

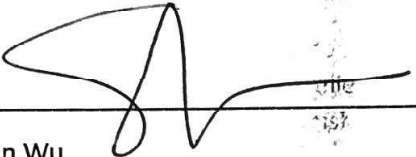
I, SHAUN WU, hereby declare:

That I possess advanced knowledge of the Japanese and English languages. The attached Japanese into English translation has been translated by me and to the best of my knowledge and belief, it is a true and accurate translation of the Japanese patent WO 2018/074498 A1.

I declare that all statements made above of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true. I have been warned and understand that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under § 1001 of Title 18 of the United States Code.

I declare (or certify, verify, or state) under penalty of perjury that the foregoing is true and correct.

Executed on April 17, 2024 in Los Angeles, California.



Shaun Wu



Notary Public



Notary Commission Expiry 10 - 23 - 2026

ACKNOWLEDGMENT

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

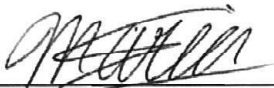
State of California
County of Los Angeles)

On April 18, 2024 before me, M. Esparza, Notary Public
(insert name and title of the officer)

personally appeared Shaun Wo
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature 

(Seal)



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

(19) International Bureau of
the World Intellectual
Property Organization

(43) International Publication Date
April 26, 2018 (04.26.2018)



(10) International Publication Number
WO 2018/074498 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/435 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
G01N 33/579 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/JP2017/037629

(22) International Filing Date:

October 18, 2017 (10.18.2017)

(25) Language of International Application: Japanese

(26) Language of International Publication: Japanese

(30) Priority Data:

JP2016-204729A, October 18, 2016 (10.18.2016) JP

(71) Applicant: **Seikagaku Corporation** [JP/JP]; 1-6-1
Marunouchi, Chiyoda-Ku, Tokyo 1000005, Japan
(JP).

(72) Inventor: **MIZUMURA, Hikaru**; Seikagaku
Corporation, 1-6-1 Marunouchi, Chiyoda-Ku,
Tokyo 1000005, Japan (JP); **KOBAYASHI, Yuki**;
Address: 1-6-1, Marunouchi, Chiyoda-Ku, Tokyo

1000005, Japan (JP). **ODA, Toshio**; Seikagaku
Corporation, 1-6-1 Marunouchi, Chiyoda-Ku,
Tokyo 1000005, Japan (JP).

(74) Agent: **SANUKI, Shinichi** et al.; Acropolis 21
Building, 8th FL., 3-4-10 Higashi Nihonbashi,
Chuo-Ku, Tokyo 1030004 (JP).

(81) Designated Countries (all types of national
protection are available unless otherwise
indicated): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54)Title: RECOMBINANT PROTEINS DERIVED FROM LIMULUS BACTERIUM, AND DNA
MOLECULES ENCODING SAME

(54) Title of Invention: RECOMBINANT PROTEINS DERIVED FROM LIMULUS BACTERIUM, AND DNA
MOLECULES ENCODING SAME

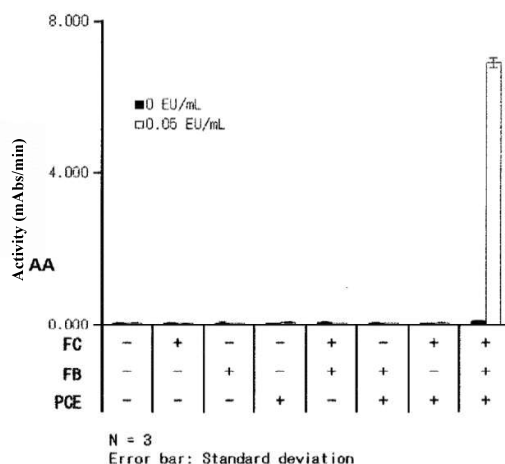


FIG. 3:
AA Activity (mAbs/min)

(57) **Abstract:** Provided are: all of full-length recombinant proteins which are involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus*; cDNA molecules encoding the full-length recombinant proteins; and uses of the full-length recombinant proteins. A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4, a recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12, a recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22, and variants thereof; cDNA molecules encoding the recombinant proteins and the variants thereof; and uses of the recombinant proteins and the variants thereof.

[Continued]



SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Designated Countries (all types of regional protection are available unless otherwise indicated): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europe (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Attached public documents:

- International search report (Article 21(3) of the Convention)
- Sequence listings presented as a separate part of the description (Rule 5.2(a));

(57) Abstract: Provided are: all of the full-length recombinant proteins which are involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus*; cDNA molecules encoding the full-length recombinant proteins; and uses of the full-length recombinant proteins. A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4, a recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12, a recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22, and variants thereof; cDNA molecules encoding the recombinant proteins and the variants thereof; and uses of the recombinant proteins and the variants thereof.

SPECIFICATION

Title of the Invention:

Recombinant proteins derived from the genus *Limulus* and DNA encoding the same

Technical Field

[0001] The present invention relates to recombinant proteins derived from the genus *Limulus*, DNA encoding the same, and methods of use thereof.

Background Art

[0002] Horseshoe crabs are said to be "living fossils," with only two genera and four species existing on Earth. There are only two genera: *Limulus*, which lives only on the east coast of the North American continent, and *Tachypleus*, which lives only in the southeastern waters of Asia.

[0003] When a group of organisms is distributed across widely separated regions, this is called a discontinuous distribution. Organisms like the horseshoe crab, which are distributed across two regions on Earth, are extremely rare.

[0004] The genus *Limulus* contains only one species, *Limulus polyphemus*. The genus *Tachypleus* contains only three species: *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas*, and *Tachypleus rotundicauda* (also called *Carcinoscorpius rotundicauda*).

[0005] It is known that an extract of amoebocytes present in the blood of this organism (amoebocyte lysate) coagulates when it comes into contact with endotoxin. Taking advantage of this property, amoebocyte lysates are widely used as a highly sensitive reagent for detecting endotoxin in the quality control of pharmaceuticals, and the like.

[0006] This reagent is called a "lysate reagent." Also, because the property of endotoxin causing coagulation was first discovered in *Limulus polyphemus*, this reagent is sometimes called "Limulus reagent" or "LAL (*Limulus* amoebocyte lysate)

reagent." Even though the reagent uses amebocyte lysate from the genus *Tachypleus*, it is conventionally called "Limulus reagent" or "LAL reagent."

[0007] Currently, the lysate reagent (Limulus reagent, LAL reagent) used by pharmaceutical manufacturers in Japan, the United States, and Europe is made from *Limulus polyphemus*. Due to concerns about extinction, capture of *Limulus polyphemus* is strictly limited, but there are reports that the population is still declining.

[0008] In order to protect horseshoe crabs, there is an idea to artificially produce proteins in amebocyte lysate using recombinant technology and prepare reagents (Patent Documents 1 to 8). In fact, products utilizing recombinant proteins, such as PyroGene (trademark) (Lonza), Endo Zyme (trademark) (HygLos), and PyroSmart (trademark) (Seikagaku Corporation), have been commercialized.

[0009] However, all of these methods use recombinant proteins derived from organisms of the genus *Tachypleus*. There have been no reports of a reagent using recombinant proteins derived from *Limulus polyphemus*, which is widely used as a lysate reagent.

[0010] The reason is that in *Limulus polyphemus*, the proteins and their genes involved in the mechanism of coagulation caused by endotoxin have not been completely identified structurally or functionally.

[0011] In the genus *Tachypleus*, for example, the complete gene sequence and amino acid sequence from *Tachypleus tridentatus* were reported (Non-Patent Document 1) in 1991, and the complete gene sequence and amino acid sequence from *Tachypleus rotundicauda* (*Carcinoscorpius rotundicauda*) were reported (Non-Patent Document 2) in 1995 with respect to factor C, a protein involved in the coagulation mechanism.

[0012] However, in *Limulus polyphemus*, even though more than 20 years have passed since the report in the genus *Tachypleus*, complete identification of these proteins and genes in terms of both structure and function has not been achieved. This is because due to the various differences and diversity of biomolecules depending on the genus and species of horseshoe crab, it has not been possible to accurately

determine the full-length sequence structure, expression, and function of these proteins and genes using conventional methods.

- [0013] In fact, a comprehensive analysis of the genes of *Limulus polyphemus* is being conducted as part of the invertebrate genome project using next-generation sequencers (<http://genome.wustl.edu/genomes/detail/limulus-polyphemus/>). The full-length sequences of all proteins and genes involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus* have not yet been elucidated. This fact also demonstrates the difficulty in accurately determining the full-length sequence structures of these proteins and genes in *Limulus polyphemus*.

Prior Art Literature

Patent Documents

- [0014] Patent Document 1: U.S. Patent No. 5,712,144 Specification
Patent Document 2: U.S. Patent No. 5,716,834 Specification
Patent Document 3: U.S. Patent No. 5,858,706 Specification
Patent Document 4: U.S. Patent No. 5,985,590 Specification
Patent Document 5: U.S. Patent No. 6,645,724 Specification
Patent Document 6: International Publication No. 2008/004674
Patent Document 7: JP2014-510898A
Patent Document 8: International Publication No. 2014/092079

Non-Patent Document

- [0015] Non-Patent Document 1: Muta T et al., Journal of Biological Chemistry, 266, 6554-6561 (1991)
Non-Patent Document 2: Ding JL et al., Molecular Marine Biology and Biotechnology, 4(1), 90-103 (1995)

Summary of the Invention

Problem To Be Solved by The Invention

- [0016] An object of the present invention is to provide all full-length recombinant

proteins involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus*, cDNAs encoding these proteins, and uses thereof.

Means For Solving the Problem

[0017] The present inventors have succeeded in obtaining full-length cDNAs encoding all of the protein factors involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus*, something that no one had succeeded in doing for many years, and in expressing all of the recombinant proteins, and have further discovered that these can be used for a variety of purposes, thereby completing the present invention.

[0018] That is, the present invention includes the following aspects.

[1]

A recombinant first protein, such as a recombinant protein which is any of the following:

(A) A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4.

(B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and having factor C activity.

(C) A recombinant protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and having factor C activity.

(D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of the complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and having factor C activity.

[2]

A recombinant second protein, such as a recombinant protein which is any of the following:

(A) A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.

(B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and having factor B activity.

(C) A recombinant protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95%

or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

(D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of the complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

[3]

A recombinant third protein, such as a recombinant protein which is any of the following:

(A) A recombinant protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22.

(B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22 and having pro-clotting enzyme activity.

(C) A recombinant protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

(D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

[1-1]

The use of a recombinant first protein to activate a protein having factor B activity (e.g., a second protein below).

(A) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.

(B) A protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and having factor B activity.

(C) A protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more

identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

(D) A protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

[1-1-1]

The use described in [1-1], wherein the second protein is a recombinant second protein.

[2-1]

The use of a recombinant second protein to activate a protein having pro-clotting enzyme activity (e.g., a third protein such as the proteins below).

(A) A protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22.

(B) A protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22 and having pro-clotting enzyme activity.

(C) A protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

(D) A protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA comprising of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

[2-1-1]

The use described in [2-1], wherein the third protein is a recombinant third protein.

[3-1]

Use of a recombinant third protein to cleave a substrate.

[3-1-1]

The use described in [3-1], wherein the substrate is a synthetic substrate.

[1-2]

A method for detecting endotoxin in a sample, comprising the step of contacting a recombinant first protein with the sample.

[1-2-1]

The method described in [1-2], further comprising a step of contacting the recombinant first protein that has been contacted with the sample with a protein having factor B activity, such as a second protein.

[1-2-1-1]

The method described in [1-2-1], wherein the second protein is a recombinant second protein.

[1-2-2]

The method described in [1-2-1] or [1-2-1-1], further comprising a step of contacting the protein having factor B activity that has been in contact with the "recombinant first protein that has been in contact with a sample" with a protein having pro-clotting enzyme activity, such as a third protein.

[1-2-2-1]

The method described in [1-2-2], wherein the third protein is a recombinant third protein.

[1-2-3]

The method described in [1-2-2] or [1-2-2-1], further comprising a step of contacting the protein having pro-clotting enzyme activity that has been in contact with "a protein having factor B activity that has been in contact with a recombinant first protein that has been in contact with a sample" with a detection substrate.

[1-3]

An endotoxin detection agent comprising a recombinant first protein.

[1-3-1]

The agent according to [1-3], further comprising a protein having factor B activity, such as a second protein.

[1-3-1-1]

The agent described in [1-3-1], wherein the second protein is a recombinant second protein.

[1-3-2]

The agent described in [1-3-1] or [1-3-1-1], further comprising a protein having pro-clotting enzyme activity, such as a third protein.

[1-3-2-1]

The agent described in [1-3-2], wherein the third protein is a recombinant third protein.

[1-4]

A cDNA which is any one of the following (hereinafter also referred to as "first cDNA"):

- (A) cDNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3.
- (B) a cDNA comprising a nucleotide sequence having 95% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3 and encoding a protein having factor C activity.
- (C) a cDNA that hybridizes under stringent conditions with a DNA consisting of a complementary sequence to the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3 and encodes a protein having factor C activity.
- (D) a cDNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4.
- (E) a cDNA comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and encoding a protein having factor C activity.

[1-4-1]

A DNA construct comprising the first cDNA.

[1-4-2]

A cell transformed with the DNA construct described in [1-4-1] and expressing a recombinant first protein.

[1-4-3]

A method for producing a recombinant first protein, comprising the step of culturing the cell according to [1-4-2].

[2-4]

A cDNA which is any one of the following (hereinafter also referred to as "second cDNA"):

- (A) cDNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11
- (B) a cDNA comprising a nucleotide sequence having 95% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11 and encoding a protein having factor B activity.
- (C) a cDNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11 and encodes a protein having factor B activity.
- (D) a cDNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.
- (E) A cDNA comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and encoding a protein having factor B activity.

[2-4-1]

A DNA construct comprising a second cDNA.

[2-4-2]

A cell transformed with the DNA construct described in [2-4-1] and expressing a recombinant second protein.

[2-4-3]

A method for producing a recombinant second protein, comprising the step of culturing the cell according to [2-4-2].

[3-4]

A cDNA which is any one of the following (hereinafter also referred to as "third cDNA"):

- (A) cDNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21.
- (B) a cDNA comprising a nucleotide sequence having 95% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21 and encoding a protein having pro-clotting enzyme activity.

(C) a cDNA that hybridizes under stringent conditions with a DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21 and encodes a protein having pro-clotting enzyme activity.

(D) a cDNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22.

(E) A cDNA encoding a protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22 and having pro-clotting enzyme activity.

[3-4-1]

A DNA construct comprising the third cDNA.

[3-4-2]

A cell transformed with the DNA construct described in [3-4-1] and expressing a recombinant third protein.

[3-4-3]

A method for producing a recombinant third protein, comprising the step of culturing the cell according to [3-4-2].

[1-5]

A method for producing an endotoxin detection agent, comprising the step of artificially expressing a protein using a first cDNA.

[1-5-1]

The manufacturing method described in [1-5], further comprising a step of artificially expressing a protein using a second cDNA.

[1-5-2]

The manufacturing method described in [1-5-1], further comprising a step of artificially expressing a protein using a third cDNA.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0019] FIG.1 is an electrophoretic photograph of PCR products in the process of

obtaining cDNA for a protein having *Limulus polyphemus* factor C activity.

FIG. 2 is an electrophoretic photograph of PCR products in the process of obtaining cDNA for a protein having *Limulus polyphemus* factor C activity.

FIG. 3 is a diagram showing the cleaving activity of a synthetic substrate upon contact of each recombinant protein alone or in a mixture with endotoxin.

FIG. 4 is a diagram showing the standard curve for endotoxin using a mixture of three types of recombinant proteins.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0020] <1> Recombinant first protein and method for producing same

(1) Recombinant first protein

The first recombinant protein is a recombinant protein that has Factor C activity.

[0021] The recombinant first protein is specifically a recombinant protein which is any of the following:

(I) A recombinant protein comprising the amino acid sequence of a protein having factor C activity of *Limulus polyphemus*.

(II) A variant of (I) above, which is a recombinant protein having factor C activity.

[0022] Examples of the amino acid sequence of a protein having *Limulus polyphemus* factor C activity include the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 4. Further, examples of the base sequence encoding such an amino acid sequence include the base sequences shown in SEQ ID NO:1 or 3.

[0023] The recombinant first protein may more specifically be a recombinant protein that is any of the following:

(A) A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4.

(B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and having factor C activity.

(C) A recombinant protein encoded by DNA comprising a base sequence having

95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and having factor C activity.

(D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of the complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and having factor C activity.

[0024] The expressions "comprising an amino acid sequence" or "comprising a base sequence" also encompass the cases "consisting of the amino acid sequence" or "consisting of the base sequence."

[0025] This protein was obtained for the first time in the world by the method disclosed in the Embodiments of this Specification, and its full-length sequence, structure and function have been elucidated for the first time. Its function is to become active in the presence of endotoxin and to convert proteins having factor B activity, such as the second protein described below, into their active form (referred to as "factor C activity" in the present application). The first recombinant protein may exhibit Factor C activity at least in combination with a second protein, such as the second recombinant protein.

[0026] Having factor C activity means that the recombinant protein of interest is conjugated to a second protein (not in an activated form). Combination with a protein (inactive type) having factor B activity such as the third protein (inactive type), a protein (inactive type) having pro-clotting enzyme activity such as the third protein (inactive type), and a detection substrate, can be confirmed by detecting the progression of the cascade reaction in the presence of endotoxin.

[0027] "Cascade reaction" refers to a series of reactions in which a protein having factor C activity (inactive form) is activated by endotoxin, a protein having factor B activity (inactive form) is activated by a protein having factor C activity (active form), and a protein having pro-clotting enzyme activity (inactive form) is activated by the protein having factor B activity (active form). The progress of the cascade reaction can be detected by cleavage of the detection substrate.

[0028] Among the recombinant first proteins, the most preferred are the recombinant

proteins of (I) above, such as the recombinant protein of (A) above, but variants thereof may also be used so long as they have factor C activity.

[0029] A variant may be, for example, a recombinant protein that comprises an amino acid sequence that includes one or several amino acid substitutions, deletions, insertions, and/or additions at one or several positions in the amino acid sequence of a recombinant first protein as described above (e.g., the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4), and has factor C activity. The above-mentioned "one or several" may be, for example, 1 to 20, 1 to 10, 1 to 5, or 1 to 3. The above-mentioned substitution, deletion, insertion, and/or addition of one or several amino acids are conservative mutations that maintain the normal function of the protein. A representative example of a conservative mutation is a conservative substitution. Conservative are mutations that substitute for each other, for example, between Phe, Trp, and Tyr when the substitution site is an aromatic amino acid, between Leu, Ile, and Val when the substitution site is a hydrophobic amino acid, between Gln and Asn when polar amino acids, and between Lys, Arg, and His when basic amino acids, between Asp and Glu when acidic amino acids, and between Ser and Thr when amino acids with hydroxyl groups. These mutations substitute each other. Substitutions that are considered to be conservative substitutions include, specifically: Substitution of Ala to Ser or Thr, substitution of Arg to Gln, His or Lys, substitution of Asn to Glu, Gln, Lys, His or Asp, substitution of Asp to Asn, Glu or Gln, substitution of Cys to Ser or Ala, substitution of Gln to Asn, Glu, Lys, His, Asp or Arg, Substitution of Glu with Gly, Asn, Gln, Lys or Asp, substitution of Gly with Pro, substitution of His with Asn, Lys, Gln, Arg or Tyr, substitution of Ile with Leu, Met, Val or Phe, substitution of Leu with Ile, Met, Val or Phe; substitution of Lys with Asn, Glu, Gln, His or Arg; substitution of Met with Ile, Leu, Val or Phe; substitution of Phe with Trp, Tyr, Met, Ile or Leu; substitutions of Ser with Thr or Ala, substitutions of Thr with Ser or Ala, substitutions of Trp with Phe or Tyr, substitutions of Tyr with His, Phe or Trp, and substitutions of Val with Met, Ile or Leu.

[0030] The variant may also be, for example, a recombinant protein that contains an amino acid sequence that has 80% or more, 90% or more, 95% or more, 96% or

more, 97% or more, 98% or more, or 99% or more identity to the amino acid sequence of the recombinant first protein as described above (e.g., the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4) and has factor C activity.

[0031] The variant may also be a recombinant protein that is encoded by DNA containing a base sequence that has 80% or more, 90% or more, 95% or more, 96% or more, 97% or more, 98% or more, or 99% or more identity to the base sequence encoding the amino acid sequence of the recombinant first protein as described above (e.g., the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3), and that has factor C activity.

[0032] The variant may also be, for example, a recombinant protein that is encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of a base sequence encoding the amino acid sequence of the above-mentioned recombinant first protein (for example, the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3), and that has factor C activity. The "stringent conditions" are as described in Molecular Cloning, edited by T. Maniatis et al.: This refers to the conditions under which so-called specific hybrids are formed and non-specific hybrids are not formed in the normal hybridization procedure described in, for example, A Laboratory Manual 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory. Specifically, "stringent conditions" refers to conditions in which the sodium salt concentration is 15 to 750 mM, preferably 50 to 750 mM, and more preferably 300 to 750 mM, the temperature is 25 to 70°C, preferably 50 to 70°C, and more preferably 55 to 65°C, and the formamide concentration is 0 to 50%, preferably 20 to 50%, and more preferably 35 to 45%. Further, under stringent conditions, the conditions for washing the filter after hybridization typically include a sodium salt concentration of 15 to 600 mM, preferably 50 to 600 mM, and more preferably 300 to 600 mM, and a temperature of 50 to 70°C, preferably 55 to 70°C, and more preferably 60 to 65°C.

[0033] Specifically, the variants are preferably the recombinant proteins (B) to (D) above. The "95% or more" in the above (B) and (C) is preferably 96% or more, more preferably 97% or more, more preferably 98% or more, and more preferably 99% or more.

[0034] Further, any peptide such as a His tag or a V tag may be added to the recombinant first protein, so long as it has factor C activity.

[0035] In addition, in the present application, the term "recombinant protein" refers to a protein obtained by artificially introducing a gene encoding the protein into a host cell other than horseshoe crab and expressing the gene. Therefore, the protein itself obtained from natural horseshoe crabs does not fall under the category of "recombinant protein" in this application.

[0036] (2) Method for Producing Recombinant First Protein

Since the complete amino acid sequence of the recombinant first protein has been disclosed for the first time by the present invention, it can be produced, for example, by genetic engineering techniques using DNA encoding this sequence. The method for producing the first recombinant protein by genetic engineering techniques is not particularly limited, and for example, a typical method for producing a protein by genetic engineering techniques can be used. The first recombinant protein can be produced, for example, by utilizing a heterologous expression system or a cell-free protein synthesis system.

[0037] For example, the first cDNA described below can be artificially introduced into a host cell other than horseshoe crab, and a protein can be expressed from this cDNA to produce the recombinant first protein. The present invention also provides a method for producing such a recombinant first protein.

[0038] When artificially introducing DNA into a host cell, a DNA construct (such as a vector) into which the DNA has been artificially incorporated may be used. An example of such an artificial DNA construct is a DNA construct into which the first cDNA has been incorporated. Such artificial DNA constructs are described below.

[0039] Host cells other than horseshoe crab are not particularly limited, so long as they are capable of functionally expressing a protein from the first cDNA. Host cells other than those of horseshoe crab include, for example, mammalian cells and insect cells. Mammals include rodents and primates. Rodents include Chinese hamsters, hamsters, mice, rats, and guinea pigs. An example of a Chinese hamster

cell is a Chinese hamster ovary-derived cell line (CHO). Examples of CHO include CHO DG44, CHO S, and CHO K1. Primates include, but are not limited to, humans, monkeys, and chimpanzees. Human cells include human embryonic kidney (HEK) derived cell lines. An example of HEK is HEK293.

[0040] "Functionally expressed" means that the expressed recombinant first protein exhibits Factor C activity. The presence of factor C activity can be confirmed by the method described in the Embodiments below. Further, whether or not the expressed protein contains a target amino acid sequence, such as any of the structures (A) to (D), can be confirmed by analyzing the amino acid sequence of the expressed protein and comparing it with the target amino acid sequence.

[0041] The method for artificially introducing the first cDNA into a host cell is not particularly limited, so long as the cDNA is retained in the host cell in an expressible state. The first recombinant protein can be expressed by growing the host cell into which the first cDNA has been artificially introduced.

[0042] The transformed host cells can be grown, for example, by culturing the cells. The culture conditions are not particularly limited as long as the cells can grow and proliferate, and conditions normally used for culturing the cells can be used with appropriate modifications as necessary. For example, when the host cell is a mammalian cell, a medium generally used for culturing mammalian cells can be used. Examples of such media that can be used include RPMI1640 medium (Sigma), DMEM medium (Sigma), and ExpiCHOTM Expression Medium (Thermo Fisher Scientific). The culture can be carried out, for example, at 36° C to 38° C under a supply of 5% to 8% CO₂ by static culture or suspension culture. Kits specifically designed for protein expression may also be used.

[0043] The expressed recombinant first protein can be recovered as a solution fraction containing it and used for various applications described below.

[0044] The solution fraction containing the recombinant first protein may be, for example, a culture medium, a culture supernatant, a cell lysate extract, or a mixture thereof.

The recombinant first protein may be purified to a desired extent before use, or may be used as is without purification.

[0045] Purification can be carried out by known methods used for protein purification. Such methods include ammonium sulfate precipitation, gel filtration chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, hydroxyapatite chromatography, and the like.

[0046] The present invention makes it possible for the first time to artificially and functionally express a recombinant first protein. The recombinant first protein thus produced can be used, for example, for the purposes described below.

[0047] <2> Recombinant second protein and method for producing same

The recombinant second protein is a recombinant protein that has factor B activity.

[0048] The recombinant second protein is specifically a recombinant protein that is any of the following:

(I) A recombinant protein comprising the amino acid sequence of a protein having *Limulus polyphemus* factor B activity.

(II) A recombinant protein which is a variant of (I) and has factor B activity.

[0049] Examples of the amino acid sequence of a protein having *Limulus polyphemus* factor B activity include the amino acid sequences shown in SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12. Further, examples of base sequences encoding such amino acid sequences include the base sequences shown in SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11.

[0050] The recombinant second protein may more specifically be a recombinant protein that is any of the following:

(A) A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.

(B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and having factor B activity.

(C) A recombinant protein encoded by DNA containing a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

(D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of the complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

[0051] The function of this protein is to be activated by a protein (activated form) having factor C activity, such as the activated first protein, and this is the function of converting proteins having pro-clotting enzyme activity, such as the third protein described below, into an active form (referred to as "factor B activity" in this application). The recombinant second protein may exhibit factor B activity at least in combination with a first protein, such as the recombinant first protein, and a third protein, such as the recombinant third protein.

[0052] Having factor B activity can be confirmed by detecting the progress of the cascade reaction when the target recombinant protein is combined with a protein (active type) having factor C activity such as protein 1 (active type), a protein (inactive type) having pro-clotting enzyme activity such as protein 3 (inactive type), and a detection substrate. This can be confirmed by detecting the progress of the cascade reaction. This system may further contain endotoxin for converting a protein having factor C activity (inactive form) into an active form.

[0053] For other details, the explanation in <1> above can be applied mutatis mutandis. That is, for example, in the above <1>, "SEQ ID NO: 1 or 3" can be read as "SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11," "SEQ ID NO: 2 or 4" can be read as "SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12," "(recombinant) first protein" can be read as "(recombinant) second protein," "first cDNA" can be read as "second cDNA," "factor C" can be read as "factor B," and the like.

[0054] <3> Recombinant third protein and method for producing same

The recombinant third protein is a recombinant protein having pro-clotting enzyme activity.

[0055] The recombinant third protein is specifically a recombinant protein which is any of the following:

(I) A recombinant protein comprising an amino acid sequence of a protein having pro-clotting enzyme activity of *Limulus polyphemus*.

(II) A recombinant protein which is a variant of (I) and has pro-clotting enzyme activity.

[0056] Examples of the amino acid sequence of a protein having pro-clotting enzyme activity of *Limulus polyphemus* include the amino acid sequences shown in SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22. Further, examples of base sequences encoding such amino acid sequences include the base sequences shown in SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, and 21.

[0057] The recombinant third protein may more specifically be a recombinant protein that is any of the following:

(A) A recombinant protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22.

(B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22 and having pro-clotting enzyme activity.

(C) A recombinant protein encoded by DNA containing a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

(D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

[0058] The function of this protein is to be activated by a protein (activated form) having factor B activity, such as an activated second protein, and this is the function of cleaving a substrate (protein or peptide) described below (referred to as "pro-clotting enzyme activity" in this application). The recombinant third protein

may exhibit pro-clotting enzyme activity at least in combination with a second protein, such as the recombinant second protein.

[0059] Having pro-clotting enzyme activity means can be confirmed by detecting the progress of the cascade reaction when the recombinant protein of interest is combined with a protein (activated form) having factor B activity, such as a second protein (activated form), and a detection substrate. This can be confirmed by detecting the progress of the cascade reaction. This system may further contain a protein having factor C activity (active form) for converting a protein having factor B activity (inactive form) into an active form. Further, this system may further contain endotoxin for converting a protein having factor C activity (inactive form) into an active form.

[0060] For other details, the explanation in <1> above can be applied mutatis mutandis. That is, for example, in the above <1>, "SEQ ID NO: 1 or 3" can be read as "SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21," "SEQ ID NO: 2 or 4" can be read as "SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22," "(recombinant) first protein" can be read as "(recombinant) third protein," "first cDNA" can be read as "third cDNA," "factor C" can be read as "pro-clotting enzyme," and the like.

[0061] <4> Use of the recombinant first protein

The recombinant first protein can be used to activate a protein having factor B activity, such as a second protein. In other words, the present invention encompasses a method for activating a protein having factor B activity, comprising the step of contacting a recombinant first protein with a protein having factor B activity.

[0062] Proteins having factor B activity include a second protein.

[0063] The second protein is specifically any of the following proteins:

(I) A protein containing the amino acid sequence of a protein having *Limulus polyphemus* factor B activity.

(II) A variant of (I) above, the protein having factor B activity.

[0064] The second protein may more specifically be a protein that is any of the following:

(A) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.

(B) A protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and having factor B activity.

(C) A protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

(D) A protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.

[0065] Proteins having factor B activity also include the following proteins:

(III) A protein containing the amino acid sequence of a protein having factor B activity from a horseshoe crab other than *Limulus polyphemus*.

(IV) A variant of the above (III), which has factor B activity.

[0066] The explanation of the protein having factor B activity can be applied mutatis mutandis to the explanation in <2> above.

[0067] The present invention has demonstrated for the first time that the recombinant first protein (A) retains factor C activity. The protein (A) and its variants having such functions are applied to the activation of a protein having factor B activity.

[0068] The protein having factor B activity used herein may be one obtained from a natural product or one artificially produced (e.g., recombinant second protein), so long as it has the above-mentioned structure and function. The present invention makes it possible for the first time to artificially and functionally express a recombinant second protein. It has become possible to stably produce the second protein with a consistent quality without obtaining it from natural *Limulus polyphemus*. Therefore, the protein having factor B activity is preferably a recombinant second protein.

[0069] Activation of a protein having factor B activity using recombinant protein 1 can be achieved by contacting a recombinant protein 1 (active) molecule with a protein having factor B activity (inactive) molecule. In order to convert the recombinant first protein into an active form, the recombinant first protein (inactive form) may be contacted with a protein having factor B activity (inactive form) in the presence of endotoxin.

[0070] The conditions for this contact are not particularly limited, so long as they are conditions under which the recombinant first protein (active form) can exert factor C activity and activate the protein having factor B activity (if the contact is performed in the presence of endotoxin, the conditions are also conditions under which the endotoxin can activate the recombinant first protein). For example, reaction conditions for a known lysate reagent can be adopted.

[0071] Activation of a protein having factor B activity can be confirmed by the method described in the Embodiments below.

[0072] <5> Use of recombinant second protein

The recombinant second protein can be used to activate a protein that has pro-clotting enzyme activity, such as a third protein. In other words, the present invention encompasses a method for activating a protein having pro-clotting enzyme activity, comprising the step of contacting a recombinant second protein with a protein having pro-clotting enzyme activity.

[0073] An example of a protein having pro-clotting enzyme activity is the third protein.

[0074] The third protein is specifically any of the following proteins:

(I) A protein comprising the amino acid sequence of a protein having pro-clotting enzyme activity of *Limulus polyphemus*.

(II) A variant of (I) above, the protein having pro-clotting enzyme activity.

[0075] The third protein may more specifically be a protein that is any of the following:

(A) A protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22.

(B) A protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22 and having pro-clotting enzyme activity.

(C) A protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

(D) A protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA comprising of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21, and having pro-clotting enzyme activity.

[0076] Further, examples of proteins having pro-clotting enzyme activity include the following proteins:

(III) A protein containing the amino acid sequence of a protein having pro-clotting enzyme activity of a horseshoe crab other than *Limulus polyphemus*.

(IV) A variant of the above (III), the protein having pro-clotting enzyme activity.

[0077] The explanation of the protein having pro-clotting enzyme activity can be applied mutatis mutandis to the explanation of <3> above.

[0078] The protein having pro-clotting enzyme activity used herein may be one obtained from a natural product or one artificially produced (e.g., recombinant third protein) so long as it has the above-mentioned structure and function.

[0079] Activation of a protein having pro-clotting enzyme activity using a recombinant second protein can be achieved by contacting a recombinant second protein (active) molecule with a protein having pro-clotting enzyme activity (inactive) molecule. Further, in order to convert the recombinant second protein into an active form, the recombinant second protein (inactive form) may be contacted with a protein having pro-clotting enzyme activity (inactive form) in the presence of a protein having factor C activity (active form). Still further, in order to activate

this protein having factor C activity, it may be contacted with a protein having factor C activity (inactive form), a recombinant second protein (inactive form), and a protein having pro-clotting enzyme activity (inactive form) in the presence of endotoxin.

[0080] The conditions for this contact are not particularly limited, so long as they are conditions under which the recombinant second protein (active type) can exhibit factor B activity and activate a protein with pro-clotting enzyme activity (where carried out in the presence of a protein having factor C activity (active form), conditions under which the protein having factor C activity (active form) can further exhibit factor C activity and activate the recombinant second protein and where performed in the presence of endotoxin, conditions that allow endotoxin to activate proteins with factor C activity). For example, reaction conditions for a known lysate reagent can be adopted.

[0081] Activation of the third protein can be confirmed by the method described in the Embodiments below.

[0082] An example of a protein having factor C activity is protein 1.

[0083] The first protein is specifically any of the following proteins:

(I) A protein comprising the amino acid sequence of a protein having factor C activity of *Limulus polyphemus*.

(II) A variant of (I) above, the protein having factor C activity.

[0084] The first protein may more specifically be a protein that is any of the following:

(A) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4.

(B) A protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and having factor C activity.

(C) A protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3 and having factor C activity.

(D) A protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with

DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and that has factor C activity.

[0085] Proteins having factor C activity also include the following proteins:

(III) A protein comprising the amino acid sequence of a protein having factor C activity from a horseshoe crab other than *Limulus polyphemus*.

(IV) A variant of the above (III), which has factor C activity.

[0086] The explanation of the protein having factor C activity can be applied mutatis mutandis to the explanation of <1> above.

[0087] The protein having factor C activity used herein may be one obtained from a natural product or one artificially produced (for example, recombinant first protein), so long as it has the above-mentioned structure and function.

[0088] For other details, the explanation in <4> above can be applied mutatis mutandis.

[0089] <6> Use of recombinant third protein

The recombinant third protein can be used to cleave the substrate. In other words, the present invention encompasses a method for cleaving a substrate comprising the step of contacting a recombinant third protein with the substrate.

[0090] This substrate can also be used as the above-mentioned "detection substrate," and may be a naturally occurring substrate or a synthetic substrate. Such a substrate is not particularly limited as long as it is cleaved by the pro-clotting enzyme activity of a protein (active form) having pro-clotting enzyme activity, such as the third protein (active form).

[0091] Examples of substances that are cleaved by the activity of the pro-clotting enzyme include proteins such as coagulogens and synthetic substrates represented by the general formula X-Y-Z (wherein X- is a protecting group covalently bonded to Y, Y is a peptide residue, and -Z is a signal substance bonded to Y by an amide bond).

[0092] The protecting group X is not particularly limited, and any known protecting group for peptides can be used. Such protecting groups include, for example, t-butoxycarbonyl and benzoyl groups.

- [0093] The peptide residue Y is also not particularly limited, and examples thereof include Leu-Gly-Ar9 (LGR) and Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR) (SEQ ID NO: 23).
- [0094] The signal substance Z is also not particularly limited, and examples thereof include dyes and fluorescent dyes that are detectable under visible light. Examples of such dyes include pNA (paranitroaniline), MCA (7-methoxycoumarin-4-acetic acid), DNP (2,4-dinitroaniline), and Dansyl dyes.
- [0095] Among these, Boc-Leu-Gly-Ar9-pNA (t-butoxycarbonyl-leucyl-glycyl-arginyl-paranitroaniline, Boc-LGR-pNA) is preferred.
- [0096] When coagulogen is used as the substrate, cleaving of the substrate by the pro-clotting enzyme activity can be detected by detecting "gelation," for example. Gelation can be detected, for example, by visually detecting a decrease in fluidity.
- [0097] Further, when the synthetic substrate as described above is used, the substrate cleaved by the pro-clotting enzyme activity can be detected, for example. By detecting a signal, Z is released to emit a signal such as color or fluorescence when the amide bond between Y and Z is broken. The detection of a signal may be carried out by a method appropriate for the type of the signal. For example, the signal of pNA can be detected by absorbance (405 nm).
- [0098] Cleaving of a substrate using a recombinant third protein can be carried out by contacting a recombinant third protein (active form) molecule with a substrate molecule. In order to convert the recombinant third protein into an active form, the recombinant third protein (inactive form) may be contacted with a substrate in the presence of a protein having factor B activity (active form). Further, in order to convert this protein having factor B activity into an active form, a protein having factor B activity (inactive form), a recombinant third protein (inactive

form), and a substrate may be contacted in the presence of a protein having factor C activity (active form). Further, in order to convert this protein having factor C activity into an active form, the protein having factor C activity (inactive form), the protein having factor B activity (inactive form), the recombinant third protein (inactive form), and the substrate may be contacted in the presence of endotoxin.

[0099] The conditions for this contact are not particularly limited as long as they are conditions under which the recombinant third protein (active type) can exhibit pro-clotting enzyme activity and cleave the substrate (where carried out in the presence of a protein having factor B activity (active form), conditions under which the protein having factor B activity (active form) can further exhibit factor B activity and activate the recombinant third protein and where carried out in the presence of a protein having factor C activity (active form), conditions under which the protein having factor C activity (active form) can further exhibit factor C activity and activate the second protein and where carried out in the presence of endotoxin, conditions required to allow endotoxin to activate proteins with factor C activity). For example, reaction conditions for a known lysate reagent can be adopted.

[0100] For other details, the explanation in <4> above can be applied mutatis mutandis.

[0101] <7> Method for detecting endotoxin

The method for detecting endotoxin of the present invention is a method for detecting endotoxin in a sample, which comprises the step of contacting the recombinant first protein with the sample.

[0102] The method may further include the step of contacting the recombinant first protein that has been contacted with the sample with a protein having factor B activity, such as a second protein. The protein having factor B activity can be a recombinant second protein.

[0103] This method may further include a step of contacting the protein having factor B activity that has been in contact with the "recombinant first protein that has been in contact with the sample" with a protein having pro-clotting enzyme activity, such as a third protein. The protein having pro-clotting enzyme activity may be a recombinant third protein.

[0104] Endotoxin in a sample can be detected by detecting activation of recombinant

protein 1 that has come into contact with the sample. Activation of the recombinant first protein can be confirmed by the method described in the Embodiments below. Further, the activation of the recombinant first protein can also be directly detected using a substrate (detection substrate). That is, by using as a detection substrate a substance that is cleaved by the factor C activity of the activated recombinant first protein to emit a signal, activation of the recombinant first protein can be directly detected. Therefore, this method may further comprise the step of contacting the "recombinant first protein contacted with the sample" with a detection substrate.

[0105] When the method further includes a step of contacting with a protein having factor B activity, the activation of the protein having factor B activity can be detected by the method described in <4> above. Further, the activation of a protein having factor B activity can also be detected directly using a substrate (detection substrate). That is, by using as a detection substrate a substance that is cleaved by the factor B activity of an activated protein having factor B activity and emits a signal, the activation of a protein having factor B activity can be directly detected. Thus, this method may further comprise the step of contacting the "protein having factor B activity contacted with the recombinant first protein" with a detection substrate.

[0106] The method further comprising a step of contacting the method with a protein having pro-clotting enzyme activity can be performed by detecting the activation of a protein having pro-clotting enzyme activity (cleavage of a substrate by the method described in <6> above) by the method described in <5> above. Therefore, this method may further comprise the step of contacting "the protein having pro-clotting enzyme activity that has been contacted with the protein having factor B activity" with a substrate (detection substrate). Examples of detection substrates capable of detecting the activation of a protein having pro-clotting enzyme activity include those exemplified in the above item <6>.

[0107] These steps may be performed sequentially or simultaneously. For example, when these steps are performed simultaneously, the sample, recombinant first protein (inactive form), a protein having factor B activity (inactive form), a protein

having pro-clotting enzyme activity (inactive form), and a detection substrate may be contacted simultaneously in the same system.

[0108] The contact conditions are the same as those described in <4> to <6> above. For example, the contact between the recombinant first protein and the sample is not particularly limited as long as the conditions are such that endotoxin in the sample can activate the recombinant first protein. The contact conditions may be, for example, reaction conditions for known lysate reagents. For example, the pH of the reaction solution may be 5 to 10, preferably 7 to 8.5. The reaction temperature may be from 10°C to 80°C, preferably from 20°C to 50°C, and more preferably from 30°C to 40°C. The reaction temperature is, for example, 37°C. The reaction time is not particularly limited and may be appropriately set depending on various conditions. The reaction time may be, for example, 5 minutes to 2 hours, preferably 15 minutes to 90 minutes, and more preferably 30 minutes to 40 minutes.

[0109] The specimen is not particularly limited as long as it is a sample in which endotoxin needs to be detected. Examples of specimens include medical water, pharmaceuticals, infusions, blood formulations, medical devices, medical instruments, cosmetics, food and drink, environmental samples, biological components, natural proteins, recombinant proteins, nucleic acids, and carbohydrates. The specimen itself, or an extract or washing solution thereof, can be mixed, dispersed or dissolved in a reaction system and subjected to endotoxin detection.

[0110] Endotoxin may be detected qualitatively or quantitatively. Quantitative detection can be performed by making a connection in advance using a calibration curve or a relational expression of the relationship between the amount (concentration) and the detection level depending on the type of substrate (for example, the degree of "gelation" when using coagulogen as a substrate, and the degree of signal when using a synthetic substrate) using multiple standards with different endotoxin amounts (concentrations) and converting endotoxin amount (concentration) from the detection level when using actual samples, for example.

[0111] <8> Endotoxin detection agent

The endotoxin detection agent of the present invention is an endotoxin

detection agent that contains the recombinant first protein.

- [0112] The detection agent may further comprise a protein having factor B activity, such as a second protein. The protein having factor B activity may be a recombinant second protein.
- [0113] The detection agent may further comprise a protein having pro-clotting enzyme activity, such as a third protein. The protein having pro-clotting enzyme activity may be a recombinant third protein.
- [0114] As explained in <1> to <3> above, these proteins may be in a form present, for example, in a culture medium, a culture supernatant, a cell lysate extract, or a mixture thereof. These proteins may be purified to a desired extent before use, or may be used as is without purification. For example, when these proteins are contained in the culture supernatant, the medium may be used as it contains the medium components.
- [0115] The amounts of the recombinant first protein, the protein having factor B activity, and the protein having pro-clotting enzyme activity in this detection agent can be appropriately determined depending on the activity of each protein, and the like. For example, the final concentration of each protein in the reaction solution mixed with the sample can be 15 to 30 µg/mL.
- [0116] The detection agent may further comprise a substrate (detection substrate).
- [0117] The detection agent can be produced by incorporating these substances as constituents. The detection agent may further contain additives such as excipients, stabilizers, and buffers. Further, the form of this detection agent is not particularly limited, and it can be formulated in any form, such as a solid (for example, a freeze-dried form) or a liquid.
- [0118] In this detection agent, these substances may be contained together as components in a single container, or may be contained in separate containers.
- [0119] The detection agent may further contain a dissolution buffer, an endotoxin standard, a reaction vessel (e.g., a tube or a microplate), and the like. The detection agent also includes the form of a kit.
- [0120] This detection agent can be used, for example, in the method described in <7> above.

[0121] <9> First cDNA and its use

(1) First cDNA

The first cDNA is a cDNA that is either:

- (A) cDNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3.
- (B) a cDNA comprising a nucleotide sequence having 95% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3 and encoding a protein having factor C activity.
- (C) a cDNA that hybridizes under stringent conditions with a DNA consisting of a complementary sequence to the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3 and encodes a protein having factor C activity.
- (D) a cDNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4.
- (E) a cDNA comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and encoding a protein having factor C activity.

[0122] This cDNA was obtained for the first time in the world by the method disclosed in the Embodiments of this Specification, and this is the first time that the full-length sequence structure and the function of the protein encoded thereby have been elucidated. Its function is "factor C activity."

[0123] Among the first cDNAs, the cDNA (A) above is most preferred, but variants thereof may also be used so long as the protein encoded thereby has factor C activity.

[0124] Specifically, the variants are preferably the cDNAs (B) to (E) above. The "95% or more" in the above (B), (C), and (E) is preferably 96% or more, more preferably 97% or more, more preferably 98% or more, and more preferably 99% or more.

[0125] In addition, the meaning of "stringent conditions" and other explanations can be applied mutatis mutandis to the explanation in <1> above.

[0126] The first cDNA may also have any codon replaced with an equivalent codon. For

example, a cDNA obtained by replacing any codon in the cDNA of (A) above with an equivalent codon is included in the cDNA of (D) above.

[0127] Since the complete nucleotide sequence of the first cDNA has been disclosed by the present invention, it can be produced by known DNA synthesis techniques or genetic engineering techniques using this sequence information. The first cDNA was first obtained by the method described in the Embodiments below, but since its base sequence has been disclosed in the present invention, it can also be produced by methods other than those described in the Embodiments.

[0128] (2) DNA construct containing first cDNA, transformed cell, and method for producing recombinant first protein using the same

The present invention provides a DNA construct comprising the first cDNA. An example of such an artificial DNA construct is a vector. As the vector, a plasmid, a virus, or other known vector can be appropriately selected depending on the purpose, such as amplification, maintenance, or introduction of recombinant DNA, library construction, cloning, or protein translation (protein expression). By introducing the first cDNA into such a vector or the like, a DNA construct containing the first cDNA can be produced.

[0129] The present invention also provides a cell comprising the first cDNA. Such cells may, for example, be cells transformed with such a DNA construct and express the recombinant first protein. The present invention also provides a method for producing a recombinant first protein, which comprises the step of culturing such cells.

[0130] The method for transforming a cell (host cell) with the DNA construct and the method for culturing the transformed cell to produce the recombinant first protein can be similarly described in <1> (2) above.

[0131] <10> Second cDNA

(1) Second cDNA

The second cDNA is a cDNA that is either:

(A) cDNA containing the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11.

(B) a cDNA comprising a nucleotide sequence having 95% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11 and encoding a protein having factor B activity.

(C) a cDNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11 and encodes a protein having factor B activity.

(D) a cDNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.

(E) A cDNA comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and encoding a protein having factor B activity.

[0132] For other explanations, the explanation in <9> (1) above can be applied mutatis mutandis. That is, for example, "factor C" in the above item <9> (1) may be read as "factor B," and "first cDNA" as "second cDNA," and the like.

[0133] (2) DNA construct containing second cDNA, transformed cell, and method for producing recombinant second protein using the same

The present invention provides a DNA construct comprising the second cDNA. The invention also provides cells containing the second cDNA, such as cells transformed with such a DNA construct to express a recombinant second protein. The present invention also provides a method for producing a recombinant second protein, which comprises the step of culturing such cells.

[0134] For other explanations, the explanation in <9> (2) above can be applied mutatis mutandis.

[0135] <11> Third cDNA

(1) The third cDNA

The third cDNA is a third cDNA that is any of the following:

(A) cDNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21.

(B) a cDNA comprising a nucleotide sequence having 95% or more identity to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21 and

encoding a protein having pro-clotting enzyme activity.

(C) a cDNA that hybridizes under stringent conditions with a DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, or 21 and encodes a protein having pro-clotting enzyme activity.

(D) a cDNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22.

(E) A cDNA encoding a protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22 and having pro-clotting enzyme activity.

[0136] For other explanations, the explanation in <9> (1) above can be applied mutatis mutandis. That is, for example, "factor C" in <9> (1) above can be read as "pro-clotting enzyme," and "first cDNA" can be read as "third cDNA," and the like.

[0137] (2) The present invention related to a method for producing recombinant third protein using DNA construct containing the third cDNA and transformed cells provides a DNA construct containing a third cDNA. The invention also provides cells containing the third cDNA, such as cells transformed with such a DNA construct to express a recombinant third protein. The present invention also provides a method for producing a recombinant third protein, which comprises the step of culturing such cells.

[0138] For other explanations, the explanation in <9> (2) above can be applied mutatis mutandis.

[0139] <12> Method for producing endotoxin detection agent

The present invention also provides a method for producing an endotoxin detection agent, which comprises the step of artificially expressing a protein using the first cDNA.

[0140] The method may further include the step of artificially expressing the protein using a second cDNA. The method may further include the step of artificially expressing a protein using a third cDNA.

[0141] The method for artificially expressing a protein using these cDNAs is not particularly limited, but the methods described in <9> (2), <10> (2), and <11> (2)

above can be used, for example.

- [0142] In this manner, a recombinant first protein is expressed by artificial expression using the first cDNA. Similarly, a second recombinant protein is expressed artificially using a second cDNA, and a third recombinant protein is expressed artificially using a third cDNA.
- [0143] The expressed protein is, as explained in <1> to <3> above, and it may be in a form present in a culture medium, a culture supernatant, a cell lysate extract, or a mixture thereof, for example. These proteins may be purified to a desired extent before use, or may be used as is without purification. For example, when these proteins are contained in the culture supernatant, the medium may be used as it contains the medium components.
- [0144] For other details, the explanation in <8> above can be applied mutatis mutandis. Therefore, the method for producing the endotoxin detection agent of the present invention also includes the method for producing the kit.
- [0145] In the present invention, either or both of the second protein (e.g., recombinant second protein) and the third protein (e.g., recombinant third protein) may be replaced with their counterparts derived from horseshoe crabs other than *Limulus polyphemus*. The same applies to the second and third cDNAs. Examples of horseshoe crabs other than *Limulus polyphemus* include organisms belonging to the genus *Tachypleus*, such as *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas*, and *Tachypleus rotundicauda*.
- [0146] That is, B factor (such as recombinant B factor) derived from horseshoe crabs other than *Limulus polyphemus* (such as *Tachypleus tridentatus*) in place of a second protein (such as a recombinant second protein), pro-clotting enzyme derived from the same organism (such as recombinant pro-clotting enzyme) in place of a third protein (recombinant third protein, etc.), a B factor gene (cDNA etc.) derived from the same organism in place of a second cDNA, and a pro-clotting enzyme gene (cDNA, etc.) derived from the same organism instead of the third cDNA may be used, respectively.
- [0147] Any of these proteins and genes may contain an amino acid sequence or a

nucleotide sequence that is actually found in a horseshoe crab other than *Limulus polyphemus*, or may be a variant thereof. For variants, the explanations of variants in <1> to <11> above can be applied mutatis mutandis. Further, these proteins and genes may or may not be derived from the same horseshoe crab other than *Limulus polyphemus*.

- [0148] As is clear from the above explanation, the method for producing an endotoxin detection agent of the present invention includes artificially introducing each of the first cDNA, the second cDNA, and the third cDNA (with regard to the second cDNA and the third cDNA, either one or both of which may be replaced with a gene derived from a horseshoe crab other than *Limulus polyphemus* (such as *Tachypleus tridentatus*)) into a host cell other than that of a horseshoe crab, and each recombinant protein (3 types in total) was expressed from each of these cDNAs. Next, as described above in <8>, Embodiments in which each of these expressed recombinant proteins is contained as a constituent component are also included.

Embodiments

- [0149] Hereinafter, the present invention will be described in detail with reference to examples. However, these are merely illustrative of the present invention and the scope of the present invention is not limited to these Embodiments.

- [0150] (1) Synthesis of primers

In order to attempt to clone a protein having factor C activity in *Limulus polyphemus*, the following primers were synthesized.

- [0151] <Primers used for cloning a protein having factor C activity>
SK15-dT20: CTGCAGGAATTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO: 24)
SK15-FC-S: ATCGATAAGCTTGATGATCTGGGCTTGTGTGATGA (SEQ ID NO: 25)
SK15-AS: CTGCAGGAATTCGAT (SEQ ID NO: 26)
LFC-5'race: CTACACCAAGTTCCA (SEQ ID NO: 27)
LFC-1st-S: GTAAACCATGTGACAACTGGAGGC (SEQ ID NO: 28)
LFC-1st-As: AATAAGGCCTCCATCGATAGAAGTA (SEQ ID NO: 29)
LFC-EcoRI-kozak-S:
GGGGAATTCAAGCTTGCCACCATGGTACTAGCGTCGTTC (SEQ ID NO: 30)

LFC-XhoI-stop-As: GGGCTCGAGTCAAATGAACTGCCGAATCCACGATA
(SEQ ID NO: 31)

[0152] In order to attempt cloning of a protein having factor B activity and a protein having pro-cloning enzyme activity, the following primers were synthesized.

[0153] <Primers used for cloning a protein having factor B activity and a protein having pro-clotting enzyme activity>

SK15-FB-S: ATCGATAAGCTTGATCACATGCAAGGAAAAGTTCT (SEQ ID NO: 32)

SK15-FB-As: CTGCAGGAATTCGATCACTGTTTAAACAACTGAA (SEQ ID NO: 33)

SK15-PCE-S: ATCGATAAGCTTGATAGACCAGAGTGGTCTTTCTG (SEQ ID NO :34)

SK15-As: CTGCAGGAATTCGAT (SEQ ID NO: 26)

[0154] (2) Preparation of total RNA from hemocytes of *Limulus polyphemus*

Total RNA was prepared using the PureLink (registered trademark) RNA Mini Kit and the PureLink (registered trademark) DNase kit (Thermo Fisher Scientific), and the basic operations were performed according to the attached instructions. TRIzol solution was added to 2.23 g of a pool of hemocytes of *Limulus polyphemus* to disrupt the cells. Thereafter, chloroform was added thereto and the mixture was centrifuged to obtain an aqueous layer. Ethanol was added to the resulting aqueous layer, which was then passed through a silica membrane cartridge provided in the kit to bind the nucleic acid components to the silica membrane. DNase I provided with the kit was added to this silica membrane to degrade DNA, and after washing the cartridge, an elution buffer was added to recover total RNA (1.3 mg).

[0155] (3) Obtaining cDNA (first cDNA) encoding a protein having *Limulus polyphemus* factor C activity

(3-1) First step

A reverse transcription reaction was carried out using the total RNA recovered in (2) above as a template and SK15-d20 (SEQ ID NO: 24) as a primer to obtain cDNA. This primer is designed to selectively bind to the polyA sequence of mRNA, and further has an additional sequence outside that can be used for polymerase chain reaction (PCR). In this reaction, SuperScript III Reverse

Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) was used as the reverse transcriptase, and the reaction conditions were in accordance with the attached instructions.

[0156] (3-2) Second step

PCR was performed using the obtained cDNA as a template, SK15-FC-S (SEQ ID NO: 25) as a sense primer, SK15-As (SEQ ID NO: 26) as an antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) as a polymerase.

[0157] The PCR products were confirmed by agarose gel electrophoresis. The target DNA (LpFC1) was barely detectable, and nonspecific DNA amplification was detected (Figure 1A). So, the following steps were attempted: In Figure 1A, lane "1" is the size marker, and lane "2" is the PCR product. The triangle marks the area where LpFC1 is predicted to be present.

[0158] (3-3) Third Step

The region where LpFC1 was predicted to be present was excised from the gel, and DNA was extracted and purified. Using this as a template, PCR was performed using SK15-FC-S (SEQ ID NO: 25) as a sense primer, SK15-As (SEQ ID NO: 26) as an antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) as a polymerase.

[0159] The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, and surprisingly, the target DNA (LpFC1) was significantly amplified (FIG. 1B). This LpFC1 was excised from the gel, extracted and purified. As a result, obtaining a partial DNA fragment (LpFC1) that may encode a protein having *Limulus polyphemus* factor C activity was achieved. In FIG. 1B, lane "1" is the size marker, and lane "2" is the PCR product. The triangle indicates the location of LpFC1.

[0160] (3-4) Fourth Step

LpFC1 was mixed with EcoRV enzyme-treated pBluescript II SK (+), and the vector was introduced by recombination reaction using In-Fusion HD Enzyme premix (Takara Bio). The reaction product was transformed into *E. coli* DH5 α competent cells, which were then spread onto an ampicillin LB medium plate containing X-Gal and IPTG, and colonies were selected by blue-white screening.

- [0161] DNA amplification was then performed by colony PCR on the candidate colonies. In this case, M13-20 Primer was used as the sense primer, M13 Reverse Primer was used as the antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) was used as the polymerase. The resulting PCR product was subjected to agarose gel electrophoresis, and then excised from the gel, extracted, and purified DNA (LpFC1) was used as a template to confirm the sequence-by-sequence PCR. This resulted in the determination of the DNA sequence of LpFC1.
- [0162] (3-5) Fifth step
- The 5' end of synthetic DNA LFC-5race (SEQ ID NO: 27), which was prepared with reference to the sequence information of LpFC1, was phosphorylated with T4 Polynucleotide Kinase (Takara Bio) in the presence of ATP. The target DNA (LpFC2) was obtained by reverse transcription reaction using the total RNA as a template, the obtained phosphorylated primer, and the reverse transcriptase Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). As a result, a partial DNA fragment (LpFC2) which may code for an amino acid sequence containing a portion of a protein having the activity of *Limulus polyphemus* factor C was obtained.
- [0163] LpFC2 was treated at high temperature (95°C, 2 min) in the presence of RNase A, followed by ethanol precipitation. Subsequent treatment with T4 RNA Ligase (New England Biolabs) resulted in the production of concatemeric DNA (LpFC3) in which LpFC2 was continuously linked. As a result, a partial DNA fragment (LpFC3) which may code for an amino acid sequence comprising a portion of a protein having the activity of *Limulus polyphemus* factor C was obtained.
- [0164] PCR was performed using LpFC3 as a template, LFC-1st-S (sequence number 28) as a sense primer, LFC-1st-As (sequence number 29) as an antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) to amplify the target DNA (LpFC4).
- [0165] When the PCR products were examined by agarose gel electrophoresis, the target DNA (LpFC4) was hardly detectable, and non-specific DNA amplification was detected (Figure 2A). So, the following steps were attempted: In Figure 2A, lane

"1" is the size marker, and lane "2" is the PCR product. The triangle indicates the position of LpFC4.

[0166] (3-6) 6th step

The region where LpFC4 was expected to be present was excised from the gel, and DNA was extracted and purified. Using this as a template, PCR was performed using LFC-1st-S (SEQ ID NO: 28) as a sense primer, LFC-1st-As (SEQ ID NO: 29) as an antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) as a polymerase.

[0167] The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, and to our surprise, the target DNA (LpFC4) was significantly amplified and detected at a very high concentration (Figure 2B). This LpFC4 was excised from the gel, extracted and purified. As a result, there was success in obtaining a partial DNA fragment (LpFC4) that may code for an amino acid sequence containing a portion of a protein having Limulus polyphemus factor C activity. In FIG. 2B, lane "1" is the size marker, and lane "2" is the PCR product. The triangle marks indicate areas where LpFC4 is predicted to be present.

[0168] The sequence of LpFC4 was analyzed by sequence PCR using LpFC4 as a template. This revealed the 5' DNA sequence of the target protein.

[0169] (3-7) Seventh step

PCR was performed using the cDNA obtained in (3-1) above as a template, LFC-EcoRI-kozak-S (sequence number 30) as a sense primer, LFC-XhoI-stop-As (sequence number 31) as an antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) as a polymerase.

[0170] The PCR product was purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, and then treated with EcoRI and XhoI enzymes. The restriction enzyme digestion products were subjected to agarose gel electrophoresis and excised from the gel, and the DNA was extracted and purified to obtain the target DNA (LpFC5).

[0171] LpFC5 was mixed with the expression vector pCA7 (Takeda et al., 2005, J. Virol. 79:14346-14354) that had been treated with EcoRI and XhoI enzymes, and ligation reaction was carried out using Ligation Mix (Takara Bio). The reaction mixture was transformed into E. coli DH5 α competent cells and spread onto an

ampicillin-containing LB medium plate. The resulting colonies were selected by colony PCR and then inoculated onto ampicillin-containing LB medium.

[0172] After cultivation, plasmid purification was performed using NucleoSpin® Plasmid Easy Pure (Macherey-Nagel). The nucleotide sequences of the two clones obtained were analyzed by sequence PCR using the plasmids as templates.

[0173] This resulted in the first successful elucidation of the full-length cDNA sequence (sequence number 1, sequence number 3) encoding a protein that may have Limulus polyphemus C factor activity, and the full-length amino acid sequence of that protein (sequence number 2, sequence number 4). SEQ ID NOs: 1 and 3 (SEQ ID NOs: 2 and 4) are in a variant relationship, and are considered to be based on polymorphism between individuals. The expression and activity analysis of this protein will be described later.

[0174] (4) Obtaining cDNA (second cDNA) of a protein having Limulus polyphemus B factor activity

Using the cDNA obtained in (3-1) above as a template, PCR was performed using SK15-FB-S (sequence number 32) as the sense primer, SK15-FB-As (sequence number 33) as the antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) as the polymerase. The amplified fragment was cloned in the same manner as described above (3-4), and the nucleotide sequences of the four clones obtained were analyzed.

[0175] This resulted in the elucidation of the full-length cDNA sequences encoding proteins that may have Limulus polyphemus factor B activity (sequence number 5, sequence number 7, sequence number 9, sequence number 11) and the full-length amino acid sequences of those proteins (sequence number 6, sequence number 8, sequence number 10, sequence number 12). SEQ ID NOs: 5, 7, 9 and 11 (SEQ ID NOs: 6, 8, 10 and 12) are related to variants and are believed to be based on polymorphism between individuals. The expression and activity analysis of this protein will be described later.

[0176] (5) Obtaining cDNA (third cDNA) of a protein having pro-clotting enzyme activity of Limulus polyphemus

PCR was performed using the cDNA obtained in (3-1) above as a template,

SK15-PCE-S (sequence number 34) as a sense primer, SK15-As (sequence number 26) as an antisense primer, and Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) as a polymerase. The amplified fragment was cloned in the same manner as in (3-4) above, and the nucleotide sequences of the five resulting clones were analyzed.

[0177] As a result, the full-length sequences of the cDNAs encoding proteins that may have pro-clotting enzyme activity of *Limulus polyphemus* (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21) and the full-length amino acid sequences of those proteins (SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22) were elucidated. SEQ ID NOs: 13, 15, 17, 19 and 21 (SEQ ID NOs: 14, 16, 18, 20 and 22) are related to variants and are considered to be based on polymorphism between individuals. The expression and activity analysis of this protein will be described later.

[0178] (6) Expression of recombinant proteins

The cDNA (SEQ ID NO: 13) obtained in (5) above was ligated to pCA7, a vector for expressing proteins in mammalian cells, to obtain an expression plasmid. The cDNA (SEQ ID NO: 5) obtained in (4) above was ligated to the protein expression vector pCA7 according to the literature (Kobayashi et al., 2015, J Biol Chem, 290:19379-19386) to obtain an expression plasmid. Using these expression plasmids and the expression plasmid obtained in (3-7) above (containing the cDNA of sequence number 1) and the ExpiCHOTM Expression System (Thermo Fisher Scientific), each recombinant protein was obtained as a culture supernatant fraction.

[0179] Transfection of the expression plasmid into cells and recovery of the recombinant protein were carried out according to the attached instructions.

[0180] As a result, there was success for the first time in expressing and obtaining a protein from *Limulus polyphemus* that may have factor C activity (sequence number 2), a protein that may have factor B activity (sequence number 6), and a protein that may have pro-clotting enzyme activity (sequence number 14). The activity analysis of these proteins will be described later.

[0181] (7) Activity measurement

In the presence of 50 mM Tris buffer (pH 8.0) and synthetic substrate (Boc-LGR-pNA), various combinations of the three recombinant proteins obtained in (6) above examined the endotoxin-dependent activation of three types of recombinant proteins using United States Pharmacopoeia Standard Endotoxin (USP-RSE, Seikagaku Corporation) (0 EU/mL, 0.05 EU/mL; EU is an endotoxin unit) as a sample. The reaction was carried out at 37°C for 30 minutes.

[0182] If the cascade reaction proceeds in this assay system, the protein having factor C activity is activated by endotoxin, this activated protein having factor C activity activates a protein having factor B activity, this activated protein having factor B activity activates a protein having pro-clotting enzyme activity and the synthetic substrate Boc-LGR-pNA is cleaved by the activated protein having pro-clotting enzyme activity, thereby resulting in the release of pNA, which was detected by measuring the change in absorbance (A405 nm). As a result, cleaving of the synthetic substrate was observed when all three recombinant proteins were present (Figure 3). In Figure 3, FC is the protein expressed from the cDNA obtained in (3-7) above, FB is the protein expressed from the cDNA obtained in (4) above, and PCE is the protein expressed from the cDNA obtained in (5) above. The final protein concentrations in the reaction solution (100 μ L) mixed with the endotoxin sample were 22.8 μ g/mL for FC, 20.0 μ g/mL for FB, and 23.5 μ g/mL for PCE. Each assay was performed in triplicate, and the standard deviation is shown in the figure as an error bar.

[0183] Based on this, the expressed protein which may have factor C activity, the protein which may have factor B activity, and the protein which may have pro-clotting enzyme activity have factor C activity, factor B activity, and pro-clotting enzyme activity, respectively, and this demonstrated for the first time that contact with endotoxin triggers a cascade reaction. It was also demonstrated for the first time that these recombinant proteins can be used to detect endotoxin.

[0184] Further, under these conditions, the concentration dependency of endotoxin was examined, and a calibration curve was prepared. The curve showed good linearity in the concentration range of 0.001 to 0.1 EU/mL (Figure 4). The assay was

performed in triplicate at each endotoxin concentration, and the standard deviation is shown in the figure as an error bar.

[0185] The above results demonstrated for the first time that the use of each of the three recombinant proteins enables quantitative detection of endotoxin with high sensitivity and accuracy.

[0186] (8) Activity comparison with recombinant factor C from *Tachypleus* sp.

The activity of recombinant factor C (hereinafter referred to as "LFC") derived from *Limulus polyphemus* was compared with that of recombinant factor C (hereinafter referred to as "TFC") derived from the genus *Tachypleus*.

[0187] LFC was obtained as a culture supernatant fraction by expressing the cDNA of SEQ ID NO: 1 in the same manner as described above in (6). TFC was obtained as a culture supernatant fraction by expressing the C factor gene of *Tachypleus tridentatus* (SEQ ID NO: 1 in WO2014/092079) by the method described in Example 1.(2) of the same document in the same manner as in (6) above. Here, pCI-neo (Promega) was used as the protein expression vector.

[0188] Western blotting was performed on the LFC and TFC to be tested using a factor C-specific monoclonal antibody (2C12; Yoshiki Miura, et al., J. Biochem. 112: 476-481 (1992)). Equal volumes of samples (3 μ L each) were applied and the band intensities were measured optically to give LFC of 18,036 and TFC of 24,516. That is, the relative amount of recombinant factor C in equal volumes of samples (TFC/LFC) was 1.4.

[0189] Next, the activities of each recombinant factor C in a cascade reaction system (a system containing factor C, factor B, and pro-clotting enzyme) were compared. Both the B factor and the pro-clotting enzyme were recombinant proteins derived from the genus *Tachypleus*. The former expresses the factor B gene of *Tachypleus tridentatus* (SEQ ID NO: 5 in WO2014/092079), and the latter expresses the pro-clotting enzyme gene of the same organism (SEQ ID NO: 7 in the same document) by the method described in the same document (Example 2. Preparation of recombinant factor B and recombinant pro-clotting enzyme), and the culture supernatant fraction was used.

[0190] The activities of each sample of recombinant factor C (LFC or TFC) (both at the

same volume), as well as the above-mentioned recombinant factor B (TFB) derived from *Tachyplesus tridentatus* and recombinant pro-clotting enzyme (TPCE) derived from the same, were measured by the method described in (7) above. The conditions were the same except for the recombinant C factor used.

[0191] In each cascade reaction system, the change in absorbance (mAbs/min) at endotoxin concentrations of 0 EU/mL (blank) and 0.05 EU/mL was 0.53 and 14.27 in the LFC system, and 0.51 and 9.15 in the TFC system. That is, in this system, LFC showed approximately 1.6 times the activity of TFC (approximately 2.2 times when the difference in protein amount mentioned above is taken into consideration).

[0192] The disclosure of Japanese Patent Application No. 2016-204729 (filing date: October 18, 2016) is hereby incorporated by reference in its entirety into this Specification.

[0193] All publications, patent applications, and technical standards mentioned in this Specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication, patent application, or technical standard was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Industrial Applicability

[0194] According to the present invention, all full-length recombinant proteins involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus*, cDNAs encoding these proteins, and uses thereof can be provided. The present invention is particularly useful for detecting endotoxin.

[0195] [Explanation of sequence listing]

SEQ ID NO: 1: Base sequence of the first cDNA

SEQ ID NO: 2: Amino acid sequence of the first protein

SEQ ID NO: 3: Nucleotide sequence of the first DNA - variant 1

SEQ ID NO: 4: Amino acid sequence of first protein - variant 1

SEQ ID NO: 5: Nucleotide sequence of the second cDNA

SEQ ID NO: 6: Amino acid sequence of the second protein

SEQ ID NO: 7: Nucleotide sequence of the second cDNA - variant 1

SEQ ID NO: 8: Amino acid sequence of the second protein - variant 1

SEQ ID NO: 9: Nucleotide sequence of the second cDNA - variant 2

SEQ ID NO: 10: Amino acid sequence of the second protein - variant 2

SEQ ID NO: 11: Nucleotide sequence of the second cDNA - variant 3

SEQ ID NO: 12: Amino acid sequence of the second protein - variant 3

SEQ ID NO: 13: Base sequence of the third cDNA

SEQ ID NO: 14: Amino acid sequence of the third protein

SEQ ID NO: 15: Nucleotide sequence of the third cDNA - variant 1

SEQ ID NO: 16: Amino acid sequence of the third protein - variant 1

SEQ ID NO: 17: Nucleotide sequence of the third cDNA - variant 2

SEQ ID NO: 18: Amino acid sequence of the third protein - variant 2

SEQ ID NO: 19: Nucleotide sequence of the third cDNA - variant 3

SEQ ID NO: 20: Amino acid sequence of the third protein - variant 3

SEQ ID NO: 21: Nucleotide sequence of the third cDNA-variant 4

SEQ ID NO: 22: Amino acid sequence of the third protein - variant 4

SEQ ID NO: 23: Synthetic substrate peptide IEGR

SEQ ID NOs: 24 to 34: primers

Claims

- [Claim 1] A recombinant protein which is any of the following:
- (A) A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4.
 - (B) A recombinant protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and having factor C activity.
 - (C) A recombinant protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and having factor C activity.
 - (D) A recombinant protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of the complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3, and having factor C activity.
- [Claim 2] Use of the recombinant protein according to claim 1 for activating the following protein:
- (A) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12.
 - (B) A protein comprising an amino acid sequence having 95% or more identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12 and having factor B activity.
 - (C) A protein encoded by DNA comprising a base sequence having 95% or more identity to the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.
 - (D) A protein encoded by DNA that hybridizes under stringent conditions with DNA consisting of a complementary sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, 9, or 11, and having factor B activity.
- [Claim 3] A method for detecting endotoxin in a sample, comprising a step of contacting the recombinant protein described in claim 1 with the sample.

[Claim 4] An endotoxin detection agent comprising the recombinant protein according to Claim 1.

SEQUENCE LISTING

<110> Seikagaku Corporation

<120> Recombinant protein of Limulus and cDNA encoding the same

<130> F201706-7383

<150> JP2016-204729

<151> 2016-10-18

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3063

<212> DNA

<213> Limulus polyphemus

<400> 1

atggtactag	cgtcgttctt	ggtgtctggt	ttagttctag	ggctattagc	ccaacaaatg	60
cacccagttc	agtccagagg	agtagatctg	ggcttggtg	atgacacgag	gtttgagtgt	120
aagtgtggag	atccaggata	cgtgttcaac	gtccccgcga	agcaatgtac	gtacttctat	180
cgatggaggc	cttattgtaa	accatgtgac	aaactggagg	ctaaagatgt	gtgtcccaag	240
tacaaacgat	gtcaagagtg	tagggctggt	ctcgacagtt	gtgtgagttg	tccacctaac	300
aaatatggaa	cttggtgtag	cggtagtggt	cagtgtgaaga	atgggggtat	ttgtgatcag	360
aggacaggag	cttgtagatg	tcgtgacaga	tatgaagggtg	tgcattgtga	aatccttcaa	420
ggttgctctc	ttcttcaatc	ggatccccag	gttcaggaag	taaaaaatcc	accaaataat	480
ccacaaacta	ttgactacag	ctgttcacca	ggcttcaagc	ttaaaggcgt	ggcacgtatc	540
acctgtcttc	caaattgggca	gtggagtagc	tttccacca	aatgtattcg	agaatgttcc	600
atggtttcat	ctctagaaca	tggcaaaagta	aactctccta	gtgccgatct	gatagaagga	660
gctactttta	ggttctcatg	tgatagtccc	tactacttga	ttgggtcaaga	aacattaacc	720
tgccagggca	acggtcagtg	gagtgggcag	ataccacagt	gtcagaaatt	ggtcttctgc	780
cctgaccttg	accctgtaag	ccatgctgaa	caccagggtta	aaattggcct	agaacaaaaa	840
tatggtcaat	ttcctcaagg	cactgaagta	acctatacgt	gtactggtaa	ttacttcttg	900
atggggtttg	acaccttaaa	atgtaaccct	gatgggtcct	ggtcgggaac	acagccgtcc	960
tgtgtttaaag	tggcagacag	agagggtcaac	tgtgacagta	aagctgtgga	cttcttggat	1020
gatgtttggcg	aacctgtcag	gatccactgt	cctgctggct	gttccttaac	tgctggtact	1080
gtatggggta	cagccatata	tcacgaactt	tcctcagtat	gtcgtgcagc	tattcatgct	1140
ggcaagggtc	caaactctgg	agggtcagtg	catgtagtga	acaacggtcc	gtactcagac	1200
tttctggcta	gtgatctgaa	tgggataaaa	tcagacgagt	tgaagtctct	tgctcagagt	1260
ttccgattcg	attatgtcag	ttcatcaaca	gcaggagagaa	agtcaggatg	tcctgatgga	1320
tggttcgaga	ttgaggagaa	ctgtgtgtac	gttacatcga	aacagagagc	ctgggaaaga	1380
gctcaagggtg	tatgtacca	tatggccgct	cgtcttgctg	tgtagacaa	agatgtaatt	1440
ccaagttcct	tgactgagac	tctacgaggg	aaagggttag	caacgacgtg	gattggacta	1500
cacagattag	atgctgataa	tcactttatt	tgggagctaa	tggatcgag	tagtggtgct	1560
ttgaatgaca	gcctaacatt	ctgggctcct	ggagaacctg	ggaatgaaac	taactgtgta	1620
tatctggata	tccaagatca	gctacagcca	gtgtggaaaa	ccaagtcttg	ttttcaaccc	1680
tcaagttttg	tttgtatgat	ggatttgtca	gacaagaaca	aagccaaatg	caaagaccct	1740

```

ggaccttttg aaaacggaca cgccaagctt catggtcaaa gtattgatgg attttatgct 1800
gggtcttctg taagatacag ctgcgaggtc ctccactacc tcagtggaac tgagacagta 1860
tcttgtacat caaatggcac gtggagtgcc cctaaacctc gatgtattaa agtcatcacc 1920
tgccaaaccc ctcctgtacc atcctatggt tctgtggaca tcaaaccccc aagtagaaca 1980
aactcaatca gtcgtgttgg gtcgccattc ttgaggttgc cacggttacc cctcccctta 2040
gccagagcag ccggacctcc tccaaaacct agatccgcac caccctctac tgtggacctg 2100
tcttccaagg tcaaactgcc tgaaggatcat taccgggtgg ggtctcaagc catttacacg 2160
tgcgagtcaa gatactacga actgcttggg tctcaaggta gaagatgcga ctctaattgga 2220
aagtggagtg gtcgaccagc aagctgtata ccagtttgtg gacggtcaga ctctccccgt 2280
tctcctttca tcgtcaatgg aaattccacc gaaatagggtc agtggccgtg gcaggcagga 2340
atctccagat ggcttgacga tcataatatg tggtttcttc agtgtggagg agctctactg 2400
aatgagaaat ggatcattac tgcagcccac tgtgtcacct actctgtac tgccgagatc 2460
attgacccaa gtcagttaa attctacctg ggcaaatact atcgagatga cagtaaggat 2520
gatgactacg tacaagtaag agaggctatc gagatccatg tgaatcctaa ctacgatcct 2580
ggaaatctca actttgacat agccctgatt caactgaaga cttctgttgc tctgaccaca 2640
cgagtgaac caatatgtct gcctactgat ctactacaa gagaaaacct gaaagagggg 2700
gcgttagcgg tggtagacagg atgggggttg aatgaaaaca acacatattc agagatgatt 2760
cagcaagccg ttctgcctgt tgttgacgca agcacctgtg aacaaggata tcaggactcg 2820
ggcttgccac tgacagtgc agagaacatg ttctgtgcag gttacaagca ggggctctat 2880
gatgcctgca gtggagacag tggaggacca ttagtgtttg ctgatgattc ccgcaccgat 2940
aggcggtggg tcctggaagg gatcgtcagc tggggcagcc ccaatggatg tggcaagtct 3000
aaccagtatg ggggcttcac taaagttaac gtttttctat cgtggattcg gcagttcatt 3060
tga

```

```

<210> 2
<211> 1020
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 2
Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu
1          5          10          15
Ala Gln Gln Met His Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu
20        25        30
Cys Asp Asp Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val
35        40        45
Phe Asn Val Pro Ala Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro
50        55        60
Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Lys Leu Glu Ala Lys Asp Val Cys Pro Lys
65        70        75        80
Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Arg Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Ser
85        90        95
Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys
100       105       110
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg
115       120       125
Asp Arg Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ile Leu Gln Gly Cys Pro Leu
130       135       140
Leu Gln Ser Asp Pro Gln Val Gln Glu Val Lys Asn Pro Pro Asn Asp

```

145					150					155				160	
Pro	Gln	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Lys	Gly
				165					170					175	
Val	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Leu	Pro	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Ser	Phe	Pro
			180					185					190		
Pro	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Cys	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Leu	Glu	His	Gly
		195					200					205			
Lys	Val	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Arg
		210				215					220				
Phe	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly	Gln	Glu	Thr	Leu	Thr
225					230					235					240
Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Gly	Gln	Ile	Pro	Gln	Cys	Gln	Lys
				245					250					255	
Leu	Val	Phe	Cys	Pro	Asp	Leu	Asp	Pro	Val	Ser	His	Ala	Glu	His	Gln
			260					265					270		
Val	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gln	Phe	Pro	Gln	Gly	Thr
		275					280					285			
Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Tyr	Phe	Leu	Met	Gly	Leu	Asp
		290				295					300				
Thr	Leu	Lys	Cys	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Ser
305					310					315					320
Cys	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Arg	Glu	Val	Asn	Cys	Asp	Ser	Lys	Ala	Val
				325					330					335	
Asp	Phe	Leu	Asp	Asp	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Arg	Ile	His	Cys	Pro	Ala
			340					345					350		
Gly	Cys	Ser	Leu	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Gly	Thr	Ala	Ile	Tyr	His
		355					360					365			
Glu	Leu	Ser	Ser	Val	Cys	Arg	Ala	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Lys	Val	Pro
		370				375					380				
Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	His	Val	Val	Asn	Asn	Gly	Pro	Tyr	Ser	Asp
385					390					395					400
Phe	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Ser
				405					410					415	
Leu	Ala	Gln	Ser	Phe	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly
			420					425					430		
Arg	Lys	Ser	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly	Trp	Phe	Glu	Ile	Glu	Glu	Asn	Cys
		435					440					445			
Val	Tyr	Val	Thr	Ser	Lys	Gln	Arg	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Val
		450				455					460				
Cys	Thr	Asn	Met	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Lys	Asp	Val	Ile
465					470					475					480
Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Thr	Thr
				485					490					495	
Trp	Ile	Gly	Leu	His	Arg	Leu	Asp	Ala	Asp	Asn	His	Phe	Ile	Trp	Glu
			500					505					510		
Leu	Met	Asp	Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	Trp
		515					520					525			
Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Asn	Glu	Thr	Asn	Cys	Val	Tyr	Leu	Asp	Ile
	530					535					540				
Gln	Asp	Gln	Leu	Gln	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro

945		950		955		960									
Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Asp
		965						970						975	
Ser	Arg	Thr	Asp	Arg	Arg	Trp	Val	Leu	Glu	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
		980						985						990	
Ser	Pro	Asn	Gly	Cys	Gly	Lys	Ser	Asn	Gln	Tyr	Gly	Gly	Phe	Thr	Lys
	995					1000						1005			
Val	Asn	Val	Phe	Leu	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Ile				
	1010					1015					1020				

<210> 3
 <211> 3063
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 3

atggtactag	cgctcgttctt	ggtgtctggt	ttagttctag	ggctattagc	ccaacaaatg	60
caccagttc	agtcagagg	agtagatctg	ggcttgtgtg	atgacacgag	gtttgagtgt	120
aagtgtggag	atccaggata	cgtgttcaac	gtccccgcga	agcaatgtac	gtacttctat	180
cgatggaggc	cttattgtaa	accatgtgac	aaactggagg	ctaaagatgt	gtgtcccaag	240
tacaaacgat	gtcaagagtg	tagggctggt	ctcgacagtt	gtgtgagttg	tccacctaac	300
aaatatggaa	cttgggtgtag	cggtagtggt	cagtgtgaaga	atgggggtat	ttgtgatcag	360
aggacaggag	cttgtagatg	tcgtgacaga	tatgaagggtg	tgcattgtga	aatccttcaa	420
ggttgtcctc	ttcttcaatc	ggatccccag	gttcaggaag	taaaaaatcc	accaaagtat	480
ccacaaacta	ttgactacag	ctgttcacca	ggcttcaagc	ttaaaggcgt	ggcacgtatc	540
acctgtcttc	caaattgggca	gtggagtagc	tttccacca	aatgtattcg	agaatgttcc	600
atggtttcat	ctctagaaca	tggcaaagta	aactctccta	gtgccgatct	gatagaagga	660
gctactttta	ggttctcatg	tgatagtccc	tactacttga	ttgggtcaaga	aacattaacc	720
tgccagggca	acggtcagtg	gagtgggcag	ataccacagt	gtcagaaatt	ggtcttctgc	780
cctgaccttg	accctgcaag	ccatgctgaa	caccagggtta	aaattggcct	agaacaaaaa	840
tatggtcaat	ttcctcaagg	cactgaagta	acctatacgt	gtactggtaa	ttacttcttg	900
atgggttttg	acaccttaaa	atgtaaccct	gatgggtcct	ggtcgggaac	acagccgtcc	960
tgtgtttaaag	tggcagacag	agagggtcaac	tgtgacagta	aagctgtgga	cttcttggtat	1020
gatgtttggc	aacctgtcag	gatccactgt	cctgctggct	gttccttaac	tgctgggtact	1080
gtatggggta	cagccatata	tcacgaactt	tcctcagtat	gtcgtgcagc	tattcatgct	1140
ggcaagggtc	caaactctgg	aggtgcagtg	catgtagtga	acaacgggtc	gtactcagac	1200
tttctggcta	gtgatctgaa	tgggataaaa	tcagacgagt	tgaagtctct	tgctcagagt	1260
ttccgattcg	attatgtcag	ttcatcaaca	gcaggggagaa	agtcaggatg	tcctgatgga	1320
tggttcgaga	ttgaggagaa	ctgtgtgtac	gttacatcga	aacagagagc	ctgggaaaga	1380
gctcaagggtg	tatgtaccaa	tatggccgct	cgtcttgctg	tgtagacaa	agatgtaatt	1440
ccaagttcct	tgactgagac	tctacgaggg	aaagggttag	caacgacgtg	gattggacta	1500
cacagattag	atgctgataa	tcactttatt	tgggagctaa	tggatcgag	tagtggtgct	1560
ttgaatgaca	gcctaacatt	ctgggctcct	ggagaacctg	ggaatgaaac	taactgtgta	1620
tatctggata	tccaagatca	gctacagcca	gtgtggaaaa	ccaagtcttg	ttttcaaccc	1680
tcaagttttg	tttgtatgat	ggatttgtca	gacaagaaca	aagccaaatg	caaagaccct	1740
ggaccttttg	aaaacggaca	cgccaagctt	catgggtcaaa	gtattgatgg	atthttatgct	1800
gggtcttctg	taagatacag	ctgcgaggtc	ctccactacc	tcagtggaaac	tgagacagta	1860
tcttgtagat	caaattggcac	gtggagtgcc	cctaaacctc	gatgtattaa	agtcatcacc	1920
tgccaaaccc	ctcctgtacc	atcctatggt	tctgtggaca	tcaaaccccc	aagtagaaca	1980

```

aactcaatca gtcgtgttgg gtcgccattc ttgaggttgc cacggttacc cctcccttta 2040
gccagagcag cgggacctcc tccaaaacct agatccgcac caccctctac tgtggacctg 2100
tcttccaagg tcaaactgcc tgaaggatcat taccgggtgg ggtctcaagc catttacacg 2160
tgcgagtcaa gatactacga actgcttggga tctcaaggta gaagatgcga ctctaattgga 2220
aagtggagtg gtcgaccagc aagctgtata ccagtttgtg gacggtcaga ctctccccgt 2280
tctcctttca tcgtcaatgg aaattccacc gaaataggctc agtggccgtg gcaggcagga 2340
atctccagat ggcttgcaga tcataatatg tggtttcttc agtgtggagg agctctactg 2400
aatgagaaat ggatcattac tgcagccac tgtgtcacct actctgctac tgccgagatc 2460
attgacccaa gtcagtttaa attctacctg ggcaataact atcgagatga cagtaaggat 2520
gatgactacg tacaagtaag agaggctatc gagatccatg tgaatcctaa ctacgatcct 2580
ggaaatctca actttgacat agccctgatt caactgaaga cttctgttgc tctgaccaca 2640
cgagtgcac caatatgtct gcctactgat ctcactacaa gagaaaacct gaaagaggga 2700
gcgttagcgg tggtagcagg atgggggttg aatgaaaaca acacatattc agagatgatt 2760
cagcaagccg ttctgcctgt tgttgcagca agcacctgtg aacaaggata tcaggactcg 2820
ggcttgccac tgacagtgc agagaacatg ttctgtgcag gttacaagca ggggcgctat 2880
gatgcctgca gtggagacag tggaggacca ttagtgtttg ctgatgattc ccgcaccgat 2940
aggcggtggg tcctggaagg gatcgtcagc tggggcagcc ccaatggatg tggcaagtct 3000
aaccagtatg ggggcttcac taaagttaac gtttttctat cgtggattcg gcagttcatt 3060
tga

```

```

<210> 4
<211> 1020
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 4
Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu
1          5          10          15
Ala Gln Gln Met His Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu
20        25        30
Cys Asp Asp Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val
35        40        45
Phe Asn Val Pro Ala Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro
50        55        60
Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Lys Leu Glu Ala Lys Asp Val Cys Pro Lys
65        70        75        80
Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Arg Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Ser
85        90        95
Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys
100       105       110
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg
115       120       125
Asp Arg Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ile Leu Gln Gly Cys Pro Leu
130       135       140
Leu Gln Ser Asp Pro Gln Val Gln Glu Val Lys Asn Pro Pro Asn Asp
145       150       155       160
Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly
165       170       175
Val Ala Arg Ile Thr Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro

```

			180					185				190							
Pro	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Cys	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Leu	Glu	His	Gly				
		195					200					205							
Lys	Val	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Arg				
	210					215					220								
Phe	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly	Gln	Glu	Thr	Leu	Thr				
225					230					235					240				
Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Gly	Gln	Ile	Pro	Gln	Cys	Gln	Lys				
			245					250						255					
Leu	Val	Phe	Cys	Pro	Asp	Leu	Asp	Pro	Ala	Ser	His	Ala	Glu	His	Gln				
		260					265					270							
Val	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gln	Phe	Pro	Gln	Gly	Thr				
	275					280					285								
Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Tyr	Phe	Leu	Met	Gly	Leu	Asp				
	290				295					300									
Thr	Leu	Lys	Cys	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Ser				
305				310					315						320				
Cys	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Arg	Glu	Val	Asn	Cys	Asp	Ser	Lys	Ala	Val				
			325					330						335					
Asp	Phe	Leu	Asp	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Arg	Ile	His	Cys	Pro	Ala					
	340				345					350									
Gly	Cys	Ser	Leu	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Gly	Thr	Ala	Ile	Tyr	His				
	355				360					365									
Glu	Leu	Ser	Ser	Val	Cys	Arg	Ala	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Lys	Val	Pro				
	370				375					380									
Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	His	Val	Val	Asn	Asn	Gly	Pro	Tyr	Ser	Asp				
385				390					395						400				
Phe	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Ser				
			405				410							415					
Leu	Ala	Gln	Ser	Phe	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly				
		420					425						430						
Arg	Lys	Ser	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly	Trp	Phe	Glu	Ile	Glu	Glu	Asn	Cys				
	435					440						445							
Val	Tyr	Val	Thr	Ser	Lys	Gln	Arg	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Val				
	450				455						460								
Cys	Thr	Asn	Met	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Lys	Asp	Val	Ile				
465				470				475						480					
Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Thr	Thr				
			485				490							495					
Trp	Ile	Gly	Leu	His	Arg	Leu	Asp	Ala	Asp	Asn	His	Phe	Ile	Trp	Glu				
	500						505					510							
Leu	Met	Asp	Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	Trp				
	515					520						525							
Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Asn	Glu	Thr	Asn	Cys	Val	Tyr	Leu	Asp	Ile				
	530				535					540									
Gln	Asp	Gln	Leu	Gln	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro				
545				550						555					560				
Ser	Ser	Phe	Val	Cys	Met	Met	Asp	Leu	Ser	Asp	Lys	Asn	Lys	Ala	Lys				
			565				570							575					
Cys	Lys	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Glu	Asn	Gly	His	Ala	Lys	Leu	His	Gly				

				580					585					590					
Gln	Ser	Ile	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Val	Arg	Tyr	Ser	Cys				
		595					600					605							
Glu	Val	Leu	His	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Glu	Thr	Val	Ser	Cys	Thr	Ser				
	610					615					620								
Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Thr				
625					630					635					640				
Cys	Gln	Thr	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Asp	Ile	Lys	Pro				
				645					650					655					
Pro	Ser	Arg	Thr	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg	Val	Gly	Ser	Pro	Phe	Leu	Arg				
			660					665					670						
Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro				
		675					680					685							
Lys	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Ser	Ser	Lys	Val				
	690					695				700									
Lys	Leu	Pro	Glu	Gly	His	Tyr	Arg	Val	Gly	Ser	Gln	Ala	Ile	Tyr	Thr				
705					710					715					720				
Cys	Glu	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg	Arg	Cys				
				725					730					735					
Asp	Ser	Asn	Gly	Lys	Trp	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Ser	Cys	Ile	Pro	Val				
			740					745					750						
Cys	Gly	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Arg	Ser	Pro	Phe	Ile	Val	Asn	Gly	Asn				
		755					760					765							
Ser	Thr	Glu	Ile	Gly	Gln	Trp	Pro	Trp	Gln	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp				
	770					775					780								
Leu	Ala	Asp	His	Asn	Met	Trp	Phe	Leu	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu				
785					790					795					800				
Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Ile	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala				
				805					810					815					
Thr	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Phe	Lys	Phe	Tyr	Leu	Gly	Lys				
				820				825					830						
Tyr	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp	Asp	Tyr	Val	Gln	Val	Arg	Glu				
		835					840					845							
Ala	Ile	Glu	Ile	His	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Asp	Pro	Gly	Asn	Leu	Asn				
	850					855				860									
Phe	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Leu	Lys	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Thr	Thr				
865					870					875					880				
Arg	Val	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Arg	Glu	Asn				
				885					890					895					
Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Leu	Asn	Glu				
			900					905					910						
Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	Val	Val				
		915					920					925							
Ala	Ala	Ser	Thr	Cys	Glu	Gln	Gly	Tyr	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Pro	Leu				
		930				935				940									
Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gln	Gly	Arg	Tyr				
945					950					955					960				
Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Asp				
				965					970					975					
Ser	Arg	Thr	Asp	Arg	Arg	Trp	Val	Leu	Glu	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly				

	980		985		990										
Ser	Pro	Asn	Gly	Cys	Gly	Lys	Ser	Asn	Gln	Tyr	Gly	Gly	Phe	Thr	Lys
	995						1000					1005			
Val	Asn	Val	Phe	Leu	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Ile				
	1010						1015				1020				

<210> 5
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 5

atggcgtgga	tttgtgtgat	aacgtttgtt	gctttggctt	ctagtacgtt	gagtaataaa	60
gttagtagag	tggggatcat	ctttcctaag	acacagaacg	ataataaaca	gtgtacagca	120
aaagggtggat	taaaagggtc	ctgcaagtcc	ctcacagact	gtcctgctgt	cttggctacg	180
ttgaaggata	gtttccctgt	cgtttgctct	tggaaatggc	ggtttcagcc	tattgtatgt	240
tgtcctgatg	cagcagcacc	aagtgttaacc	acaacagtta	caactattgt	ccctacaaaa	300
gaaacaaaga	ttccaagatt	acatatacca	ggttgtggaa	aaagaaaagt	aaatgtagat	360
attacaacta	ttggacgttc	ggggtcacca	atacttcctc	ccatatctac	ttctcaagat	420
ttgaaggggtg	ggagaggaat	cattgctgga	ggtgtagaag	ctaaaattgg	cgcctggcct	480
tggatggcag	ctgtttttgt	gaaaaatfff	ggcattggca	gattccattg	tgctggtagc	540
ataatcagta	gcaagtacat	tttgtctgct	gcccacgctt	tcctcattgg	aggtcgaaag	600
ctgaccccaa	ctcgcttagc	tgtccgcgta	ggaggccact	acgtaaagat	gggtcaagaa	660
tatcatgtgg	aagatgtgat	tatccatcct	gactacgtag	aaagggagaa	ttacaatgat	720
attgctatca	ttgtgttaaa	agaggaactg	aattttactg	atttgggtccg	tccaatctgt	780
ctccctgacc	cagaggcagt	aacagattca	ttaaaaggca	gaagggtgac	agtagctgga	840
tgggggtgatc	tggattttgc	cgggtccacga	agtcaagttc	tgcgcgaggt	tagtatcccc	900
gttggttccaa	tcggtgactg	taacaaagcc	tatcagaagc	tcaacaccct	tgctcttaaa	960
aatgggataa	cgaaaaagtt	tatttgtgct	ggattggaag	aaggtgggaa	agatgcttgt	1020
caaggcgatt	ctggtggacc	gttgatgcta	gtgaacaata	gtagttggat	agtgacggga	1080
gtggtgtcgt	tcggacacaa	gtgtgccgag	gagggatattc	ctggtgtgta	cacgcgtgta	1140
gtgagttacc	tagagtggat	cgcgaagggt	acgaactcgt	tagaccaggc	agtcactaac	1200
tga						1203

<210> 6
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Limulus polyphemus

<400> 6

Met	Ala	Trp	Ile	Cys	Val	Ile	Thr	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Ser	Ser	Thr
1				5					10					15	
Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Ser	Arg	Val	Gly	Ile	Ile	Phe	Pro	Lys	Thr	Gln
			20					25					30		
Asn	Asp	Asn	Lys	Gln	Cys	Thr	Ala	Lys	Gly	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Cys
	35						40					45			
Lys	Ser	Leu	Thr	Asp	Cys	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser
	50					55					60				

```

Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
65          70          75          80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
          85          90          95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
100        105        110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
115        120        125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
130        135        140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145        150        155        160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
165        170        175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Ser Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
180        185        190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
195        200        205
Arg Val Gly Gly His Tyr Val Lys Met Gly Gln Glu Tyr His Val Glu
210        215        220
Asp Val Ile Ile His Pro Asp Tyr Val Glu Arg Glu Asn Tyr Asn Asp
225        230        235        240
Ile Ala Ile Ile Val Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
245        250        255
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Ala Val Thr Asp Ser Leu Lys
260        265        270
Gly Arg Arg Val Thr Val Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ala Gly
275        280        285
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Ile
290        295        300
Gly Asp Cys Asn Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Asn Thr Leu Ala Leu Lys
305        310        315        320
Asn Gly Ile Thr Lys Lys Phe Ile Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
325        330        335
Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
340        345        350
Asn Ser Ser Trp Ile Val Thr Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
355        360        365
Ala Glu Glu Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Val Ser Tyr Leu
370        375        380
Glu Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp Gln Ala Val Thr Asn
385        390        395        400

```

<210> 7

<211> 1203

<212> DNA

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 7

```

atggcgtgga tttgtgtgat aacgttggtt gctttggcct ctagtacgtt gagtaataaa    60
gttagtagag tggggatcat ctttcctaag acacagaacg ataataaaca gtgtacagca    120
aaaggtggat taaaagggtc ctgcaagtc ctcacagact gtcctgctgt cttggctacg    180
ttgaaggata gtttccctgt cgtttgctct tggaatggtc ggtttcagcc tattgtatgt    240
tgtcctgatg cagcagcacc aagtgttaacc acaacagtta caactattgt ccctacaaaa    300
gaaacaaaga ttccaagatt acatatacca ggttgtggaa aaagaaaagt aaatgtagat    360
attacaacta ttggacgttc ggggtcacca atacttcctc ccatatctac ttctcaagat    420
ttgaagggtg ggagaggaat cattgctgga ggtgtagaag ctaaaattgg cgcctggcct    480
tggatggcag ctgtttttgt gaaaaatttt ggcatgggca gattccattg tgctggtagc    540
ataatcagta gcaagtacat tttgtctgct gcccacgctt tcctcattgg aggtcgaaag    600
ctgaccccaa ctgccttagc tgtccgcgta ggaggccact acgtaaagat ggggtcaagaa    660
tatcatgtgg aagatgtgat tatccatcct gactacgtag aaaggagaa ttacaatgat    720
attgctatca ttgtgttaaa agaggaactg aattttactg atttgggtccg tccaatctgt    780
ctccctgacc cagaggcagt aacagattca ttaaaaggca gaagggtgac agtagctgga    840
tggggtgatc tggatttcgc cggtcacga agtcaagttc tgcgcgaggt tagtatcccc    900
gttgttccaa tcagtgattg taacaaagcc tatcagaatc tcaacaccct tgctcttaaa    960
aatgggataa cgaaaaagtt tatttgtgct ggattggaag aagggtgggaa agatgcttgt 1020
caaggcgatt ctggtggacc gttgatgcta gtgaacaata gtagttggat agtgacggga 1080
gtggtgtcgt tcggacacaa gtgtgccgag gagggatttc ctggtgtgta cacgcgtgta 1140
gtgagttacc tagagtggat cgcgaaggtt acgaactcgt tagaccaggc agtcactaac 1200
tga                                     1203

```

```

<210> 8
<211> 400
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 8
Met Ala Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1           5           10           15
Leu Ser Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Ile Ile Phe Pro Lys Thr Gln
20          25          30
Asn Asp Asn Lys Gln Cys Thr Ala Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys
35          40          45
Lys Ser Leu Thr Asp Cys Pro Ala Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser
50          55          60
Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
65          70          75          80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
85          90          95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
100         105         110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
115         120         125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
130         135         140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145         150         155         160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His

```

<210>	9
<211>	1203
<212>	DNA
<213>	Limulus polyphemus

<400>	9						
atggcgtgga	tttgtgtgat	aacgtttgttt	gcttttggtt	ctagtacgtt	gagtaataaaa		60
gttagtagag	tggggatcat	ctttcctaag	acacagaacg	ataataaaca	gtgtacagca		120
aaagggtggat	taaaagggtc	ctgcaagtcc	ctcacagact	gtcctgctgt	cttggctacg		180
ttgaaggata	gtttccctgt	cgtttgctct	tggaatggtc	ggtttcagcc	tattgtatgt		240
tgtcctgatg	cagcagcacc	aagtgtaac	acaacagtta	caactattgt	ccctacaaaa		300
gaaacaaaga	ttccaagatt	acatatacca	ggttgtggaa	aaagaaaagt	aaatgtagat		360
attacaacta	ttggacgttc	ggggtcacca	atacttcctc	ccatatctac	ttctcaagat		420
ttgaaggggtg	ggagaggaat	cattgctgga	ggtgtagaag	ctaaaattgg	cgctggccct		480
tggatggcag	ctgtttttgt	gaaaaatttt	ggcattggca	gattccattg	tgctggtagc		540
ataatcagta	gcaagtacat	tttgtctgct	gccacgctt	tcctcattgg	aggtcgaaag		600
ctgaccccaa	ctcgcttagc	tgtccgcgta	ggaggccact	acgtaaagat	gggtcaagaa		660
tatcatgtgg	aagatgtgat	tatccatcct	gactacgtag	aaagggagaa	ttacaatgat		720
attgctatca	ttgtgttaaa	agagggaactg	aattttactg	atttgggtccg	tccaatctgt		780

```

ctccctgacc cagaggcagt aacagattca ttaaaaggca gaagggtgac agtagctgga      840
tggggtgatac tggatttcgc cgggtccacga agtcaagttc tgcgcgaggt tagtatcccc      900
gttggttccaa tcagtgattg taacaaagcc tatcagaatc tcaacaccct tgctcttaaa      960
aatgggataa cgaacaagtt tatttgtgct ggattggaag aaggcgggaa agatgcttgt    1020
caaggcgatt ctggtggacc gttgatgcta gtgaacaata gtagttggat agtgacggga    1080
gtggtgtcgt tcggacacaa gtgtgccgag gagggatttc ctggtgtgta cacgcgtgta    1140
gtgagttacc tagagtggat cgcgaagggt acgaactcgt tagaccaggc agtcactaac    1200
tga                                           1203

```

```

<210> 10
<211> 400
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 10
Met Ala Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1           5           10           15
Leu Ser Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Ile Ile Phe Pro Lys Thr Gln
20          25          30
Asn Asp Asn Lys Gln Cys Thr Ala Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys
35          40          45
Lys Ser Leu Thr Asp Cys Pro Ala Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser
50          55          60
Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
65          70          75          80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
85          90          95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
100         105         110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
115         120         125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
130         135         140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145         150         155         160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
165         170         175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Ser Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
180         185         190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
195         200         205
Arg Val Gly Gly His Tyr Val Lys Met Gly Gln Glu Tyr His Val Glu
210         215         220
Asp Val Ile Ile His Pro Asp Tyr Val Glu Arg Glu Asn Tyr Asn Asp
225         230         235         240
Ile Ala Ile Ile Val Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
245         250         255
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Ala Val Thr Asp Ser Leu Lys
260         265         270

```

Gly	Arg	Arg	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Gly
	275						280				285				
Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Pro	Ile
	290					295					300				
Ser	Asp	Cys	Asn	Lys	Ala	Tyr	Gln	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ala	Leu	Lys
305					310					315					320
Asn	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Phe	Ile	Cys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly
				325					330					335	
Lys	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Leu	Val	Asn
			340					345					350		
Asn	Ser	Ser	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Val	Val	Ser	Phe	Gly	His	Lys	Cys
		355					360					365			
Ala	Glu	Glu	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Val	Ser	Tyr	Leu
	370					375					380				
Glu	Trp	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	Gln	Ala	Val	Thr	Asn
385					390					395					400

<210> 11
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 11	
atggcgtgga tttgtgtgat aacgttgttt gctttggctt ctagtacgtt gagtaataaaa	60
gttagtagag tggggatcat ctttcctaag acacagaacg ataataaaca gtgtacagca	120
aaaggtggat taaaagggtc ctgcaagtcc ctcacagact gtcctgctgt cttggctacg	180
ttgaaggata gtttccctgt cgtttgctct tggaatggtc ggtttcagcc tattgtatgt	240
tgtcctgatg cagcagcacc aagtgttaacc acaacagtta caactattgt ccctacaaaa	300
gaaacaaaga ttccaagatt acatatacca ggttgtggaa aaagaaaagt aaatgtagat	360
attacaacta ttggacgttc ggggtcacca atacttcctc ccatatctac ttctcaagat	420
ttgaagggtg ggagaggaat cattgctgga ggtgtagaag ctaaaattgg cgcctggcct	480
tggatggcag ctgtttttgt gaaaaatttt ggcatggca gatttcattg tgctggtagc	540
ataatcagta gcaagtacat tttgtctgct gccacgctt tcctcattgg aggtcgaaag	600
ctgaccccaa ctgccttagc tgtccgcgta ggaggccact acgtaaagat gggtaagaa	660
tatcatgtgg aagatgtgat tatccatcct gactacgtag aaaggagaa ttacaatgat	720
attgctatca ttgtgttaaa agaggaactg aattttactg atttgggtccg tccaatctgt	780
ctccctgacc cagaggcagt aacagattca ttaaaaaggca gaagggtgac agtagctgga	840
tggggtgatc tggatttcgc cggtccacga agtcaagttc tgcgcgagggt tagtatcccc	900
gttgttccaa tcagtgattg taacaaagcc tatcagaatc tcaacaccct tgctcttaaa	960
aatgggataa cgaacaagtt tattttgtgct ggattggaag aaggcgggaa agatgcttgt	1020
caaggcgatt ctggtggacc gttgatgcta gtgaacaata gtagttggat agtgacggga	1080
gtggtgtcgt tcggacacaa gtgtgccgag gagggatttc ctggtgtgta cacgcgtgta	1140
gtgagttacc tagagtggat cgcgaagggt acgaactcgt tagaccaggc agtcactaag	1200
tga	1203

<210> 12
 <211> 400
 <212> PRT

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 12

```

Met Ala Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1      5      10      15
Leu Ser Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Ile Ile Phe Pro Lys Thr Gln
      20      25      30
Asn Asp Asn Lys Gln Cys Thr Ala Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys
      35      40      45
Lys Ser Leu Thr Asp Cys Pro Ala Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser
      50      55      60
Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
      65      70      75      80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
      85      90      95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
      100      105      110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
      115      120      125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
      130      135      140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
      145      150      155      160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
      165      170      175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Ser Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
      180      185      190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
      195      200      205
Arg Val Gly Gly His Tyr Val Lys Met Gly Gln Glu Tyr His Val Glu
      210      215      220
Asp Val Ile Ile His Pro Asp Tyr Val Glu Arg Glu Asn Tyr Asn Asp
      225      230      235      240
Ile Ala Ile Ile Val Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
      245      250      255
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Ala Val Thr Asp Ser Leu Lys
      260      265      270
Gly Arg Arg Val Thr Val Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ala Gly
      275      280      285
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Ile
      290      295      300
Ser Asp Cys Asn Lys Ala Tyr Gln Asn Leu Asn Thr Leu Ala Leu Lys
      305      310      315      320
Asn Gly Ile Thr Asn Lys Phe Ile Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
      325      330      335
Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
      340      345      350
Asn Ser Ser Trp Ile Val Thr Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
      355      360      365
Ala Glu Glu Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Val Ser Tyr Leu

```

370	375	380
Glu Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp Gln Ala Val Thr Lys		
385	390	395
		400

<210> 13
 <211> 1128
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 13

atgtttggtga	ataacatggtt	ttcattgctg	tgttttccac	tcctgatgtc	tatgttttagc	60
tgcagtagtc	tcggcagaca	gcgtagacag	tttgttttcc	ccgatgatga	agaatcatgc	120
tcaaaccgat	ttactaacga	tggaatatgt	aaagatgttt	tgaattgtag	agatctttta	180
caaaaaaatg	attataatth	actgaaagaa	tcaatatgcg	gttttgaagg	cataacaccc	240
aaagtttggt	gtccgaaaca	aagtattgta	aatccaataa	cagaagcacc	tccaaaaacc	300
actacaactg	aacgaccgcc	aatacggata	ccatccaatc	ttcctaaaca	gtgtggaaat	360
cgtaatatta	caactaccag	gattattgga	gggcaggaag	caacacctgg	agcctggccc	420
tggatggctg	ctgtctatat	caaacaagga	ggaatcagaa	gtgttcagtg	tggagggtgcg	480
cttgtcacca	acaggcacgt	gattacagca	tcgcactgtg	ttgtaaacag	tttaggaaca	540
gatgtgatgc	gagctgacgt	attctcgggt	cgcctagggtg	aacacaattt	atatagcacc	600
aatgacagtt	cagatccaat	tgattttgca	gttacgtcag	tgaaacatca	tgaaaacttt	660
gtgctcgcga	cgtatttgaa	tgatatcgca	attctgaagt	taaacgacac	tgttacgttt	720
acgcacaaaa	ttaaaccaat	ttgtctacct	tatgaaagct	taaggatga	ggatctagca	780
atgagaaacc	catttgctgc	cggatgggga	acaacagcat	ttaatggccc	atctagtgc	840
gtattacgag	aagtgcagtt	accaatatgg	ggacacgagc	cctgcaggca	ggcctacgag	900
aaggatttaa	atattacaaa	cgtgtatatg	tgtgctgggt	atgcagatgg	cggtaaagat	960
gcttgccagg	gtgattctgg	aggtccaatg	atgttgcttg	ataaaagcgg	gaacttttat	1020
ctcgttggaa	ttgtgtcttt	cggaaagaaa	tgcgcgttgc	ctggatttcc	tgggggtttac	1080
acaaaagtga	ccgaattttt	agattggatt	gcagtaaata	tggtgtag		1128

<210> 14
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Limulus polyphemus

<400> 14

Met	Leu	Val	Asn	Asn	Met	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Met
1			5					10					15		
Ser	Met	Phe	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Gly	Arg	Gln	Arg	Arg	Gln	Phe	Val
			20					25					30		
Phe	Pro	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Cys	Ser	Asn	Arg	Phe	Thr	Asn	Asp	Gly
		35				40					45				
Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Leu	Asn	Cys	Arg	Asp	Leu	Leu	Gln	Lys	Asn	Asp
	50				55					60					
Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Cys	Gly	Phe	Glu	Gly	Ile	Thr	Pro
65				70				75							80
Lys	Val	Cys	Cys	Pro	Lys	Gln	Ser	Ile	Val	Asn	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala
			85					90					95		

```

Pro Pro Lys Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser
    100                      105                      110
Asn Leu Pro Lys Gln Cys Gly Asn Arg Asn Ile Thr Thr Thr Arg Ile
    115                      120                      125
Ile Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Ala Ala
    130                      135                      140
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala
    145                      150                      155                      160
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn
    165                      170                      175
Ser Leu Gly Thr Asp Val Met Arg Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu
    180                      185                      190
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Asp Ser Ser Asp Pro Ile Asp
    195                      200                      205
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu Asn Phe Val Leu Ala Thr
    210                      215                      220
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe
    225                      230                      235                      240
Thr His Lys Ile Lys Pro Ile Cys Leu Pro Tyr Glu Ser Leu Arg Tyr
    245                      250                      255
Glu Asp Leu Ala Met Arg Asn Pro Phe Val Ala Gly Trp Gly Thr Thr
    260                      265                      270
Ala Phe Asn Gly Pro Ser Ser Ala Val Leu Arg Glu Val Gln Leu Pro
    275                      280                      285
Ile Trp Gly His Glu Pro Cys Arg Gln Ala Tyr Glu Lys Asp Leu Asn
    290                      295                      300
Ile Thr Asn Val Tyr Met Cys Ala Gly Tyr Ala Asp Gly Gly Lys Asp
    305                      310                      315                      320
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Met Leu Pro Asp Lys Ser
    325                      330                      335
Gly Asn Phe Tyr Leu Val Gly Ile Val Ser Phe Gly Lys Lys Cys Ala
    340                      345                      350
Leu Pro Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Glu Phe Leu Asp
    355                      360                      365
Trp Ile Ala Val Asn Met Val
    370                      375

```

```

<210> 15
<211> 1128
<212> DNA
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 15
atgttggtga ataacatggt ttcatgtgctg tgtttccac tcctgatgtc tatgtttagc 60
tgcagtagtc tcgagcagaca gcgtagacag ttgttttcc ccgatgatga agaatcatgc 120
tcaaacgat ttactaacga tggaatatgt aaagatgttt tgaattgtag agatctttta 180
caaaaaaatg attataatgt actgaaagaa tcaatatgctg gttttgaagg cataacaccc 240
aaagtttgtt gtccgaaaca aagtattgta aatccaataa cagaagcacc tccaaaaacc 300
actacaactg aacgaccgcc aatacggata ccatccaatc ttcctaaaca gtgtggaaat 360

```

```

cgtaatatatta caactaccag gattattgga gggcaggaag caacacctgg agcctggccc 420
tggtatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgctcagtg tggaggtgcg 480
cttgtcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaacag tttaggaaca 540
gatgtgatgc gagctgatgt attctcgggt cgcctagggtg aacacaattt atatagcacc 600
aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggatatga ggatctagca 780
atgagaaaacc catttgtcgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
aaggatttaa atattacaaa cgtgtatatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgcttg ataaaagcgg gaacttttat 1020
ctcgttggaa ttgtgtcttt cggaaagaaa tgcgcgttgc ctggatttcc tgggggtttac 1080
acaaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tggtgtag 1128

```

```

<210> 16
<211> 375
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 16
Met Leu Val Asn Asn Met Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met
1 5 10 15
Ser Met Phe Ser Cys Ser Ser Leu Gly Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
20 25 30
Phe Pro Asp Asp Glu Glu Ser Cys Ser Asn Arg Phe Thr Asn Asp Gly
35 40 45
Ile Cys Lys Asp Val Leu Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Lys Asn Asp
50 55 60
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
65 70 75 80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Gln Ser Ile Val Asn Pro Ile Thr Glu Ala
85 90 95
Pro Pro Lys Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser
100 105 110
Asn Leu Pro Lys Gln Cys Gly Asn Arg Asn Ile Thr Thr Thr Arg Ile
115 120 125
Ile Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Ala Ala
130 135 140
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Ala Gln Cys Gly Gly Ala
145 150 155 160
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn
165 170 175
Ser Leu Gly Thr Asp Val Met Arg Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu
180 185 190
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Asp Ser Ser Asp Pro Ile Asp
195 200 205
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu Asn Phe Val Leu Ala Thr
210 215 220
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe

```

225					230					235					240	
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr	
				245					250					255		
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr	
				260					265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro	
				275					280					285		
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn	
				290					295					300		
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp	
305					310					315					320	
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser	
				325					330					335		
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala	
				340					345					350		
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp	
				355					360					365		
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val										
				370					375							

<210>	17
<211>	1128
<212>	DNA
<213>	Limulus polyphemus

<400>	17						
atgtttggtga	ataacatggtt	ttcatttgctg	tgtttccac	tcctgatgtc	tatgttttagc		60
tgcagtagtc	tcggcagaca	gcgtagacaa	tttgttttcc	ccgatgatga	agaatcatgc		120
tcaaacccgat	ttactaacga	aggaatatgt	aaagatgttt	tgaattgtag	agaactttta		180
caaaaaaatg	attataat	actgaaagaa	tcaatatgcg	gttttgaagg	cataacaccc		240
aaagtttgtt	gtccgaaaca	aagtattgta	aatccaataa	cagaagcacc	tccaaaaact		300
actacaactg	aacgaccgcc	aatccgtata	ccatccaatc	ttcctaaaca	gtgtggaaat		360
cgtaatat	caactaccag	gattattgga	gggcaggaag	caacacctgg	agcctggccc		420
tggatggctg	ctgtctatat	caaacaagga	ggaatcagaa	gtgttcagt	tggaggtgcg		480
cttgtcacca	acaggcacgt	gattacagca	tcgcactgtg	ttgtaaacag	tttaggaaca		540
gatgtgatgc	gagctgacgt	attctcgggt	cgccataggtg	aacacaattt	atatagcacc		600
aatgacagtt	cagatccaat	tgatttttgca	gttacgtcag	tgaaacatca	tgaaaacttt		660
gtgctcgcca	cgtattttgaa	tgatatcgca	attctgaagt	taaacgacac	tgttacgttt		720
acgcacaaaa	ttaaaccaat	ttgtctacct	tatgaaagct	taaggtagatga	ggatctagca		780
atgagaaaacc	cattttgtcgc	cggatgggga	acaacagcat	ttaatggccc	atctagtgc		840
gtattacgag	aagtgcagtt	accaatatgg	ggacacgagc	cctgcaggca	ggcctacgag		900
aaggatttaa	atattacaaa	cgtgtatatg	tgtgctgggt	atgcagatgg	cggtaaagat		960
gcttgccagg	gtgattctgg	aggtccaatg	atgttgctg	ataaaaagcgg	gaacttttat		1020
ctcgttggaa	ttgtgtcttt	cggaaagaaa	tgcgcgttgc	ctggatttcc	tgggggtttac		1080
acaaaagtga	ccgaattttt	agattggatt	gcagtaaata	tggtgtag			1128

$\langle 210 \rangle$	18
$\langle 211 \rangle$	375

<212> PRT

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 18

Met	Leu	Val	Asn	Asn	Met	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Met
1				5					10					15	
Ser	Met	Phe	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Gly	Arg	Gln	Arg	Arg	Gln	Phe	Val
			20					25					30		
Phe	Pro	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Cys	Ser	Asn	Arg	Phe	Thr	Asn	Glu	Gly
			35				40					45			
Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Leu	Asn	Cys	Arg	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Asn	Asp
	50					55					60				
Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Cys	Gly	Phe	Glu	Gly	Ile	Thr	Pro
65					70					75					80
Lys	Val	Cys	Cys	Pro	Lys	Gln	Ser	Ile	Val	Asn	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala
				85					90					95	
Pro	Pro	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Arg	Pro	Pro	Ile	Arg	Ile	Pro	Ser
			100					105					110		
Asn	Leu	Pro	Lys	Gln	Cys	Gly	Asn	Arg	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ile
		115					120					125			
Ile	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Met	Ala	Ala
	130					135					140				
Val	Tyr	Ile	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Val	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala
145					150					155					160
Leu	Val	Thr	Asn	Arg	His	Val	Ile	Thr	Ala	Ser	His	Cys	Val	Val	Asn
				165					170					175	
Ser	Leu	Gly	Thr	Asp	Val	Met	Arg	Ala	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Arg	Leu
			180					185					190		
Gly	Glu	His	Asn	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Ile	Asp
		195					200					205			
Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Lys	His	His	Glu	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	Thr
	210					215					220				
Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe
225					230					235					240
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr
				245					250					255	
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr
			260					265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp
305					310					315					320
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser
				325					330					335	
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala
			340					345					350		
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp
		355					360					365			

Trp Ile Ala Val Asn Met Val
370 375

<210> 19
<211> 1128
<212> DNA
<213> *Limulus polyphemus*

<400> 19
atgttggatga ataacatggt ttcatgtgctg tgtttccac tcctgatgtc tatgttttagc 60
tgcagtagtc tcggcagaca gcgtagacaa tttgttttcc ccgatgatga agaatcatgc 120
tcaaaccgat ttactaacga tggaatatgt aaagatgttt tgaattgtag agatctttta 180
caaaaaaatg attataatgt actgaaagaa tcaatatgcg gttttgaagg cataacaccc 240
aaagtttgtt gtccgaaaca agtattgtta aatccaataa cagaagcacc tccaaaaaat 300
actacaactg aacgaccgcc aatccgtata ccatccaatc ttcctaaaca gtgtggaaat 360
cgtaatatga caactaccag gattattgga gggcaggaag caacacctgg agcctggccc 420
tggtatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgttcagtg tggagggtgcg 480
cttgtcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaacag tttaggaaca 540
gatgtgatgc gagctgacgt attctcggtt cgcctagggtg aacacaattt atatagcacc 600
aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggatatga ggatctagca 780
atgagaaacc catttgtcgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
aaggatttaa atattacaaa cgtgtatatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgctg ataaaagcgg gaacttttat 1020
ctcgttggaa ttgtgtcttt cggaaagaaa tgcgcgttgc ctggatttcc tggggtttac 1080
acaaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tggtgtag 1128

<210> 20
<211> 375
<212> PRT
<213> *Limulus polyphemus*

<400> 20
Met Leu Val Asn Asn Met Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met
1 5 10 15
Ser Met Phe Ser Cys Ser Ser Leu Gly Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
20 25 30
Phe Pro Asp Asp Glu Glu Ser Cys Ser Asn Arg Phe Thr Asn Asp Gly
35 40 45
Ile Cys Lys Asp Val Leu Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Lys Asn Asp
50 55 60
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
65 70 75 80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Gln Ser Ile Val Asn Pro Ile Thr Glu Ala
85 90 95
Pro Pro Lys Asn Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser

			100					105					110			
Asn	Leu	Pro	Lys	Gln	Cys	Gly	Asn	Arg	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ile	
		115					120					125				
Ile	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Met	Ala	Ala	
	130					135					140					
Val	Tyr	Ile	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Val	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala	
145					150					155					160	
Leu	Val	Thr	Asn	Arg	His	Val	Ile	Thr	Ala	Ser	His	Cys	Val	Val	Asn	
				165					170					175		
Ser	Leu	Gly	Thr	Asp	Val	Met	Arg	Ala	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Arg	Leu	
			180					185					190			
Gly	Glu	His	Asn	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Ile	Asp	
		195					200					205				
Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Lys	His	His	Glu	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	Thr	
	210					215					220					
Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	
225					230					235					240	
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr	
				245					250					255		
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr	
			260					265					270			
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro	
		275					280					285				
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn	
	290					295					300					
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp	
305					310					315					320	
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser	
				325					330					335		
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala	
			340					345					350			
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp	
		355					360					365				
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val										
	370					375										

```
<210> 21
<211> 1128
<212> DNA
<213> Limulus polyphemus
```

<400>	21						
atgttggtga	ataacatggt	ttcattgctg	tgtttctcac	tcctgatgtc	tatgtttagc		60
tgcgtagtc	tcggcagaca	gcgtagacag	tttgttttcc	ccgatgatga	agaatcatgc		120
tcaaaccgat	ttactaacga	tggaatatgt	aaagatgttt	tgaattgtag	agatctttta		180
caaaaaaatg	attataatth	actgaaagaa	tcaatatgcg	gttttgaagg	cataacaccc		240
aaagtttgth	gtccgaaaca	aagtattgta	aatccaataa	cagaagcacc	tccaaaaact		300
actacaactg	aacgaccgcc	aatacggata	ccatccaatc	ttcctaaaca	gtgtggaaat		360
cgtaatatth	caactaccag	gattattgga	gggcaggaag	caacacctgg	agcctggccc		420

```

tggatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgttcagtg tggaggtgcg 480
cttgtcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaacag tttaggaaca 540
gatgtgatgc gagctgacgt attctcgggt cgcctagggt aacacaattt atatagcacc 600
aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggatatga ggatctagca 780
atgagaaacc catttgtcgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
aaggatttaa atattacaaa cgtgtgtatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgcttg ataaaagcgg gaacttttat 1020
ctcgttggaa ttgtgtcttt cggaaagaaa tgcgcgttgc ctggatttcc tgggggtttac 1080
acgaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tgggtgtag 1128

```

```

<210> 22
<211> 375
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 22
Met Leu Val Asn Asn Met Phe Ser Leu Leu Cys Phe Ser Leu Leu Met
1      5      10      15
Ser Met Phe Ser Cys Ser Ser Leu Gly Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
20     25     30
Phe Pro Asp Asp Glu Glu Ser Cys Ser Asn Arg Phe Thr Asn Asp Gly
35     40     45
Ile Cys Lys Asp Val Leu Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Lys Asn Asp
50     55     60
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
65     70     75     80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Gln Ser Ile Val Asn Pro Ile Thr Glu Ala
85     90     95
Pro Pro Lys Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser
100    105    110
Asn Leu Pro Lys Gln Cys Gly Asn Arg Asn Ile Thr Thr Thr Arg Ile
115    120    125
Ile Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Ala Ala
130    135    140
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala
145    150    155    160
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn
165    170    175
Ser Leu Gly Thr Asp Val Met Arg Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu
180    185    190
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Asp Ser Ser Asp Pro Ile Asp
195    200    205
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu Asn Phe Val Leu Ala Thr
210    215    220
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe
225    230    235    240

```

Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr
				245					250					255	
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr
			260					265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Thr	Asn	Val	Cys	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp
305				310					315					320	
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser
			325					330					335		
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala
		340					345					350			
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp
		355				360					365				
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val									
	370					375									

<210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptide

<400> 23
 Ile Glu Gly Arg
 1

<210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 24
 ctgcaggaat tcgatttttt tttttttttt ttttt

35

<210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 25

atcgataagc ttgatgatct gggcttgtgt gatga

35

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 26

ctgcaggaat tcgat

15

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 27

ctacaccaag ttcca

15

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 28

gtaaaccatg tgacaaactg gaggc

25

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 29
aataaggcct ccatcgatag aagta 25

<210> 30
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
ggggaattca agcttgccac catggtacta gcgtcgttc 39

<210> 31
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
gggctcgagt caaatgaact gccgaatcca cgata 35

<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
atcgataagc ttgatcacat gcaaggaaaa gttct 35

<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33

ctgcaggaat tcgatcactg tttaaacaaa ctgaa 35

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

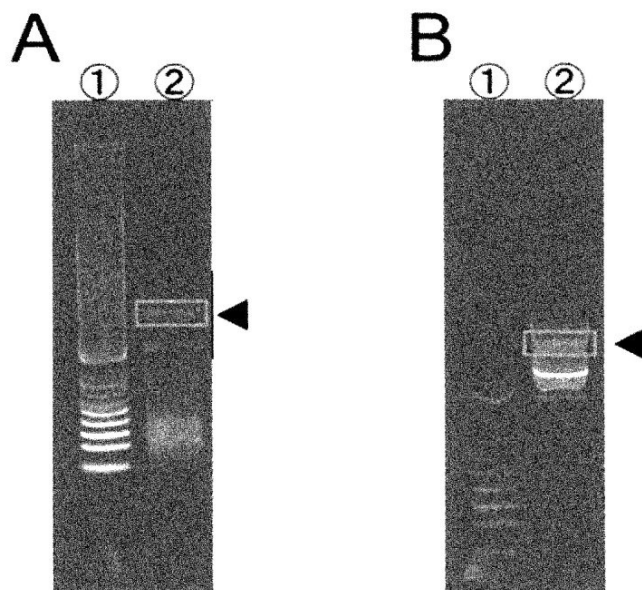
<220>

<223> primer

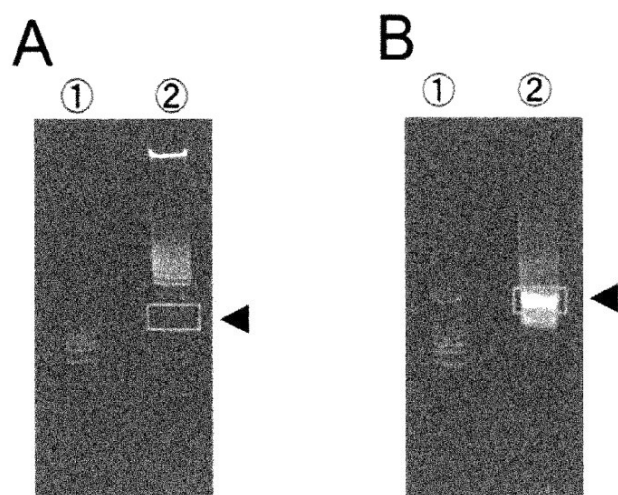
<400> 34

atcgataagc ttgatagacc agagtgggtct ttctg 35

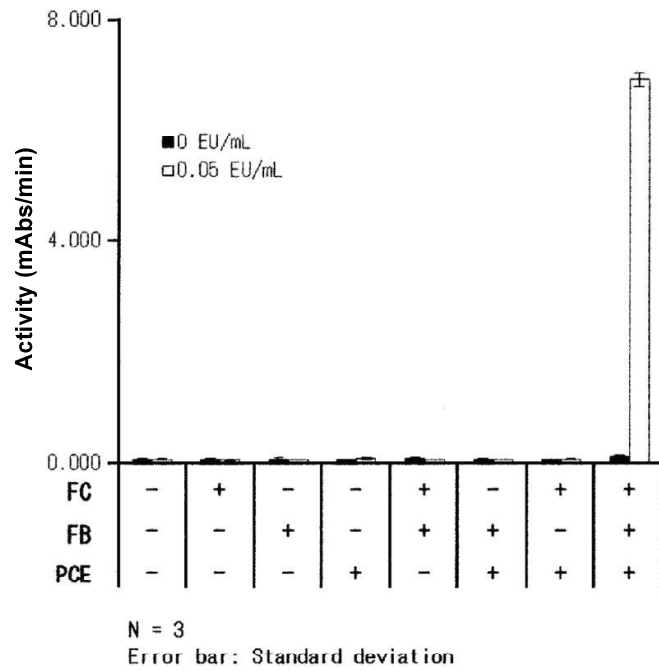
[Figure 1]



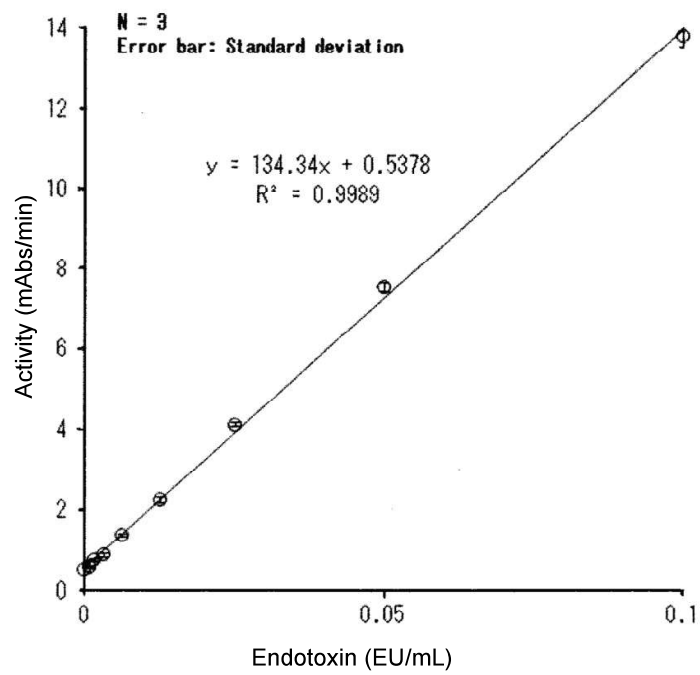
[Figure 2]



[Figure 3]



[Figure 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K14/435 (2006.01) i, G01N33/579 (2006.01) i, C12N15/09 (2006.01) n

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. C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90, G01N33/579

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2017

Registered utility model specifications of Japan 1996-2017

Published registered utility model applications of Japan 1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, DWPFI (Derwent Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-510898 A (SEIKAGAKU CORPORATION) 01 May 2014, claims, paragraphs [0031], [0082]-[0118], SEQ ID NOs: 2, 4 & WO 2012/118226 A1, claims, paragraphs [0031], [0082]-[0118], SEQ ID NOs: 2, 4	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 December 2017

Date of mailing of the international search report

16 January 2018

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037629

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/092079 A1 (SEIKAGAKU CORPORATION) 19 June 2014, claims, paragraphs [0019], [0020], [0046], [0050], [0102]-[0133], SEQ ID NOs: 2, 6 & US 2015/0307864 A1, claims, paragraphs [0187], [0188], [0214], [0218], [0277]-[0308], SEQ ID NOs: 2, 6	1-4
Y	JP 2015-141088 A (DKK TOA CORP.) 03 August 2015, claims, paragraphs [0052]-[0060] (Family: none)	1-4
Y	JP 2015-536158 A (MICROCOAT BIOTECHNOLOGIE GMBH) 21 December 2015, claims, paragraphs [0173]-[0209] & WO 2014/086847 A1, claims, page 42, line 10 to page 48, line 2	1-4

A. Classification of Subject Matter (International Patent Classification (IPC)) Int.Cl. C07K14/435(2006.01)i, G01N33/579(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
B. Fields Searched Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC)) Int.Cl. C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90, G01N33/579											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent such documents are included in the fields searched <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 40%;">Japan Utility Model Publication</td> <td>1922-1996</td> </tr> <tr> <td>Japan Utility Model Publication</td> <td>1971-2017</td> </tr> <tr> <td>Japan Utility Model Registration Publication</td> <td>1996-2017</td> </tr> <tr> <td>Japan Registered Utility Model Publication</td> <td>1994-2017</td> </tr> </table>				Japan Utility Model Publication	1922-1996	Japan Utility Model Publication	1971-2017	Japan Utility Model Registration Publication	1996-2017	Japan Registered Utility Model Publication	1994-2017
Japan Utility Model Publication	1922-1996										
Japan Utility Model Publication	1971-2017										
Japan Utility Model Registration Publication	1996-2017										
Japan Registered Utility Model Publication	1994-2017										
Electronic data bases consulted in the international search (names of databases, terms used in the search) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMB/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, DWPI (Derwent Innovation)											
C. Documents considered to be relevant											
Citation Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim Number									
Y	JP 2014-510898 A (Seikagaku Corporation) 05.01.2014, Claims, paragraphs [0031], [0082]-[0118], SEQ ID NO: 2, 4 & WO 2012/118226 A1, Claims, paragraphs [0031], [0082]-[0118], SEQ ID NO:2,4	1-4									
☒ Further documents are listed in continuation of C. ☐ Please see the Patent Family Annex											
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "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 from the same patent family </td> </tr> </table>				* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 from the same patent family						
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 from the same patent family										
The date of completion of the international search December 26, 2017		The date of mailing of the international search report January 16, 2018									
Name and address of the International Searching Authority Japan Patent Office (ISA/JP) Postal Code: 100-8915 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-Ku, Tokyo		Patent Office Examiner (authorized officer) Kaoru Kobayashi Telephone number: 03-3581-1101, Ext: 3488	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">4N</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">6114</td> </tr> </table>	4N	6114						
4N	6114										

C (cont.) Related Documents		
Citation Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim Number
Y	WO 2014/092079 A1 (Seikagaku Corporation) 06.19.2014, Claims, paragraphs [0019]-[0020], [0046], [0050], [0102]-[0133], SEQ ID NO: 2, 6 & US 2015/0307864 A1, Claims, paragraphs [0187]-[0188], [0214], [0218], [0277]-[0308], SEQ ID NO:2, 6	1-4
Y	JP 2015-141088 A (DKK-TOA Corporation) 08.03.2015, Claims, paragraphs [0052]-[0060] (Family: none)	1-4
Y	JP 2015-536158 A (Microcoat Biotechnology GmbH) 12.21.2015, Claims, paragraphs [0173]-[0209] & WO 2014/086847 A1, Claims, page 42, line 10 - page 48, line 2	1-4

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年4月26日(26.04.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/074498 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/435 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/579 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/037629
- (22) 国際出願日: 2017年10月18日(18.10.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-204729 2016年10月18日(18.10.2016) JP
- (71) 出願人: 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 水村 光 (MIZUMURA, Hikaru); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生化学工業株式会社内 Tokyo (JP). 小林雄毅(KOBAYASHI, Yuki); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生化学工業株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 佐貫 伸一, 外(SANUKI, Shinichi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: RECOMBINANT PROTEINS DERIVED FROM LIMULUS BACTERIUM, AND DNA MOLECULES ENCODING SAME

(54) 発明の名称: リムルス属由来の組換え蛋白質及びこれをコードするDNA

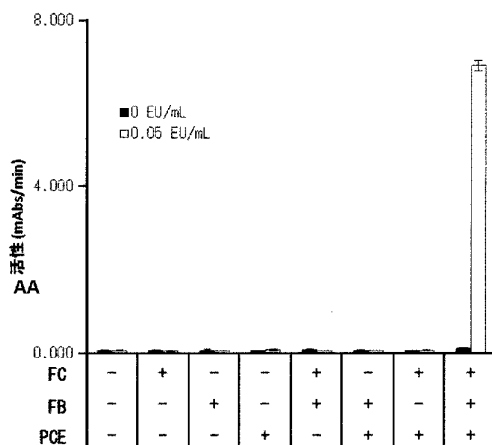


FIG. 3:
AA Activity (mAbs/min)

N = 3
Error bar: Standard deviation

(57) Abstract: Provided are: all of full-length recombinant proteins which are involved in the coagulation mechanism of *Limulus polyphemus*; cDNA molecules encoding the full-length recombinant proteins; and uses of the full-length recombinant proteins. A recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4, a recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, 8, 10, or 12, a recombinant protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, or 22, and variants thereof; cDNA molecules encoding the recombinant proteins and the variants thereof; and uses of the recombinant proteins and the variants thereof.

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

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

(57) 要約: リムルス・ポリフェムスの凝固メカニズムに関与するすべての完全長の組換え蛋白質、これらをコードするcDNA、これらの用途を提供する。配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質、配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質、配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質、それらのバリエーション、それらをコードするcDNA、それらの利用。

明 細 書

発明の名称：

リムルス属由来の組換え蛋白質及びこれをコードするDNA

技術分野

[0001] 本発明は、リムルス属由来の組換え蛋白質、これをコードするDNA及びこれらの利用法に関する。

背景技術

[0002] カブトガニは「生きた化石」と言われており、地球上に2属4種しか存在しない。属としては、北米大陸東海岸のみに生息する「リムルス (Limulus) 属」と、アジア東南海域のみに生息する「タキプレウス (Tachypleus) 属」のみである。

[0003] 一つの生物群が遠く離れた地域に分かれて分布することを不連続分布といい、カブトガニのように地球上の2つの地域に分かれた生物は大変珍しい。

[0004] リムルス属に属する生物はリムルス・ポリフェムス (Limulus polyphemus) の1種のみであり、タキプレウス属に属する生物はタキプレウス・トリデンタツス (Tachypleus tridentatus)、タキプレウス・ギガス (Tachypleus gigas)、タキプレウス・ロツンディカウダ (Tachypleus rotundicauda。カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ (Carcinoscorpius rotundicauda) とも言われる) の3種のみである。

[0005] この生物の血中に存在するアメボサイト (amoebocyte) の抽出物 (アメボサイト・ライセート。amoebocyte lysate) がエンドトキシンに接触すると、凝固することが知られている。この性質を利用して、アメボサイト・ライセートはエンドトキシンを高感度に検出する試薬として医薬品の品質管理等に広く使用されている。

[0006] この試薬は「ライセート試薬」と呼ばれている。またエンドトキシンによって凝固が生じる性質は、最初にリムルス・ポリフェムスで発見されたことから、この試薬は「リムルス試薬」や「LAL (Limulus amoebocyte lysate)

試薬」と呼ばれることもある。タキプレウス属のアメボサイト・ライセートを用いた試薬であっても、慣習上「リムルス試薬」や「LAL試薬」と呼ばれている。

- [0007] 現在、日米欧の医薬品メーカーが使用しているライセート試薬（リムルス試薬、LAL試薬）は、リムルス・ポリフェムスを原料としている。リムルス・ポリフェムスは絶滅の懸念から捕獲数が厳しく制限されているが、依然固体数が減少しているとの報告もある。
- [0008] カプトガニを保護するため、アメボサイト・ライセート中の蛋白質を組換え技術で人工的に製造し、試薬を作製する思想がある（特許文献1～8）。そして実際に、組換え蛋白質を利用して、PyroGene（商標）（Lonza）、Endo Zyme（商標）（Hyglos）、PyroSmart（商標）（生化学工業）といった製品が上市されている。
- [0009] しかし、これらはいずれもタキプレウス属の生物に由来する組換え蛋白質を用いたものであり、ライセート試薬として広く普及しているリムルス・ポリフェムスに由来する組換え蛋白質を用いた試薬は報告されていない。
- [0010] その理由は、リムルス・ポリフェムスでは、エンドトキシンによって凝固が生じるメカニズムに関与する蛋白質及びその遺伝子が、構造的にも機能的にも完全には同定されていないからである。
- [0011] タキプレウス属では、例えば、凝固メカニズムに関与する1つの蛋白質であるC因子については、1991年にタキプレウス・トリデンタツス由来の完全な遺伝子配列及びアミノ酸配列が（非特許文献1）、1995年にはタキプレウス・ロツンディカウダ（カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ）由来の完全な遺伝子配列及びアミノ酸配列が（非特許文献2）それぞれ報告されている。
- [0012] しかし、リムルス・ポリフェムスでは、前記タキプレウス属における報告から20年以上経過してもなお、これらの蛋白質及び遺伝子の構造及び機能の両面における完全な同定には成功していない。カプトガニの属や種の相違による生体分子の種々の相違や多様性等に起因して、一般的な手法ではこれら

の蛋白質及び遺伝子の全長配列構造の正確な決定、発現、および機能解明ができなかったからである。

- [0013] 現に、次世代シーケンサーを使った無脊椎動物ゲノムプロジェクトの一環として、リムルス・ポリフェムスの遺伝子の網羅的な解析が行われているが (<http://genome.wustl.edu/genomes/detail/limulus-polyphemus/>)、リムルス・ポリフェムスの凝固メカニズムに関与する全ての蛋白質及び遺伝子の全長配列の解明には至っていない。この事実も、リムルス・ポリフェムスにおけるこれらの蛋白質及び遺伝子の全長配列構造の正確な決定の困難性を裏付けている。

先行技術文献

特許文献

- [0014] 特許文献1：米国特許第5, 712, 144号明細書
特許文献2：米国特許第5, 716, 834号明細書
特許文献3：米国特許第5, 858, 706号明細書
特許文献4：米国特許第5, 985, 590号明細書
特許文献5：米国特許第6, 645, 724号明細書
特許文献6：国際公開第2008/004674号
特許文献7：特表2014-510898号公報
特許文献8：国際公開第2014/092079号

非特許文献

- [0015] 非特許文献1：Muta T et al., Journal of Biological Chemistry, 266, 6554-6561 (1991)
非特許文献2：Ding JL et al., Molecular Marine Biology and Biotechnology, 4(1), 90-103 (1995)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0016] 本発明は、リムルス・ポリフェムスの凝固メカニズムに関与するすべての

完全長の組換え蛋白質、これらをコードする cDNA、これらの用途を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者は、長年誰も成功しなかったリムルス・ポリフェムスの凝固メカニズムに関与するすべての蛋白質因子をコードする完全長の cDNA の取得、及びそのすべての組換え蛋白質の発現に成功し、更にこれらが各種用途に利用できることを見出し、本発明を完成させた。

[0018] すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

[1]

以下のいずれかである組換え蛋白質等の組換え第 1 蛋白質。

(A) 配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(B) 配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列に対して 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C 因子活性を有する組換え蛋白質。

(C) 配列番号 1 または 3 で表される塩基配列に対して 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含む DNA によってコードされ、かつ、C 因子活性を有する組換え蛋白質。

(D) 配列番号 1 または 3 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA によってコードされ、かつ、C 因子活性を有する組換え蛋白質。

[2]

以下のいずれかである組換え蛋白質等の組換え第 2 蛋白質。

(A) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(B) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列に対して 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B 因子活性を有する組換え蛋白質。

(C) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列に対して 95%

以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、B因子活性を有する組換え蛋白質。

(D) 配列番号5、7、9、または11で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、B因子活性を有する組換え蛋白質。

[3]

以下のいずれかである組換え蛋白質等の組換え第3蛋白質。

(A) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(B) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

(C) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

(D) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

[1-1]

B因子活性を有する蛋白質（例えば以下の蛋白質等の第2蛋白質）を活性化するための、組換え第1蛋白質の使用。

(A) 配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(B) 配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B因子活性を有する蛋白質。

(C) 配列番号5、7、9、または11で表される塩基配列に対して95%

以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、B因子活性を有する蛋白質。

(D) 配列番号5、7、9、または11で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、B因子活性を有する蛋白質。

[1-1-1]

第2蛋白質が、組換え第2蛋白質である、[1-1]記載の使用。

[2-1]

プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（例えば以下の蛋白質等の第3蛋白質）を活性化するための、組換え第2蛋白質の使用。

(A) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(B) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

(C) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

(D) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

[2-1-1]

第3蛋白質が、組換え第3蛋白質である、[2-1]記載の使用。

[3-1]

基質を切断するための、組換え第3蛋白質の使用。

[3-1-1]

基質が、合成基質である、[3-1]記載の使用。

[1 - 2]

組換え第 1 蛋白質を検体と接触させるステップを含む、検体中のエンドトキシンの検出方法。

[1 - 2 - 1]

検体と接触した組換え第 1 蛋白質を、第 2 蛋白質等の B 因子活性を有する蛋白質と接触させるステップを更に含む、[1 - 2]記載の方法。

[1 - 2 - 1 - 1]

第 2 蛋白質が、組換え第 2 蛋白質である、[1 - 2 - 1]記載の方法。

[1 - 2 - 2]

「検体と接触した組換え第 1 蛋白質」と接触した B 因子活性を有する蛋白質を、第 3 蛋白質等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質と接触させるステップを更に含む、[1 - 2 - 1]又は[1 - 2 - 1 - 1]記載の方法。

[1 - 2 - 2 - 1]

第 3 蛋白質が、組換え第 3 蛋白質である、[1 - 2 - 2]記載の方法。

[1 - 2 - 3]

「検体と接触した組換え第 1 蛋白質と接触した B 因子活性を有する蛋白質」と接触したプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質を、検出用基質と接触させるステップを更に含む、[1 - 2 - 2]又は[1 - 2 - 2 - 1]記載の方法。

[1 - 3]

組換え第 1 蛋白質を含む、エンドトキシン検出剤。

[1 - 3 - 1]

第 2 蛋白質等の B 因子活性を有する蛋白質を更に含む、[1 - 3]記載の剤。
。

[1 - 3 - 1 - 1]

第 2 蛋白質が、組換え第 2 蛋白質である、[1 - 3 - 1]記載の剤。

[1 - 3 - 2]

第3蛋白質等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質を更に含む、[1-3-1]又は[1-3-1-1]記載の剤。

[1-3-2-1]

第3蛋白質が、組換え第3蛋白質である、[1-3-2]記載の剤。

[1-4]

以下のいずれかであるcDNA（以下「第1cDNA」ともいう）。

(A) 配列番号1または3で表される塩基配列を含むcDNA。

(B) 配列番号1または3で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、C因子活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

(C) 配列番号1または3で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、C因子活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

(D) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするcDNA。

(E) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

[1-4-1]

第1cDNAを含むDNA構築物。

[1-4-2]

[1-4-1]記載のDNA構築物で形質転換されて組換え第1蛋白質を発現する細胞。

[1-4-3]

[1-4-2]記載の細胞を培養するステップを含む、組換え第1蛋白質の生産方法。

[2-4]

以下のいずれかであるcDNA（以下「第2cDNA」ともいう）。

(A) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列を含む cDNA。
。

(B) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列に対して 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、B 因子活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

(C) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、B 因子活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

(D) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする cDNA。

(E) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列に対して 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B 因子活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

[2-4-1]

第 2 cDNA を含む DNA 構築物。

[2-4-2]

[2-4-1] 記載の DNA 構築物で形質転換されて組換え第 2 蛋白質を発現する細胞。

[2-4-3]

[2-4-2] 記載の細胞を培養するステップを含む、組換え第 2 蛋白質の生産方法。

[3-4]

以下のいずれかである cDNA (以下「第 3 cDNA」ともいう)。

(A) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列を含む cDNA。

(B) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列に対して 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

(C) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

(D) 配列番号 14、16、18、20、または 22 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする cDNA。

(E) 配列番号 14、16、18、20、または 22 で表されるアミノ酸配列に対して 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

[3-4-1]

第 3 cDNA を含む DNA 構築物。

[3-4-2]

[3-4-1] 記載の DNA 構築物で形質転換されて組換え第 3 蛋白質を発現する細胞。

[3-4-3]

[3-4-2] 記載の細胞を培養するステップを含む、組換え第 3 蛋白質の生産方法。

[1-5]

第 1 cDNA を用いて人工的に蛋白質を発現させるステップを含む、エンドトキシン検出剤の製造方法。

[1-5-1]

第 2 cDNA を用いて人工的に蛋白質を発現させるステップを更に含む、[1-5] 記載の製造方法。

[1-5-2]

第 3 cDNA を用いて人工的に蛋白質を発現させるステップを更に含む、[1-5-1] 記載の製造方法。

図面の簡単な説明

[0019] [図1] リムルス・ポリフェムスの C 因子活性を有する蛋白質の cDNA 取得過

程におけるPCR産物の電気泳動写真である。

[図2]リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質のcDNA取得過程におけるPCR産物の電気泳動写真である。

[図3]各組換え蛋白質の単品または各種混合物とエンドトキシンとの接触による、合成基質の切断活性を示す図である。

[図4]3種の組換え蛋白質の混合物を用いたエンドトキシンの検量線を示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] <1>組換え第1蛋白質及びその製法

(1) 組換え第1蛋白質

組換え第1蛋白質は、C因子活性を有する組換え蛋白質である。

[0021] 組換え第1蛋白質は、具体的には、以下のいずれかである組換え蛋白質である。

(I) リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(II) 前記(I)のバリエーションであって、C因子活性を有する組換え蛋白質。

[0022] リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列としては、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列が挙げられる。また、そのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号1または3で表される塩基配列が挙げられる。

[0023] 組換え第1蛋白質は、より具体的には、以下のいずれかである組換え蛋白質であってよい。

(A) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(B) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質。

(C) 配列番号1または3で表される塩基配列に対して95%以上の同一性

を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質。

(D) 配列番号1または3で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質。

[0024] なお、「アミノ酸配列を含む」または「塩基配列を含む」という表現は、当該「アミノ酸配列からなる」場合または当該「塩基配列からなる」場合も包含する。

[0025] この蛋白質は、本明細書の実施例に開示された方法により世界で初めて取得され、その全長の配列構造及び機能が初めて明らかにされたものである。その機能は、エンドトキシンの存在下で活性型となり、後述する第2蛋白質等のB因子活性を有する蛋白質を活性型に変化させる機能（本出願書類において「C因子活性」という）である。組換え第1蛋白質は、少なくとも組換え第2蛋白質等の第2蛋白質との組み合わせにおいて、C因子活性を示すものであってよい。

[0026] C因子活性を有することは、対象となる組換え蛋白質を、第2蛋白質（活性型になっていないもの。以下「非活性型」という）等のB因子活性を有する蛋白質（非活性型）、第3蛋白質（非活性型）等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（非活性型）、及び検出用基質と組み合わせた際に、エンドトキシンの存在下でのカスケード反応の進行を検出することにより確認できる。

[0027] 「カスケード反応」とは、エンドトキシンによりC因子活性を有する蛋白質（非活性型）が活性化され、C因子活性を有する蛋白質（活性型）によりB因子活性を有する蛋白質（非活性型）が活性化され、B因子活性を有する蛋白質（活性型）によりプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（非活性型）が活性化される一連の反応をいう。カスケード反応の進行は、検出用基質の切断によって検出できる。

[0028] 組換え第1蛋白質のうち、最も好ましいのは前記（A）の組換え蛋白質等

の前記（１）の組換え蛋白質であるが、C因子活性を有する限り、それらのバリエーションであってもよい。

[0029] バリエーションは、例えば、上記のような組換え第１蛋白質のアミノ酸配列（例えば配列番号２または４で表されるアミノ酸配列）において、１若しくは数個の位置での、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、及び／又は付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質であってよい。前記「１若しくは数個」とは、例えば、１～２０個、１～１０個、１～５個、または１～３個であってよい。上記の１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、及び／又は付加は、蛋白質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、例えば、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

[0030] また、バリエーションは、例えば、上記のような組換え第１蛋白質のアミノ酸配列（例えば配列番号２または４で表されるアミノ酸配列）に対して、８０

%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質であってもよい。

[0031] また、バリエーションは、例えば、上記のような組換え第1蛋白質のアミノ酸配列をコードする塩基配列（例えば配列番号1または3で表される塩基配列）に対して、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質であってもよい。

[0032] また、バリエーションは、例えば、上記のような組換え第1蛋白質のアミノ酸配列をコードする塩基配列（例えば配列番号1または3で表される塩基配列）の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質であってもよい。「ストリンジェントな条件」とは、T. Maniatisら編、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratoryなどに記載の通常のハイブリダイゼーション操作で、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。「ストリンジェントな条件」とは、具体的には、ナトリウム塩濃度が15～750 mM、好ましくは50～750 mM、より好ましくは300～750 mM、温度が25～70℃、好ましくは50～70℃、より好ましくは55～65℃、ホルムアミド濃度が0～50%、好ましくは20～50%、より好ましくは35～45%での条件をいう。さらに、ストリンジェントな条件では、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄条件が、通常はナトリウム塩濃度が15～600 mM、好ましくは50～600 mM、より好ましくは300～600 mM、温度が50～70℃、好ましくは55～70℃、より好ましくは60～65℃である。

[0033] バリエーションとして具体的には、前記(B)～(D)の組換え蛋白質が好ましい。前記(B)及び(C)における「95%以上」は、好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好まし

くは99%以上である。

[0034] また、組換え第1蛋白質は、C因子活性を有する限り、Hisタグ、Vタグ等の任意のペプチド等が付加されていてもよい。

[0035] また、本出願書類において「組換え蛋白質」とは、蛋白質をコードする遺伝子を人工的にカプトガニ以外の宿主細胞に導入し、発現させることにより得られた蛋白質をいう。したがって、天然のカプトガニから取得された蛋白質そのものは、本出願書類における「組換え蛋白質」には該当しない。

[0036] (2) 組換え第1蛋白質の製法

組換え第1蛋白質は、その完全なアミノ酸配列が本発明によって初めて開示されたので、例えば、この配列をコードするDNAを用いて、遺伝子工学的的手法により製造することができる。組換え第1蛋白質を遺伝子工学的的手法により製造する方法は特に制限されず、例えば、蛋白質を遺伝子工学的的手法により製造する通常の方法を採用できる。組換え第1蛋白質は、例えば、異種発現系や無細胞蛋白質合成系を利用して製造することができる。

[0037] 例えば、後述する第1cDNAを人工的にカプトガニ以外の宿主細胞に導入し、このcDNAから蛋白質を発現させることによって組換え第1蛋白質を製造することができる。本発明は、このような組換え第1蛋白質の製造方法をも提供する。

[0038] 宿主細胞に人工的にDNAを導入する際、当該DNAが人工的に組み込まれたDNA構築物（ベクターなど）を用いてもよい。このような人工のDNA構築物としては、例えば第1cDNAが組み込まれたDNA構築物が例示できる。このような人工のDNA構築物については後述する。

[0039] カプトガニ以外の宿主細胞は、第1cDNAから蛋白質を機能的に（functionally）発現させることができる限りにおいて特に限定されない。カプトガニ以外の宿主細胞としては、例えば、哺乳類細胞や昆虫細胞が挙げられる。哺乳類としては、げっ歯類や霊長類が挙げられる。げっ歯類としては、チャイニーズハムスター、ハムスター、マウス、ラット、モルモットが挙げられる。チャイニーズハムスターの細胞としては、例えば、チャイニーズハムス

ター卵巢由来細胞株（CHO）が挙げられる。CHOとしては、CHO DG44、CHO SやCHO K1が挙げられる。霊長類としては、特に制限されないが、ヒト、サル、チンパンジーが挙げられる。ヒトの細胞としては、ヒト胎児腎細胞由来細胞株（HEK）が挙げられる。HEKとしては、HEK293が挙げられる。

[0040] 「機能的に発現する」とは、発現された組換え第1蛋白質が、C因子活性を示すことをいう。C因子活性を示すことは、後述の実施例に記載の方法により確認することができる。また、発現された蛋白質が前記（A）～（D）のいずれかの構造等の目的のアミノ酸配列を含むか否かは、発現された蛋白質のアミノ酸配列を分析し、これを目的のアミノ酸配列と比較することにより確認することができる。

[0041] 第1 cDNAを人工的に宿主細胞に導入する手法も、当該cDNAが宿主細胞内で発現可能に保持される状態となる限りにおいて特に制限されない。第1 cDNAが人工的に導入された宿主細胞を生育させることで、組換え第1蛋白質を発現させることができる。

[0042] 形質転換された宿主細胞の生育は、例えば当該細胞を培養することにより行うことができる。その際の培養条件も、当該細胞が生育や増殖できる限り特に限定されず、当該細胞の培養に通常用いられる条件を、必要により適宜修正して用いることができる。例えば、宿主細胞が哺乳類細胞の場合には、哺乳類細胞の培養に通常用いられる培地を用いることができる。このような培地として、例えばRPMI1640培地（Sigma社）、DMEM培地（Sigma社）やExpiCHO™ Expression Medium（Thermo Fisher Scientific）などを用いることができる。培養は、例えば、36℃～38℃で、5%～8%CO₂供給下で、静置培養あるいは浮遊培養などにより行うことができる。蛋白質発現専用のキットを用いてもよい。

[0043] 発現した組換え第1蛋白質は、これを含有する溶液画分として回収して、後述する各種用途に利用できる。

[0044] 組換え第1蛋白質を含有する溶液画分は、例えば、培養液、培養上清、細

胞破碎抽出物、またはそれらの混合物等でありうる。組換え第1蛋白質は、所望の程度に精製して用いてもよく、精製せずそのまま用いてもよい。

[0045] 精製は、蛋白質の精製に用いられる公知の方法により行うことができる。そのような方法としては、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー等が挙げられる。

[0046] 本発明により、組換え第1蛋白質の人工的、かつ機能的な発現が初めて可能になった。このようにして製造された組換え第1蛋白質は、例えば後述する用途に使用することができる。

[0047] <2>組換え第2蛋白質及びその製法

組換え第2蛋白質は、B因子活性を有する組換え蛋白質である。

[0048] 組換え第2蛋白質は、具体的には、以下のいずれかである組換え蛋白質である。

(I) リムルス・ポリフェムスのB因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(II) 前記(I)のバリエーションであって、B因子活性を有する組換え蛋白質。

[0049] リムルス・ポリフェムスのB因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列としては、配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列が挙げられる。また、そのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号5、7、9、または11で表される塩基配列が挙げられる。

[0050] 組換え第2蛋白質は、より具体的には、以下のいずれかである組換え蛋白質であってよい。

(A) 配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(B) 配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B因子活性を有する組換え蛋白質。

(C) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列に対して 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含む DNA によってコードされ、かつ、B 因子活性を有する組換え蛋白質。

(D) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズする DNA によってコードされ、かつ、B 因子活性を有する組換え蛋白質。

[0051] この蛋白質の機能は、活性型となった第 1 蛋白質等の C 因子活性を有する蛋白質（活性型）によって活性型となり、後述する第 3 蛋白質等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質を活性型に変化させる機能（本出願書類において「B 因子活性」という）である。組換え第 2 蛋白質は、少なくとも組換え第 1 蛋白質等の第 1 蛋白質及び組換え第 3 蛋白質等の第 3 蛋白質との組み合わせにおいて、B 因子活性を示すものであってよい。

[0052] B 因子活性を有することは、対象となる組換え蛋白質を、第 1 蛋白質（活性型）等の C 因子活性を有する蛋白質（活性型）、第 3 蛋白質（非活性型）等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（非活性型）、及び検出用基質を組み合わせた際に、カスケード反応の進行を検出することにより確認できる。この系には、C 因子活性を有する蛋白質（非活性型）を活性型に変化させるためのエンドトキシンがさらに存在していてもよい。

[0053] その他の説明は、前記<1>の説明を準用できる。すなわち、例えば、前記<1>における「配列番号 1 または 3」を「配列番号 5、7、9、または 11」、「配列番号 2 または 4」を「配列番号 6、8、10、または 12」、「（組換え）第 1 蛋白質」を「（組換え）第 2 蛋白質」、「第 1 cDNA」を「第 2 cDNA」、「C 因子」を「B 因子」などとそれぞれ読み替えればよい。

[0054] <3>組換え第 3 蛋白質及びその製法

組換え第 3 蛋白質は、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質である。

[0055] 組換え第 3 蛋白質は、具体的には、以下のいずれかである組換え蛋白質で

ある。

(I) リムルス・ポリフェムスのプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(II) 前記(I)のバリエーションであって、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

[0056] リムルス・ポリフェムスのプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質のアミノ酸配列としては、配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列が挙げられる。また、そのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列が挙げられる。

[0057] 組換え第3蛋白質は、より具体的には、以下のいずれかである組換え蛋白質であってよい。

(A) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。

(B) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

(C) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

(D) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する組換え蛋白質。

[0058] この蛋白質の機能は、活性型となった第2蛋白質等のB因子活性を有する蛋白質(活性型)によって活性型となり、後述する基質(蛋白質またはペプチド)を切断する機能(本出願書類において「プロクロッティングエンザイム活性」という)である。組換え第3蛋白質は、少なくとも組換え第2蛋白質

質等の第2蛋白質との組み合わせにおいて、プロクロッティングエンザイム活性を示すものであってよい。

[0059] プロクロッティングエンザイム活性を有することは、対象となる組換え蛋白質を、第2蛋白質（活性型）等のB因子活性を有する蛋白質（活性型）及び検出用基質と組み合わせた際に、カスケード反応の進行を検出することにより確認できる。この系には、B因子活性を有する蛋白質（非活性型）を活性型に変化させるためのC因子活性を有する蛋白質（活性型）がさらに存在していてもよい。また、この系には、C因子活性を有する蛋白質（非活性型）を活性型に変化させるためのエンドトキシンがさらに存在していてもよい。

[0060] その他の説明は、前記<1>の説明を準用できる。すなわち、例えば、前記<1>における「配列番号1または3」を「配列番号13、15、17、19、または21」、「配列番号2または4」を「配列番号14、16、18、20、または22」、「（組換え）第1蛋白質」を「（組換え）第3蛋白質」、「第1cDNA」を「第3cDNA」、「C因子」を「プロクロッティングエンザイム」などとそれぞれ読み替えればよい。

[0061] <4>組換え第1蛋白質の使用

組換え第1蛋白質は、第2蛋白質等のB因子活性を有する蛋白質を活性化するために使用することができる。換言すれば、本発明は、組換え第1蛋白質をB因子活性を有する蛋白質と接触させるステップを含む、B因子活性を有する蛋白質の活性化方法を包含する。

[0062] B因子活性を有する蛋白質としては、第2蛋白質が挙げられる。

[0063] 第2蛋白質は、具体的には、以下のいずれかである蛋白質である。

（I）リムルス・ポリフェムスのB因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む蛋白質。

（I1）前記（I）のバリエーションであって、B因子活性を有する蛋白質。

[0064] 第2蛋白質は、より具体的には、以下のいずれかである蛋白質であってよい。

(A) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(B) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列に対して 95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B 因子活性を有する蛋白質。

(C) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列に対して 95%以上の同一性を有する塩基配列を含む DNA によってコードされ、かつ、B 因子活性を有する蛋白質。

(D) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA によってコードされ、かつ、B 因子活性を有する蛋白質。

[0065] また、B 因子活性を有する蛋白質としては、以下の蛋白質も挙げられる。

(III) リムルス・ポリフェムス以外のカプトガニの B 因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む蛋白質。

(IV) 前記 (III) のバリエントであって、B 因子活性を有する蛋白質。

[0066] B 因子活性を有する蛋白質の説明は、前記<2>の説明を準用できる。

[0067] 本発明により、組換え第 1 蛋白質の (A) の蛋白質が C 因子活性を保持していることが初めて明らかにされた。このような機能をもつ (A) の蛋白質及びそのバリエントを、B 因子活性を有する蛋白質の活性化に応用したものである。

[0068] ここで用いる B 因子活性を有する蛋白質は、上記の構造及び機能を有する限り、天然物から取得したものでも、人工的に製造されたもの（例えば、組換え第 2 蛋白質）でもよい。本発明により、組換え第 2 蛋白質の人工的かつ機能的な発現が初めて可能になり、第 2 蛋白質を天然のリムルス・ポリフェムスから取得することなく一定の品質で安定的に製造することができるようになったことから、B 因子活性を有する蛋白質は、組換え第 2 蛋白質であることが好ましい。

[0069] 組換え第1蛋白質を用いたB因子活性を有する蛋白質の活性化は、組換え第1蛋白質（活性型）分子とB因子活性を有する蛋白質（非活性型）分子とを接触させることにより行うことができる。なお、組換え第1蛋白質を活性型に変化させるために、エンドトキシン存在下で組換え第1蛋白質（非活性型）とB因子活性を有する蛋白質（非活性型）とを接触させてもよい。

[0070] この接触時の条件は、組換え第1蛋白質（活性型）がC因子活性を発揮してB因子活性を有する蛋白質を活性化できる条件（エンドトキシン存在下で行う場合には、さらにエンドトキシンが組換え第1蛋白質を活性化できる条件）である限りにおいて特に限定されない。例えば、公知のライセート試薬における反応条件を採用することができる。

[0071] B因子活性を有する蛋白質が活性化されたことは、後述の実施例に記載の方法で確認することができる。

[0072] <5>組換え第2蛋白質の使用

組換え第2蛋白質は、第3蛋白質等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質を活性化するために使用することができる。換言すれば、本発明は、組換え第2蛋白質をプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質と接触させるステップを含む、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の活性化方法を包含する。

[0073] プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質としては、第3蛋白質が挙げられる。

[0074] 第3蛋白質は、具体的には、以下のいずれかである蛋白質である。

（I）リムルス・ポリフェムスのプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む蛋白質。

（II）前記（I）のバリエーションであって、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

[0075] 第3蛋白質は、より具体的には、以下のいずれかである蛋白質であってよい。

（A）配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配

列を含む蛋白質。

(B) 配列番号 14、16、18、20、または 22 で表されるアミノ酸配列に対して 95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

(C) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列に対して 95%以上の同一性を有する塩基配列を含む DNA によってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

(D) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA によってコードされ、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

[0076] また、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質としては、以下の蛋白質も挙げられる。

(III) リムルス・ポリフェムス以外のカプトガニのプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む蛋白質。

(IV) 前記 (III) のバリエントであって、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質。

[0077] プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の説明は、前記<3>の説明を準用できる。

[0078] ここで用いるプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質は、上記の構造及び機能を有する限り、天然物から取得したものでも、人工的に製造されたもの（例えば、組換え第 3 蛋白質）でもよい。

[0079] 組換え第 2 蛋白質を用いたプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の活性化は、組換え第 2 蛋白質（活性型）分子とプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（非活性型）分子とを接触させることにより行うことができる。なお、組換え第 2 蛋白質を活性型に変化させるために、C 因子活性を有する蛋白質（活性型）の存在下で、組換え第 2 蛋白質（非活性型）とプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（非活性型）とを

接触させてもよい。さらに、このC因子活性を有する蛋白質を活性化するために、エンドトキシン存在下でC因子活性を有する蛋白質（非活性型）、組換え第2蛋白質（非活性型）、及びプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（非活性型）を接触させてもよい。

[0080] この接触時の条件は、組換え第2蛋白質（活性型）がB因子活性を発揮してプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質を活性化できる条件（C因子活性を有する蛋白質（活性型）の存在下で行う場合には、さらにC因子活性を有する蛋白質（活性型）がC因子活性を発揮して組換え第2蛋白質を活性化できる条件。エンドトキシン存在下で行う場合には、さらにエンドトキシンがC因子活性を有する蛋白質を活性化できる条件）である限りにおいて特に限定されない。例えば、公知のライセート試薬における反応条件を採用することができる。

[0081] 第3蛋白質が活性化されたことは、後述の実施例に記載の方法により確認することができる。

[0082] C因子活性を有する蛋白質としては、第1蛋白質が挙げられる。

[0083] 第1蛋白質は、具体的には、以下のいずれかである蛋白質である。

（I）リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む蛋白質。

（I I）前記（I）のバリエーションであって、C因子活性を有する蛋白質。

[0084] 第1蛋白質は、より具体的には、以下のいずれかである蛋白質であってよい。

（A）配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

（B）配列番号2または4で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する蛋白質。

（C）配列番号1または3で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する蛋白質。

（D）配列番号1または3で表される塩基配列の相補配列からなるDNAと

ストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する蛋白質。

[0085] また、C因子活性を有する蛋白質としては、以下の蛋白質も挙げられる。

(III) リムルス・ポリフェムス以外のカプトガニのC因子活性を有する蛋白質のアミノ酸配列を含む蛋白質。

(IV) 前記(III)のバリエーションであって、C因子活性を有する蛋白質。

[0086] C因子活性を有する蛋白質の説明は、前記<1>の説明を準用できる。

[0087] ここで用いるC因子活性を有する蛋白質は、上記の構造及び機能を有する限り、天然物から取得したものでも、人工的に製造されたもの（例えば、組換え第1蛋白質）でもよい。

[0088] その他の説明は、前記<4>の説明を準用できる。

[0089] <6>組換え第3蛋白質の使用

組換え第3蛋白質は、基質を切断するために使用することができる。換言すれば、本発明は、組換え第3蛋白質を基質と接触させるステップを含む、基質の切断方法を包含する。

[0090] この基質は、前記の「検出用基質」としても用いることができ、天然由来の基質であっても、合成基質であってもよい。このような基質は、第3蛋白質（活性型）等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質（活性型）が有するプロクロッティングエンザイム活性によって切断されるものであれば特に限定されない。

[0091] プロクロッティングエンザイム活性によって切断されるものとしては、例えば、コアグュローゲンなどの蛋白質や、一般式X-Y-Z（式中、X-はYと共有結合した保護基、Yはペプチド残基、-ZはYとアミド結合したシグナル物質である）で表される合成基質が挙げられる。

[0092] 保護基Xは特に限定されず、ペプチドの公知の保護基を用いることができる。そのような保護基としては、例えば、t-ブトキシカルボニル基やベンゾイル基が挙げられる。

- [0093] ペプチド残基 Y も特に限定されず、例えば、L e u - G l y - A r g (LGR) や I l e - G l u - G l y - A r g (I EGR) (配列番号 23) が挙げられる。
- [0094] シグナル物質 Z も特に限定されず、例えば、可視光下で検出される色素や蛍光色素が挙げられる。このような色素としては、例えば、p N A (パラニトロアニリン)、M C A (7-メトキシクマリン-4-酢酸)、D N P (2, 4-ジニトロアニリン)、D a n s y l (ダンシル) 系色素が挙げられる。
- [0095] これらのなかでも、B o c - L e u - G l y - A r g - p N A (t-ブトキシカルボニル-ロイシル-グリシル-アルギニル-パラニトロアニリン。B o c - L G R - p N A) が好ましい。
- [0096] 基質がプロクロッティングエンザイム活性によって切断されたことは、例えば、基質としてコアギュローゲンを用いた場合には、「ゲル化」を検知することにより検出することができる。ゲル化は、例えば、流動性が低下したことを目視などで検知することにより検出することができる。
- [0097] また、基質がプロクロッティングエンザイム活性によって切断されたことは、例えば、前記のような合成基質を用いた場合には、Y-Z間のアミド結合が切断されることによりシグナル Z が遊離して発色や蛍光などのシグナルを発するので、このシグナルを検知することにより検出することができる。シグナルの検知は、そのシグナルの種類に応じた手法により行えばよい。例えば、p N A のシグナルは、吸光度 (405 nm) によって検出することができる。
- [0098] 組換え第3蛋白質を用いた基質の切断は、組換え第3蛋白質 (活性型) 分子と基質分子とを接触させることにより行うことができる。なお、組換え第3蛋白質を活性型に変化させるために、B 因子活性を有する蛋白質 (活性型) の存在下で、組換え第3蛋白質 (非活性型) と基質とを接触させてもよい。さらに、この B 因子活性を有する蛋白質を活性型に変化させるために、C 因子活性を有する蛋白質 (活性型) の存在下で、B 因子活性を有する蛋白質

(非活性型)、組換え第3蛋白質(非活性型)、及び基質を接触させてもよい。さらに、このC因子活性を有する蛋白質を活性型に変化させるために、エンドトキシン存在下でC因子活性を有する蛋白質(非活性型)、B因子活性を有する蛋白質(非活性型)、組換え第3蛋白質(非活性型)、及び基質を接触させてもよい。

[0099] この接触時の条件は、組換え第3蛋白質(活性型)がプロクロッティングエンザイム活性を発揮して基質を切断できる条件(B因子活性を有する蛋白質(活性型)の存在下で行う場合には、さらにB因子活性を有する蛋白質(活性型)がB因子活性を発揮して組換え第3蛋白質を活性化できる条件。C因子活性を有する蛋白質(活性型)の存在下で行う場合には、さらにC因子活性を有する蛋白質(活性型)がC因子活性を発揮して第2蛋白質を活性化できる条件。エンドトキシン存在下で行う場合には、さらにエンドトキシンがC因子活性を有する蛋白質を活性化できる条件)である限りにおいて特に限定されない。例えば、公知のライセート試薬における反応条件を採用することができる。

[0100] その他の説明は、前記<4>の説明を準用できる。

[0101] <7>エンドトキシンの検出方法

本発明のエンドトキシンの検出方法は、組換え第1蛋白質を検体と接触させるステップを含む、検体中のエンドトキシンの検出方法である。

[0102] この方法は、検体と接触した組換え第1蛋白質を、第2蛋白質等のB因子活性を有する蛋白質と接触させるステップを更に含んでいてよい。このB因子活性を有する蛋白質は、組換え第2蛋白質であってよい。

[0103] また、この方法は、「検体と接触した組換え第1蛋白質」と接触したB因子活性を有する蛋白質を、第3蛋白質等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質と接触させるステップを更に含んでいてよい。このプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質は、組換え第3蛋白質であってよい。

[0104] 検体中のエンドトキシンの検出は、検体と接触した組換え第1蛋白質の活

性化を検知することにより行うことができる。組換え第1蛋白質が活性化されたことは、後述の実施例に記載の方法により確認することができる。また、組換え第1蛋白質の活性化は、基質（検出用基質）を利用して直接検知することもできる。すなわち、検出用基質として、活性化された組換え第1蛋白質のC因子活性により切断されシグナルを発するものを利用することにより、組換え第1蛋白質の活性化を直接検知することができる。よって、この方法は、「検体と接触した組換え第1蛋白質」と検出用基質を接触させるステップを更に含んでもよい。

[0105] 更にB因子活性を有する蛋白質と接触させるステップを含む場合には、前記<4>に記載の方法でB因子活性を有する蛋白質の活性化を検知することにより行うことができる。また、B因子活性を有する蛋白質の活性化は、基質（検出用基質）を利用して直接検知することもできる。すなわち、検出用基質として、活性化されたB因子活性を有する蛋白質のB因子活性により切断されシグナルを発するものを利用することにより、B因子活性を有する蛋白質の活性化を直接検知することができる。よって、この方法は、「組換え第1蛋白質と接触したB因子活性を有する蛋白質」と検出用基質を接触させるステップを更に含んでもよい。

[0106] 更にプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質と接触させるステップを含む場合には、前記<5>に記載の方法でプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の活性化（前記<6>に記載の方法による基質の切断）を検知することにより行うことができる。よって、この方法は、「B因子活性を有する蛋白質と接触したプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質」と基質（検出用基質）を接触させるステップを更に含んでもよい。プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の活性化を検知できる検出用基質としては、前記<6>に例示したものが挙げられる。

[0107] これらのステップは、順次行ってもよく、同時に行ってもよい。例えば、これらのステップを同時に行う場合には、検体、組換え第1蛋白質（非活性型）、B因子活性を有する蛋白質（非活性型）、プロクロッティングエンザ

イム活性を有する蛋白質（非活性型）、検出用基質を同時に同じ系のなかで接触させてもよい。

[0108] これらの接触の条件は、前記<4>～<6>に記載した条件と同様である。例えば、組換え第1蛋白質と検体との接触は、検体中のエンドトキシンが組換え第1蛋白質を活性化できる条件である限りにおいて特に限定されない。接触の条件は、例えば公知のライセート試薬における反応条件を採用することができる。例えば、反応液のpHとしては、pH5～10、好ましくは7～8.5を採用できる。反応温度としては、10℃～80℃、好ましくは20℃～50℃、さらに好ましくは30℃～40℃を採用することができる。反応温度としては、例えば、37℃が例示される。反応時間も特に限定されず、諸条件に応じて適宜設定すればよい。反応時間は、例えば、5分～2時間、好ましくは15分～90分、より好ましくは30分～40分であってよい。

[0109] 検体も、エンドトキシンの検出が必要な試料である限りにおいて特に限定されない。検体としては、例えば、医療用水、医薬品、輸液、血液製剤、医療機器、医療器具、化粧品、飲食品、環境試料、生体成分、天然の蛋白質、組換え蛋白質、核酸、糖質が挙げられる。検体は、それ自体を、あるいはその抽出物や洗浄液を反応系に混合、分散、又は溶解し、エンドトキシンの検出に供することができる。

[0110] エンドトキシンの検出は、定性的な検出でも、定量的な検出でもよい。定量的な検出は、例えば、エンドトキシン量（濃度）が異なる複数の標準品を用いて、その量（濃度）と、基質の種類に応じた検出レベル（例えば、基質としてコアギュローゲンを用いた場合には「ゲル化」の程度、合成基質を用いた場合にはシグナルの程度）との関係を、例えば検量線や関係式を用いて予め関連付けておき、実際の検体を用いた場合の検出レベルから、エンドトキシン量（濃度）を換算することにより行うことができる。

[0111] <8>エンドトキシン検出剤

本発明のエンドトキシン検出剤は、組換え第1蛋白質を含む、エンドトキ

シン検出剤である。

- [0112] この検出剤は、第2蛋白質等のB因子活性を有する蛋白質を更に含んでいてよい。このB因子活性を有する蛋白質は、組換え第2蛋白質であってよい。
- [0113] この検出剤は、第3蛋白質等のプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質を更に含んでいてよい。このプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質は、組換え第3蛋白質であってよい。
- [0114] これらの蛋白質は、前記<1>～<3>に説明したとおり、例えば、培養液、培養上清、細胞破碎抽出物、またはそれらの混合物等の中に存在する形態でありうる。これらの蛋白質は、所望の程度に精製して用いてもよく、精製せずそのまま用いてもよい。例えば、これらの蛋白質が培養上清中に含有されている場合には、その培地成分を含んだまま用いてもよい。
- [0115] この検出剤中の組換え第1蛋白質、B因子活性を有する蛋白質、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の各量は、各蛋白質の活性等に応じ適宜設定できるが、例えば、検体と混合した状態の反応液中の各蛋白質の終濃度として、15～30 $\mu\text{g/mL}$ を例示することができる。
- [0116] この検出剤は、更に基質（検出用基質）を含んでいてよい。
- [0117] この検出剤は、これらの物を構成成分として含ませることにより製造することができる。この検出剤は、それ以外に賦形剤、安定化剤、緩衝剤などの添加剤を更に含んでいてもよい。また、この検出剤の形状も特に限定されず、固体状（例えば凍結乾燥形態）、液体状等の任意の形態で製剤化できる。
- [0118] この検出剤では、これらの物が、まとめて一体の容器内に構成成分として収められていてもよく、別体の容器内に収められていてもよい。
- [0119] また、この検出剤は、溶解用の緩衝液、エンドトキシン標準品、反应用容器（例えば、チューブやマイクロプレート）などを更に含んでいてもよい。この検出剤は、キットの形態をも包含する。
- [0120] この検出剤は、例えば前記<7>に説明した方法で 사용할 ことができる。

[0121] <9>第1 cDNA及びその利用

(1) 第1 cDNA

第1 cDNAは、以下のいずれかであるcDNAである。

(A) 配列番号1または3で表される塩基配列を含むcDNA。

(B) 配列番号1または3で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、C因子活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

(C) 配列番号1または3で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、C因子活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

(D) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするcDNA。

(E) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

[0122] このcDNAは、本明細書の実施例に開示された方法によって世界で初めて取得され、その全長の配列構造及びこれによってコードされる蛋白質の機能が初めて明らかにされたものである。その機能は「C因子活性」である。

[0123] 第1 cDNAのうち、最も好ましいのは前記(A)のcDNAであるが、これによってコードされる蛋白質がC因子活性を有する限り、それらのバリエーションであってもよい。

[0124] バリエーションとして具体的には、前記(B)～(E)のcDNAが好ましい。前記(B)、(C)、及び(E)における「95%以上」は、好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上である。

[0125] また、「ストリンジェントな条件」の意義及びその他の説明は、前記<1>の説明を準用できる。

[0126] また、第1 cDNAは、任意のコドンをそれと等価のコドンに置換したも

のであってもよい。例えば、前記（Ａ）のｃＤＮＡにおいて任意のコドンとそれと等価のコドンに置換してなるｃＤＮＡは、前記（Ｄ）に包含される。

[0127] 第１ｃＤＮＡは、その完全な塩基配列が本発明によって開示されたので、この配列情報を用いて、公知のＤＮＡ合成手法ないし遺伝子工学的手法により製造することができる。第１ｃＤＮＡは、後述の実施例に記載の方法によって初めて取得されたものであるが、その塩基配列が本発明で開示された以上、実施例記載の方法以外の方法によっても製造することができる。

[0128] （２）第１ｃＤＮＡを含むＤＮＡ構築物、形質転換細胞、これを用いた組換え第１蛋白質の生産方法

本発明は、第１ｃＤＮＡを含むＤＮＡ構築物を提供する。このような人工のＤＮＡ構築物としては、例えば、ベクターを例示することができる。ベクターとしては、組換えＤＮＡの増幅、維持、導入、ライブラリー作製、クローニング、蛋白質翻訳（蛋白質発現）などの目的に応じて、プラスミド、ウイルス、その他の公知のベクターを適宜選択することができる。このようなベクター等に第１ｃＤＮＡを導入することにより、第１ｃＤＮＡを含むＤＮＡ構築物を製造することができる。

[0129] また、本発明は、第１ｃＤＮＡを含む細胞を提供する。このような細胞は、例えば、このようなＤＮＡ構築物で形質転換されて組換え第１蛋白質を発現する細胞であってよい。また、本発明は、このような細胞を培養するステップを含む、組換え第１蛋白質の生産方法を提供する。

[0130] ＤＮＡ構築物で細胞（宿主細胞）を形質転換する方法、これを培養して組換え第１蛋白質を生産する方法は、前記＜１＞（２）における説明を準用できる。

[0131] ＜１０＞第２ｃＤＮＡ

（１）第２ｃＤＮＡ

第２ｃＤＮＡは、以下のいずれかであるｃＤＮＡである。

（Ａ）配列番号５、７、９、または１１で表される塩基配列を含むｃＤＮＡ。

(B) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列に対して 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、B 因子活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

(C) 配列番号 5、7、9、または 11 で表される塩基配列の相補配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、B 因子活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

(D) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする cDNA。

(E) 配列番号 6、8、10、または 12 で表されるアミノ酸配列に対して 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B 因子活性を有する蛋白質をコードする cDNA。

[0132] その他の説明は、前記の<9>(1)の説明を準用できる。すなわち、例えば、前記<9>(1)の「C 因子」を「B 因子」、「第 1 cDNA」を「第 2 cDNA」などとそれぞれ読み替えればよい。

[0133] (2) 第 2 cDNA を含む DNA 構築物、形質転換細胞、これを用いた組換え第 2 蛋白質の生産方法

本発明は、第 2 cDNA を含む DNA 構築物を提供する。また本発明は、このような DNA 構築物で形質転換されて組換え第 2 蛋白質を発現する細胞等の第 2 cDNA を含む細胞を提供する。また本発明は、このような細胞を培養するステップを含む、組換え第 2 蛋白質の生産方法を提供する。

[0134] その他の説明は、前記<9>(2)の説明を準用できる。

[0135] <11>第 3 cDNA

(1) 第 3 cDNA

第 3 cDNA は、以下のいずれかである第 3 cDNA である。

(A) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列を含む cDNA。

(B) 配列番号 13、15、17、19、または 21 で表される塩基配列に対して 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、プロクロッティ

ングエンザイム活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

(C) 配列番号13、15、17、19、または21で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

(D) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするcDNA。

(E) 配列番号14、16、18、20、または22で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、プロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質をコードするcDNA。

[0136] その他の説明は、前記の<9>(1)の説明を準用できる。すなわち、例えば、前記<9>(1)の「C因子」を「プロクロッティングエンザイム」、「第1cDNA」を「第3cDNA」などとそれぞれ読み替えばよい。

[0137] (2) 第3cDNAを含むDNA構築物、形質転換細胞、これを用いた組換え第3蛋白質の生産方法

本発明は、第3cDNAを含むDNA構築物を提供する。また本発明は、このようなDNA構築物で形質転換されて組換え第3蛋白質を発現する細胞等の第3cDNAを含む細胞を提供する。また本発明は、このような細胞を培養するステップを含む、組換え第3蛋白質の生産方法を提供する。

[0138] その他の説明は、前記<9>(2)の説明を準用できる。

[0139] <12>エンドトキシン検出剤の製造方法

本発明は、第1cDNAを用いて人工的に蛋白質を発現させるステップを含む、エンドトキシン検出剤の製造方法も提供する。

[0140] この方法は、第2cDNAを用いて人工的に蛋白質を発現させるステップを更に含んでいてよい。また、第3cDNAを用いて人工的に蛋白質を発現させるステップを更に含んでいてよい。

[0141] これらのcDNAを用いて人工的に蛋白質を発現させる方法も特に限定されないが、例えば、前記<9>(2)、<10>(2)、<11>(2)に

記載された方法を用いることができる。

[0142] このような方法で、第1 cDNAを用いて人工的に発現させることにより組換え第1蛋白質が発現される。同様に、更に第2 cDNAを用いて人工的に発現させることで組換え第2蛋白質が、第3 cDNAを用いて人工的に発現させることで組換え第3蛋白質がそれぞれ発現される。

[0143] 発現された蛋白質は、前記<1>～<3>に説明したとおり、例えば、培養液、培養上清、細胞破碎抽出物、またはそれらの混合物等の中に存在する形態でありうる。これらの蛋白質は、所望の程度に精製して用いてもよく、精製せずそのまま用いてもよい。例えば、これらの蛋白質が培養上清中に含有されている場合には、その培地成分を含んだまま用いてもよい。

[0144] その他の説明は、前記<8>の説明を準用できる。したがって、本発明のエンドトキシン検出剤の製造方法は、キットの製造方法をも包含する。

[0145] なお、本発明では、第2蛋白質（組換え第2蛋白質など）及び第3蛋白質（組換え第3蛋白質など）のいずれか一方又は双方を、リムルス・ポリフェムス以外のカブトガニに由来するこれらの対応物にそれぞれ置き換えてもよい。第2 cDNA及び第3 cDNAについても同様である。リムルス・ポリフェムス以外のカブトガニとしては、タキプレウス・トリデンタツス (*Tachypleus tridentatus*)、タキプレウス・ギガス (*Tachypleus gigas*)、タキプレウス・ロツンディカウダ (*Tachypleus rotundicauda*) 等のタキプレウス属に属する生物が挙げられる。

[0146] すなわち、第2蛋白質（組換え第2蛋白質など）に代えてリムルス・ポリフェムス以外のカブトガニ（タキプレウス・トリデンタツスなど）由来のB因子（組換えB因子など）を、第3蛋白質（組換え第3蛋白質など）に代えて同生物由来のプロクロッティングエンザイム（組換えプロクロッティングエンザイムなど）を、第2 cDNAに代えて同生物由来のB因子遺伝子（cDNAなど）を、第3 cDNAに代えて同生物由来のプロクロッティングエンザイム遺伝子（cDNAなど）をそれぞれ用いてもよい。

[0147] これらの蛋白質や遺伝子は、いずれも、リムルス・ポリフェムス以外のカ

ブトガニに実際に見出されるアミノ酸配列又は塩基配列を含むものであってもよいし、それらのバリエーションであってもよい。バリエーションについては、前記<1>～<11>におけるバリエーションの説明を準用できる。また、これらの蛋白質や遺伝子は、リムルス・ポリフェムス以外の同一のカブトガニに由来するものであってもよく、そうでなくてもよい。

[0148] そして、前記の説明からも明らかなとおり、本発明のエンドトキシン検出剤の製造方法には、第1 cDNA、第2 cDNA、及び第3 cDNA（第2 cDNA及び第3 cDNAについては、そのいずれか一方又は双方をリムルス・ポリフェムス以外のカブトガニ（タキプレウス・トリデンタツスなど）由来の遺伝子に置き換えてもよい）のそれぞれを人工的にカブトガニ以外の宿主細胞に導入し、これら各々のcDNAから各々の組換え蛋白質（計3種類）を発現させ、次いで、前記<8>のとおり、これらの発現された各々の組換え蛋白質を構成成分として含ませる態様も包含される。

実施例

[0149] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の例示であり、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

[0150] （1）プライマーの合成

リムルス・ポリフェムスにおけるC因子活性を有する蛋白質のクローニングを試みるため、下記の各プライマーを合成した。

[0151] <C因子活性を有する蛋白質のクローニングに用いたプライマー>

SK15-dT20： CTGCAGGAATTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT（配列番号24）

SK15-FC-S： ATCGATAAGCTTGATGATCTGGGCTTGTGTGATGA（配列番号25）

SK15-As： CTGCAGGAATTCGAT（配列番号26）

LFC-5race： CTACACCAAGTTCCA（配列番号27）

LFC-1st-S： GTAAACCATGTGACAACTGGAGGC（配列番号28）

LFC-1st-As： AATAAGGCCTCCATCGATAGAAGTA（配列番号29）

LFC-EcoRI-kozak-S： GGGGAATTCAGCTTGCCACCATGGTACTAGCGTCGTTT（配列番号30）

LFC-XhoI-stop-As : GGGCTCGAGTCAAATGAACTGCCGAATCCACGATA (配列番号 3 1)

[0152] また、B 因子活性を有する蛋白質及びプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質の各クローニングを試みるため、下記の各プライマーを合成した。

[0153] < B 因子活性を有する蛋白質及びプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質のクローニングに用いたプライマー >

SK15-FB-S : ATCGATAAGCTTGATCACATGCAAGGAAAAGTTCT (配列番号 3 2)

SK15-FB-As : CTGCAGGAATTCGATCACTGTTTAAACAACTGAA (配列番号 3 3)

SK15-PCE-S : ATCGATAAGCTTGATAGACCAGAGTGGTCTTTCTG (配列番号 3 4)

SK15-As : CTGCAGGAATTCGAT (配列番号 2 6)

[0154] (2) リムルス・ポリフェムスの血球細胞からのトータルRNAの調製

トータルRNAの調製は、PureLink (登録商標) RNA Mini KitとPureLink (登録商標) DNase kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、基本的操作は添付の説明書に従った。リムルス・ポリフェムスの血球細胞プール2.23 g にTRIzol溶液を添加して細胞を破碎した。その後、これにクロロホルムを添加して遠心分離し、水層を得た。得られた水層にエタノールを添加した後、これをキットに添付のシリカ膜カートリッジに通すことで、核酸成分をシリカ膜に結合させた。このシリカ膜にキット添付のDNase Iを加えてDNAを分解し、カートリッジを洗浄後、溶出バッファーを添加して、トータルRNA (1.3mg) を回収した。

[0155] (3) リムルス・ポリフェムスのC 因子活性を有する蛋白質のcDNA (第 1 cDNA) の取得

(3 - 1) 第 1 ステップ

前記 (2) で回収したトータルRNAを鋳型として、SK15-d20 (配列番号 2 4) をプライマーとして用いた逆転写反応を行い、cDNAを得た。本プライマーはmRNAのポリA配列に選択的に結合するように設計され、更にその外側にポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) に利用可能な付加配列を有してい

る。本反応では逆転写酵素としてSuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用い、反応条件は添付の説明書に従った。

[0156] (3-2) 第2ステップ

得られたcDNAを鋳型とし、センスプライマーとしてSK15-FC-S (配列番号25)、アンチセンスプライマーとしてSK15-As (配列番号26)、ポリメラーゼとしてTks Gflex DNA polymerase (タカラバイオ) を用いてPCRを行った。

[0157] PCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、目的としたDNA (LpFC1) はほとんど検知できず、非特異的なDNA増幅が検知された (図1A)。そこで、以下のステップを試すこととした。なお、図1A中の「1」のレーンはサイズマーカー、「2」のレーンがPCR産物である。また三角印はLpFC1の存在が予想される部分である。

[0158] (3-3) 第3ステップ

LpFC1の存在が予想された部分をゲルから切り出して、DNAを抽出、精製した。これを鋳型として、センスプライマーとしてSK15-FC-S (配列番号25)、アンチセンスプライマーとしてSK15-As (配列番号26)、ポリメラーゼとしてTks Gflex DNA polymerase (タカラバイオ) を用いてPCRを行った。

[0159] PCR産物をアガロースゲル電気泳動した結果、驚くべきことに目的としたDNA (LpFC1) が著しく増幅していた (図1B)。このLpFC1をゲルから切り出して抽出、精製した。これにより、リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質をコードしている可能性があるDNAの部分断片 (LpFC1) の取得に成功した。なお、図1B中の「1」のレーンはサイズマーカー、「2」のレーンがPCR産物である。また、三角印はLpFC1の位置である。

[0160] (3-4) 第4ステップ

LpFC1をEcoRV酵素処理したpBluescript II SK (+) と混合し、In-Fusion HD Enzyme premix (タカラバイオ) を用いて組換え反応によりベクターへの導入を行った。反応物をE. coli DH5α competent cellに形質転換し、X-Gal、IPTGを含むアンピシリンLB培地プレートに塗布して、ブルーホワイトスクリーニングによるコロニーの選定を行った。

[0161] その後、候補のコロニーに対するコロニーPCRでDNA増幅を行った。この際、センスプライマーとしてM13-20 Primer、アンチセンスプライマーとしてM13 Reverse Primer、ポリメラーゼとしてTks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ）を用いた。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動後、ゲルから切り出して抽出、精製したDNA（LpFC1）を鋳型として、シーケンスPCRにより配列を確認した。これにより、LpFC1のDNA配列が判明した。

[0162] （３－５）第５ステップ

LpFC1の配列情報を参考に作製した合成DNA LFC-5race（配列番号２７）の5'末端を、ATP存在下でT4 Polynucleotide Kinase（タカラバイオ）によりリン酸化した。前記のトータルRNAを鋳型とし、得られたリン酸化プライマーと逆転写酵素SuperScript III Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific）を用いた逆転写反応により、目的とするDNA（LpFC2）を得た。これにより、リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質の一部分を含むアミノ酸配列をコードしている可能性があるDNAの部分断片（LpFC2）を得た。

[0163] LpFC2をRNase A存在下で高温処理（95℃、2分間）したのち、エタノール沈殿を行った。その後、T4 RNA Ligase（New England Biolabs）で処理した結果、LpFC2が連続的に結合したコンカテマー化DNA（LpFC3）が得られた。これにより、リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質の一部分を含むアミノ酸配列をコードしている可能性があるDNAの部分断片（LpFC3）を得た。

[0164] LpFC3を鋳型に、センスプライマーとしてLFC-1st-S（配列番号２８）、アンチセンスプライマーとしてLFC-1st-As（配列番号２９）、Tks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ）を用いたPCRを行い、目的とするDNA（LpFC4）を増幅した。

[0165] PCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、目的としたDNA（LpFC4）はほとんど検知できず、非特異的なDNA増幅が検知された（図２A）。そこで、以下のステップを試すこととした。なお、図２A中の「１」のレーン

はサイズマーカー、「2」のレーンがPCR産物である。また、三角印はLpFC4の位置である。

[0166] (3-6) 第6ステップ

LpFC4の存在が予想される部分をゲルから切り出して、DNAを抽出、精製した。これを鋳型として、センスプライマーとしてLFC-1st-S（配列番号28）、アンチセンスプライマーとしてLFC-1st-As（配列番号29）、ポリメラーゼとしてTks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ）を用いてPCRを行った。

[0167] PCR産物をアガロースゲル電気泳動した結果、驚くべきことに目的としたDNA（LpFC4）が著しく増幅し、非常に高濃度で検出された（図2B）。このLpFC4をゲルから切り出して抽出、精製した。これにより、リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する蛋白質の一部分を含むアミノ酸配列をコードしている可能性があるDNAの部分断片（LpFC4）の取得に成功した。なお、図2B中の「1」のレーンはサイズマーカー、「2」のレーンがPCR産物である。また、三角印はLpFC4の存在が予想される部分である。

[0168] LpFC4を鋳型とし、シークエンスPCRによりLpFC4の配列を解析した。これにより、目的蛋白質の5'側のDNA配列が判明した。

[0169] (3-7) 第7ステップ

前記(3-1)で得たcDNAを鋳型とし、センスプライマーとしてLFC-EcoRI-kozak-S（配列番号30）、アンチセンスプライマーとしてLFC-XhoI-stop-As（配列番号31）、ポリメラーゼとしてTks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ）を用いてPCRを行った。

[0170] PCR産物をフェノールクロロフォルム抽出、エタノール沈殿によって精製後、EcoRI酵素とXhoI酵素で処理した。制限酵素処理産物をアガロースゲル電気泳動してゲルから切り出し、DNAを抽出、精製して目的DNA（LpFC5）を得た。

[0171] LpFC5をEcoRI酵素とXhoI酵素で処理した発現ベクターpCA7（Takeda et al., 2005, J virol 79:14346-14354）と混合し、Ligation Mix（タカラバイオ）を用いてライゲーション反応を行った。反応物をE. coli DH5α competent cellに形質転換し、アンピシリン含有LB培地プレートに塗布した。得られた

コロニーからコロニーPCRによる選定を行った後、アンピシリン含有LB培地に植菌した。

[0172] 培養後、NucleoSpin (登録商標) Plasmid Easy Pure (マッハライ・ナーゲル) によるプラスミド精製を行った。得られた2種のクローンのプラスミドを鋳型とし、シークエンスPCRにより各々の塩基配列を解析した。

[0173] これにより、リムルス・ポリフェムスのC因子活性を有する可能性がある蛋白質をコードするcDNAの全長配列(配列番号1、配列番号3)と、その蛋白質のアミノ酸の全長配列(配列番号2、配列番号4)の解明に初めて成功した。配列番号1と3(配列番号2と4)はバリエーションの関係にあり、個体間の多型に基づくと考えられる。この蛋白質の発現及び活性解析については後述する。

[0174] (4) リムルス・ポリフェムスのB因子活性を有する蛋白質のcDNA(第2 cDNA)の取得

前記(3-1)で得たcDNAを鋳型とし、センスプライマーとしてSK15-FB-S(配列番号32)、アンチセンスプライマーとしてSK15-FB-As(配列番号33)、ポリメラーゼとしてTks Gflex DNA polymerase(タカラバイオ)を用いてPCRを行った。増幅した断片を前記(3-4)と同じ手順でクローニングし、得られた4種のクローンについて各々の塩基配列を解析した。

[0175] これにより、リムルス・ポリフェムスのB因子活性を有する可能性がある蛋白質をコードするcDNAの全長配列(配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11)と、その蛋白質のアミノ酸の全長配列(配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12)を解明した。配列番号5、7、9および11(配列番号6、8、10および12)はバリエーションの関係にあり、個体間の多型に基づくと考えられる。この蛋白質の発現及び活性解析については後述する。

[0176] (5) リムルス・ポリフェムスのプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質のcDNA(第3 cDNA)の取得

前記(3-1)で得たcDNAを鋳型とし、センスプライマーとしてSK15-PCE-

S（配列番号 34）、アンチセンスプライマーとして SK15-As（配列番号 26）、ポリメラーゼとして Tks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ）を用いて PCR を行った。増幅した断片を前記（3-4）と同じ手順でクローニングし、得られた 5 種のクローンについて各々の塩基配列を解析した。

[0177] これにより、リムルス・ポリフェムスのプロクロッティングエンザイム活性を有する可能性がある蛋白質をコードする cDNA の全長配列（配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21）と、その蛋白質のアミノ酸の全長配列（配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22）を解明した。配列番号 13、15、17、19 および 21（配列番号 14、16、18、20 および 22）はバリエーションの関係にあり、個体間の多型に基づくと考えられる。この蛋白質の発現及び活性解析については後述する。

[0178] （6）組換え蛋白質の発現

前記（5）で得た cDNA（配列番号 13）を、哺乳類細胞での蛋白質発現用ベクター pCA7 につなぎ、発現プラスミドを得た。前記（4）で得た cDNA（配列番号 5）は、文献（Kobayashi et al., 2015, J Biol Chem, 290:19379-19386）に従い、蛋白質発現用ベクター pCA7 につなぎ、発現プラスミドを得た。これらの発現プラスミドおよび前記（3-7）で得られた発現プラスミド（配列番号 1 の cDNA が組み込まれたもの）と、ExpiCHO™ Expression System（Thermo Fisher Scientific）を使い、培養上清画分として各々の組換え蛋白質を得た。

[0179] 細胞への発現プラスミドのトランスフェクションと組換え蛋白質の回収は、添付の説明書に従った。

[0180] これにより、リムルス・ポリフェムスの、C 因子活性を有する可能性がある蛋白質（配列番号 2）、B 因子活性を有する可能性がある蛋白質（配列番号 6）、プロクロッティングエンザイム活性を有する可能性がある蛋白質（配列番号 14）の発現及び取得に初めて成功した。これら蛋白質の活性解析については後述する。

[0181] (7) 活性測定

50mM トリス緩衝液 (pH8.0)、合成基質 (Boc-LGR-pNA) の存在下で、前記 (6) で得た 3 種類の組換え蛋白質の種々の組合せについて、米国薬局方標準エンドトキシン (USP-RSE。生化学工業株式会社) (0 EU/mL 、 0.05 EU/mL 。EU はエンドトキシン単位) を検体として、エンドトキシンに依存した 3 種の組換え蛋白質の活性化を調べた。この反応は 37°C で 30 分間行った。

[0182] このアッセイ系でカスケード反応が進行すれば、エンドトキシンにより C 因子活性を有する蛋白質が活性化され、この活性化された C 因子活性を有する蛋白質により B 因子活性を有する蛋白質が活性化され、この活性化された B 因子活性を有する蛋白質によりプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質が活性化され、この活性化されたプロクロッティングエンザイム活性を有する蛋白質により合成基質 Boc-LGR-pNA が切断され、これにより pNA が遊離する。pNA の遊離は、吸光度 ($A_{405\text{nm}}$) の変化を測定することで検知した。その結果、3 種の組換え蛋白質が揃った場合に合成基質の切断がみられた (図 3)。なお、図 3 中、FC は前記 (3-7) で得た cDNA から発現させた蛋白質、FB は前記 (4) で得た cDNA から発現させた蛋白質、PCE は前記 (5) で得た cDNA から発現させた蛋白質である。エンドトキシン検体と混合した状態の反応液 ($100\text{ }\mu\text{L}$) 中の蛋白質終濃度は、FC が $22.8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、FB が $20.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、PCE が $23.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ であった。各アッセイは $N=3$ で行い、標準偏差をエラーバーとして図中に併記した。

[0183] このことから、発現された C 因子活性を有する可能性がある蛋白質、B 因子活性を有する可能性がある蛋白質、プロクロッティングエンザイム活性を有する可能性がある蛋白質は、それぞれ C 因子活性、B 因子活性、プロクロッティングエンザイム活性を有し、エンドトキシンと接触することによってカスケード反応が生じることが初めて示された。またこれらの組換え蛋白質を利用して、エンドトキシンを検出できることが初めて示された。

[0184] 更に、この条件下でエンドトキシンの濃度依存性を調べ、検量線を作成したところ、 0.001 から 0.1 EU/mL の濃度範囲で良好な直線性を示した (図 4)

。各エンドトキシン濃度におけるアッセイはN = 3で行い、標準偏差をエラーバーとして図中に併記した。

[0185] 以上の結果から、前記の3種類の各組換え蛋白質を用いることで、エンドトキシンの定量的な高感度かつ高精度での検出も可能であることが初めて示された。

[0186] (8) タキプレウス属由来の組換えC因子との活性比較

リムルス・ポリフェムス由来の組換えC因子（以下「LFC」）と、タキプレウス属由来の組換えC因子（以下「TFC」）との活性を比較した。

[0187] LFCは、配列番号1のcDNAを前記(6)と同様に発現させ、培養上清画分として得た。TFCは、タキプレウス・トリデンタツスのC因子遺伝子(W02014/092079の配列番号1)を同文献の実施例1.(2)に記載の方法によって前記(6)と同様に発現させ、培養上清画分として得た。ここでは、蛋白質発現用ベクターとして、いずれもpCI-neo (Promega)を用いた。

[0188] 試験に付するLFCとTFCについて、C因子特異的なモノクローナル抗体(2C12; Yoshiki Miura, et al., J. Biochem. 112: 476-481 (1992))を用いたウェスタンブロットを行った。等しい容量のサンプル(各3 μ L)をアプライしてバンドの強度を光学的に測定した結果、LFCは18036、TFCは24516であった。すなわち、等容量のサンプル中の組換えC因子の相対量(TFC/LFC)は1.4であった。

[0189] 次に、カスケード反応系(C因子、B因子、及びプロクロッティングエンザイムを含有する系)における各組換えC因子の活性を比較した。B因子及びプロクロッティングエンザイムは、いずれもタキプレウス属由来の組換え蛋白質を用いた。前者は、タキプレウス・トリデンタツスのB因子遺伝子(W02014/092079の配列番号5)を、後者は同生物のプロクロッティングエンザイム遺伝子(同文献の配列番号7)を、それぞれ同文献に記載の方法(実施例2. 組換えファクターBと組換えプロクロッティングエンザイムの調製)で発現させ、培養上清画分として得たものを用いた。

[0190] 組換えC因子(LFC又はTFC)の各サンプル(いずれも同容量)、並びに前

記のタキプレウス・トリデンタツス由来の組換えB因子（TFB）及び同由来の組換えプロクロッティングエンザイム（TPCE）を用いて、前記（7）に記載の方法で活性を測定した。用いる組換えC因子以外の条件は同一とした。

[0191] 各カスケード反応系における、0EU/mL（ブランク）及び0.05EU/mLの各エンドトキシン濃度における吸光度の変化（mAbs/min）は、LFCの系で0.53及び14.27、TFCの系で0.51、9.15であった。すなわちこの系において、LFCはTFCの約1.6倍（前記の蛋白量の相違を考慮すれば約2.2倍）の活性を示した。

[0192] 日本国特許出願第2016-204729号（出願日：2016年10月18日）の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

[0193] 本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書に参照により取り込まれる。

産業上の利用可能性

[0194] 本発明によれば、リムルス・ポリフェムスの凝固メカニズムに関与するすべての完全長の組換え蛋白質、これらをコードするcDNA、これらの用途を提供できる。本発明は、特に、エンドトキシンの検出に有用である。

[0195] 〔配列表の説明〕

配列番号1：第1cDNAの塩基配列

配列番号2：第1蛋白質のアミノ酸配列

配列番号3：第1cDNA-バリエーション1の塩基配列

配列番号4：第1蛋白質-バリエーション1のアミノ酸配列

配列番号5：第2cDNAの塩基配列

配列番号6：第2蛋白質のアミノ酸配列

配列番号7：第2cDNA-バリエーション1の塩基配列

配列番号8：第2蛋白質-バリエーション1のアミノ酸配列

配列番号9：第2cDNA-バリエーション2の塩基配列

配列番号10：第2蛋白質-バリエーション2のアミノ酸配列

配列番号11：第2cDNA-バリエーション3の塩基配列

配列番号 12 : 第2蛋白質－バリエーション3のアミノ酸配列

配列番号 13 : 第3 cDNAの塩基配列

配列番号 14 : 第3蛋白質のアミノ酸配列

配列番号 15 : 第3 cDNA－バリエーション1の塩基配列

配列番号 16 : 第3蛋白質－バリエーション1のアミノ酸配列

配列番号 17 : 第3 cDNA－バリエーション2の塩基配列

配列番号 18 : 第3蛋白質－バリエーション2のアミノ酸配列

配列番号 19 : 第3 cDNA－バリエーション3の塩基配列

配列番号 20 : 第3蛋白質－バリエーション3のアミノ酸配列

配列番号 21 : 第3 cDNA－バリエーション4の塩基配列

配列番号 22 : 第3蛋白質－バリエーション4のアミノ酸配列

配列番号 23 : 合成基質ペプチドIEGR

配列番号 24～34 : プライマー

請求の範囲

- [請求項1] 以下のいずれかである組換え蛋白質。
- (A) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を含む組換え蛋白質。
- (B) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質。
- (C) 配列番号1または3で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質。
- (D) 配列番号1または3で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、C因子活性を有する組換え蛋白質。
- [請求項2] 以下の蛋白質を活性化するための、請求項1に記載の組換え蛋白質の使用。
- (A) 配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。
- (B) 配列番号6、8、10、または12で表されるアミノ酸配列に対して95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、B因子活性を有する蛋白質。
- (C) 配列番号5、7、9、または11で表される塩基配列に対して95%以上の同一性を有する塩基配列を含むDNAによってコードされ、かつ、B因子活性を有する蛋白質。
- (D) 配列番号5、7、9、または11で表される塩基配列の相補配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、かつ、B因子活性を有する蛋白質。
- [請求項3] 請求項1に記載の組換え蛋白質を検体と接触させるステップを含む、検体中のエンドトキシンの検出方法。

[請求項4] 請求項 1 に記載の組換え蛋白質を含む、エンドトキシン検出剤。

SEQUENCE LISTING

<110> Seikagaku Corporation

<120> Recombinant protein of Limulus and cDNA encoding the same

<130> F201706-7383

<150> JP2016-204729

<151> 2016-10-18

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3063

<212> DNA

<213> Limulus polyphemus

<400> 1

atggtactag	cgtcgttctt	ggtgtctggt	ttagttctag	ggctattagc	ccaacaaatg	60
cacccagttc	agtccagagg	agtagatctg	ggcttgtgtg	atgacacgag	gtttgagtgt	120
aagtgtggag	atccaggata	cgtgttcaac	gtccccgcga	agcaatgtac	gtacttctat	180
cgatggaggc	cttattgtaa	accatgtgac	aaactggagg	ctaaagatgt	gtgtcccaag	240
tacaaacgat	gtcaagagtg	tagggctggt	ctcgacagtt	gtgtgagttg	tccacctaac	300
aaatatggaa	cttgggtgtg	cggtagtggt	cagtgtgaaga	atgggggtat	ttgtgatcag	360
aggacaggag	cttgtacatg	tcgtgacaga	tatgaagggtg	tgcattgtga	aatccttcaa	420
ggttgtcctc	ttcttcaatc	ggatccccag	gttcaggaag	taaaaaatcc	accaaataat	480
ccacaaacta	ttgactacag	ctgttcacca	ggcttcaagc	ttaaaggcgt	ggcacgtatc	540
acctgtcttc	caaattgggca	gtggagtagc	tttccacca	aatgtattcg	agaatgttcc	600
atggtttcat	ctctagaaca	tggcaaaagta	aactctccta	gtgccgatct	gatagaagga	660
gctactttta	ggttctcatg	tgatagtccc	tactacttga	ttgggtcaaga	aacattaacc	720
tgccagggca	acggtcagtg	gagtgggcag	ataccacagt	gtcagaaatt	ggtcttctgc	780
cctgaccttg	accctgtaag	ccatgctgaa	caccagggtta	aaattggcct	agaacaaaaa	840
tatggtcaat	ttcctcaagg	cactgaagta	acctatacgt	gtactggtaa	ttacttcttg	900
atggggtttg	acaccttaaa	atgtaaccct	gatgggtcct	ggtcgggaac	acagccgtcc	960
tgtgtttaaag	tggcagacag	agagggtcaac	tgtgacagta	aagctgtgga	cttcttggat	1020
gatgtttggcg	aacctgtcag	gatccactgt	cctgctggct	gttccttaac	tgctggtact	1080
gtatggggta	cagccatata	tcacgaactt	tcctcagtat	gtcgtgcagc	tattcatgct	1140
ggcaagggttc	caaactctgg	aggtgcagtg	catgtagtga	acaacggtcc	gtactcagac	1200
tttctggcta	gtgatctgaa	tgggataaaa	tcagacgagt	tgaagtctct	tgctcagagt	1260
ttccgattcg	attatgtcag	ttcatcaaca	gcaggagagaa	agtcaggatg	tcctgatgga	1320
tggttcgaga	ttgaggagaa	ctgtgtgtac	gttacatcga	aacagagagc	ctgggaaaga	1380
gctcaagggtg	tatgtacca	tatggccgct	cgtcttgctg	tgtagacaa	agatgtaatt	1440
ccaagttcct	tgactgagac	tctacgaggg	aaagggttag	caacgacgtg	gattggacta	1500
cacagattag	atgctgataa	tcactttatt	tgggagctaa	tggatcgag	tagtggtgct	1560
ttgaatgaca	gcctaacatt	ctgggctcct	ggagaacctg	ggaatgaaac	taactgtgta	1620
tatctggata	tccaagatca	gctacagcca	gtgtggaaaa	ccaagtcttg	ttttcaaccc	1680
tcaagttttg	tttgtatgat	ggatttgtca	gacaagaaca	aagccaaatg	caaagaccct	1740

```

ggaccttttg aaaacggaca cgccaagctt catggtcaaa gtattgatgg attttatgct 1800
gggtcttctg taagatacag ctgcgaggtc ctccactacc tcagtggAAC tgagacagta 1860
tcttgtacat caaatggcac gtggagtgcc cctaaacctc gatgtattaa agtcatcacc 1920
tgccaaaccc ctcctgtacc atcctatggt tctgtggaca tcaaaccccc aagtagaaca 1980
aactcaatca gtcgtgttgg gtcgccattc ttgaggttgc cacggttacc cctcccttta 2040
gccagagcag ccggacctcc tccaaaacct agatccgcac caccctctac tgtggacctg 2100
tcttccaagg tcaaactgcc tgaaggatcat taccgggtgg ggtctcaagc catttacacg 2160
tgcgagtcaa gatactacga actgcttggA tctcaaggta gaagatgcga ctctaattgga 2220
aagtggagtg gtcgaccagc aagctgtata ccagtttgtg gacggtcaga ctctccccgt 2280
tctcctttca tctgcaatgg aaattccacc gaaatagggtc agtggccgtg gcaggcagga 2340
atctccagat ggcttgCaga tcataatatg tggtttcttc agtgtggagg agctctactg 2400
aatgagaaat ggatcattac tgcagcccac tgtgtcacct actctgtac tgccgagatc 2460
attgacccaa gtcagttaa attctacctg ggcaaatact atcgagatga cagtaaggat 2520
gatgactacg tacaagtaag agaggctatc gagatccatg tgaatcctaa ctacgatcct 2580
ggaaatctca actttgacat agccctgatt caactgaaga cttctgttgc tctgaccaca 2640
cgagtgaac caatatgtct gcctactgat ctactacaa gagaaaacct gaaagagggA 2700
gcgttagcgg tgggtgacagg atggggtttg aatgaaaaca acacatattc agagatgatt 2760
cagcaagccg ttctgcctgt tgttgCagca agcacctgtg aacaaggata tcaggactcg 2820
ggcttgccac tgacagtgac agagaacatg ttctgtgcag gttacaagca ggggcgctat 2880
gatgcctgca gtggagacag tggaggacca ttagtgtttg ctgatgattc ccgcaccgat 2940
aggcggtggg tcctggaagg gatcgtcagc tggggcagcc ccaatggatg tggcaagtct 3000
aaccagtatg ggggcttcac taaagttaac gtttttctat cgtggattcg gcagttcatt 3060
tga 3063

```

```

<210> 2
<211> 1020
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 2
Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu
1          5          10          15
Ala Gln Gln Met His Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu
20        25        30
Cys Asp Asp Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val
35        40        45
Phe Asn Val Pro Ala Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro
50        55        60
Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Lys Leu Glu Ala Lys Asp Val Cys Pro Lys
65        70        75        80
Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Arg Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Ser
85        90        95
Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys
100       105       110
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg
115       120       125
Asp Arg Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ile Leu Gln Gly Cys Pro Leu
130       135       140
Leu Gln Ser Asp Pro Gln Val Gln Glu Val Lys Asn Pro Pro Asn Asp

```

145					150				155				160			
Pro	Gln	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Lys	Gly	
				165					170					175		
Val	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Leu	Pro	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Ser	Phe	Pro	
				180					185					190		
Pro	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Cys	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Leu	Glu	His	Gly	
				195					200					205		
Lys	Val	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Arg	
				210					215					220		
Phe	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly	Gln	Glu	Thr	Leu	Thr	
				225					230					235		
Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Gly	Gln	Ile	Pro	Gln	Cys	Gln	Lys	
				245					250					255		
Leu	Val	Phe	Cys	Pro	Asp	Leu	Asp	Pro	Val	Ser	His	Ala	Glu	His	Gln	
				260					265					270		
Val	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gln	Phe	Pro	Gln	Gly	Thr	
				275					280					285		
Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Tyr	Phe	Leu	Met	Gly	Leu	Asp	
				290					295					300		
Thr	Leu	Lys	Cys	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Ser	
				305					310					315		
Cys	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Arg	Glu	Val	Asn	Cys	Asp	Ser	Lys	Ala	Val	
				325					330					335		
Asp	Phe	Leu	Asp	Asp	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Arg	Ile	His	Cys	Pro	Ala	
				340					345					350		
Gly	Cys	Ser	Leu	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Gly	Thr	Ala	Ile	Tyr	His	
				355					360					365		
Glu	Leu	Ser	Ser	Val	Cys	Arg	Ala	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Lys	Val	Pro	
				370					375					380		
Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	His	Val	Val	Asn	Asn	Gly	Pro	Tyr	Ser	Asp	
				385					390					395		
Phe	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Ser	
				405					410					415		
Leu	Ala	Gln	Ser	Phe	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly	
				420					425					430		
Arg	Lys	Ser	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly	Trp	Phe	Glu	Ile	Glu	Glu	Asn	Cys	
				435					440					445		
Val	Tyr	Val	Thr	Ser	Lys	Gln	Arg	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Val	
				450					455					460		
Cys	Thr	Asn	Met	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	
				465					470					475		
Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Thr	Thr	
				485					490					495		
Trp	Ile	Gly	Leu	His	Arg	Leu	Asp	Ala	Asp	Asn	His	Phe	Ile	Trp	Glu	
				500					505					510		
Leu	Met	Asp	Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	Trp	
				515					520					525		
Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Asn	Glu	Thr	Asn	Cys	Val	Tyr	Leu	Asp	Ile	
				530					535					540		
Gln	Asp	Gln	Leu	Gln	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro	

545					550								560			
Ser	Ser	Phe	Val	Cys 565	Met	Met	Asp	Leu	Ser 570	Asp	Lys	Asn	Lys	Ala 575	Lys	
Cys	Lys	Asp	Pro 580	Gly	Pro	Leu	Glu	Asn 585	Gly	His	Ala	Lys	Leu 590	His	Gly	
Gln	Ser	Ile 595	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala 600	Gly	Ser	Ser	Val	Arg 605	Tyr	Ser	Cys	
Glu	Val 610	Leu	His	Tyr	Leu	Ser 615	Gly	Thr	Glu	Thr	Val 620	Ser	Cys	Thr	Ser	
Asn 625	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala 630	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys 635	Ile	Lys	Val	Ile	Thr 640	
Cys	Gln	Thr	Pro	Pro 645	Val	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Asp	Ile	Lys	Pro	
Pro	Ser	Arg	Thr 660	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg 665	Val	Gly	Ser	Pro	Phe 670	Leu	Arg	
Leu	Pro	Arg 675	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu 680	Ala	Arg	Ala	Ala	Gly 685	Pro	Pro	Pro	
Lys	Pro 690	Arg	Ser	Ala	Pro	Pro 695	Ser	Thr	Val	Asp	Leu 700	Ser	Ser	Lys	Val	
Lys 705	Leu	Pro	Glu	Gly 710	His	Tyr	Arg	Val	Gly	Ser 715	Gln	Ala	Ile	Tyr	Thr 720	
Cys	Glu	Ser	Arg 725	Tyr	Glu	Leu	Leu 730	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg 735	Arg	Arg	Cys	
Asp	Ser	Asn	Gly 740	Lys	Trp	Ser	Gly 745	Arg	Pro	Ala	Ser	Cys 750	Ile	Pro	Val	
Cys	Gly	Arg 755	Ser	Asp	Ser	Pro	Arg 760	Ser	Pro	Phe	Ile	Val 765	Asn	Gly	Asn	
Ser	Thr 770	Glu	Ile	Gly	Gln	Trp 775	Pro	Trp	Gln	Ala	Gly 780	Ile	Ser	Arg	Trp	
Leu 785	Ala	Asp	His	Asn	Met 790	Trp	Phe	Leu	Gln	Cys 795	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu 800	
Asn	Glu	Lys	Trp	Ile 805	Ile	Thr	Ala	Ala	His 810	Cys	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	
Thr	Ala	Glu	Ile 820	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln 825	Phe	Lys	Phe	Tyr 830	Leu	Gly	Lys	
Tyr	Tyr	Arg 835	Asp	Asp	Ser	Lys	Asp 840	Asp	Asp	Tyr	Val	Gln 845	Val	Arg	Glu	
Ala	Ile 850	Glu	Ile	His	Val	Asn 855	Pro	Asn	Tyr	Asp	Pro 860	Gly	Asn	Leu	Asn	
Phe 865	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile 870	Gln	Leu	Lys	Thr	Ser 875	Val	Ala	Leu	Thr	Thr 880	
Arg	Val	Gln	Pro	Ile 885	Cys	Leu	Pro	Thr	Asp 890	Leu	Thr	Thr 895	Arg	Glu	Asn	
Leu	Lys	Glu	Gly 900	Ala	Leu	Ala	Val 905	Val	Thr	Gly	Trp	Gly 910	Leu	Asn	Glu	
Asn	Asn	Thr 915	Tyr	Ser	Glu	Met	Ile 920	Gln	Gln	Ala	Val	Leu 925	Pro	Val	Val	
Ala	Ala 930	Ser	Thr	Cys	Glu	Gln 935	Gly	Tyr	Gln	Asp	Ser 940	Gly	Leu	Pro	Leu	
Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gln	Gly	Arg	Tyr	

945		950		955		960									
Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Asp
		965						970						975	
Ser	Arg	Thr	Asp	Arg	Arg	Trp	Val	Leu	Glu	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
		980						985						990	
Ser	Pro	Asn	Gly	Cys	Gly	Lys	Ser	Asn	Gln	Tyr	Gly	Gly	Phe	Thr	Lys
	995					1000							1005		
Val	Asn	Val	Phe	Leu	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Ile				
	1010					1015					1020				

<210> 3
 <211> 3063
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 3

atggtactag	cgtcgttctt	ggtgtctggt	ttagttctag	ggctattagc	ccaacaaatg	60
caccagttc	agtcagagg	agtagatctg	ggcttgtgtg	atgacacgag	gtttgagtgt	120
aagtgtggag	atccaggata	cgtgttcaac	gtccccgcga	agcaatgtac	gtacttctat	180
cgatggaggc	cttattgtaa	accatgtgac	aaactggagg	ctaaagatgt	gtgtcccaag	240
tacaaacgat	gtcaagagtg	tagggctggt	ctcgacagtt	gtgtgagttg	tccacctaac	300
aaatatggaa	cttgggtgtg	cggtagtggt	cagtgtgaaga	atgggggtat	ttgtgatcag	360
aggacaggag	cttgtagatg	tcgtgacaga	tatgaagggtg	tgcattgtga	aatccttcaa	420
ggttgtcctc	ttcttcaatc	ggatccccag	gttcaggaag	taaaaaatcc	accaaagtat	480
ccacaaacta	ttgactacag	ctgttcacca	ggcttcaagc	ttaaaggcgt	ggcacgtatc	540
acctgtcttc	caaattgggca	gtggagtagc	tttccacca	aatgtattcg	agaatgttcc	600
atggtttcat	ctctagaaca	tggcaaagta	aactctccta	gtgccgatct	gatagaagga	660
gctactttta	ggttctcatg	tgatagtccc	tactacttga	ttgggtcaaga	aacattaacc	720
tgccagggca	acggtcagtg	gagtgggcag	ataccacagt	gtcagaaatt	ggtcttctgc	780
cctgaccttg	accctgcaag	ccatgctgaa	caccagggtta	aaattggcct	agaacaaaaa	840
tatggtcaat	ttcctcaagg	cactgaagta	acctatacgt	gtactggtaa	ttacttcttg	900
atgggttttg	acaccttaaa	atgtaaccct	gatgggtcct	ggtcgggaac	acagccgtcc	960
tgtgtttaaag	tggcagacag	agagggtcaac	tgtgacagta	aagctgtgga	cttcttggtat	1020
gatgtttggcg	aacctgtcag	gatccactgt	cctgctggct	gttccttaac	tgctgggtact	1080
gtatggggta	cagccatata	tcacgaactt	tcctcagtat	gtcgtgcagc	tattcatgct	1140
ggcaagggtc	caaactctgg	aggtgcagtg	catgtagtga	acaacgggtc	gtactcagac	1200
tttctggcta	gtgatctgaa	tgggataaaa	tcagacgagt	tgaagtctct	tgctcagagt	1260
ttccgattcg	attatgtcag	ttcatcaaca	gcaggggagaa	agtcaggatg	tcctgatgga	1320
tggttcgaga	ttgaggagaa	ctgtgtgtac	gttacatcga	aacagagagc	ctgggaaaga	1380
gctcaagggtg	tatgtaccaa	tatggccgct	cgtcttgctg	tgttagacaa	agatgtaatt	1440
ccaagttcct	tgactgagac	tctacgaggg	aaagggttag	caacgacgtg	gattggacta	1500
cacagattag	atgctgataa	tcactttatt	tgggagctaa	tggatcgag	tagtggtgct	1560
ttgaatgaca	gcctaacatt	ctgggctcct	ggagaacctg	ggaatgaaac	taactgtgta	1620
tatctggata	tccaagatca	gctacagcca	gtgtggaaaa	ccaagtcttg	ttttcaaccc	1680
tcaagttttg	tttgtatgat	ggatttgtca	gacaagaaca	aagccaaatg	caaagacctt	1740
ggaccttttg	aaaacggaca	cgccaagctt	catgggtcaaa	gtattgatgg	attttatgct	1800
gggtcttctg	taagatacag	ctgcgaggtc	ctccactacc	tcagtggaaac	tgagacagta	1860
tcttgtagat	caaattggcac	gtggagtgcc	cctaaacctc	gatgtattaa	agtcatcacc	1920
tgccaaaccc	ctcctgtacc	atcctatggt	tctgtggaca	tcaaaccccc	aagtagaaca	1980

```

aactcaatca gtcgtgttgg gtcgccattc ttgaggttgc cacggttacc cctccccttta 2040
gccagagcag cgggacctcc tccaaaacct agatccgcac caccctctac tgtggacctg 2100
tcttccaagg tcaaactgcc tgaaggatcat taccgggtgg ggtctcaagc catttacacg 2160
tgcgagtcaa gatactacga actgcttggga tctcaaggta gaagatgcga ctctaattgga 2220
aagtggagtg gtcgaccagc aagctgtata ccagtttgtg gacggtcaga ctctccccgt 2280
tctcctttca tcgtcaatgg aaattccacc gaaataggctc agtggccgtg gcaggcagga 2340
atctccagat ggcttgcaga tcataatatg tggtttcttc agtgtggagg agctctactg 2400
aatgagaaat ggatcattac tgcagccac tgtgtcacct actctgctac tgccgagatc 2460
attgacccaa gtcagtttaa attctacctg ggcaataact atcgagatga cagtaaggat 2520
gatgactacg tacaagtaag agaggctatc gagatccatg tgaatcctaa ctacgatcct 2580
ggaaatctca actttgacat agccctgatt caactgaaga cttctgttgc tctgaccaca 2640
cgagtgcac caatatgtct gcctactgat ctcactacaa gagaaaacct gaaagaggga 2700
gcgttagcgg tggtagcagg atgggggttg aatgaaaaca acacatattc agagatgatt 2760
cagcaagccg ttctgcctgt tgttgcagca agcacctgtg aacaaggata tcaggactcg 2820
ggcttgccac tgacagtgc agagaacatg ttctgtgcag gttacaagca ggggcgctat 2880
gatgcctgca gtggagacag tggaggacca ttagtgtttg ctgatgattc ccgcaccgat 2940
aggcggtggg tcctggaagg gatcgtcagc tggggcagcc ccaatggatg tggcaagtct 3000
aaccagtatg ggggcttcac taaagttaac gtttttctat cgtggattcg gcagttcatt 3060
tga

```

```

<210> 4
<211> 1020
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 4
Met Val Leu Ala Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu
1          5          10          15
Ala Gln Gln Met His Pro Val Gln Ser Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu
20        25        30
Cys Asp Asp Thr Arg Phe Glu Cys Lys Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val
35        40        45
Phe Asn Val Pro Ala Lys Gln Cys Thr Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro
50        55        60
Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Lys Leu Glu Ala Lys Asp Val Cys Pro Lys
65        70        75        80
Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Arg Ala Gly Leu Asp Ser Cys Val Ser
85        90        95
Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys
100       105       110
Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg
115       120       125
Asp Arg Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ile Leu Gln Gly Cys Pro Leu
130       135       140
Leu Gln Ser Asp Pro Gln Val Gln Glu Val Lys Asn Pro Pro Asn Asp
145       150       155       160
Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly
165       170       175
Val Ala Arg Ile Thr Cys Leu Pro Asn Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro

```

			180					185				190					
Pro	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Cys	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Leu	Glu	His	Gly		
		195					200					205					
Lys	Val	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Arg		
	210					215					220						
Phe	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Gly	Gln	Glu	Thr	Leu	Thr		
225					230					235					240		
Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Gly	Gln	Ile	Pro	Gln	Cys	Gln	Lys		
			245					250						255			
Leu	Val	Phe	Cys	Pro	Asp	Leu	Asp	Pro	Ala	Ser	His	Ala	Glu	His	Gln		
		260					265					270					
Val	Lys	Ile	Gly	Leu	Glu	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gln	Phe	Pro	Gln	Gly	Thr		
	275					280					285						
Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Tyr	Phe	Leu	Met	Gly	Leu	Asp		
	290				295					300							
Thr	Leu	Lys	Cys	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Ser		
305				310					315						320		
Cys	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Arg	Glu	Val	Asn	Cys	Asp	Ser	Lys	Ala	Val		
			325					330						335			
Asp	Phe	Leu	Asp	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Arg	Ile	His	Cys	Pro	Ala			
	340				345					350							
Gly	Cys	Ser	Leu	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Gly	Thr	Ala	Ile	Tyr	His		
	355				360					365							
Glu	Leu	Ser	Ser	Val	Cys	Arg	Ala	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Lys	Val	Pro		
	370				375					380							
Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	His	Val	Val	Asn	Asn	Gly	Pro	Tyr	Ser	Asp		
385				390					395						400		
Phe	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Ser		
			405				410							415			
Leu	Ala	Gln	Ser	Phe	Arg	Phe	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Gly		
		420					425						430				
Arg	Lys	Ser	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly	Trp	Phe	Glu	Ile	Glu	Glu	Asn	Cys		
	435					440						445					
Val	Tyr	Val	Thr	Ser	Lys	Gln	Arg	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Val		
	450				455					460							
Cys	Thr	Asn	Met	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Lys	Asp	Val	Ile		
465				470				475						480			
Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Thr	Thr		
			485				490						495				
Trp	Ile	Gly	Leu	His	Arg	Leu	Asp	Ala	Asp	Asn	His	Phe	Ile	Trp	Glu		
	500					505						510					
Leu	Met	Asp	Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	Trp		
	515					520						525					
Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Asn	Glu	Thr	Asn	Cys	Val	Tyr	Leu	Asp	Ile		
	530				535					540							
Gln	Asp	Gln	Leu	Gln	Pro	Val	Trp	Lys	Thr	Lys	Ser	Cys	Phe	Gln	Pro		
545				550				555							560		
Ser	Ser	Phe	Val	Cys	Met	Met	Asp	Leu	Ser	Asp	Lys	Asn	Lys	Ala	Lys		
			565				570					575					
Cys	Lys	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Glu	Asn	Gly	His	Ala	Lys	Leu	His	Gly		

			580					585				590							
Gln	Ser	Ile	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Val	Arg	Tyr	Ser	Cys				
		595					600					605							
Glu	Val	Leu	His	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Glu	Thr	Val	Ser	Cys	Thr	Ser				
	610					615					620								
Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Lys	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Val	Ile	Thr				
625					630					635					640				
Cys	Gln	Thr	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Asp	Ile	Lys	Pro				
				645					650					655					
Pro	Ser	Arg	Thr	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg	Val	Gly	Ser	Pro	Phe	Leu	Arg				
			660					665					670						
Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro				
		675					680					685							
Lys	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Ser	Ser	Lys	Val				
	690					695				700									
Lys	Leu	Pro	Glu	Gly	His	Tyr	Arg	Val	Gly	Ser	Gln	Ala	Ile	Tyr	Thr				
705					710					715					720				
Cys	Glu	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Arg	Arg	Cys				
				725					730					735					
Asp	Ser	Asn	Gly	Lys	Trp	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Ser	Cys	Ile	Pro	Val				
			740					745					750						
Cys	Gly	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Arg	Ser	Pro	Phe	Ile	Val	Asn	Gly	Asn				
		755					760					765							
Ser	Thr	Glu	Ile	Gly	Gln	Trp	Pro	Trp	Gln	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp				
	770					775					780								
Leu	Ala	Asp	His	Asn	Met	Trp	Phe	Leu	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu				
785					790					795					800				
Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Ile	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala				
				805					810					815					
Thr	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Phe	Lys	Phe	Tyr	Leu	Gly	Lys				
			820					825					830						
Tyr	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp	Asp	Tyr	Val	Gln	Val	Arg	Glu				
		835					840					845							
Ala	Ile	Glu	Ile	His	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Asp	Pro	Gly	Asn	Leu	Asn				
	850					855				860									
Phe	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Leu	Lys	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Thr	Thr				
865					870					875					880				
Arg	Val	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Arg	Glu	Asn				
				885					890					895					
Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Leu	Asn	Glu				
			900					905					910						
Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	Val	Val				
		915					920					925							
Ala	Ala	Ser	Thr	Cys	Glu	Gln	Gly	Tyr	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Pro	Leu				
		930				935				940									
Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gln	Gly	Arg	Tyr				
945					950					955					960				
Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Asp				
				965					970					975					
Ser	Arg	Thr	Asp	Arg	Arg	Trp	Val	Leu	Glu	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly				

		980						985						990						
Ser	Pro	Asn	Gly	Cys	Gly	Lys	Ser	Asn	Gln	Tyr	Gly	Gly	Phe	Thr	Lys					
		995						1000					1005							
Val	Asn	Val	Phe	Leu	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Ile									
	1010						1015				1020									

<210> 5
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 5

atggcgtgga	tttgtgtgat	aacgtttgtt	gctttggctt	ctagtacgtt	gagtaataaa	60
gttagtagag	tggggatcat	ctttcctaag	acacagaacg	ataataaaca	gtgtacagca	120
aaagggtgat	taaaagggtc	ctgcaagtcc	ctcacagact	gtcctgctgt	cttggctacg	180
ttgaaggata	gtttccctgt	cgtttgctct	tggaaatggc	ggtttcagcc	tattgtatgt	240
tgtcctgatg	cagcagcacc	aagtgttaacc	acaacagtta	caactattgt	ccctacaaaa	300
gaaacaaaga	ttccaagatt	acatatacca	ggttgtggaa	aaagaaaagt	aaatgtagat	360
attacaacta	ttggacgttc	ggggtcacca	atacttcctc	ccatatctac	ttctcaagat	420
ttgaaggggtg	ggagaggaat	cattgctgga	ggtgtagaag	ctaaaattgg	cgcctggcct	480
tggatggcag	ctgtttttgt	gaaaaatfff	ggcattggca	gattccattg	tgctggtagc	540
ataatcagta	gcaagtacat	tttgtctgct	gcccacgctt	tcctcattgg	aggtcgaaag	600
ctgaccccaa	ctcgcttagc	tgtccgcgta	ggaggccact	acgtaaagat	gggtcaagaa	660
tatcatgtgg	aagatgtgat	tatccatcct	gactacgtag	aaagggagaa	ttacaatgat	720
attgctatca	tttgtgttaa	agaggaactg	aattttactg	atttgggtccg	tccaatctgt	780
ctccctgacc	cagaggcagt	aacagattca	ttaaaaggca	gaagggtgac	agtagctgga	840
tgggggtgatc	tggattttgc	cgggtccacga	agtcaagttc	tgcgcgaggt	tagtatcccc	900
gttggttccaa	tcggtgactg	taacaaagcc	tatcagaagc	tcaacaccct	tgctcttaaa	960
aatgggataa	cgaaaaagtt	tatttgtgct	ggattggaag	aaggtgggaa	agatgcttgt	1020
caaggcgatt	ctggtggacc	gttgatgcta	gtgaacaata	gtagttggat	agtgacggga	1080
gtggtgtcgt	tcggacacaa	gtgtgccgag	gagggatttc	ctggtgtgta	cacgcgtgta	1140
gtgagttacc	tagagtggat	cgcgaagggt	acgaactcgt	tagaccaggc	agtcactaac	1200
tga						1203

<210> 6
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Limulus polyphemus

<400> 6

Met	Ala	Trp	Ile	Cys	Val	Ile	Thr	Leu	Phe	Ala	Leu	Ala	Ser	Ser	Thr
1				5					10					15	
Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Ser	Arg	Val	Gly	Ile	Ile	Phe	Pro	Lys	Thr	Gln
			20					25					30		
Asn	Asp	Asn	Lys	Gln	Cys	Thr	Ala	Lys	Gly	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Cys
	35						40					45			
Lys	Ser	Leu	Thr	Asp	Cys	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser
	50					55					60				

```

Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
65          70          75          80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
          85          90          95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
100        105        110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
115        120        125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
130        135        140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145        150        155        160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
165        170        175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Ser Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
180        185        190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
195        200        205
Arg Val Gly Gly His Tyr Val Lys Met Gly Gln Glu Tyr His Val Glu
210        215        220
Asp Val Ile Ile His Pro Asp Tyr Val Glu Arg Glu Asn Tyr Asn Asp
225        230        235        240
Ile Ala Ile Ile Val Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
245        250        255
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Ala Val Thr Asp Ser Leu Lys
260        265        270
Gly Arg Arg Val Thr Val Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ala Gly
275        280        285
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Ile
290        295        300
Gly Asp Cys Asn Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Asn Thr Leu Ala Leu Lys
305        310        315        320
Asn Gly Ile Thr Lys Lys Phe Ile Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
325        330        335
Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
340        345        350
Asn Ser Ser Trp Ile Val Thr Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
355        360        365
Ala Glu Glu Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Val Ser Tyr Leu
370        375        380
Glu Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp Gln Ala Val Thr Asn
385        390        395        400

```

<210> 7

<211> 1203

<212> DNA

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 7

```

atggcgtgga tttgtgtgat aacgttggtt gctttggcct ctagtacgtt gagtaataaa    60
gttagtagag tggggatcat ctttcctaag acacagaacg ataataaaca gtgtacagca    120
aaaggtggat taaaagggtc ctgcaagtc ctcacagact gtcctgctgt cttggctacg    180
ttgaaggata gtttccctgt cgtttgctct tggaatggtc ggtttcagcc tattgtatgt    240
tgtcctgatg cagcagcacc aagtgttaacc acaacagtta caactattgt ccctacaaaa    300
gaaacaaaga ttccaagatt acatatacca gggtgtggaa aaagaaaagt aaatgtagat    360
attacaacta ttggacgttc ggggtcacca atacttcctc ccatatctac ttctcaagat    420
ttgaaggggtg ggagaggaat cattgctgga ggtgtagaag ctaaaattgg cgcctggcct    480
tggatggcag ctgtttttgt gaaaaatttt ggcatgggca gattccattg tgctggtagc    540
ataatcagta gcaagtacat tttgtctgct gcccacgctt tcctcattgg aggtcgaaag    600
ctgaccccaa ctgccttagc tgtccgcgta ggaggccact acgtaaagat ggggtcaagaa    660
tatcatgtgg aagatgtgat tatccatcct gactacgtag aaaggagaa ttacaatgat    720
attgctatca ttgtgttaaa agaggaactg aattttactg atttgggtccg tccaatctgt    780
ctccctgacc cagaggcagt aacagattca ttaaaaggca gaagggtgac agtagctgga    840
tgggggtgatc tggatttcgc cggtcacga agtcaagttc tgcgcgaggt tagtatcccc    900
gttgttccaa tcagtgattg taacaaagcc tatcagaatc tcaacaccct tgctcttaaa    960
aatgggataa cgaaaaagtt tatttgtgct ggattggaag aagggtgggaa agatgcttgt 1020
caaggcgatt ctggtggacc gttgatgcta gtgaacaata gtagttggat agtgacggga 1080
gtggtgtcgt tcggacacaa gtgtgccgag gagggatttc ctggtgtgta cacgcgtgta 1140
gtgagttacc tagagtggat cgcgaaggtt acgaactcgt tagaccaggc agtcactaac 1200
tga                                     1203

```

```

<210> 8
<211> 400
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 8
Met Ala Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1           5           10           15
Leu Ser Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Ile Ile Phe Pro Lys Thr Gln
20          25          30
Asn Asp Asn Lys Gln Cys Thr Ala Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys
35          40          45
Lys Ser Leu Thr Asp Cys Pro Ala Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser
50          55          60
Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
65          70          75          80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
85          90          95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
100         105         110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
115         120         125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
130         135         140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145         150         155         160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His

```

				165					170					175			
Cys	Ala	Gly	Ser	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ala	Ala	His		
			180					185					190				
Ala	Phe	Leu	Ile	Gly	Gly	Arg	Lys	Leu	Thr	Pro	Thr	Arg	Leu	Ala	Val		
		195					200					205					
Arg	Val	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Lys	Met	Gly	Gln	Glu	Tyr	His	Val	Glu		
	210					215					220						
Asp	Val	Ile	Ile	His	Pro	Asp	Tyr	Val	Glu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Asn	Asp		
225				230					235						240		
Ile	Ala	Ile	Ile	Val	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Thr	Asp	Leu	Val		
			245						250					255			
Arg	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys		
			260					265					270				
Gly	Arg	Arg	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Gly		
	275						280				285						
Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Pro	Ile		
	290					295					300						
Ser	Asp	Cys	Asn	Lys	Ala	Tyr	Gln	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ala	Leu	Lys		
305				310					315						320		
Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Cys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly		
			325					330						335			
Lys	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Leu	Val	Asn		
		340						345					350				
Asn	Ser	Ser	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Val	Val	Ser	Phe	Gly	His	Lys	Cys		
	355					360					365						
Ala	Glu	Glu	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Val	Ser	Tyr	Leu		
	370					375					380						
Glu	Trp	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	Gln	Ala	Val	Thr	Asn		
385				390					395						400		

<210> 9

<211> 1203

<212> DNA

<213> Limulus polyphemus

<400> 9

atggcgtgga	tttgtgtgat	aacgttggtt	gctttggcctt	ctagtacgtt	gagtaataaa	60
gttagtagag	tggggatcat	ctttcctaag	acacagaacg	ataataaaca	gtgtacagca	120
aaaggtggat	taaaaggggtc	ctgcaagtcc	ctcacagact	gtcctgctgt	cttggctacg	180
ttgaaggata	gtttccctgt	cgtttgctct	tggaaatggc	ggtttcagcc	tattgtatgt	240
tgtcctgatg	cagcagcacc	aagtgttaacc	acaacagtta	caactattgt	ccctacaaaa	300
gaaacaaaga	ttccaagatt	acatatacca	ggttgtggaa	aaagaaaagt	aaatgtagat	360
attacaacta	ttggacgttc	ggggtcacca	atacttcctc	ccatatctac	ttctcaagat	420
ttgaagggtg	ggagaggaat	cattgctgga	ggtgtagaag	ctaaaattgg	cgcttgccct	480
tggatggcag	ctgtttttgt	gaaaaatttt	ggcattggca	gattccattg	tgctggtagc	540
ataatcagta	gcaagtacat	tttgtctgct	gcccacgctt	tcctcattgg	aggtcgaaag	600
ctgaccccaa	ctcgcttagc	tgtccgcgta	ggaggccact	acgtaaagat	gggtcaagaa	660
tatcatgtgg	aagatgtgat	tatccatcct	gactacgtag	aaaggagaa	ttacaatgat	720
attgctatca	ttgtgttaaa	agaggaactg	aattttactg	atttgggtccg	tccaatctgt	780

```

ctccctgacc cagaggcagt aacagattca ttaaaaggca gaagggtgac agtagctgga      840
tggggtgatac tggatttcgc cgggtccacga agtcaagttc tgcgcgaggt tagtatcccc      900
gttggttccaa tcagtgattg taacaaagcc tatcagaatc tcaacaccct tgctcttaaa      960
aatgggataa cgaacaagtt tatttgtgct ggattggaag aaggcgggaa agatgcttgt    1020
caaggcgatt ctggtggacc gttgatgcta gtgaacaata gtagttggat agtgacggga    1080
gtggtgtcgt tcggacacaa gtgtgccgag gagggatttc ctggtgtgta cacgcgtgta    1140
gtgagttacc tagagtggat cgcgaagggt acgaactcgt tagaccaggc agtcactaac    1200
tga                                           1203

```

```

<210> 10
<211> 400
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 10
Met Ala Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1           5           10           15
Leu Ser Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Ile Ile Phe Pro Lys Thr Gln
20          25          30
Asn Asp Asn Lys Gln Cys Thr Ala Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys
35          40          45
Lys Ser Leu Thr Asp Cys Pro Ala Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser
50          55          60
Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
65          70          75          80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
85          90          95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
100         105         110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
115         120         125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
130         135         140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
145         150         155         160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
165         170         175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Ser Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
180         185         190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
195         200         205
Arg Val Gly Gly His Tyr Val Lys Met Gly Gln Glu Tyr His Val Glu
210         215         220
Asp Val Ile Ile His Pro Asp Tyr Val Glu Arg Glu Asn Tyr Asn Asp
225         230         235         240
Ile Ala Ile Ile Val Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
245         250         255
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Ala Val Thr Asp Ser Leu Lys
260         265         270

```

Gly	Arg	Arg	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Gly
	275						280				285				
Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Pro	Ile
	290					295					300				
Ser	Asp	Cys	Asn	Lys	Ala	Tyr	Gln	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ala	Leu	Lys
305				310				315							320
Asn	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Phe	Ile	Cys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly
			325					330						335	
Lys	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Leu	Val	Asn
		340					345				350				
Asn	Ser	Ser	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Val	Val	Ser	Phe	Gly	His	Lys	Cys
	355					360					365				
Ala	Glu	Glu	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Val	Ser	Tyr	Leu
	370					375					380				
Glu	Trp	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Asn	Ser	Leu	Asp	Gln	Ala	Val	Thr	Asn
385				390					395						400

<210> 11
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 11	
atggcgtgga	tttgtgtgat aacgttgttt gctttggctt ctagtacgtt gagtaataaaa 60
gttagtagag	tggggatcat ctttcctaag acacagaacg ataataaaca gtgtacagca 120
aaaggtggat	taaaagggtc ctgcaagtcc ctcacagact gtcctgctgt cttggctacg 180
ttgaaggata	gtttccctgt cgtttgctct tggaatggtc ggtttcagcc tattgtatgt 240
tgtcctgatg	cagcagcacc aagtgttaacc acaacagtta caactattgt ccctacaaaa 300
gaaacaaaga	ttccaagatt acatatacca ggttgtggaa aaagaaaagt aaatgtagat 360
attacaacta	ttggacgttc ggggtcacca atacttcctc ccatatctac ttctcaagat 420
ttgaagggtg	ggagaggaat cattgctgga ggtgtagaag ctaaaattgg cgcctggcct 480
tggatggcag	ctgtttttgt gaaaaatttt ggcaattggca gatttcattg tgctggtagc 540
ataatcagta	gcaagtacat tttgtctgct gccacgctt tcctcattgg aggtcgaaag 600
ctgaccccaa	ctcgcttagc tgtccgcgta ggaggccact acgtaaagat gggtaagaa 660
tatcatgtgg	aagatgtgat tatccatcct gactacgtag aaaggagaa ttacaatgat 720
attgctatca	ttgtgttaaa agaggaactg aattttactg atttgggtccg tccaatctgt 780
ctccctgacc	cagaggcagt aacagattca ttaaaaaggca gaagggtgac agtagctgga 840
tggggtgatc	tggatttcgc cggtccacga agtcaagttc tgcgcgagggt tagtatcccc 900
gttgttccaa	tcagtgattg taacaaagcc tatcagaatc tcaacaccct tgctcttaaa 960
aatgggataa	cgaacaagtt tattttgtgct ggattggaag aaggcgggaa agatgcttgt 1020
caaggcgatt	ctggtggacc gttgatgcta gtgaacaata gtagttggat agtgacggga 1080
gtggtgtcgt	tcggacacaa gtgtgccgag gagggatttc ctggtgtgta cacgcgtgta 1140
gtgagttacc	tagagtggat cgcgaagggt acgaactcgt tagaccaggc agtcactaag 1200
tga	1203

<210> 12
 <211> 400
 <212> PRT

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 12

```

Met Ala Trp Ile Cys Val Ile Thr Leu Phe Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1      5      10      15
Leu Ser Asn Lys Val Ser Arg Val Gly Ile Ile Phe Pro Lys Thr Gln
      20      25      30
Asn Asp Asn Lys Gln Cys Thr Ala Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ser Cys
      35      40      45
Lys Ser Leu Thr Asp Cys Pro Ala Val Leu Ala Thr Leu Lys Asp Ser
      50      55      60
Phe Pro Val Val Cys Ser Trp Asn Gly Arg Phe Gln Pro Ile Val Cys
      65      70      75      80
Cys Pro Asp Ala Ala Ala Pro Ser Val Thr Thr Thr Val Thr Thr Ile
      85      90      95
Val Pro Thr Lys Glu Thr Lys Ile Pro Arg Leu His Ile Pro Gly Cys
      100      105      110
Gly Lys Arg Lys Val Asn Val Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Ser Gly
      115      120      125
Ser Pro Ile Leu Pro Pro Ile Ser Thr Ser Gln Asp Leu Lys Gly Gly
      130      135      140
Arg Gly Ile Ile Ala Gly Gly Val Glu Ala Lys Ile Gly Ala Trp Pro
      145      150      155      160
Trp Met Ala Ala Val Phe Val Lys Asn Phe Gly Ile Gly Arg Phe His
      165      170      175
Cys Ala Gly Ser Ile Ile Ser Ser Lys Tyr Ile Leu Ser Ala Ala His
      180      185      190
Ala Phe Leu Ile Gly Gly Arg Lys Leu Thr Pro Thr Arg Leu Ala Val
      195      200      205
Arg Val Gly Gly His Tyr Val Lys Met Gly Gln Glu Tyr His Val Glu
      210      215      220
Asp Val Ile Ile His Pro Asp Tyr Val Glu Arg Glu Asn Tyr Asn Asp
      225      230      235      240
Ile Ala Ile Ile Val Leu Lys Glu Glu Leu Asn Phe Thr Asp Leu Val
      245      250      255
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Pro Glu Ala Val Thr Asp Ser Leu Lys
      260      265      270
Gly Arg Arg Val Thr Val Ala Gly Trp Gly Asp Leu Asp Phe Ala Gly
      275      280      285
Pro Arg Ser Gln Val Leu Arg Glu Val Ser Ile Pro Val Val Pro Ile
      290      295      300
Ser Asp Cys Asn Lys Ala Tyr Gln Asn Leu Asn Thr Leu Ala Leu Lys
      305      310      315      320
Asn Gly Ile Thr Asn Lys Phe Ile Cys Ala Gly Leu Glu Glu Gly Gly
      325      330      335
Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Leu Val Asn
      340      345      350
Asn Ser Ser Trp Ile Val Thr Gly Val Val Ser Phe Gly His Lys Cys
      355      360      365
Ala Glu Glu Gly Phe Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Val Ser Tyr Leu

```

370	375	380
Glu Trp Ile Ala Lys Val Thr Asn Ser Leu Asp Gln Ala Val Thr Lys		
385	390	395 400

<210> 13
 <211> 1128
 <212> DNA
 <213> *Limulus polyphemus*

<400> 13

atgtttggtga	ataacatggtt	ttcattgctg	tgtttccac	tcctgatgtc	tatgttttagc	60
tgcagtagtc	tcggcagaca	gcgtagacag	tttgttttcc	ccgatgatga	agaatcatgc	120
tcaaaccgat	ttactaacga	tggaatatgt	aaagatgttt	tgaattgtag	agatctttta	180
caaaaaaatg	attataat	actgaaagaa	tcaatatg	gttttgaagg	cataacaccc	240
aaagtttgtt	gtccgaaaca	aagtattgta	aatccaataa	cagaagcacc	tccaaaaacc	300
actacaactg	aacgaccgcc	aatacggata	ccatccaatc	ttcctaaaca	gtgtggaaat	360
cgtaatat	caactaccag	gattattgga	gggcaggaag	caacacctgg	agcctggccc	420
tggatggctg	ctgtctatat	caaacaagga	ggaatcagaa	gtgttcagtg	tggagggtgcg	480
cttgtcacca	acaggcacgt	gattacagca	tcgcactgtg	ttgtaaacag	tttaggaaca	540
gatgtgatgc	gagctgacgt	attctcgggt	cgccatgggtg	aacacaattt	atatagcacc	600
aatgacagtt	cagatccaat	tgattttgca	gttacgtcag	tgaacatca	tgaaaacttt	660
gtgctcgca	cgtatttgaa	tgatatcgca	attctgaagt	taaacgacac	tgttacgttt	720
acgcacaaaa	ttaaaccaat	ttgtctacct	tatgaaagct	taaggatga	ggatctagca	780
atgagaaacc	catttgtcgc	cggatgggga	acaacagcat	ttaatggccc	atctagtgc	840
gtattacgag	aagtgcagtt	accaatatgg	ggacacgagc	cctgcaggca	ggcctacgag	900
aaggatttaa	atattacaaa	cgtgtatatg	tgtgctgggt	atgcagatgg	cggtaaagat	960
gcttgccagg	gtgattctgg	aggtccaatg	atgttgctg	ataaaagcgg	gaacttttat	1020
ctcgttggaa	ttgtgtcttt	cggaaagaaa	tgcgcgttgc	ctggatttcc	tgggggtttac	1080
acaaaagtga	ccgaattttt	agattggatt	gcagtaaata	tggtgtag		1128

<210> 14
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Limulus polyphemus*

<400> 14

Met	Leu	Val	Asn	Asn	Met	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Met
1				5					10					15	
Ser	Met	Phe	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Gly	Arg	Gln	Arg	Arg	Gln	Phe	Val
			20					25					30		
Phe	Pro	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Cys	Ser	Asn	Arg	Phe	Thr	Asn	Asp	Gly
		35				40					45				
Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Leu	Asn	Cys	Arg	Asp	Leu	Leu	Gln	Lys	Asn	Asp
	50					55				60					
Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Cys	Gly	Phe	Glu	Gly	Ile	Thr	Pro
65				70					75					80	
Lys	Val	Cys	Cys	Pro	Lys	Gln	Ser	Ile	Val	Asn	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala
			85					90					95		

Pro	Pro	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Arg	Pro	Pro	Ile	Arg	Ile	Pro	Ser
			100					105					110		
Asn	Leu	Pro	Lys	Gln	Cys	Gly	Asn	Arg	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ile
		115					120					125			
Ile	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Met	Ala	Ala
	130					135					140				
Val	Tyr	Ile	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Val	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala
145				150					155						160
Leu	Val	Thr	Asn	Arg	His	Val	Ile	Thr	Ala	Ser	His	Cys	Val	Val	Asn
			165					170						175	
Ser	Leu	Gly	Thr	Asp	Val	Met	Arg	Ala	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Arg	Leu
			180					185					190		
Gly	Glu	His	Asn	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Ile	Asp
		195					200					205			
Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Lys	His	His	Glu	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	Thr
	210					215					220				
Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe
225				230						235					240
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr
			245						250					255	
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr
		260						265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp
305				310					315						320
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser
			325					330						335	
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala
		340					345						350		
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp
		355					360					365			
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val									
	370					375									

<210> 15

<211> 1128

<212> DNA

<213> Limulus polyphemus

<400> 15

atgttggtga	ataacatggt	ttcattgctg	tgtttccac	tcctgatgtc	tatgtttagc	60
tgcagtagtc	tcggcagaca	gcgtagacag	tttgttttcc	ccgatgatga	agaatcatgc	120
tcaaacgat	ttactaacga	tggaatatgt	aaagatgttt	tgaattgtag	agatctttta	180
caaaaaaatg	attataat	actgaaagaa	tcaatatg	gttttgaagg	cataacaccc	240
aaagtttgtt	gtccgaaaca	aagtattgta	aatccaataa	cagaagcacc	tccaaaaacc	300
actacaactg	aacgaccgcc	aatacggata	ccatccaatc	ttcctaaaca	gtgtggaaat	360

```

cgtaatatatta caactaccag gattattgga gggcaggaag caacacctgg agcctggccc 420
tggtatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgctcagtg tggaggtgcg 480
cttgtcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaacag tttaggaaca 540
gatgtgatgc gagctgatgt attctcgggt cgcctagggtg aacacaattt atatagcacc 600
aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggatatga ggatctagca 780
atgagaaaacc catttgtcgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
aaggatttaa atattacaaa cgtgtatatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgcttg ataaaagcgg gaacttttat 1020
ctcgttggaa ttgtgtcttt cggaagaaa tgcgcgttgc ctggatttcc tgggggtttac 1080
acaaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tggtgtag 1128

```

```

<210> 16
<211> 375
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 16
Met Leu Val Asn Asn Met Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met
1 5 10 15
Ser Met Phe Ser Cys Ser Ser Leu Gly Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
20 25 30
Phe Pro Asp Asp Glu Glu Ser Cys Ser Asn Arg Phe Thr Asn Asp Gly
35 40 45
Ile Cys Lys Asp Val Leu Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Lys Asn Asp
50 55 60
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
65 70 75 80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Gln Ser Ile Val Asn Pro Ile Thr Glu Ala
85 90 95
Pro Pro Lys Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser
100 105 110
Asn Leu Pro Lys Gln Cys Gly Asn Arg Asn Ile Thr Thr Thr Arg Ile
115 120 125
Ile Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Ala Ala
130 135 140
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Ala Gln Cys Gly Gly Ala
145 150 155 160
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn
165 170 175
Ser Leu Gly Thr Asp Val Met Arg Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu
180 185 190
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Asp Ser Ser Asp Pro Ile Asp
195 200 205
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu Asn Phe Val Leu Ala Thr
210 215 220
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe

```

225		230		235		240									
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr
		245				250								255	
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr
		260						265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp
305					310					315					320
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser
			325					330						335	
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala
		340					345					350			
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp
		355					360					365			
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val									
	370					375									

<210> 17
 <211> 1128
 <212> DNA
 <213> Limulus polyphemus

<400> 17
 atgttggtga ataacatggt ttcattgctg tgtttccac tcctgatgtc tatgttttagc 60
 tgcagtagtc tcggcagaca gcgtagacaa tttgttttcc ccgatgatga agaatcatgc 120
 tcaaacgat ttactaacga aggaatatgt aaagatgttt tgaattgtag agaactttta 180
 caaaaaaatg attataatgt actgaaagaa tcaatatgcg gttttgaagg cataacaccc 240
 aaagtttggt gtccgaaaca aagtattgta aatccaataa cagaagcacc tccaaaaact 300
 actacaactg aacgaccgcc aatccgtata ccatccaatc ttcctaaaca gtgtggaaat 360
 cgtaatatga caactaccag gattattgga gggcaggaag caacacctgg agcctggccc 420
 tggatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgttcagtg tggaggtgcg 480
 ctgtgcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaagag tttaggaaca 540
 gatgtgatgc gagctgacgt attctcggtt cgcctagggt aacacaattt atatagcacc 600
 aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
 gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
 acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggtatga ggatctagca 780
 atgagaaacc catttgtcgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
 gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
 aaggatttaa atattacaaa cgtgtatatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
 gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgctg ataaaagcgg gaacttttat 1020
 ctcgttgga ttgtgtcttt cggaagaaa tgcgctgtgc ctggatttcc tgggggtttac 1080
 acaaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tgggtgtag 1128

<210> 18
 <211> 375

<212> PRT

<213> *Limulus polyphemus*

<400> 18

Met	Leu	Val	Asn	Asn	Met	Phe	Ser	Leu	Leu	Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Met
1				5					10					15	
Ser	Met	Phe	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Gly	Arg	Gln	Arg	Arg	Gln	Phe	Val
			20					25					30		
Phe	Pro	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Cys	Ser	Asn	Arg	Phe	Thr	Asn	Glu	Gly
			35				40					45			
Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Leu	Asn	Cys	Arg	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Asn	Asp
	50					55					60				
Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Cys	Gly	Phe	Glu	Gly	Ile	Thr	Pro
65					70					75					80
Lys	Val	Cys	Cys	Pro	Lys	Gln	Ser	Ile	Val	Asn	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala
				85					90					95	
Pro	Pro	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Arg	Pro	Pro	Ile	Arg	Ile	Pro	Ser
			100					105					110		
Asn	Leu	Pro	Lys	Gln	Cys	Gly	Asn	Arg	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ile
		115					120					125			
Ile	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Met	Ala	Ala
	130					135					140				
Val	Tyr	Ile	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Val	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala
145					150					155					160
Leu	Val	Thr	Asn	Arg	His	Val	Ile	Thr	Ala	Ser	His	Cys	Val	Val	Asn
				165					170					175	
Ser	Leu	Gly	Thr	Asp	Val	Met	Arg	Ala	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Arg	Leu
			180					185					190		
Gly	Glu	His	Asn	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Ile	Asp
		195					200					205			
Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Lys	His	His	Glu	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	Thr
	210					215					220				
Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe
225					230					235					240
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr
				245					250					255	
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr
			260					265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp
305					310					315					320
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser
				325					330					335	
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala
			340					345					350		
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp
		355					360					365			

Trp Ile Ala Val Asn Met Val
370 375

<210> 19
<211> 1128
<212> DNA
<213> *Limulus polyphemus*

<400> 19
atgttggtga ataacatggt ttcatgtgctg tgtttccac tcctgatgtc tatgttttagc 60
tgcagtagtc tcggcagaca gcgtagacaa tttgttttcc ccgatgatga agaatcatgc 120
tcaaaccgat ttactaacga tggaatatgt aaagatgttt tgaattgtag agatctttta 180
caaaaaaatg attataatgt actgaaagaa tcaatatgcg gttttgaagg cataacaccc 240
aaagtttggt gtccgaaaca agtattgtta aatccaataa cagaagcacc tccaaaaaat 300
actacaactg aacgaccgcc aatccgtata ccatccaatc ttcctaaaca gtgtggaaat 360
cgtaatatga caactaccag gattattgga gggcaggaag caacacctgg agcctggccc 420
tggtatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgttcagtg tggagggtgcg 480
cttgtcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaacag tttaggaaca 540
gatgtgatgc gagctgacgt attctcggtt cgcctagggtg aacacaattt atatagcacc 600
aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggatatga ggatctagca 780
atgagaaacc catttgctgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
aaggatttaa atattacaaa cgtgtatatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgctg ataaaagcgg gaacttttat 1020
ctcgttgga ttgtgtcttt cggaaagaaa tgcgcgttgc ctggatttcc tggggtttac 1080
acaaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tgggtgtag 1128

<210> 20
<211> 375
<212> PRT
<213> *Limulus polyphemus*

<400> 20
Met Leu Val Asn Asn Met Phe Ser Leu Leu Cys Phe Pro Leu Leu Met
1 5 10 15
Ser Met Phe Ser Cys Ser Ser Leu Gly Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
20 25 30
Phe Pro Asp Asp Glu Glu Ser Cys Ser Asn Arg Phe Thr Asn Asp Gly
35 40 45
Ile Cys Lys Asp Val Leu Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Lys Asn Asp
50 55 60
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
65 70 75 80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Gln Ser Ile Val Asn Pro Ile Thr Glu Ala
85 90 95
Pro Pro Lys Asn Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser

			100					105					110			
Asn	Leu	Pro	Lys	Gln	Cys	Gly	Asn	Arg	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ile	
		115					120					125				
Ile	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Met	Ala	Ala	
	130					135					140					
Val	Tyr	Ile	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Val	Gln	Cys	Gly	Gly	Ala	
145					150					155					160	
Leu	Val	Thr	Asn	Arg	His	Val	Ile	Thr	Ala	Ser	His	Cys	Val	Val	Asn	
				165					170					175		
Ser	Leu	Gly	Thr	Asp	Val	Met	Arg	Ala	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Arg	Leu	
			180					185					190			
Gly	Glu	His	Asn	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Ile	Asp	
		195					200					205				
Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Lys	His	His	Glu	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	Thr	
	210					215					220					
Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	
225					230					235					240	
Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr	
				245					250					255		
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr	
			260					265					270			
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro	
		275					280					285				
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn	
	290					295					300					
Ile	Thr	Asn	Val	Tyr	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp	
305					310					315					320	
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser	
				325					330					335		
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala	
			340					345					350			
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp	
		355					360					365				
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val										
	370					375										

```
<210> 21
<211> 1128
<212> DNA
<213> Limulus polyphemus
```

<400>	21						
atgttggtga	ataacatggt	ttcattgctg	tgtttctcac	tcctgatgtc	tatgtttagc		60
tgcagtagtc	tcggcagaca	gcgtagacag	tttgttttcc	ccgatgatga	agaatcatgc		120
tcaaaccgat	ttactaacga	tggaatatgt	aaagatgttt	tgaattgtag	agatctttta		180
caaaaaaatg	attataatth	actgaaagaa	tcaatatgcg	gttttgaagg	cataacaccc		240
aaagtttgth	gtccgaaaca	aagtattgta	aatccaataa	cagaagcacc	tccaaaaact		300
actacaactg	aacgaccgcc	aatacggata	ccatccaatc	ttcctaaaca	gtgtggaaat		360
cgtaatatth	caactaccag	gattattgga	gggcaggaag	caacacctgg	agcctggccc		420

```

tggatggctg ctgtctatat caaacaagga ggaatcagaa gtgttcagtg tggaggtgcg 480
cttgtcacca acaggcacgt gattacagca tcgcactgtg ttgtaaacag tttaggaaca 540
gatgtgatgc gagctgacgt attctcgggt cgcctagggt aacacaattt atatagcacc 600
aatgacagtt cagatccaat tgattttgca gttacgtcag tgaaacatca tgaaaacttt 660
gtgctcgcga cgtatttgaa tgatatcgca attctgaagt taaacgacac tgttacgttt 720
acgcacaaaa ttaaaccaat ttgtctacct tatgaaagct taaggatatga ggatctagca 780
atgagaaaacc catttgtcgc cggatgggga acaacagcat ttaatggccc atctagtgc 840
gtattacgag aagtgcagtt accaatatgg ggacacgagc cctgcaggca ggcctacgag 900
aaggatttaa atattacaaa cgtgtgtatg tgtgctgggt atgcagatgg cggtaaagat 960
gcttgccagg gtgattctgg aggtccaatg atgttgcttg ataaaagcgg gaacttttat 1020
ctcgttggaa ttgtgtcttt cggaaagaaa tgcgcgttgc ctggatttcc tgggggtttac 1080
acgaaagtga ccgaattttt agattggatt gcagtaaata tgggtgtag 1128

```

```

<210> 22
<211> 375
<212> PRT
<213> Limulus polyphemus

```

```

<400> 22
Met Leu Val Asn Asn Met Phe Ser Leu Leu Cys Phe Ser Leu Leu Met
1      5      10      15
Ser Met Phe Ser Cys Ser Ser Leu Gly Arg Gln Arg Arg Gln Phe Val
20     25     30
Phe Pro Asp Asp Glu Glu Ser Cys Ser Asn Arg Phe Thr Asn Asp Gly
35     40     45
Ile Cys Lys Asp Val Leu Asn Cys Arg Asp Leu Leu Gln Lys Asn Asp
50     55     60
Tyr Asn Leu Leu Lys Glu Ser Ile Cys Gly Phe Glu Gly Ile Thr Pro
65     70     75     80
Lys Val Cys Cys Pro Lys Gln Ser Ile Val Asn Pro Ile Thr Glu Ala
85     90     95
Pro Pro Lys Thr Thr Thr Thr Glu Arg Pro Pro Ile Arg Ile Pro Ser
100    105    110
Asn Leu Pro Lys Gln Cys Gly Asn Arg Asn Ile Thr Thr Thr Arg Ile
115    120    125
Ile Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro Gly Ala Trp Pro Trp Met Ala Ala
130    135    140
Val Tyr Ile Lys Gln Gly Gly Ile Arg Ser Val Gln Cys Gly Gly Ala
145    150    155    160
Leu Val Thr Asn Arg His Val Ile Thr Ala Ser His Cys Val Val Asn
165    170    175
Ser Leu Gly Thr Asp Val Met Arg Ala Asp Val Phe Ser Val Arg Leu
180    185    190
Gly Glu His Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Asp Ser Ser Asp Pro Ile Asp
195    200    205
Phe Ala Val Thr Ser Val Lys His His Glu Asn Phe Val Leu Ala Thr
210    215    220
Tyr Leu Asn Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Asn Asp Thr Val Thr Phe
225    230    235    240

```

Thr	His	Lys	Ile	Lys	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Tyr
				245					250					255	
Glu	Asp	Leu	Ala	Met	Arg	Asn	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Thr	Thr
			260					265					270		
Ala	Phe	Asn	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Trp	Gly	His	Glu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Tyr	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn
	290					295					300				
Ile	Thr	Asn	Val	Cys	Met	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Asp
305					310					315					320
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Ser
				325					330					335	
Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Lys	Cys	Ala
			340					345					350		
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	Asp
		355					360					365			
Trp	Ile	Ala	Val	Asn	Met	Val									
	370					375									

<210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptide

<400> 23
 Ile Glu Gly Arg
 1

<210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 24
 ctgcaggaat tcgatttttt tttttttttt ttttt

35

<210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 25

atcgataagc ttgatgatct gggcttgtgt gatga

35

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 26

ctgcaggaat tcgat

15

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 27

ctacaccaag ttcca

15

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 28

gtaaaccatg tgacaaactg gaggc

25

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 29
aataaggcct ccatcgatag aagta 25

<210> 30
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
ggggaattca agcttgccac catggtacta gcgtcgttc 39

<210> 31
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
gggctcgagt caaatgaact gccgaatcca cgata 35

<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
atcgataagc ttgatcacat gcaaggaaaa gttct 35

<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33

ctgcaggaat tcgatcactg tttaaacaaa ctgaa 35

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

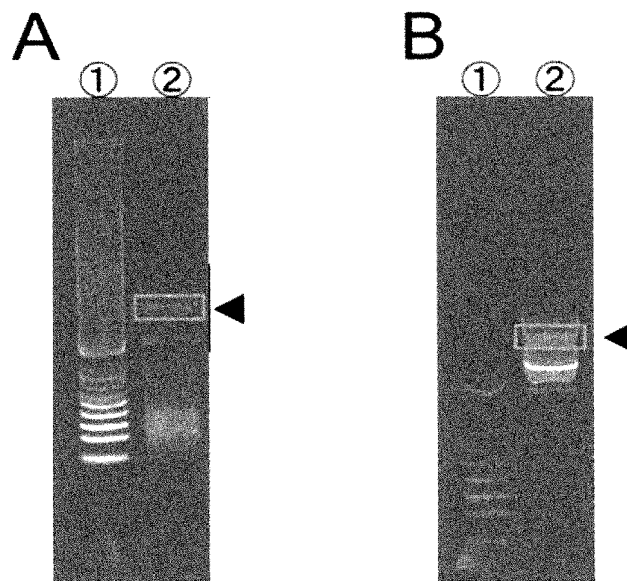
<220>

<223> primer

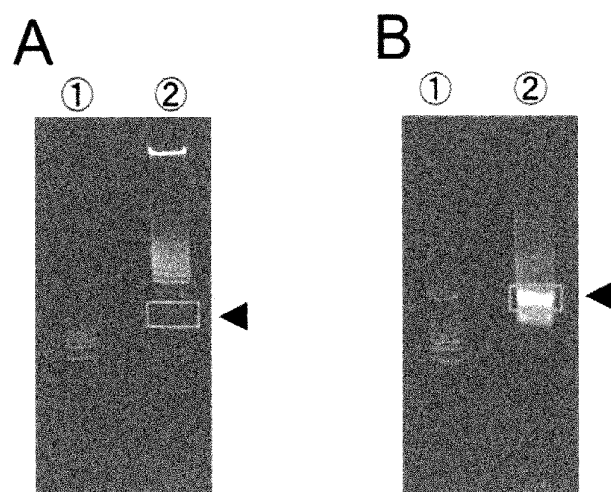
<400> 34

atcgataagc ttgatagacc agagtgggtct ttctg 35

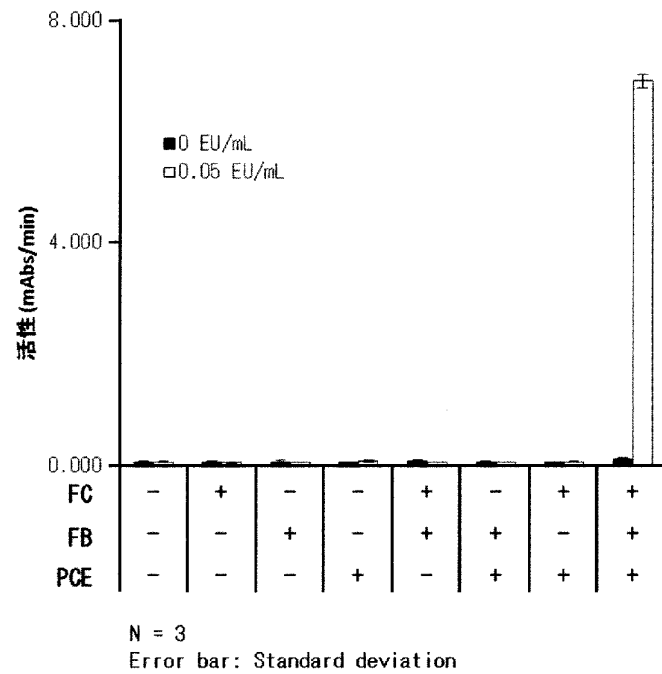
[図1]



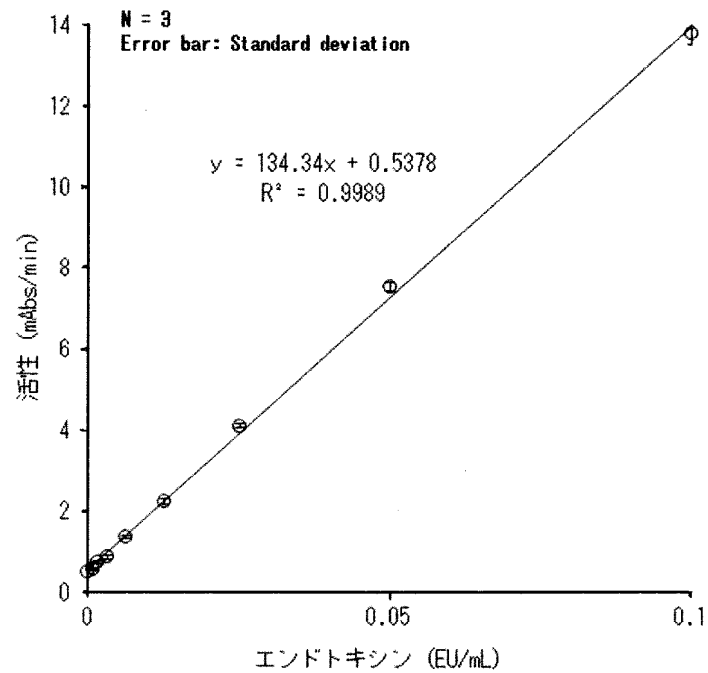
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K14/435(2006.01)i, G01N33/579(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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. C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90, G01N33/579

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2017

Registered utility model specifications of Japan 1996-2017

Published registered utility model applications of Japan 1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, DWPI(Derwent Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-510898 A (SEIKAGAKU CORPORATION) 01 May 2014, claims, paragraphs [0031], [0082]-[0118], SEQ ID NOS: 2, 4 & WO 2012/118226 A1, claims, paragraphs [0031], [0082]-[0118], SEQ ID NOS: 2, 4	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

26 December 2017

Date of mailing of the international search report

16 January 2018

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037629

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/092079 A1 (SEIKAGAKU CORPORATION) 19 June 2014, claims, paragraphs [0019], [0020], [0046], [0050], [0102]-[0133], SEQ ID NOS: 2, 6 & US 2015/0307864 A1, claims, paragraphs [0187], [0188], [0214], [0218], [0277]-[0308], SEQ ID NOS: 2, 6	1-4
Y	JP 2015-141088 A (DKK TOA CORP.) 03 August 2015, claims, paragraphs [0052]-[0060] (Family: none)	1-4
Y	JP 2015-536158 A (MICROCOAT BIOTECHNOLOGIE GMBH) 21 December 2015, claims, paragraphs [0173]-[0209] & WO 2014/086847 A1, claims, page 42, line 10 to page 48, line 2	1-4

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07K14/435(2006.01)i, G01N33/579(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n			
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. C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90, G01N33/579			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, DWPI (Derwent Innovation)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	JP 2014-510898 A（生化学工業株式会社） 2014.05.01, 特許請求の範囲、段落[0031]、[0082]-[0118]、配列 番号2、4 & WO 2012/118226 A1, Claims、段落[0031]、[0082]-[0118]、SEQ ID NO:2, 4	1-4	
☒ 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 26.12.2017		国際調査報告の発送日 16.01.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 小林 薫 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 6114

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2014/092079 A1 (生化学工業株式会社) 2014. 06. 19, 特許請求の範囲、段落[0019]-[0020]、[0046]、[0050]、 [0102]-[0133] 、配列番号 2、 6 & US 2015/0307864 A1, Claims、段落[0187]-[0188]、[0214]、[0218]、 [0277]-[0308] 、SEQ ID NO:2, 6	1-4
Y	JP 2015-141088 A (東亜ディーケーケー株式会社) 2015. 08. 03, 特許請求の範囲、段落[0052]-[0060] (ファミリーなし)	1-4
Y	JP 2015-536158 A (マイクロコート バイオテクノロジー ゲーエム ムベーハー) 2015. 12. 21, 特許請求の範囲、段落[0173]-[0209] & WO 2014/086847 A1, Claims、第 4 2 ページ第 1 0 行ー第 4 8 ページ 第 2 行	1-4