

(12) International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty

(19) World Intellectual Property Organization
International Office



(43) International Publication Date
January 10, 2008 (10.01.2008)

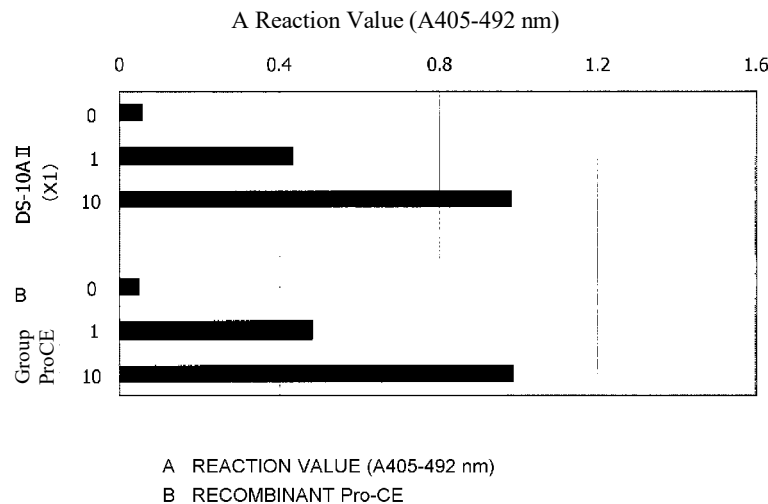
PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/004674 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/64* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
- (21) International Application No.: PCT/JP2007/063606
- (22) International Application Date: July 6, 2007 (06.07.2007)
- (25) Language of International Application: Japanese
- (26) Language of International Publication: Japanese
- (30) Priority Data: JP 2006-188523 July 7, 2006 (07.07.2006) JP
- (71) Applicant (for all designated countries except the United States): Seikagaku Corporation (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP];
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for the United States only): Hiroshi Tamura (TAMURA, Hiroshi) [JP/JP]; c/o Seikagaku Corporation, 1-6-1 Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo-to 1000005 Tokyo (JP). Shoji Takahashi (TAKAHASHI, Shoji) [JP/JP]; c/o Seikagaku Corporation Central Research Institute, 3-1253 Tateno, Higashiyamato-shi, Tokyo-to 2070021 Tokyo (JP).
- (74) Agent: Mitsuharu Shimura (SHIMURA, Mitsuharu); 9-3 Sakuragaoka-cho, Shibuya-ku, Tokyo-to 1500031 Tokyo (JP).
- (81) Designated Countries (all types of national protection are available unless otherwise indicated): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
- /Continued/

(54) Title: PRO-CLOTTING ENZYME, AND METHOD FOR DETECTION OF ENDOTOXIN OR (1→3)-β-D-GLUCAN USING THE SAME

(54) Title of Invention: PRO-CLOTTING ENZYME, AND METHOD FOR DETECTION OF ENDOTOXIN OR (1→3)-β-D-GLUCAN USING THE SAME



(57) Abstract: Disclosed are: DNA encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab which enables the production of a uniform-quality reagent for the determination of (1→3)-β-D-glucan or an endotoxin in a stable manner, at low cost and in large quantity; a virus carrying the DNA; a cell carrying the virus; a method for the production of a pro-clotting enzyme using the cell; and a means for determination of (1→3)-β-D-glucan or an endotoxin by using the enzyme. DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:4 or the like is selected as a nucleic acid encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab. A recombinant form of the pro-clotting enzyme is produced based on the DNA. By using the resulting enzyme and utilizing a constituent element of the cascade system for a lysate derived from a horseshoe crab, it becomes possible to provide a sensitive detection method and a sensitive detection kit for (1→3)-β-D-glucan or an endotoxin.

(57) Abstract: Disclosed are: DNA encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab which enables the production of a uniform-quality reagent for the determination of (1→3)-β-D-glucan or an endotoxin in a stable manner, at low cost and in large quantity;

/Continued/



GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europe (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Attached Publications:

- **International Search Report**
- **The sequence listing part of the specification published separately in electronic form is available from the International Office upon request**

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the Guidance Notes for Codes and Abbreviations at the beginning of each regularly issued *PCT Gazette*.

a virus carrying the DNA; a cell carrying the virus; a method for the production of a pro-clotting enzyme using the cell; and a means for determination of (1→3)-β-D-glucan or an endotoxin by using the enzyme. DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:4 or the like is selected as a nucleic acid encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab. A recombinant form of the pro-clotting enzyme is produced based on the DNA. By using the resulting enzyme and utilizing a constituent element of the cascade system for a lysate derived from a horseshoe crab, it becomes possible to provide a sensitive detection method and a sensitive detection kit for (1→3)-β-D-glucan or an endotoxin.

Specification

PRO-CLOTTING ENZYME, AND METHOD FOR DETECTION OF ENDOTOXIN OR (1→3)-β-D-GLUCAN USING THE SAME

Technical Field

[0001] The present invention relates to a nucleic acid encoding pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab, a virus carrying the nucleic acid, a cell carrying the virus, and a method for the production of a pro-clotting enzyme using the cell, as well as a method for detection and detection kit for Et and BG using the pro-clotting enzyme obtained thereby.

Background Art

[0002] A method for measuring Et and BG using a horseshoe crab amebocyte lysate (horseshoe crab hemocyte extract, hereinafter simply referred to as "lysate") is known. This method is based on the coagulation of lysates by Et or BG. This coagulation reaction is triggered by a stepwise activation of several coagulation factors (Patent Document 1, Non-Patent Document 1).

[0003] For example, when BG comes into contact with a lysate, factor G present in the lysate is activated to produce activated factor G. This activated factor G activates Pro-CE present in the lysate to produce CE. This CE hydrolyzes defined sites in coagulogen molecules present in the lysate in a limited manner, thereby producing a coagulin gel and coagulating the lysate. The CE also acts on synthetic substrates (for example, t-butoxycarbonyl-leucyl-glycyl-arginine-pNA (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)) to hydrolyze the amide bond and release pNA. Therefore, BG may be quantified by measuring the absorbance of the produced chromogenic substance (pNA) (Patent Document 1).

[0004] Although Pro-CE has already been cloned (Non-Patent Document 2), it has been difficult to express a protein (Pro-CE) that carries activity using this nucleic acid.

[0005] That is, although Pro-CE has already been cloned, the techniques and products disclosed in this document are merely standard procedures for obtaining a targeted clone of the cDNA encoding the object protein. In other words, 23 clones were selected from the λ gt11 cDNA library (1.5 million clones) using anti-CE antibody, and then subcloned into the pUC118/119 vector, after which the nucleotide sequences were determined, where progress has stopped. In reality, this task alone requires an enormous amount of effort, and it has not yet been possible to express the enzymatic activity of proCE, a serine protease precursor [protease (amidase) activity of CE],

activate ProCE by activated factor B, or quantitatively reproduce (reconstitute) the enzymatic activity in the copresence of activated factors C and B. Determining the base sequence of a defined protein and obtaining that protein as a recombinant and using it to construct a defined assay system are tasks that require highly advanced technical creativity on an entirely different level.

[Patent Document 1] JP H08-122334 A

[Patent Document 2] JP 2006-271384 A

Non-Patent Document 1: J. Protein Chem., 5, p255-268 (1986)

Non-patent document 2: J. Biol. Chem., 265(36). P22426-22433 (1990)

Disclosure of Invention

Problem to Be Solved by Invention

[0006] The present invention aims to provide a nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab which enables the production of a uniform-quality reagent for the detection of an Et or BG in a stable manner, at low cost and in large quantity, a virus carrying the nucleic acid, a cell carrying the virus, a method for the production of a pro-CE using the cell, and a method for detection and detection kit for an Et or BG using the pro-CE obtained by the production method.

Means for Solving Problem

[0007] As a result of intensive research conducted to solve the above problems, the present inventors discovered that a protein having pro-CE activity can be produced by using a cell carrying a virus carrying DNA encoding a pro-CE, and that this enables the production of a uniform-quality reagent for the detection of an Et or BG in a stable manner, at low cost and in large quantity, thereby completing the present invention.

[0008] The following abbreviations are used throughout the documents of the present application, including the Background Art section above.

Pro-CE: Pro-clotting enzyme (pro-clotting enzyme)

CE: Clotting enzyme (clotting enzyme)

AcNPV: Autographa californica nuclear polyhedrosis virus

BG: (1→3)-β-D-glucan

Et: Endotoxin (also called "lipopolysaccharide")

HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-

piperazinyl]ethanesulfonic acid)

HRP: Horseradish peroxidase (horseradish peroxidase)

MOI: Multiplicity of infection (multiplicity of infection)

NPV: Nuclear polyhedrosis virus (nuclear polyhedrosis virus)

PBS: Phosphate buffered saline (phosphate buffered saline)

PCR: Polymerase chain reaction (polymerase chain reaction)

pNA: Paranitroaniline

PVDF: Polyvinylidene difluoride (polyvinylidene difluoride)

SDS: Sodium dodecyl sulfate (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

LAL: Limulus amebocyte lysate

[0009] That is, the present invention provides a nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab (hereinafter referred to as the "nucleic acid of the present invention").

[0010] The horseshoe crab referred to here is one selected from the following four types: *Tachypleus tridentatus*, *Limulus polyphemus*, *Tachypleus gigas*, and *Tachypleus rotundicauda* (also called *Carcinoscorpius rotundicauda*).

[0011] Furthermore, the "nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab" referred to herein is more preferably a nucleic acid selected from the following (A) to (C):

[0012] (A) DNA encoding a protein containing the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4;

(B) DNA encoding a "protein containing an amino acid sequence in which one or several amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 have been deleted, substituted, inserted or rearranged, and having the activity of a pro-CE derived from a horseshoe crab;"

(C) RNA obtained by transcribing the DNA of (A) or (B) above.

[0013] Furthermore, the "nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab" referred to herein is preferably a nucleic acid selected from the following (a) to (c):

[0014] (a) DNA containing the nucleotide sequence shown by the base sequence 1 to 1143 in SEQ ID NO: 3;

(b) DNA characterized by having, in the base sequence containing the base sequence shown by the base sequence 1 to 1143 in SEQ ID NO: 3, a mutation of a base that causes a deletion, substitution, insertion, or rearrangement of one or several amino acids in the amino acid sequence of a protein encoded by that base sequence, and the expressed protein having the activity of a pro-CE derived from a horseshoe crab.

(c) RNA obtained by transcribing the DNA of (a) or (b) above.

[0015] The present invention also provides a virus carrying the nucleic acid of the present invention (hereinafter referred to as the "virus of the present invention").

[0016] The "virus" referred to herein is a preferably a baculovirus. Among baculoviruses, NPV is preferable, and AcNPV is more preferable.

[0017] The present invention also provides a cell carrying the virus of the present invention (hereinafter referred to as the "cell of the present invention").

[0018] The "cell" referred to herein is not particularly limited, and may be freely selected taking into consideration compatibility with the above-mentioned virus of the present invention, and the like. That is, examples include cells derived from Escherichia coli, bacteria, yeast, insects, and the like. As mentioned above, a suitable virus of the present invention is a baculovirus, and when selecting the virus, it is suitable to select a cell derived from an insect.

[0019] The present invention also provides a method for the production of a pro-CE derived from a horseshoe crab, which includes at least a step of growing the cell of the present invention and collecting a pro-CE derived from a horseshoe crab from the grown product (hereinafter referred to as the "production method of the present invention").

[0020] The present invention also provides a pro-CE produced by the production method of the present invention (hereinafter referred to as the "enzyme of the present invention").

[0021] The present invention also provides a method for the detection of an Et, which is characterized by allowing the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" to be copresent in a test sample for detecting the Et, and detecting the Et in the sample using the enzymatic activity accompanying the conversion from the enzyme of the present invention to a CE as an indicator (hereinafter referred to as "method 1 of the present invention").

[0022] In the method 1 of the present invention, the "serine protease precursor expressing an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" is preferably a "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" and a "Horseshoe crab-derived Factor C and/or recombinant Factor C."

[0023] Furthermore, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" is preferably horseshoe crab-derived factor B and/or recombinant factor B.

[0024] It is suitable that the above-mentioned factors C and B are both recombinant, and as one

example of the most suitable aspects of the method 1 of the present invention is an aspect in which factors C and B are allowed to be copresent together with the enzyme of the present invention in a test sample for detecting an Et, and all of the factors C and B are recombinant. Performing the method 1 of the present invention using natural factors C and B derived from a horseshoe crab is sufficiently suitable from the standpoint of the effectiveness of the method, such as detection sensitivity, but on the other hand, in order to collect the body fluid of a horseshoe crab that serves as the source of natural factors C and B, it is necessary to catch the horseshoe crab and collect the body fluid to an extent that does not interfere with their continued growth. It is unavoidable that the capture and collection of body fluids causes a certain amount of stress to the horseshoe crab, and some have pointed out that this is leading to a decline in population due to environmental destruction, and the like. Thus, making all of the cascade reaction proteins for performing the method 1 of the present invention recombinant is particularly significant from the perspective of protecting valuable biological resources, and will make an immeasurable contribution to biological conservation and animal replacement.

[0025] When factor C or factor B used as a constituent element of an Et detection system is a recombinant factor, the vector into which the gene encoding these factors are incorporated and the host into which this is transduced may be selected without any particular limitation, and as with the recombinant pro-CE described above, the vector may be a virus, suitably a baculovirus, and among baculoviruses, NPV is preferable, and AcNPV is more preferable. Examples of hosts include cells derived from Escherichia coli, bacteria, yeast, insects, and the like, but a suitable virus of the present invention is a baculovirus, and when selecting such the virus, it is suitable to select a cell derived from an insect.

[0026] Furthermore, "using the enzymatic activity accompanying the conversion from the enzyme of the present invention to a CE as an indicator" means that the enzymatic activity induced by the conversion from the pro-CE that is the enzyme of the present invention to a CE is detected quantitatively or qualitatively and used as an indicator of the amount or presence of the Et in the test sample. Examples of "phenomena indicating enzymatic activity accompanying the conversion from the pro-CE to a CE" include the coagulation of lysate accompanying the formation of a coagulin gel due to the presence of a CE (which may be detected by gelation or changes in turbidity, and the like), color development of a chromogenic dye separated by hydrolysis of the amide bond of a synthetic chromogenic substrate, and the like. In particular, by using a synthetic chromogenic substrate, a highly sensitive and reproducible measurement system

may be constructed, and furthermore, there is no need to use a lysate derived from a horseshoe crab, which is extremely beneficial from the viewpoint of protecting valuable biological resources.

[0027] An example of a synthetic chromogenic substrate is indicated by X-A-Y (in the formula, X is a protecting group, Y is a chromogenic dye, and A is a tripeptide). The presence of a CE cleaves the A-Y bond, resulting in the development of chromogenic dye Y, which provides a quantitative or qualitative indication of the presence of an Et. Here, the protecting group X may be a well-known protecting group for peptides, for example a t-butoxycarbonyl group, a benzoyl group, or the like and the chromogenic dye Y may be, for example, pNA, MCA (7-methoxycoumarin-4-acetic acid), DNP (2,4-dinitroaniline), Dansyl dye, or the like. Examples of tripeptides include Leu-Gly-Arg (LGR: one-letter abbreviation), Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR: one-letter abbreviation), and Val-Pro-Arg (VPR: one-letter abbreviation) and the like.

[0028] When the method 1 of the present invention is performed quantitatively, correlation data (typically a calibration curve) showing the relationship between the amount of Et and the indicator intensity (such as the intensity of color development by the chromogenic dye Y or the turbidity due to lysate coagulation) is prepared in advance using an Et standard product, and using this as a reference, the Et in the test sample may be quantitatively determined based on the detected indicator intensity.

[0029] The above-mentioned test sample is not particularly limited, and examples thereof include water for injection, medicines, infusions, blood products, medical devices (medical tools), quasi-drugs, cosmetics, etc., as well as environmental samples such as food, drinking water, air, rivers, and soil, native proteins, gene recombinant proteins, nucleic acids, enzymes, carbohydrates, electrolytes, as well as biological components such as blood, body fluids, and tissues.

[0030] The present invention also provides a detection kit of an Et for performing the method 1 of the present invention, which is characterized by including as a configuration at least the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" (hereinafter referred to as "kit 1 of the present invention").

[0031] Furthermore, in the kit 1 of the present invention, the "serine protease precursor expressing an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" is preferably a "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" and a "Horseshoe crab-derived Factor C and/or recombinant Factor C."

- [0032] Furthermore, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" is preferably horseshoe crab-derived factor B and/or recombinant factor B.
- [0033] Furthermore, in the kit 1 of the present invention, it is suitable that the above-mentioned factors C and B are both recombinant, and as one example of the most suitable aspects of the kit 1 of the present invention is an aspect in which all of the factors C and B included as a configuration thereof are recombinant. That is, it is more preferable that the cascade reaction proteins contained in the kit 1 of the present invention are only the enzyme of the present invention, recombinant factor C and recombinant factor B.
- [0034] The kit 1 of the present invention may include a reagent used to perform the method 1 of the present invention, such as the above-mentioned synthetic chromogenic substrate (X-A-Y), a buffer solution, diluent, salt, horseshoe crab lysate, or the like, selected according to the aspect of the method 1 of the present invention to be performed by the kit 1 of the present invention.
- [0035] The present invention also provides a method for the detection of a BG, which is characterized by allowing the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an BG" to be copresent in a test sample for detecting the BG, and detecting the BG in the sample using the enzymatic activity accompanying the conversion from the enzyme of the present invention to a CE as an indicator (hereinafter referred to as "method 2 of the present invention").
- [0036] In the method 2 of the present invention, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with a BG" is preferably horseshoe crab-derived factor G and/or recombinant factor G.
- [0037] It is suitable that the above-mentioned factor G is recombinant, and as one example of the most suitable aspects of the method 2 of the present invention is an aspect in which factor G is allowed to be copresent together with the enzyme of the present invention in a test sample for detecting a BG, and all of the factor G is recombinant.
- [0038] Note that the reason why factor G used in the method 2 of the present invention is suitable recombinant is the same as the reason why factor C and factor B are preferably recombinant in the method 1 of the present invention. In addition, vectors for obtaining recombinant factor G include viruses, suitably a baculovirus, and among baculoviruses, NPV is preferable, and AcNPV is more preferable, as in the case of factors C and B described above. Moreover, examples of hosts include cells derived from Escherichia coli, bacteria, yeast, insects, and the like, but a

suitable virus of the present invention is a baculovirus, and when selecting such the virus, it is suitable to select a cell derived from an insect, for the same reason.

[0039] Furthermore, "using the enzymatic activity accompanying the conversion from the enzyme of the present invention to a CE as an indicator" means that the phenomenon indicating the conversion from the pro-CE that is the enzyme of the present invention to a CE is detected quantitatively or qualitatively and this is used as an indicator of the amount or presence of the BG in the test sample, as in the case of the method 1 of the present invention, and the details of "phenomenon indicating the conversion from the pro-CE to a CE" are also the same as disclosed for the method 1 of the present invention. In the method 2 of the present invention, the synthetic chromogenic substrate X-A-Y may also be suitably used.

[0040] When the method 2 of the present invention is performed quantitatively, correlation data (typically a calibration curve) showing the relationship between the amount of BG and the indicator intensity (such as the intensity of color development by the chromogenic dye Y or the turbidity due to lysate coagulation) is prepared in advance using a BG standard product, and using this as a reference, the BG in the test sample may be quantitatively determined based on the detected indicator intensity.

[0041] The above-mentioned test sample is not particularly limited, and examples thereof include water for injection, medicines, infusions, blood products, medical devices (medical tools), quasi-drugs, cosmetics, etc., as well as environmental samples such as food, drinking water, air, rivers, and soil, native proteins, gene recombinant proteins, nucleic acids, enzymes, carbohydrates, electrolytes, as well as biological components such as blood, body fluids, and tissues.

[0042] The present invention also provides a detection kit of a BG for performing the method 2 of the present invention, which is characterized by including as a configuration at least the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with a BG" (hereinafter referred to as "kit 2 of the present invention").

[0043] In the kit 2 of the present invention, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with a BG" is preferably horseshoe crab-derived factor G and/or recombinant factor G.

[0044] Furthermore, in the kit 2 of the present invention, it is suitable that the above-mentioned factor G is recombinant, and as one example of the most suitable aspects of the kit 2 of the present invention is an aspect in which all of the factor G (α , β subunit) included as a configuration thereof

are recombinant. That is, it is more preferable that the cascade reaction proteins contained in the kit 2 of the present invention are only the enzyme of the present invention and recombinant factor G.

- [0045] The kit 2 of the present invention may include a reagent used to perform the method 2 of the present invention, such as the above-mentioned synthetic chromogenic substrate (X-A-Y), a buffer solution, diluent, salt, horseshoe crab lysate, or the like, selected according to the aspect of the method 2 of the present invention to be performed by the kit 2 of the present invention.

Effect of Invention

- [0046] The nucleic acid of the present invention is extremely useful because its use provides the virus of the present invention, which is useful for the stable, efficient, large quantity and inexpensive production of a uniform-quality pro-CE. Furthermore, the virus of the present invention is extremely useful because its use provides the cell of the present invention, which is useful for stable, efficient, large quantity, and inexpensive production of a uniform-quality pro-CE. Furthermore, the cell of the present invention is extremely useful because its use enables for stable, efficient, large quantity and inexpensive production of a uniform-quality protein carrying the activity of a pro-CE thereby providing the methods and kits of the present invention. Furthermore, the method and kit of the present invention make it possible to detect and measure an Et or BG without preparing a lysate from a horseshoe crab, a valuable biological resource, and provide an extremely useful technique in terms of biological conservation, animal replacement, cost, accuracy, reproducibility, and the like.

Brief Description of Drawings

- [0047] [FIG. 1] A diagram showing the results of sequence analysis of the N-terminal and C-terminal regions of the target sequence of a pro-CE recombinant virus.
- [FIG. 2] A diagram illustrating a western blotting of a pro-CE expression product.
- [FIG. 3] A graph showing the reactivity of the supernatant fraction at a BG concentration of 1 ng/mL.
- [FIG. 4] A graph showing the reactivity of the supernatant fraction at a BG concentration of 10 ng/mL.
- [FIG. 5] A graph showing the reactivity of BG when a DS-3GII fraction is used.
- [FIG. 6] A graph showing the reactivity of the supernatant fraction at an Et concentration of 10 ng/mL.

[FIG. 7] A graph showing the reactivity of the supernatant fraction at an Et concentration of 100 ng/mL.

[FIG. 8] A graph showing the reactivity of BG when recombinant factor G (diluted 5-fold) was used.

[FIG. 9] A graph showing the results of examining recombinant factor B to be used in an Et reaction.

[FIG. 10] A graph showing the results of an Et reaction for each sample used in the reaction.

[FIG. 11] A graph showing the results of investigating the hydrolysis properties of each factor toward a Boc-LGR-pNA substrate in the presence of a high concentration of Et.

[FIG. 12] A graph showing the results of examining the effect of magnesium sulfate concentration on the Et reaction of a completely reconstructed system between 0 to 100 mM.

[FIG. 13] A graph showing the results of examining the effect of magnesium sulfate concentration on the Et reaction of a completely reconstructed system between 0 and 10 mM.

[FIG. 14] A graph showing the results of examining the effect of calcium chloride concentration on the Et reaction of a completely reconstructed system between 0 and 5 mM.

[FIG. 15] A graph showing the results of examining the effect of sodium chloride concentration on the Et reaction of a completely reconstructed system between 0 and 2.5 M.

[FIG. 16] A graph showing the results of examining the difference in the Et reaction of a completely reconstructed system when Boc-LGR-pNA and Boc-VPR-pNA were used as substrates.

Best Mode for Carrying Out Invention

[0048] The present invention will now be described with reference to the best mode for carrying out the present invention.

[0049] <1> Nucleic acid of the present invention

The nucleic acid of the present invention is a nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab. The "nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab" in the nucleic acid of the present invention is not particularly limited as long as it is a nucleic acid that encodes a pro-CE derived from a horseshoe crab. For example, a nucleic acid consisting of the base sequence described in SEQ ID NO: 1 is exemplified (SEQ ID NO: 2 shows only an amino acid sequence based on the base sequence), but it will be easily understood by those skilled in the art that nucleic acids consisting of a base sequence having a different base sequence due to degeneracy of genetic code are also included in the nucleic acid of the present invention.

[0050] "Nucleic acid" used herein may be either DNA or RNA, and may be selected by those skilled in the art depending on the application. For example, when greater importance is placed on stability, DNA may be selected.

[0051] Examples of such nucleic acids include the following nucleic acids encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab:

Tachypleus tridentatus, *Limulus polyphemus*, *Tachypleus gigas* and *Tachypleus rotundicauda*.

[0052] Among these, nucleic acids encoding a pro-CE derived from *Tachypleus tridentatus* or *Limulus polyphemus* are preferable, and nucleic acids encoding a pro-CE derived from *Tachypleus tridentatus* are more preferable.

[0053] The nucleic acid of the present invention may also be chemically synthesized or produced by a genetic engineering technique. To produce by genetic engineering, the nucleic acid may be prepared by using a cDNA library prepared in accordance with standard methods from the blood cells (amebocytes) of a horseshoe crab such as *Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas*, and *Tachypleus rotundicauda*, for example, a primer of an artificially prepared base sequence described in SEQ ID NO: 5 or 6, to amplify an object DNA by PCR. The PCR product may be easily isolated using a molecular weight separation technique such as gel electrophoresis.

[0054] Furthermore, the "nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab" referred to herein is more preferably a nucleic acid of the following (A) to (C):

[0055] (A) DNA encoding a protein containing the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4;

(B) DNA encoding "a protein including an amino acid sequence in which one or several amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 have been deleted, substituted, inserted, or rearranged, and which has activity of a pro-CE derived from a horseshoe crab";

(C) RNA obtained by transcribing the DNA of (A) or (B) above.

[0056] The "DNA encoding a protein including an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4" referred to herein is DNA encoding a pro-CE derived from *Tachypleus tridentatus*.

[0057] Furthermore, a naturally occurring protein may have a mutation in its amino acid sequence, such as an amino acid substitution, deletion, insertion, or rearrangement, due to polymorphism or mutation in the DNA that encodes it, and may also have a post-translational modification, such as amino acid phosphorylation, glycosylation, lipid addition, or proline hydroxylation, due to modification reactions within the cell of the protein after production and during purification, but nevertheless, it is known that some naturally occurring proteins exhibit physiological and biological activities that are substantially equivalent to those of proteins that do not have such

mutations. In this way, a "protein encoded by the DNA of (B)" that has slight structural differences from a "protein encoded by the DNA of (A)" but has no significant functional differences may be said to be substantially equivalent to a "protein encoded by the DNA of (A)." The same is true when the above-mentioned mutations are artificially introduced into the amino acid sequence of a protein, in which case it is possible to produce an even greater variety of mutants. For example, it is known that a polypeptide in which a certain cysteine residue in the amino acid sequence of human interleukin 2 (IL-2) is substituted with serine carries interleukin 2 activity (Science, 224, 1431 (1984)). Such a "protein having a mutation" may be prepared by a well-known method such as "site-directed mutagenesis." It is also known that certain proteins have peptide regions that are not essential for activity. For example, there are signal peptides present in proteins secreted outside the cell and pro-sequences found in protease precursors and the like, and most of these regions are removed after translation or during conversion to active proteins. Such proteins exist in different forms in terms of their primary structure, but ultimately are proteins have substantially the same function as the "protein encoded by the DNA of (A)." The above "protein encoded by the DNA of (B)" defines such a protein.

[0058] Note that in the present application, "several amino acids" refers to the number of amino acids that may be mutated without losing the activity of the protein. For example, in the case of a protein containing 600 amino acid residues, the number is approximately 2 to 30, preferably 2 to 15, and more preferably 2 to 8.

[0059] The protein encoded by the DNA in (B) has the activity of a pro-CE derived from a horseshoe crab. The activity of a pro-CE may be confirmed by examining its reactivity by allowing the copresence of the pro-CE, a synthetic substrate (for example, t-butoxycarbonyl-leucyl-glycyl-arginine-pNA (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)), Et, factor C and factor B. Specifically, when the pro-CE has activity, pNA will be released when the Pro-CE, synthetic substrate, Et, and factor C are allowed be copresent, so the amount of pNA produced may be detected by measuring absorbance. Please refer to Example 2 for specific methods.

[0060] The term "copresent" as used herein is not particularly limited as long as the copresent things are in a state of contact with each other. Specifically, it refers to a state in which the pro-CE, synthetic substrate, Et, factor C, and factor B are brought into contact with each other, or in which the pro-CE, synthetic substrate, BG, and factor G are in contact with each other.

[0061] The term "reaction" as used herein refers to a reaction in which the pro-CE is copresent with a synthetic substrate, the pro-CE is converted to a CE, and then acts on the synthetic substrate to

hydrolyze the amide bond and release pNA.

[0062] Furthermore, an example of the DNA encoding the "protein including the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4" of (A) is a DNA defined by the base sequence shown in base numbers 1 to 1143 in SEQ ID NO:3. The DNA registered under GenBank accession No. D161657 may also be used.

[0063] Furthermore, examples of the DNA encoding "a protein containing the amino acid sequence shown in which one or several amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 have been deleted, substituted, inserted, or rearranged, and which has activity of a pro-CE derived from a horseshoe crab" in (B) include, for the DNA of (A), a DNA complementary to this DNA, or a DNA that hybridizes with these DNAs under stringent conditions.

[0064] Here, "stringent conditions" refers to conditions under which so-called specific hybrids are formed and non-specific hybrids are not formed (see Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) and the like). Specifically, "stringent conditions" include hybridization at 42°C in a solution containing 50% formamide, 4x SSC, 50 mM HEPES (pH 7.0), 10x Denhardt's solution, and 100 µg/ml salmon sperm DNA, followed by washing with 2x SSC, 0.1% SDS solution at room temperature and 0.1x SSC, 0.1% SDS solution at 50°C.

[0065] Furthermore, the nucleic acid of the present invention is preferably one further linked to DNA encoding a marker peptide or the like. Examples of marker peptides include protein A, insulin signal sequence, His-tag, FLAG, CBP (calmodulin-binding protein), and GST (glutathione S-transferase) and the like. The nucleic acid of the present invention also includes RNA obtained by transcribing the DNA of (A) or (B) above.

[0066] The nucleic acid of the present invention may be used, for example, to produce the "virus of the present invention" described below, and may further be utilized in producing the cell of the present invention and the like.

[0067] <2>Virus of the present invention

The virus of the present invention is a, virus carrying the nucleic acid of the present invention.

[0068] The nucleic acid of the present invention is as described above.

[0069] In the virus of the present invention, the phrase "carrying the nucleic acid" does not prevent other bases or nucleic acids from being further carried, so long as the nucleic acid is carried. Therefore, for example, in addition to the nucleic acid, a nucleic acid encoding a marker peptide or the like may further be carried.

[0070] For example, a vector carrying DNA in which "DNA of (A) or (B) in the above nucleic acid of the present invention" and "DNA encoding a marker peptide or the like" are linked together is also encompassed in the virus of the present invention. Designing the carried nucleic acid in this manner has an advantage that it may be expressed as a fusion protein with a marker peptide or the like, and purification, detection, analysis, and the like of the expressed protein may be made easier. Examples of marker peptides include protein A, insulin signal sequence, His-tag, FLAG, CBP (calmodulin-binding protein), and GST (glutathione S-transferase) and the like. For example, fusion proteins with protein A may be conveniently purified by affinity chromatography using a solid phase bound to IgG. Similarly, for a fusion protein with a His tag, a solid phase bound to magnetic nickel may be used, and for a fusion protein with FLAG, a solid phase bound to an anti-FLAG antibody may be used. Furthermore, since a fusion protein with an insulin signal is secreted outside the cell (to the culture medium, or the like), extraction procedures such as cell disruption are not required.

[0071] The method for producing the virus of the present invention is not particularly limited. An example of a method for producing the virus of the present invention is as follows. Please refer to the Examples for more specific methods.

[0072] First, a nucleic acid encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab is prepared. When the DNA of (A) above is used as the nucleic acid, first, a DNA encoding a "protein including the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4" is prepared. Furthermore, when the DNA of (B) is used, first a DNA encoding a "protein containing an amino acid sequence in which one or several amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 have been deleted, substituted, inserted or rearranged, and having the activity of a pro-CE derived from a horseshoe crab" is prepared. This DNA is not particularly limited as long as they encode respective predetermined proteins. These DNAs exist having various different base sequences due to the degeneracy of the genetic code, and DNA having any base sequence may be used.

[0073] By introducing such a nucleic acid into a virus, the virus of the present invention may be produced.

[0074] The virus into which such a nucleic acid is introduced is not particularly limited as long as it is a virus that may be used for gene transfection. Among these, a baculovirus is preferred. Among these, an NPV is preferred. The NPV is not particularly limited as long as it is a virus classified as an NPV, and for example, AcNPV, silkworm NPV (*Bombyx mori* NPV, BmNPV), or the like may be used. Of these, AcNPV is preferred.

- [0075] The nucleic acid may be introduced into the virus by homologous recombination using a transfer vector. The type of transfer vector is also not particularly limited, and examples include pPSC8 (Protein Science), pFastBac (Invitrogen), and pVL1393 (Pharmingen) and the like, among which, pPSC8 is preferable. These transfer vectors may also be commercially available.
- [0076] The method of homologous recombination using a transfer vector is not particularly limited. For a specific example, see the Examples.
- [0077] Whether a virus carrying the DNA (A) or (B) has been produced may be confirmed, for example, by analyzing the base sequence of the produced virus to examine whether DNA encoding a pro-CE derived from a horseshoe crab is carried, whether the protein expressed from the produced virus has the amino acid sequence of a pro-CE derived from a horseshoe crab, whether the protein expressed from the produced virus has the activity of a pro-CE, and the like.
- [0078] The virus of the present invention may be used, for example, to produce the "cell of the present invention" described below, and may further be utilized in the method of the present invention and the like.
- [0079] <3>Cell of the present invention
- The cell of the present invention is a cell that carries the virus of the present invention.
- [0080] The description of the "virus of the present invention" is as described above.
- [0081] The "cell" used herein is not limited as long as it is a cell that may be infected with the virus of the present invention and may express the pro-CE derived from a horseshoe crab carried by the virus of the present invention. One example is a cell derived from an insect. Furthermore, an example of a cell derived from an insect is an Sf9 cell.
- [0082] The method for making the cell carry the virus of the present invention is also not particularly limited. For example, when an NPV is used as the virus, the virus of the present invention may be infected into the cell by simply bringing the virus of the present invention and the cell into contact, and the cell may be made to carry the virus of the present invention. For an example of a specific method, see the Examples that follow.
- [0083] Since the cell of the present invention has the ability to produce a pro-CE derived from a horseshoe crab, the cell of the present invention may be selected using these properties as indicators.
- [0084] The cell of the present invention may be used, for example, in the production method of the present invention and the like described below.
- [0085] <4> Production method of the present invention

The production method of the present invention is a method for the production of a pro-CE derived from a horseshoe crab, which includes at least a step of growing the cell of the present invention and collecting a pro-CE derived from a horseshoe crab from the grown product.

[0086] The "cell of the present invention" is as described above.

[0087] In the present application, "growth" refers to a concept including the proliferation of transformed cells or the growth of an animal or insect or the like incorporating transformed cells. The term "grown product" as used herein is a concept that encompasses the medium (supernatant of culture solution) left after growing the transformant, the cultured cells themselves, and secretions, excretions, or the like from animals, insects, or the like into which the cells have been incorporated.

[0088] The growth conditions (medium, culture conditions, etc.) are not particularly limited as long as the cell of the present invention grow and the pro-CE derived from a horseshoe crab is produced, and may be appropriately selected depending on the vector, cells, etc. used. For example, the culture temperature may be about 20 to 40°C.

[0089] The growth time of the cell of the present invention may also be appropriately adjusted depending on the amount of the cell of the present invention used, the desired amount of pro-CE produced, other growth conditions, and the like.

[0090] The method for collecting the pro-CE derived from a horseshoe crab from the grown material may be appropriately selected and adopted by those skilled in the art from among general methods depending on the type of growing material.

[0091] For example, when the pro-CE is produced in a soluble form that is secreted into the medium (culture supernatant), the medium may be collected and used as is. Furthermore, when the pro-CE is produced in a soluble form secreted into the cytoplasm or in an insoluble (membrane-bound) form, these pro-CEs may be extracted by processing procedures such as a method using a nitrogen cavitation device, homogenization, glass bead milling, sonication, osmotic shock, extraction by cell disruption by freeze-thawing or the like, surfactant extraction, a combination of these, and the like, and the extract may be used as the pro-CE as is.

[0092] The production method of the present invention may further include other steps so long as at least a "step of growing the cell of the present invention and collecting a pro-CE derived from a horseshoe crab from the grown product" is included. For example, the method may include a step of further purifying the collected pro-CE. The purification may be incomplete (partial) or complete, and may be appropriately selected depending on the intended use of the pro-CE, and

the like.

[0093] Specific examples of purification methods include processing procedures such as salting out with ammonium sulfate (ammonium sulfate), sodium sulfate, or the like, centrifugation, dialysis, ultrafiltration, adsorption chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, reverse phase chromatography, gel filtration, gel permeation chromatography, affinity chromatography, electrophoresis, or the like, and combinations of these.

[0094] Whether the produced protein is configured from a pro-CE, whether it carries the activity of the pro-CE derived from a horseshoe crab and the like may be confirmed by analyzing the amino acid sequence, molecular weight, electrophoresis results, and Western blotting using an antibody that specifically reacts with the pro-CE of the collected protein, and the like.

[0095] According to the method of the present invention, a protein that carries the activity of the pro-CE may be produced extremely efficiently.

[0096] <5> Enzyme of the present invention

The enzyme of the present invention is a pro-CE produced by the production method of the present invention.

[0097] The "production method of the present invention" is as described above.

[0098] The enzyme of the present invention may be used in the method 1 of the present invention and the like described below.

[0099] <6> Method 1 of the present invention

The method 1 of the present invention is a sensitive method for the detection of an Et, which is characterized by allowing the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" to be copresent in a test sample for detecting the Et, and detecting the Et in the sample using the enzymatic activity accompanying the conversion from the enzyme of the present invention to a CE as an indicator.

[0100] The "enzyme of the present invention" is as described above.

[0101] The term "copresent" as used herein is not particularly limited as long as the copresent things are in a state of contact with each other.

[0102] For example, the enzyme of the present invention, the test sample for detecting the Et, and the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" are not particularly limited as long as they are in a state of contact with each other, and they may be made to be copresent in a solution, or a pro-CE or the serine protease precursor expressing the activity of converting the pro-CE to CE upon contact with the Et may be

immobilized on an appropriate solid phase, and the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" or the pro-CE may be put into contact with this.

[0103] Furthermore, in the method 1 of the present invention, the "serine protease precursor expressing an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et" is preferably a "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" and a "Horseshoe crab-derived Factor C and/or recombinant Factor C."

[0104] Furthermore, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" is preferably horseshoe crab-derived factor B and/or recombinant factor B.

[0105] The "factor C" and "factor B" used in the method 1 of the present invention is not particularly limited, so long as it carries its function. For example, a natural factor C fraction and factor B fraction obtained by using chromatography or the like to purify a lysate derived from one of four species of horseshoe crab, *Tachypleus • tridentatus*, *Limulus • polyphemus*, *Tachypleus gigas* and *Tachypleus rotundicauda* may be used and recombinant factor C and factor B may be used. For natural factor C and factor B, fractions of factor C and factor B may be obtained by treating the lysate using a carrier bound to dextran sulfate, a sulfopropyl group, or the like, or a specific adsorption carrier or the like. Furthermore, an amino acid sequence for natural factor C derived from, for example *Tachypleus • tridentatus* and *Tachypleus rotundicauda*, is well-known, so the recombinants may be appropriately prepared based on these sequences. The method is not particularly limited, but for example, the following method may be used. The object base sequence of factor C with a His-tag added to the C-terminus is synthesized and introduced into a transfer vector (for example, pPSC8, Takara Bio Inc.), the obtained expression vector (Factor C/pPSC8) DNA and baculovirus (AcNPV) DNA are cotransfected into an Sf9 cell, and the virus solution obtained from the culture supernatant is purified and amplified achieve preparation. The B factor may also be obtained in a similar method. The amino acid sequences of both factors C and B and the genes encoding them are already known (factor C is commercially available, and the commercially available product is disclosed in the Examples below. For factor B, SEQ ID NO:15 shows the base sequence of the gene, and SEQ ID NO:16 shows the amino acid sequence) and recombinants of these factors may be produced based on the sequence information by a step substantially the same as that for the enzyme of the present invention described above. Note that a person skilled in the art could easily understand that a nucleotide sequence having a different

nucleotide sequence than the well-known base sequence of factor C and SEQ ID NO: 15 due to the degeneracy of the genetic code, and that a protein produced based on this may be a factor C or factor B that can be used in the present invention within the range of having the original action of the factor C and factor B.

[0106] The conditions for operating the reconstructed system include not having to go through insect cells (provided as a reaction site), preferably having a constant heating, and coexisting metal ions represented by alkaline earth metals (calcium, strontium, barium, beryllium, magnesium, and the like) and alkali metals (lithium, sodium, potassium, and the like) in order to facilitate at least cascading reaction triggering, sequential activation of serine protease precursors, and CE reactions in a cell-free system.

[0107] In the method 1 of the present invention, it is more preferable that for the cascade reaction proteins, only the enzyme of the present invention, recombinant factor C and recombinant factor B are made to be copresent.

[0108] As used in the present specification, a "cascade reaction" refers to "1." and/or "2." in the following reaction:

1. The series of reactions in which, when an Et is added to the lysate, factor C (Et-sensitive factor, molecular weight 123,000) present in the lysate is activated, and the generated activated factor C hydrolyzes a defined site of factor B (molecular weight 64,000) in a limited manner to generate activated factor B, the activated factor B activates the pro-CE (molecular weight 54,000) to convert it into a CE, and the CE hydrolyzes a defined site in a loop crosslinked by disulfide bonds of a coagulogen (coagulation protein, molecular weight 19,723), that is, between . . . Arg¹⁸-Thr¹⁹ . . . and between ...Arg⁴⁶-Gly⁴⁷ . . . in a limited manner to release a polypeptide C (amino acid 28 residue) represented by H-Thr¹⁹ . . . Arg⁴⁶-OH, while the remaining portion is converted into coagulin gel;

2. The series of reactions in which, when a BG is added to the lysate, the factor G (BG-sensitive factor) present in the lysate is activated, and the activated factor G activates the pro-CE, converting it to a CE, and then hydrolyzes a defined site in a loop crosslinked by disulfide bonds of a coagulogen in a limited manner, producing coagulin gel.

[0109] Furthermore, the term "cascade reaction protein" refers to a protein that constitutes a "cascade reaction." It refers to a serine protease precursor (factor C, factor B, factor G, and pro-CE); specifically, in "1." of the above cascade reaction, refers to factor C, factor B, and the pro-CE, and in "2.," refers to factor G and the pro-CE.

[0110] As will be apparent from the Examples described later, each of the coagulation factors obtained by genetic engineering and used in the method 1 of the present invention may be derived from different sources. For example, the Et may also be detected by including a step of making the enzyme of the present invention, factor C derived from *Tachypleus rotundigauda*, and factor B derived from *Limulus polyphemus* to be copresent.

[0111] The method 1 of the present invention may be conveniently carried out by using the kit 1 of the present invention described *below*.

[0112] <7> Kit 1 of the present invention

Furthermore, the kit 1 of the present invention is a detection kit of an Et for performing the method 1 of the present invention, including as components at least the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with an Et."

[0113] The "enzyme of the present invention" is as described above.

[0114] Furthermore, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with activated factor C" is preferably horseshoe crab-derived factor B and/or recombinant factor B.

[0115] Furthermore, it is preferable that the kit 1 of the present invention is configured only from the enzyme of the present invention, recombinant factor C, and recombinant factor B, as cascade reaction proteins.

[0116] Furthermore, the kit 1 of the present invention can be appropriately used by those skilled in the art based on the method 1 of the present invention.

[0117] The meanings of the terms "factor C," "factor B," "cascade reaction," and the like used in the kit 1 of the present invention are the same as those used in the method 1 of the present invention. Furthermore, as described above, such may include a reagent used to perform the method 1 of the present invention, such as the above-mentioned synthetic chromogenic substrate (X-A-Y), a buffer solution, diluent, salt, horseshoe crab lysate, or the like, selected according to the aspect of the method 1 of the present invention to be performed by the kit 1 of the present invention.

[0118] <8> Method 2 of the Present Invention

The method 2 of the present invention also provides a method for the detection of a BG, which is characterized by allowing the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-clotting enzyme to a clotting enzyme upon contact with an BG" to be present together in a test sample for detecting the BG, and detecting the BG in

the sample using the enzymatic activity accompanying the conversion from the enzyme of the present invention to a clotting enzyme as an indicator.

[0119] The "enzyme of the present invention" is as described above.

[0120] In the method 2 of the present invention, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with a BG" is preferably horseshoe crab-derived factor G and/or recombinant factor G.

[0121] The "factor G" that can be used in the method 2 of the present invention is not particularly limited, so long as it retains its function. For example, a natural factor G fraction obtained by purifying a lysate derived from any one of four species of horseshoe crabs by chromatography or the like can be used, or a recombinant factor G can also be used. Recombinant factor G is a protein composed of an α subunit and a β subunit, and each of them can be produced by the following procedures.

[0122] First, DNA encoding the α subunit of factor G from a horseshoe crab is prepared. An example of such DNA is the DNA registered as GenBank accession No.16622 (SEQ ID NO: 17: amino acid sequence is SEQ ID NO: 18). This DNA is treated with BamHI/HindIII to recover a DNA fragment containing the desired gene sequence. This sample is blunted and then mixed with pPSC8 (transfer vector) treated with Nru I to carry out a ligation reaction. The ligation product is then transformed into E. coli JM109 to obtain transformants. The plasmid in which the fragment of the desired size has been confirmed is purified. The selected expression vector (factor G- α /pPSC8) DNA and baculovirus (AcNPV) DNA are co-transfected into Sf9 cells. Thereafter, the virus solution obtained from the culture supernatant is purified and amplified. This virus solution is used to infect expres SF⁺ cells, and the culture medium is centrifuged to obtain a supernatant fraction and a precipitate fraction. The α subunit of factor G can be obtained from these fractions. Furthermore, the β subunit can be obtained by replacing the DNA used in the method for obtaining the α subunit with DNA encoding the β unit of factor G derived from horseshoe crab. Furthermore, as the DNA encoding the β unit, for example, the base sequence registered as GenBank accession No. 16623 (SEQ ID NO: 19) and its amino acid sequence (SEQ ID NO: 20) may also be used. Note that a person skilled in the art could easily understand that a nucleotide sequence having a different nucleotide sequence than SEQ ID NOS: 16 and 17 due to the degeneracy of the genetic code, and that a protein produced based on the nucleotide sequence may be a factor G that can be used in the present invention within the range of having the original action of the factor G.

- [0123] The conditions for operating the reconstructed system include not having to go through insect cells (a certain type of cell is provided as a reaction site), preferably having a constant heating, and coexisting metal ions such as alkaline earths and alkali metals in order to facilitate at least cascading reaction triggering, sequential activation of serine protease precursors, and CE reactions in a cell-free system.
- [0124] Furthermore, the method 2 of the present invention more preferably allows only the enzyme of the present invention and recombinant factor G to be present together, as cascade reaction proteins. As in the method 1 of the present invention, the enzyme of the present invention and the recombinant factor G may be derived from the same source, or enzymes of different origins may be combined.
- [0125] The meanings of the terms "present together," "cascade reaction," and "cascade reaction protein" used in the method 2 of the present invention are the same as those used in the method 1 of the present invention.
- [0126] The method 2 of the present invention can be utilized in the kit 2 of the present invention described below.
- [0127] <9> Kit 2 of the Present Invention
- Furthermore, the kit 2 of the present invention is a detection kit of a BG for performing the method 2 of the present invention, including as components at least the enzyme of the present invention and "a serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with a BG."
- [0128] The "enzyme of the present invention" is as described above.
- [0129] In the kit 2 of the present invention, the "serine protease precursor that expresses an activity of converting a pro-CE to a CE upon contact with a BG" is preferably horseshoe crab-derived factor G and/or recombinant factor G.
- [0130] It is further suitable that this factor G is recombinant, and as one example of the most suitable aspects of the kit 2 of the present invention is an aspect in which all of the factor G included as a configuration thereof are recombinant. That is, it is more preferable that the cascade reaction proteins contained in the kit 2 of the present invention are only the enzyme of the present invention and recombinant factor G.
- [0131] Furthermore, the kit 2 of the present invention can be appropriately used by those skilled in the art based on the method 2 of the present invention.
- [0132] The term "factor G" used in the kit 2 of the present invention has the same meaning as in the

method 2 of the present invention. Furthermore, "cascade reaction" and "cascade reaction protein" have the same meaning as those used in the method 1 of the present invention. Furthermore, as described above, such may include a reagent used to perform the method 2 of the present invention, such as the above-mentioned synthetic chromogenic substrate (X-A-Y), a buffer solution, diluent, salt, horseshoe crab lysate, or the like, selected according to the aspect of the method 2 of the present invention to be performed by the kit 2 of the present invention.

Examples

[0133] The present invention will be described in more detail below with reference to examples.

[0134] [Example 1] Expression of Pro-CE using insect cells

The cDNA shown in SEQ ID NO: 3 (the base sequence shown in 1 to 1125 of SEQ ID NO: 3, with a His-Tag sequence added to the C-terminus) (kindly provided by Dr. Tatsufumi Muta of the Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University (currently the Graduate School of Life Sciences, Tohoku University); this cDNA was prepared by the method described in Non-Patent Document 2) was introduced into a transfer vector (pPSC8), and a clone having the desired base sequence was selected. Selected expression vector (PC/pPSC8) DNA and baculovirus (AcNPV) DNA were co-transfected into Sf9 cells. The virus solution obtained from the culture supernatant was purified and amplified. Viral DNA was extracted from baculovirus-infected cells and sequenced. The obtained virus solution was used to infect insect cells expresSF+ (registered trademark; made by Protein • Science (Protein Science)), and the expressed product was analyzed by Western blotting. These steps are described in detail below.

[0135] 1. Expression Vector Construction

To a 0.2 mL sample tube, 1 µL of PC/pUC118 (20 ng/µg), 12 µL of 2.5 mM dNTP, 5 µL of KOD buffer #1, 2 µL of 25 mM magnesium chloride solution, 2.5 µL each of PC-F and PC-R (4 pmol/µL), 1 µL of KOD DNA polymerase (Toyobo Co., Ltd.), and 24 µL of sterilized pure water were added and stirred to perform PCR. After confirming that the target gene was contained, the total volume was made up to 16 µL with TE buffer. To the resulting PCR product, 1 µL of 100 mM ATP, 1 µL of 10× Buffer, and T4 Polynucleotide Kinase (made by Takara Bio Inc.) were added, and the mixture was incubated at 37°C for 30 minutes. After purification, the PCR product was mixed with pPSC12 treated with SmaI, and a ligation reaction was carried out. E. coli JM109 was transformed using a ligation product to obtain a transformant (PC/pPSC12). PC/pPSC12 was digested with Xba I/Bgl II, and a fragment containing the target gene was recovered. The resulting

fragment was mixed with pPSC8 treated with the same enzyme, and a ligation reaction was carried out. *E. coli* JM109 was transformed using a ligation product to obtain a transformant. A plasmid in which the fragment of the desired size was confirmed was purified and its sequence confirmed. The sequence analysis was performed using the following primers and the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver .3 (Applied Biosystems), and the analysis was performed using an automated sequencer, ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The primer sequences are shown in SEQ ID NOS: 5 to 10 in the sequence listing.

SEQ ID NO: 5: PC-F

SEQ ID NO: 6: PC-R

SEQ ID NO: 7: PSC2

SEQ ID NO: 8: PSC4

SEQ ID NO: 9 PC 453/472-F

SEQ ID NO: 10: PC 683/664-R

[0136] A clone in which insertion of the target gene was confirmed was inoculated into 100 mL of LB medium containing 50 µg/mL ampicillin and cultured at 30°C overnight. The grown cells were harvested, and the plasmid was purified according to the instructions in the Plasmid Midi Kit (QIAGEN) manual.

[0137] 2. Co-Transfection

200 µL of serum-free Sf-900II medium (made by (Invitrogen) Invitrogen) containing 2.3 µg of an expression vector carrying a cDNA encoding Pro-CE, 85 ng of Linear AcNPV DNA, and 5 µL of LIPOFECTIN Reagent (made by (Invitrogen) Invitrogen) was added to 1.0×10^6 Sf9 cells seeded in a 25 cm² flask. After leaving the plates at 28°C for 6 hours, serum-free Sf-900 II medium was added to bring the culture volume to 5 mL. After further culturing at 28°C for 5 days, the culture supernatant was collected and used as a co-transfection solution.

[0138] 3. Purification of Recombinant Virus

The recombinant virus was purified by plaque assay. The specific method is as follows.

[0139] 2.0×10^6 Sf9 cells were seeded onto a 60 mm diameter petri dish and left to stand at 28°C for 1 hour to allow the cells to adhere to the bottom surface. The co-transfection solution was diluted to 10^4 , 10^5 , 10^6 , and 10^7 times with serum-free Sf-900 II medium, and 1 mL of each solution was added to the cells and gently shaken at room temperature for 1 hour. Then, the supernatant of the petri dish (virus solution) was removed, and 4 mL of serum-free Sf-900II medium containing 0.5% SeaKemGTG agarose (BMA) was poured into the dish, followed by static culture at 28°C

for 8 days. Six plaques of infected insect cells lacking polyhedra (Polyhedra) were picked from each medium and each was suspended in 1 mL of serum-free Sf-900II medium to prepare a virus stock solution.

[0140] 4. Propagation of Recombinant Virus

Next, the recombinant virus was propagated (a recombinant virus solution was prepared). The specific method is as follows.

[0141] 0.5 mL of the virus stock solution was added to 2.0×10^6 Sf9 cells seeded in a 25 cm² flask, and the cells were incubated at 28°C for 1 hour. Serum-free Sf-900 II medium was added to bring the culture volume to 5 mL, and the cells were cultured statically for 3 days to prepare a first passage virus solution.

[0142] The entire amount of the first virus solution was added to 6.0×10^6 Sf9 cells seeded in a 75 cm² flask, and the cells were incubated at 28°C for 1 hour. Then, 10 mL of serum-free Sf-900 II medium was added and the cells were cultured for an additional 3 days. After the cultivation, the culture supernatant was collected and centrifuged at $3,000 \times g$ and 4°C for 15 minutes to separate the supernatant and precipitate. The culture supernatant was collected and used as the second passage virus liquid.

[0143] 5. Preparation of Recombinant Virus Solution

Cultured insect cells expresSF + in the logarithmic growth phase were diluted with serum-free Sf-900 II medium to a concentration of 1.5×10^6 cells/mL, and 50 mL of the diluted solution was prepared in a 125 mL Erlenmeyer flask. 0.5 mL of the second-stage virus liquid was added to this, and the mixture was cultured while shaking at 130 rpm at 28°C for 3 days. After incubation, the culture solution was centrifuged at $10,000 \times g$, 4°C for 30 minutes, and fractionated into a supernatant and a precipitate. This culture supernatant was recovered and used as the third viral solution.

[0144] 6. Gene insertion confirmation

The insertion of DNA into the cells was then confirmed. The specific method is as follows.

[0145] 0.7 mL of the third passage virus fluid collected as described above was placed in a 1.5 mL microtube, and equal volumes of 20% polyethylene glycol and 1 M sodium chloride solution were added, mixed well, and allowed to stand for 1 hour. Then, the mixture was centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 minutes and fractionated into a supernatant and a precipitate. This precipitate was collected and dissolved in 180 µL of Buffer

ALT according to the manual of the QIAamp DNA Miki Kit (QIAGEN), and viral DNA was

extracted. Using the extracted viral DNA as a template, PCR was performed as follows using the following primers.

SEQ ID NO: 11: PSC N3F

SEQ ID NO: 12: PSC N3R

[0146] To a 0.2 mL sample tube, 1 μ L of the above viral DNA, 5 μ L of 10 $\times$ PCR buffer for KO D-Plus-, 5 μ L of 2 mM dNTPs, 2 μ L of 25 mM magnesium sulfate solution, 3.75 μ L each of PSC N3F and PSC N3R primers (4 pmol/mL), 1 μ L of KOD-Plus- DNA Polymerase (Toyobo Co., Ltd.), and 19.5 μ L of sterilized pure water were added and mixed well. Using this, PCR was performed by repeating 30 cycles of "94°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 4 minutes."

[0147] 10 μ L of the PCR product was subjected to agarose gel electrophoresis to confirm the length of the amplified fragment. A PCR product that yielded a fragment of the desired length was purified, and the N-terminal and C-terminal sequences were confirmed. The sequence analysis was carried out using the same reagents and equipment as in "1." above, and the following primers were used. The primer sequences are shown in SEQ ID NOS: 13 and 14 in the sequence listing.

SEQ ID NO: 13: PSCNF2

SEQ ID NO: 14: PSC3

[0148] 7. Titer Measurement

2.0 $\times$ 10⁶ Sf9 cells were seeded onto a 60 mm diameter petri dish and left to stand at 28°C for 1 hour to allow the cells to adhere to the bottom, and then the culture medium was removed. The third passage viral solution was diluted to 10⁵, 10⁶, 10⁷, and 10⁸ times with serum-free Sf-900 II medium, and 1 mL of each of these solutions was added to the petri dish, and the mixture was gently shaken at room temperature for 1 hour. Then, the supernatant of the petri dish (virus solution) was removed, and 4 mL of serum-free Sf-900II medium containing 0.5% SeaKemGTG agarose (BMA) was poured into the dish, followed by static culture at 28°C for 7 days. The number of plaques observed in each medium was counted to determine the titer.

[0149] 8. Expression Testing

Insect cell expresSF+ was diluted with serum-free Sf-900 II medium to a concentration of 1.5 $\times$ 10⁶ cells/mL, and 100 mL of the solution was prepared in each of nine 250 mL Erlenmeyer flasks. The third passage virus solution was added to each of these plates at MOI = 0.2, 1, or 5 (three tubes each), and the plates were shake-cultured at 130 rpm at 28°C for 48, 72, or 96 hours,

respectively. After incubation, the culture solution was centrifuged at 3,000×g, 4°C for 20 minutes, and fractionated into a precipitate and a supernatant.

[0150] 9. Confirmation of Expression

The samples collected in "8." above were subjected to SDS-PAGE according to a standard method. The proteins were transferred to a blotting membrane by semi-dry blotting, and Western blotting was performed under the following conditions. The "DNA encoding Pro-CE" incorporated into the virus is designed to be expressed in a form bound to a His-Tag.

Sample treatment: Laemmli Sample Buffer (made by BIO-RAD) was added to the supernatant, and the mixture was heat-treated at 99°C for 3 minutes. Regarding the precipitate, 200 µL of the precipitate was suspended in 400 µL of PBS, after which Laemmli Sample Buffer was added and the mixture was heat-treated at 99°C for 3 minutes.

The amount of sample applied was 20 µL/lane.

SDS-PAGE gel concentration: 10 to 20% gel (BIO-RAD) was used.

The SDS-PAGE gel was energized at 150 V, CV.

Blotting membrane: PVDF was used.

Blotting current: 15 V, CV, 30 minutes.

Primary antibody: Penta•His Antibody (QIAGEN) was used.

Secondary antibody: Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate (BIO-RAD) was used.

Detection: Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Milipore) was used.

[0151] 10. Results

The results of sequence analysis of the target sequence of the recombinant virus are shown in FIG. 1. The upper panel shows the analysis results, and the lower panel shows the Pro-CE sequence. As can be seen from this, the N-terminal and C-terminal sequences of Pro-CE in the recombinant virus were identical. This confirmed the presence of the DNA sequence encoding Pro-CE in the recombinant virus.

[0152] The titer measurement result was 0.7×10^8 pfu/mL.

[0153] As a result of the above step "9.", a band that reacted with anti-His-Tag antibody was confirmed at the desired position (approximately 40 kDa) (FIG. 2). In FIG. 2, M indicates a molecular weight marker, 48, 72, and 96 indicate the 48-hour, 72-hour, and 96-hour infection groups, respectively, S indicates the virus-uninfected group, and A indicates the wild-type virus infection group. This confirmed that Pro-CE was expressed.

[0154] [Example 2] Confirmation of activity of recombinant Pro-CE

Insect cell expresSF+ was diluted in serum-free Sf-900II medium to obtain 1.5×10^6 pieces/mL, and 100 mL of the solution was prepared in each of nine 250 mL Erlenmeyer flasks. The third passage virus solution was added to each of these plates at MOI = 0.2, 1, or 5 (three tubes each), and the plates were shake-cultured at 130 rpm at 28°C for 48, 72, or 96 hours, respectively. After incubation, the culture solution was centrifuged at $3,000\times g$, 4°C for 20 minutes, and fractionated into a precipitate and a supernatant. The supernatant was frozen and stored.

- [0155] Sample 1: MOI = 0.2, 48 hours
 Sample 2: MOI = 0.2, 72 hours
 Sample 3: MOI = 0.2, 96 hours
 Sample 4: MOI = 1, 48 hours
 Sample 5: MOI = 1, 72 hours
 Sample 6: MOI = 1, 96 hours
 Sample 7: MOI = 5, 48 hours
 Sample 8: MOI = 5, 72 hours
 Sample 9: MOI = 5, 96 hours
 Sample 10: Non-virus infected cells
 Sample 11: Wild-type virus infected cells

- [0156] (Reagents)

DS-3GII fraction: Factor G derived from horseshoe crab hemocyte lysate [purified fraction using dextran sulfate Sepharose CL-6B (hereinafter referred to as DS-Sepharose)]

DS-10AII fraction: Pro-CE derived from horseshoe crab hemocyte lysate (DS-Sepharose purified product)

BG:CSBG (1495 ng/vial) was dissolved in 1.495 mL of distilled water and then serially diluted 10-fold.

- [0157] 1. Reactivity of supernatant fraction and factor G at BG concentrations of 1 to 100 ng/mL

First, the supernatants of the above nine samples were examined to determine whether the expressed proteins retained Pro-CE activity.

- [0158] After incubation, the supernatant fraction was diluted 10-fold with 50 mL of Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl. The DS-3GII fraction (25 μ L), dextran (final concentration 2.4%), Tris-HCl buffer (pH 8.0) (final concentration 80 mM), MgSO₄ (final concentration 64 mM), CaCl₂ (final concentration 0.4 mM), Na₂SO₄ (final concentration 8 mM), distilled water for injection (15 μ L), Boc-Leu-Gly-Arg-pNA substrate (see Patent Document 1 above) (final concentration 0.24 mM) and 25 μ L of BG solution (0, 1, 10, 100 ng/mL) were added to this dilution to each sample (25 μ L each), the total volume was adjusted to 125 μ L, and the mixture was transferred to a Wellreader SK603 and reacted at 37°C for 2 hours, after which the

absorbance at a measurement wavelength of 405 nm (reference wavelength 492 nm) was automatically measured. Also, the DS-10AII fraction was used as a positive control. The experiment was performed in duplicate, and the average absorbance was calculated. The results are shown in FIGS. 3 and 4 and Table 1.

[0159] [Table 1]

[Endpoint assay]

[Endpoint assay]					
	Measurement sample	Sample No.	Reaction value (A405-492nm)		Average value
CSBG (0 ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.029	0.029	0.029
		② MOI=0.2, 72h	0.029	0.030	0.030
		③ MOI=0.2, 96h	0.031	0.031	0.031
		④ MOI= 1, 48h	0.030	0.032	0.031
		⑤ MOI= 1, 72h	0.030	(0.041)	0.030
		⑥ MOI= 1, 96h	0.031	0.030	0.031
		⑦ MOI= 5, 48h	0.030	0.030	0.030
		⑧ MOI= 5, 72h	0.030	0.030	0.030
		⑨ MOI= 5, 96h	0.031	0.031	0.031
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.029	0.030	0.030
		⑪ Wild type infection	0.030	0.029	0.030
DS-10AII fraction (Control)			0.040	0.041	0.041
CSBG (1ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.308	0.317	0.313
		② MOI=0.2, 72h	0.462	0.461	0.462
		③ MOI=0.2, 96h	0.396	0.397	0.397
		④ MOI= 1, 48h	0.332	0.331	0.332
		⑤ MOI= 1, 72h	0.382	0.380	0.381
		⑥ MOI= 1, 96h	0.376	0.370	0.373
		⑦ MOI= 5, 48h	0.359	0.365	0.362
		⑧ MOI= 5, 72h	0.401	0.396	0.399
		⑨ MOI= 5, 96h	0.344	0.344	0.344
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.052	0.053	0.053
		⑪ Wild type infection	0.051	0.052	0.052
DS-10AII fraction (Control)			0.510	0.481	0.496
CSBG (10ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.567	0.578	0.573
		② MOI=0.2, 72h	0.612	0.642	0.627
		③ MOI=0.2, 96h	0.606	0.628	0.617
		④ MOI= 1, 48h	0.516	0.518	0.517
		⑤ MOI= 1, 72h	0.589	0.588	0.589
		⑥ MOI= 1, 96h	0.595	0.589	0.592
		⑦ MOI= 5, 48h	0.527	0.555	0.541
		⑧ MOI= 5, 72h	0.606	0.597	0.601
		⑨ MOI= 5, 96h	0.552	0.558	0.555
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.084	0.084	0.084
		⑪ Wild type infection	0.083	0.083	0.083
DS-10AII fraction (Control)			0.699	0.725	0.712

[0160] As shown in Table 1, the enzyme was present in approximately the same amount in the culture supernatants of the virus-infected cells of samples 1 to 9, and expression of Pro-CE was confirmed in all fractions. In particular, sample 2 showed strong activity.

[0161] Table 2 and FIG. 5 show a comparison of the activities of the recombinant Pro-CE and DS-10AII fractions of sample 2.

[0162] [Table 2]

[Endpoint assay]

	Measurement sample	CSBG concentration	Reaction value		Average value	ΔA value
		(ng/mL)	(A405-492nm)			
DS-3G II (X1)	DS-10A II (X1)	0	0.056	0.060	0.058	— —
		1	0.440	0.434	0.437	0.379
		10	0.969	1.002	0.986	0.928
	Group ProCE (X5)	0	0.051	0.049	0.050	— —
		1	0.480	0.487	0.484	0.434
		10	0.988	0.986	0.987	0.937

[0163] These results confirmed that the recombinant Pro-CE has activity substantially equivalent to that of Pro-CE derived from horseshoe crab hemocyte extract.

[0164] 2. Reactivity of supernatant fractions and factors B and C at Et concentrations of 1 to 100 ng/mL

To the dilution obtained in "1." above, the recombinant Pro-CE and DS10-AII fraction (positive control), which is the elution fraction of Pro-CE, and further, DS-12BCI fraction (25 μ L), which is the elution fraction of factors B and C in place of factors B and C, and Et were added. The concentrations of Et added were 0, 1, 10, and 100 ng/mL, respectively. The other reaction mixtures were added at the same concentrations and amounts, and the total volume was adjusted to 125 μ L, which was then transferred to a Wellreader SK603 and reacted at 37°C for 30 minutes, after which the absorbance was automatically measured at a measurement wavelength of 405 nm (reference wavelength 492 nm). The experiment was performed in duplicate, and the average absorbance was calculated. The results are shown in FIGS. 6 and 7 and Table 3.

[0165] [Table 3]

[Endpoint assay]					
	Measurement sample	Sample No.	Reaction value (A405-492nm)		Average value
Endotoxin (0 ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.036	0.035	0.036
		② MOI=0.2, 72h	0.036	0.037	0.037
		③ MOI=0.2, 96h	0.038	0.037	0.038
		④ MOI=1, 48h	0.037	0.038	0.038
		⑤ MOI=1, 72h	0.037	0.039	0.038
		⑥ MOI=1, 96h	0.037	0.037	0.037
		⑦ MOI=5, 48h	0.038	0.038	0.038
		⑧ MOI=5, 72h	0.038	0.038	0.038
		⑨ MOI=5, 96h	0.038	0.039	0.039
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.036	0.038	0.037
		⑪ Wild type infection	0.039	0.038	0.039
	DS-10AII fraction (Control)		0.044	0.044	0.044
Endotoxin (1 ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.066	0.067	0.067
		② MOI=0.2, 72h	0.084	0.083	0.084
		③ MOI=0.2, 96h	0.070	0.072	0.071
		④ MOI=1, 48h	0.070	0.071	0.071
		⑤ MOI=1, 72h	0.075	0.075	0.075
		⑥ MOI=1, 96h	0.069	0.069	0.069
		⑦ MOI=5, 48h	0.074	0.075	0.075
		⑧ MOI=5, 72h	0.074	0.077	0.076
		⑨ MOI=5, 96h	0.065	0.068	0.067
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.049	0.054	0.052
		⑪ Wild type infection	0.051	0.053	0.052
	DS-10AII fraction (Control)		0.156	0.143	0.150

[Endpoint assay]					
	Measurement sample	Sample No.	Reaction value (A405-492nm)		Average value
Endotoxin (10 ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.306	0.276	0.291
		② MOI=0.2, 72h	0.420	0.395	0.408
		③ MOI=0.2, 96h	0.317	0.317	0.317
		④ MOI=1, 48h	0.306	0.302	0.304
		⑤ MOI=1, 72h	0.333	0.338	0.336
		⑥ MOI=1, 96h	0.295	0.297	0.296
		⑦ MOI=5, 48h	0.333	0.329	0.331
		⑧ MOI=5, 72h	0.339	0.337	0.338
		⑨ MOI=5, 96h	0.271	0.268	0.270
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.146	0.147	0.147
		⑪ Wild type infection	0.146	0.145	0.146
	DS-10AII fraction (Control)		0.722	0.724	0.723
Endotoxin (100 ng/mL)	Recombinant Pro-CE (10x dilution)	① MOI=0.2, 48h	0.634	0.634	0.634
		② MOI=0.2, 72h	0.738	0.806	0.771
		③ MOI=0.2, 96h	0.727	0.686	0.707
		④ MOI=1, 48h	0.682	0.650	0.656
		⑤ MOI=1, 72h	0.707	0.678	0.693
		⑥ MOI=1, 96h	0.677	0.666	0.672
		⑦ MOI=5, 48h	0.729	0.693	0.711
		⑧ MOI=5, 72h	0.720	0.699	0.710
		⑨ MOI=5, 96h	0.710	0.704	0.707
	(10x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.306	0.301	0.304
		⑪ Wild type infection	0.300	0.302	0.301
	DS-10AII fraction (Control)		0.733	0.757	0.745

[0166] As shown in Table 3, it was confirmed that the Pro-CE was present in the culture supernatant of virus-infected cells in all samples. In particular, sample 2 showed strong activity.

[0167] [Example 3] Confirmation of activity expression of complete reconstruction system using recombinant Pro-CE and recombinant factor G

(Reagents)

(1) Recombinant factor G (culture supernatant of α subunit: β subunit = 2:1)

(2) Recombinant Pro-CE (culture supernatant of sample 2 in Example 2)

(3) BG:CSBG (1495 ng/vial) was dissolved in 1.495 mL of distilled water and then serially diluted 10-fold.

[0168] The culture supernatants of (1) and (2), produced according to the method disclosed in JP 2006-271384 A (Patent Document 2), were each diluted 5-fold with 50 mL of Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl. In this case, the DNA encoding the α subunit of factor G had the sequence shown in SEQ ID NO: 21. Recombinant Pro-CE (25 μ L), Tris-HCl buffer (pH 8.0) (final concentration 80 mM), $MgSO_4$ (final concentration 64 mM), $CaCl_2$ (final concentration 0.4 mM), Na_2SO_4 (final concentration 8 mM), distilled water for injection (15 μ L), dextran (final concentration 2.4%), Boc-Leu-Gly-Arg-pNA substrate (final concentration 0.24 mM) and 25 μ L of BG solution (0, 1, 10 ng/mL) were added to the diluted recombinant factor G (25 μ L), the total volume was made 125 μ L, and the mixture was transferred to a Wellreader SK603 and reacted as usual, after which the absorbance at a measurement wavelength of 405 nm (reference wavelength 492 nm) was automatically measured. The experiment was performed in duplicate, and the average absorbance was calculated. The results are shown in Table 4 and FIG. 8.

[0169] [Table 4]

[Endpoint assay]

	Measurement sample	CSBG concentration	Reaction value		Average value ($\times 10^3$)	ΔA value ($\times 10^3$)
		(ng/mL)	(A405–492nm) ($\times 10^3$)			
Recombinant Factor G (X5)	Group ProCE (X5)	0	0.079	0.076	0.078	— —
		1	0.140	0.138	0.139	0.061
		10	0.543	0.520	0.532	0.454

[0170] These results confirmed that by combining recombinant factor G and recombinant Pro-CE, the BG-induced reaction proceeded in a concentration-dependent manner, similar to that of each factor in the lysate (natural LAL factor), and that activity was expressed similarly to that of natural LAL factor.

[0171] [Example 4] Confirmation of Et reaction by complete reconstruction system using recombinant Pro-CE, recombinant factor B, and recombinant factor C

The expression sequence of factor B was synthesized by adding a His-Tag sequence to the C-terminus of factor B, and was introduced into a transfer vector (pPSC8). The obtained expression vector (FactorB/pPSC8) DNA and baculovirus (AcNPV) DNA were co-transfected into Sf9 cells, and the virus solution obtained from the culture supernatant was purified and amplified. Viral DNA was extracted from the virus fluid and subjected to base sequence analysis to confirm the N-terminal and C-terminal sequences of the integrated gene. The obtained recombinant virus was infected into expresSF + cells in an amount equivalent to 100 mL of culture medium at MOIs of 0.02, 0.1, and 0.5, and the culture supernatant and precipitate were collected 48, 72, and 96 hours later. The expression of the recovered expression product was confirmed by Western blotting using an anti-His-Tag antibody. Furthermore, Et (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml) was added to the mixture in the presence of this factor, recombinant factor C (PyroGene, Cambrex), and recombinant ProCE, and the mixture was reacted at 37°C for 1 hour. The activation of ProCE (production of CE) was confirmed by the ability of pro-CE to hydrolyze a synthetic substrate (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA).

[0172] Upon conducting an experiment similar to that in Example 1 was conducted to confirm the activity of the recombinant B factor, then examining Et reactivity, the condition of MOI = 0.1 and 96 hours showed the highest Et reactivity, and therefore these conditions were used to reconstruct the C system cascade (Table 5, FIG. 9).

[0173] [Table 5]

[Endpoint assay]					
	Measurement sample	Sample No.	Reaction value (A405-492nm)		Average value
Endotoxin (0 ng/mL)	Recombinant Factor B (5x dilution)	① MOI=0.02, 48h	0.022	---	0.022
		② MOI=0.02, 72h	0.022	---	0.022
		③ MOI=0.02, 96h	0.022	---	0.022
		④ MOI= 0.1, 48h	0.023	---	0.023
		⑤ MOI= 0.1, 72h	0.018	---	0.018
		⑥ MOI= 0.1, 96h	0.018	---	0.018
		⑦ MOI= 0.5, 48h	0.010	---	0.010
		⑧ MOI= 0.5, 72h	0.019	---	0.019
		⑨ MOI= 0.5, 96h	0.018	---	0.018
	(5x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.016	---	0.016
⑪ Wild type infection		0.016	---	0.016	
Endotoxin (10ng/mL)	Recombinant Factor B (5x dilution)	① MOI=0.02, 48h	0.044	0.043	0.044
		② MOI=0.02, 72h	0.232	0.230	0.231
		③ MOI=0.02, 96h	0.440	0.451	0.446
		④ MOI= 0.1, 48h	0.340	0.318	0.329
		⑤ MOI= 0.1, 72h	0.568	0.572	0.570
		⑥ MOI= 0.1, 96h	0.617	0.622	0.620
		⑦ MOI= 0.5, 48h	0.300	0.276	0.288
		⑧ MOI= 0.5, 72h	0.478	0.462	0.470
		⑨ MOI= 0.5, 96h	0.368	0.369	0.369
	(5x dilution)	⑩ Uninfected cells	0.034	0.033	0.034
⑪ Wild type infection		0.035	0.034	0.035	

[0174] In addition, to confirm whether the cascade reaction would proceed when factors derived from different horseshoe crabs were combined, recombinant factor C (derived from *Tachyplesus rotundicauda*), which is a component of the commercially available PyroGene (made by Cambrex), was used as the recombinant factor C.

[0175] (Reagents)

- (1) Recombinant factor B (MOI = 0.1, 96-hour culture supernatant)
- (2) Recombinant Pro-CE (culture supernatant of sample 2 in Example 2)
- (3) Recombinant factor C (trade name PyroGene, used as is)
- (4) Et: *E. coli* O111:B4 (Sigma) was adjusted to 1mg/mL with distilled water and then serially diluted 10-fold.

[0176] In addition, to verify that the experimental results were obtained as a result of reconstructing the cascade, we created and verified the following combinations of samples:

- [0177] Sample A: recombinant Pro-CE, recombinant factor B, and recombinant factor C
Sample B: recombinant Pro-CE, recombinant factor B, and distilled water
Sample C: Recombinant Pro-CE, recombinant factor C, and distilled water
Sample D: Recombinant factor B, recombinant factor C, and distilled water
Sample E: Recombinant Pro-CE and distilled water
Sample F: Recombinant factor B and distilled water
Sample G: Recombinant factor C and distilled water
- [0178] For each sample, the culture supernatants from (1) and (2) above were diluted 5-fold with 50 mL of ice-cold Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, and the total volume was adjusted to 60 μ L.
- [0179] 25 μ L of Tris-HCl buffer (pH 8.0) (final concentration 80 mM), MgSO₄ (final concentration 64 mM), CaCl₂ (final concentration 0.4 mM), Na₂SO₄ (final concentration 8 mM), dextran (final concentration 2.4%), distilled water for injection (15 μ L), Boc-Leu-Gly-Arg-pNA substrate (final concentration 0.24 mM), and Et solution (0, 100 ng/mL) were added to each sample, transferred to a Wellreader SK603 having a total volume of 125 μ L, and reacted at 37°C for 10 hours, then absorbance at a measurement wavelength of 405 nm (control wavelength 492 nm) was measured. The experiment was performed in duplicate, and the average absorbance was calculated. The results are shown in Table 6 and FIG. 10.
- [0180] [Table 6]

Et concentration (ng/mL)	Reconstruction system	Reaction value		Average value
		(A405-492nm.)		
0	(A)PCE+FB+FC	0.024	0.022	0.023
	(B)PCE+FB	0.023	0.022	0.023
	(C)PCE+FC	0.020	0.020	0.020
	(D)FB+FC	0.024	0.025	0.025
	(E)PCE	0.009	0.006	0.008
	(F)FB	0.022	0.022	0.022
	(G)FC	0.022	0.023	0.023
100	(A) PCE+FB+FC	0.652	0.645	0.649
	(B) PCE+FB	0.022	0.023	0.023
	(C) PCE+FC	0.029	0.030	0.030
	(D) FB+FC	0.032	0.034	0.033
	(E) PCE	0.006	0.006	0.006
	(F) FB	0.024	0.026	0.025
	(G) FC	0.034	0.035	0.035

[0181] In addition, the hydrolysis properties of each factor (samples A, B, and E to G) toward the Boc-Leu-Gly-Arg-pNA substrate in the presence of a high concentration of Et were examined. No activation by high concentrations of Et was observed in samples containing recombinant Pro-CE and recombinant factor B alone or in combination. Conversely, significant hydrolytic activity was observed in the recombinant factor C alone, as well as in the completely reconstruction system with recombinant factor C, recombinant factor B and recombinant Pro-CE. However, the hydrolysis activity in the full reconstruction system using recombinant Pro-CE, recombinant factor B, and recombinant factor C was significantly activated (by approximately three orders of magnitude) compared with the hydrolysis activity of recombinant factor C alone (FIG. 11).

[0182] These results demonstrated that the combination of recombinant factor C, recombinant factor B, and recombinant Pro-CE induces a cascade reaction dependent on the Et concentration, similarly to the case of each natural factor (natural LAL factor). Furthermore, it was confirmed that when reconstructing this cascade, coagulation factors from different horseshoe crab species were used, and the activity was expressed in a manner similar to that of the native LAL factor.

[0183] [Example 5]Study on the effect of metal salts on the activity of the Et reaction in the fully reconstructed system In the Et reaction in the fully reconstructed system (sample A) shown in Example 4, the change in the activity of the Et reaction when the amount of metal salt added was

changed was studied.

[0184] (A) Effect of magnesium sulfate (calcium chloride and sodium chloride not added)

(a) Study in concentration range of 0 to 100 mM

In the Et reaction of the complete reconstruction system in Example 4, the magnesium sulfate concentration, which is 64 mM in this Example, was changed between 0 and 100 mM, and the change in reaction activity was observed (during the reaction). The results are shown in Table 7 and FIG. 12. In this reaction, the Et solution was used in two systems: 0 ng/mL (control) and 100 ng/mL.

[0185] [Table 7]

Et concentration (ng/ml)	NaCl concentration (mM: during reaction)	Response value (mAbs/min)		
				Average value
0	0	0.21	— —	0.21
	6.25	0.22	— —	0.22
	12.5	0.21	— —	0.21
	25	0.21	— —	0.21
	50	0.20	— —	0.20
	100	0.19	— —	0.19
	200	0.14	— —	0.14
20	0	27.07	27.50	27.29
	6.25	25.83	25.79	25.81
	12.5	28.30	29.32	28.81
	25	28.18	28.65	28.42
	50	27.27	27.96	27.62
	100	21.79	21.46	21.63
	200	17.66	18.42	18.04

In light of the results shown in Table 7 and FIG. 12, in the completely reconstructed system of the method 1 of the present invention, the activity value significantly decreased with increasing concentration of magnesium sulfate added to the measurement system.

[0186] (b) Study in concentration range 0 to 10 mM

In the reaction system (a) of this Example above (Et concentrations were 0 ng/mL (control) and 20 ng/mL), the magnesium sulfate concentration was varied so as to be 0 to 10 mM during the reaction, and the change in activity after reconstruction was observed. The results are shown in

Table 8 and FIG. 13.

[0187] [Table 8]

Et concentration (ng/mL)	MgSO ₄ concentration (mM: during reaction)	Response value (mAbs/min)			Average value
0	0	0.11	—	—	0.11
	1	0.10	—	—	0.10
	2	0.08	—	—	0.08
	4	0.08	—	—	0.08
	6	0.09	—	—	0.09
	8	0.08	—	—	0.08
	10	0.09	—	—	0.09
20	0	24.03	23.96		24.00
	1	22.33	22.42		22.38
	2	21.53	22.88		22.21
	4	20.22	19.59		19.91
	6	18.70	18.40		18.55
	8	15.33	15.78		15.56
	10	14.44	14.57		14.51

The results shown in Table 8 and FIG. 13 indicate that in the complete reconstruction system of the method 1 of the present invention, the Et reaction was inhibited concentration-dependently even when the magnesium sulfate concentration was 10 mM or less.

[0188] These results demonstrated that in the Et reaction using this measurement system, the activity of each factor after reconstruction was well detected and maintained even without the addition of magnesium sulfate.

[0189] (B) Effect of calcium chloride (magnesium sulfate and sodium chloride not added)

In the Et reaction of the complete reconstruction system of Example 4 (Et was either not added (control) or 20 ng/mL), calcium chloride was added to reach a concentration of 0 to 5 mM during the reaction, and the change in activity after reconstruction was observed. The results are shown in Table 9 and FIG. 14.

[0190] [Table 9]

Et concentration (ng/mL)	CaCl ₂ concentration (mM: during reaction)	Response value (mAbs/min)			Average value
0	0	0.06	—	—	0.06
	0.5	0.03	—	—	0.03
	1	0.13	—	—	0.13
	2	0.36	—	—	0.36
	3	0.64	—	—	0.64
	4	0.73	—	—	0.73
	5	0.71	—	—	0.71
20	0	30.83	31.02		30.93
	0.5	21.66	22.79		22.23
	1	17.53	20.01		18.77
	2	14.09	14.60		14.35
	3	11.78	12.96		12.37
	4	9.88	10.04		9.96
	5	9.15	10.04		9.60

(CaCl₂ concentrations of 1 to 5 mM cause slight cloudiness)

The results in Table 9 and FIG. 14 confirmed that in the Et reaction of the full reconstruction system, the activity of each factor was well detected and maintained even without the addition of calcium chloride, as in the case of magnesium.

[0191] (C) Effect of sodium chloride (magnesium sulfate and calcium chloride not added)

In this test system, 80 mM Cl is present in the reaction buffer (Tris-Cl, pH = 8.0) during the reaction, but Na⁺ is not also present in this test system and is not included in the sodium chloride concentration.

[0192] In the Et reaction of the complete reconstruction system in Example 4 (Et was not added (control) and 20 ng/mL), the calcium chloride concentration added, which was 150 mM in this example, was changed between 0 and 2.5 M, namely, 0, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, and 2.5 (M), and the change in the reaction value was observed (during the reaction). The results are shown in Table 10 and FIG. 15.

[0193] [Table 10]

Et concentration (ng/mL)	NaCl concentration (mM: during reaction)	Response value (mAbs/min)			Average value
0	0	0.21	—	—	0.21
	6.25	0.22	—	—	0.22
	12.5	0.21	—	—	0.21
	25	0.21	—	—	0.21
	50	0.20	—	—	0.20
	100	0.19	—	—	0.19
	200	0.14	—	—	0.14
20	0	27.07	27.50		27.29
	6.25	25.83	25.79		25.81
	12.5	28.30	29.32		28.81
	25	28.18	28.65		28.42
	50	27.27	27.96		27.62
	100	21.79	21.46		21.63
	200	17.66	18.42		18.04

The results in Table 10 and FIG. 15 show that when the sodium chloride concentration during the reaction was between 0 and 50 mM, there was substantially no effect on the activity after reconstruction, but at higher concentrations, significant reaction inhibition was observed (approximately 30% decrease at 200 mM).

[0194] [Example 6] Examination of substrate specificity of Et reaction in full reconstruction system

The Et reaction in the full reconstruction system of Example 4 was compared using a synthetic chromogenic substrate, Boc-Val-Pro-Arg-pNA (Boc-VPR-pNA) (acetate) (hereinafter also referred to as Substrate 1), which is similar to the fluorescent synthetic substrate, Boc-Val-Pro-Arg-MCA, contained in the Et measurement reagent (PyroGene: Cambrex) containing recombinant factor C, with Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (Boc-LGR-pNA) (hereinafter also referred to as Substrate 2), which is optimal for the conventional LAL reaction.

[0195] The substrate concentrations during the Et reaction were both set at 0.3 mM for Substrate 1 and Substrate 2.

[0196] The results are shown in Table 11 and FIG. 16.

[0197] [Table 11]

Substrate	Et concentration (EU/mL)	Response value (mAbs/min)		
				Average value
Boc-LGR -pNA	0	0.10	0.09	0.10
	0.1	0.47	0.45	0.46
	1	3.87	3.76	3.82
	10	28.61	27.90	28.26
	100	50.71	52.37	51.54
	1000	70.48	70.23	70.36
Boc-VPR -pNA	0	0.11	0.09	0.10
	0.1	0.12	0.11	0.12
	1	0.12	0.14	0.13
	10	0.45	0.48	0.47
	100	3.54	3.34	3.44
	1000	15.46	15.30	15.38

From the results shown in Table 11 and FIG. 16, it was found that the Et activity of this system using the full reconstruction system was about 200 times higher with Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (substrate 2) than with Boc-Val-Pro-Arg-pNA (substrate 1).

[0198] In a separate test, the Et reaction was examined in a system containing only recombinant factor C (the substrate concentrations were set at 0.3 mM for both substrate 1 and substrate 2), and the reaction value when substrate 1 was used was approximately 1.6 times higher than the reaction value when substrate 2 was used.

[0199] This demonstrated that the endotoxin activity of the full reconstruction system showed a significantly higher reaction value than that of the recombinant factor C alone. A similar tendency was observed in (1→3)-β-D-glucan. In other words, it has become clear that the present invention makes it possible to detect and quantify endotoxin and (1→3)-β-D-glucan with high sensitivity and good reproducibility even in trace amounts.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

[0200] The present invention provides in vitro tools and methods for expressing large amounts of Pro-CE derived from horseshoe crab, and for efficiently and reproducibly detecting and measuring microbial somatic components. Furthermore, Pro-CE obtained by the present invention is provided as a major factor constituting a reaction system together with other recombinant factors involved in the LAL reaction. This method is expected to be permanently and widely used for the detection and quantification of Et and BG, safety evaluation of pharmaceuticals and medical

devices, serodiagnosis of sepsis and fungal infections, and the like, as a detection tool for microbial contamination in the environmental and food hygiene fields, as a research reagent, or the like.

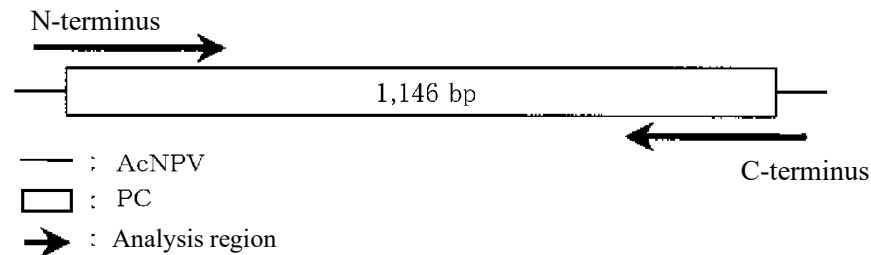
Scope of Patent Claims

- [1] A nucleic acid encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab.
- [2] The nucleic acid according to claim 1, wherein the horseshoe crab is selected from *Tachypleus tridentatus*, *Limulus • polyphemus*, *Tachypleus gigas*, and *Tachypleus • rotundicauda*.
- [3] The nucleic acid according to claim 1, wherein the nucleic acid encoding the pro-clotting enzyme derived from the horseshoe crab is selected from the following (A) to (C):
 - (A) DNA encoding a protein including the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4;
 - (B) DNA encoding "a protein including an amino acid sequence in which one or more amino acids in the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 have been deleted, substituted, inserted, or rearranged, and which has activity of a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab";
 - (C) RNA obtained by transcribing the DNA of (A) or (B) above.
- [4] The nucleic acid according to claim 1, wherein the nucleic acid encoding the pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab is selected from (a) to (c) below:
 - (a) DNA containing the base sequence shown by base sequence 1 to 1143 in SEQ ID NO: 3;
 - (b) DNA having, in the base sequence containing the base sequence shown by the base sequence 1 to 1143 in SEQ ID NO: 3, a mutation of a base that causes a deletion, substitution, insertion, or rearrangement of one or several amino acids in the amino acid sequence of a protein encoded by that base sequence, and the expressed protein having the activity of a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab;
 - (c) RNA obtained by transcribing the DNA of (a) or (b) above.
- [5] A virus carrying the nucleic acid according to any one of claims 1 to 4.
- [6] The virus according to claim 5, wherein the virus is a baculovirus.
- [7] The virus according to claim 6, wherein the baculovirus is a nuclear polyhedrosis virus.
- [8] A cell carrying the virus according to any one of claims 5 to 7.
- [9] The cell according to claim 8, wherein the cell is an insect-derived cell.
- [10] A method for producing a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab, comprising at least steps of growing the cell according to claim 8 or 9 and collecting a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab from the grown product.
- [11] A pro-clotting enzyme produced by the method according to claim 10.

- [12] A method for detecting an endotoxin, comprising: in a test sample for detecting endotoxin, causing the pro-clotting enzyme according to claim 11 and a "serine protease precursor expressing activity to convert a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with endotoxin" to both be present; and detecting endotoxin in the sample using the enzyme activity associated with the conversion of the pro-clotting enzyme to the clotting enzyme as an indicator.
- [13] The endotoxin detection method according to claim 12, wherein the "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with endotoxin" is a "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with activated factor C" and horseshoe crab-derived factor C and/or recombinant factor C.
- [14] The endotoxin detection method according to claim 13, wherein the "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with activated factor C" is horseshoe crab-derived factor B and/or recombinant factor B.
- [15] The endotoxin detection method according to any one of claims 12 to 14, wherein only the pro-clotting enzyme according to claim 11, recombinant factor C, and recombinant factor B are allowed to be present together as cascade reaction proteins.
- [16] An endotoxin detection kit for carrying out the detection method according to claim 12, comprising at least the pro-clotting enzyme according to claim 11 and a "serine protease precursor expressing activity to convert a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with endotoxin."
- [17] The endotoxin detection kit according to claim 16, wherein the "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with endotoxin" is a "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with activated factor C" and horseshoe crab-derived factor C and/or recombinant factor C.
- [18] The endotoxin detection kit according to claim 17, wherein the "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with activated factor C" is horseshoe crab-derived factor B and/or recombinant factor B.
- [19] The endotoxin detection kit according to any one of claims 16 to 18, wherein only the pro-clotting enzyme according to claim 11, recombinant factor C, and recombinant factor B are contained as components, as cascade reaction proteins.

- [20] A METHOD FOR DETECTING (1→3)-β-D-glucan, comprising: in a test sample for detecting (1→3)-β-D-glucan, causing the pro-clotting enzyme according to claim 11 and a "serine protease precursor expressing activity to convert a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with (1→3)-β-D-glucan" to both be present; and detecting (1→3)-β-D-glucan in the sample using the enzyme activity associated with the conversion of the pro-clotting enzyme to the clotting enzyme as an indicator.
- [21] The (1→3)-β-D-glucan detection method according to claim 20, wherein the "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with (1→3)-β-D-glucan" is horseshoe crab-derived factor G and/or recombinant factor G.
- [22] The (1→3)-β-D-glucan detection method according to claim 20 or 21, wherein only the pro-clotting enzyme according to claim 11 and recombinant factor G are allowed to be present together as cascade reaction proteins.
- [23] A (1→3)-β-D-glucan detection kit for carrying out the detection method according to claim 20, comprising at least the pro-clotting enzyme according to claim 11 and a "serine protease precursor expressing activity to convert a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with (1→3)-β-D-glucan."
- [24] The (1→3)-β-D-glucan detection kit according to claim 23, wherein the "serine protease precursor expressing activity of converting a pro-clotting enzyme into a clotting enzyme upon contact with (1→3)-β-D-glucan" is horseshoe crab-derived factor G and/or recombinant factor G.
- [25] The (1→3)-β-D-glucan detection kit according to claim 23 or 24, wherein only the pro-clotting enzyme according to claim 11 and recombinant factor G are included as components, as cascade reaction proteins.

[FIG. 1]



• N-terminus

```

TAATCGCGAT CTAGAATGTT GGTGAATAAC GTGTTTTAC TACTGTGTTT CCCACTCTTG
*****
ATGTT GGTGAATAAC GTGTTTTAC TACTGTGTTT CCCACTCTTG

ATGTCTGTGG TTAGATGCAG TACTCTCAGC AGACAGCGTA GACAGTTTGT TTTCCCTGAC
*****
ATGTCTGTGG TTAGATGCAG TACTCTCAGC AGACAGCGTA GACAGTTTGT TTTCCCTGAC

GAGGAAGAAC TTTGCTCAAA CCGATTTACT GAAGAAGGAA CATGCAAAA TGTCTTGGAT
*****
GAGGAAGAAC TTTGCTCAAA CCGATTTACT GAAGAAGGAA CATGCAAAA TGTCTTGGAT

TGTAGAATAC TTTTACAAA AAATGATTAT AATTTACTCA AAGAATCAAT ATGCGGCTTT
*****
TGTAGAATAC TTTTACAAA AAATGATTAT AATTTACTCA AAGAATCAAT ATGCGGCTTT

GAAGGCATAA CACCCAAAGT TTGTTGTCCG AAATCAAGCC ATGTAATTTG AAGTACACAG
*****
GAAGGCATAA CACCCAAAGT TTGTTGTCCG AAATCAAGCC ATGTAATTTG AAGTACACAG

```

• C-terminus

```

CNCNTNACAA GCGGTCTTAT TATTAAATCT AGTGATGGTG ATGGTGATGC ACCATATGTT
** *****
CT AGTGATGGTG ATGGTGATGC ACCATATGTT

CTGGAATCCA ATCTAAAAAC TCTGTCACCT TTGTGTAAAC CCCAGGAAAT CCAGGCAATG
*****
CTGGAATCCA ATCTAAAAAC TCTGTCACCT TTGTGTAAAC CCCAGGAAAT CCAGGCAATG

CGCATTTCTT TCCGAAAGAC ACAATTCCAA TGAGATAAAA CTCTCCGGTT TTAACAGGCA
*****
CGCATTTCTT TCCGAAAGAC ACAATTCCAA TGAGATAAAA CTCTCCGGTT TTAACAGGCA

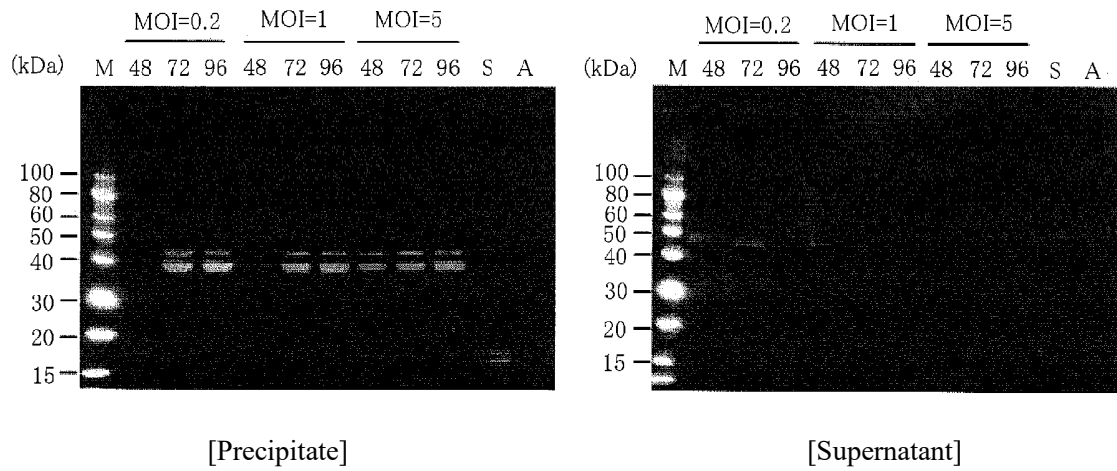
ACATCATTGG ACCTCCAGAA TCACCCTGGC AAGCATCCTT CCGCCCATCT GCAAAGCCAG
*****
ACATCATTGG ACCTCCAGAA TCACCCTGGC AAGCATCCTT CCGCCCATCT GCAAAGCCAG

CACACATATA CACGTTTGTA ATATTTAAAT CCTTCTCGTA GGCCTGTCTA CAGGCCTCGT
*****
CACACATATA CACGTTTGTA ATATTTAAAT CCTTCTCGTA GGCCTGTCTA CAGGCCTCGT

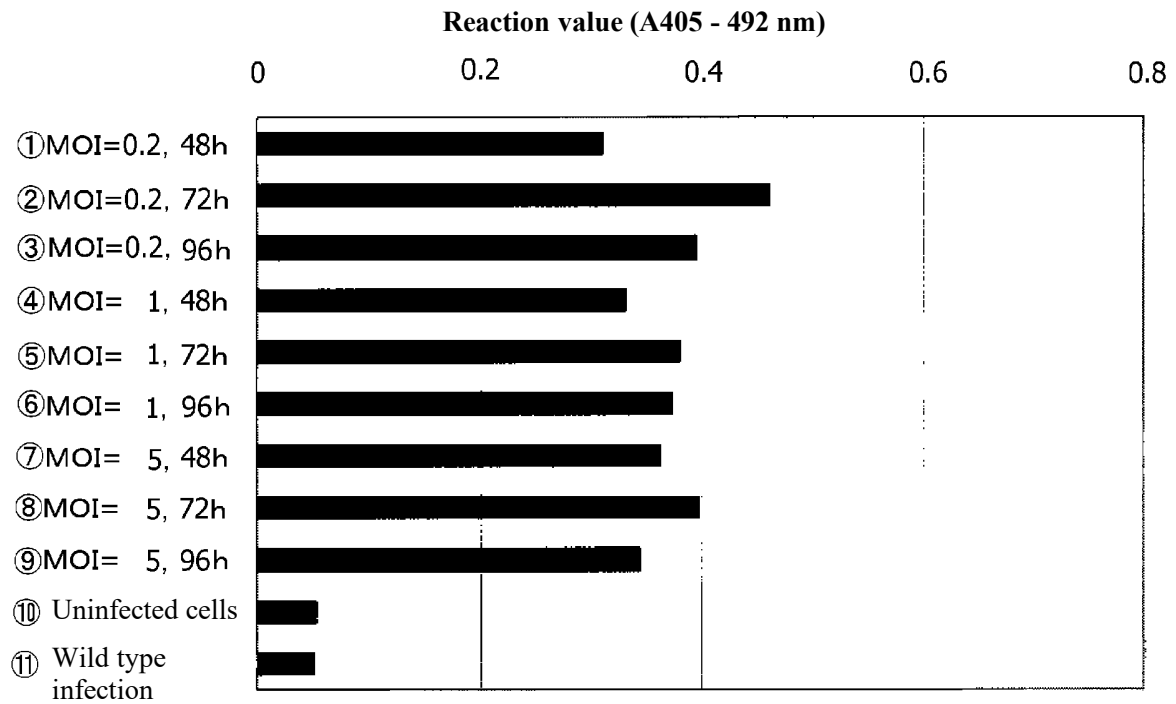
GTTCCCATAT TGCTAACTGT ACTTCTCTCA AACTGCACT AGATGGGCGG TTAATGCTG
*****
GTTCCCATAT TGCTAACTGT ACTTCTCTCA AACTGCACT AGATGGGCGG TTAATGCTG

```

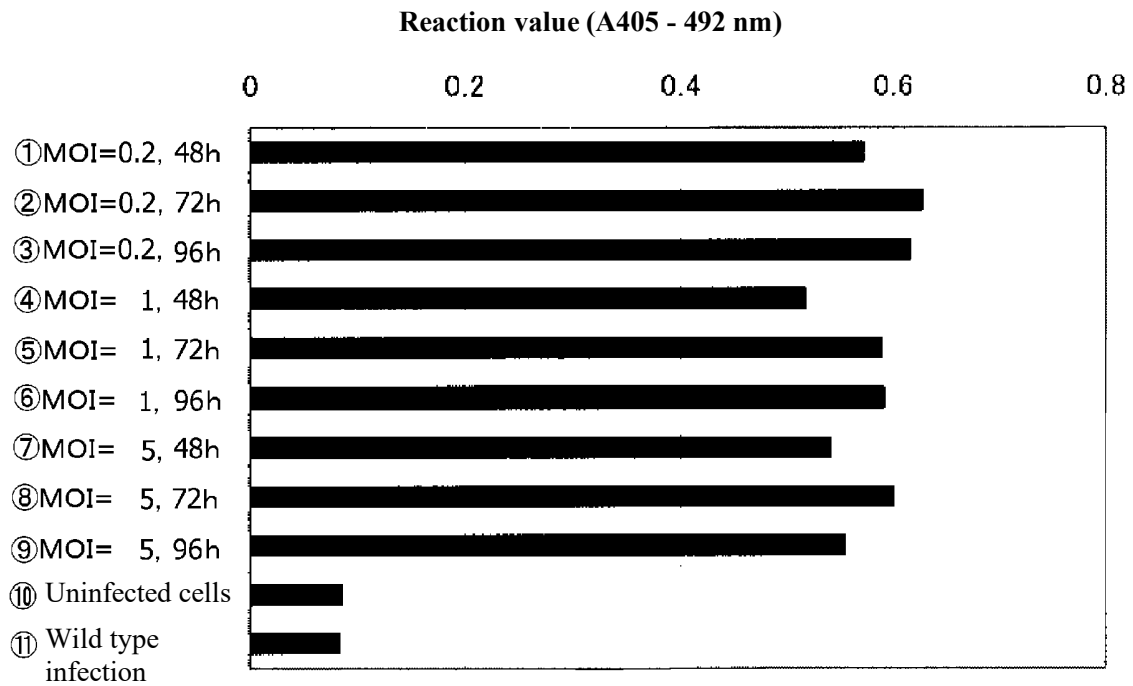
[FIG. 2]



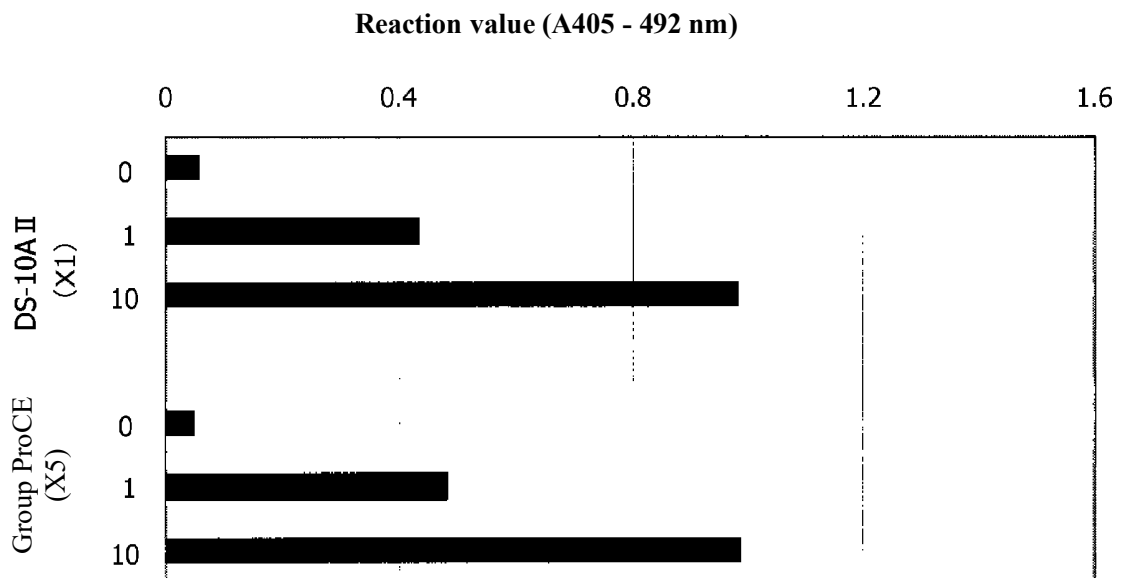
[FIG. 3]



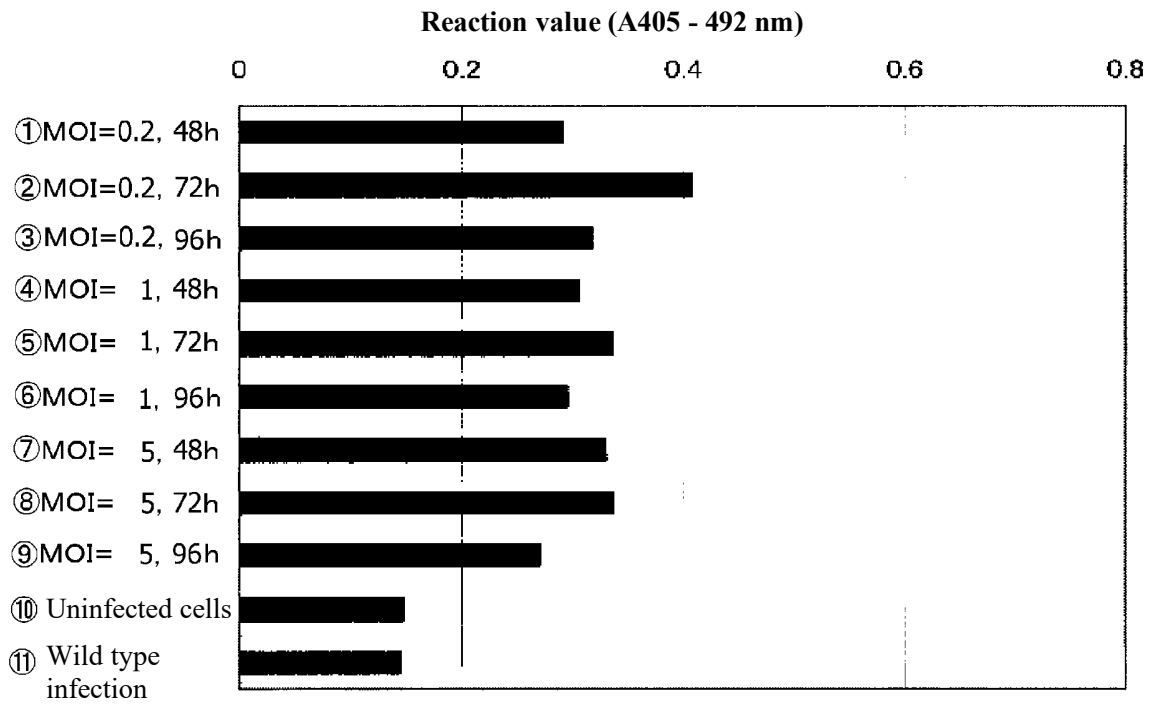
[FIG. 4]



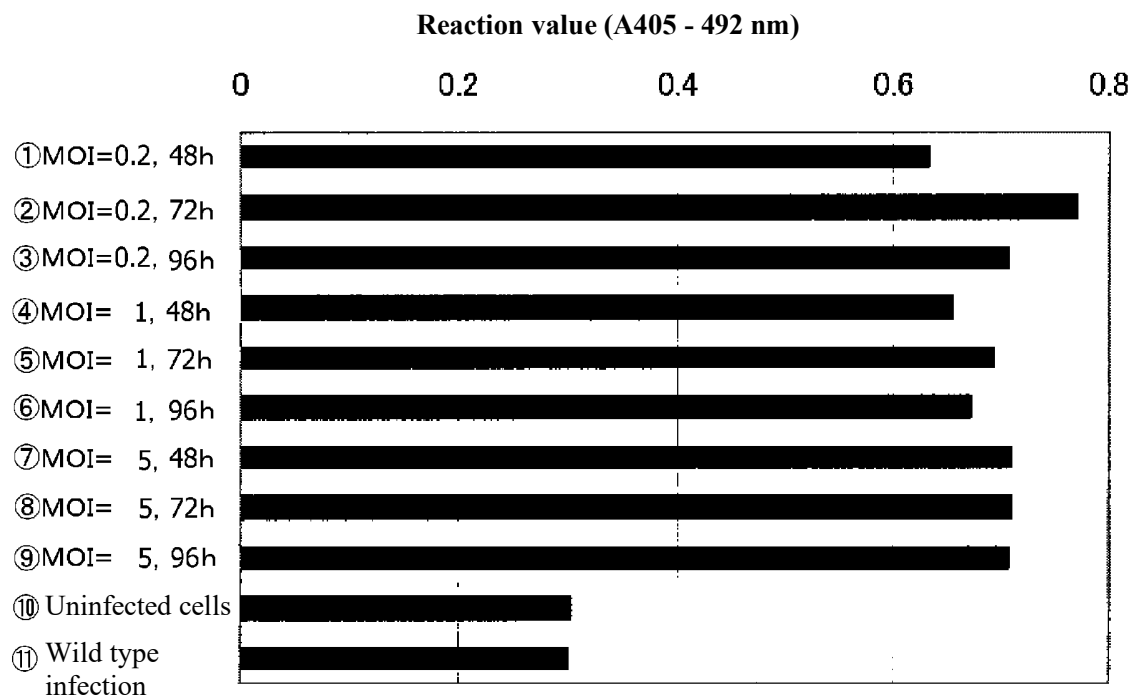
[FIG. 5]



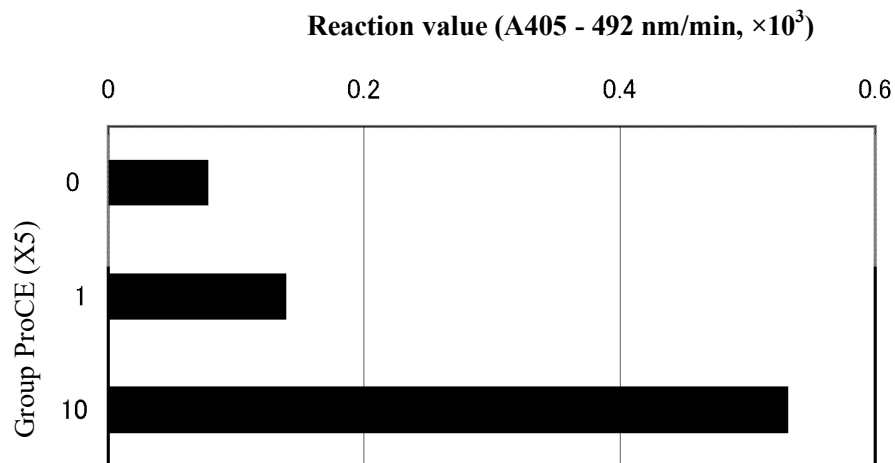
[FIG. 6]



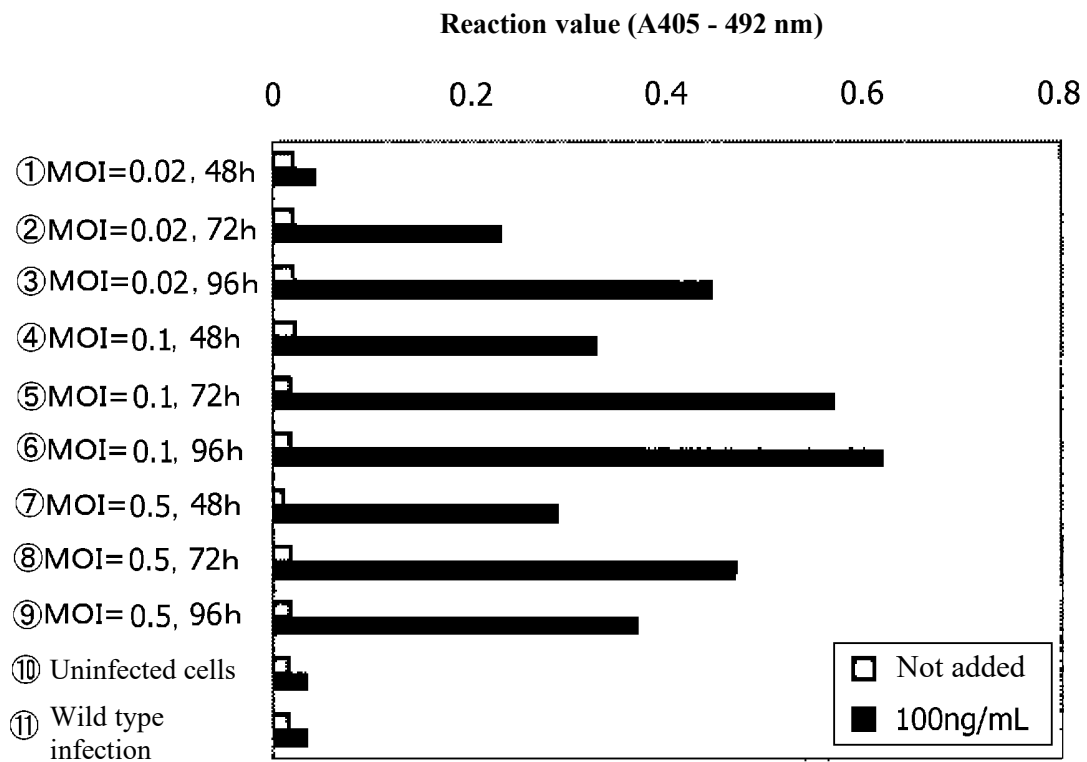
[FIG. 7]



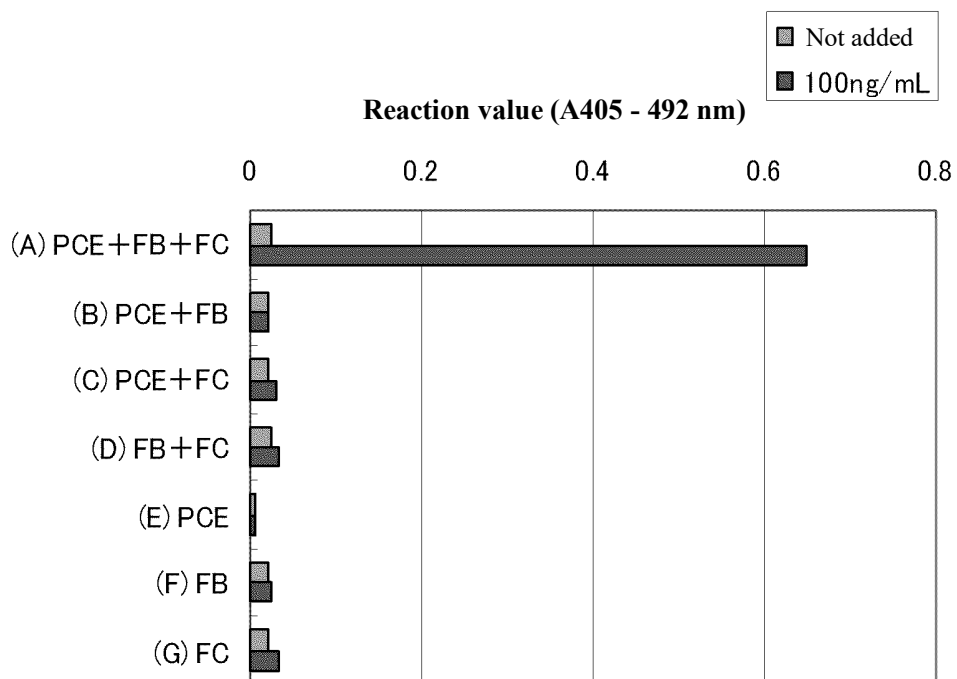
[FIG. 8]



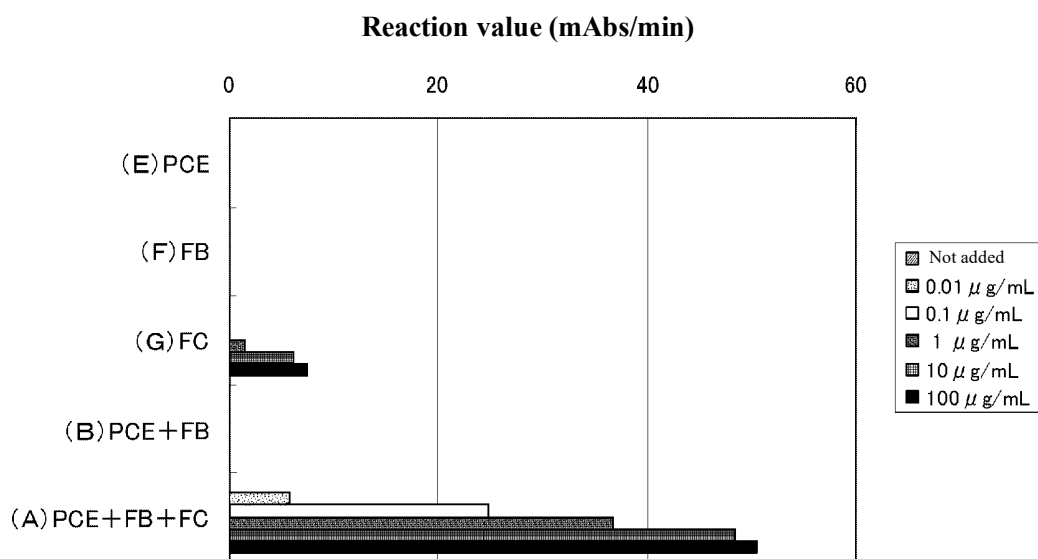
[FIG. 9]



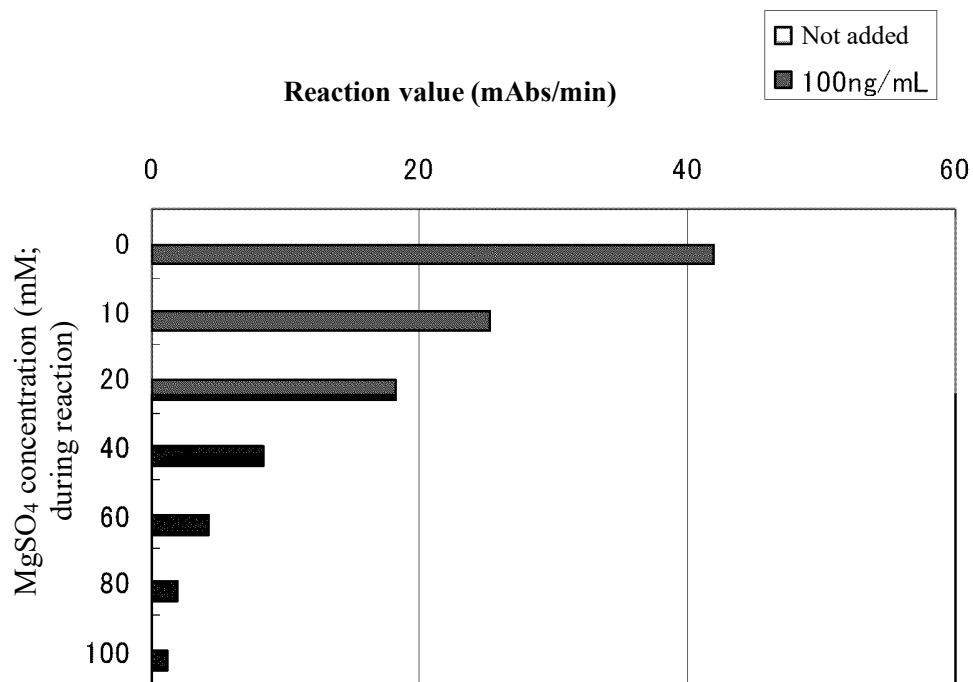
[FIG. 10]



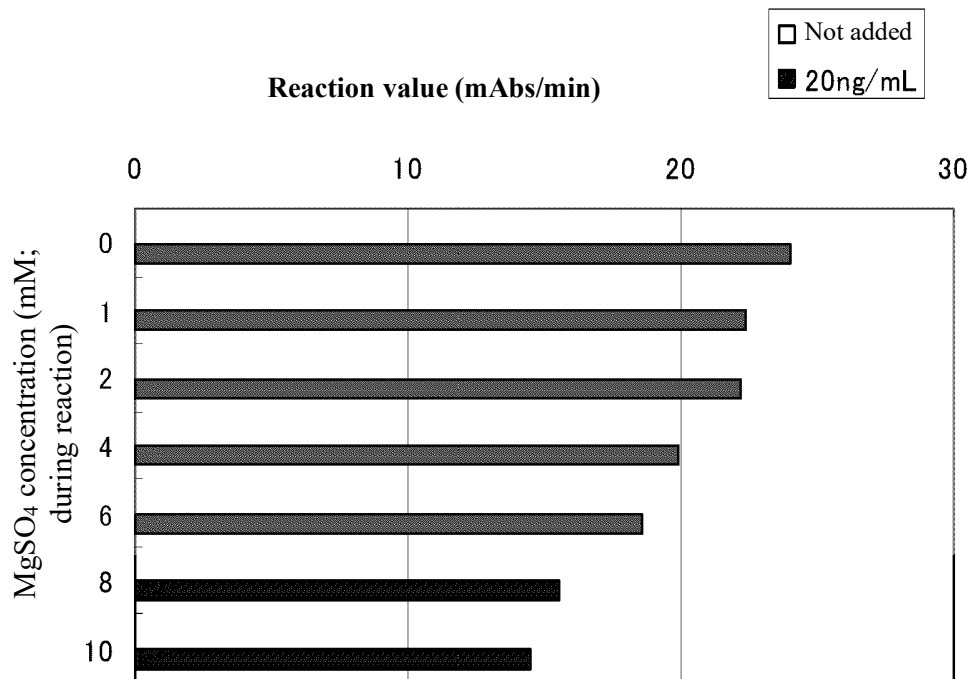
[FIG. 11]



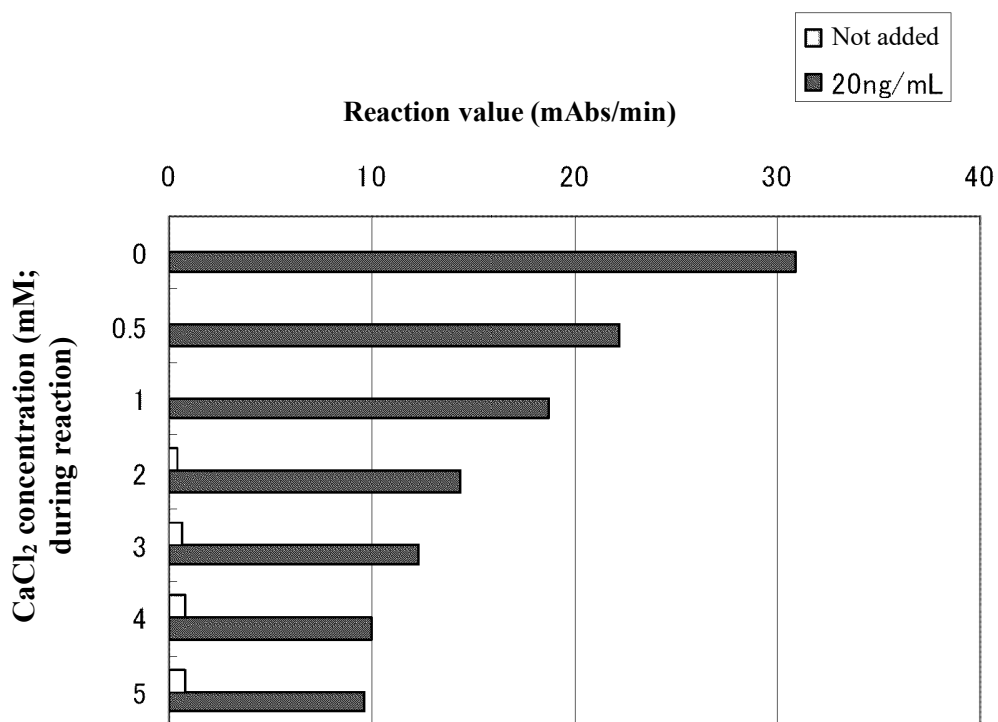
[FIG. 12]



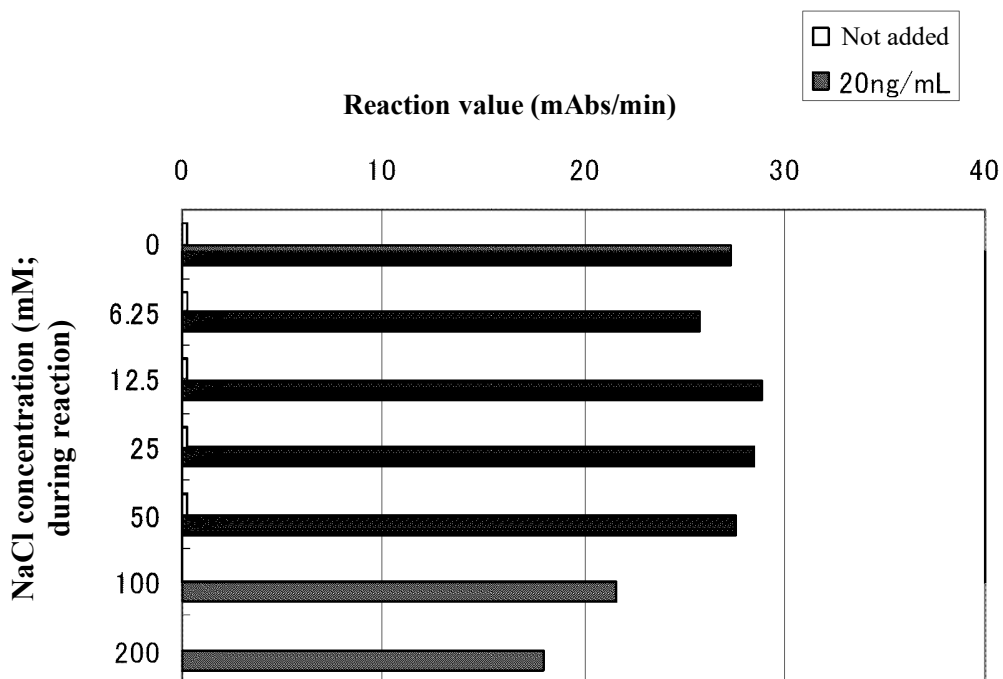
[FIG. 13]



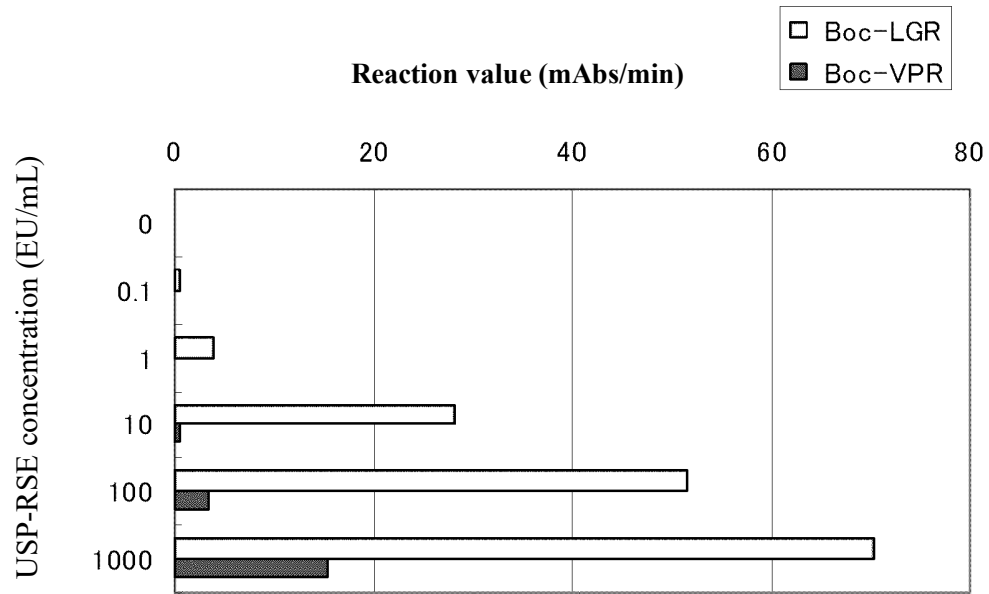
[FIG. 14]



[FIG.15]



[FIG. 16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N5/10, C12N7/00, C12N9/64, C12Q1/37

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

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

MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS(STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	MUTA, T. et al., "Proclotting enzyme from hoseshoe crab hemocytes", J. Biol. Chem., (1990), Vol.265, No.36, pp.22426-22433, full text (Particularly, Fig.1)	1-4 5-25
Y	WO 1999/15676 A1 (National University of Singapore), 01 April, 1999 (01.04.99), Full text (particularly, page 2, lines 13 to 20; examples 1 to 2, 5) & US 6645724 B1 & EP 1015609 A1	5-25



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
19 September, 2007 (19.09.07)

Date of mailing of the international search report
02 October, 2007 (02.10.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063606

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAMURA, T. et al., "Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes", Eur. J. Biochem., (1986), Vol.154, pp.511-521, full text (Particularly, page 516, 22nd line from the bottom to page 517, line 4, table 5, Fig.10)	12-19
Y	NAKAMURA, T. et al., "Purification and properties of intracellular clotting factor, factor B, from horseshoe crab (Tachypleus tridentatus) hemocytes", J. Biochem., (1986), Vol.99, pp.847-857, full text (Particularly, TABLE IV)	12-19
Y	MUTA, T. et al., "Purified hoseshoe crab factor G", J. Biol. Chem., (1995), Vol.270, No.2, pp.892-897, full text (Particularly, page 896, left column, lines 4 to 26, page 897, right column, lines 5 to 9, TABLE VI)	20-25
X	NAKAMURA, T. et al., "Intracellular proclotting enzyme in Limulus (Tachypleus tridentatus) hemocytes: Its purification and properties", J. Biochem., (1985), Vol.97, pp.1561-1574, full text (Particularly, Fig.6)	1-4,11
X	ROTH, R. I. and LEVIN, J., "Purification of Limulus polyphemus proclotting enzyme", J. Biol. Chem., (1992), Vol.267, No.33, pp.24097-24102, full text (Particularly, Fig.4)	1-4,11
P,Y	JP 2006-271384 A (Seikagaku Corp.), 12 October, 2006 (12.10.06), Full text & EP 1707574 A1 & US 2006/228779 A1	20-25
A	JP 2005-500520 A (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.), 06 January, 2005 (06.01.05), Full text & WO 2003/002976 A2 & EP 1409984 A2 & US 2003/054432 A1	1-25
A	MUTA, T. et al., "Hoseshoe crab coagulation factor B", J. Biol. Chem., (1993), Vol.268, No.28, pp.21384-21388, full text	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

B. FIELDS SEARCHED

10

C (continued). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Citation Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
--------------------	--	-----------------------

1	2000-01-01	100
---	------------	-----

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:



May 29, 2025

Certification

Welocalize Translations

TRANSLATORS' DECLARATION:

We, David Takata and Eric Vance, hereby declare:

That we possess advanced knowledge of the Japanese and English languages. The attached Japanese into English translation has been translated by us and to the best of our knowledge and belief, it is a true and accurate translation of PCT/JP2007/063606

A handwritten signature in black ink, appearing to read "David Takata", written over a horizontal line.

David Takata

Project Number: MLB_2505_P0066 (Bibliographic information, abstract, claims, specifications par. [0001]-[0114])

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Eric Vance", written over a horizontal line.

Eric Vance

Project Number: MLB_2505_P0066 (Specifications par. [0115]-[0200], claims, drawings)

15 W. 37th Street 4th Floor
New York, NY 10018
212.581.8870

(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
2008 年 1 月 10 日 (10.01.2008)

PCT

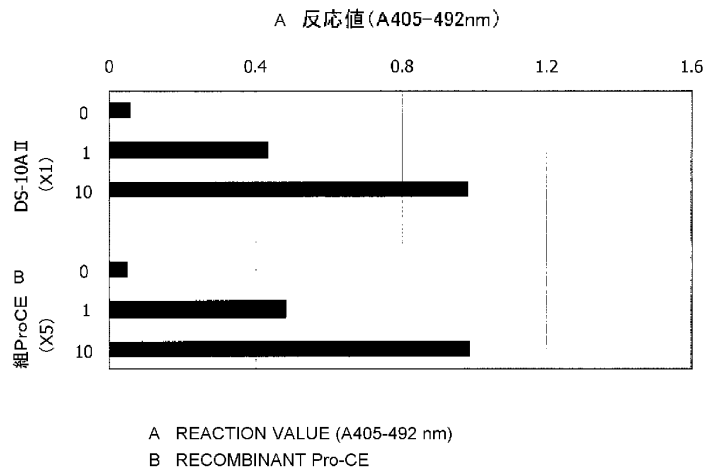
(10) 国際公開番号
WO 2008/004674 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/64 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/063606
- (22) 国際出願日: 2007 年 7 月 6 日 (06.07.2007)
- (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 2006-188523 2006 年 7 月 7 日 (07.07.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP];
- 〒1000005 東京都千代田区丸の内 1 丁目 6 - 1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 田村 弘志 (TAMURA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内 1 丁目 6 - 1 生化学工業株式会社内 Tokyo (JP). 高橋 昭治 (TAKAHASHI, Shoji) [JP/JP]; 〒2070021 東京都東大和市立野 3 丁目 1 2 5 3 生化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 志村 光春 (SHIMURA, Mitsuharu); 〒1500031 東京都渋谷区桜丘町 9 - 3 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

[続葉有]

(54) Title: PRO-CLOTTING ENZYME, AND METHOD FOR DETECTION OF ENDOTOXIN OR (1→3)- β -D-GLUCAN USING THE SAME

(54) 発明の名称: プロクロッティングエンザイム、並びに、これを用いたエンドトキシン又は (1→3) - β - D - グルカンの検出方法



(57) Abstract: Disclosed are: DNA encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab which enables the production of a uniform-quality reagent for the determination of (1→3)- β -D-glucan or an endotoxin in a stable manner, at low cost and in large quantity; a virus carrying the DNA; a cell carrying the virus; a method for the production of a pro-clotting enzyme using the cell; and a means for determination of (1→3)- β -D-glucan or an endotoxin by using the enzyme. DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:4 or the like is selected as a nucleic acid encoding a pro-clotting enzyme derived from a horseshoe crab. A recombinant form of the pro-clotting enzyme is produced based on the DNA. By using the resulting enzyme and utilizing a constituent element of the cascade system for a lysate derived from a horseshoe crab, it becomes possible to provide a sensitive detection method and a sensitive detection kit for (1→3)- β -D-glucan or an endotoxin.

(57) 要約: 本発明は一定の品質を有する (1→3) - β - D - グルカン及びエンドトキシンの測定試薬を安定的、安価かつ大量に製造しうる、カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムをコードする DNA、こ

[続葉有]



GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

れを保持するウイルス、これを保持する細胞及びこれを用いたプロクロッティングエンザイムの生産方法を提供し、さらに当該エンザイムを用いた(1→3)-β-D-グルカンとエンドトキシンの測定手段を提供することを目的とする。本発明では、カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムをコードする核酸として、例えば、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA等を選択し、これを基として組み換え体の当該プロクロッティングエンザイムを得て、当該エンザイムを用い、カプトガニのライゼートにおけるカスケード系の構成要素を活用した、(1→3)-β-D-グルカンとエンドトキシンに対する鋭敏な検出方法と検出キットを得ることができる。

明 細 書

プロクロッティングエンザイム、並びに、これを用いたエンドトキシン又は(1→3)- β -D-グルカンの検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムをコードする核酸、これを保持するウイルス、これを保持する細胞及びこれを用いたプロクロッティングエンザイムの生産方法、さらにはこれにより得られたプロクロッティングエンザイムを用いるEtやBGの検出方法及び検出キットに関する。

背景技術

[0002] カプトガニ・アメボサイト・ライセート(カプトガニ血球抽出液、以下、単に「ライセート」という。)を使用して、EtやBGを測定する方法が知られている。この方法は、EtやBGによってライセートが凝固することに基づいている。この凝固反応は、いくつかの凝固因子が段階的に活性化されることによって引き起こされる(特許文献1、非特許文献1)。

[0003] 例えば、BGがライセートに接触すると、ライセート中に存在するG因子が活性化されて活性型G因子が生成する。この活性型G因子により、ライセート中に存在するPro-CEを活性化してCEが生成する。このCEは、ライセート中に存在するコアキュローゲン分子中の特定の箇所を限定水解し、これによりコアギュリングルが生成してライセートが凝固する。CEは、合成基質(例えば、 t -ブトキシカルボニル-ロイシル-グリシル-アルギニン-pNA (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA))にも作用して、そのアミド結合を水解してpNAを遊離する。したがって、生成した発色物質(pNA)の吸光度を測定することにより、BGを定量することができる(特許文献1)。

[0004] Pro-CEは既にクローニングされているが(非特許文献2)、この核酸を用いて活性を保持するタンパク質(Pro-CE)を発現することは困難であった。

[0005] すなわち、Pro-CEはすでにクローニングされているが、本文献で開示された技術及び成果物は、目的とするタンパク質をコードするcDNAの標的クローンを得るための標準的な手法のみである。つまり、抗CE抗体を用いて、 λ gt11 cDNAライブラリ

ー(150万個のクローン)から23個のクローンを選別、pUC118/119ベクターにサブクローニングした後、塩基配列が決定されるに止まっている。実際の問題として当該作業だけでも膨大な労力が必要であり、セリンプロテアーゼ前駆体であるproCEの酵素活性[CEのプロテアーゼ(アミダーゼ)活性]の発現、及び、活性型B因子によるProCEの活性化あるいは、活性型C因子及びB因子の共存下で酵素活性の定量的な再現試験(再構成)を行うには至っていない。特定のタンパク質の塩基配列を決定する作業と、当該タンパク質を組み換え体として得て、これを用いる特定のアッセイ系を構築することは全く別次元の高度な技術的創造性が求められる事項である。

特許文献1:特開平08-122334号公報

特許文献2:特開2006-271384号公報

非特許文献1:J. Protein Chem., 5, p255-268 (1986)

非特許文献2:J. Biol. Chem., 265(36), P22426-22433 (1990)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、一定の品質を有するEtやBGの検出試薬を安定的に、安価に、かつ大量に製造しうる、カプトガニ由来のPro-CEをコードする核酸、これを保持するウイルス、これを保持する細胞、これを用いたPro-CEの生産方法、この生産方法により得られたPro-CEを用いたEtやBGの検出方法や検出キット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

- [0007] 本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、Pro-CEをコードするDNAを保持するウイルスが保持された細胞を用いることにより、Pro-CEの活性を有するタンパク質を製造することができることを見出し、これにより一定の品質を有するEt及びBGの検出試薬を安定的に、安価に、かつ大量に製造しうることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0008] 上記の背景技術の欄を含め、本出願書類の全てにおいて使用する略号は以下の通りである。

Pro-CE:プロクロッティングエンザイム(pro-clotting enzyme)

CE:クロッティングエンザイム(clotting enzyme)

AcNPV:Autographa californicaの核多角体病ウイルス

BG:(1→3)- β -D-グルカン

Et:エンドトキシン(「リポポリサッカライド」ともいう。)

HEPES:2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid)

HRP:ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)

MOI:多重感染度(multiplicity of infection)

NPV:核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus)

PBS:リン酸緩衝化生理食塩水(phosphate buffered saline)

PCR:ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction)

pNA:パラニトロアニリン

PVDF:ポリビニリデン・ジフルオリド(polyvinylidene difluoride)

SDS:ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE:ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

LAL:limulus amebocyte lysate

[0009] すなわち本発明は、カブトガニ由来のPro-CEをコードする核酸(以下、「本発明核酸」という。)を提供する。

[0010] ここにいうカブトガニは、タキプレウス・トリデンタツス、リムルス・ポリフェムス、タキプレウス・ギガス及びタキプレウス・ロツンディカウダ(カルシノスコルピウス・ロツンディカウダともいう。)の4種のいずれかから選択される。

[0011] またここにいう「カブトガニ由来のPro-CEをコードする核酸」は下記(A)～(C)から選ばれる核酸である事がより好ましい。

[0012] (A)配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA、
(B)「配列番号4に示されるアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、カブトガニ由来のPro-CEの活性を有するタンパク質」をコードするDNA、
(C)上記(A)又は(B)のDNAを転写することにより得られるRNA。

- [0013] またここにいう「カプトガニ由来のPro-CEをコードする核酸」は、下記(a)～(c)から選ばれる核酸であることが好ましい。
- [0014] (a)配列番号3における塩基配列1～1143で示される塩基配列を含むDNA、
(b)配列番号3における塩基配列1～1143で示される塩基配列を含む塩基配列において、その塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は転位させる塩基の変異を有し、かつ、発現されるタンパク質がカプトガニ由来のPro-CEの活性を有することを特徴とするDNA、
(c)上記(a)又は(b)のDNAを転写することにより得られるRNA。
- [0015] また本発明は、本発明核酸が保持されたウイルス(以下、「本発明ウイルス」という。)を提供する。
- [0016] ここにいう「ウイルス」はバキュロウイルスであることが好ましい。バキュロウイルスのなかでも、NPVが好ましく、AcNPVであることがより好ましい。
- [0017] また本発明は、本発明ウイルスを保持する細胞(以下、「本発明細胞」という。)を提供する。
- [0018] ここにいう「細胞」は特に限定はされず、上記の本発明ウイルスとの相性等を考慮して、自由に選択することができる。すなわち、大腸菌由来、バクテリア由来、酵母由来、昆虫由来である細胞等が例示される。上述のように、好適な本発明ウイルスがバキュロウイルスであり、当該ウイルスを選択する場合には、昆虫由来の細胞を選択することが好適である。
- [0019] また本発明は、本発明細胞を生育させ、その生育物からカプトガニ由来のPro-CEを採取するステップを少なくとも含む、カプトガニ由来のPro-CEの生産方法(以下、「本発明生産方法」という。)を提供する。
- [0020] また本発明は、本発明生産方法により製造されるPro-CE(以下、「本発明酵素」という。)を提供する。
- [0021] また本発明は、Etを検出するための被験試料において、本発明酵素及び「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を共存させ、本発明酵素からCEへの変換に伴う酵素活性を指標として、当該

試料中のEtの検出を行うことを特徴とする、Etの検出方法(以下、「本発明方法1」という。)を提供する。

[0022] 本発明方法1において、「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」は、「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」、及び、「カプトガニ由来のC因子及び／又は組換えC因子」であることが好ましい。

[0023] さらに、当該「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」、好ましくは、カプトガニ由来のB因子及び／又は組換えB因子である。

[0024] 上記C因子とB因子は、共に組換え型であることが好適であり、本発明方法1の最も好適な態様の一つとして、Etを検出するための被験試料において、本発明酵素と共に、C因子とB因子を共存させ、かつ、当該C因子とB因子の全てが組換え型である態様を例示することができる。C因子とB因子として、カプトガニ由来の天然型を用いて本発明方法1を行うことは、検出感度等の方法の有効性という観点からすると、十分に好適であるが、その一方で、天然のC因子とB因子の原料となるカプトガニの体液を採取するには、カプトガニを捕獲して、その永続的な生育に支障が出ない限度で体液を採取する必要がある。この捕獲と体液の採取の際にカプトガニに対して、ある程度のストレスを与えてしまうことは避けられず、環境破壊などに伴う個体数の減少を指摘する声もある。このように、本発明方法1を行うためのカスケード反応タンパク質の全てを組換え型とすることは、特に、貴重な生物資源を保護する観点から意義深く、生物保護、動物代替への貢献は計り知れない。

[0025] Etの検出系の構成要素として用いられるC因子又はB因子を組換え型因子とする場合、これらの因子をコードする遺伝子を組み込むベクターと、これを形質導入する宿主の選択は、特に限定されずに行うことも可能であるが、前述の組換え型のPro-CEと同様に、ベクターとして、ウイルス、好適には、バキュロウイルスが挙げられ、バキュロウイルスのなかでも、NPVが好ましく、AcNPVであることがより好ましい。そして、宿主としては、大腸菌由来、バクテリア由来、酵母由来、昆虫由来である細胞等が例示されるが、好適な本発明ウイルスがバキュロウイルスであり、当該ウイルスを選

択する場合には、昆虫由来の細胞を選択することが好適である。

- [0026] また、「本発明酵素からCEへの変換に伴う酵素活性を指標とする」とは、本発明酵素であるPro-CEからCEへの変換により誘導される酵素活性を、定量的又は定性的に検知し、これを被験試料中のEtの存在量又は存在の指標とすることを意味するものである。「Pro-CEからCEへの変換に伴う酵素活性を示す現象」としては、CEの存在による、コアギュリングの生成に伴うライセートの凝固（ゲル化や濁度の変化等により検出可能である）や、合成発色基質のアミド結合の水解により分離した発色色素の発色、等が挙げられる。とくに、合成発色基質を用いることにより、高感度で再現性の良い測定系を構築することができ、さらに、カプトガニ由来のライセートを用いる必要もなく、貴重な生物資源を保護する観点からもきわめて有益である。
- [0027] 合成発色基質としては、例えば、X-A-Y（式中、Xは保護基、Yは発色色素、Aはトリペプチドである）で示されるものを挙げるができる。CEの存在によりA-Y結合が切断されて、発色色素Yが発色し、Etの存在の定量的又は定性的な指標となる。ここで、保護基Xは、ペプチドの公知の保護基、例えば、t-ブトキシカルボニル基、ベンゾイル基等を挙げる事が可能であり、発色色素Yとしては、例えば、pNA、MC A（7-メトキシクマリン-4-酢酸）、DNP（2,4-ジニトロアニリン）、Dansyl 色素等が挙げられる。トリペプチドとしては、例えば、Leu-Gly-Arg（LGR：一文字表記）、及びIle-Glu-Gly-Arg（IEGR：一文字表記）、Val-Pro-Arg（VPR：一文字表記）等を例示することができる。
- [0028] 本発明方法1を定量的に行う場合には、予めEtの標準品を用いた、Et量と指標強度（発色色素Yによる発色の強度や、ライセートの凝固による濁度等）との関連を示す相関データ（典型的には検量線）の作成を行い、これを基準として被験試料内におけるEtを、検出された指標強度を基礎として検量的に確定することができる。
- [0029] 上記被験試料は特に限定されず、注射用水、医薬品、輸液、血液製剤、医療機器（医療用具）医薬部外品、化粧品などのほか、食品、飲料水、空気、河川、土壌などの環境試料、ネイティブな蛋白質や遺伝子組換えタンパク、核酸、酵素、糖質、電解質に加え、血液、体液、組織などの生体成分等を挙げる事ができる。
- [0030] また本発明は、本発明酵素及び「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換さ

せる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を少なくとも構成として含むことを特徴とする、本発明方法1を行うためのEtの検出キット(以下、「本発明キット1」という。)を提供する。

[0031] また本発明キット1は、「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」、及び、「カプトガニ由来のC因子及び／又は組換えC因子」であることが好ましい。

[0032] さらに、当該「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」は、好ましくは、カプトガニ由来のB因子及び／又は組換えB因子である。

[0033] また本発明キット1において、上記C因子とB因子は、共に組換え型であることが好適であり、本発明キット1の最も好適な態様の一つとして、その構成として含まれるC因子とB因子の全てが組換え型である態様を例示することができる。すなわち、本発明キット1に含まれるカスケード反応タンパク質として、本発明酵素、組換えC因子及び組換えB因子のみであることがより好ましい。

[0034] 本発明キット1には、本発明方法1を行うために用いる試薬等、例えば、上記の合成発色基質(X-A-Y)、緩衝液、希釈液、塩類、カプトガニのライセート等を、本発明キット1により行われる本発明方法1の態様に応じて選択して、キットの構成に含めることができる。

[0035] また本発明は、BGを検出するための被験試料において、本発明酵素及び「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を共存させ、本発明酵素からCEへの変換に伴う酵素活性を指標として、当該試料中のBGの検出を行うことを特徴とする、BGの検出方法(以下、「本発明方法2」という。)を提供する。

[0036] 本発明方法2において、「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のG因子及び／又は組換えG因子であることが好ましい。

[0037] 上記G因子は、組換え型であることが好適であり、本発明方法2の最も好適な態様

のーつとして、BGを検出するための被験試料において、本発明酵素と共に、G因子を共存させ、かつ、当該G因子の全てが組換え型である態様を例示することができる。

[0038] なお、本発明方法2において用いるG因子が組換え型であることが好適な理由は、本発明方法1において、C因子とB因子が組換え型であることが好適である理由と同様である。また、組換え型G因子を得る際のベクターとしてウイルス、好適には、バキエロウイルスが挙げられ、バキエロウイルスのなかでも、NPVが好ましく、AcNPVであることがより好ましい点は上述したC因子とB因子と同様である。さらに、宿主としては、大腸菌由来、バクテリア由来、酵母由来、昆虫由来である細胞等が例示されるが、好適な本発明ウイルスがバキエロウイルスであり、当該ウイルスを選択する場合には、昆虫由来の細胞を選択することが好適である点もまた同様の理由によるものである。

[0039] また、「本発明酵素からCEへの変換に伴う酵素活性を指標」とは、本発明酵素であるPro-CEからCEへの変換を示す現象を、定量的又は定性的に検出し、これを被験試料中のBGの存在量又は存在の指標とすることを意味するものであることは、本発明方法1と同様であり、「Pro-CEからCEへの変換を示す現象」の内容についても本発明方法1について開示したものと同様である。本発明方法2においても、合成発色基質X-A-Yを好適に用いることができる。

[0040] 本発明方法2を定量的に行う場合には、予めBGの標準品を用いた、BG量と指標強度(発色素Yによる発色の強度や、ライセートの凝固による濁度等)との関連を示す相関グラフ(典型的には検量線)の作成を行い、これを基準として被験試料内におけるBGを、検出された指標強度を基礎として検量的に確定することができる。

[0041] 上記被験試料は特に限定されず、注射用水、医薬品、輸液、血液製剤、医療機器(医療用具)、医薬部外品、化粧品などのほか、食品、飲料水、空気、河川、土壌などの環境試料、ネイライズな蛋白質や遺伝子組換えタンパク、核酸、酵素、糖質、電解質に加え、血液、体液、組織などの生体成分等を挙げることができる。

[0042] また本発明は、本発明酵素及び「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリレプロナーゼ前駆体」を少なくとも構成して含むことを特徴とする、本発明方法2を行うためのBGの検出キット(以下、「本発明キット2」という。

)を提供する。

- [0043] 本発明キット2は、「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のG因子及び／又は組換えG因子であることが好ましい。
- [0044] また本発明キット2は、上記G因子は組換え型であることが好適であり、本発明キット2の最も好適な態様の一つとして、その構成として含まれるG因子の全て(α 、 β サブユニット)が組換え型である態様を例示することができる。すなわち、本発明キット2に含まれるカスケード反応タンパク質として、本発明酵素、組換えG因子のみであることがより好ましい。
- [0045] 本発明キット2には、本発明方法2を行うために用いる試薬等、例えば、上記の合成発色基質(X-A-Y)、緩衝液、希釈液、塩類、カプトガニのライセート等を、本発明キット2により行われる本発明方法2の態様に応じて選択して、キットの構成に含めることができる。

発明の効果

- [0046] 本発明核酸は、これを用いることによって、一定の品質を有するPro-CEの安定的、効率的、大量かつ安価な生産に有用な本発明ウイルスが提供されることから極めて有用である。また本発明ウイルスは、これを用いることによって、一定の品質を有するPro-CEの安定的、効率的、大量かつ安価な生産に有用な本発明細胞が提供されることから極めて有用である。また本発明細胞は、これを用いることにより、Pro-CEの活性を保持した一定の品質のタンパク質を安定的、効率的、大量かつ安価に生産することができ、またこれによって本発明方法及び本発明キットが提供されることから極めて有用である。さらに、本発明方法及び本発明キットでは、貴重な生物資源であるカプトガニからライセートを調製せずに、EtやBGの検出、測定を行うことも可能であり、生物保護、動物代替、費用、精度、再現性等の点で、極めて有用な手法を提供するものである。

図面の簡単な説明

- [0047] [図1]Pro-CE組換えウイルスの目的配列N末端、C末端領域のシーケンス解析結果を示す図である。

- [図2]Pro-CE発現物のウエスタンブロッティングを示す図である。
- [図3]BG濃度1ng/mLにおける上清画分の反応性を示す図である。
- [図4]BG濃度10ng/mLにおける上清画分の反応性を示す図である。
- [図5]DS-3GII画分使用におけるBGの反応性を示す図である。
- [図6]Et濃度10ng/mLにおける上清画分の反応性を示す図である。
- [図7]Et濃度100ng/mLにおける上清画分の反応性を示す図である。
- [図8]組換えG因子(5倍希釈)用いたときのBGの反応性を示す図である。
- [図9]Et反応において用いるべき組換えB因子の検討の結果を示す図である。
- [図10]Et反応において、用いた各サンプルにおける当該反応の結果を示す図である。
- 。
- [図11]高濃度のEt存在下における各因子の、Boc-LGR-pNA基質に対する水解特性について調べた結果を示す図である。
- [図12]硫酸マグネシウム濃度の完全再構築系のEt反応に対する影響を0～100mMの間で検討した結果を示す図である。
- [図13]硫酸マグネシウム濃度の完全再構築系のEt反応に対する影響を0～10mMの間で検討した結果を示す図である。
- [図14]塩化カルシウム濃度の完全再構築系のEt反応に対する影響を0～5mMの間で検討した結果を示す図である。
- [図15]塩化ナトリウム濃度の完全再構築系のEt反応に対する影響を0～2.5Mの間で検討した結果を示す図である。
- [図16]Boc-LGR-pNAとBoc-VPR-pNAを基質として用いた場合の、完全再構成系のEt反応の差異を検討した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0048] 以下、本発明を実施するための最良の形態により本発明を説明する。

[0049] <1>本発明核酸

本発明核酸は、カプトガニ由来のPro-CEをコードする核酸である。本発明核酸における「カプトガニ由来のPro-CEをコードする核酸」は、カプトガニ由来のPro-CEがコードされている核酸である限りにおいて特に限定されない。例えば、配列番

号1に記載の塩基配列からなる核酸が例示される(配列番号2は、当該塩基配列に基づくアミノ酸配列のみの表示)が、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有する塩基配列からなる核酸も本発明核酸に包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

[0050] ここで用いる「核酸」は、DNAであっても、RNAであってもよく、当業者がその用途に合わせて選択することができる。例えば、より安定性を重視する場合にはDNAを選択することができる。

[0051] このような核酸としては、以下のカプトガニに由来するPro-CEがコードされている核酸が例示される；

タキプレウス・トリデンタツス、リムルス・ポリフェムス、タキプレウス・ギガス及びタキプレウス・ロツンディカウダ。

[0052] これらのなかでも、タキプレウス・トリデンタツスやリムルス・ポリフェムスに由来するPro-CEがコードされている核酸が好ましく、タキプレウス・トリデンタツスに由来するPro-CEがコードされている核酸がより好ましい。

[0053] また本発明核酸は、化学的に合成することもでき、遺伝子工学的に製造することもできる。遺伝子工学的に製造するには、例えばリムルス・ポリフェムス、タキプレウス・トリデンタツス、タキプレウス・ギガス、並びにタキプレウス・ロツンディカウダ等のカプトガニの血球(アメボサイト)から常法に従って調製したcDNAライブラリーを、例えば配列番号5又は6に記載の人工的に調製した塩基配列のプライマーを使用して、PCR法により目的のDNAを増幅させて調製することができる。PCR産物はゲル電気泳動などの分子量による分離手段を用いることにより容易に単離することができる。

[0054] またここにいう「カプトガニ由来のPro-CEをコードする核酸」は下記(A)～(C)の核酸であることがより好ましい。

[0055] (A)配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA、
(B)「配列番号4に示されるアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、カプトガニ由来のPro-CEの活性を有するタンパク質」をコードするDNA、
(C)上記(A)又は(B)のDNAを転写することにより得られるRNA。

[0056] ここにいう「配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA」は、タキプレウス・トリデンタツスに由来するPro-CEをコードするDNAである。

[0057] また天然に存在するタンパク質には、それをコードするDNAの多型や変異によりアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるほか、生成後のタンパク質の細胞内及び精製中の修飾反応などによってアミノ酸のリン酸化、糖鎖付加、脂質付加、プロリンの水酸化などの翻訳後修飾が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように「(A)のDNAによってコードされるタンパク質」に対して構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められない「(B)のDNAによってコードされるタンパク質」は、「(A)のDNAによってコードされるタンパク質」と実質的に同等なものといえる。人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2(IL-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている(Science,224,1431(1984))。このような「変異を有するタンパク質」は「部位特異的変異法」などの公知の方法により作成することができる。また、ある種のタンパク質は、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるタンパク質に存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、又は活性型タンパク質への転換に際して除去される。このようなタンパク質は、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には「(A)のDNAによってコードされるタンパク質」と実質的に同等の機能を有するタンパク質である。上記の「(B)のDNAによってコードされるタンパク質」は、このようなタンパク質を規定するものである。

[0058] なお本出願書類において「数個のアミノ酸」とは、当該タンパク質の活性が失われな
い範囲で変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば600アミノ酸残基を含むタン
パク質の場合には2～30程度、好ましくは2～15、より好ましくは2～8の数を示す
。

- [0059] (B)のDNAによってコードされるタンパク質は、カプトガニ由来のPro-CEの活性を有するものである。Pro-CEの活性は該Pro-CE、合成基質(例えばt-ブトキシカルボニル-ロイシル-グリシル-アルギニン-pNA(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA))、Et、C因子及びB因子を共存させることによりその反応性を調べることにより確認できる。具体的には該Pro-CEに活性があれば、該Pro-CE、合成基質、Et、C因子を共存させることによりpNAが遊離してくるので、このpNAの生成量を吸光度測定を行うことにより検知することができる。具体的な方法は実施例2を参照されたい。
- [0060] ここで用いる「共存」とは、共存するものが相互に接触する状態にある限りにおいて特に限定されない。具体的には、これらの該Pro-CE、合成基質、Et、C因子及びB因子と接触させる、又は該Pro-CE、合成基質、BG及びG因子とが相互に接触する状態であることをいう。
- [0061] またここで用いる「反応」は、該Pro-CEを合成基質と共存させ、該Pro-CEがCEに変換されることにより、合成基質に作用して、そのアミド結合を水解してpNAを遊離する反応のことをいう。
- [0062] また、前記(A)の「配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質」をコードするDNAとしては、配列番号3における塩基番号1～1143で示される塩基配列によって特定されるDNAが例示される。またGenBank accession No. D161657として登録されているDNAも使用することができる。
- [0063] また、前記(B)の「配列番号4に示されるアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、カプトガニ由来のPro-CEの活性を有するタンパク質」をコードするDNAとしては、例えば前記(A)のDNA若しくは当該DNAに相補的なDNA又はこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが例示される。
- [0064] ここで「ストリンジェントな条件」とは、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(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジェントな条件」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SS

C、50mMHEPES (pH7. 0)、10×Denhardt's solution、100 μg/mlサケ精子DNAを含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0. 1%SDS溶液、50℃下で0. 1×SSC、0. 1%SDS溶液で洗浄する条件が挙げられる。

- [0065] また、本発明核酸としては、マーカーペプチド等をコードするDNAがさらに連結されているものが好ましい。マーカーペプチドとしては、例えばプロテインA、インスリンシグナル配列、His-tag、FLAG、CBP(カルモジュリン結合タンパク質)、GST(グルタチオン S-トランスフェラーゼ)などが挙げられる。また本発明核酸には上記(A)又は(B)のDNAを転写することにより得られるRNAも含まれる。
- [0066] 本発明核酸は、例えば後述する「本発明ウイルス」の製造に使用することができ、ひいては本発明細胞等の生産に利用することができる。
- [0067] <2>本発明ウイルス
本発明ウイルスは、本発明核酸が保持された、ウイルスである。
- [0068] 本発明核酸についての説明は、前記の通りである。
- [0069] 本発明ウイルスにおいて「核酸が保持された」とは、その核酸が保持されている限りにおいて、他の塩基や核酸が更に保持されていることを妨げるものではない。したがって、例えばその核酸のみならず、更にマーカーペプチド等をコードする核酸等が保持されていてもよい。
- [0070] 例えば、「上記本発明核酸における(A)又は(B)のDNA」と「マーカーペプチド等をコードするDNA」とが連結されたDNAが保持されたベクターも、本発明ウイルスに包含される。保持される核酸をこのようにデザインすると、マーカーペプチド等との融合タンパク質として発現させることができ、その発現されたタンパク質の精製、検出、分析等を容易にすることができるというメリットがある。マーカーペプチドとしては、例えばプロテインA、インスリンシグナル配列、His-tag、FLAG、CBP(カルモジュリン結合タンパク質)、GST(グルタチオン S-トランスフェラーゼ)などが挙げられる。例えばプロテインAとの融合タンパク質は、IgGを結合させた固相を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって簡便に精製することができる。同様に、Hisタグとの融合タンパク質については磁性ニッケルを結合させた固相を用いることができ、FLAGとの融合タンパク質については抗FLAG抗体を結合させた固相を用いることができる。

。またインスリンシグナルとの融合タンパク質は、細胞外(培地等)に分泌されることから、細胞破碎等の抽出操作が不要となる。

[0071] 本発明ウイルスの製造方法も特に限定されない。本発明ウイルスを製造する方法の一例は、以下の通りである。より具体的な方法については、実施例を参照されたい。

[0072] まず、カプトガニ由来のPro-CEをコードする核酸を用意する。当該核酸として、前記(A)のDNAを用いる場合には、まず「配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質」をコードするDNAを用意する。また、前記(B)のDNAを用いる場合には、まず「配列番号4に示されるアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、カプトガニ由来のPro-CEの活性を有するタンパク質」をコードするDNAを用意する。このDNAは、それぞれ所定のタンパク質をコードするものである限りにおいて特に限定されない。これらのDNAとしては、遺伝暗号の縮重によって種々の異なった塩基配列を有するものが存在するが、いずれの塩基配列を有するDNAをも用いることができる。

[0073] このような核酸をウイルスに導入することにより、本発明ウイルスを製造することができる。

[0074] このような核酸が導入されるウイルスは、遺伝子のトランスフェクションに用いることができるウイルスである限りにおいて特に限定されない。なかでもバキュロウイルスが好ましい。その中でも、NPVが好ましい。NPVは、NPVとして分類されるウイルスである限りにおいて特に限定されず、例えばAcNPVや、カイコガNPV(Bombyx mori NPV、BmNPV)等を用いることができる。なかでも、AcNPVであることが好ましい。

[0075] ウイルスへの核酸の導入は、トランスファーベクターを用いた相同的組換えにより行うことができる。トランスファーベクターの種類も特に限定されず、例えばpPSC8(プロテインサイエンス社)、pFastBac(インビトロジェン社)、pVL1393(ファーマンジェン社)等が例示されるが、なかでもpPSC8が好ましい。これらのトランスファーベクターは、市販のものを用いることもできる。

[0076] トランスファーベクターを用いた相同的組換えの方法も特に限定されない。その具体的な一例は、実施例を参照されたい。

[0077] 前記(A)又は(B)のDNAが保持されたウイルスが製造されたか否かは、例えば、

製造されたウイルスの塩基配列を解析して、カプトガニ由来のPro-CEをコードするDNAが保持されているか否か、製造されたウイルスから発現されたタンパク質が、カプトガニ由来のPro-CEのアミノ酸配列を有しているか否か、製造されたウイルスから発現されたタンパク質がPro-CEの活性を有しているか否か、等を調べることによって確認することができる。

[0078] 本発明ウイルスは、例えば後述する「本発明細胞」の製造に使用することができ、ひいては本発明方法等に利用することができる。

[0079] <3> 本発明細胞

本発明細胞は、本発明ウイルスを保持する細胞である。

[0080] 「本発明ウイルス」についての説明は、前記の通りである。

[0081] ここで用いる「細胞」は、本発明ウイルスが感染しうる細胞であって、かつ、本発明ウイルスが保持しているカプトガニ由来のPro-CEが発現することができるものであれば良い。その一例として昆虫に由来する細胞を挙げることができる。また昆虫に由来する細胞として、Sf9細胞を例示することができる。

[0082] 本発明ウイルスを細胞に保持させる方法も特に限定されないが、例えばウイルスとしてNPVを採用した場合には、単に本発明ウイルスと細胞とを接触させるだけで、本発明ウイルスを当該細胞に感染させることができ、本発明ウイルスを当該細胞に保持させることができる。その具体的な方法の一例は、後述の実施例を参照されたい。

[0083] 本発明細胞は、カプトガニ由来のPro-CEを生産する能力を有することから、これらの性質を指標にして、本発明細胞を選択することができる。

[0084] 本発明細胞は、例えば後述する本発明生産方法等に利用することができる。

[0085] <4> 本発明生産方法

本発明生産方法は、本発明細胞を生育させ、その生育物からカプトガニ由来のPro-CEを採取する工程を少なくとも含む、カプトガニ由来のPro-CEの生産方法である。

[0086] 「本発明細胞」については、前記の通りである。

[0087] 本出願書類において「生育」とは、形質転換体である細胞の増殖や、形質転換体である細胞を組み込んだ動物・昆虫等の生育を含む概念である。また、ここでいう「生

育物」とは、形質転換体を生育させた後の培地(培養液の上清)、培養された細胞自体、細胞を組み込んだ動物・昆虫等からの分泌物・排出物等を包含する概念である。

- [0088] 生育の条件(培地や培養条件等)は、本発明細胞が生育し、カプトガニ由来のPro-CEが生産される限りにおいて特に限定されず、用いるベクターや細胞等に応じて適宜選択することができる。例えば、培養の温度としては20～40℃程度を例示することができる。
- [0089] 本発明細胞の生育時間も、用いる本発明細胞の量、所望するPro-CEの生産量、その他の生育条件等に応じて適宜調節することができる。
- [0090] 生育物からカプトガニ由来のPro-CEを採取する方法は、生育物の種類に応じて、一般的な方法のなかから当業者が適宜選択し採用することができる。
- [0091] 例えば、Pro-CEが、培地(培養液の上清)中に分泌される可溶性の形態で産生される場合には、培地を採取し、これをそのまま用いてもよい。またPro-CEが細胞質中に分泌される可溶性の形態、又は不溶性(膜結合性)の形態で産生される場合には、窒素キャビテーション装置を用いる方法、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、又はこれらの組み合わせ等の処理操作によってこれらのPro-CEを抽出することができ、その抽出物をそのままPro-CEとして用いてもよい。
- [0092] 本発明生産方法は、「本発明細胞を生育させ、その生育物からカプトガニ由来のPro-CEを採取する工程」を少なくとも含む限りにおいて、他の工程をさらに含んでもよい。例えば、採取されたPro-CEをさらに精製する工程を含んでもよい。精製は、不完全な精製(部分精製)であっても、完全な精製であってもよく、Pro-CEの使用目的等に応じて適宜選択することができる。
- [0093] 精製方法として具体的には、例えば硫酸アンモニウム(硫安)や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

- [0094] 生産されたタンパク質が、Pro-CEから構成されているか否か、カプトガニ由来のPro-CEの活性を保持しているか否か等は、採取されたタンパク質のアミノ酸配列、分子量、電気泳動結果、Pro-CEに特異的に反応する抗体を用いたウエスタンブロッティング等を分析することによって確認することができる。
- [0095] 本発明方法によれば、Pro-CEの活性を保持しているタンパク質を極めて効率的に生産することができる。
- [0096] <5>本発明酵素
本発明酵素は、本発明生産方法により製造されるPro-CEである。
- [0097] 「本発明生産方法」については、前記の通りである。
- [0098] 本発明酵素は、後述する本発明方法1等に用いることができる。
- [0099] <6>本発明方法1
本発明方法1は、Etを検出するための被験試料において、本発明酵素及び「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を共存させ、本発明酵素からCEへの変換に伴う酵素活性を指標として、当該試料中のEtの検出を行うことを特徴とする、Etの鋭敏な検出方法である。
- [0100] 「本発明酵素」については、前記の通りである。
- [0101] ここで用いる「共存」とは、共存するものが相互に接触する状態にある限りにおいて特に限定されない。
- [0102] 例えば、これら本発明酵素、Etを検出するための被験試料及び「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が相互に接触する状態にある限りにおいて特に限定されず、溶液中で共存させてもよく、Pro-CE若しくは、Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体を適当な固相に固着させ、これに前記「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」あるいはPro-CEを接触させてもよい。
- [0103] また本発明方法1において、「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」は、「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」、及び、「カ

プトガニ由来のC因子及び／又は組換えC因子」であることが好ましい。

[0104] さらに、当該「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」は、好ましくは、カプトガニ由来のB因子及び／又は組換えB因子である。

[0105] 本発明方法1で用いられる「C因子」及び「B因子」はその機能を保持している限りにおいて特に限定されない。例えば、4種のカプトガニ、タキプレウス・トリデンタツス、リムルス・ポリフェムス、タキプレウス・ギガス及びタキプレウス・ロツンディカウダのいずれかに由来するライセートをクロマトグラフィー等で精製することにより得た天然のC因子画分、B因子画分を用いることもでき、組換えC因子、B因子を用いることもできる。天然のC因子、B因子はデキストラン硫酸、スルホプロピル基等を結合した担体又は特異的な吸着担体等を用いてライセートを処理し、C因子、B因子の画分を得ることができる。また、組換え体に関しては、例えばタキプレウス・トリデンタツス及びタキプレウス・ロツンディカウダ由来の天然C因子に対するアミノ酸配列が公知であるので、これらの配列に基づいて適宜調製することができる。その方法は特に限定されるものではないが、例えば次の方法で得ることができる。C末端にHis-Tagを付加したC因子の目的塩基配列を合成し、トランスファーベクター（例えばpPSC8、タカラバイオ社製）に導入し、得られた発現ベクター（Factor C/pPSC8）DNAとバキュロウイルス（AcNPV）DNAをSf9細胞にコトランスフェクションし、培養上清から得られたウイルス液を純化、増幅することによって調製できる。また、B因子についても同様の方法で取得できる。C因子及びB因子共に、そのアミノ酸配列とこれをコードする遺伝子は既に知られており（C因子については市販されており、後述する実施例に当該市販品が開示されている。B因子について配列番号15は遺伝子の塩基配列を示し、配列番号16にアミノ酸配列を示した。）、これらの因子の組み換え体は当該配列情報に基づいて、上記の本発明酵素と実質的に同様の工程にて製造することができる。なお、遺伝暗号の縮重による、公知のC因子の塩基配列と配列番号15とは異なった塩基配列を有する塩基配列であって、それに基づき製造されるタンパク質がC因子又はB因子本来の作用を有する範囲で、本発明において用いることが可能なC因子とB因子であり得ることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

- [0106] 再構築系を作動させる条件としては、昆虫細胞を経る(反応の場として提供される)必要はなく、細胞フリーの系で、少なくともカスケード反応のトリガリング、セリンプロテアーゼ前駆体の逐次活性化及びCEの反応を円滑に進めるため、好ましくは一定の加温がなされることと、アルカリ土類金属(カルシウム、ストロンチウム、バリウム、ベリリウム、マグネシウム等)、アルカリ金属(リチウム、ナトリウム、カリウム等)に代表される金属イオンが共存することなどが挙げられる。
- [0107] 本発明方法1においては、カスケード反応タンパク質として、本発明酵素、組換えC因子及び組換えB因子のみを共存させることがより好ましい。
- [0108] 本明細書で用いる「カスケード反応」とは、次の反応の「1.」及び／又は「2.」のことをいう；
1. ライセートにEtが加わると、ライセート中に存在するC因子(Et感受性因子、分子量123, 000)が活性化され、生成した活性型C因子がB因子(分子量64, 000)の特定箇所を限定水解して活性型B因子を生成し、活性型B因子はPro-CE(分子量54, 000)を活性化してCEに変換し、CEはコアギュロゲン(凝固タンパク、分子量19, 723)のジスルフィド結合で架橋されたループ内の特定箇所を、すなわち…Arg¹⁸-Thr¹⁹…の間及び…Arg⁴⁶-Gly⁴⁷…の間を限定水解してH-Thr¹⁹…Arg⁴⁶-OHで表されるペプチドC(アミノ酸28残基)を遊離しつつ残余の部分がコアギュリンゲルに変換される、という一連の反応、
 2. ライセートにBGが加わると、ライセート中に存在するG因子(BG感受性因子)が活性化され、活性型G因子がPro-CEを活性化しCEに変換し、コアギュロゲンのジスルフィド結合で架橋されたループ内の特定箇所を限定水解し、コアギュリンゲルが生成される、という一連の反応。
- [0109] また「カスケード反応タンパク質」とは「カスケード反応」を構成するタンパク質のことをいう。セリンプロテアーゼ前駆体(C因子、B因子、G因子及びPro-CE)のことをいい、具体的には上記カスケード反応の「1.」ではC因子、B因子及びPro-CEのことをいい、「2.」ではG因子及びPro-CEのことをいう。
- [0110] また後述する実施例からもわかるように、本発明方法1に用いられる遺伝子工学的に得られた各凝固因子はそれぞれ由来が異なってもよい。例えば本発明酵素、

タキプレウス・ロツンディガウダ由来のC因子及びリムルス・ポリフェムス由来のB因子を共存させるステップを含むことによりEtを検出することもできる。

[0111] 本発明方法1は、後述する本発明キット1を用いることにより、簡便に行うことができる。

[0112] <7> 本発明キット1

また本発明キット1は、本発明酵素及び「Etと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を少なくとも構成として含むことを特徴とする、本発明方法1を行うためのEtの検出キットである。

[0113] 「本発明酵素」については、前記した通りである。

[0114] さらに、当該「活性型C因子と接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」は、好ましくは、カプトガニ由来のB因子及び／又は組換えB因子である。

[0115] また本発明キット1は、カスケード反応タンパク質として本発明酵素、組換えC因子及び組換えB因子のみで構成されていることが好ましい。

[0116] また、本発明キット1は、本発明方法1に基づいて当業者が適宜利用することができる。

[0117] 本発明キット1で用いられる、「C因子」、「B因子」及び「カスケード反応」等の用語の意味等は本発明方法1で用いられるものと同じある。また、前記したように、本発明方法1を行うために用いる試薬等、例えば、上記の合成発色基質(X-A-Y)、緩衝液、希釈液、塩類、カプトガニのライセート等を、本発明キット1により行われる本発明方法1の態様に応じて選択して、キットの構成に含めることができる。

[0118] <8> 本発明方法2

また本発明方法2は、BGを検出するための被験試料において、本発明酵素、及び「BGと接触することによりプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を共存させ、本発明酵素からクロッティングエンザイムへの変換に伴う酵素活性を指標として、当該試料中のBGの検出を行うことを特徴とする、BGの検出方法である。

[0119] 「本発明酵素」については、前記の通りである。

- [0120] 本発明方法2は、「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のG因子及び／又は組換えG因子であることが好ましい。
- [0121] 本発明方法2で用いることができる「G因子」とはその機能を保持している限りにおいて特に限定されない。例えば、4種のカプトガニのいずれかに由来するライセートをクロマトグラフィー等で精製することにより得た天然のG因子画分を用いることもでき、組換えG因子を用いることもできる。また組換え体のG因子に関しては、G因子が α サブユニットと β サブユニットから構成されているタンパク質であり、そのそれぞれに関して下記の手順で生産できる。
- [0122] まず、カプトガニ由来のG因子の α サブユニットをコードするDNAを用意する。当該DNAとしては例えばGenBank accession No.16622として登録されているDNAが例示される(配列番号17:アミノ酸配列は、配列番号18)。このDNAをBamHI/Hind I IIで処理し、目的の遺伝子配列が含まれるDNA断片を回収する。このサンプルを平滑末端化処理後、Nru Iで処理したpPSC8(トランスファーベクター)と混合しライゲーション反応を行う。その後ライゲーション産物でE.coli JM109を形質転換し、形質転換体を得る。目的サイズの断片が確認されたプラスミドを精製する。選択された発現ベクター(G因子- α /pPSC8)DNAとバキュロウイルス(AcNPV)DNAをSf9細胞にコトランスフェクトする。その後、この培養液の上清より得られたウイルス液を純化し増幅する。このウイルス液をexpres SF+細胞に感染させ、培養液を遠心分離することにより上清画分と沈殿画分が得られる。これらの画分よりG因子の α サブユニットを得ることができる。また、 β サブユニットに関しては、 α サブユニットを得る方法における、用いるDNAをカプトガニ由来のG因子の β ユニットをコードするDNAに置き換えることにより得ることができる。また、 β ユニットをコードするDNAとしては、例えばGenBank accession No.16623(配列番号19)として登録されている塩基配列やそのアミノ酸配列(配列番号20)も使用することができる。なお、遺伝暗号の縮重による、配列番号16と17とは異なった塩基配列を有する塩基配列であって、それに基づき製造されるタンパク質がG因子本来の作用を有する範囲で、本発明において用いることが可能なG因子であり得ることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

[0123] 再構築系を作動させる条件としては、昆虫細胞を経る(ある種の細胞が反応の場合として提供される)必要はなく、細胞フリーの系で、少なくともカスケーター反応のトリガー/グ、セリンプロテアーゼ前駆体の逐次活性化及びCEの反応を円滑に進めるため、好ましくは、一定の加温がなされること、アルカリ土類、アルカリ金属などの金属イオンが共存すること等が挙げられる。

[0124] また本発明方法2は、カスケーター反応タンパク質として本発明酵素及び組換えG因子のみを共存させることがより好ましい。また本発明方法1と同様に、本発明酵素と組換えG因子の由来が同一ものを用いてもよく、異なる由来の酵素を組み合わせてもよい。

[0125] 本発明方法2で用いられる「共存」、「カスケーター反応」、「カスケーター反応タンパク質」等の用語の意味は本発明方法1で用いられるものと同じである。

[0126] 本発明方法2は、後述の本発明キット2に利用することができる。

[0127] <9>本発明キット2

また本発明キット2は、本発明酵素及び「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を少なくとも構成として含むことを特徴とする、本発明方法2を行うためのBGの検出キットである。

[0128] 「本発明酵素」については、前記の通りである。

[0129] 本発明キット2では、「BGと接触することによりPro-CEをCEに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のG因子及び/又は組換えG因子であることが好ましい。

[0130] 当該G因子は組換え型であることがさらに好適であり、本発明キット2の最も好適な態様の一つとして、その構成として含まれるG因子の全てが組換え型である態様を例示することができる。すなわち、本発明キット2に含まれるカスケーター反応タンパク質として、本発明酵素、組換えG因子のみであることがより好ましい。

[0131] また、本発明キット2は、本発明方法2に基づいて当業者が適宜使用することができる。

[0132] 本発明キット2で用いられる「G因子」は本発明方法2と同じ意味で用いられる。また「カスケーター反応」、「カスケーター反応タンパク質」は本発明方法1で用いられるものと

同じ意味で用いる。また、前記したように、本発明方法2を行うために用いる試薬等、例えば、上記の合成発色基質(X-A-Y)、緩衝液、希釈液、塩類、カプトガニのライセート等を、本発明キット2により行われる本発明方法2の態様に応じて選択して、キットの構成に含めることができる。

実施例

[0133] 以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

[0134] [実施例1] 昆虫細胞を用いたPro-CEの発現

配列番号3で示されるcDNA(配列番号3の1～1125で示される塩基配列のC末端にHis-Tag配列を付加したもの)(九州大学大学院医学研究院分子細胞生化学分野(現在、東北大学大学院生命科学研究科)の牟田達史博士より恵与された。このcDNAは、前記の非特許文献2に記載の方法で調製したものである。)を、トランスファクター(pPSC8)に導入し、所定の塩基配列を有するクローンを選択した。選択された発現ベクター(PC/pPSC8)DNAとバキュロウイルス(AcNPV)DNAをSf9細胞にコトランスフェクションした。この培養液上清から得られたウイルス液を純化し、増幅した。バキュロウイルスに感染した細胞からウイルスDNAを抽出しシーケンス解析した。得られたウイルス液を昆虫細胞expresSF+(登録商標;プロテイン・サイエンス(Protein Science)社製)に感染させ、ウエスタンブロッティングによって発現物の解析を行った。以下、これらのステップの詳細を説明する。

[0135] 1. 発現ベクターの構築

0. 2mLのサンプルチューブにPC/pUC118(20ng/ μ g)1 μ L、2. 5mM dNTP 12 μ L、KOD buffer #15 μ L、25mM 塩化マグネシウム溶液 2 μ L、PC-F、PC-R(4pmol/ μ L)をそれぞれ 2. 5 μ L、KOD DNA polymerase (東洋紡社製)1 μ L及び滅菌した純水を24 μ Lを加え攪拌し、PCRを行った。目的の遺伝子が含まれる事を確認した後、TEバッファーで全量を16 μ Lとした。得られたPCR産物に100mM ATP 1 μ L、10 $\times$ Buffer 1 μ L及びT4Polynucleotide Kinase (タカラバイオ株式会社製)を加え37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。PCR産物を精製後、Sma Iで処理したpPSC12と混合し、ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物で E.coli JM109を形質転換し、形質転換体(PC/pPSC12)を得た。PC/pPSC12をXba I/Bgl IIで消

化し、目的遺伝子が含まれる断片を回収した。得られた断片を同酵素で処理したpPS C8と混合し、ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物で E.coli JM109を形質転換し、形質転換体を得た。目的サイズの断片が確認されたプラスミドを精製し、シーケンスを確認した。シーケンスの解析には、以下のプライマー、及びABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver.3(Applied Biosystems社)を使用し、解析には自動シーケンサーABI Prism 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems社)を使用した。プライマー配列を配列表の配列番号5～10に示す。

配列番号5:PC-F

配列番号6:PC-R

配列番号7:PSC2

配列番号8:PSC4

配列番号9:PC 453/472-F

配列番号10:PC 683/664-R

[0136] 目的遺伝子の挿入が確認されたクローンを、50 μ g/mLのアンピシリンを含む100mLのLB培地に植菌し、30℃で一晩培養した。増殖した菌体を回収し、Plasmid Midi Kit (QIAGEN社製)のマニュアルに従ってプラスミドを精製した。

[0137] 2. コトランスフェクション

25 cm²フラスコに播いた 1.0×10^6 個のSf9細胞に、Pro-CEをコードするcDNAを保持する発現ベクター2.3 μ g、Linear AcNPV DNA 85ng及びLIPOFECTIN Reagent ((インビトロジェン)Invitrogen社製) 5 μ Lを含む無血清Sf-900II培地 ((インビトロジェン)Invitrogen社製) 200 μ Lを加えた。28℃で6時間静置後、培養液量が5 mLとなるように無血清Sf-900II培地を加えた。さらに28℃で5日間培養後、培養上清を回収し、コトランスフェクション溶液とした。

[0138] 3. 組換えウイルスの純化

組換えウイルスの純化は、プラークアッセイ法で行った。具体的な方法は以下の通りである。

[0139] 2. 0×10^6 個のSf9細胞を直径60mmのシャーレに播き、28℃で1時間静置して細胞を底面に接着させた。前記のコトランスフェクション溶液を無血清Sf-900II培

地で 10^4 、 10^5 、 10^6 及び 10^7 倍に希釈し、これらの溶液をそれぞれ1mLずつ細胞に添加し、室温で1時間穏やかに震盪した。その後、シャーレ上清(ウイルス液)を取り除き、0.5% SeaKemGTG agarose (BMA社製) を含有する無血清Sf-900II培地 4mLを流し込んで、28°Cで8日間静置培養した。培地ごとに、多角体(Polyhedra)が存在しない感染昆虫細胞のプラーク6個を採取して、各々を1mLの無血清Sf-900II培地に懸濁させ、ウイルス原液とした。

[0140] 4. 組換えウイルスの増殖

次いで、組換えウイルスの増殖(組換えウイルス液の作製)を行った。具体的な方法は以下の通りである。

[0141] 25cm²フラスコに播いた 2.0×10^6 個のSf9細胞に上記ウイルス原液を0.5mLずつ添加して、28°Cで1時間静置培養した。培養液量が5mLとなるように無血清Sf-900II培地を加え、3日間静置培養し、第1代ウイルス液とした。

[0142] 75 cm²フラスコに播いた 6.0×10^6 個のSf9細胞に、第1代ウイルス液を全量加え、28°Cで1時間静置培養した。その後、無血清Sf-900II培地を10mL加えてさらに3日間培養した。培養後、培養上清を回収し、3,000×g、4°Cで15分間遠心し、上清と沈殿に分画した。この培養上清を回収し、第2代ウイルス液とした。

[0143] 5. 組換えウイルス液の作製

対数増殖期にある培養昆虫細胞expresSF+を、 1.5×10^6 個/mLとなるように無血清Sf-900II培地で希釈し、125 mL三角フラスコに50mL用意した。これに上記第2代ウイルス液を0.5mL加え、130rpm、28°Cで3日間震盪培養した。培養後、培養液を10,000×g、4°Cで30分間遠心し、上清と沈殿に分画した。この培養上清を回収し、第3代ウイルス液とした。

[0144] 6. 遺伝子挿入確認

その後、細胞へのDNAの挿入を確認した。具体的な方法は以下の通りである。

[0145] 上記のように回収した第3代ウイルス液を1.5mL マイクロチューブに0.7mL入れ、等量の20%ポリエチレングリコール、1M塩化ナトリウム溶液を加え、よく混合し、1時間静置した。その後、10,000×gで10分間遠心分離し、上清と沈殿に分画した。この沈殿を回収し、QIAamp DNA Miki Kit (QIAGEN社製)のマニュアルに従いBuffer

ALT 180 μ Lに溶解し、ウイルスDNAを抽出した。抽出されたウイルスDNAを鋳型とし、以下のプライマーを用いて、以下のようにPCRを行った。

配列番号11:PSC N3F

配列番号12:PSC N3R

[0146] 0. 2mLのサンプルチューブに上記のウイルスDNA 1 μ L、10 $\times$ PCR buffer for KOD -Plus- 5 μ L、2mM dNTPs 5 μ L、25mM 硫酸化マグネシウム溶液 2 μ L、PSC N3F及びPSC N3Rプライマー(4pmol/mL)にそれぞれ3. 75 μ L、KOD -Plus- DNA Polymerase(東洋紡社製) 1 μ L及び滅菌した純水19. 5 μ Lを添加してよく攪拌した。これを用いて、「94 $^{\circ}$ Cで1分間、58 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで4分間」のサイクルを30サイクル繰り返してPCRを行った。

[0147] 10 μ LのPCR産物をアガロースゲルで電気泳動し、増幅断片の長さを確認した。目的の長さの断片が得られたPCR産物を精製し、N末端側とC末端側のシークエンスを確認した。シークエンス解析は、前記「1.」と同様の試薬、機器を使用し、プライマーは以下のものを用いた。プライマーの配列を配列表の配列番号13及び14に示す。

配列番号13:PSCNF2

配列番号14:PSC3

[0148] 7. タイター測定

2. 0 $\times$ 10⁶個のSf9細胞を直径60mmのシャーレに播き、28 $^{\circ}$ Cで1時間静置して細胞を底面に定着させた後、培養液を除去した。第3代ウイルス液を無血清Sf-900II培地で10⁵、10⁶、10⁷及び10⁸倍に希釈し、これらの溶液をそれぞれ1mLずつシャーレに添加し、室温で1時間穏やかに震盪した。その後、シャーレの上清(ウイルス液)を取り除き、0. 5% SeaKemGTG agarose (BMA社製)を含有する無血清Sf-900II培地4mLを流し込んで、28 $^{\circ}$ Cで7日間静置培養した。培地ごとに、観察されたプラークの個数を数え、タイターを求めた。

[0149] 8. 発現試験

昆虫細胞 expresSF+を、1. 5 $\times$ 10⁶個/mLとなるように無血清Sf-900II培地で希釈し、250mL三角フラスコ9本に100mLずつ用意した。これらに、第3代ウイルス

液を各々MOI=0. 2、1、5となるように加え(各3本ずつ)130rpm、28℃でそれぞれ48、72、96時間震盪培養した。培養後、培養液を3,000×g、4℃で20分間遠心し、沈殿と上清に分画した。

[0150] 9. 発現物の確認

前記「8.」で回収したサンプルについて、定法に従いSDS-PAGEを行った。セミドライブロットティング法によりブロットティング膜にタンパク質を転写し以下の条件でウェスタンブロットティングを行った。なお、ウイルス中に組み込まれた「Pro-CEをコードするDNA」はHis-Tagが結合した形で発現されるようにデザインされている。

サンプルの処理: 上清については、Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD社製)を加え、99℃で3分間熱処理した。沈殿については、200 μL相当の沈殿に400 μLのPBSを加え懸濁後、Laemmli Sample Bufferを加え、99℃で3分間熱処理した。

サンプルアプライ量: 20 μL/レーンとした。

SDS-PAGEゲル濃度: 10~20%ゲル (BIO-RAD社製)を用いた。

SDS-PAGEゲル通電150V、CVとした。

ブロットティング膜: PVDFを用いた。

ブロットティング通電: 15V、CV、30分間とした。

一次抗体: Penta-His Antibody (QIAGEN社製)を用いた。

二次抗体: Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP Conjugate (BIO-RAD社製)を用いた。

検出: Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Miliopore社製)を用いた。

[0151] 10. 結果

組換えウイルスの目的配列のシーケンス解析結果を図1に示す。上段が解析結果を、下段にPro-CEの配列を示した。これからわかるように組換えウイルス中にPro-CEのN末端、C末端の配列が一致した。このことから、組換えウイルス中にPro-CEをコードするDNAの塩基配列の存在が確認された。

[0152] また、タイター測定の結果は、 0.7×10^8 pfu/mLであった。

[0153] 前記「9.」の結果、目的の位置(約40kDa付近)に、抗His-Tag抗体と反応するバンドが確認された(図2)。図2のMは分子量マーカー、48, 72, 96はそれぞれ48時

間感染区、72時間感染区、96時間感染区を示し、Sはウイルス非感染区、Aは野生型ウイルス感染区をそれぞれ示す。このことから、Pro-CEが発現されたことが確認された。

[0154] [実施例2]組換えPro-CEの活性確認

昆虫細胞 expresSF+を、 1.5×10^6 個/mLとなるように無血清Sf-900II培地で希釈し、250mL三角フラスコ9本に100mLずつ用意した。これらに、第3代ウイルス液を各々MOI=0.2、1、5となるように加え(各3本ずつ)130rpm、28℃でそれぞれ48、72、96時間震盪培養した。培養後、培養液を $3,000 \times g$ 、4℃で20分間遠心し、沈殿と上清に分画した。上清は凍結させて保存した。

[0155] サンプル1:MOI=0.2、48時間

サンプル2:MOI=0.2、72時間

サンプル3:MOI=0.2、96時間

サンプル4:MOI=1、48時間

サンプル5:MOI=1、72時間

サンプル6:MOI=1、96時間

サンプル7:MOI=5、48時間

サンプル8:MOI=5、72時間

サンプル9:MOI=5、96時間

サンプル10:ウイルス非感染細胞

サンプル11:野生型ウイルス感染細胞

[0156] (試薬)

DS-3GII画分:カブトガニ血球抽出液由来G因子[デキストラン硫酸Sephrose CL-6B(以下DS-Sephrose)による分画精製品]

DS-10AII画分:カブトガニ血球抽出液由来Pro-CE(DS-Sephrose精製品)

BG:CSBG(1495ng/vial)を蒸留水1.495 mLで溶解後、10倍段階希釈した。

[0157] 1.上清画分とG因子を用いたBG濃度1~100ng/mLにおける反応性

まず上記9サンプルの上清について、発現されたタンパク質がPro-CEの活性を保持しているか否かを調べた。

[0158] 培養後の上清画分を、150mM NaCl含有50mL Tris-HCl緩衝液(pH7.5)でそれぞれ10倍希釈した。この希釈物(それぞれ25 μ L)にDS-3GII画分(25 μ L)、デキストラン(終濃度2.4%)、Tris-HCl緩衝液(pH8.0)(終濃度80mM)、MgSO₄(終濃度64mM)、CaCl₂(終濃度0.4mM)、Na₂SO₄(終濃度8mM)、注射用蒸留水(15 μ L)、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA基質(前記の特許文献1参照)(終濃度0.24mM)及びBG溶液(0、1、10、100ng/mL)を25 μ L添加し、総容量を125 μ Lとして、Wellreader SK603内に移し、37°Cで2時間反応させた後、測定波長405nm(対照波長492nm)における吸光度を自動測定した。また陽性コントロールとして、DS-10AII画分を用いた。実験は二重測定で行い、吸光度の平均値を算出した。その結果を図3、4及び表1に示す。

[0159] [表1]

[Endpoint assay]

測定サンプル	サンプルNo.	反応値 (A405-492nm)		平均値
CSBG (0 ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	① MOI=0.2, 48h	0.029	0.029
		② MOI=0.2, 72h	0.029	0.030
		③ MOI=0.2, 96h	0.031	0.031
		④ MOI= 1, 48h	0.030	0.032
		⑤ MOI= 1, 72h	0.030	0.041
		⑥ MOI= 1, 96h	0.031	0.030
		⑦ MOI= 5, 48h	0.030	0.030
		⑧ MOI= 5, 72h	0.030	0.030
		⑨ MOI= 5, 96h	0.031	0.031
	(10倍希釈液)	⑩ 非感染細胞	0.029	0.030
	⑪ 野生型感染	0.030	0.029	0.030
DS-10A II 画分 (Control)		0.040	0.041	0.041
CSBG (1 ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	① MOI=0.2, 48h	0.308	0.317
		② MOI=0.2, 72h	0.462	0.461
		③ MOI=0.2, 96h	0.396	0.397
		④ MOI= 1, 48h	0.332	0.331
		⑤ MOI= 1, 72h	0.382	0.380
		⑥ MOI= 1, 96h	0.376	0.370
		⑦ MOI= 5, 48h	0.359	0.365
		⑧ MOI= 5, 72h	0.401	0.396
		⑨ MOI= 5, 96h	0.344	0.344
	(10倍希釈液)	⑩ 非感染細胞	0.052	0.053
	⑪ 野生型感染	0.051	0.052	0.052
DS-10A II 画分 (Control)		0.510	0.481	0.496
CSBG (10 ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	① MOI=0.2, 48h	0.567	0.578
		② MOI=0.2, 72h	0.612	0.642
		③ MOI=0.2, 96h	0.606	0.628
		④ MOI= 1, 48h	0.516	0.518
		⑤ MOI= 1, 72h	0.589	0.588
		⑥ MOI= 1, 96h	0.595	0.589
		⑦ MOI= 5, 48h	0.527	0.555
		⑧ MOI= 5, 72h	0.605	0.597
		⑨ MOI= 5, 96h	0.552	0.558
	(10倍希釈液)	⑩ 非感染細胞	0.084	0.084
	⑪ 野生型感染	0.083	0.083	0.083
DS-10A II 画分 (Control)		0.699	0.725	0.712

[0160] 表1に示されるように、サンプル1～9のウイルス感染細胞の培養上清中には当該酵素がほぼ同一量存在しており、全ての画分においてPro-CEの発現が確認された。特にサンプル2は強い活性を示していた。

[0161] また、表2及び図5は上記サンプル2の組換えPro-CEとDS-10AII画分の活性を比較したものである。

[0162] [表2]

【 Endpoint assay 】						
	測定サンプル	CSBG濃度	反応値		平均値	ΔA値
		(ng/mL)	(A405-492nm)			
DS-3GII (X1)	DS-10A II (X1)	0	0.056	0.060	0.058	—
		1	0.440	0.434	0.437	0.379
		10	0.969	1.002	0.986	0.928
	組ProCE (X5)	0	0.051	0.049	0.050	—
		1	0.480	0.487	0.484	0.434
		10	0.988	0.986	0.987	0.937

[0163] これらの結果より、当該組換えPro-CEはカプトガニ血球抽出液由来Pro-CEとほぼ同等の活性を有することを確認した。

[0164] 2. 上清画分とB及びC因子を用いたEt濃度1～100ng/mLにおける反応性

上記「1.」で得られた希釈物に当該組換えPro-CE及びPro-CEの溶出画分であるDS10-AII画分(陽性コントロール)と、さらにB及びC因子の代わりにB及びC因子の溶出画分であるDS-12BCI画分(25 μL)とEtを添加した。加えたEt濃度はそれぞれ0、1、10、100ng/mLとした。その他の反応混合物に関しては同様の濃度、量を加え、総容量を125 μLとしてWellreader SK603内に移し、37℃で30分間反応させた後、測定波長405nm(対照波長492nm)における吸光度を自動測定した。実験は二重測定で行い、吸光度の平均値を算出した。その結果を図6、7及び表3に示す。

[0165] [表3]

【Endpoint assay】					
測定サンプル		サンプルNo.	反応値		平均値
			(A405-492nm)		
Endotoxin(0 ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	①MOI=0.2, 48h	0.036	0.035	0.036
		②MOI=0.2, 72h	0.036	0.037	0.037
		③MOI=0.2, 96h	0.038	0.037	0.038
		④MOI=1, 48h	0.037	0.038	0.038
		⑤MOI=1, 72h	0.037	0.039	0.038
		⑥MOI=1, 96h	0.037	0.037	0.037
		⑦MOI=5, 48h	0.038	0.038	0.038
		⑧MOI=5, 72h	0.038	0.038	0.038
		⑨MOI=5, 96h	0.038	0.039	0.039
	(10倍希釈液)	⑩非感染細胞	0.036	0.038	0.037
		⑪野生型感染	0.039	0.038	0.039
DS-10A II 画分 (Control)			0.044	0.044	0.044
Endotoxin(1ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	①MOI=0.2, 48h	0.066	0.067	0.067
		②MOI=0.2, 72h	0.084	0.083	0.084
		③MOI=0.2, 96h	0.070	0.072	0.071
		④MOI=1, 48h	0.070	0.071	0.071
		⑤MOI=1, 72h	0.075	0.075	0.075
		⑥MOI=1, 96h	0.069	0.069	0.069
		⑦MOI=5, 48h	0.074	0.075	0.075
		⑧MOI=5, 72h	0.074	0.077	0.076
		⑨MOI=5, 96h	0.065	0.068	0.067
	(10倍希釈液)	⑩非感染細胞	0.049	0.054	0.052
		⑪野生型感染	0.051	0.053	0.052
DS-10A II 画分 (Control)			0.156	0.143	0.150

[Endpoint assay]					
測定サンプル		サンプルNo.	反応値	平均値	
			(A405-492nm)		
Endotoxin (10ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	①MOI=0.2, 48h	0.305	0.276	0.291
		②MOI=0.2, 72h	0.420	0.395	0.408
		③MOI=0.2, 96h	0.317	0.317	0.317
		④MOI=1, 48h	0.306	0.302	0.304
		⑤MOI=1, 72h	0.333	0.338	0.336
		⑥MOI=1, 96h	0.295	0.297	0.296
		⑦MOI=5, 48h	0.333	0.329	0.331
		⑧MOI=5, 72h	0.339	0.337	0.338
		⑨MOI=5, 96h	0.271	0.268	0.270
	(10倍希釈液)	⑩非感染細胞	0.146	0.147	0.147
		⑪野生型感染	0.146	0.145	0.146
DS-10A II 画分 (Control)			0.722	0.724	0.723
Endotoxin (100ng/mL)	組換え Pro-CE (10倍希釈液)	①MOI=0.2, 48h	0.634	0.634	0.634
		②MOI=0.2, 72h	0.738	0.806	0.771
		③MOI=0.2, 96h	0.727	0.686	0.707
		④MOI=1, 48h	0.682	0.650	0.656
		⑤MOI=1, 72h	0.707	0.678	0.693
		⑥MOI=1, 96h	0.677	0.666	0.672
		⑦MOI=5, 48h	0.729	0.693	0.711
		⑧MOI=5, 72h	0.720	0.699	0.710
		⑨MOI=5, 96h	0.710	0.704	0.707
	(10倍希釈液)	⑩非感染細胞	0.306	0.301	0.304
		⑪野生型感染	0.300	0.302	0.301
DS-10A II 画分 (Control)			0.733	0.757	0.745

[0166] 表3に示されるように、全てのサンプルのウイルス感染細胞の培養上清中に当該Pro-CEが存在していることが確認できた。特にサンプル2は強い活性を示していた。

[0167] [実施例3]組換えPro-CE及び組換えG因子による完全再構成系の活性発現の確認

(試薬)

(1)組換えG因子(α サブユニット: β サブユニット=2:1の培養上清)

(2)組換えPro-CE(実施例2のサンプル2の培養上清)

(3)BG:CSBG(1495 ng/vial)を蒸留水1.495mLで溶解後、10倍段階希釈した。

[0168] 特開2006-271384号公報(特許文献2)にて開示された方法に準じて製造された(1)、及び、(2)の培養上清を、150mM NaCl含有50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)でそれぞれ5倍希釈した。なお、ここでは、G因子の α サブユニットをコードするDNAとして、配列番号21に示す配列のものをを用いた。希釈した組換えG因子(25 μ L)に組換えPro-CE(25 μ L)、Tris-HCl緩衝液(pH8.0)(終濃度80mM)、MgSO₄(終濃度64mM)、CaCl₂(終濃度0.4mM)、Na₂SO₄(終濃度8mM)、注射用蒸留水(15 μ L)、デキストラン(終濃度2.4%)、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA基質(終濃度0.24mM)及びBG溶液(0、1、10ng/mL)を25 μ L添加し、総容量を125 μ Lとして、Wellreader SK603内に移し、常法通り反応させた後、測定波長405nm(対照波長492nm)における吸光度を自動測定した。実験は二重測定で行い、吸光度の平均値を算出した。その結果を表4及び図8に示す。

[0169] [表4]

[Endpoint assay]

[Enzyme assay]						
	測定サンプル	CSBG濃度	反応値		平均値 (×10 ³)	ΔA値 (×10 ³)
		(ng/mL)	(A405-492nm) (×10 ³)			
組換え Factor G (X5)	組ProCE (X5)	0	0.079	0.076	0.078	—
		1	0.140	0.138	0.139	0.061
		10	0.543	0.520	0.532	0.454

[0170] これらの結果から、組換えG因子と組換えPro-CEを組み合わせるによっても、ライセート中の各因子(天然のLAL因子)と同様にBGによる反応が濃度依存的に進行し、天然のLAL因子と同様に活性発現されていることが確認された。

[0171] [実施例4]組換えPro-CE、組換えB因子及び組換えC因子を用いた完全再構成系によるEt反応の確認

B因子のC末端側にHis-Tag配列を付加したB因子の発現目的塩基配列を合成し、トランスファーベクター(pPSC8)に導入した。得られた発現ベクター(FactorB/pPSC8) DNAとバキュロウィルス(AcNPV) DNAをSf9細胞にコトランスフェクションし、この培養液上清から得られたウィルス液を純化、増幅した。ウィルス液からウィルスDNAを抽出し、塩基配列の解析を行い、組込み遺伝子のN末端及びC末端、それぞれの配列を確認した。得られた組換えウィルスを100mL培養液相当のexpresSF+細胞へMOI=0.02、0.1及び0.5で感染させ、48、72及び96時間後に培養上清及び沈殿を回収した。回収した発現物は、抗His-Tag抗体を用いたウェスタンブロットティングにより発現の確認を行った。さらに、本因子と組換えC因子(PyroGene、ケンブレックス社製)ならびに組換えProCEの共存下で、Et(0、0.01、0.1、1、10、100 μ g/ml)を添加、37℃、1時間反応させ、pro-CEの合成基質(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) 水解能により、ProCEの活性化(CEの生成)を確認した。

[0172] 実施例1と同様の実験を行い組換えB因子の活性を確認後、Et反応性について検討したところ、MOI=0.1、96時間の条件のものが最もEt反応性が高かったことから、C系のカスケードの再構築にはこの条件のものをを用いた(表5、図9)。

[0173] [表5]

[Endpoint assay]					
測定サンプル		サンプルNo.	反応値		平均値
			(A405-492nm)		
Endotoxin (0 ng/mL)	組換え Factor B (5倍希釈液)	①MOI=0.02, 48h	0.022	---	0.022
		②MOI=0.02, 72h	0.022	---	0.022
		③MOI=0.02, 96h	0.022	---	0.022
		④MOI= 0.1, 48h	0.023	---	0.023
		⑤MOI= 0.1, 72h	0.018	---	0.018
		⑥MOI= 0.1, 96h	0.018	---	0.018
		⑦MOI= 0.5, 48h	0.010	---	0.010
		⑧MOI= 0.5, 72h	0.019	---	0.019
		⑨MOI= 0.5, 96h	0.018	---	0.018
	(5倍希釈液)	⑩非感染細胞	0.016	---	0.016
		⑪野生型感染	0.016	---	0.016
Endotoxin (10ng/mL)	組換え Factor B (5倍希釈液)	①MOI=0.02, 48h	0.044	0.043	0.044
		②MOI=0.02, 72h	0.232	0.230	0.231
		③MOI=0.02, 96h	0.440	0.451	0.446
		④MOI= 0.1, 48h	0.340	0.318	0.329
		⑤MOI= 0.1, 72h	0.568	0.572	0.570
		⑥MOI= 0.1, 96h	0.617	0.622	0.620
		⑦MOI= 0.5, 48h	0.300	0.276	0.288
		⑧MOI= 0.5, 72h	0.478	0.462	0.470
		⑨MOI= 0.5, 96h	0.368	0.369	0.369
	(5倍希釈液)	⑩非感染細胞	0.034	0.033	0.034
		⑪野生型感染	0.035	0.034	0.035

[0174] また、異なるカプトガニ由来の各因子を組み合わせた場合にもカスケード反応が進むかどうかを確認するため、組換えC因子には、市販のPyroGene(ケンブレックス社製)の構成品である組換えC因子(タキプレウス・ロツンディガウダ由来)を用いた。

[0175] (試薬)

- (1)組換えB因子(MOI=0.1、96時間の培養上清)
- (2)組換えPro-CE(実施例2のサンプル2の培養上清)
- (3)組換えC因子(商品名 PyroGene、原液で使用)
- (4)Et:E. coli O111:B4由来(シグマ社製)を蒸留水にて1mg/mLに調製後、10倍段階希釈した。

[0176] また、実験結果がカスケードを再構成した結果得られたものであることを確認するために、以下のような組み合わせのサンプルを作成し検証した。

[0177] サンプルA:組換えPro-CE、組換えB因子及び組換えC因子

サンプルB:組換えPro-CE、組換えB因子及び蒸留水

サンプルC:組換えPro-CE、組換えC因子及び蒸留水

サンプルD:組換えB因子、組換えC因子及び蒸留水

サンプルE:組換えPro-CE及び蒸留水

サンプルF:組換えB因子及び蒸留水

サンプルG:組換えC因子及び蒸留水

[0178] また、それぞれのサンプルには、上記(1)及び(2)の培養上清を、150mM NaClを含有する氷冷した50mL Tris-HCl緩衝液(pH7.5)でそれぞれ5倍希釈ものを用い、全液量が60 μ Lとなるように調製した。

[0179] それぞれのサンプルに、Tris-HCl緩衝液(pH8.0)(終濃度80mM)、 MgSO_4 (終濃度64mM)、 CaCl_2 (終濃度0.4mM)、 Na_2SO_4 (終濃度8mM)、デキストラン(終濃度2.4%)、注射用蒸留水(15 μ L)、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA基質(終濃度0.24mM)及びEt溶液(0、100ng/mL)を25 μ L添加し、総容量を125 μ Lとして、Wellreader SK603内に移し、37°Cで10時間反応させた後、測定波長405nm(対照波長492nm)における吸光度を測定した。実験は二重測定で行い、吸光度の平均値を算出した。その結果を表6及び図10に示す。

[0180] [表6]

Et濃度 (ng/mL)	再構成系		反応値 (A405-492nm) ： 平均値	
0	(A)PCE+FB+FC	0.024	0.022	0.023
	(B)PCE+FB	0.023	0.022	0.023
	(C)PCE+FC	0.020	0.020	0.020
	(D)FB+FC	0.024	0.025	0.025
	(E)PCE	0.009	0.006	0.008
	(F)FB	0.022	0.022	0.022
	(G)FC	0.022	0.023	0.023
	(A)PCE+FB+FC	0.652	0.645	0.649
	(B)PCE+FB	0.022	0.023	0.023
	(C)PCE+FC	0.029	0.030	0.030
100	(D)FB+FC	0.032	0.034	0.033
	(E)PCE	0.006	0.006	0.006
	(F)FB	0.024	0.026	0.025
	(G)FC	0.034	0.035	0.035
	(A)PCE+FB+FC	0.652	0.645	0.649
	(B)PCE+FB	0.022	0.023	0.023
	(C)PCE+FC	0.029	0.030	0.030

[0181] また、高濃度のEt存在下における各因子 (サンプルA、B及びE～G) のBoc-Leu-

Gly-Arg-pNA基質に対する水解特性について調べた。組換えPro-CE及び組換えB因子それぞれ単独又は共存させたサンプルにおいては高濃度のEtによる活性化が見られなかった。一方組換えC因子単独のもの、並びに組換えC因子、組換えB因子及び組換えPro-CEによる完全再構成系において顕著な水解活性が認められた。ただし、組換えPro-CE、組換えB因子及び組換えC因子による完全再構成系における水解活性は、組換えC因子単独での水解活性と比較して著しい活性化(およそ3桁の違い)が誘導された(図11)。

[0182] これらの結果より、組換えC因子、組換えB因子及び組換えPro-CEを組み合わせることにより、天然の各因子(天然のLAL因子)と同様にEtの濃度依存的にカスケーブ反応が進むことが判明した。また、このカスケードを再構築する際にカプトガニ種が異なる凝固因子を用いても、天然のLAL因子と同様に活性発現されていることが確認された。

[0183] [実施例5] 完全再構成系のEt反応の活性に対する金属塩の影響についての検討
実施例4に示した完全再構築系 (サンプルA) のEt反応において、金属塩の添加

量を変化させた場合のEt反応の活性の変化について検討した。

[0184] (A) 硫酸マグネシウムの影響(塩化カルシウムと塩化ナトリウムは未添加)

(a) 0～100mMの濃度範囲における検討

実施例4の完全再構築系のEt反応において、当該実施例では64mMである硫酸マグネシウムの濃度を、0～100mMの間で変化させて、反応活性の変化を観察した(反応時)。その結果を、表7と図12に示す。なお、本反応で、Et溶液は、0ng/mL(対照)と100ng/mLの2種類の系にて行った。

[0185] [表7]

Et 濃度 (ng/ml)	NaCl 濃度 (mM : 反応時)	反応値 (mAbs/min)		
				平均値
0	0	0.21	— —	0.21
	6.25	0.22	— —	0.22
	12.5	0.21	— —	0.21
	25	0.21	— —	0.21
	50	0.20	— —	0.20
	100	0.19	— —	0.19
	200	0.14	— —	0.14
20	0	27.07	27.50	27.29
	6.25	25.83	25.79	25.81
	12.5	28.30	29.32	28.81
	25	28.18	28.65	28.42
	50	27.27	27.96	27.62
	100	21.79	21.46	21.63
	200	17.66	18.42	18.04

表7と図12に示す結果により、本発明方法1の完全再構築系では、本測定系に添加した硫酸マグネシウムの濃度上昇に伴い、活性値が有意に減少した。

[0186] (b) 0～10mMの濃度範囲における検討

上記本実施例の(a)の反応系において(Et濃度は、0ng/mL(対照)と20ng/mL)、硫酸マグネシウムの濃度を、反応時に0～10mMになるように変化させて、再構成後

の活性変化を観察した。その結果を、表8と図13に示す。

[0187] [表8]

Et 濃度 (ng/mL)	MgSO ₄ 濃度 (mM : 反応時)	反応値 (mAbs/min)		平均値
0	0	0.11	— —	0.11
	1	0.10	— —	0.10
	2	0.08	— —	0.08
	4	0.08	— —	0.08
	6	0.09	— —	0.09
	8	0.08	— —	0.08
	10	0.09	— —	0.09
20	0	24.03	23.96	24.00
	1	22.33	22.42	22.38
	2	21.53	22.88	22.21
	4	20.22	19.59	19.91
	6	18.70	18.40	18.55
	8	15.33	15.78	15.56
	10	14.44	14.57	14.51

表8と図13に示す結果により、本発明方法1の完全再構築系では、硫酸マグネシウムの濃度が10mM以下であっても濃度依存的に、Et反応の抑制を認めた。

[0188] これらの結果より、本測定系によるEt反応においては、硫酸マグネシウムを添加しなくても各因子の再構成後の活性は良好に検出、維持されることが判明した。

[0189] (B) 塩化カルシウムの影響(硫酸マグネシウムと塩化ナトリウムは未添加)

実施例4の完全再構築系のEt反応において(Etは、無添加(対照)と20ng/mL)、塩化カルシウム濃度を、反応時に0～5mMになるように添加し、再構成後の活性変化を観察した。その結果を、表9と図14に示す。

[0190] [表9]

Et 濃度 (ng/mL)	CaCl ₂ 濃度 (mM : 反応時)	反応値 (mAbs/min)			平均値
0	0	0.06	—	—	0.06
	0.5	0.03	—	—	0.03
	1	0.13	—	—	0.13
	2	0.36	—	—	0.36
	3	0.64	—	—	0.64
	4	0.73	—	—	0.73
	5	0.71	—	—	0.71
20	0	30.83	31.02		30.93
	0.5	21.66	22.79		22.23
	1	17.53	20.01		18.77
	2	14.09	14.60		14.35
	3	11.78	12.96		12.37
	4	9.88	10.04		9.96
	5	9.15	10.04		9.60

(CaCl₂ 濃度 1～5mM では軽微白濁)

表9と図14の結果により、完全再構成系のEt反応においては、塩化カルシウムを添加しなくても、マグネシウムと同様に各因子の活性は良好に検出、維持されることが確認された。

[0191] (C) 塩化ナトリウムの影響 (硫酸マグネシウムと塩化カルシウムは未添加)

本試験系において、反応緩衝液 (Tris-Cl, pH=8.0) 中のCl⁻が、反応時に80mM存在することになるが、本試験系においては、Na⁺は共存せず、塩化ナトリウム濃度としては算入付加されない。

[0192] 実施例4の完全再構築系のEt反応において (Etは、無添加 (対照) と20ng/mL)、当該実施例では、150mM添加されていた塩化カルシウム濃度を、0、0.078、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5 (M) と、0～2.5Mの間で変化させて、反応値の変化を観察した (反応時)。その結果を、表10と図15に示す。

[0193] [表10]

Et 濃度 (ng/mL)	NaCl 濃度 (mM : 反応時)	反応値 (mAbs/min)		平均値
0	0	0.21	— —	0.21
	6.25	0.22	— —	0.22
	12.5	0.21	— —	0.21
	25	0.21	— —	0.21
	50	0.20	— —	0.20
	100	0.19	— —	0.19
	200	0.14	— —	0.14
20	0	27.07	27.50	27.29
	6.25	25.83	25.79	25.81
	12.5	28.30	29.32	28.81
	25	28.18	28.65	28.42
	50	27.27	27.96	27.62
	100	21.79	21.46	21.63
	200	17.66	18.42	18.04

表10と図15の結果により、塩化ナトリウムの反応時の濃度が、0～50mMの間では、再構成後の活性にほとんど影響を認めないが、それ以上の濃度では、有意の反応抑制がみられた(200mMでおよそ30%の低下)。

[0194] [実施例6] 完全再構成系におけるEt反応の基質特異性に関する検討

組換えC因子を構成品とするEt測定試薬(PyroGene: Cambrex社)に含まれる蛍光合成基質、Boc-Val-Pro-Arg-MCAと類似の発色合成基質、Boc-Val-Pro-Arg-pNA(Boc-VPR-pNA)(酢酸塩)(以下、基質1ともいう)を用いて、実施例4の完全再構成系におけるEt反応を、通常のLAL反応では最適のBoc-Leu-Gly-Arg-pNA(Boc-LGR-pNA)(以下、基質2ともいう)と比較した。

[0195] Et反応時の基質濃度は、基質1、基質2、共に0.3mMに設定して行った。

[0196] その結果を、表11と図16に示す。

[0197] [表11]

基質	Et 濃度 (EU/mL)	反応値 (mAbs/min)		
				平均値
Boc-LGR -pNA	0	0.10	0.09	0.10
	0.1	0.47	0.45	0.46
	1	3.87	3.76	3.82
	10	28.61	27.90	28.26
	100	50.71	52.37	51.54
	1000	70.48	70.23	70.36
Boc-VPR -pNA	0	0.11	0.09	0.10
	0.1	0.12	0.11	0.12
	1	0.12	0.14	0.13
	10	0.45	0.48	0.47
	100	3.54	3.34	3.44
	1000	15.46	15.30	15.38

表11と図16に示された結果より、完全再構成系による本系のEt活性は、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA(基質2)の方が、Boc-Val-Pro-Arg-pNA(基質1)に比べ、反応値が200倍ほど高いことが判明した。

[0198] なお、別試験として、組換え型C因子のみの系(基質濃度は、基質1、基質2、共に0.3mMに設定して行った)のEt反応の検討を行ったところ、基質2を用いた場合の反応値に比べ、基質1を用いた場合の方が、反応値が1.6倍ほど高かった。

[0199] このことから、組換え型C因子単独の場合に比べ、完全再構成系によるエンドトキシン活性の方が著しく高い反応値を示すことが明らかとなった。また、(1→3)-β-D-グルカンにおいても同様の傾向を示す。すなわち、本発明により、微量でも高感度かつ再現性の良いエンドトキシン及び(1→3)-β-D-グルカンの検出・定量を行うことが可能であることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0200] 本発明により、カプトガニ由来のPro-CEを大量に遺伝子発現させ、微生物由来の菌体成分を効率的かつ再現性よく検出、測定するためのin vitro のツールや方法が提供される。さらに、本発明により得られるPro-CEは、他のLAL反応に参与する

組換え因子とともに反応系を構成する主要な因子として提供される。本法は、Et及びBGの検出、定量による医薬品、医療用具等の安全性評価、敗血症、真菌感染症等の血清診断、環境・食品衛生分野における微生物汚染の検出ツールとして、又は、研究用試薬等として、恒久的かつ幅広い利用が期待できる。

請求の範囲

- [1] カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムをコードする核酸。
- [2] カプトガニが、タキプレウス・トリデンタツス、リムルス・ポリフェムス、タキプレウス・ギガス及びタキプレウス・ロツンディカウダから選択されるものである、請求項1に記載の核酸。
- [3] カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムをコードする核酸が、下記(A)～(C)から選ばれるものである、請求項1に記載の核酸。
- (A) 配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA、
- (B) 「配列番号4に示されるアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムの活性を有するタンパク質」をコードするDNA、
- (C) 上記(A)又は(B)のDNAを転写することによって得られるRNA。
- [4] カプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムをコードする核酸が、下記(a)～(c)から選ばれるものである、請求項1に記載の核酸。
- (a) 配列番号3における塩基配列1～1143で示される塩基配列を含むDNA、
- (b) 配列番号3における塩基配列1～1143で示される塩基配列を含む塩基配列において、その塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は転位させる塩基の変異を有し、かつ、発現されるタンパク質がカプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムの活性を有することを特徴とするDNA、
- (c) 上記(a)又は(b)のDNAを転写することによって得られるRNA。
- [5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸が保持された、ウイルス。
- [6] ウイルスが、バキュウロウイルスである、請求項5に記載のウイルス。
- [7] バキュウロウイルスが、核多角体病ウイルスである、請求項6に記載のウイルス。
- [8] 請求項5～7のいずれか1項に記載のウイルスを保持する細胞。
- [9] 細胞が、昆虫由来の細胞である、請求項8に記載の細胞。
- [10] 請求項8又は9に記載の細胞を生育させ、その生育物からカプトガニ由来のプロクロッティングエンザイムを採取するステップを少なくとも含む、カプトガニ由来のプロクロ

ツインゲンザイムの生産方法。

[11] 請求項10に記載の方法により製造されるプロクロツインゲンザイム。

[12] エントキシンを検出するための被験試料において、請求項11に記載のプロクロツ

インゲンザイム及び「エントキシンと接触することによりプロクロツインゲンザイ

ムをクロツインゲンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体

」を共存させ、プロクロツインゲンザイムからクロツインゲンザイムへの変換に

伴う酵素活性を指標として、当該試料中のエントキシンの検出を行うことを特徴とす

る、エントキシンの検出方法。

[13] 「エントキシンと接触することによりプロクロツインゲンザイムをクロツインゲン

ザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、「活性型C因子と

接触することによりプロクロツインゲンザイムをクロツインゲンザイムに変換させ

る活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」並びにカプトガニ由来のC因子及び／

又は組換えC因子である、ことを特徴とする、請求項12に記載のエントキシンの検出

方法。

[14] 「活性型C因子と接触することによりプロクロツインゲンザイムをクロツインゲン

ザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来の

B因子及び／又は組換えB因子であることを特徴とする、請求項13に記載のエント

キシンの検出方法。

[15] カスケーター反応タンパク質として、請求項11に記載のプロクロツインゲンザイム、

組換えC因子及び組換えB因子のみを共存させることを特徴とする、請求項12～14

のいずれか1項に記載のエントキシンの検出方法。

[16] 請求項11に記載のプロクロツインゲンザイム及び「エントキシンと接触すること

によりプロクロツインゲンザイムをクロツインゲンザイムに変換させる活性を発

現するセリンプロテアーゼ前駆体」を少なくとも構成として含むことを特徴とする、請求

項12に記載の検出方法を行うためのエントキシンの検出キット。

[17] 「エントキシンと接触することによりプロクロツインゲンザイムをクロツインゲン

ザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、「活性型C因子と

接触することによりプロクロツインゲンザイムをクロツインゲンザイムに変換させ

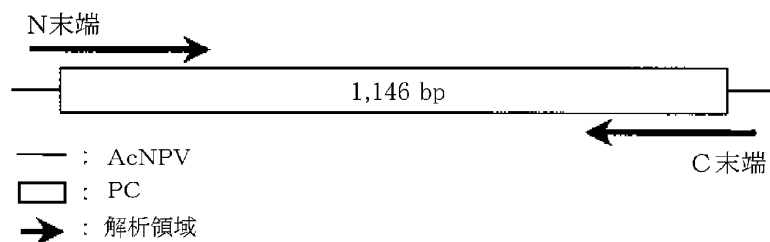
る活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」並びにカプトガニ由来のC因子及び／又は組換えC因子である、ことを特徴とする、請求項16に記載のエンドトキシン検出キット。

- [18] 「活性型C因子と接触することによりプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のB因子及び／又は組換えB因子であることを特徴とする、請求項17に記載のエンドトキシン検出キット。
- [19] カスケード反応タンパク質として、請求項11に記載のプロクロッティングエンザイム、組換えC因子及び組換えB因子のみを構成として含んでいることを特徴とする、請求項16～18のいずれか1項に記載のエンドトキシン検出キット。
- [20] (1→3)－ β －D－グルカンを検出するための被験試料において、請求項11に記載のプロクロッティングエンザイム、及び「(1→3)－ β －D－グルカンと接触することによりプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を共存させ、プロクロッティングエンザイムからクロッティングエンザイムへの変換に伴う酵素活性を指標として、当該試料中の(1→3)－ β －D－グルカンの検出を行うことを特徴とする、(1→3)－ β －D－グルカンの検出方法。
- [21] 「(1→3)－ β －D－グルカンと接触することによりプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のG因子及び／又は組換えG因子であることを特徴とする、請求項20に記載の(1→3)－ β －D－グルカンの検出方法。
- [22] カスケード反応タンパクとして、請求項11に記載のプロクロッティングエンザイム及び組換えG因子のみを共存させることを特徴とする、請求項20又は21に記載の(1→3)－ β －D－グルカンの検出方法。
- [23] 請求項11に記載のプロクロッティングエンザイム及び「(1→3)－ β －D－グルカンと接触することによりプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」を少なくとも構成として含むことを特徴とする、請求項20に記載の検出方法を行うための(1→3)－ β －D－グルカン検出

キット。

- [24] 「(1→3)－β－D－グルカンと接触することによりプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに変換させる活性を発現するセリンプロテアーゼ前駆体」が、カプトガニ由来のG因子及び／又は組換えG因子であることを特徴とする、請求項23に記載の(1→3)－β－D－グルカン検出キット。
- [25] カスケード反応タンパク質として、請求項11に記載のプロクロッティングエンザイム及び組換えG因子のみを構成として含んでいることを特徴とする、請求項23又は24に記載の(1→3)－β－D－グルカン検出キット。

[図1]



・ N末端

```

TAATCGCGAT CTAGAATGTT GGTGAATAAC GTGTTTTAC TACTGTGTTT CCCACTGTTG
*****
ATGTT GGTGAATAAC GTGTTTTAC TACTGTGTTT CCCACTGTTG

ATGTCTGTGG TTAGATGCAG TACTCTCAGC AGACAGCGTA GACAGTTTGT TTTCCCTGAC
*****
ATGTCTGTGG TTAGATGCAG TACTCTCAGC AGACAGCGTA GACAGTTTGT TTTCCCTGAC

GAGGAAGAAC TTTGCTCAAA CCCATTACT GAAGAAGGAA CATGCAAAA TGTCTTGGAT
*****
GAGGAAGAAC TTTGCTCAAA CCCATTACT GAAGAAGGAA CATGCAAAA TGTCTTGGAT

TGTAGAATAC TTTTACAAA AAATGATTAT AATTTACTCA AAGAATCAAT ATGCGGCTTT
*****
TGTAGAATAC TTTTACAAA AAATGATTAT AATTTACTCA AAGAATCAAT ATGCGGCTTT

GAAGGCATAA CACCCAAAGT TTGTTGTCCG AAATCAAGCC ATGTAATTTG AAGTACACAG
*****
GAAGGCATAA CACCCAAAGT TTGTTGTCCG AAATCAAGCC ATGTAATTTG AAGTACACAG

```

・ C末端

```

CNCNTNACAA GCGGTCTTAT TATTAAATCT AGTGATGGTG ATGGTGATGC ACCATATGTT
** *****
CT AGTGATGGTG ATGGTGATGC ACCATATGTT

CTGGAATCCA ATCTAAAAAC TCTGTCACTT TTGTGTAAAC CCCAGGAAAT CCAGGCAATG
*****
CTGGAATCCA ATCTAAAAAC TCTGTCACTT TTGTGTAAAC CCCAGGAAAT CCAGGCAATG

CGCATTTCTT TCCGAAAGAC ACAATTCCAA TGAGATAAAA CTCTCCGGTT TTAACAGGCA
*****
CGCATTTCTT TCCGAAAGAC ACAATTCCAA TGAGATAAAA CTCTCCGGTT TTAACAGGCA

ACATCATTGG ACCTCCAGAA TCACCCTGGC AAGCATCCTT CCGCCCATCT GCAAAGCCAG
*****
ACATCATTGG ACCTCCAGAA TCACCCTGGC AAGCATCCTT CCGCCCATCT GCAAAGCCAG

CACACATATA CACGTTTGTG ATATTTAAAT CTTTCTCGTA GGCCTGTCTA CAGGCCTCGT
*****
CACACATATA CACGTTTGTG ATATTTAAAT CTTTCTCGTA GGCCTGTCTA CAGGCCTCGT

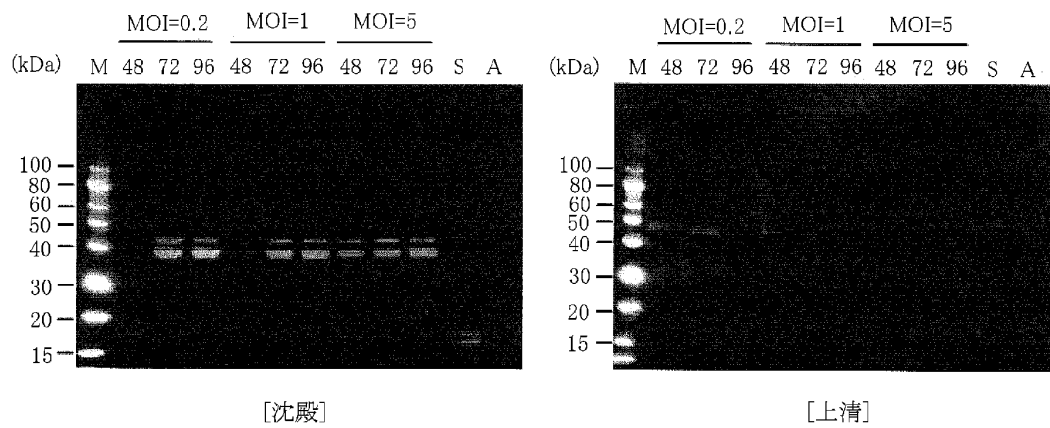
GTTCCCATAT TGGTAACTGT ACTTCTCTCA ACACTGCACT AGATGGGCGG TTAATGCTG
*****
GTTCCCATAT TGGTAACTGT ACTTCTCTCA ACACTGCACT AGATGGGCGG TTAATGCTG

```

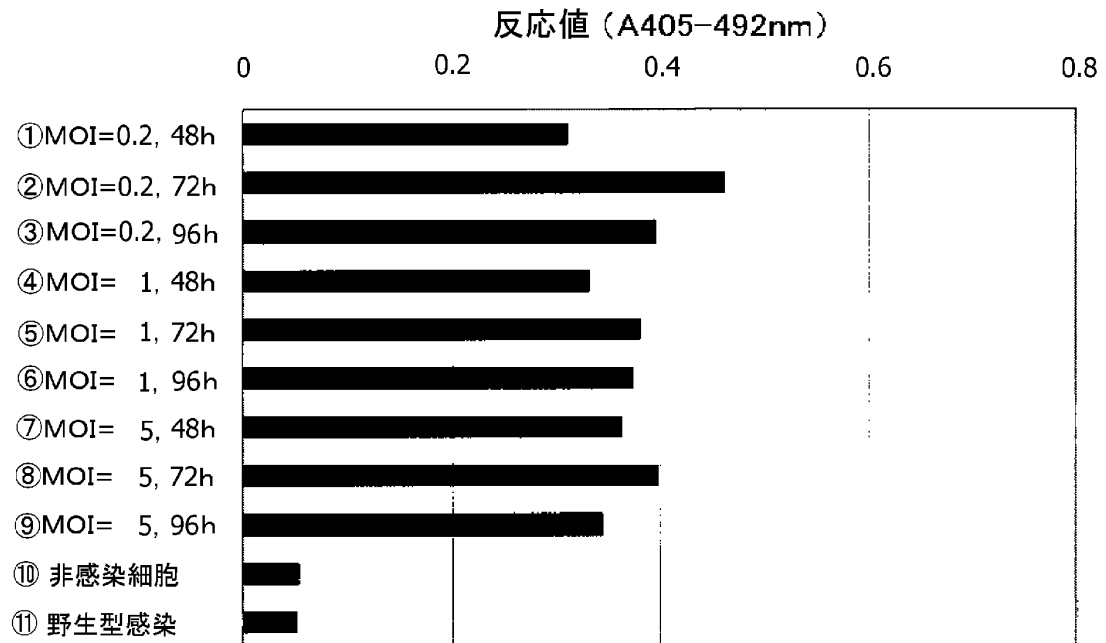
WO 2008/004674

PCT/JP2007/063606

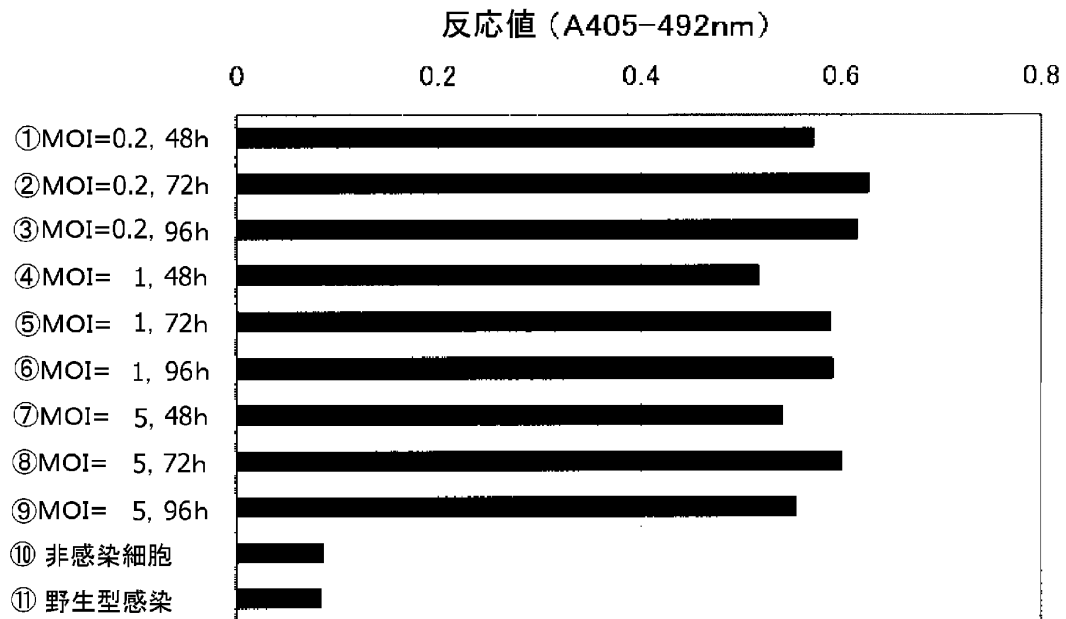
[図2]



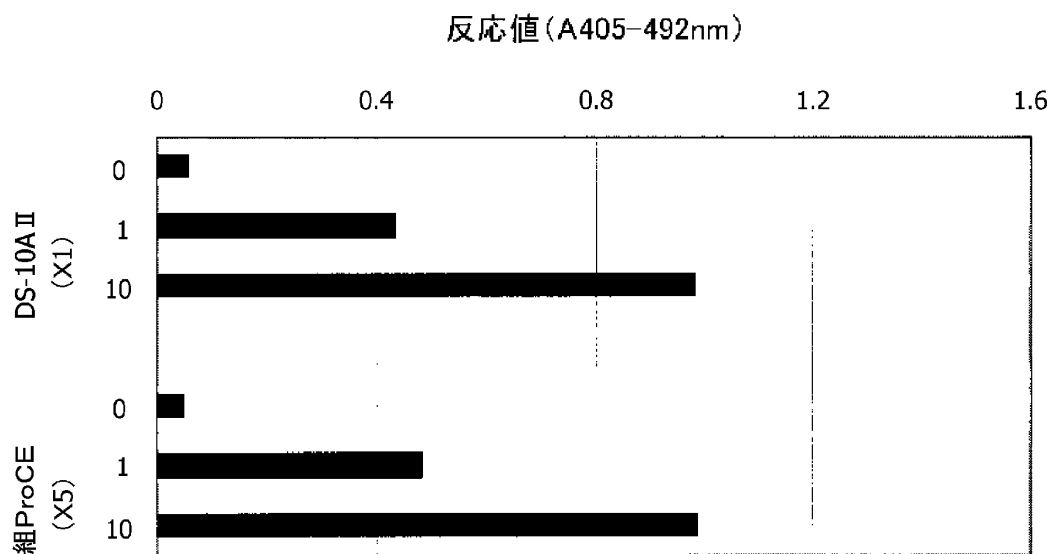
[図3]



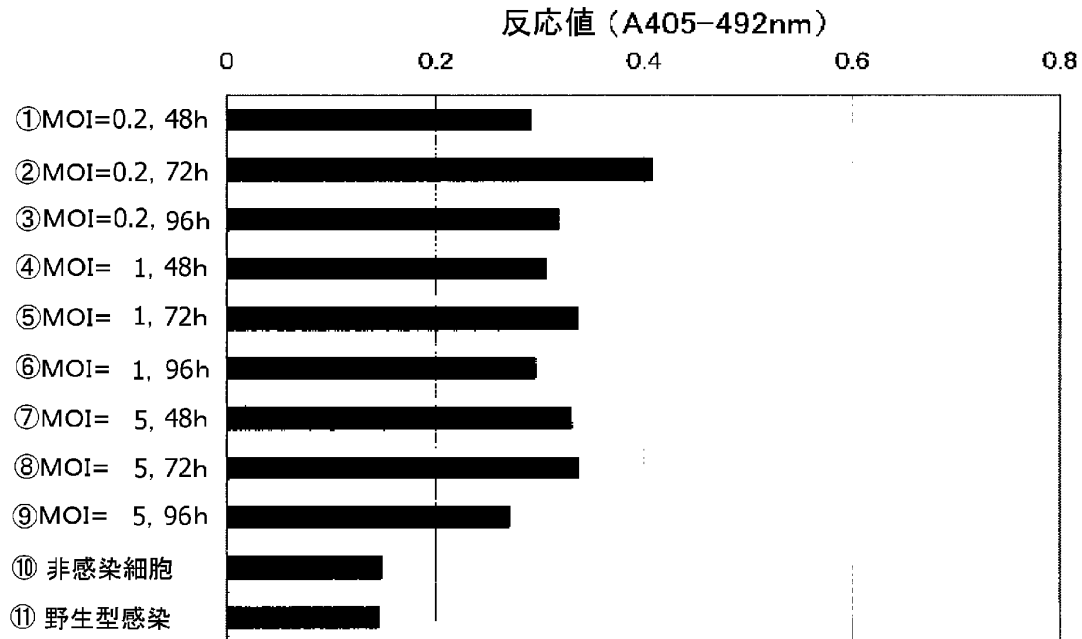
[図4]



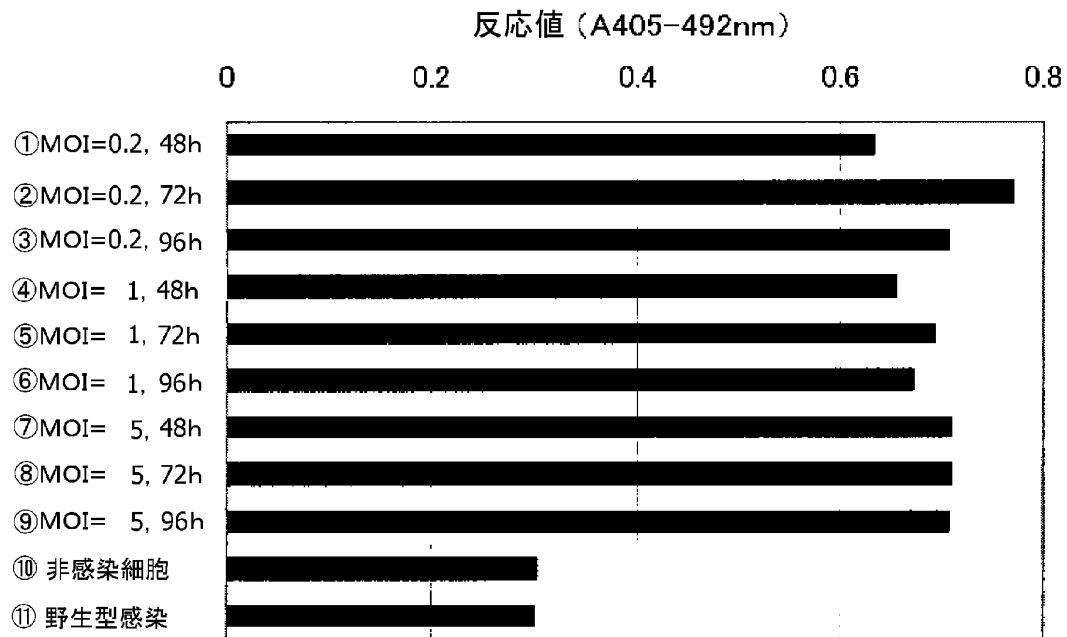
[図5]



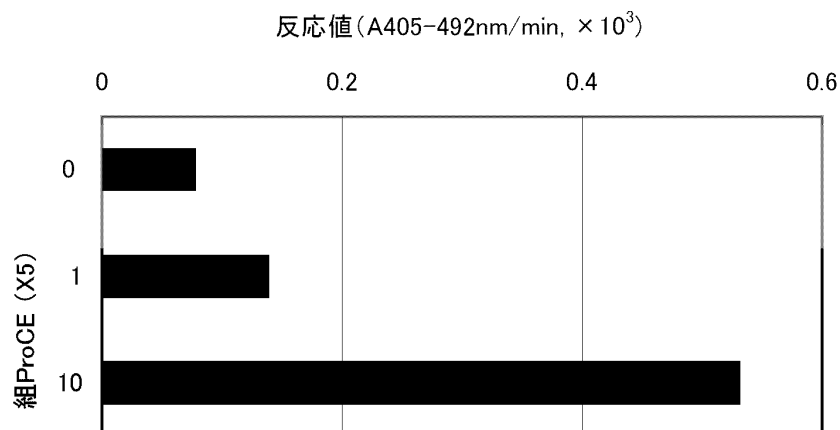
[図6]



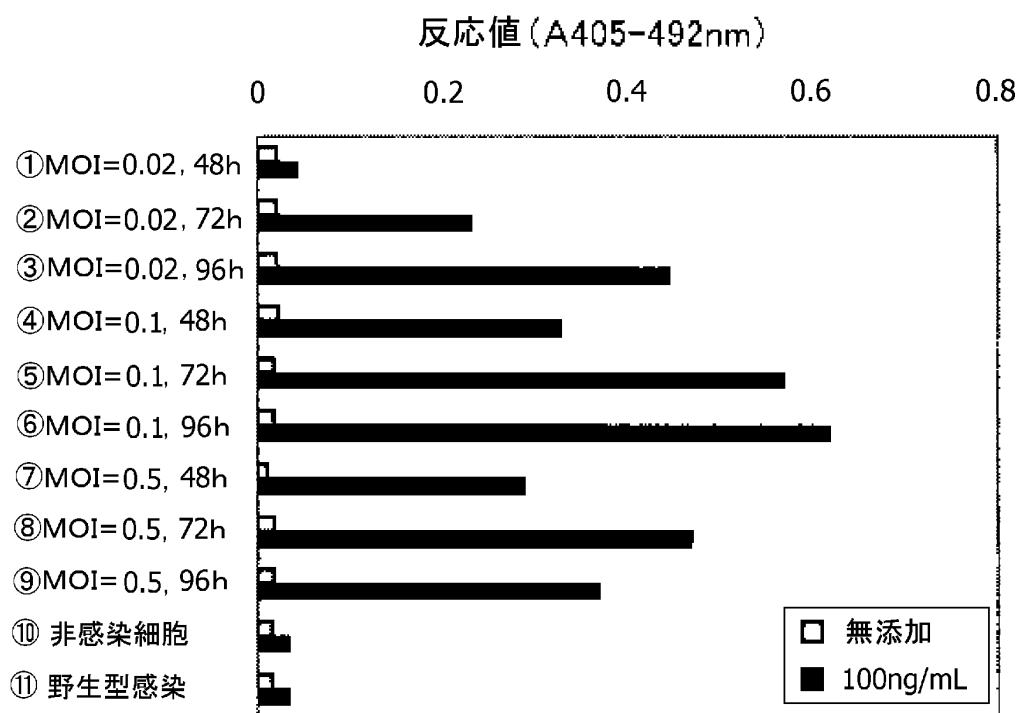
[図7]



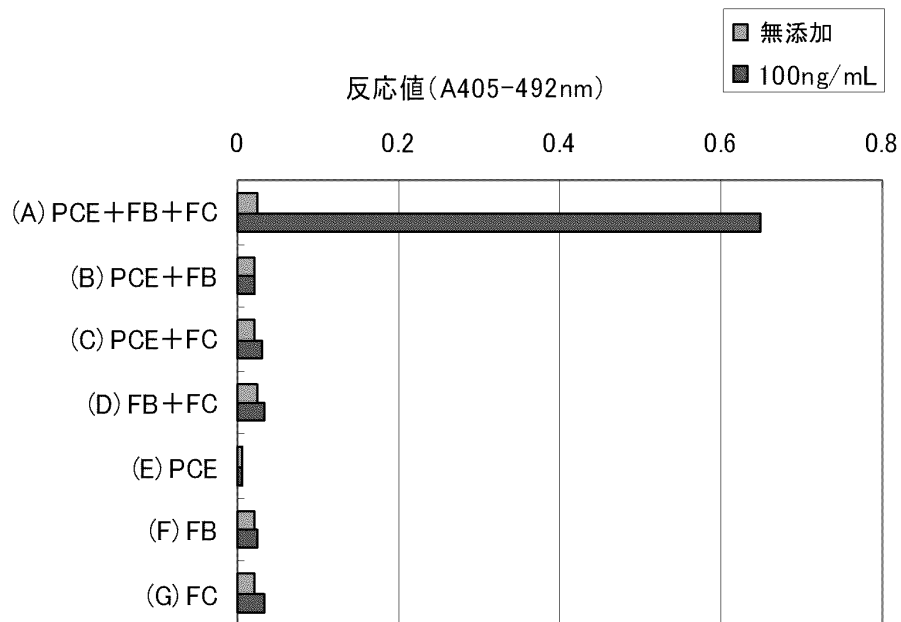
[図8]



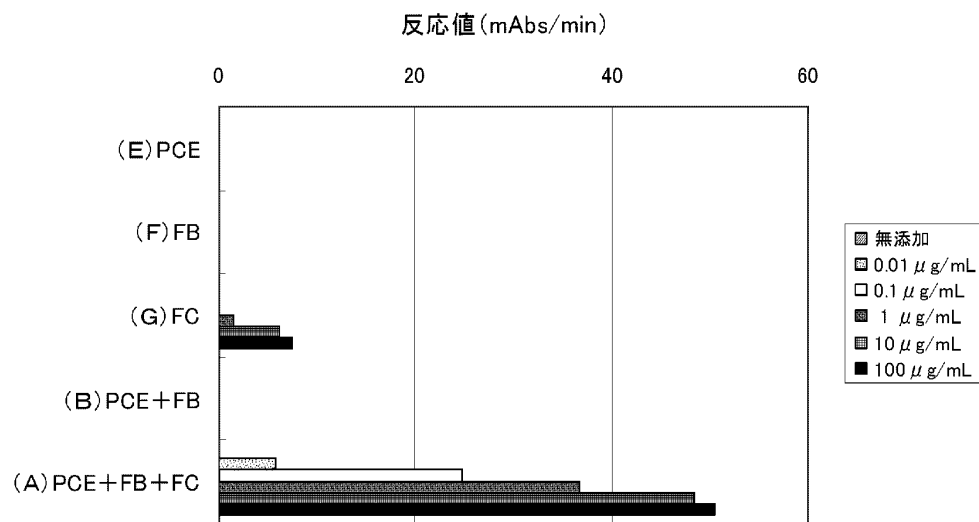
[図9]



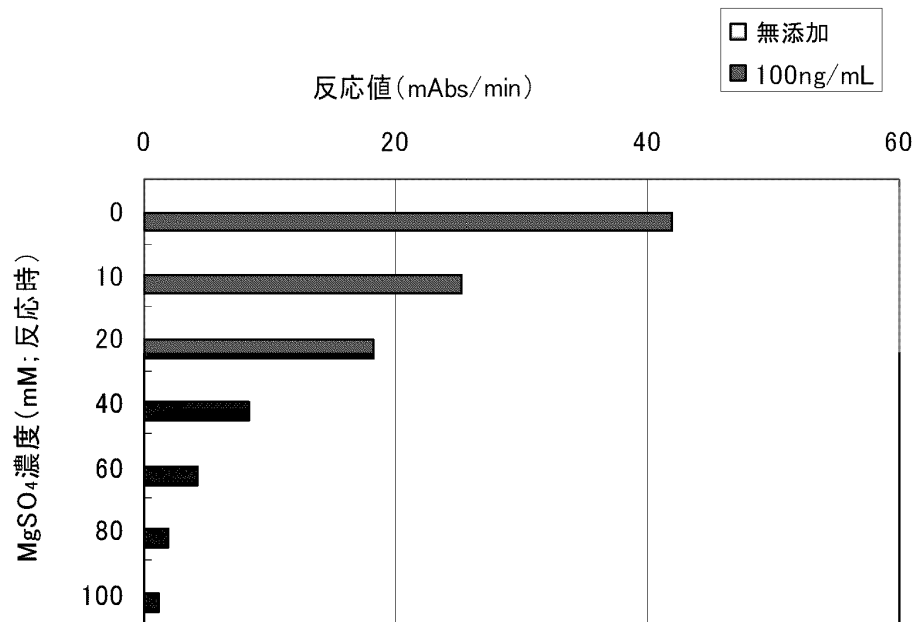
[図10]



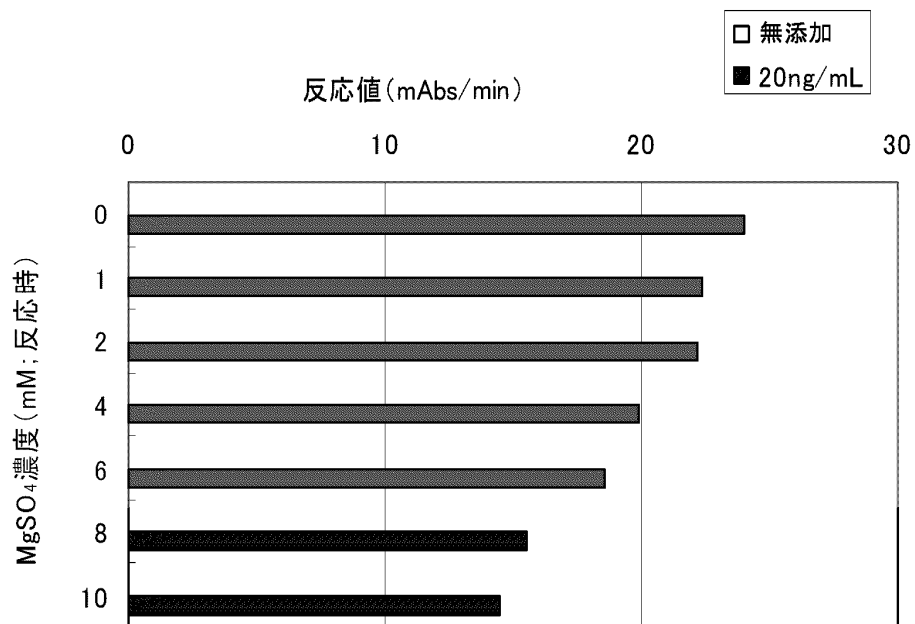
[図11]



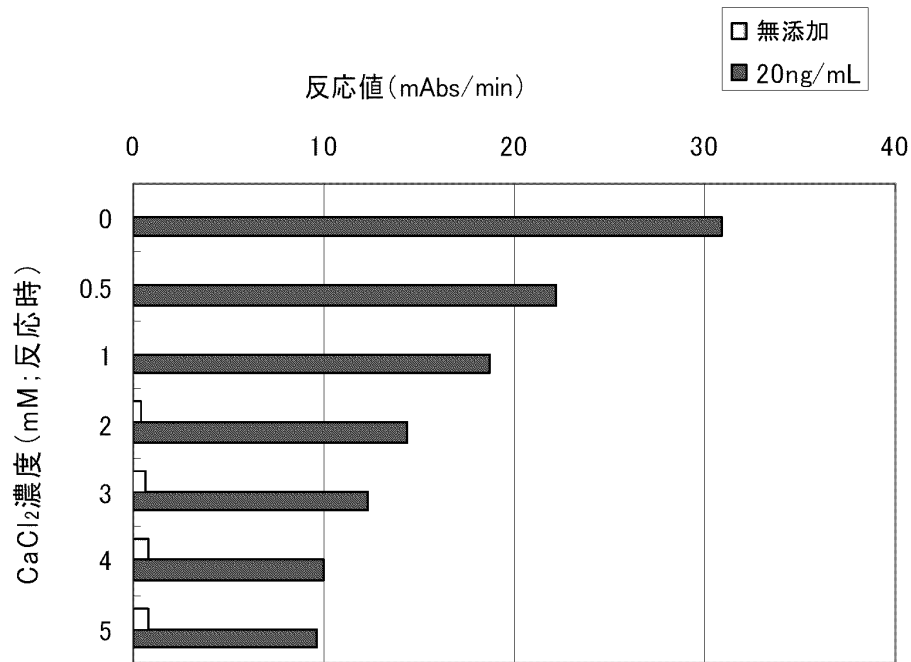
[図12]



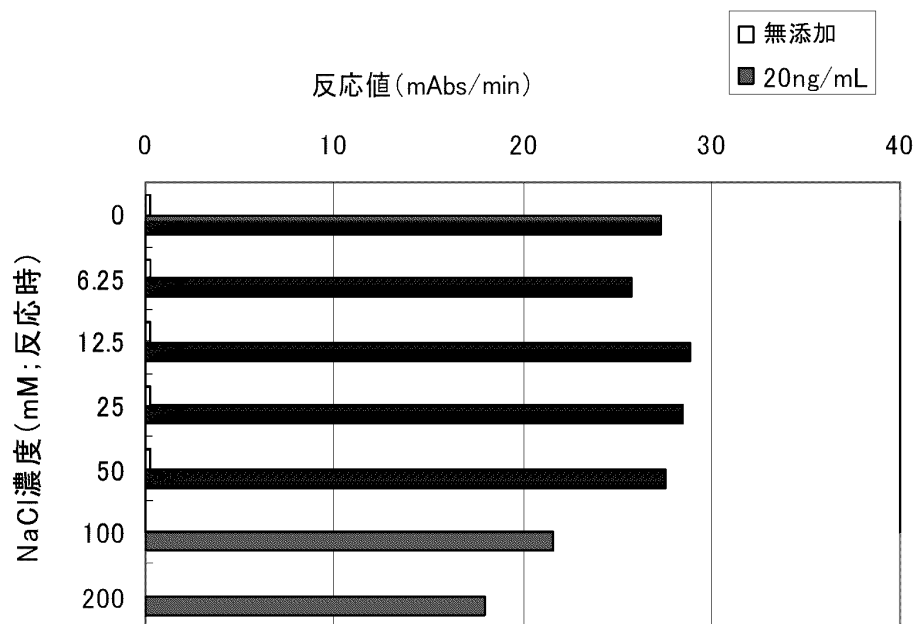
[図13]



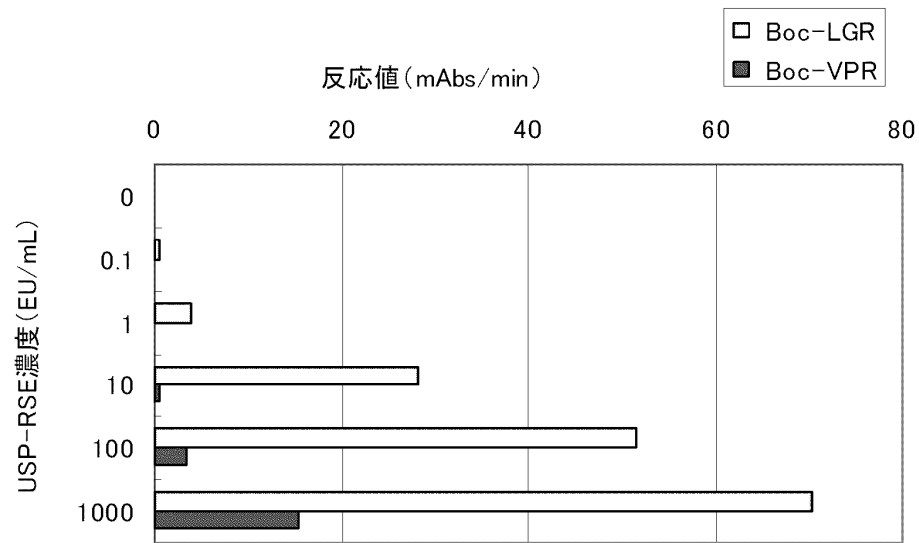
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N5/10, C12N7/00, C12N9/64, C12Q1/37

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

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

MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS(STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	MUTA, T. et al., "Proclotting enzyme from hoeseshoe crab hemocytes", J. Biol. Chem., (1990), Vol.265, No.36, pp.22426-22433, full text (Particularly, Fig.1)	1-4 5-25
Y	WO 1999/15676 A1 (National University of Singapore), 01 April, 1999 (01.04.99), Full text (particularly, page 2, lines 13 to 20; examples 1 to 2, 5) & US 6645724 B1 & EP 1015609 A1	5-25

☒ 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
19 September, 2007 (19.09.07)

Date of mailing of the international search report
02 October, 2007 (02.10.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063606

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAMURA, T. et al., "Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes", Eur. J. Biochem., (1986), Vol.154, pp.511-521, full text (Particularly, page 516, 22nd line from the bottom to page 517, line 4, table 5, Fig.10)	12-19
Y	NAKAMURA, T. et al., "Purification and properties of intracellular clotting factor, factor B, from horseshoe crab (Tachypleus tridentatus) hemocytes", J. Biochem., (1986), Vol.99, pp.847-857, full text (Particularly, TABLE IV)	12-19
Y	MUTA, T. et al., "Purified horseshoe crab factor G", J. Biol. Chem., (1995), Vol.270, No.2, pp.892-897, full text (Particularly, page 896, left column, lines 4 to 26, page 897, right column, lines 5 to 9, TABLE VI)	20-25
X	NAKAMURA, T. et al., "Intracellular proclotting enzyme in Limulus (Tachypleus tridentatus) hemocytes: Its purification and properties", J. Biochem., (1985), Vol.97, pp.1561-1574, full text (Particularly, Fig.6)	1-4,11
X	ROTH, R. I. and LEVIN, J., "Purification of Limulus polyphemus proclotting enzyme", J. Biol. Chem., (1992), Vol.267, No.33, pp.24097-24102, full text (Particularly, Fig.4)	1-4,11
P,Y	JP 2006-271384 A (Seikagaku Corp.), 12 October, 2006 (12.10.06), Full text & EP 1707574 A1 & US 2006/228779 A1	20-25
A	JP 2005-500520 A (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.), 06 January, 2005 (06.01.05), Full text & WO 2003/002976 A2 & EP 1409984 A2 & US 2003/054432 A1	1-25
A	MUTA, T. et al., "Horseshoe crab coagulation factor B", J. Biol. Chem., (1993), Vol.268, No.28, pp.21384-21388, full text	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, C12N7/00, C12N9/64, C12Q1/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)
JMEDPLUS/JST7580/JSTPLUS (JDream2)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X ----- Y	MUTA, T. et al., "Proclotting enzyme from hoseshoe crab hemocytes", J. Biol. Chem., (1990), Vol.265, No.36, pp.22426-22433, 全文(特に、Fig.1 参照)	1-4 ----- 5-25
Y	WO 1999/15676 A1, (National University of Singapore), 1999.04.01, 全文(特に、第 2 頁 第 13-20 行, Example.1-2,5 参照) & US 6645724 B1 & EP 1015609 A1	5-25

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 9 . 0 9 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

0 2 . 1 0 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

佐藤 巖

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 3 3 4

様式 PCT/I S A / 2 1 0 (第 2 ページ) (2 0 0 5 年 4 月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	NAKAMURA, T. et al., "Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes", Eur. J. Biochem., (1986), Vol.154, pp.511-521, 全文(特に、p.516 下から 22 行～p.517 4 行, Table.5, Fig.10 参照)	12-19
Y	NAKAMURA, T. et al., "Purification and properties of intracellular clotting factor, factor B, from horseshoe crab (Tachypleus tridentatus) hemocytes", J. Biochem., (1986), Vol.99, pp.847-857, 全文(特に、TABLE IV 参照)	12-19
Y	MUTA, T. et al., "Purified hoseshoe crab factor G", J. Biol. Chem., (1995), Vol.270, No.2, pp.892-897, 全文(特に、p.896 左欄 第 4-26 行, p.897 右欄 第 5-9 行, TABLE VI 参照)	20-25
X	NAKAMURA, T. et al., "Intracellular proclotting enzyme in Limulus (Tachypleus tridentatus) hemocytes: Its purification and properties", J. Biochem., (1985), Vol.97, pp.1561-1574, 全文(特に、Fig.6 参照)	1-4,11
X	ROTH, R. I. and LEVIN, J., "Purification of Limulus polyphemus proclotting enzyme", J. Biol. Chem., (1992), Vol.267, No.33, pp.24097-24102, 全文(特に、Fig.4 参照)	1-4,11
P,Y	JP 2006-271384 A, (生化学工業株式会社), 2006.10.12, 全文 & EP 1707574 A1 & US 2006/228779 A1	20-25
A	JP 2005-500520 A, (ケンブレックス バイオサイエンス ウォーカーズビル インコーポレーティッド), 2005.01.06, 全文 & WO 2003/002976 A2 & EP 1409984 A2 & US 2003/054432 A1	1-25
A	MUTA, T. et al., "Hoseshoe crab coagulation factor B", J. Biol. Chem., (1993), Vol.268, No.28, pp.21384-21388, 全文	1-25

様式 PCT/ISA/210 (第 2 ページの続き) (2005 年 4 月)

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. b の続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 紙形式

☒ 電子形式

c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：