

## 明 細 書

発明の名称： カプトガニ B 因子改変体

### 技術分野

[0001] 本発明は、カプトガニ B 因子改変体に関する。

### 背景技術

[0002] 医薬や食品の衛生管理やヒトを含む動物の診断において、微生物由来物質を検知し、微生物汚染の程度を測定する手段は重要である。微生物汚染の程度を測定する手段としては、リムルス試験が普及している。リムルス試験は、エンドトキシン（LPS）や（1→3）-β-D-グルカン測定対象物質として微生物汚染の程度を測定する技術であり、カプトガニが有するプロテアーゼ前駆体がこれらの測定対象物質により活性化される性質を利用した測定方法である。

[0003] リムルス試験としては、カプトガニ血球抽出液（カプトガニ・アメボサイト・ライセート。以下単に「ライセート」という）を使用する方法が普及している。この方法は、セリンプロテアーゼ前駆体（C因子、B因子およびプロクロッティングエンザイム）がエンドトキシンと接触した際に、または、セリンプロテアーゼ前駆体（G因子およびプロクロッティングエンザイム）が（1→3）-β-D-グルカンと接触した際に、逐次活性化されて進行するカスケード反応を利用する方法である。

[0004] 非特許文献1には、ライセートから単離されたタキプレウス・トリデンタツスB因子が開示されている。また、非特許文献2には、タキプレウス・トリデンタツスB因子のポリペプチドのアミノ酸配列が開示されている。しかしながら、いずれの文献においても、B因子そのものよりも優れた酵素特性を有するB因子改変体については開示されていない。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0005] 非特許文献1：Nakamura, T., Horiuchi, T., Morita, T., Iwanaga, S. (198

6) J. Biochem. 99, 847-57

非特許文献2: Muta, T., Oda, T., Iwanaga, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 21384-8

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、カプトガニB因子改変体に関する技術を提供することを課題とする。詳しくは、本発明は、カプトガニB因子改変体のポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする核酸、当該核酸を保持するベクター、当該核酸および／または当該ベクターを保持する細胞、当該ポリペプチドの製造方法、当該ポリペプチドを用いたエンドトキシンの測定方法、当該ポリペプチドを構成成分として含むエンドトキシン測定用試薬、および、当該ポリペプチドまたは当該試薬を構成成分として含むエンドトキシン測定用キット等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] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、カプトガニB因子のポリペプチドのアミノ酸配列において特定部位のアミノ酸残基を改変する事により、カプトガニB因子そのものよりも優れたプロテアーゼ活性を有するB因子改変体を得られることを見出した。また、本発明者らは、上記により、カプトガニB因子そのものよりも優れた熱安定性を有するB因子改変体を得られることも見出した。本発明者らは、これらの知見に基づき、本発明を完成させた。

[0008] 前記課題は、以下の態様を包含する本発明によって解決することができる。

[1]

カプトガニB因子のポリペプチドのアミノ酸配列において193位のアミノ酸残基がシステイン(Cys)残基に置換されたアミノ酸配列を有するポリペプチド。

[2]

下記（Ａ）～（Ｄ）のいずれかに示されるポリペプチド。

（Ａ）下記（Ａ１）又は（Ａ２）に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（Ａ１）配列番号７におけるアミノ酸番号１～４００で示されるアミノ酸配列。

（Ａ２）配列番号７におけるアミノ酸番号２４～４００で示されるアミノ酸配列。

（Ｂ）下記（Ｂ１）又は（Ｂ２）に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（Ｂ１）配列番号１０におけるアミノ酸番号１～４００で示されるアミノ酸配列。

（Ｂ２）配列番号１０におけるアミノ酸番号２４～４００で示されるアミノ酸配列。

（Ｃ）上記（Ａ）又は（Ｂ）に示されるポリペプチドのアミノ酸配列において１個若しくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列（ただし、１９３位のシステイン（Ｃｙｓ）残基は置換も欠失もされない）を有し、かつカプトガニＢ因子の機能を有するポリペプチド。

（Ｄ）上記（Ａ）～（Ｃ）のいずれかに示されるポリペプチドにペプチドタグを付加してなる融合ポリペプチドのアミノ酸配列を有し、かつカプトガニＢ因子の機能を有するポリペプチド。

[３]

前記〔１〕又は〔２〕に記載のポリペプチドをコードする核酸。

[４]

下記（ａ）～（ｄ）のいずれかに示されるＤＮＡ。

（ａ）下記（ａ１）～（ａ４）のいずれかに示される塩基配列を有するＤＮＡ。

（ａ１）配列番号５における塩基番号１～１２００で示される塩基配列。

- (a 2) 配列番号 5 における塩基番号 70～1200 で示される塩基配列。
- (a 3) 配列番号 6 における塩基番号 1～1200 で示される塩基配列。
- (a 4) 配列番号 6 における塩基番号 70～1200 で示される塩基配列。
- (b) 下記 (b 1)～(b 4) のいずれかに示される塩基配列を有する DNA。
- (b 1) 配列番号 8 における塩基番号 1～1200 で示される塩基配列。
- (b 2) 配列番号 8 における塩基番号 70～1200 で示される塩基配列。
- (b 3) 配列番号 9 における塩基番号 1～1200 で示される塩基配列。
- (b 4) 配列番号 9 における塩基番号 70～1200 で示される塩基配列。
- (c) 上記 (a) 又は (b) に示される DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA (ただし、塩基番号 577～579 で示される塩基は保存されている) であって、かつカブトガニ B 因子の機能を有するポリペプチドをコードする DNA。
- (d) 上記 (a)～(c) のいずれかに示される DNA にペプチドタグをコードする DNA を付加してなる融合 DNA の塩基配列を有し、かつカブトガニ B 因子の機能を有するポリペプチドをコードする DNA。

[5]

前記 [3] に記載の核酸、及び／又は前記 [4] に記載の DNA を保持するベクター。

[6]

前記 [3] に記載の核酸、前記 [4] に記載の DNA、及び／又は前記 [5] に記載のベクターを保持する細胞。

[7]

前記 [6] に記載の細胞を用いてカブトガニ B 因子の機能を有するポリペ

プチドを生成させる工程を含む、ポリペプチドの製造方法。

[ 8 ]

前記 [ 7 ] に記載された方法により得られるポリペプチド。

[ 9 ]

下記 ( 1 ) 及び ( 2 ) の工程を含む、エンドトキシンの測定方法。

( 1 ) 前記 [ 1 ] 、 [ 2 ] 又は [ 8 ] に記載のポリペプチド、カプトガニ C 因子、及び被験試料を混合する工程。

( 2 ) 上記ポリペプチドのプロテアーゼ活性を測定する工程。

[ 1 0 ]

前記 [ 1 ] 、 [ 2 ] 又は [ 8 ] に記載のポリペプチドを構成成分として含む、エンドトキシン測定用試薬。

[ 1 1 ]

前記 [ 1 ] 、 [ 2 ] 又は [ 8 ] に記載のポリペプチド又は前記 [ 1 0 ] に記載の試薬を構成成分として含む、エンドトキシン測定用キット。

### 発明の効果

[0009] 本発明によれば、カプトガニ B 因子そのものよりも優れたプロテアーゼ活性を有する B 因子改変体を提供することができる。また、本発明によれば、カプトガニ B 因子そのものよりも優れた熱安定性を有する B 因子改変体を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図 1 は、タキプレウス・トリデンタツス B 因子 ( T F B ) とタキプレウス・トリデンタツス B 因子改変体 ( M u r a s a m e - T F B ) の比活性 (  $u n i t s / \mu m o l$  ) を示す図である。

[図2]図 2 は、タキプレウス・トリデンタツス B 因子 ( T F B ) ( ○ で示されるグラフ ) とタキプレウス・トリデンタツス B 因子改変体 ( M u r a s a m e - T F B ) ( ● で示されるグラフ ) の熱安定性を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明において「リムルス因子」とは、C 因子、B 因子およびプロクロッ

ティングエンザイム（凝固酵素前駆体）を個別にまたは総称していう。また、本発明において「リムルス試薬」とは、任意のリムルス因子を構成成分として含み、リムルス試験に用いられる試薬をいう。

[0012] 本発明においては、エンドトキシンと接触したC因子が自己触媒的に活性型（活性型C因子）に変化し、当該活性型C因子のプロテアーゼ活性によりB因子が切断されて活性型B因子に変化する一連の反応を「カスケード反応」と称する場合がある。また、本発明においては、当該一連の反応に加えて、当該活性型B因子のプロテアーゼ活性によりプロクロッティングエンザイム（凝固酵素前駆体）が切断されてクロッティングエンザイム（凝固酵素）に変化する反応をも含む一連の反応を「カスケード反応」と称する場合もある。

[0013] <1>本発明のポリペプチド

本発明のポリペプチドは、カプトガニB因子のポリペプチドのアミノ酸配列において特定部位のアミノ酸残基が改変されていることを特徴とするポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、具体的には、カプトガニB因子のポリペプチドのアミノ酸配列において193位のアミノ酸残基がシステイン（Cys）残基に置換されたアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

[0014] カプトガニB因子のポリペプチドのアミノ酸配列においてN末端の23残基はシグナル配列として機能することが知られている（非特許文献2）。よって、上記本発明のポリペプチドにおいては、当該シグナル配列を有する態様のポリペプチドの他、シグナル配列を有しない態様のポリペプチド（N末端側の23残基を有しない態様のポリペプチド）や他のシグナル配列（カプトガニが本来的に有するシグナル配列以外のシグナル配列）を有する態様のポリペプチドも上記本発明のポリペプチドの一態様であることを当業者は理解できる。

[0015] 本発明において、カプトガニの種類は、特に限定されない。カプトガニとしては、タキプレウス・トリデンタツス（*Tachypleus tridentatus*）、リムルス・ポリフェムス（*Limulus polyphemus*）、カルシノスコルピウス・ロツ

ンディカウダ (*Carcinoscorpius rotundicauda*)、タキプレウス・ギガス (*Tachypleus gigas*) の4種が知られており、これらのカブトガニを本発明におけるカブトガニとして例示することができる。本発明のポリペプチドは、例えば、これらのカブトガニにおけるB因子のポリペプチドのアミノ酸配列において193位のアミノ酸残基がシステイン (Cys) 残基に置換されたアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

[0016] 本発明において、カブトガニは、タキプレウス・トリデンタツス、リムルス・ポリフェムスまたはカルシノスコルピウス・ロツンディカウダであることが好ましく、タキプレウス・トリデンタツスまたはリムルス・ポリフェムスであることがより好ましい。

[0017] 本発明のポリペプチドとしては、具体的には、下記 (A) ~ (D) のいずれかに示されるポリペプチドが例示される。

(A) 下記 (A1) 又は (A2) に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(A1) 配列番号7におけるアミノ酸番号1~400で示されるアミノ酸配列。

(A2) 配列番号7におけるアミノ酸番号24~400で示されるアミノ酸配列。

(B) 下記 (B1) 又は (B2) に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B1) 配列番号10におけるアミノ酸番号1~400で示されるアミノ酸配列。

(B2) 配列番号10におけるアミノ酸番号24~400で示されるアミノ酸配列。

(C) 上記 (A) 又は (B) に示されるポリペプチドのアミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列（ただし、193位のシステイン (Cys) 残基は置換も欠失もされない）を有し、かつカブトガニB因子の機能を有するポリペ

チド。

(D) 上記 (A) ~ (C) のいずれかに示されるポリペプチドにペプチドタグを付加してなる融合ポリペプチドのアミノ酸配列を有し、かつカプトガニ B 因子の機能を有するポリペプチド。

[0018] 本発明において「アミノ酸配列を有するポリペプチド」は、当該「アミノ酸配列からなるポリペプチド」を一態様として包含する。

[0019] 上記 (A) においていう配列番号 7 に示されるアミノ酸配列は、タキプレウス・トリデンタツス B 因子のポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 2) における 193 位のアミノ酸残基がシステイン (C y s) 残基に置換されてなるアミノ酸配列である。

[0020] 上記 (B) においていう配列番号 10 に示されるアミノ酸配列は、リムルス・ポリフェムス B 因子のポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 4) における 193 位のアミノ酸残基がシステイン (C y s) 残基に置換されてなるアミノ酸配列である。

[0021] 上記 (C) に示されるポリペプチドのアミノ酸配列は、上記 (A) または (B) に示されるポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されているが、193 位のシステイン (C y s) 残基は置換も欠失もされていない (193 位の C y s 残基が保存されている) アミノ酸配列である。なお、上記 193 位のシステイン (C y s) 残基とは、配列番号 7 又は 10 のアミノ酸配列において保存されるシステイン (C y s) 残基の位置を示したものである。よって、上記 (A) または (B) に示されるポリペプチドのアミノ酸配列において 1 個もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列 (すなわち、上記 (C) に示されるアミノ酸配列) において保存されているシステイン (C y s) 残基は、元のアミノ酸配列 (上記 (A) または (B) に示されるポリペプチドのアミノ酸配列) とのアラインメントにおいて、上記 193 位のシステイン (C y s) 残基に相当する位置のシステイン (C y s) 残基である。

[0022] 上記（C）においていう「複数個」とは、置換、欠失、挿入、及び／又は付加してもポリペプチドがカプトガニB因子の機能を失わない程度のアミノ酸残基の数（総数）を意味する。「複数個」とは、例えば、ポリペプチドを構成するアミノ酸残基の総数に対して、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下、さらに好ましくは2%以下、特に好ましくは1%以下の数であってよい。

[0023] よって、上記（A1）または（B1）に示されるポリペプチドのアミノ酸配列の場合、アミノ酸残基の総数が400個であるので、「複数個」とは、好ましくは2～40個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～8個、特に好ましくは2～4個であってよい。また、上記（A2）または（B2）に示されるポリペプチドのアミノ酸配列の場合、アミノ酸残基の総数が377個であるので、「複数個」とは、好ましくは2～37個、より好ましくは2～18個、さらに好ましくは2～7個、特に好ましくは2～3個であってよい。上記（C）において「複数個」とは、具体的な個々の数としては、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個等の整数であってよい。

[0024] 上記（C）においていう「置換、欠失、挿入、及び／又は付加」は、例えば、保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合にはPhe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合にはLeu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合にはGln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合にはLys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合にはAsp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合にはSer、Thr間で、お互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、

Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が例示される。

[0025] 上記（C）に示されるポリペプチドは、例えば、上記（A）または（B）に示されるポリペプチドのアミノ酸配列に対して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の類似性を有し、かつカプトガニB因子の機能を有するポリペプチド（ただし、193位のシステイン（Cys）残基は保存されている）であってもよい。なお、ここにいう「類似性」（similarity）は「同一性」（identity）を含む概念であるので、類似性を同一性と読み替えて当該ポリペプチドの好適態様に適用することができる。

[0026] 上記（C）に示されるポリペプチドは、193位のシステイン（Cys）残基が置換も欠失もされていない（193位のCys残基が保存されている）限り、上記（A）または（B）に示されるポリペプチドのアミノ酸配列において任意のアミノ酸残基が置換または欠失されていてよいが、タキプレウス・トリデンタツスB因子のポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号2）およびリムルス・ポリフェムスB因子のポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号4）の間で保存されている（同じ位置に存在する）他のCys残基も保存されている（置換も欠失もされていない）ことが好ましい。上記（C）に示されるポリペプチドは、具体的には、上記（A）または（B）に示されるポリペプチドのアミノ酸配列において112位、177位、193位、260位、307位、329位、340位、368位のCys残基が保存されてい

る（置換も欠失もされていない）ことが好ましい。

[0027] 上記（D）においていう「ペプチドタグ」とは、検出や精製を容易にするためにポリペプチドに付加されるペプチドを意味する。「ペプチドタグ」の長さおよびアミノ酸配列は、ペプチドタグを上記（A）～（C）のいずれかに示されるポリペプチドにペプチドタグを付加してなる融合ポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有する限り、特に限定されない。そのようなペプチドタグとしては、6×Hisペプチド（Hisタグ）、FLAGペプチド（FLAGタグ）、c-mycペプチド（mycタグ）、プロテインA、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-転移酵素（GST）等が例示される。

[0028] ペプチドタグは、上記（A）～（C）のいずれかに示されるポリペプチドに直接付加されていてもよいし、任意のリンカーを介して付加されていてもよい。ここにいう「リンカー」は、任意のアミノ酸配列からなるペプチドリリンカーであってよい。ここにいう「ペプチドリリンカー」の長さおよびアミノ酸配列は、ペプチドタグの場合と同様、ペプチドタグを上記（A）～（C）のいずれかに示されるポリペプチドに付加した融合ポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有する限り、特に限定されない。

[0029] ペプチドタグは、例えば、ポリペプチドのN末端および／またはC末端に付加されていてよい。ペプチドタグは、ポリペプチドのN末端側にのみ付加されていてよいし、C末端側にのみ付加されていてよいし、両末端に付加されていてよい。ポリペプチドに付加されるペプチドタグは1種であってもよいし、2種またはそれ以上であってもよい。また、ポリペプチドに付加される各種ペプチドタグはそれぞれ独立して1個であってもよく、2個またはそれ以上であってもよい。

[0030] 本発明において「カプトガニB因子の機能」とは、カプトガニのB因子が有するプロテアーゼ前駆体としての機能を意味する。「カプトガニB因子の機能」とは、具体的には、活性型C因子と接触して活性型（活性型B因子）に変化し、プロテアーゼ活性を発現する機能を意味する。

- [0031] カプトガニB因子の機能は、例えば、活性型C因子と接触して活性型（活性型B因子）に変化し、凝固酵素前駆体を切断して凝固酵素に変化させる機能である。また、カプトガニB因子の機能は、例えば、活性型C因子と接触して活性型（活性型B因子）に変化し、活性型B因子の基質となる検出用基質を切断して標識物質を遊離させる機能である。ここにいうC因子および凝固酵素前駆体ならびに検出用基質としては、例えば、後述する本発明の測定方法に記載された態様を好適に用いることができる。
- [0032] ポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有するか否かは、例えば、活性型C因子と接触させることによって当該ポリペプチドがプロテアーゼ活性を発現するか否かを評価することにより判定することができる。ポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有するか否かは、具体的には、例えば、後述する<実施例2>または<実施例5>に記載された方法により判定することができる。
- [0033] また、ポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有するか否かは、例えば、C因子と組み合わせて構成したリムルス試薬を用いた場合に、エンドトキシンと共存させることによってカスケード反応が進行するか否かを評価することにより判定することもできる。
- [0034] さらに、ポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有するか否かは、例えば、C因子および凝固酵素前駆体と組み合わせて構成したリムルス試薬を用いた場合に、エンドトキシンと共存させることによってカスケード反応が進行するか否かを評価することにより判定することもできる。
- [0035] よって、上記（C）に示されるポリペプチドは、例えば、カプトガニB因子の機能を指標として、カプトガニB因子の機能を失わずに1個もしくは複数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、及び／又は付加を行うことが可能な部位を、上記（A）又は（B）に示されるアミノ酸配列から選択して得ることができる。また、上記（D）に示されるポリペプチドは、例えば、カプトガニB因子の機能を指標として、カプトガニB因子の機能を失わずにペプチドタグを付加できるポリペプチドを、上記（A）～（C）のいずれかに示

されるポリペプチドから選択して得ることができる。

[0036] 本発明のポリペプチドの一態様は、カプトガニB因子そのものよりも高いプロテアーゼ活性を発現するポリペプチドである。カプトガニB因子そのものとは、具体的には、天然のカプトガニB因子と同じアミノ酸配列からなるポリペプチドである。カプトガニB因子そのものとは、より具体的には、例えば、上記(A)又は(B)に示されるアミノ酸配列において、193位のアミノ酸残基がアラニン(Ala)残基に置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチド(配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド)である。本発明のポリペプチドは、例えば、活性型C因子と接触して活性型(活性型B因子)に変化して発現するプロテアーゼ活性(比活性)が、カプトガニB因子そのものと比較して2倍以上、好ましくは5倍以上、より好ましくは10倍以上であることを特徴とするポリペプチドであってよい。また、本発明のポリペプチドは、例えば、活性型C因子と接触して活性型(活性型B因子)に変化して発現するプロテアーゼ活性(比活性)が、80 units/ $\mu$ mol以上、好ましくは200 units/ $\mu$ mol以上、より好ましくは300 units/ $\mu$ mol以上、特に好ましくは400 units/ $\mu$ mol以上であることを特徴とするポリペプチドであってよい。ここで、1 unitは37℃において1分間に1  $\mu$ molの基質(検出用基質)を切断するプロテアーゼ活性に相当する。酵素活性(units/ $\mu$ mol)の測定条件は、具体的には、例えば、＜実施例2＞または＜実施例5＞に記載の条件であってよい。

[0037] 本発明のポリペプチドの一態様は、カプトガニB因子そのものよりも高い熱安定性を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、例えば、50℃で2分間加熱したポリペプチドを活性型C因子と接触させて活性型(活性型B因子)に変化させた際に発現するプロテアーゼ活性(比活性)が、加熱していないポリペプチドと比較して50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上であることを特徴とするポリペプチドであってよい。また、本発明のポリペプチドは、例えば、60℃、70℃、80℃ま

たは90℃で2分間加熱した後においてもカプトガニB因子の機能を失わないことを特徴とするポリペプチドであってよい。

[0038] 本発明のポリペプチドは、例えば、60℃で2分間加熱したポリペプチドを活性型C因子と接触させて活性型（活性型B因子）に変化させた際に発現するプロテアーゼ活性（比活性）が、加熱していないポリペプチドと比較して30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上であることを特徴とするポリペプチドであってよい。また、本発明のポリペプチドは、例えば、90℃で2分間加熱したポリペプチドを活性型C因子と接触させて活性型（活性型B因子）に変化させた際に発現するプロテアーゼ活性（比活性）が、加熱していないポリペプチドと比較して20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上であることを特徴とするポリペプチドであってよい。

[0039] 活性型B因子のプロテアーゼ活性は、例えば、後述する<実施例2>または<実施例5>に記載の活性型C因子と接触させて活性化させたB因子（活性型B因子）のプロテアーゼ活性を測定する方法により測定することができる。

[0040] ここで、カプトガニのリムルス因子においてポリペプチドのアミノ酸配列は相同性があり、種の間において高い類似性を有している。アミノ酸配列の類似性は、周知のコンピュータソフトウェアを用いて算出することができ、例えば、アルゴリズムBLAST (Karlin, S., Altschul, SF. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 5873-7) やFASTA (Pearson, WR. (1990) Methods. Enzymol. 183, 63-98) を用いて算出することができる。アミノ酸配列の類似性は、具体的には、例えば、GENETYX（ゼネティックス社製）を用いて算出することができる。

[0041] 例えば、タキプレウス・トリデンタツスB因子のポリペプチド（配列番号2、NCBI番号：BAA03528.1）とリムルス・ポリフェムスB因子のポリペプチド（配列番号4、NCBI番号：XP\_013784210.1）は98.5%の類似性を有している。

- [0042] また、例えば、タキプレウス・トリデンタツスC因子のポリペプチド（配列番号12、NCBI番号：BAA14315.1）とリムルス・ポリフェムスC因子のポリペプチド（配列番号14）は99.5%の類似性を、タキプレウス・トリデンタツスC因子のポリペプチドとカルシノスコルピウス・ロツンディカウダC因子のポリペプチド（配列番号16、NCBI番号：AAB34361.1）は99.8%の類似性を、リムルス・ポリフェムスC因子のポリペプチドとカルシノスコルピウス・ロツンディカウダC因子のポリペプチドは99.4%の類似性を、それぞれ有している。
- [0043] さらに、例えば、タキプレウス・トリデンタツス凝固酵素前駆体のポリペプチド（配列番号18、NCBI番号：AAA30094.1）とリムルス・ポリフェムス凝固酵素前駆体のポリペプチド（配列番号20、NCBI番号：XP\_013783518.1）は96.0%の類似性を有している。
- [0044] よって、本発明の技術は、後述する実施例において、タキプレウス・トリデンタツスB因子およびリムルス・ポリフェムスB因子の各ポリペプチドの改変によって実証されるが、その他のカプトガニB因子のポリペプチドに対しても適用可能であることを当業者は理解できる。例えば、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダB因子およびタキプレウス・ギガスB因子の各ポリペプチドのアミノ酸配列ならびに当該ポリペプチドをコードする塩基配列は未だ知られていないものの、本発明の技術はこれらのB因子のポリペプチドに対しても適用できることを当業者は理解できる。
- [0045] 本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドからなる態様であってもよいし、他の成分を含む態様であってもよい。ここにいう「他の成分」は、本発明のポリペプチドの機能を失わせる成分でない限り特に制限されない。「他の成分」としては、緩衝剤、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、界面活性剤が例示される。また、「他の成分」としては、本発明のポリペプチドを生成する細胞に由来する本発明のポリペプチド以外の成分（核酸、タンパク質、糖質、脂質等）も例示される。
- [0046] 本発明のポリペプチドは、任意の形状であってよい。本発明のポリペプチ

ドは、例えば、凍結乾燥物等の固形状であってもよく、水性溶媒等の任意の溶媒に溶解された状態の液状であってもよい。

[0047] 本発明のポリペプチドにおいて本発明のポリペプチドが占める重量濃度は、例えば、0.001%以上、0.01%以上、0.1%以上、1%以上、5%以上、10%以上、25%以上、または50%以上であってよい。また、本発明のポリペプチドにおいて本発明のポリペプチドが占める重量濃度は、例えば、100%以下、75%以下、50%以下、25%以下、10%以下、5%以下、または1%以下であってよい。

[0048] 本発明のポリペプチドは、本明細書の記載に基づいて、公知の手法により調製することができる。本発明のポリペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法により調製することができる。本発明のポリペプチドは、具体的には、例えば、後述する本発明の製造方法により調製することができる。本発明のポリペプチドは、例えば、当該本発明の製造方法に従って細胞を培養して得られる培養液そのものであってもよいし、当該培養液を所望の程度に精製した画分であってよい。

[0049] <2>本発明の核酸

本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする核酸である。本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする核酸である限り、特に限定されない。本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする核酸である限り、遺伝暗号（コドン）の縮重（縮退）によって異なっているが同一のポリペプチドをコードする塩基配列を有する全ての核酸を包含する。ここにいう「核酸」には、DNAおよびRNAが包含される。

[0050] 本発明の核酸は、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。本発明の核酸が二本鎖である場合は、DNAとRNAからなるハイブリッド鎖であってもよい。また、本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする核酸であるから、本発明のポリペプチドをコードする領域内にイントロンの配列を有する核酸であってもよく、当該領域内にイントロンの配列を有しない核酸であってもよい。さらに、本発明の核酸は、mRNA（mRNA前駆体または

成熟 mRNA)であってもよく、mRNAから逆転写反応によって合成された DNA (cDNA)であってもよい。本発明の核酸は、単離された核酸であってよい。

[0051] 本発明の核酸は、例えば、カプトガニ B 因子のポリペプチドをコードする cDNA の塩基配列において、塩基番号 577 の塩基がチミン (T)、塩基番号 578 の塩基がグアニン (G)、塩基番号 579 の塩基がチミン (T) またはシトシン (C) に置換された塩基配列を有する DNA であって、かつカプトガニ B 因子の機能を有するポリペプチドをコードする DNA である。本発明の核酸としては、具体的には、下記 (a) ~ (d) のいずれかに示される DNA が例示される。

(a) 下記 (a1) ~ (a4) のいずれかに示される塩基配列を有する DNA。

(a1) 配列番号 5 における塩基番号 1 ~ 1200 で示される塩基配列。

(a2) 配列番号 5 における塩基番号 70 ~ 1200 で示される塩基配列。

(a3) 配列番号 6 における塩基番号 1 ~ 1200 で示される塩基配列。

(a4) 配列番号 6 における塩基番号 70 ~ 1200 で示される塩基配列。

(b) 下記 (b1) ~ (b4) のいずれかに示される塩基配列を有する DNA。

(b1) 配列番号 8 における塩基番号 1 ~ 1200 で示される塩基配列。

(b2) 配列番号 8 における塩基番号 70 ~ 1200 で示される塩基配列。

(b3) 配列番号 9 における塩基番号 1 ~ 1200 で示される塩基配列。

(b4) 配列番号 9 における塩基番号 70 ~ 1200 で示される塩基配列。

(c) 上記 (a) 又は (b) に示される DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA (ただし、塩

基番号 577～579 で示される塩基は保存されている) であって、かつカブトガニ B 因子の機能を有するポリペプチドをコードする DNA。

(d) 上記 (a) ～ (c) のいずれかに示される DNA にペプチドタグをコードする DNA を付加してなる融合 DNA の塩基配列を有し、かつカブトガニ B 因子の機能を有するポリペプチドをコードする DNA。

[0052] 本発明において「塩基配列を有する核酸」は、当該「塩基配列からなる核酸」を一態様として包含する。よって、本発明において「塩基配列を有する DNA」は、当該「塩基配列からなる DNA」を一態様として包含する。

[0053] 上記 (a) においていう配列番号 5 に示される塩基配列は、タキプレウス・トリデンタツス B 因子のポリペプチドをコードする DNA (配列番号 1) の塩基配列において、塩基番号 577 の塩基がチミン (T) に、塩基番号 578 の塩基がグアニン (G) に、塩基番号 579 の塩基がチミン (T) に置換された塩基配列である。

[0054] 上記 (a) においていう配列番号 6 に示される塩基配列は、タキプレウス・トリデンタツス B 因子のポリペプチドをコードする DNA (配列番号 1) の塩基配列において、塩基番号 577 の塩基がチミン (T) に、塩基番号 578 の塩基がグアニン (G) に置換された塩基配列である。

[0055] 上記 (b) においていう配列番号 8 に示される塩基配列は、リムルス・ポリフェムス B 因子のポリペプチドをコードする DNA (配列番号 3) の塩基配列において、塩基番号 577 の塩基がチミン (T) に、塩基番号 578 の塩基がグアニン (G) に置換された塩基配列である。

[0056] 上記 (b) においていう配列番号 9 に示される塩基配列は、リムルス・ポリフェムス B 因子のポリペプチドをコードする DNA (配列番号 3) の塩基配列において、塩基番号 577 の塩基がチミン (T) に、塩基番号 578 の塩基がグアニン (G) に、塩基番号 579 の塩基がシトシン (C) に置換された塩基配列である。

[0057] 上記 (c) においていう「ストリンジントな条件」とは、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意味す

る。よって、ここにいう「ストリンジントな条件」とは、例えば、上記（a）または（b）に示されるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAに対し、特異的なハイブリッドが形成される条件を意味する。ストリンジントな条件としては、類似性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の類似性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより類似性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件が例示される。このような条件としては、例えば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1%SDS、より好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1%SDS、に相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件が例示される。また、このような条件としては、50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES-NaOH（pH7.0）、10×Denhardt's solution、および100μg/mLサケ精子DNAからなる溶液中で42℃においてハイブリダイズさせ、2×SSCおよび0.1%SDSからなる溶液で室温において洗浄し、0.1×SSCおよび0.1%SDSからなる溶液で50℃においてさらに洗浄する条件も例示される（Sambrook J, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）。

[0058] 上記（c）に示されるDNAは、例えば、上記（a）または（b）に示されるDNAに対して核酸残基の置換、欠失、挿入、及び／又は付加（以下総称して「変異の導入」という）を同塩基配列における塩基番号577～579以外の領域に行うことで調製することができる。ここにいう「変異の導入」は、例えば、公知の方法により行うことが可能である。

[0059] 「変異の導入」を行う方法としては、制限酵素およびT4DNAリガーゼを用いる方法が例示される。すなわち、変異を導入したDNA断片の両末端を制限酵素によって限定分解し、同じ制限酵素で限定分解した上記（a）ま

たは（b）に示されるDNAをサブクロニングしたベクターと混合した後、T4 DNAリガーゼによって両者をライゲーションさせることにより、変異を導入したDNAを得ることができる。ここにいう「変異を導入したDNA断片」は、例えば、そのような変異を導入したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR反応により得ることができる。

[0060] また、「変異の導入」を行う方法としては、部位特異的変異導入法も例示される。部位特異的変異導入法としては、PCR反応を用いる方法（Higuchi, R. (1989) in PCR technology (Erlich, H. A., ed.) Stockton Press, New York, pp. 61-70、Carter, P. (1987) Methods Enzymol. 154, 382-403）や、ファージを用いる方法（Kramer, W., Fritz, H. J. (1987) Methods Enzymol. 154, 350-67、Kunkel, T. A., Roberts, J. D., Zakour, R. A. (1987) Methods Enzymol. 154, 367-82）が例示される。部位特異的変異導入法は、具体的には、例えば、KOD-Plus-Mutagenesis Kit（東洋紡社製）を利用して行うことができる。

[0061] 上記（c）に示されるDNAは、塩基番号577～579で示される部位に変異の導入が行われていない（塩基番号577～579で示される塩基が保存されている）限り、上記（a）または（b）に示されるDNAの塩基配列において任意の部位に変異の導入が行われていてよいが、タキプレウス・トリデンタツスB因子のポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号2）およびリムルス・ポリフェムスB因子のポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号4）の間に保存されている（同じ位置に存在する）他のCys残基も保存されている（置換も欠失もされていない）ポリペプチドをコードするDNAであることが好ましい。上記（c）に示されるDNAは、具体的には、塩基番号334～336、塩基番号529～531、塩基番号577～579、塩基番号778～780、塩基番号919～921、塩基番号985～987、塩基番号1018～1020、塩基番号1102～1104で示される塩基配列（コドン）が保存されている（TGTまたはTGCである）ことが好ましい。

- [0062] 上記（d）においていう「ペプチドタグ」の態様は、前記「＜1＞本発明のポリペプチド」における態様と同じである。よって、DNAがコードするポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有する限りにおいて、ペプチドタグをコードするDNAを上記（a）、（b）または（c）に示されるDNAに付加した融合DNAも本発明の核酸として例示される。
- [0063] このような「ペプチドタグをコードするDNAを付加した融合DNA」は、例えば、制限酵素およびT4 DNAリガーゼを用いる方法により調製することができる。すなわち、ペプチドタグをコードするDNA断片の両末端を制限酵素によって限定分解し、同じ制限酵素で限定分解した上記（a）～（c）のいずれかに示されるDNAをサブクローニングしたベクターと混合した後、T4 DNAリガーゼによって両者をライゲーションさせることにより、当該DNAを得ることができる。
- [0064] また、このような「ペプチドタグをコードするDNAを付加した融合DNA」は、例えば、当該ペプチドタグをコードするDNAの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、上記（a）～（c）のいずれかに示されるDNAを鋳型として用いるPCR反応によっても得ることができる。
- [0065] 本発明の核酸がコードするポリペプチドは、例えば、後述する本発明の製造方法により調製することができる。本発明の製造方法としては、具体的には、後述する＜実施例1＞または＜実施例4＞に記載の哺乳類細胞を用いる方法が例示される。
- [0066] 本発明の核酸がコードするポリペプチドは、カプトガニB因子の機能を有するポリペプチドである。ここにいう「カプトガニB因子の機能」の定義は、前記「＜1＞本発明のポリペプチド」における記載の通りである。よって、前記「＜1＞本発明のポリペプチド」に記載された方法に従って、核酸がコードするポリペプチドがカプトガニB因子の機能を有するか否かを判定することにより、上記（c）または（d）に示されるDNAを選択することができる。

[0067] 本発明の核酸は、本明細書の記載に基づいて、公知の手法により調製することができる。本発明の核酸は、遺伝子工学的手法によって調製することができる。本発明の核酸は、具体的には、例えば、後述する<実施例1>または<実施例4>に記載のPCR反応により調製することができる。また、本発明の核酸は、例えば、その塩基配列を化学的に全合成することによっても調製することができる。

[0068] <3>本発明のベクター

本発明のベクターは、本発明の核酸を保持するベクターである。本発明のベクターが保持する本発明の核酸の種類や数は特に限定されない。本発明のベクターが保持する本発明の核酸は1種であってもよいし、2種またはそれ以上であってもよい。また、本発明のベクターが保持する各種の本発明の核酸はそれぞれ独立して1個（1コピー）であってもよく、2個（2コピー）またはそれ以上であってもよい。

[0069] ここにいう「ベクター」は、本発明の核酸の増幅および／または本発明の核酸がコードするポリペプチドの発現のために用いられる核酸分子を意味する。本発明においてベクターは、これを導入する細胞において本発明の核酸もしくは当該ベクターの増幅または本発明の核酸がコードするポリペプチドの発現が可能なベクターである限り、特に限定されない。そのようなベクターとしては、ファージ、プラスミド、ウイルス等が例示される。

[0070] ベクターは、これを導入する細胞の種類や本発明の核酸がコードするポリペプチドの所望の発現量等の諸条件に応じて適宜選択することができる。例えば、細胞として細菌細胞等の原核細胞を利用する場合、ベクターとしては、ファージやプラスミドを好適に利用することができる。また、例えば、細胞として昆虫細胞や哺乳類細胞等の真核細胞を利用する場合、ベクターとしては、プラスミドやウイルスを好適に利用することができる。

[0071] 哺乳類細胞で利用できるプラスミドとしては、例えば、pCA7 (Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M., Yanagi, Y. (2005) J. Virol. 79, 14346-54.)、pCI-neo (Promega社製) が例示される。昆虫細胞で

利用できるプラスミドとしては、pIZ-V5 (Life Technologies社製) が例示される。細菌細胞で利用できるプラスミドとしては、pBlue Script II SK(+) (アジレント・テクノロジー社製)、pET (タカラバイオ社製) が例示される。

- [0072] 哺乳類細胞で利用できるウイルスとしては、動物ウイルスが例示される。動物ウイルスとしては、センダイウイルスが例示される。昆虫細胞で利用できるウイルスとしては、バキュロウイルス (Baculovirus) が例示される。バキュロウイルスとしては、核多角体病ウイルス (Nuclear Polyhedrosis Viruses; NPV) が例示される。
- [0073] 細菌細胞で利用できるファージとしては、バクテリオファージ (Bacteriophage) が例示される。バクテリオファージとしては、ラムダファージ (λファージ) や T4 ファージが例示される。
- [0074] 本発明のベクターは、例えば、ベクターへ本発明の核酸を導入することにより得られる。ベクターへの本発明の核酸の導入は、常法に従って行うことができる。
- [0075] ベクターに本発明の核酸を導入する方法としては、ベクターが有するマルチクローニングサイトを利用する方法が例示される。例えば、ベクターが有するマルチクローニングサイトに存在する制限酵素サイトから任意の2つを選択し、ベクターと本発明の核酸をこれらの制限酵素で限定分解した後にライゲーションすることにより、本発明のベクターを得ることができる。当該用途における本発明の核酸としては、例えば、制限酵素サイトを5'末端側に付加したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、本発明の核酸を鋳型として用いるPCR反応によって得られるDNAを用いることができる。また、例えば、カプトガニB因子のポリペプチドをコードするDNAが挿入されたベクターを鋳型としたインバースPCR反応によって、当該ポリペプチドのアミノ酸配列において193位のアミノ酸残基がシステイン (Cys) 残基となるように変異の導入を行うことにより、本発明のベクターを得ることもできる。本発明のベクターを製造する方法としては、具体的には、後

述する＜実施例1＞または＜実施例4＞に記載された方法が例示される。

[0076] ＜4＞本発明の細胞

本発明の細胞は、本発明の核酸および／または本発明のベクター（以下、総称して「本発明のベクター等」という）を保持する細胞である。本発明のベクターは本発明の核酸を有するベクターであるので、本発明のベクターを保持する細胞は、本発明の核酸を保持する細胞にも該当する。

[0077] 本発明の細胞は、例えば、本発明のベクター等を細胞に導入することにより得ることができる。よって、本発明の細胞は、例えば、細胞を本発明のベクター等を用いて形質転換（形質導入）することにより得ることができる。本発明において細胞は、本発明のベクター等の導入やこれを用いた形質転換が可能である限り特に限定されない。本発明において細胞は、単離された細胞であることが好ましい。

[0078] 本発明の細胞が保持する本発明のベクター等の種類や数は特に限定されない。本発明の細胞が保持する本発明のベクター等は1種であってもよいし、2種またはそれ以上であってもよい。また、本発明の細胞が保持する各種の本発明のベクター等はそれぞれ独立して1個（1コピー）であってもよく、2個（2コピー）またはそれ以上であってもよい。

[0079] 本発明の細胞は、染色体上に本発明のベクター等を保持していてもよく、染色体外に本発明のベクター等を保持していてもよく、染色体上と染色体外の両方に本発明のベクター等を保持していてもよい。本発明の細胞は、具体的には、本発明のベクター等を導入またはこれを用いて形質転換された細胞であってよい。

[0080] 本発明の細胞において「細胞」は、例えば、宿主細胞である。ここにいう「宿主細胞」は、本発明のベクター等を増幅させるための宿主として、および／または本発明のベクター等がコードする本発明のポリペプチドを発現させるための宿主として用いられる細胞を意味する。

[0081] 本発明において細胞は、本発明のベクター等を使用する目的に応じて適宜選択できる。

- [0082] 例えば、本発明のベクター等の増幅を目的とする場合は、細胞は、原核細胞であることが好ましく、具体的には、細菌細胞であることが好ましく、中でも大腸菌 (*Escherichia coli*) であることが好ましい。大腸菌としては、J M 1 0 9 株や D H 5  $\alpha$  株が例示される。
- [0083] また、例えば、本発明のベクター等がコードするポリペプチドの発現を目的とする場合は、細胞としては、例えば、その細胞が本来的に有しないポリペプチドを発現させるために通常用いられる細胞を利用できる。そのような細胞は、例えば、真核細胞であることが好ましく、具体的には、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞または酵母細胞であることが好ましい。真核細胞は、哺乳類細胞または昆虫細胞であることが好ましく、哺乳類細胞であることがより好ましい。
- [0084] 哺乳類細胞は、霊長類の細胞またはげっ歯類の細胞であることが好ましい。霊長類としては、ヒト、サル、チンパンジーが例示される。霊長類の細胞としてはヒトの細胞が例示される。ヒトの細胞としては、具体的には、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 (H E K 細胞) が例示される。H E K 細胞としては、H E K 2 9 3 細胞が例示される。H E K 2 9 3 細胞としては、H E K 2 9 3 S 細胞が例示される。H E K 2 9 3 S 細胞としては、H E K 2 9 3 S G n T 1 - 細胞が例示される。また、げっ歯類としては、ハムスター、マウス、ラット、モルモットが例示される。げっ歯類の細胞としてはハムスターの細胞が例示される。ハムスターの細胞としては、チャイニーズハムスターの細胞が例示される。チャイニーズハムスターの細胞としては、C H O 細胞が例示される。C H O 細胞としては、C H O D G 4 4 細胞、C H O - K 1 細胞、C H O - S 細胞が例示される。
- [0085] 細胞への核酸の導入は、常法に従って行うことができる。本発明において細胞へ核酸を導入する方法は、細胞への本発明のベクター等の導入が可能な方法である限り特に限定されない。細胞へ核酸を導入する方法としては、具体的には、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、D E A E デキストラン法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法が例示され

る。細胞の形質転換は、例えば、後述する<実施例 1>または<実施例 4>に記載された方法により行うことができる。

[0086] <5>本発明の製造方法

本発明の製造方法は、本発明の細胞を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法である。本発明の製造方法は、具体的には、本発明の細胞を用いて本発明のポリペプチドを生成させる工程（以下「生成工程」という）を含む、ポリペプチドの製造方法である。生成工程は、例えば、本発明の細胞を培養して本発明のポリペプチドを発現させる工程である。

[0087] 本発明の製造方法において本発明の細胞を培養する条件（以下単に「培養条件」という）は、本発明のポリペプチドを細胞に発現させることができる条件である限り特に制限されない。培養条件は、細胞の種類や本発明のベクター等がコードする本発明のポリペプチドの所望の発現量等の諸条件に応じて適宜選択することができる。細胞の培養は、例えば、当該細胞の培養に通常用いられる培地を用いることにより行うことができる。培養条件としては、具体的には、後述する<実施例 1>または<実施例 4>に記載の条件が例示される。

[0088] 本発明の製造方法は、生成工程を含む限り、さらに他の工程を含んでもよい。ここにいう「他の工程」は、例えば、生成工程において生成させた本発明のポリペプチドを採取する工程（以下「採取工程」という）である。ここにいう「採取工程」は、例えば、細胞の培養液から本発明のポリペプチドを含む画分を得る工程である。

[0089] 例えば、本発明のポリペプチドが細胞外に分泌される態様で発現された場合、採取工程は、培養液そのもの、遠心分離後の上清、またはこれらをカラム等にして精製した後の画分を本発明のポリペプチドとして採取する工程であってよい。

[0090] また、例えば、本発明のポリペプチドが細胞内に蓄積される態様で発現された場合、採取工程は、細胞そのもの、細胞を破碎して得られる破碎物（細胞残渣）もしくは抽出液、またはこれらをカラム等にして精製した後の画

分を本発明のポリペプチドとして採取する工程であってよい。

[0091] 上記において「破碎」は、細胞の種類に応じて適宜選択する方法により実施できる。破碎する方法としては、ホモジェナイズする方法、超音波処理する方法、凍結融解する方法、界面活性剤を添加する方法が例示される。破碎に用いるこれらの手法は適宜組み合わせて用いることができる。

[0092] 上記において「精製」は、ポリペプチドの精製に通常用いられる手法により行うことができる。そのような方法としては、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト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が例示される。これらの手法は適宜組み合わせて用いることができる。

[0093] このようにして採取した画分中に本発明のポリペプチドが含まれているか否かは、例えば、前記「＜1＞本発明のポリペプチド」において記載した方法に従い、カプトガニB因子の機能を有するポリペプチドの有無を測定して判定することができる。また、このようにして採取した画分中に本発明のポリペプチドが含まれているか否かは、例えば、本発明のポリペプチドと結合する抗体を用いる方法によって判定することもできる。

[0094] ＜6＞本発明の測定方法

本発明の測定方法は、本発明のポリペプチドを用いてエンドトキシンの測定を行う方法である。本発明において、測定は、検出、検知、および定量を含む総称として用いられる。よって、本発明の測定方法は、例えば、エンドトキシンの検出方法、エンドトキシンの検知方法、またはエンドトキシンの定量方法であってもよい。

[0095] 本発明の測定方法は、例えば、下記（1）および（2）の工程を含む、エンドトキシンの測定方法である。

（1）本発明のポリペプチド、カプトガニC因子、及び被験試料を混合する工程。

（2）上記ポリペプチドのプロテアーゼ活性を測定する工程。

- [0096] 上記（１）の工程は、本発明のポリペプチド、カプトガニＣ因子および被験試料を混合する工程である。被験試料がエンドトキシンを含有する試料である場合、当該エンドトキシンと接触したＣ因子が活性型Ｃ因子に変化し、続いてＢ因子が活性型Ｂ因子に変化するカスケード反応が進行する。
- [0097] 上記（１）の工程においては、本発明のポリペプチド、Ｃ因子および被験試料を混合する操作を含んでいる限り、さらに他の物質を混合する操作を含んでいてもよい。ここにいう「他の物質」としては、凝固酵素前駆体、緩衝剤、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、界面活性剤、検出用基質が例示される。上記（１）の工程が本発明のポリペプチド、Ｃ因子、凝固酵素前駆体および被験試料を混合する工程であり、かつ、被験試料がエンドトキシンを含有する試料である場合、当該エンドトキシンと接触したＣ因子が活性型Ｃ因子に変化し、Ｂ因子が活性型Ｂ因子に変化し、凝固酵素前駆体が凝固酵素に変化するカスケード反応が進行する。
- [0098] 本発明において「Ｃ因子」は、カプトガニＣ因子の機能を有するＣ因子である限り特に限定されない。ここにいう「カプトガニ」の定義は、前記「＜１＞本発明のポリペプチド」における記載の通りである。「カプトガニＣ因子の機能」とは、カプトガニのＣ因子が有するプロテアーゼ前駆体としての機能を意味する。「カプトガニＣ因子の機能」とは、具体的には、エンドトキシンの共存下で活性型（活性型Ｃ因子）に変化し、プロテアーゼ活性を発現する機能を意味する。カプトガニＣ因子の機能は、例えば、エンドトキシンの共存下で活性型（活性型Ｃ因子）に変化し、Ｂ因子を切断して活性型（活性型Ｂ因子）に変化させる機能である。
- [0099] 本発明において「凝固酵素前駆体」は、カプトガニ凝固酵素前駆体の機能を有する凝固酵素前駆体である限り特に限定されない。ここにいう「カプトガニ」の定義は、前記「＜１＞本発明のポリペプチド」における記載の通りである。「カプトガニ凝固酵素前駆体の機能」とは、カプトガニの凝固酵素前駆体が有するプロテアーゼ前駆体としての機能を意味する。「カプトガニ凝固酵素前駆体の機能」とは、具体的には、活性型Ｂ因子の共存下で活性型

(凝固酵素)に変化し、プロテアーゼ活性を発現する機能を意味する。カプトガニ凝固酵素前駆体の機能は、例えば、活性型B因子の共存下で活性型(凝固酵素)に変化し、コアギュロゲンを切断してコアギュリングルを形成させる機能である。また、カプトガニ凝固酵素前駆体の機能は、例えば、活性型B因子の共存下で活性型(凝固酵素)に変化し、凝固酵素の基質となる検出用基質を切断して標識物質を遊離させる機能である。

[0100] 本発明においてC因子および凝固酵素前駆体は、それぞれ独立して、カプトガニから得られる天然のリムルス因子であってもよく、遺伝子工学的手法によって調製された組換え体のリムルス因子であってもよく、天然のリムルス因子と組換え体のリムルス因子を任意の割合で含む混合物であってもよい。

[0101] 天然のリムルス因子は、カプトガニの血球を原料とし、常法に従って取得されたライセートを適宜精製して分取されたものであってもよい。リムルス因子の分取は、例えば、文献(Nakamura, T., Horiuchi, T., Morita, T., Iwanaga, S. (1986) J. Biochem. 99, 847-57)に記載された方法を参照して行うことができる。

[0102] 組換え体のリムルス因子は、リムルス因子のポリペプチドをコードする核酸を導入した細胞に当該リムルス因子を生成させることで取得することができる。リムルス因子をコードする核酸の塩基配列は、NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))等の公知のデータベースから取得できる。

[0103] 細胞によるリムルス因子の生成は、公知の手法により行うことができる。細胞によるリムルス因子の生成は、具体的には、後述する<実施例1>または<実施例4>に記載の哺乳類細胞を用いる方法が例示される。また、細胞によるリムルス因子の生成は、例えば、文献(国際公開第2012/118226号、または国際公開第2014/092079号)に記載された方法を参照して行うこともできる。さらに、細胞によるリムルス因子の生成は、例えば、前記「<5>本発明の製造方法」に記載された方法を準用して行うこともできる。

[0104] 本発明においてC因子および凝固酵素前駆体の具体的な態様は、前記「＜1＞本発明のポリペプチド」の記載を準用して表すことができる。例えば、本発明においてリムルス因子は、組換え体であることが好ましい。また、例えば、本発明においてリムルス因子の生成に用いる細胞は、哺乳類細胞または昆虫細胞であることが好ましく、哺乳類細胞であることが好ましい。

[0105] 本発明におけるC因子としては、具体的には、下記（１）～（５）のいずれかに示されるポリペプチドが例示される。

（１）配列番号１２に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（２）配列番号１４に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（３）配列番号１６に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（４）上記（１）～（３）のいずれかに示されるアミノ酸配列において、１個若しくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつカプトガニC因子の機能を有するポリペプチド。

（５）上記（１）～（４）のいずれかに示されるポリペプチドにペプチドタグを付加した融合ポリペプチドのアミノ酸配列を有し、かつカプトガニC因子の機能を有するポリペプチド。

[0106] 本発明における凝固酵素前駆体としては、具体的には、下記（６）～（９）のいずれかに示されるポリペプチドが例示される。

（６）配列番号１８に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（７）配列番号２０に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（８）上記（６）又は（７）に示されるアミノ酸配列において、１個若しくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつカプトガニ凝固酵素前駆体の機能を有するポリペプチド。

（９）上記（６）～（８）のいずれかに示されるポリペプチドにペプチドタグを付加した融合ポリペプチドのアミノ酸配列を有し、かつカプトガニ凝固酵素前駆体の機能を有するポリペプチド。

- [0107] 上記（１）においていう配列番号１２に示されるアミノ酸配列は、タキプレウス・トリデンタツスＣ因子のポリペプチドのアミノ酸配列である。
- [0108] 上記（２）においていう配列番号１４に示されるアミノ酸配列は、リムルス・ポリフェムスＣ因子のポリペプチドのアミノ酸配列である。
- [0109] 上記（３）においていう配列番号１６に示されるアミノ酸配列は、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダＣ因子のポリペプチドのアミノ酸配列である。
- [0110] 上記（６）においていう配列番号１８に示されるアミノ酸配列は、タキプレウス・トリデンタツス凝固酵素前駆体のポリペプチドのアミノ酸配列である。
- [0111] 上記（７）においていう配列番号２０に示されるアミノ酸配列は、リムルス・ポリフェムス凝固酵素前駆体のポリペプチドのアミノ酸配列である。
- [0112] 上記（４）および（８）においていう「複数個」および「置換、欠失、挿入、及び／又は付加」の態様は、前記「＜１＞本発明のポリペプチド」における態様と同じである。
- [0113] 上記（４）に示されるポリペプチドは、例えば、上記（１）～（３）のいずれかに示されるアミノ酸配列全体に対して、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、特に好ましくは９９％以上の類似性を有し、かつカプトガニＣ因子の機能を有するポリペプチドであってもよい。また、上記（８）に示されるポリペプチドは、例えば、上記（６）又は（７）に示されるアミノ酸配列全体に対して、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、特に好ましくは９９％以上の類似性を有し、かつカプトガニ凝固酵素前駆体の機能を有するポリペプチドであってもよい。なお、これらにおいていう「類似性」（similarity）は、「同一性」（identity）を含む概念であるので、類似性を同一性と読み替えて当該ポリペプチドの好適態様に適用することができる。
- [0114] 上記（４）および（８）においていう「ペプチドタグ」の態様は、前記「

＜1＞本発明のポリペプチド」における態様と同じである。

- [0115] 本発明において「検出用基質」は、活性化したリムルス因子の有無やその量、カスケード反応の進行を測定するために用いられる基質である。検出用基質は、活性型B因子を測定するための基質であってもよく、凝固酵素を測定するための基質であってもよい。検出用基質は、活性化したリムルス因子の基質となる基質である限り特に限定されない。検出用基質は、例えば、タンパク質、ペプチド、またはこれらの誘導体であってもよい。
- [0116] 上記タンパク質は、天然のタンパク質であってもよく、組換えのタンパク質であってもよい。上記タンパク質としては、凝固酵素の基質であるコアギュローゲンが例示される。例えば、天然のコアギュローゲンは、ライセートから分取して調製することができる。また、例えば、組換えのコアギュローゲンは、文献（宮田ら、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.29; P30-43; 1986）に記載された方法を参照して調製することができる。
- [0117] 上記ペプチドは、例えば、化学的に合成された合成基質であってもよい。合成基質は、活性化したリムルス因子の有無やその量、カスケード反応の進行を測定するのに好適な基質である限り特に制限されない。合成基質は、ペプチドの誘導体であることが好ましい。
- [0118] 合成基質としては、一般式 $Y-X-Z$ （式中、Yは存在しても存在しなくてもよく、Yが存在する場合はYは保護基であり、Xはペプチドであり、Zは標識物質である。）で表される基質が例示される。このような合成基質は、活性化されたりムルス因子によって $X-Z$ 間の共有結合が切断され、標識物質Zが遊離する性質を有していればよい。前記一般式において、保護基（Y）は、ペプチドのN末端のアミノ基に対する保護基であることが好ましい。前記一般式において、 $Y-X$ 間の結合は、保護基のカルボキシ基とペプチドのN末端の $\alpha$ アミノ基との間に形成されるアミド結合であることが好ましい。また、前記一般式において、 $X-Z$ 間の結合は、ペプチドのC末端のカルボキシ基と標識物質Zのアミノ基との間に形成されるアミド結合であることが好ましい。

- [0119] 保護基（Y）は特に制限されず、ペプチドの保護に適用可能な公知の保護基を用いることができる。保護基（Y）としては、tert-ブトキシカルボニル基（Boc）、ベンジルオキシカルボニル基（Cbz）、ベンジル基（Bzl）、ベンゾイル基（Bz）、アセチル基（Ac）が例示される。
- [0120] ペプチド（X）は、活性化されたリムルス因子の基質となるアミノ酸配列を有するペプチドである限り、特に限定されない。ペプチドは、セリンプロテアーゼの測定に好適な基質であることが好ましく、Arg（R）残基をC末端に有するペプチドであることが好ましい。
- [0121] リムルス因子がB因子である場合、ペプチドは一般式X-Thr-Arg（式中、Xは任意のアミノ酸である。）で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが好ましい。具体的には、リムルス因子がB因子である場合、ペプチドはLeu-Thr-Arg（LTR）またはMet-Thr-Arg（MTR）で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが好ましい。
- [0122] リムルス因子が凝固酵素前駆体である場合、ペプチドは一般式X-Gly-Arg（式中、Xは任意のアミノ酸である。）で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが好ましい。具体的には、リムルス因子が凝固酵素前駆体である場合、ペプチドはLeu-Gly-Arg（LGR）またはGlu-Gly-Arg（EGR）で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが好ましい。
- [0123] 標識物質（Z）は特に制限されず、プロテアーゼ活性の測定に適用可能な公知の標識物質を用いることができる。標識物質としては、例えば、ペプチドから遊離すると発色または蛍光として検出できるようになる標識物質を用いることができる。そのような標識物質としては、パラニトロアニリン（pNA）、7-メトキシクマリン-4-酢酸（MCA）、2,4-ジニトロアニリン（DNP）が例示される。また、標識物質としては、例えば、ペプチドから遊離すると電気化学測定法（ボルタンメトリー、アンペロメトリー等）によって検出できるようになる標識物質を用いることができる。そのよう

な標識物質としては、p-アミノフェノール（pAP）、p-メトキシアニリン（pMA）、N-メチル-p-フェニレンジアミン（MPDD）、N、N'-ジメチル-p-フェニレンジアミン（DMPD）が例示される。

[0124] 上記本発明の測定方法における（１）の工程において本発明のポリペプチド、リムルス因子、被験試料、検出用基質および他の物質（緩衝剤等）は、任意の順序で添加して混合されてよい。例えば、上記（１）の工程において被験試料は、本発明のポリペプチド、リムルス因子、検出用基質、他の物質の混合物に対して添加して混合されてよい。また、例えば、上記（１）の工程において被験試料は、本発明のポリペプチド、リムルス因子、検出用基質、他の物質の混合物を添加されて混合されてよい。上記（１）の工程において混合は、例えば、一端に開口を有する容器（試験管、バイアル等）の内部（容器内）で行われてよい。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、天然のタンパク質や遺伝子組換えタンパク質、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。

[0125] 上記（２）の工程は、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を測定する工程である。当該工程は、例えば、検出用基質から遊離した標識物質を測定する工程である。当該工程では、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性（全活性）に応じた量（モル数）の標識物質が検出用基質から遊離されるため、検出用基質から遊離した標識物質を測定することにより本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を測定することができる。検出用基質から遊離した標識物質は、例えば、分光光度計や蛍光光度計等の光学的機器によって測定することができる。また、検出用基質から遊離した標識物質は、例えば、ボルタンメトリー計やアンペロメトリー計等の電気化学的測定機器によって測定することができる。例えば、当該工程において示される測定値をブランク値（エンドトキシンフリーの被験試料を測定対象とした場合の測定値）と比較することにより、被験試料中のエンドトキシンの有無を判定すること

ができる。

[0126] 本発明の測定方法は、上記（１）および（２）の工程に加えて、さらに他の工程を含んでいてもよい。本発明の測定方法は、例えば、上記（２）の工程において得られる測定をブランク値と比較することにより、被験試料中のエンドトキシンの有無を判定する工程を含んでいてもよい。また、本発明の測定方法は、例えば、混合液のゲル化の有無を判定することにより、被験試料中のエンドトキシンの有無を判定する工程を含んでいてもよい。さらに、本発明の測定方法は、例えば、上記（２）の工程において得られる測定値を他の値に変換する工程を含んでいてもよい。測定値を他の値に変換する工程としては、例えば、測定値に基づき、エンドトキシンの量を算出する工程が例示される。そのような工程は、具体的には、例えば、被験試料を濃度既知の標準物質に置き換えて測定した時に得られる測定値と標準物質の濃度との関係（標準曲線）に基づき、被験試料を測定した時に得られる測定値をエンドトキシンの量に変換する工程である。

[0127] 本発明の測定方法においてリムルス反応は、水あるいは緩衝液等の水性溶媒中で行われることが好ましい。

[0128] < 7 > 本発明の試薬

本発明の試薬は、本発明のポリペプチドを構成成分として含むことを特徴とするエンドトキシン測定用試薬である。本発明の試薬は、本発明の測定方法を行うために好適に用いることができる。

[0129] 本発明の試薬は、本発明のポリペプチドを構成成分として含む限り、他の構成成分をさらに含んでいてよい。ここにいう他の構成成分としては、例えば、カプトガニＣ因子、カプトガニ凝固酵素前駆体、検出用基質、緩衝剤、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、界面活性剤が例示される。

[0130] 本発明の試薬は、本発明のポリペプチドの他にカプトガニＣ因子を構成成分として含んでいることが好ましく、さらにカプトガニ凝固酵素前駆体を構成成分として含んでいることがより好ましい。また、本発明の試薬は、凍結乾燥品として提供されることが好ましい。

## [0131] &lt;8&gt;本発明のキット

本発明のキットは、本発明のポリペプチドまたは本発明の試薬を構成成分として含むことを特徴とするエンドトキシン測定用キットである。本発明のキットは、本発明の測定方法を行うために好適に用いることができる。

[0132] 本発明のキットは、本発明のポリペプチドまたは本発明の試薬を構成成分として含む限り、他の構成成分をさらに含んでよい。ここにいう他の構成成分としては、例えば、カプトガニC因子、カプトガニ凝固酵素前駆体、検出用基質、緩衝液、蒸留水、エンドトキシン標準品、マイクロプレート、製品情報を記載した添付文書が例示される。

[0133] 本発明のキットは、各構成成分をそれぞれ別個に含んでいてもよいし、各構成成分を任意に組み合わせてなる混合物として含んでいてもよい。本発明のキットは、例えば、各リムルス因子を別個に含んでいてもよいし、予め混合された態様として含んでいてもよいし、さらに検出用基質も予め混合された態様として含んでいてもよい。

### 実施例

[0134] 以下、実施例によって本発明の一態様を具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの実施例のみに限定されない。

[0135] 本発明の実施例においては、以下の略号が使用される場合がある。

(a) T F C : タキプレウス・トリデンタツスC因子

(b) T F B : タキプレウス・トリデンタツスB因子

(c) M u r a s a m e - T F B : タキプレウス・トリデンタツスB因子改変体

(d) L F C : リムルス・ポリフェムスC因子

(e) L F B : リムルス・ポリフェムスB因子

(f) M u r a s a m e - L F B : リムルス・ポリフェムスB因子改変体

[0136] 本発明の実施例において発現ベクターの調製、リムルス因子の調製、およびリムルス因子の活性測定は、文献 (Kobayashi, Y., Takahashi, T., Shibata, T., Ikeda, S., Koshiba, T., Mizumura, H., Oda, T., Kawabata, S. (

2015) J. Biol. Chem. 290, 19379-86) に記載された方法を参照して行うことができる。

- [0137] 本発明の実施例においてPCR反応は、別段の記載がある場合を除き、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs社製) を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。
- [0138] 本発明の実施例においてPCR反応液からのDNAの精製は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製) を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。
- [0139] 本発明の実施例においてDNAの分取は、DNAを含む試料をアガロースゲル電気泳動に供し、目的のDNA断片をメスで切り取って回収した後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製) を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。
- [0140] 本発明の実施例においてライゲーション反応は、別段の記載がある場合を除き、T4 DNA ligase (New England Biolabs社製) を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。
- [0141] 本発明の実施例においてベクターの増幅と精製は、ベクターを用いて形質転換した大腸菌を培養した後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega社製) を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。具体的には、ベクターを用いて形質転換した大腸菌DH5 $\alpha$ 株をアンピシリン含有LB (LB/Amp) 寒天培地のプレート上に塗布して終夜静置培養して得られるシングルコロニーをアンピシリン含有LB培地に植菌して37℃で終夜振盪培養してベクターの増幅を行い、上記培養液中の大腸菌の菌体からベクターを精製した。
- [0142] 本発明の実施例においてDNAの脱リン酸化は、Alkaline Phosphatase (E. coli C75) (タカラバイオ社製) を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。
- [0143] 本発明の実施例においてタンパク質濃度の測定は、Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社製) を用い、添付のプロトコールに従

った操作を行って実施した。また、本発明の実施例においてリムルス因子のモル濃度は、上記測定により得られるタンパク質濃度をリムルス因子の分子量で除して算出した。

[0144] <参考例 1> T F C の調製

(1) T F C 発現ベクターの作製

タキプレウス・トリデンタツス C 因子 (T F C) の発現ベクターは、以下の手順に従って作製した。

[0145] N 末端のシグナル配列を除く T F C の全長をコードする D N A (配列番号 1 1 における塩基番号 7 6 ~ 3 0 5 7 で示される塩基配列を有する D N A) を P C R 反応により調製した。P C R 反応の鋳型には、pSecTag2A ベクター (Invitrogen 社製) に T F C をコードする D N A が挿入されたベクター (Koshi ba, T., Hashii, T., Kawabata, S. (2007) J. Biol. Chem. 282, 3962-7) を用いた。また、P C R 反応のプライマーには、プライマー 1 (配列番号 2 1) および BGH reverse プライマー (配列番号 2 8) を用いた。

[0146] 上記 P C R 反応によって得られた D N A を精製し、上記 D N A に対して制限酵素 (Age I および Kpn I) による限定分解と分取を行った。pHLsec ベクター (Aricescu, AR., Lu, W., Jones, EY. (2006) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 62, 1243-50) に対して上記と同様にして制限酵素による限定分解と分取を行った後、上記 D N A とのライゲーション反応を行った。

[0147] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターに対して制限酵素 (EcoR I) による限定分解と分取を行い、D N A 断片 1 (pHLsec ベクター由来の分泌シグナルのアミノ酸配列をコードする塩基配列および配列番号 1 1 における塩基番号 7 6 ~ 2 2 9 8 で示される塩基配列を有し、5' 末端および 3' 末端に EcoR I の粘着末端を有する D N A) を得た。また、上記ベクターに対して制限酵素 (EcoR I および Xho I) による限定分解と分取を行い、D N A 断片 2 (配列番号 1 1 における塩基番号 2 2 9 9 ~ 2 5 4 5 で示される塩基配列を有し、5' 末端に EcoR I の粘着末端を、3' 末端に Xho I の粘着末端を有する D N A) お

よびDNA断片3（配列番号11における塩基番号2546～3057で示される塩基配列およびpHLsecベクター由来のHisタグのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、5'末端および3'末端にXho Iの粘着末端を有するDNA）を得た。

- [0148] pCA7ベクター（Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M., Yanagi, Y. (2005) J. Virol. 79, 14346-54.）に対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行った後、上記DNA断片2とのライゲーション反応を行った。
- [0149] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターに対して制限酵素（Xho I）による限定分解、脱リン酸化、分取を行った後、上記DNA断片3とのライゲーション反応を行った。
- [0150] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターに対して制限酵素（EcoR I）による限定分解、脱リン酸化、分取を行った後、上記DNA断片1とのライゲーション反応を行った。
- [0151] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。このようにして、C末端にHisタグを有するTFCをコードするベクターを得た。
- [0152] 上記ベクターを鋳型とし、プライマー8（配列番号29）およびプライマー2（配列番号22）を用いたPCR反応を行い、増幅されたDNAを精製した。上記DNAに対して制限酵素（EcoR I）による限定分解と分取を行い、DNA断片1を得た。また、上記DNAに対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行い、DNA断片2およびDNA断片4（配列番号11における塩基番号2546～3057で示される塩基配列を有し、5'末端および3'末端にXho Iの粘着末端を有するDNA）を得た。
- [0153] pCA7ベクターに対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行った後、上記DNA断片2とのライゲーション反応を行った。

- [0154] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターに対して制限酵素 (Xho I) による限定分解、脱リン酸化、分取を行った後、上記DNA断片4とのライゲーション反応を行った。
- [0155] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターに対して制限酵素 (EcoR I) による限定分解、脱リン酸化、分取を行った後、上記DNA断片1とのライゲーション反応を行った。
- [0156] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。このようにして、C末端にHisタグを有しないTF Cをコードするベクターを得た。
- [0157] 上記ベクターに対して制限酵素 (EcoR I) による限定分解、脱リン酸化、分取を行い、DNA断片5 (配列番号11における塩基番号2299~3057で示される塩基配列およびpCA7ベクターの塩基配列を有し、5'末端および3'末端にEcoR Iの粘着末端を有するDNA) を得た。
- [0158] pPSC8ベクター (Protein Sciences社製) にN末端のシグナル配列を含むTF Cの全長をコードするDNA (配列番号11における塩基番号1~3057で示される塩基配列を有するDNA) が挿入されたベクターを鋳型とし、プライマー3 (配列番号23) およびプライマー2 (配列番号22) を用いたPCR反応を行い、増幅されたDNAを精製した。上記DNAに対して制限酵素 (EcoR I) による限定分解と分取を行い、DNA断片6 (配列番号11における塩基番号1~2298で示される塩基配列を有し、5'末端および3'末端にEcoR Iの粘着末端を有するDNA) を得た。続いて、上記DNA断片5とのライゲーション反応を行った。
- [0159] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。このようにして、N末端のシグナル配列を含むTF C全長をコードするベクターを得た。
- [0160] 上記ベクターを鋳型とし、リン酸化されたプライマー (プライマー4 (配

列番号24)およびプライマー5(配列番号25))を用いたインバースPCR反応を行った。インバースPCR反応は、Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs社製)を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。上記PCR反応液に制限酵素(Dpn I)を添加して鋳型を分解し、フェノール/クロロフォルム抽出およびエタノール沈殿を行ってDNAの分取を行った後、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ社製)を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って、ライゲーション反応(セルフライゲーション)を行った。

[0161] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。このようにして、シグナル配列の直後に6×HisタグとFactor Xa切断配列(IEGR)のアミノ酸配列が挿入されたTFCをコードするベクターを得た。

[0162] 上記ベクターを鋳型とし、プライマー6(配列番号26)およびプライマー7(配列番号27)を用いたPCR反応を行い、増幅されたDNAを精製した。PCR反応は、Q5 High-Fidelity DNA Polymeraseを用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。上記DNAに対して制限酵素(Age IおよびNhe I)による限定分解と分取を行い、DNA断片7(6×Hisタグをコードする塩基配列、IEGRをコードする塩基配列、および配列番号11における塩基番号76~2236で示される塩基配列を有し、5'末端にAge Iの粘着末端を、3'末端にNhe Iの粘着末端を有するDNA)を得た。

[0163] 上記C末端にHisタグを有しないTFCをコードするベクターに対して制限酵素(Age IおよびNhe I)による限定分解、脱リン酸化、分取を行い、DNA断片8(配列番号11における塩基番号2237~3057で示される塩基配列およびpCA7ベクターの塩基配列を有し、5'末端にNhe Iの粘着末端を、3'末端にAge Iの粘着末端を有するDNA)を得た。続いて、上記DNA断片7とのライゲーション反応を行った。

[0164] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの

増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がないことを確認した。このようにして、N末端のシグナル配列を除くTFC配列のN末端側に6×HisタグとFactor Xa切断配列(IEGR)を有するポリペプチドの発現ベクター(以下「TFC/pCA7」という)を得た。

[0165] (2) TFCの調製

タキプレウス・トリデントスC因子(TFC)は、以下の手順に従い、哺乳類細胞発現系によって調製した。細胞培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で実施した。

[0166] 上記(1)で得たTFCの発現ベクター(TFC/pCA7)を用いて、HEK293S GnTI-細胞(ATCC:CRL-3022)を形質転換した。具体的には、80%~90%コンフルエントに達した上記細胞に対して形質転換培地(TFC/pCA7(1.8μg/mL)、ポリエチレンイミン(2.7μg/mL)、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・レーグルタミン溶液(和光純薬工業社製)、および2%ウシ胎児血清を含むDMEM培地)を0.22mL/cm<sup>2</sup>となるように添加し、終濃度で2mMとなるようにベンザミジンを追加して120時間静置培養した。このようにして、細胞から分泌されたTFCを含む培養液を得た。

[0167] 上記培養液を6,000×gで30分間遠心し、上清を回収した。上記上清と0.1倍量の緩衝溶液(0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH8.0)、1.5M NaCl、0.1M イミダゾール)を混合した後、ニッケルカラム(nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column、内径:1.0cm×長さ:5.0cm)にアプライした。カラムを洗浄溶液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH8.0)、150mM NaCl、10mM イミダゾール)で洗浄した後、溶出溶液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH8.0)、150mM NaCl、20~200mM イミダゾール)を用いてTFCを溶出させた。TFCの溶出画分はゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって確認した。

- [0168] T F Cの溶出画分を回収し、限外ろ過によって溶液を反応溶液（20 mM Tris-HCl（pH 8.0）、150 mM NaCl、10 mM CaCl<sub>2</sub>）に置換した。続いて、ファクターXaを3.3 μg/mLとなるように添加し、37℃に16時間静置してT F CのN末端からHisタグを遊離させた。
- [0169] 上記反応溶液をセファロースカラム（benzamidine-Sepharose column、内径：0.25 cm×長さ：1.5 cm）にアプライし、ファクターXaをカラムに吸着させて除去した。続いて、上記カラムの素通り画分（フロースルー）をニッケルカラム（nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column、内径：0.25 cm×長さ：1.5 cm）にアプライし、T F Cから遊離されたHisタグをカラムに吸着させて除去した。上記カラムの素通り画分をT F Cとして以後の試験に用いた。
- [0170] <参考例2> T F Bの調製
- （1）T F B発現ベクターの作製
- タキプレウス・トリデンタツスB因子（T F B）の発現ベクターは、以下の手順に従って作製した。
- [0171] N末端のシグナル配列を除くT F Bの全長をコードするDNA（配列番号1における塩基番号70～1200で示される塩基配列を有するDNA）をPCR反応により調製した。PCR反応の鋳型には、pPSC8ベクターにT F BをコードするDNAが挿入されたベクターを用いた。また、PCR反応のプライマーには、プライマー9（配列番号30）およびプライマー10（配列番号31）を用いた。
- [0172] 上記PCR反応によって得られたDNAを精製し、上記DNAに対して制限酵素（Age IおよびXho I）による限定分解と分取を行った。pCA7ベクターに対して制限酵素（Age IおよびXho I）による限定分解と分取を行った後、上記DNAとのライゲーション反応を行った。上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がな

いことを確認した。このようにして、N末端のシグナル配列を除くTFBの発現ベクター(TFB/pCA7)を得た。

[0173] (2) TFBの調製

タキプレウス・トリデンタツスB因子(TFB)は、以下の手順に従い、哺乳類細胞発現系によって調製した。細胞培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で実施した。

[0174] TFCの発現ベクター(TFC/pCA7)に代えて上記(1)で得たTFBの発現ベクター(TFB/pCA7)を用い、ベンザミジンを添加しなかったことを除き、前記<参考例1>における「(2)TFCの調製」と同じ操作を行って、細胞から分泌されたTFBを含む培養液を得た。

[0175] 上記培養液を6,000×gで30分間遠心し、上清を回収した。上記上清に50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH6.8)を添加して5倍希釈した後、SPカラム(SP-Sepharose column、内径:1.0cm×長さ:10cm)にアプライした。カラムを50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH6.8)で洗浄した後、溶出溶液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH6.8)、50~500mM NaCl)を用いてTFBを溶出させた。TFBの溶出画分はゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって確認した。

[0176] TFBの溶出画分を回収し、限外ろ過によって溶液を20mM Tris-HCl(pH8.0)に置換した。上記溶液をDEAEカラム(DEAE-Sepharose column、内径:1.0cm×長さ:1.0cm)にアプライした後、溶出溶液(20mM Tris-HCl(pH8.0)、10~200mM NaCl)を用いてTFBを溶出させた。TFBの溶出画分はゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって確認した。上記TFBの溶出画分をTFBとして以後の試験に用いた。

[0177] <実施例1>Murasame-TFBの調製

タキプレウス・トリデンタツスB因子改変体(Murasame-TFB)の発現ベクターは、以下の手順に従って作製した。

[0178] (1) Murasame-TFB発現ベクターの作製

上記TFB／pCA7を鋳型とし、リン酸化されたプライマー（プライマー11（配列番号32）およびプライマー12（配列番号33））を用いたインバースPCR反応を行った。インバースPCR反応は、Tks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って実施した。上記PCR反応液に制限酵素（Dpn I）を添加して鋳型を分解し、フェノール／クロロフォルム抽出およびエタノール沈殿を行ってDNAの分取を行った後、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>を用い、添付のプロトコールに従った操作を行って、ライゲーション反応（セルフライゲーション）を行った。

[0179] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がないことを確認した。このようにして、Murasame-TFBの発現ベクター（Murasame-TFB／pCA7）を得た。

[0180] (2) Murasame-TFBの調製

タキプレウス・トリデントスB因子改変体（Murasame-TFB）は、以下の手順に従い、哺乳類細胞発現系によって調製した。細胞培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で実施した。

[0181] TFCの発現ベクター（TFC／pCA7）に代えて上記（1）で得たMurasame-TFBの発現ベクター（Murasame-TFB／pCA7）を用い、ベンザミジンを添加しなかったことを除き、前記<参考例1>における「（2）TFCの調製」と同じ操作を行って、細胞から分泌されたMurasame-TFBを含む培養液を得た。

[0182] 前記<参考例2>における「（2）TFBの調製」と同じ操作を行って、Murasame-TFBを含む溶出画分を得た。上記Murasame-TFBの溶出画分をMurasame-TFBとして以後の試験に用いた。

[0183] <参考例3>TFBのプロテアーゼ活性（比活性）の測定

160nM TFC、3.2μM LPS（Salmonella minnesota R595由

来、重量平均分子量 1,700 Da、List Biological Laboratories 社製)、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl の溶液を調製し、37℃に20分間静置してTFBを活性化させた。以下、活性化したTFBを「 $\alpha$ -TFB」という。

[0184] 50 nM TFB、0.2 nM  $\alpha$ -TFB、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL BSA の溶液を20  $\mu$ L 調製し、37℃に1時間静置した。この溶液に対し20% DMF に溶解した2 mM Boc-Leu-Thr-Arg-MCA (ペプチド研究所社製) を5  $\mu$ L 加え、37℃に5分間静置した。0.6 M 酢酸 (75  $\mu$ L) を添加して酵素反応を終了させた後、ペプチドから遊離したMCA の量 (活性化したTFBのプロテアーゼ活性 (全活性) に比例する) を蛍光検出器で測定した。検出は、励起波長380 nm、蛍光波長440 nm の条件で行った。

[0185] 上記の結果、TFBのプロテアーゼ活性 (比活性) は、 $31.07 \pm 2.50$  units/ $\mu$ mol であった。

[0186] <実施例2> Murasame-TFB のプロテアーゼ活性 (比活性) の測定

TFB に代えて Murasame-TFB を用い、前記<参考例3>と同じ操作を行って、Murasame-TFB のプロテアーゼ活性を測定した。

[0187] 上記試験の結果、Murasame-TFB のプロテアーゼ活性 (比活性) は、 $416.87 \pm 20.50$  units/ $\mu$ mol であった。

[0188] <参考例3>および<実施例2>の結果を図1に示す。上記試験の結果より、Murasame-TFB は TFB と比較して13.4倍のプロテアーゼ活性 (比活性) を有することが示された。

[0189] <参考例4> TFB の熱安定性の評価

100 nM TFB、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL BSA の溶液を10  $\mu$ L 調製し、所

定の温度（40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、または90℃）に2分間静置した。その後、この溶液に0.4 nM  $\alpha$ -TFC、20 mM Tris-HCl（pH 8.0）、150 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL BSAの溶液を10  $\mu$ L添加し、37℃に1時間静置した。以後、前記＜参考例3＞と同じ操作を行って、TFBのプロテアーゼ活性を測定した。上記試験の結果を表1に示す。

[0190] [表1]

表 1

| 温度  | 相対活性    |
|-----|---------|
| 40℃ | 103.60% |
| 50℃ | 40.00%  |
| 60℃ | 0.0%    |
| 70℃ | 0.0%    |
| 80℃ | 0.0%    |
| 90℃ | 0.0%    |

[0191] 表1において「相対活性」は、各温度で2分間静置したTFBのプロテアーゼ活性（比活性）を前記＜参考例3＞に示したTFBのプロテアーゼ活性（比活性）で除した値を百分率表示した数値（%）である。

[0192] ＜実施例3＞Murasame-TFBの熱安定性の評価

TFBに代えてMurasame-TFBを用い、前記＜参考例4＞と同じ操作を行って、Murasame-TFBの熱安定性を評価した。上記試験の結果を表2に示す。

[0193]

[表2]

表 2

| 温度  | 相対活性   |
|-----|--------|
| 40℃ | 99.64% |
| 50℃ | 85.17% |
| 60℃ | 72.63% |
| 70℃ | 57.64% |
| 80℃ | 50.12% |
| 90℃ | 42.92% |

[0194] 表2において相対活性は、各温度で2分間静置したMurasame-TFBのプロテアーゼ活性（比活性）を前記＜実施例2＞に示したMurasame-TFBのプロテアーゼ活性（比活性）で除した値を百分率表示した数値（%）である。

[0195] ＜参考例4＞および＜実施例3＞の結果を図2に示す。上記試験の結果より、TFBは60℃以上で2分間加熱することにより、プロテアーゼ活性を完全に失う（失活する）ことが示された。一方、Murasame-TFBは90℃で2分間加熱しても40%以上のプロテアーゼ活性を維持し、TFBよりも高い熱安定性を有することが示された。

[0196] ＜参考例5＞LFCの調製

（1）LFC発現ベクターの作製

リムルス・ポリフェムスC因子（LFC）の発現ベクターは、以下の手順に従って作製した。

[0197] N末端のシグナル配列を除くLFCの全長をコードするDNA（配列番号13における塩基番号76～3060で示される塩基配列を有するDNA）をTks Gflex DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用いたPCR反応により調製した。PCR反応の鋳型には、pBluescript II SK(+)（アジレント・テクノロジー社製）にLFCをコードするDNAが挿入されたベクターを用いた。また、PCR反応のプライマーには、プライマー13（配列番号34）およびプライマー14（配列番号35）を用いた。

- [0198] 上記PCR反応によって得られたDNAをフェノール／クロロフォルム抽出を行って回収し、上記DNAに対して制限酵素（Age IおよびXho I）による限定分解と分取を行った。TFC／pCA7に対して上記と同様にして制限酵素による限定分解と分取を行った後、上記DNAとのライゲーション反応を行った。
- [0199] 上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がないことを確認した。このようにして、N末端のシグナル配列を除くLFC配列のN末端側に6×HisタグとFactor Xa切断配列（IEGR）を有するポリペプチドの発現ベクター（以下「LFC／pCA7」という）を得た。
- [0200] (2) LFCの調製
- リムルス・ポリフェムスC因子（LFC）は、以下の手順に従い、哺乳類細胞発現系によって調製した。細胞培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で実施した。
- [0201] 上記(1)で得たLFCの発現ベクター（LFC／pCA7）を用いて、HEK293S GnTI<sup>-</sup>細胞（ATCC：CRL-3022）を形質転換した。具体的には、80%～90%コンフルエントに達した上記細胞に対して形質転換培地（LFC／pCA7（1.8μg/mL）、ポリエチレンジミン（2.7μg/mL）、1%ペニシリンーストレプトマイシン－L-グルタミン溶液、および2%ウシ胎児血清を含むDMEM培地）を0.22mL/cm<sup>2</sup>となるように添加し、終濃度で2mMとなるようにベンザミジンを添加して120時間静置培養した。このようにして、細胞から分泌されたLFCを含む培養液を得た。
- [0202] 上記培養液を6,000×gで30分間遠心し、上清を回収した。上記上清と0.1倍量の緩衝溶液（0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>－NaOH（pH8.0）、1.5M NaCl、0.1M イミダゾール）を混合した後、ニッケルカラム（nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column、内径：1.0

cm×長さ：2.0cm) にアプライした。カラムを洗浄溶液 (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{NaOH}$  (pH8.0)、150mM  $\text{NaCl}$ 、10mM イミダゾール) で洗浄した後、溶出溶液 (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{NaOH}$  (pH8.0)、150mM  $\text{NaCl}$ 、20~200mM イミダゾール) を用いてLFCを溶出させた。LFCの溶出画分はゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって確認した。

[0203] LFCの溶出画分を回収し、限外ろ過によって溶液を反応溶液 (20mM  $\text{Tris-HCl}$  (pH8.0)、150mM  $\text{NaCl}$ 、10mM  $\text{CaCl}_2$ ) に置換した。続いて、ファクターXaを $3.3\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、室温に2日間静置してLFCのN末端からHisタグを遊離させた。

[0204] 上記反応溶液をセファロースカラム (benzamidine-Sepharose column、内径：0.25cm×長さ：1.5cm) にアプライし、ファクターXaをカラムに吸着させて除去した。続いて、上記カラムの素通り画分 (フロースルー) をニッケルカラム (nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column、内径：0.25cm×長さ：1.5cm) にアプライし、LFCから遊離されたHisタグをカラムに吸着させて除去した。上記カラムの素通り画分をLFCとして以後の試験に用いた。

[0205] <参考例6> LFBの調製

(1) LFB発現ベクターの作製

リムルス・ポリフェムスB因子 (LFB) の発現ベクターは、以下の手順に従って作製した。

[0206] LFB全長配列をコードするDNA (配列番号3における塩基番号1~1200で示される塩基配列を有するDNA) をTks Gflex DNA polymeraseを用いたPCR反応により調製した。PCR反応の鋳型には、pBluescript II SK(+)にLFBをコードするDNAが挿入されたベクターを用いた。また、PCR反応のプライマーには、プライマー15 (配列番号36) およびプライマー18 (配列番号39) を用いた。

- [0207] 上記PCR反応によって得られたDNAを精製し、上記DNAに対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行った。pCA7ベクターに対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行った後、上記DNAとのライゲーション反応を行った。上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がないことを確認した。このようにして、LFB全長配列を有するポリペプチドの発現ベクターを得た。
- [0208] 上記ベクターを鋳型とし、プライマー15（配列番号36）およびプライマー19（配列番号40）を用いたPCR反応を行い、増幅されたDNAを精製した。上記DNAに対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行い、DNA断片（配列番号3における塩基番号1～1200で示される塩基配列および6×Hisタグをコードする塩基配列を有し、5'末端にEcoR Iの粘着末端を、3'末端にXho Iの粘着末端を有するDNA）を得た。
- [0209] pCA7ベクターに対して制限酵素（EcoR IおよびXho I）による限定分解と分取を行った後、上記DNAとのライゲーション反応を行った。上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がないことを確認した。このようにして、LFB全長配列のC末端側に6×Hisタグを有するポリペプチドの発現ベクターを得た。
- [0210] 上記ベクターを鋳型とし、プライマー20（配列番号41）およびプライマー21（配列番号42）を用いたPCR反応を行い、増幅されたDNAを精製した。上記DNAに対して制限酵素（Age IおよびXho I）による限定分解と分取を行い、DNA断片（配列番号3における塩基番号70～1200で示される塩基配列および6×Hisタグをコードする塩基配列を有し、5'末端にAge Iの粘着末端を、3'末端にXho Iの粘着末端を有するDNA）を得た。

[0211] pCA7ベクターに対して制限酵素 (Age IおよびXho I) による限定分解と分取を行った後、上記DNAとのライゲーション反応を行った。上記ライゲーション反応液を用いて大腸菌を形質転換した後、ベクターの増幅と精製を行った。上記ベクターの塩基配列をシーケンス解析し、PCRエラーによる変異の導入がないことを確認した。このようにして、N末端のシグナル配列を除くLFB配列のC末端側に6×Hisタグを有するポリペプチドの発現ベクター (LFB/pCA7) を得た。

[0212] (2) LFBの調製

リムルス・ポリフェムスB因子 (LFB) は、以下の手順に従い、哺乳類細胞発現系によって調製した。細胞培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で実施した。

[0213] LFCの発現ベクター (LFC/pCA7) に代えて上記(1)で得たLFBの発現ベクター (LFB/pCA7) を用い、ベンザミジンを添加しなかったことを除き、前記<参考例5>における「(2) LFCの調製」と同じ操作を行って、細胞から分泌されたLFBを含む培養液を得た。

[0214] 上記培養液をニッケルカラム (nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column、内径: 1.0cm×長さ: 1.5cm) にアプライし、LFBの溶出画分を得た。カラム精製は、前記<参考例5>における「(2) LFCの調製」に記載の手順に従って実施した。

[0215] LFBの溶出画分を回収し、限外ろ過によって溶液を反応溶液 (20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl) に置換した。このようにして得たLFBを以後の試験に用いた。

[0216] <実施例4> Murasame-LFBの調製

リムルス・ポリフェムスB因子改変体 (Murasame-LFB) の発現ベクターは、以下の手順に従って作製した。

[0217] Murasame-LFBのN末端側をコードするDNA (配列番号9における塩基番号1~594で示される塩基配列を有するDNA。以下「DNA断片9」という) をTks Gflex DNA polymeraseを用いたPCR反応により

調製した。PCR反応の鋳型には、pCA7にLFBをコードするDNAが挿入されたベクターを用いた。また、PCR反応のプライマーには、プライマー15（配列番号36）およびプライマー16（配列番号37）を用いた。

[0218] 上記と同様にして、Murasame-LFBのC末端側をコードするDNA（配列番号9における塩基番号562～1200で示される塩基配列を有するDNA。以下「DNA断片10」という）をPCR反応により調製した。PCR反応のプライマーには、プライマー17（配列番号38）およびプライマー18（配列番号39）を用いた。

[0219] 上記PCR反応によって得られたDNAを精製し、DNA断片9およびDNA断片10を得た。

[0220] Murasame-LFB全長配列をコードするDNA（配列番号9における塩基番号1～1200で示される塩基配列を有するDNA）をTks Gflex DNA polymeraseを用いたPCR反応により調製した。PCR反応の鋳型には、DNA断片9と10を混合したものをを用いた。また、PCR反応のプライマーには、プライマー15（配列番号36）およびプライマー18（配列番号39）を用いた。以後、前記＜参考例6＞における「（1）LFB発現ベクターの作製」と同じ操作を行った。このようにして、N末端のシグナル配列を除くMurasame-LFB配列のC末端側に6×Hisタグを有するポリペプチドの発現ベクター（Murasame-LFB／pCA7）を得た。

[0221] （2）Murasame-LFBの調製

リムルス・ポリフェムスB因子改変体（Murasame-LFB）は、以下の手順に従い、哺乳類細胞発現系によって調製した。細胞培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で実施した。

[0222] LFBの発現ベクター（LFB／pCA7）に代えて上記（1）で得たMurasame-LFBの発現ベクター（Murasame-LFB／pCA7）を用い、前記＜参考例6＞における「（2）LFBの調製」と同じ操作を行った。このようにして得たMurasame-LFBを以後の試験に

用いた。

[0223] <参考例7> LFBのプロテアーゼ活性（比活性）の測定

160 nM LFC、3.2  $\mu$ M LPS、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaClの溶液を調製し、37℃に20分間静置してLFCを活性化させた。以下、活性化したLFCを「 $\alpha$ -LFC」という。

[0224] 50 nM LFB、2 nM  $\alpha$ -LFC、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL BSAの溶液を20  $\mu$ L調製し、37℃に1時間静置した。この溶液に対し20% DMFに溶解した2 mM Boc-Leu-Thr-Arg-MCAを5  $\mu$ L加え、37℃に5分間静置した。0.6 M 酢酸（75  $\mu$ L）を添加して酵素反応を終了させた後、ペプチドから遊離したMCAの量（活性化したLFBのプロテアーゼ活性（全活性）に比例する）を蛍光検出器で測定した。検出は、励起波長380 nm、蛍光波長440 nmの条件で行った。

[0225] 上記の結果、LFBのプロテアーゼ活性（比活性）は、 $44.67 \pm 0.61$  units/ $\mu$ molであった。

[0226] <実施例5> Murasame-LFBのプロテアーゼ活性（比活性）の測定

LFBに代えてMurasame-LFBを用い、前記<参考例7>と同じ操作を行って、Murasame-LFBのプロテアーゼ活性を測定した。

[0227] 上記試験の結果、Murasame-LFBのプロテアーゼ活性（比活性）は、 $320.80 \pm 9.56$  units/ $\mu$ molであった。

[0228] 上記試験の結果より、Murasame-LFBは、Murasame-TFBと同様に、改変前のポリペプチド（LFB）よりも高いプロテアーゼ活性（比活性）を有することが示された。

[0229] <参考例8> LFBの熱安定性の評価

100 nM LFB、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、15

0 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL BSAの溶液を10  $\mu$ L調製し、所定の温度（40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、または90℃）に2分間静置した。その後、この溶液に4 nM  $\alpha$ -LFC、20 mM Tris-HCl（pH 8.0）、150 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL BSAの溶液を10  $\mu$ L添加し、37℃に1時間静置した。以後、前記＜参考例7＞と同じ操作を行って、LFBのプロテアーゼ活性を測定した。上記試験の結果を表3に示す。

[0230] [表3]

表 3

| 温度  | 相対活性   |
|-----|--------|
| 40℃ | 90.20% |
| 50℃ | 69.19% |
| 60℃ | 0.0%   |
| 70℃ | 0.0%   |
| 80℃ | 0.0%   |
| 90℃ | 0.0%   |

[0231] 表3において「相対活性」は、各温度で2分間静置したLFBのプロテアーゼ活性（比活性）を前記＜参考例7＞に示したLFBのプロテアーゼ活性（比活性）で除した値を百分率表示した数値（%）である。

[0232] ＜実施例6＞Murasame-LFBの熱安定性の評価

LFBに代えてMurasame-LFBを用い、前記＜参考例8＞と同じ操作を行って、Murasame-LFBの熱安定性を評価した。上記試験の結果を表4に示す。

[0233]

[表4]

表 4

| 温度  | 相対活性   |
|-----|--------|
| 40℃ | 90.96% |
| 50℃ | 84.37% |
| 60℃ | 70.43% |
| 70℃ | 50.00% |
| 80℃ | 33.80% |
| 90℃ | 26.41% |

[0234] 表4において相対活性は、各温度で2分間静置したMurasame-LFBのプロテアーゼ活性（比活性）を前記＜実施例5＞に示したMurasame-LFBのプロテアーゼ活性（比活性）で除した値を百分率表示した数値（%）である。

[0235] 上記試験の結果より、Murasame-LFBは、Murasame-TFBと同様に、改変前のポリペプチド（LFB）よりも高い熱安定性を有することが示された。

### 産業上の利用可能性

[0236] 本発明によれば、天然のカプトガニB因子よりもプロテアーゼ活性に優れたポリペプチドを製造することができる。よって、本発明により提供されるポリペプチドは、天然のカプトガニB因子と比較してエンドトキシン測定を高感度化できるカプトガニB因子改変体であると期待される。また、本発明によれば、天然のカプトガニB因子よりも熱安定性に優れたポリペプチドを製造することができる。よって、本発明により提供されるポリペプチドは、天然のカプトガニB因子と比較して試薬としての保存安定性に優れたカプトガニB因子改変体であると期待される。

[0237] ＜配列表の説明＞

配列番号1：タキプレウス・トリデンタツスB因子のcDNAの塩基配列

配列番号2：タキプレウス・トリデンタツスB因子のアミノ酸配列

配列番号3：リムルス・ポリフェムスB因子のcDNAの塩基配列

配列番号4：リムルス・ポリフェムスB因子のアミノ酸配列

配列番号5：タキプレウス・トリデンタツスB因子改変体のcDNAの塩基配列（1）

配列番号6：タキプレウス・トリデンタツスB因子改変体のcDNAの塩基配列（2）

配列番号7：タキプレウス・トリデンタツスB因子改変体のアミノ酸配列

配列番号8：リムルス・ポリフェムスB因子改変体のcDNAの塩基配列（1）

配列番号9：リムルス・ポリフェムスB因子改変体のcDNAの塩基配列（2）

配列番号10：リムルス・ポリフェムスB因子改変体のアミノ酸配列

配列番号11：タキプレウス・トリデンタツスC因子のcDNAの塩基配列

配列番号12：タキプレウス・トリデンタツスC因子のアミノ酸配列

配列番号13：リムルス・ポリフェムスC因子のcDNAの塩基配列

配列番号14：リムルス・ポリフェムスC因子のアミノ酸配列

配列番号15：カルシノスコルピウス・ロツンディカウダC因子のcDNAの塩基配列

配列番号16：カルシノスコルピウス・ロツンディカウダC因子のアミノ酸配列

配列番号17：タキプレウス・トリデンタツス凝固酵素前駆体のcDNAの塩基配列

配列番号18：タキプレウス・トリデンタツス凝固酵素前駆体のアミノ酸配列

配列番号19：リムルス・ポリフェムス凝固酵素前駆体のcDNAの塩基配列

配列番号20：リムルス・ポリフェムス凝固酵素前駆体のcDNAのアミノ酸配列

配列番号21～42：プライマー