

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-14311

(P2007-14311A)

(43) 公開日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/36 (2006.01)	A 6 1 K 39/36	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-201947 (P2005-201947)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22) 出願日	平成17年7月11日(2005.7.11)	(71) 出願人	504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
		(71) 出願人	000196107 西川ゴム工業株式会社 広島県広島市西区三篠町2丁目2番8号
		(74) 代理人	100105647 弁理士 小栗 昌平
		(74) 代理人	100105474 弁理士 本多 弘徳
		(74) 代理人	100108589 弁理士 市川 利光
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 スギ花粉由来の新規アレルゲン

(57) 【要約】

【課題】 スギ花粉症に関するCry j 1、Cry j 2以外の新規アレルゲン、それらを用いたアレルギーの診断薬、予防薬、および治療薬等を提供する。

【解決手段】 スギ花粉中に含まれ、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると分子量50,000~60,000ダルトンを示し、等電点電気泳動法により測定すると3.5~5.0付近に等電点を示すスギ花粉アレルゲンC P A 6 3を見出した。また質量分析によって、その部分アミノ酸配列を明らかにし、さらにはC P A 6 3をコードするcDNA配列およびC P A 6 3の全アミノ酸配列を明らかにした。天然型C P A 6 3および組換え体C P A 6 3のスギ花粉症患者血清との反応頻度を示し、C P A 6 3が既知のアレルゲンCry j 1、Cry j 2とは免疫学的特性の異なる新規なアレルゲンであることを明らかにした。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スギ花粉中に含まれるタンパク質で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると分子量が50,000~60,000ダルトンを示し、等電点電気泳動法により測定すると等電点が3.5~5.0付近に示すことを特徴とする、スギ花粉アレルゲン。

【請求項 2】

部分アミノ酸配列として

X-Val-Glu-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ala-Met-Arg または Phe-Thr-Pro-X-X-Ser-Asn-Ser-Arg (XはIleまたはLeuを示す)の配列を有する請求項1に記載のスギ花粉アレルゲン。

10

【請求項 3】

配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する請求項1または2に記載のスギ花粉アレルゲン。

【請求項 4】

スギ花粉粗抗原から、アフィニティー精製、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、遠心分離、濃縮、透析などの方法によって得られたことを特徴とする請求項1~3のいずれかに記載のスギ花粉アレルゲン。

【請求項 5】

配列番号2に記載のアミノ酸配列または少なくともその一部のアミノ酸配列を含むスギ花粉アレルゲンタンパク質。

20

【請求項 6】

請求項1~4のいずれかに記載のスギ花粉アレルゲンタンパク質の全部またはその少なくとも一部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸分子。

【請求項 7】

配列番号2に記載のスギ花粉アレルゲンタンパク質のアミノ酸配列または少なくともその一部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸分子。

【請求項 8】

スギ花粉アレルゲンをコードする配列番号1に記載の塩基配列または少なくともその一部の塩基配列を有する核酸分子。

【請求項 9】

スギ花粉またはスギ雄花に由来する単離された請求項6~8に記載の核酸分子。

30

【請求項 10】

請求項6~8に記載の核酸分子で形質転換された宿主細胞において産生された請求項1~5のいずれかに記載のタンパク質またはその少なくとも1部のアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 11】

無細胞発現系によって調製された請求項1~5のいずれかに記載のタンパク質または少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 12】

化学的な合成によって調製された請求項1~5のいずれかに記載のタンパク質または少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質。

40

【請求項 13】

スギ花粉症患者血清中のIgEと反応する請求項5、10~12のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 14】

スギ花粉で感作された患者のT細胞を増殖させることが可能な請求項1~5、10~12のいずれかに記載のスギ花粉タンパク質のT細胞エピトープペプチド。

【請求項 15】

請求項1~5、10~12のいずれかに記載のスギ花粉タンパク質またはその少なくとも1つのタンパク質断片に特異的に反応するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗

50

体。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 4、10 ~ 12 に記載のスギ花粉アレルゲンを用いた花粉症患者用の診断薬。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 4、10 ~ 12 に記載のスギ花粉タンパク質を用いた減感作用の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、スギ花粉に由来する新規なアレルゲンタンパク質、およびこれを用いたアレ 10
ルギーの診断、予防および治療等に関するものである。

【背景技術】

【0002】

アレルギー疾患の罹患率および死亡率は、食生活や居住環境の変化などに伴い、近年、
世界的にも増加傾向にある。民間調査（新薬開発の現状と将来展望 91年度版、（株）
シードプランニング）によると、我国で3人に1人は、スギ花粉症、アトピー性皮膚炎、
気管支喘息などの典型的なIgE依存型（I型）アレルギー疾患の症状を示しているとい
う。これは2003年の調査結果でも同様で、約4万1000人を対象として行われた
平成15年保健福祉動向調査 アレルギー様症状（厚生労働省大臣官房統計情報部）によ
れば、皮膚・呼吸器・目鼻のアレルギー様症状のうち、過去1年間にいずれかの症状があ 20
った者は35.9%であった。アレルギー疾患は、直接生命に関わることがない反面、ご
く若い世代に突然発症し、早い時期での自然治癒はまず期待できず慢性に経過すること
によって、本人や家族の負担は勿論のこと、長期に亘って社会的活動にも大きな影響を及ぼ
していると考えられる。

【0003】

スギ花粉症は、日本国民の10人に1人が罹患していると言われてきたが、実際には次の
ような疫学的データがある。1998年に獨協医科大学耳鼻咽喉科の馬場廣太郎らによって行
われた約1万7,000名を対象とした疫学調査によると、スギ花粉症の有症率は18.1%であっ
た。また、科学技術庁振興調整費 生活者ニーズ対応研究「スギ花粉症克服に向けた総合
研究」第11期成果報告書によると、2001~2002年において行った客観的診断基準による疫 30
学調査では、スギ花粉症の有症率は、都市部（東京都品川区）で33.8%、地方（山梨県牧
丘町）で26.7%であった。とりわけ、花粉の飛散する春の時期には、多くの患者がこのア
レルギー症状に苦しめられている。

【0004】

花粉症の治療に最も有効な方法は、アレルゲンとの接触を避けることであるが、居住環
境の至る所に遊離して存在するアレルゲンで感作、発症している患者では、抗ヒスタミン
剤などの副作用もある、対症療法剤を用いた一時的な解決策に依存せざるを得ないのが実
状である。このため、これを使用し続けられない限り発症を繰り返すことになり、財政的にも
、肉体的にも大きな負担を強いられ、使用を中止するとリバウンドによる症状の悪化も懸
念されるという問題を抱えている。 40

【0005】

一方、アレルギーの原因物質であるアレルゲン自体を、患者に繰り返し投与して根治し
ようとする、減感作療法の試みがなされてきている。ホヤ喘息における減感作治療では90
%以上の患者で症状の改善がみられたとの報告もあり（例えば、非特許文献1参照）、欧
米ではアレルギーの標準的な治療方法の1つとして確立されている（例えば、非特許文
献2参照）。しかしながら、使用抗原の選択を誤るとアナフィラキシーショックなどの副
作用もあるため、患者個々に対する適切な診断が求められている。

【0006】

スギ（*Cryptomeria japonica*）花粉のアレルゲンには、主要アレルゲンとして、抗原性
の異なる2つの分子種、Cry j 1とCry j 2が知られている。Cry j 1は、安枝らによって 50

報告されたもので（例えば、非特許文献3参照；本文献ではCry j 1はSBP（Sugi basic protein）と呼ばれていた）、分子量が45,000～50,000ダルトン、等電点が約9.0のタンパク質である。Cry j 2は、坂口らによって報告された分子量が約37,000ダルトン、等電点が約9.5のタンパク質である（例えば、非特許文献4参照）。Cry j 1をコードするcDNAの塩基配列およびCry j 1のアミノ酸配列が明らかとなり（例えば、非特許文献5参照）、またCry j 2をコードするcDNAの塩基配列およびCry j 2のアミノ酸配列が明らかとなった（例えば、非特許文献6参照）。これら2つの主要アレルゲンは、スギ花粉症患者血清中のIgEと高頻度に反応する。

【0007】

スギ花粉症の減感作療法においては、上記主要アレルゲンCry j 1とCry j 2のみでは、
10
十分な治療効果が得られていない。治療のためには、まず、的確な診断が重要であるが、現状においては主要アレルゲン以外での診断は殆どなされていない。このような状況の下、近年、Cry j 1とCry j 2以外のスギ花粉アレルゲンタンパク質の詳細な免疫化学的特性の解明が望まれている。

【0008】

これまでにCry j 1とCry j 2以外のスギ花粉アレルゲンがいくつか報告されてきた。河本らによって、イソフラボンレダクターゼと高い相同性を示すスギ花粉由来タンパク質CJP-6のcDNA配列およびアミノ酸配列が明らかにされ、CJP-6がスギ花粉症患者IgEによって認識される新規なアレルゲンであることが示された（例えば、非特許文献7および特許文献1参照）。一方、藤村らは、キチナーゼと高い相同性を示すスギ花粉由来タンパク質
20
CJP-4を単離するとともに、そのcDNA配列およびアミノ酸配列を明らかにし、CJP-4がスギ花粉症患者IgEによって認識される新規アレルゲンであることを示した（例えば、非特許文献8および特許文献2（本文献ではCJP-16と呼ばれている）参照）。小埜らによって、-1,3-グルカナーゼと高い相同性を示すスギ花粉由来タンパク質CPA39のcDNA配列およびアミノ酸配列が明らかにされ、CPA39の天然型と組換え体がスギ花粉症患者IgEによって認識される新規なアレルゲンであることが示された（特願2005-36507号）。

【0009】

井川らは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定した分子量が57,000～67,000ダルトンで等電点が7.0～9.0の範囲にあるスギ花粉由来のタンパク質が、新規なアレル
30
ゲンを含むことを見出した（例えば、特許文献3参照）。該アレルゲンは、質量分析による該アレルゲンのペプチド断片のアミノ酸配列の解析結果から、ピルビン酸キナーゼであると推定された（澤崎健、(財)広島県産業技術振興機構研究交流推進部「緊急共同研究・戦略的権利化プロジェクト」第3回研究推進会議（第3回プロテオームプロジェクト全体会議）（広島）、2001年3月15日）。しかしながら、該アレルゲンの全アミノ酸配列や該アレルゲンをコードするcDNA配列等の、該アレルゲンの分子種を特定する情報は得られていない。

【0010】

二村らは、スギ花粉cDNAライブラリから、マウンテンセダー(*Juniperus ashei*)のアレル
40
ゲンとして知られるJun a 3と相同性のある、3つのタンパク質のcDNA (Cry j 3.1、Cry j 3.2、およびCry j 3.3)を単離し（例えば、非特許文献9参照）、さらにその後、同じくJun a 3と相同性のあるCry j 3.4、Cry j 3.5、およびCry j 3.6のcDNAの単離も報告した（例えば、非特許文献10参照）。彼らは、これら6つの遺伝子のうち、Cry j 3.5の遺伝子だけが発達中の雄性球果と花粉で発現レベルが高いことを示し、該遺伝子がコードするタンパク質がアレルゲン活性を有する可能性を示唆した（例えば、非特許文献11参照）。一方、宮原もJun a 3と相同性を有するCry j 3a、Cry j 3b、およびCry j 3cのcDNA配列を開示した（例えば、特許文献4参照）。これらのcDNAによってコードされるCry j 3タンパク質の、スギ花粉症患者血清との反応性等の免疫学的特性が明らかとなれば、これらのCry j 3あるいはこれらCry j 3のいくつかは、スギ花粉症の重要なアレルゲンに含まれる可能性がある。

【0011】

このように、Cry j 1とCry j 2以外の多くのスギ花粉アレルゲンの存在とその重要性が示唆されているにもかかわらず、その分子種の同定ならびに免疫学的特性の評価がなされているものは少ない。

【0012】

【特許文献1】特開2002-58487号公報

【特許文献2】特開2005-65536号公報

【特許文献3】特開2001-151797号公報

【特許文献4】特開2004-89103号公報

【非特許文献1】Shigeta S. et al., *Arerugi*, 39(3), 313-21, 1990.

【非特許文献2】Bousquet J, et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 558-62, 1998. 10

【非特許文献3】Yasueda, H. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.

【非特許文献4】Sakaguchi, M. et al., *Allergy*, 45, 309-312, 1990.

【非特許文献5】Sone, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199: 619-625, 1994.

【非特許文献6】Komiyama, N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201: 1021-1028, 1994.

【非特許文献7】Kawamoto S. et al., *Clin. Exp. Allergy*, 32(7), 1064-70, 2002.

【非特許文献8】Fujimura T. et al., *Clin. Exp. Allergy*, 35(2), 234-43, 2005.

【非特許文献9】Futamura. N. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2495-2500, 2002. 20

【非特許文献10】Futamura. N. et al., 7th International Congress of Plant Molecular Biology (Barcelona), 講演番号S10-87, 2003年6月25日

【非特許文献11】篠原健司ら、スギ花粉症克服に向けた総合研究(第II期成果報告書)、218-226、2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

上述のような従来技術に鑑み、本発明は、スギ花粉症に関するCry j 1、Cry j 2以外の新規アレルゲン、それらを用いたアレルギーの診断薬、予防薬、および治療薬等を提供しようとするものである。 30

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、スギ花粉粗抗原のプロテオーム解析によって、スギ花粉症患者血清中のIgE抗体と高頻度に反応するスポットを広く検索した。その結果、分子量が50,000~60,000ダルトンで、等電点が3.5~5.0付近にあるタンパク質(CPA63)に高いアレルゲン性があることを初めて見出した。さらに、種々の分析手法および遺伝子工学的手法を用いた鋭意検討の末、そのアミノ酸配列、cDNA配列および、免疫学的な特性を明らかにして、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

【0015】 40

(1) スギ花粉中に含まれるタンパク質で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると分子量が50,000~60,000ダルトンを示し、等電点電気泳動法により測定すると等電点が3.5~5.0付近に示すことを特徴とする、スギ花粉アレルゲン。

(2) 部分アミノ酸配列として

X-Val-Glu-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ala-Met-Arg または Phe-Thr-Pro-X-X-Ser-Asn-Ser-Arg (XはIleまたはLeuを示す)の配列を有する前記(1)のスギ花粉アレルゲン。

(3) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する前記(1)または(2)のスギ花粉アレルゲン。

(4) スギ花粉粗抗原から、アフィニティー精製、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、遠心分離、濃縮、透析など方法によって得られたことを特徴と 50

する前記(1)~(3)のいずれかのスギ花粉アレルゲン。

(5)配列番号2に記載のアミノ酸配列または少なくともその一部のアミノ酸配列を含むスギ花粉アレルゲンタンパク質。

【0016】

(6)前記(1)~(4)のいずれかに記載のスギ花粉アレルゲンタンパク質の全部またはその少なくとも一部のアミノ酸配列をコードする核酸分子。

(7)配列番号2に記載のスギ花粉アレルゲンタンパク質のアミノ酸配列または少なくともその一部のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸分子。

(8)スギ花粉アレルゲンをコードする配列番号1に記載の塩基配列または少なくともその一部塩基配列を有する核酸分子。

(9)スギ花粉またはスギ雄花に由来する単離された前記(6)~(8)に記載の核酸分子。

10

【0017】

(10)前記(6)~(8)に記載の核酸分子で形質転換された宿主細胞において産生された前記(1)~(5)のいずれかに記載のタンパク質またはその少なくとも1部のアミノ酸配列を含むタンパク質。

(11)無細胞発現系によって調製された前記(1)~(5)のいずれかに記載のタンパク質または少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質。

(12)化学的な合成によって調製された前記(1)~(5)のいずれかに記載のタンパク質または少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質。

20

(13)スギ花粉症患者血清中のIgEと反応する前記(5)または(10)~(12)のタンパク質。

(14)スギ花粉で感作された患者のT細胞を増殖させることが可能な前記(1)~(5)、(10)~(12)のいずれかに記載のスギ花粉タンパク質のT細胞エピトープペプチド。

【0018】

(15)前記(1)~(5)、(10)~(12)のいずれかのスギ花粉タンパク質またはその少なくとも1つのタンパク質断片に特異的に反応するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体。

(16)前記(1)~(4)、(10)~(12)のスギ花粉アレルゲンを用いた花粉症患者用の診断薬。

30

(15)前記(1)~(4)、(10)~(12)に記載のスギ花粉タンパク質を用いた減感作用の治療薬。

【発明の効果】

【0019】

本発明の新規のスギ花粉アレルゲンは、アレルギーの診断薬、予防薬、および治療薬等に利用することができ、また、このアレルゲンタンパク質ならびにそのタンパク質断片は、Cry j 1、Cry j 2およびその他のスギ花粉アレルゲンと組み合わせることによって、スギ花粉症の診断または減感作治療等に使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0020】

以下に本発明を詳細に説明する。

スギ花粉アレルギーにおいては、Cry j 1とCry j 2の主要抗原が同定され詳細に研究されているが、その他のアレルゲンに関しては、未だ充分なされていない。そこで、本発明者らは、スギ花粉中に含まれるアレルゲンの網羅的解析を目指して、スギ花粉粗抗原を二次元電気泳動により展開した後、イムノプロットング法によってスギ花粉症患者血清IgEと特異的に反応するスポットを検索した。その結果、塩基性域のCry j 1およびCry j 2以外に、IgEと反応するアレルゲンが塩基性域ばかりでなく、酸性域にも多くのアレルゲンが存在することを見出した。その後、得られた陽性スポットのアミノ酸シーケンスをMALDI-TOF MSを用いて行い、陽性スポットの部分アミノ酸配列を決定し、CPA63と命名し

50

た。得られたアミノ酸配列を用いてホモロジー検索をしたところ、既知の他の植物由来の配列の中に有意な相同性を示すものは存在せず、本タンパク質の分子種を類推することはできなかった。次に、得られたアミノ酸配列を用いてCryptomeria japonica (日本スギ) のESTデータベースを検索したところ、一致する翻訳配列を有するEST (Accession number BP173910) を見出した。

【0021】

本発明のスギ花粉アレルゲン (CPA63) の遺伝子を単離するため、スギ葯から精製したトータルRNAを用いてスギcDNAライブラリを構築した。EST (Accession number BP173910) の塩基配列を基にして、オリゴヌクレオチドプライマーの設計を行い、RACE法によって未知の遺伝子領域を取得した。その後さらに、その塩基配列をもとに全長遺伝子を取得するべくプライマーを設計し、PCR法で全長遺伝子を取得した。得られた配列 (配列番号 1) は、開始コドンおよび終始コドンを含み、そのORFは1419塩基であった。このORFは472アミノ酸のタンパク質をコードしており、これによってCPA63タンパク質の全アミノ酸配列が明らかとなった (配列番号 2)。

10

【0022】

得られたCPA63タンパク質の全アミノ酸配列を用いてホモロジー検索をしたところ、この配列が多く植物種由来のaspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinと有意な相同性を有することが明らかになった。aspartyl proteaseと相同性のあるアレルゲンタンパク質としては、例えばチャバネゴキブリ由来のBla g 2やAspergillus fumigatus (真菌)由来のAsp f 10などが報告されている。aspartyl proteaseは、活性中心にアスパラギン酸が存在するプロテアーゼであり、疎水性アミノ酸を含むペプチド結合を切断するendo型切断を触媒する酵素である。このaspartyl proteaseは、例えば高等植物の広く多様な種において見出されている。なお aspartyl proteaseは、aspartyl proteinase、aspartic protease、aspartic proteinase、aspartate protease などと呼ばれることもあり、また酸性プロテアーゼ、カルボキシルプロテアーゼ、アスパラギン酸エンドペプチターゼ、あるいはその他の名前でも呼ばれることもあるが、これらが同じものを指す名称であることは当業者には周知である。Nakanoらによってnucleoid DNA binding proteinは、タバコ緑色培養細胞より精製された。そのタンパク質はN末端にリジンを多く含む領域を有し、DNAと非特異的に結合する。さらに、このタンパク質にはアスパラギン酸プロテアーゼの活性領域もあり、2つの機能を有しているタンパク質として報告されている (Nakano, T., et al., Plant Cell, 9, 1673-1682, 1997)。このタンパク質の発現を抑制した形質転換体では植物の生育の抑制が起こることも報告されており、植物の老化にかかわっている興味深いタンパク質である (佐藤文彦, 蛋白質核酸酵素, 45, 147-152, 2000)。

20

30

【0023】

本発明のCPA63のアミノ酸配列の一部とは、CPA63の免疫学的性質の全てが消失してしまわないかぎりにおいて、どのような短い一部分でもよい。例えばCPA63のアミノ酸配列中の10~20アミノ酸程度の長さのペプチドであっても、CPA63の免疫学的性質の少なくとも一部を有しているものは本発明に含まれる。例えば、アレルギー発症機序の過程において、抗原-抗体反応の特異性を決定するアレルゲン分子の局所構造をエピトープと呼ぶが、本発明のCPA63のアミノ酸配列の一部には、CPA63の少なくとも1つのエピトープを含むアミノ酸配列が含まれる。T細胞が特異的に認識する領域は、特にT細胞エピトープと呼ばれるが、一般的にその配列長は10~20アミノ酸程度である。

40

また本発明のCPA63タンパク質の少なくとも一部をコードする核酸には、CPA63の免疫学的性質の少なくとも一部を有しているCPA63のアミノ酸配をコードする核酸が含まれ、例えばCPA63の少なくとも1つのエピトープを含むアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む核酸は本発明に含まれる。

ここでいうCPA63の免疫学的性質とは、CPA63のヒトに対する免疫学的性質だけでなく、例えば、イヌ、ネコ、サル、ラット、マウス、ウサギ等、他の動物に対する免疫学的性質も含まれる。

50

【0024】

本発明のCPA63をコードする核酸または少なくともその1つの断片をコードする核酸は、当業者ならば、本発明によって開示されたCPA63のアミノ酸配列およびそれをコードする核酸配列の情報を利用し、公知の技術を用いて天然由来の試料やライブラリから容易に調製することができる。また当業者に公知の化学的な核酸合成技術を用いて調製することも可能である。

本発明の単離された天然型CPA63タンパク質は、免疫染色法によってそのアレルギー性が評価された。スギ花粉粗抗原(CJP)を二次元電気泳動し、スギ花粉症患者血清を用いてCPA63の特異IgE抗体価を分析した一つの実施例では、47.5%の患者血清で陽性反応を示した。

本発明の単離された天然型CPA63タンパク質および少なくともその一部を含むタンパク質断片は、スギ由来の試料から、好ましくはスギ花粉あるいはスギ花粉抽出物から、アフィニティー精製、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、遠心分離、濃縮、透析などの当業者に公知の技術を利用して得ることができる。

【0025】

本発明のCPA63および少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質は、公知の種々のタンパク質発現系のいずれかを用いて合成することができる。そのような方法には、例えば大腸菌発現系、乳酸菌発現系、酵母発現系、麹菌発現系、昆虫細胞発現系、動物細胞発現系、無細胞発現系などがある。当業者ならば、これらの発現系のそれぞれの長所および欠点等を理解しているので、当業者は目的に応じて適切な発現系を選択することが可能である。例えば、大腸菌などの原核細胞を使う発現系は、糖鎖付加などの適切な修飾が行われないために、組換えCPA63の発現には酵母などの真核細胞を使用する方がよい場合がある。

【0026】

組換えタンパク質を発現させる際には、その発現効率を向上させるため、あるいは後の精製や検出を容易にするために、あるいは発現したタンパク質が細胞内で不溶化してしまうのを防ぐために、分泌シグナル部分の配列を改変したり(例えば、特開2001-258565号公報、および、特開2000-175686号公報)、GSTタグやヒスチジンタグなどのタグ配列を付加したり(例えばTerpe, K., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60, 523-533, 2003)、あるいはGFPなどの蛍光タンパク質や他のタンパク質または他のタンパク質の一部の配列との融合タンパク質として発現させる等(例えばBreitwieser, A. et al., Protein Eng., 15, 243-249, 2002、および、W02002/036785 など)の方法が、当業者の間ではしばしば行われる。組換えCPA63の発現の際にも、当業者ならば必要に応じてこのような技術を利用し、本発明のCPA63および少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質を調製することができる。

【0027】

本発明者らは一つの実施例として、バキュロウイルス-昆虫細胞系を利用して、組換えCPA63タンパク質(rCPA63)の発現を行った。培養上清からHiTrap Chelating HP ColumnsとHiTrap Q FFカラムを用いてrCPA63を精製した。その結果、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定すると分子量約51,000ダルトンを示すrCPA63タンパク質が得られた。さらに一つの実施例として、得られた組換え型CPA63のアレルギー性をELISA法によって評価した。スギ花粉症患者血清を用いて、CPA63特異IgE抗体価を分析したところ、この実施例では約33.3%の患者血清で陽性反応を示した。

【0028】

このように、本発明のスギから単離した天然型CPA63でも、本発明の組換え技術によって調製したCPA63でも、スギ花粉症患者血清IgEとの反応が観測され、これらどちらのCPA63にもアレルギー性があることが発明者らによって初めて示された。当業者は、目的によって本発明のCPA63を取得するための方法を適宜選択することができる。

【0029】

本発明のCPA63および少なくともその一部のアミノ酸配列を含むタンパク質は、その免

10

20

30

40

50

疫学的性質の全てが消失してしまわないような状態であれば、他の一つ以上の物質と、化学的あるいは物理的な方法で、可逆的あるいは不可逆的に結合させた状態で使用することもできる。例えば、ガラス、プラスチック、樹脂、無機物、金属、半導体、蛍光物質、放射性物質、色素分子、タンパク質、核酸、糖、脂質、水溶性高分子、水溶性低分子、生分解性材料、有機合成分子、生物由来分子、ウイルス粒子などに結合させた状態で使用することができる。また結合させるものの形状はどのようなものでも良く、例えば、プレート状、ビーズ状、キューブ状、膜状、カプセル状、ゲル状、結晶状、液晶状、線維状、中空系状、多孔質状、溶液中の分子、ナノ粒子、コロイド、あるいはそれらの複合体、あるいはもっと複雑な形状などでもかまわない。

【0030】

10

本発明で得られた新規のスギ花粉アレルゲンCPA63は、スギ花粉症の診断試薬として利用ができる。また、その診断結果から aspartyl protease と相同性のあるアレルゲン（例えば Bla g 2 や Asp f 10 など）との交差感作に関する情報提供も可能である。

【0031】

また、本発明によって CPA63 タンパク質の全アミノ酸配列が明らかにされたため、CPA63 タンパク質の T 細胞エピトープ部位の同定が可能になった。そのため、それらの T 細胞エピトープペプチドは、スギ花粉症の免疫療法において用途がある。本発明の CPA63 のアミノ酸配列の少なくとも一部を含むタンパク質には、このような CPA63 の T 細胞エピトープペプチドを含むタンパク質も含まれる。

【0032】

20

アレルギーの治療法の1つとして減感作療法があるが、アナフィラキシーなどの副作用も考えられることから、最近の治療においては、患者にアレルゲン全体を投与するのではなく、T細胞が特異的に認識するアレルゲンの最小領域、つまり、T細胞エピトープのみからなるペプチドを投与する、ペプチドワクチンが注目されている。

【0033】

アレルゲンタンパク質のT細胞エピトープの同定方法は、既に確立された技術になっている。例えばこれまでに、主要抗原である Cry j 1 および Cry j 2 の T 細胞エピトープが報告されている（例えば、橋口周平ら、日本臨牀、54、2233-2242、1996、特開平7-118295号公報、および、特開平8-47392号公報）。また、それらを連結させる試みも開示されている（例えば、Sone, T. et al., J. Immunol., 161, 448-457, 1998、および、特開平10-259198号公報）。CPA63タンパク質のT細胞エピトープペプチドも、このような公知の方法によって取得することが可能である。

30

【0034】

本発明で得られた CPA63 タンパク質の T 細胞エピトープペプチドは、それ単独、あるいは、Cry j 1、Cry j 2 およびその他のスギ花粉アレルゲンの T 細胞エピトープペプチドと混在、もしくは結合させることによって、花粉症の免疫療法に用いることができる。

【0035】

さらに、本発明は、CPA63タンパク質、またはそのタンパク質断片に特異的に反応するモノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体を提供することが可能である。タンパク質、またはそのタンパク質断片に特異的に反応するモノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体を作製する方法は、当業者には公知である。

40

【実施例】

【0036】

以下に実施例を挙げて、本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

<実施例1> スギ花粉粗抗原のプロテオーム解析 スギ花粉粗抗原の調製

日本スギ花粉（広島県呉市豊町にて採取）80 gに抽出バッファー（20 mM PBS+ 3 mM EDTA pH 7.6）を3.0 L加えた後、4 で4時間攪拌した。その後、遠心分離（7,000 rpm, 30分間）によって得た上清に対して、終濃度80%飽和になるよう硫酸アンモニウムを加え

50

、4 で一晚攪拌した。次に、遠心分離（7,000 rpm, 30分間）によって沈殿を採取し、ミリQ水で一晚透析を行った。その後、遠心分離（10,000 rpm, 30分間）をすることで得られた上清の凍結乾燥を行い、スギ花粉粗抗原（CJP）を得た。

【0037】

スギ花粉粗抗原の二次元電気泳動

スギ花粉粗抗原（CJP）200 mgに4 mlのPBS+ジチオトレイトール（DTT）60 mgを加えて懸濁し、PBSで60%に調製したトリクロロ酢酸2 mlを加えた後、氷上で90分間静置した。その後、遠心分離（3,500 rpm, 15分間）を行い、沈殿を回収した。この沈殿に冷アセトン10 mlを加えて懸濁し、洗浄した。さらに、遠心分離（3,500 rpm, 20分間）を行った後、スピードバックで沈殿を乾燥させた。その沈殿にLysis Buffer（8 M 尿素、2 Mチオ尿素、2% CHAPS, 2% SB3-10, 1% DTT, 0.8% Ampholine）1 mlを加えて懸濁し、超音波破砕によって完全に溶解させた。その後、遠心分離（18,000 rpm, 20分間）を行い、その上清を二次元電気泳動用のサンプルに用いた。

10

【0038】

pIレンジ3~10のドライストリップをLysis bufferで一晚膨潤させた後、CJPのサンプルをストリップにアプライして1次元目（等電点）の泳動を行った。

9~18%ポリアクリルアミド・グラジエントゲルを作製し、その上に等電点電気泳動後のゲルをセットした。ゲルの上から低融点アガロースを重層し固化させた後、80 Vで一晚、2次元目（分子量）の電気泳動を行った。

二次元目の電気泳動が終了した後、ゲルを染色することによってタンパク質を検出した。その結果の一例を、図1に示した。スギ花粉粗抗原中には、主要抗原であるCry j 1とCry j 2以外にも多くのタンパク質が確認された。

20

【0039】

ウェスタンブロットニング

二次元電気泳動後のタンパク質を、ブロットニングキット（Hoefer DALT）を用いて約6時間、60Vの条件でメンブレンに転写した。その後、メンブレンをPBST（0.1% Tween20/PBS）で洗浄し、ブロッキング液（5% skim milk, 1% BSA/PBST）で一晚振とうした。その後、PBSTで洗浄し、ブロッキング液で10倍希釈したスギ花粉症患者血清中で4時間振とうしながらインキュベートした。洗浄後、ブロッキング液で2,500倍希釈した抗ヒトIgE - ビオチン標識（Biosource）を加え、2時間振とうしながらインキュベートした。PBSTで洗浄した後、ブロッキング液で2,500倍希釈したストレプトアビジン - HRP標識（ZYMED）と共に、1時間インキュベートした。その後、PBSTで洗浄した後、ECL Western blotting detection reagents（Amersham Pharmacia Biotech）と共に5分間インキュベートを行い、X線フィルムに感光させて陽性スポットを検出した。

30

ウェスタンブロットによる解析の結果、スギ花粉粗抗原中にはCry j 1とCry j 2以外にも陽性反応を示すスポットが多く存在することが明らかになった。12名のスギ花粉症患者血清IgEで調査した内、とくに強い陽性反応があったスポットを、図1中に線で囲んで示した。

【0040】

その中で、約50%以上の反応頻度を示したCPA63タンパク質のアミノ酸シーケンスをMALDI-TOF MSを用いて行った。その結果、X-Val-Glu-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ala-Met-Arg および Phe-Thr-Pro-X-X-Ser-Asn-Ser-Arg（XはIleまたはLeuを示す）の配列が得られた。本配列を用いてホモロジー検索をしたところ、既知の他の植物由来の配列の中に有意な相同性を示すものは存在せず、本タンパク質の分子種を類推することはできなかった。次に、X-Val-Glu-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ala-Met-Argの配列を用いてCryptomeria japonica（日本スギ）のESTデータベースを検索したところ、一致する翻訳配列を有するEST（Accession number BP173910）を見出した。そこでさらに未知遺伝子領域の配列を決定し、CPA63の全長遺伝子を取得するために、実施例2の方法をとった。

40

【0041】

<実施例2> CPA63遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の決定

50

スギ葯トータルRNAの精製

液体窒素中で粉碎したスギ葯5 gを50 ml容量の遠沈管に入れ、4 のConcert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)を25 ml加えて懸濁した。遠沈管を横にした状態で、室温で5分間静置した。これを遠心分離(2,600×g、5分間、4)した。その上清をメッシュサイズ100 μmのセルストレーナー(BDファルコン)で濾過した。濾過した上清10 mlにつき5 M塩化ナトリウムを2 ml加えて懸濁した。濾過した上清10 mlにつきクロロホルムを6 ml加えて懸濁した。これを遠心分離(2,600×g、30分間、4)した。上清に、上清の0.9倍量のイソプロパノールを加えて懸濁した。これを室温で10分間静置した。次にこれを遠心分離(2,600×g、30分間、4)した。上清を除き、沈殿したトータルRNAに75%エタノールを10 ml加えて軽く懸濁した。これを遠心分離(2,600×g、5分間、4)した。上清を除き、遠沈管のふたを開けた状態で、室温で15分間静置してトータルRNAを乾燥した。これにRNase free waterを300 μl加え、トータルRNAを溶解した。得られたトータルRNA溶液は-80 で保存した。

10

【0042】

スギ葯mRNAの精製および濃縮

スギ葯トータルRNAからmRNAの精製には、Oligotex™-dT30 <Super> mRNA Purification kit (TaKaRa)を用いた。スギ葯トータルRNA 250 μgを含むトータルRNA溶液150 μlを調製した。これに2×Binding bufferを150 μl、Oligotex™-dT30 <Super>を15 μl加えて懸濁した。70 で3分間インキュベートし、室温で10分間静置した。これを遠心分離(15,000 rpm、5分間、室温)した。上清を除き、沈殿したOligotex™-dT30 <Super>にWash bufferを350 μl加えて懸濁した。これをスピнкаラムセットのカップに移し、遠心分離(15,000 rpm、30秒間、室温)した。カップを新しいスピнкаラム用遠心チューブに移した。カップ内のOligotex™-dT30 <Super>にWash bufferを350 μl加えて懸濁した。これを遠心分離(15,000 rpm、30秒間、室温)した。カップを新しいスピнкаラム用遠心チューブに移した。(1)カップ内のOligotex™-dT30 <Super>に70 のRNase free waterを30 μl加えて懸濁し、遠心分離(15,000 rpm、30秒間、室温)して、mRNA溶液を回収した。(1)の操作をさらに2回行った。一連のmRNA精製操作をさらに5回行い、mRNA溶液を約500 μl以上得た。

20

【0043】

mRNA溶液500 μlに3 M 酢酸ナトリウム(pH5.2)を16.5 μl加えて懸濁した。これにEt hachinmate(ニッポンジーン)を3 μl加えて懸濁した。これにイソプロパノールを500 μl加えて懸濁した。これを遠心分離(15,000 rpm、10分間、4)した。上清を除き、沈殿したmRNAに75%エタノールを1 ml加えて軽く懸濁した。これを遠心分離(15,000 rpm、5分間、4)した。上清を除き、マイクロチューブのふたを開けた状態で、室温で15分間静置してmRNAを乾燥した。これにRNase free waterを10 μl加え、mRNAを溶解した。得られたmRNA溶液は-80 で保存した。

30

【0044】

スギ葯cDNAの合成

スギ葯mRNAから5'-RACE用および3'-RACE用cDNAの合成には、BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences)を用いた。5'-RACE用cDNAの合成は、0.5 ml容量のマイクロチューブに、1 μg/μl mRNA溶液を1 μl、5'-CDS primerを1 μl、BD SMART II A oligoを1 μl、RNase free waterを2 μl加えて懸濁した。一方、3'-RACE用cDNAの合成は、0.5 ml容量のマイクロチューブに、1 μg/μl mRNA溶液を1 μl、3'-CDS primer Aを1 μl、RNase free waterを3 μl加えて懸濁した。70 で2分間インキュベートし、氷上で2分間静置した。各反応液に、5×First-Strand Bufferを2 μl、20 mM ジチオトレイトールを1 μl、dNTP mixを1 μl、BD PowerScript Reverse Transcriptaseを1 μl加えて懸濁した。42 で90分間インキュベートした。反応液にTricine-EDTA Bufferを250 μl加えて懸濁した。これを72 で7分間インキュベートした。得られたcDNA溶液は-30 で保存した。

40

【0045】

50

CPA63のcDNA配列の決定

質量分析法を用いて推定したCPA63のアミノ酸配列 (X-Val またはVal-X)-Glu-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ala-Met-Arg (XはIleまたはLeuを示す) を検索子として、GenBankのESTデータベースを検索した。その結果、Leu-Val-Glu-Pro-Ala-Tyr-Asn-Ala-Met-Argの翻訳配列を有する、*Cryptomeria japonica*のEST (Accession number BP173910) を見出した。CPA63遺伝子の未知領域を取得するために、BP173910の塩基配列をもとに、5'-RACE用プライマー 5'-CTC CAC CAG CCT AGT GAT GAC TGT TCC-3'、および3'-RACE用プライマー 5'-CGG C GA CGT GGA GTT TCC TCT CAT C-3'を作製した。作製したそれぞれのプライマーとUniversal Primer A Mix (BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit付属プライマー) を用いて、スギ葯cDNAをテンプレートとした5'-RACEおよび3'-RACEを行った。このRACE反応はBD AdvantageTM 2 PCR Kit (BD Biosciences) を用いた。5'-RACE産物および3'-RACE産物を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、DNA Ligation Kit ver. 2.1 (TaKaRa) を用いてpGEM-T Easy Vector (Promega) に連結した後、Competent high E. coli DH5 (TOYOBO) に形質転換した。得られた形質転換体から、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを調製した。調製したプラスミドをテンプレートとして、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクル反応を行った。

【0046】

反応液をエタノール沈殿法で精製し、DNAシーケンサー 3100-Avant (Applied Biosystems) を用いて、5'-RACE産物および3'-RACE産物の塩基配列を解析した。5'-RACE産物の塩基配列から推定したアミノ酸配列には、質量分析法を用いて推定したCPA63のもう一つのアミノ酸配列 Phe-Thr-Pro-Leu-Leu-Ser-Asn-Ser-Arg と一致する配列が存在していた。このことは、本遺伝子がCPA63遺伝子であることをさらに支持する事象であった。CPA63の全長遺伝子を取得するために、得られた塩基配列をもとに、プライマー 5'-GGA TCA TT G CCT GTG CTT CTC ATA GAC G-3' および 5'-TTA TAG TGA AGC AGA GTG GAC GTT GG-3' を作製した。これらのプライマーを用いて、5'-RACE用スギ葯cDNAをテンプレートとしたPCRを行い、CPA63の全長遺伝子を増幅した。このPCR反応はKOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO) を用いた。得られたCPA63の全長遺伝子を精製し、pUC118 DNA HincII/BAP (TaKaRa) に連結した後、E. coli DH5 に形質転換した。形質転換体からプラスミドを調製し、CPA63の全長遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、CPA63の全長cDNAの塩基配列 (配列番号1) およびアミノ酸配列 (配列番号2) が得られた。CPA63の全長cDNAは1525 bpの塩基からなり、そのORFは472アミノ酸をコードしていた。

【0047】

<実施例3> CPA63遺伝子およびタンパク質の相同性検索

GenBankデータベースを用いたFASTA及びBLAST検索によって、得られたCPA63の遺伝子およびタンパク質の配列について相同性検索を行った。図2にスギ花粉アレルゲンCPA63のアミノ酸配列 (配列番号2) と他の植物由来の aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like protein とのアミノ酸配列の相同性を比較した結果を示した。

【0048】

図2中、ARATHA1 および ARATHA2は *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) 由来 nucleoid DNA-binding-like protein のアミノ酸配列 (それぞれGenBank Accession AAM65914およびAAM66983) である。ORYSAT は *Oryza sativa* (イネ) 由来 nucleoid DNA-binding-like protein のアミノ酸配列 (GenBank Accession BAD31106) である。POPTRI は、*Populus trichocarpa* (ブラックコットンウッド) 由来 putative aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinのアミノ酸配列 (GenBank Accession BU881529, CV233943, CV234172, CV235428, CV236654, およびCV252651から得たORFの翻訳配列) である。MALDOM1 は、*Malus x domestica* (リンゴ) 由来 putative aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinのアミノ酸配列 (GenBank Accession CN861156, CN884543, CN884846, CN887971, CN900689, CN909749, CN911584, CN939698, CN947159, およびC0898345から得たORFの翻訳配列) である。MALDOM2は、*Malus x dome*

stica (リンゴ) 由来 putative aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinのアミノ酸配列 (GenBank Accession CN878811, CN888988, CN890192, CN890327, CN900189, CN900844, CN938123, CN943706, CN946109, および C0752714から得たORFの翻訳配列)である。CITSIN は、Citrus sinensis (オレンジ) 由来 putative aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like protein (GenBank Accession CF509569, CF835209, CK934020, CK934803, CV714459, CV885520, CX045648, CX051916, CX072584, および CX072585から得たORFの翻訳配列)である。

【0049】

またCPA63は、Nepenthes gracilis由来のAspartic proteinase (Athauda SB, et al., Biochem. J., 381, 295-306, 2004)とアミノ酸レベルで34.9%、DNAレベルで50.9%、Nicotiana tabacum (Nakano, T. et al., Plant Cell, 9, 1673-1682, 1997)由来のnucleoid DNA binding proteinとアミノ酸レベルで35.5%、DNAレベルで48.3%の同一性を示した (図3、*は一致したアミノ酸残基を示す)。

以上のようにCPA63が他種のaspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinと高い相同性を保持していることが確認された。一方これまでにaspartyl proteaseはアレルゲンとしても報告されており、例えばチャパネゴキブリ由来Bla g 2 (Pollart SM, J. Allergy Clin. Immunol., 87, 511-21, 1991)やAspergillus fumigatus(真菌)由来Asp f 10 (Cramer R., Int. Arch. Allergy Immunol., 115, 99-114, 1998)などが知られている。このことから本発明のCPA63は、スギ花粉以外のアレルゲンとの交差反応性に関する情報を提供しうる手段に使用することが可能である。

【0050】

<実施例4> 組換え型CPA63タンパク質(rCPA63)の発現

組換え型CPA63タンパク質(rCPA63)をバキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させた。CPA63をコードするcDNAを鋳型として、DNA増幅酵素であるKOD-plus-を用いたPCRによって増幅し、両末端にBamH IおよびEcoR Iサイトを有するCPA63遺伝子断片を得た。この増幅物を、BamH IとEcoR Iで制限酵素処理し、同様にBamH IとEcoR Iで処理した昆虫細胞発現用ベクター-pVL1393中にインサートし、CPA63/pVL1393を得た。インサートしたCPA63遺伝子の配列はDNAシーケンサー 3100-Avant (Applied Biosystems)によって確認した。CPA63/pVL1393を、バキュロウイルスDNA (SapphireTM DNA(Orbigen))とともに昆虫培養細胞Sf9へコトランスフェクションし、CPA63遺伝子を有する組換えバキュロウイルスを調製した。本組換えバキュロウイルスのゲノムDNAを鋳型として、CPA63遺伝子特異的PCRを行うことによって、ウイルスゲノム中にCPA63遺伝子が組み込まれたことを確認した。次にこの組換えバキュロウイルスを、昆虫培養細胞Sf9に接種した後、27℃で、4日間培養し、rCPA63タンパク質を発現させた。rCPA63タンパク質は、C末端にポリヒスチジン(6×ヒスチジン残基)が付加したヒスチジntag融合タンパク質として発現させた。培養液を3,000 rpm、4℃で、10分間遠心分離した後、上清を回収した。この上清を分取して、SDS-PAGEにかけた後、銀染色とウエスタンブロット解析を行い、rCPA63の発現を確認した (図4と図5)。ウエスタンブロットは、一次抗体としてPenta-His Antibody(QIAGEN)抗体、二次抗体としてHRP標識されたAnti-mouse IgG (生化学工業)抗体を使用し、ECL Plus Western Blotting Detection System(Amersham Biosciences)で発光させrCPA63を検出した。図4および図5のレーン1は分子量マーカー、レーン2は培養上清を示す。

【0051】

<実施例5> 組換え型CPA63タンパク質(rCPA63)の精製

実施例4にて発現させたrCPA63タンパク質を、昆虫細胞の培養上清から精製した。rCPA63のC末端に付加したヒスチジntagを利用し、Hisカラムによる精製を行った。培養上清をHiTrap Chelating HPカラム (Amersham Biosciences)に供してカラムに吸着させ、PBS緩衝液で非特異的にカラムに吸着したタンパク質を洗浄した。その後、PBS緩衝液中のイミダゾールの濃度を10 mM~500 mMヘグラジエントし、rCPA63をカラムから溶出させた。得られた画分を、SDS-PAGE/ウエスタンブロット解析し、rCPA63の溶出画分を確認した (図4レーン2)。その後、rCPA63を含む溶液を攪拌型ウルトラホルダー(ADVANTEC)によ

て濃縮した。その濃縮液をHiTrap Desaltingカラム (Amersham Biosciences)に供してPBS緩衝液から20 mM Tris-HCl緩衝液に置換した。その液を、陰イオン交換カラムHiTrap Q FFカラム (Amersham Biosciences)に供して、rCPA63をカラムに吸着させた。その後、NaClの濃度を20 mM~1 Mへグラジエントし、rCPA63をカラムから溶出させた。得られた画分を、SDS-PAGE/ウエスタンブロット解析し、rCPA63の溶出画分を確認した。その後、rCPA63を含む溶液を攪拌型ウルトラホルダーによって濃縮した。

【0052】

rCPA63タンパク質の精製過程を、図4および図5に示した。図4および図5のレーン1は分子量マーカーである。昆虫細胞の培養上清(図4レーン2)、HiTrap Chelating HPカラムに供した後の画分(図4レーン3)、およびHiTrap Q FFカラムで精製したrCPA63タンパク質(図4レーン4)をサンプルとして用いて、SDS-PAGEを行った。ポリアクリルアミド濃度12.5%の分離ゲルを用いて電気泳動した後、銀染色液(第一化学工業)でタンパク質を染色した。その結果、分子量が約51,000ダルトン(図4レーン4)の単一バンドが確認された。また、Anti-Penta His抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果(図5レーン4)から該タンパク質がrCPA63であることが確認された。図5のレーン2は培養上清、レーン3はHisカラムによる精製後のrCPA63を示す。

また、得られた精製rCPA63について、スギ花粉粗抽出タンパク質をウサギに免疫して作製した抗-粗スギ花粉タンパク質 ウサギ抗血清を一次抗体としたウエスタンブロット解析も行った。二次抗体はHRP標識されたAnti-Rabbit Ig抗体 (Amersham Biosciences)を使用し、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences)で発光させ免疫染色を行った。その結果(図6)、51,000ダルトンにrCPA63由来の発色バンドが確認され、rCPA63が天然のスギ花粉由来タンパク質と同様に、抗-粗スギ花粉タンパク質ウサギ抗血清と反応することが示された(図6レーン3)。なお図6のレーン1は分子量マーカー、レーン2はCry j 2、レーン4はBSAを示す。

【0053】

<実施例6> 天然型CPA63タンパク質(nCPA63)のアレルゲン性

スギ花粉粗抗原から分離したnCPA63について、スギ花粉症患者血清との反応を調べた。実施例1と同様の方法で、スギ花粉粗抗原の調製および二次元電気泳動を行い、nCPA63を分離した。スギ花粉症患者血清40検体それぞれについて、実施例1と同様の方法でウエスタンブロッティングを行い、nCPA63との反応を調べた。比較例として、既知の主要アレルゲンCry j 1およびCry j 2との反応も調べた。その結果を表1に示した。nCPA63はスギ花粉症患者血清40検体中19検体(47.5%)で陽性反応を示した。また、nCPA63の反応状況は、Cry j 1およびCry j 2の反応状況とは異なっていた。このことから、nCPA63はスギ花粉症患者血清と高頻度で反応し、かつ、Cry j 1およびCry j 2とは免疫学的性質の異なる新規なスギ花粉アレルゲンであることが示された。

【0054】

【表 1】

表1 nCPA63のスギ花粉症患者血清との反応

患者血清	Cryj 1	Cryj 2	nCPA63
AA	+	+	+
AB	+		
AC	+	+	+
AD	+		+
AE	+	+	
AF	+		+
AG	+	+	
AH	+	+	
AI	+	+	
AJ	+	+	+
AK	+	+	+
AL	+		
AM	+	+	
AN		+	
AO	+	+	
AP	+		+
AQ			
AR	+		+
AS	+		
AT	+		+
AU			+
AV		+	
AW	+		
AX	+	+	+
AY	+		+
AZ			+
BA	+	+	+
BB		+	
BC	+		+
BD	+		
BE	+		+
BF	+		
BG	+		+
BH	+	+	+
BI	+		
BJ	+	+	+
BK	+		
BL	+		
BM			
BN	+		
陽性%	82.5	42.5	47.5

10

20

30

40

【 0 0 5 5 】

< 実施例 7 > 組換え型CPA63タンパク質 (rCPA63) のアレルギー性

実施例 4 および実施例 5 によって発現および精製された rCPA63 タンパク質のスギ花粉症患者血清由来の IgE に対する結合能を ELISA 法により測定した。まず、マイクロタイタープレートウェルに 100 mM Sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) で希釈した抗原溶液 (10 μ g/ml) を 50 μ l アプライした。また、human IgE standard をまず 200 ng/ml になるよう

50

に希釈し、倍希釈系列をそれぞれのウェルに50 μ lずつ加え、室温で2時間静置した。PBSTにて洗浄した後、blocking buffer[$\text{PBS}(\text{pH } 7.4)$, 0.5% Tween20, 3% skim milk, 1% BSA]を200 μ lアプライし、4 で一晩静置した。PBSTで洗浄後、blocking bufferで10倍希釈したスギアレルギー患者及び健常者血清を50 μ lをアプライし、4 で4時間静置した。PBSTで洗浄後、blocking bufferで1,000倍に希釈したanti-human IgE EPSILON CHAIN BIOTIN CONJUGATE (Biosource International, Inc.) 50 μ lをアプライし、室温で2時間静置した。PBSTで洗浄後、blocking bufferで1,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識Streptavidinを50 μ lアプライし、室温で1時間静置した。充分洗浄した後、50 μ lの AttoPhosTMを加え CytoFluorTM II (PerSeptive Biosystems) にて蛍光強度を測定した。

10

【0056】

スギ花粉症患者血清30検体 (RAST Score 3) および健常者血清6検体 (RAST Score = 0) を用いて、rCPA63特異的IgE抗体価を分析した結果を、図7に示す。基準として健常者6人の平均値に標準偏差の3倍を足した値を破線で示した。破線の値以上のIgE値を示した検体を危険率5%以下で当rCPA63に対して陽性であると評価した。その結果、30検体中10検体(P3, 11, 16, 17, 19, 22, 23, 26, 28, 30)の患者血清(33.3%)が、rCPA63に対してIgE反応陽性であった。

【配列表フリーテキスト】

【0057】

配列番号1 - 人工配列の説明：CPA63のアミノ酸配列をもとに作製したcDNA

20

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】スギ花粉粗抗原(CJP)の二次元電気泳動を示す図である。

【図2】スギ花粉アレルゲンCPA63と他の植物由来 aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinとの相同性を示す図である。

【図3】スギ花粉アレルゲンCPA63と他の植物由来 aspartyl protease family protein/nucleoid DNA-binding-like proteinとの相同性を示す図である。

【図4】組換え型CPA63アレルゲンの精製過程を、SDS-PAGEで解析した図である。

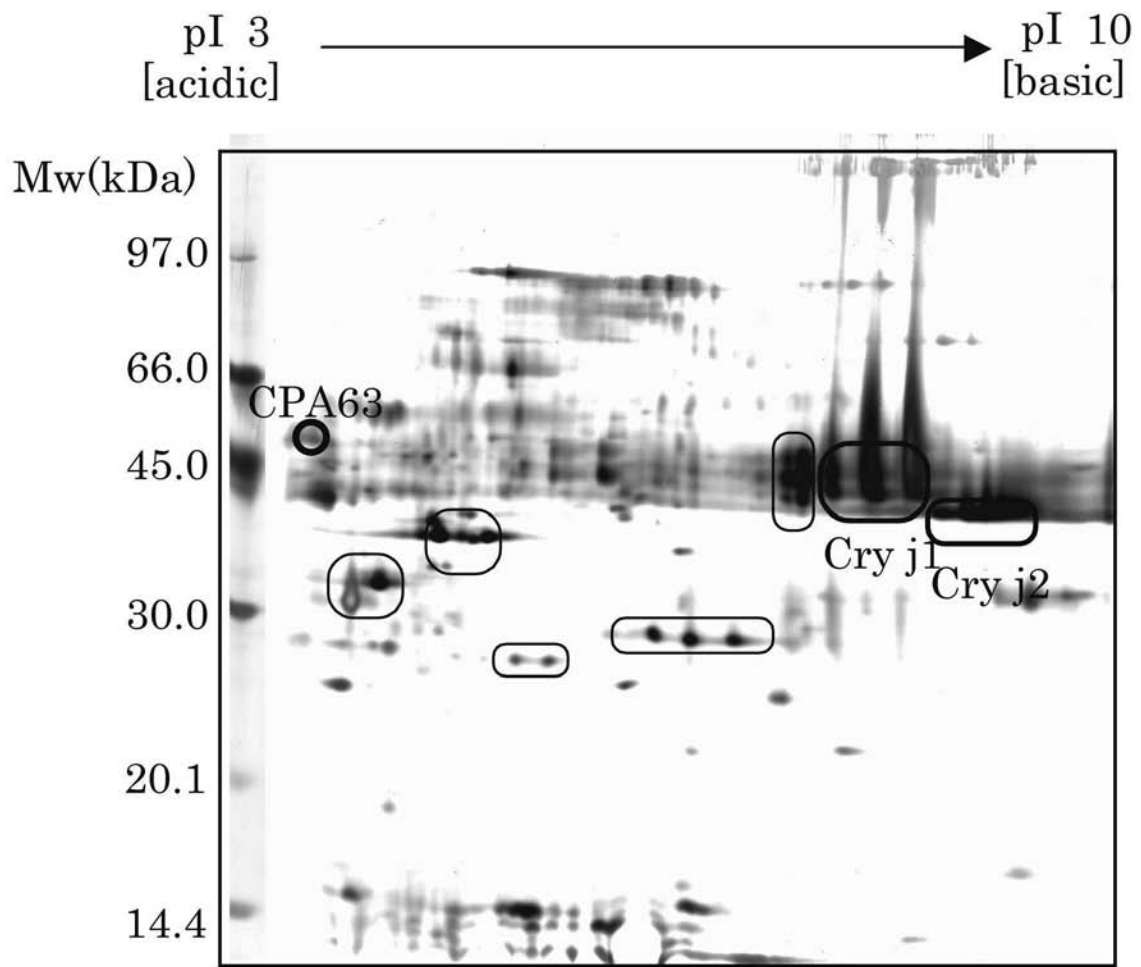
【図5】組換え型CPA63アレルゲンの精製過程を、ウエスタンブロットで解析した図である。

30

【図6】スギ花粉由来のタンパク質を免疫した抗体を用いて組換え型CPA63アレルゲンを免疫染色した図である。

【図7】スギ花粉症患者血清 (RAST Score 3) 30検体 (P1~P30) および健常者血清6検体の平均値に標準偏差の3倍を足した値 (* および破線) を用いて、rCPA63特異的IgE抗体価を分析した結果を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *
CPA63  : MARRLCSFLL--SFLII-VSVWAENSKFARLN--ASFTWKDAEDNKNCSAGELETSSTLSVMHIOGKCSPEFRLN--SSWWTAVSESIGKDT : 85
POPTRI : MHTQQQSYLVRCFSFSESIAMDFPHCAATFF--FALLFSTTKAVDPCATQSD--TSDLSVIPHYSKCSPEVPPK-QESVNVTVITMASKDP : 87
ARATHA1 : -----MASSSLHFFFFLL--LPLPFTTTRDTCATAAPDGSDDLSIIPNAKCSPEAPTHVSASVIDTVLHMASDSS : 72
MALDOM1 : -----MATLSHVLSSL--FLSLAHGLN--PQCSETKEQGSTLQIFHVYSPCSPE--RPSKPMSEESVLOMQAKDQ : 68
MALDOM2 : -----MATLSHVLSSL--FLSLAHGLN--PQCSETKEQGSTLQIFHVYSPCSPE--RPSKPMSEESVLOMQAKDQ : 70
CITSIN : -----MKPQLVFFLAFLEFLSLEGLN---PIC-DTQDHSSTLQVFFHVFSPCSP--KPSKPLSEESVLEMLAKDQ : 66
ARATHA2 : -----MRSHLLILLISLL--LKL-SESIN---CNE-KSHSSDLRVFHLNSOCSP--KTS--VSWADTLLQ---DK : 57
ORYSAT : -----MALRMSIAAMSVLAVAAVIVVAGTAAAAAACPATPPDAGATLQVSHAFGECSPLGAESAAPSAGFADQAARDA : 76

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
CPA63  : ARYRAMVKGGSAGKTMVNPQEDADIPLASG--QATSS--SNYIKLGFGTPEQSFYTVLDTGNSIAWIPCNFCSCGSSKQQPFEPKSSSTYN : 174
POPTRI : ERKLYL-----STLIA--DQKTTAVPIAPCCQVLIKIANVVRVKLGTPEQQQMFVLDTSNDAAWVPCSGCTGCS--STTFLPNASTTLG : 166
ARATHA1 : HRLIYL-----SSIVAGKPKPTSPVVASGNC--LHIGNVVRRAKLGTEPQLMFMVLDTSNDAVWLPSCGSCGCGNASTSFNINSSTYS : 154
MALDOM1 : ARIQFL-----SSI--VAKKSVVPIASGROI--TOSPTYIVKAKIGTPEQTLIMAVDTSNDAAWVPCGCVGCCS--SV-FNSAISTYK : 146
MALDOM2 : ARIQFL-----SSI--VATKPVVPIASGROI--TOSPTYIVKAKIGTPEQTLIMAVDTSNDAAWVPCGCVGCCS--NV-FNSVKSITYK : 148
CITSIN : ARIQFL-----SSIA--VARKSVVPIASGROI--TOSPTYIVRAKIGTPEQTLIMAMDTSNDAAWVPCGCVGCCS--IV-FNSAQSTTEK : 145
ARATHA2 : ARFLYL-----SSIA--GVRKSVVPIASGRALVOSPTYIVRANIGTPEQPLVALDTSNDAAWVPCGCVGCCS--SVLTFPSKSSSR : 137
ORYSAT : SRLIYL-----DSLIA--VKGRAYAPIASGRLOLLOTPYVVRARLGTPEQQLLIMAVDTSNDAAWVPCSGCAGCPT--SSPVPAAASAYR : 156

      *      200      *      220      *      240      *      260      *
CPA63  : YLTCASOCCQLLRVCTKSDNS---VNCSLTQRVGDSEVDEILSETLTVSGSOQVENVFVGCSSNAARGLIQRTPSLVGFGRNPLSEFVSOT : 261
POPTRI : SLDCSGAOCSSVIRGFCPATGS--SACL--ENQSYGGDSSITATLIVODATILANDVIEGETFGCINAVSGGSI--PPQGLLGLGRGPI--SLISQA : 254
ARATHA1 : TVSGSTAOCTAARGLTPCSSPQPSVCSF--SNQSYGGDSSFSASLVDTTLPLADVIEFNSFGCINSAGNSLPPQGLMGLGRGPM--SLVSO : 244
MALDOM1 : NLCCRAAQCNOVPNFTC--LG---SSCGFNLYYGS--SSIAANLSQETIFLALDSEVGYTFGCICRATGSSVPPQGLLGLGRG--PLSLLSQT : 230
MALDOM2 : NLCCQAACQCKQVPNFTC--LG---SSCGFNLYYGS--SSIAANLSQETIFLALDSEVGYTFGCICRATGSSVPPQGLLGLGRG--PLSLLSQT : 232
CITSIN : NLCCQAACQCKQVPNFTC--GG---GACAFNLYYGS--STIAANLSQDTTSLADIVVGYTFGCICRATGSSVPPQGLLGLGRG--PLSLLAQT : 229
ARATHA2 : TLOCEAPOCKQAPNPSCTVS---KSCGFNLYYGS--STIEAYLTODTTLASDVIENYTFGCINKASGTS--LPAQGLMGLGRG--PLSLLSOS : 222
ORYSAT : PVPGGSPCCVLAPE--SCSPNA---KSCGFNLYYGS--SSLOALSDTILAVAGDVKVAYTFGLQRATGTAAPPQGLLGLGRG--PLSLLSOT : 242

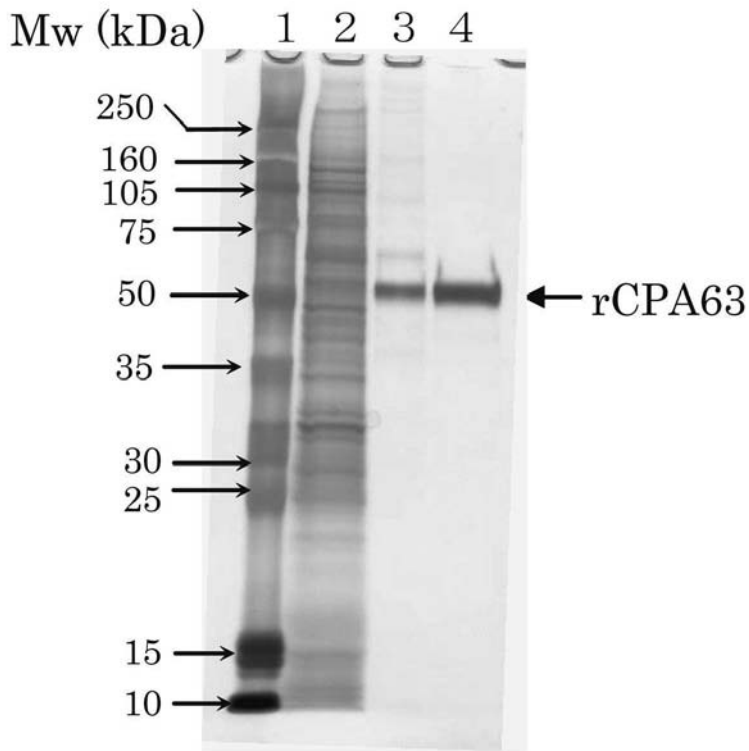
      280      *      300      *      320      *      340      *      360
CPA63  : ATLYDSTFSYCLPSLFS--SAFTGSL--LGLKEALSAOGLKSTPLLSNSRYPSFYVGLNGISVGEELVSTFAGTISLESTGRTI--DSGTVI : 351
POPTRI : GAMYSGVFSYCLPSLFSKSYF--FGSLKGLG--VGV--OPKRSIRTPLLRNP--HPSLYVNNITGVSVGRIVKVPITHESECVFEDNTGAGTI--DSGTVI : 343
ARATHA1 : TSLYSGVFSYCLPSLFS--FYFGSLKGLG--LIG--OPKRSIRTPLLRNP--RPSLYVNNITGVSVGVCVPPVDPVYITF--ANSAGAGTI--DSGTVI : 333
MALDOM1 : QNLYQSTFSYCLPSLFSKSN--FSGSLR--LGEV--OPKRIKYP--LLKNPRRS--SLYYVNNLAI--RVGRIVDIEPAALAFNEITGSGTIE--DSGTVE : 319
MALDOM2 : QNLYQSTFSYCLPSLFSKSN--FSGSLR--LGEAV--OPKRIKYP--LLKNPRRS--SLYYVNNLAI--RVGRITVDIEPAALAFNEITGSGTIE--DSGTVE : 321
CITSIN : QNLYQSTFSYCLPSLFSK--ALS--FSGSLR--LGEI--OPKRIKYP--LLKNPRRS--SLYYVNNLAI--RVGRIVDIEPGALQFNETGAGTI--DSGTVE : 318
ARATHA2 : QNLYQSTFSYCLPSLFSK--SN--FSGSLR--LGEKN--OPTRIKY--TPLLKNPRRS--SLYYVNNITGVIRVGNKIVDIEF--SALAFD--RATGAGTI--DSGTVI : 311
ORYSAT : KDMYGATFSYCLPSLFSK--LNFSGTLR--LRNG--OPRRIKYP--LLAN--HRS--SLYYVNNITGVIRVGNKIVSIF--SALAFD--RATGAGTI--DSGTVE : 331

      *      380      *      400      *      420      *      440      *
CPA63  : TRLVFPAYAVRNEERRR--V--SLSL--GAFDTCFA--ATNEAEAPAITLH--E--GLNVLPMENSLI--H--SSGSLACL--SMAAA--P--NVNSV : 440
POPTRI : TRLVQPVYDAIRDFERRQV--N--GPISSLGAFDTCFA--ADNEAEAPAITLH--E--GLNVLPMENSLI--H--SSGSLACL--SMAAA--P--NVNSV : 427
ARATHA1 : TRFAQPVYDAIRDFERRQV--N--VSSFSTLGAFTDCCF--ADNENVAEKITLHMT--SLDLKLPMENTLI--H--SSAGTLTCL--SMAGIR--Q--N--AV : 418
MALDOM1 : TRLVQPAYAVRNEERRR--V--SLSL--GAFDTCYS--VP--FVVP--ITFMES--GMVTLPP--Q--NVI--H--STAGSITCL--MAAA--P--DNVNSV : 403
MALDOM2 : TRLVQPVYDAVNEERRR--V--SLSL--GAFDTCYS--VP--FVVP--ITFMES--GLNMLPE--D--NVI--H--STAGSITCL--MAAA--P--DNVNSV : 405
CITSIN : TRLVQPAYAVRNEERRR--V--SLSL--GAFDTCYS--VP--FVVP--ITFMES--GMVTLPP--Q--NVI--H--STAGSITCL--MAAA--P--DNVNSV : 402
ARATHA2 : TRLVQPAYAVRNEERRR--V--K--NAN--ATSLG--GAFDTCYS--GS--FVVP--ITFMFA--GMVTLPP--Q--NVI--H--SSAGN--SCL--MAAA--P--DNVNSV : 394
ORYSAT : TRLVQPVYDAIRDFERRR--V--SLSL--GAFDTCYN--TT--VAV--EVTLL--E--D--GMVTLPE--N--VVI--H--TLYGTT--SCL--MAAA--P--DNVNTV : 416

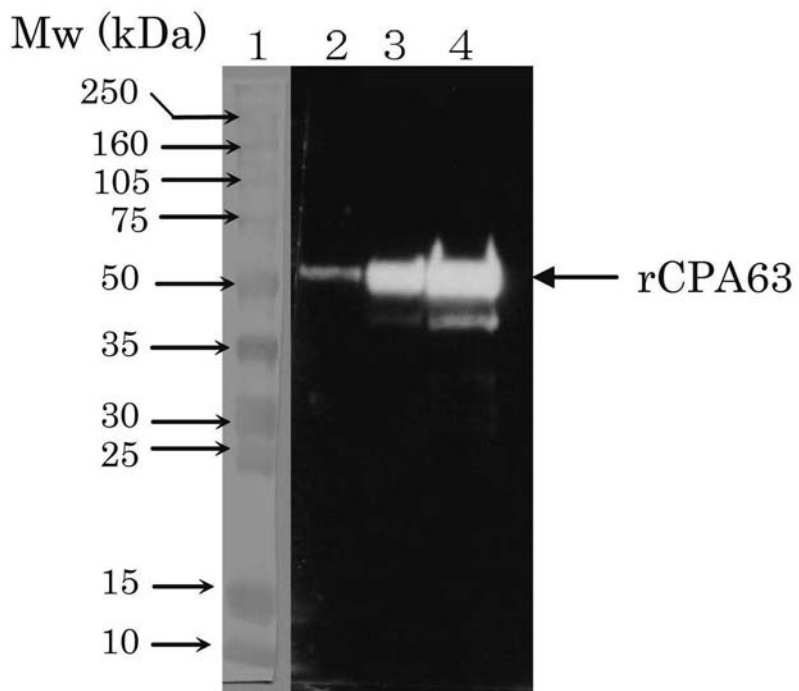
      460      *      480
CPA63  : LSTFCNYQOQKLRIVH--MAES--RLGI--ASE--N--DG-- : 472
POPTRI : LNVIANLQOQNLRIM--E--DTN--SRLGI--ARE--L--CN-- : 458
ARATHA1 : LNVIANLQOQNLRIL--E--DVP--NSRLGI--ARE--L--CN-- : 449
MALDOM1 : LNVIANMQOQNERVLI--DVP--NSRLGVARE--ACT-- : 434
MALDOM2 : LNVIANMQOQNERVLI--DVP--NSRLGVARE--ACT-- : 436
CITSIN : LNVIANMQOQNERVLI--DVP--NSRLGVARE--L--CT-- : 433
ARATHA2 : LNVIASMQOQNERVLI--DVP--NSRLGI--S--RET--CT-- : 425
ORYSAT : LNVIASMQOQNERVLI--DVP--N--G--RV--G--FA--RES--CT--AA : 449

```

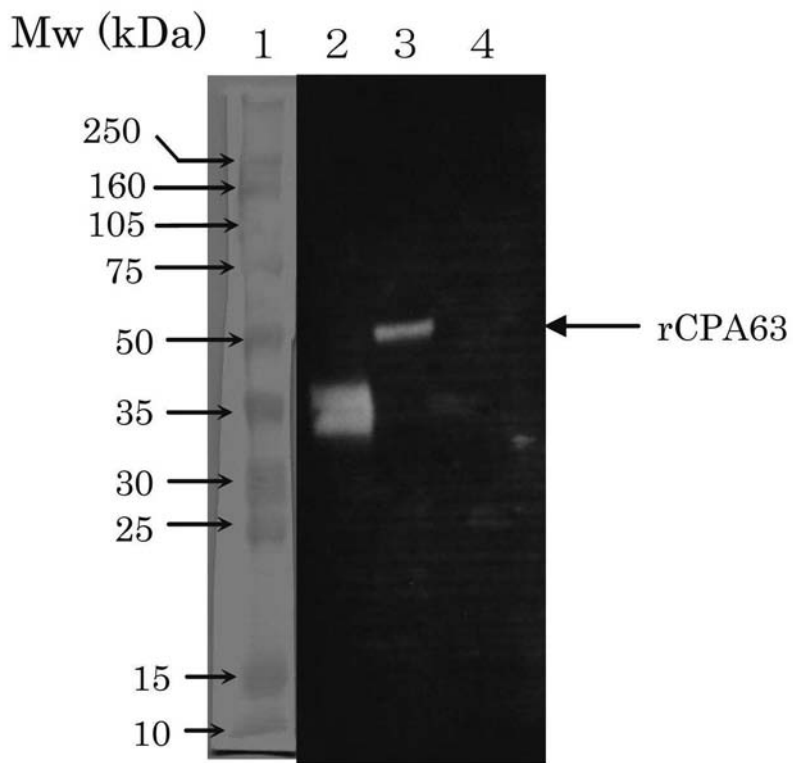
【 図 4 】



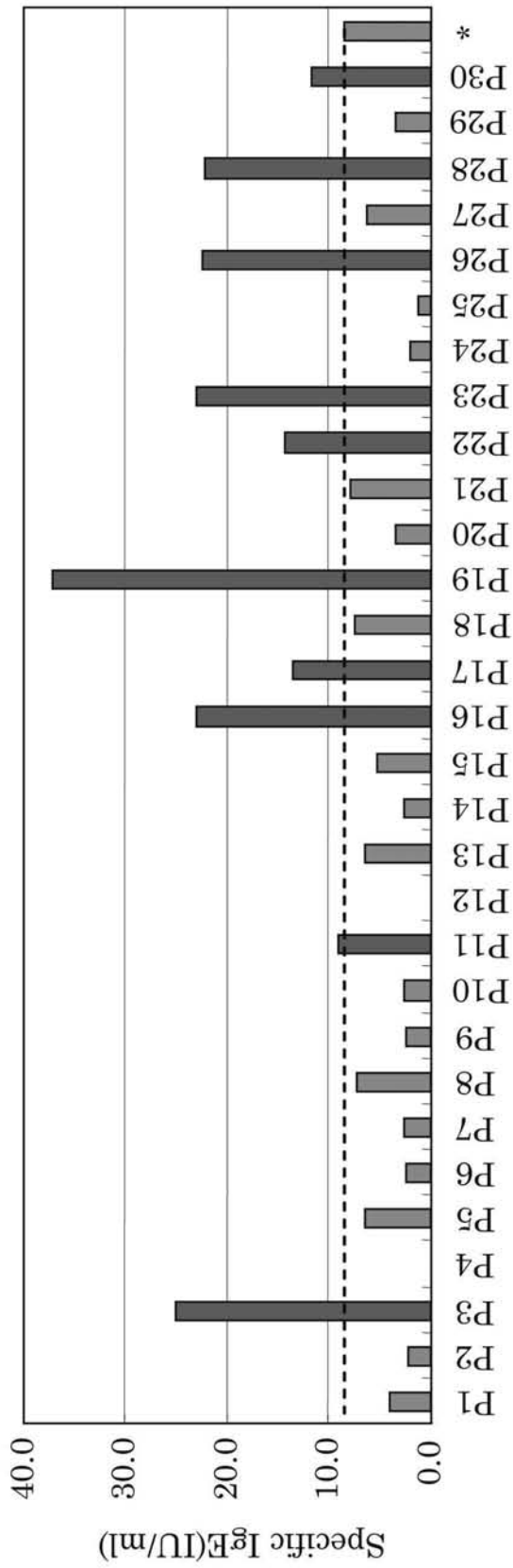
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2007014311000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/16 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 0 7 K 16/16	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Q
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

- (74)代理人 100115107
弁理士 高松 猛
- (72)発明者 小埜 和久
広島県東広島市鏡山 1 - 3 - 1 広島大学 大学院先端物質科学研究科
- (72)発明者 重田 征子
広島県東広島市鏡山 1 - 3 - 1 広島大学 大学院先端物質科学研究科
- (72)発明者 秋 庸裕
広島県東広島市鏡山 1 - 3 - 1 広島大学 大学院先端物質科学研究科
- (72)発明者 河本 正次
広島県東広島市鏡山 1 - 3 - 1 広島大学 大学院先端物質科学研究科
- (72)発明者 島田 弥生
広島県東広島市鏡山 3 - 1 0 - 2 3 独立行政法人科学技術振興機構 研究成果活用プラザ広島
- (72)発明者 力丸 智史
広島県広島市西区三篠町 2 丁目 2 番 8 号 西川ゴム工業株式会社内
- (72)発明者 大西 伸和
広島県広島市西区三篠町 2 丁目 2 番 8 号 西川ゴム工業株式会社内
- (72)発明者 大磯 勲
広島県広島市西区三篠町 2 丁目 2 番 8 号 西川ゴム工業株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA47 CA04 CA05 CA06 DA02 EA02 FA02
FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA14
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA13
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA13 MA01 NA14
ZB132
4C085 AA13 AA14 BB04 CC32 DD88 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA30 DA76 DA86 EA20 EA22 EA50
FA10 FA72 FA74 GA10 GA15 GA22 GA23 GA26 HA06 HA13
HA14

专利名称(译)	来自雪松花粉的新过敏原		
公开(公告)号	JP2007014311A	公开(公告)日	2007-01-25
申请号	JP2005201947	申请日	2005-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 西川橡胶工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 国立大学法人広島大学 西川ゴム工業株式会社		
[标]发明人	小埜和久 重田征子 秋庸裕 河本正次 島田弥生 力丸智史 大西伸和 大磯勲		
发明人	小埜 和久 重田 征子 秋 庸裕 河本 正次 島田 弥生 力丸 智史 大西 伸和 大磯 勲		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/36 A61K39/395 A61P37/08 C07K14/415 C07K16/16 G01N33/53 A61K38/00 C12P21/08		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/36 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/08 C07K14/415 C07K16/16 G01N33/53.Q A61K37/02 C12P21/08 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00. AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA47 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024 /DA02 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4C084 /AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA13 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB132 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB04 4C085/CC32 4C085 /DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA72 4H045 /FA74 4H045/GA10 4H045/GA15 4H045/GA22 4H045/GA23 4H045/GA26 4H045/HA06 4H045/HA13 4H045/HA14		
其他公开文献	JP4732040B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与雪松花粉症有关的新过敏原，与过敏原Cry j 1和Cry j 2不同，提供过敏的诊断剂，通过使用它来提供预防，治疗等，对于过敏。ZOLUTION：发现雪松花粉中含有的这种雪松花粉过敏原，命名为CPA 63，其中当用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测量时，过敏原的分子量为50,000-60,000Da，等电点为约3.5至5.0，用等电电泳测定。此外，通过质谱法澄清过敏原的部分氨基酸序列，并且澄清编码CPA 63的cDNA序列和CPA 63的总氨基酸序列。通过展示天然型CPA 63和重组CPA 63的反应频率，

CPA 63是一种新的过敏原，其免疫学特征不同于已知过敏原Cry j 1和Cry j 2的过敏原。雪松花粉症患者的血清。 Z

特開2007-

(P2007-1)

(43) 公開日 平成19年1月25日 (2007.

(5) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/36 (2006.01)	A 6 1 K 39/36	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 24 頁) 最終頁	

(21) 出願番号	特願2005-201947 (P2005-201947)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22) 出願日	平成17年7月11日 (2005. 7. 11)	(71) 出願人	504136568 国立大学法人広島大学 広島県広島市鏡山1丁目3番2号
		(71) 出願人	000196107 西川ゴム工業株式会社 広島県広島市西区三篠町2丁目2番8
		(74) 代理人	100105647 弁理士 小栗 昌平
		(74) 代理人	100105474 弁理士 本多 弘徳
		(74) 代理人	100108589