

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/445		C 0 7 K 14/445	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/015		A 6 1 K 39/015	4 C 0 8 4
48/00		48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 33/06		A 6 1 P 33/06	4 H 0 4 5
C 0 7 K 17/00		C 0 7 K 17/00	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 16数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 176044(P2001 - 176044)	(71)出願人	000004097 日本原子力研究所 東京都千代田区内幸町2丁目2番2号
(22)出願日	平成13年6月11日(2001.6.11)	(72)発明者	吉田 勝 群馬県高崎市綿貫町1233番地 日本原子力 研究所高崎研究所内
		(72)発明者	奥 浩之 群馬県桐生市天神町3 - 9 - 31 - 305
		(72)発明者	片貝 良一 群馬県桐生市菱町2407
		(74)代理人	100089705 弁理士 社本 一夫 (外 5 名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 マラリア感染診断材及びマラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原

(57)【要約】 (修正有)

【課題】ヒトおよび他の動物との免疫反応を利用したマラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発できるペプチドまたはその類似体を提供する。

【解決手段】 本発明のペプチド化合物は、ヒトエノラーゼアミノ酸配列とは相違を有する部分に由来する、マラリア原虫の解糖系酵素エノラーゼの部分アミノ酸配列を有する。生合成または化学合成された本発明のペプチド化合物は、患者血清と反応させることで熱帯熱マラリア感染の診断材に、また熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑えるかまたはマラリア原虫の融解を引き起こす抗体を産生する免疫用抗原として用いることができる。本発明のペプチド化合物はさらに、熱帯熱マラリア感染患者に能動免疫を生じさせる症状改善薬として、非感染者には防御免疫を用いたワクチンとして作用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 SEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 2との構造的相違部位を含み、熱帯熱マラリア原虫に対する細胞性または体液性の免疫学的応答を誘発しうる、ペプチドまたはその類似体。

【請求項2】 請求項1に記載の化合物、および医薬的に許容可能な担体を含む、マラリア原虫感染症の予防または治療のための医薬組成物。

【請求項3】 請求項1または2に記載の化合物をフィルム、ラテックス粒子、ビーズ、プラスチックプレートなどの固相表面に結合させることよりなる物質。

【請求項4】 請求項1または2に記載の化合物を有効成分として含有し、マラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原。

【請求項5】 請求項1または2に記載のペプチド配列をコードするDNA。

【請求項6】 請求項5に記載のDNA配列を含有し、マラリア原虫の増殖を抑える免疫用DNAワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒトおよび他の動物との免疫反応を利用した、マラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発することができるペプチドまたはその類似体に関する。本発明はまた、マラリア感染への免疫状態の診断材料、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の増殖を抑える免疫用抗原若しくは免疫用DNAワクチンに関する。

【0002】

【従来技術とその問題点】マラリアは、熱帯地域全体に広く蔓延している最も深刻な原虫感染症である。日本に於いても、仕事・観光などによるマラリア患者の移入（輸入マラリア）が次第に増加してきている。これまでにマラリア制圧のため、多数のマラリア抗原や遺伝子の解析結果を基礎に、ワクチンの開発が進められてきた（狩野繁之ら、臨床と微生物 (1997) vol. 24, pp.178-182、特表2000-504223、特表平11-508130、特開2001-002699、特表平08-502402、特表平08-500979、特表平09-503742）。これら従来の開発・研究は実験室で得られた知見をもとにしている。ところが実際のマラリア原虫 (*Plasmodium*) は複雑な免疫回避システムを持っており、実験室レベルでの研究のみでは単純に対処できないことがわかってきた。

【0003】従来ワクチンの開発はマラリア原虫の遺伝子工学の応用研究として先進各国において活発に推進されてきた。現在コロンビアのPatarroyoらによって作られたワクチンがタンザニアで試用され、効果の有無について議論を呼んでいる (Amador et al., Journal of Clinical Immunology (1996) vol. 16, pp. 183-189, Herrera et al., American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (1992) vol. 47, pp. 682-690)。

【0004】マラリアのワクチン開発・研究に於いては、研究室内の実験だけで得られた成果をもとに進められる趨勢があった。従ってPatarroyoの合成マラリアワクチンがコロンビアおよびタンザニアで野外試験で試されたとき、いかなる免疫状態にある流行地集団に対してこのワクチンを利用すべきかが十分に検討されなかった。そのため、ワクチン接種により、どの程度の効果をみたかについての評価判定が説得力に欠ける結果に終わったことは否定できない。

【0005】マラリアに対するヒトの免疫力は流行地の集団もしくは個人によって大きく異なっている (Norazmi et al. Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene (1996) vol.24, pp.237-239, Kano et al. Southeast Asian J Trop Med Public Health (1998) vol. 29, pp.341-343)。例えば熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) に感染し急性期にある日本人の輸入マラリア患者や流行地で発症している児童の血清は、流行地で絶えずマラリア感染にさらされ感染しても症状のあらわれないかほとんどない住民の血清と比較して、原虫由来の抗原分子への抗体価が大きく異なることが知られている。この事実は、マラリアワクチンはそれぞれの流行地・非流行地での集団若しくは個人の免疫学的特性を考慮して開発されなくては十分な効果をあげることができないことを示している。

【0006】以上の理由で、流行地・非流行地または集団・個人の免疫力を診断し、その上でマラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原を開発することが求められている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ヒトおよび他の動物との免疫反応を利用した、マラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発することができるペプチドまたはその類似体を提供することを課題とする。本発明は特に、マラリア感染への免疫状態の診断材料、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の増殖を抑える免疫用抗原若しくは免疫用DNAワクチンを提供することも課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】マラリアワクチンの開発に於いてはマラリア原虫の実験室レベルでの解析に加えて流行地での病態疫学研究が必要である。流行地でのマラリアに対するヒトの免疫力は流行地の集団若しくは個人によって大きく異なる。熱帯熱マラリアに感染し、急性期にある日本人の輸入マラリア患者や流行地で発症している児童の血清を使いウエスタンブロットを行った結果、これらの患者の抗体が47 kDマラリア抗原に特異的に結合する事実を見いだした (Norazmi et al. Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene (1996) vol.24, pp.237-239, Kano et al. Southeast Asian J Trop Med Public Health (1998) vol.29, pp.341-34

3)。

【0009】タイ国マヒドン大学熱帯医学病院を訪れる熱帯熱マラリア患者をその症状により重症、中程度、軽症の3グループに分け、47 kD抗原への反応性を調べたところ、重症>中程度>軽症の順に陽性率が高いことがわかった。更に47 kD分子のアミノ酸配列を調べたところ分子量48.7 kDの解糖系酵素、エノラーゼであった。つまり、解糖系酵素、エノラーゼは患者の病気、病態に応じた抗原性を表す分子であり、抗エノラーゼ抗体は熱帯熱マラリアへの防御免疫分子として働いていることがわかった。本発明の発明者らは、この結果に基づいて鋭意研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

【0010】したがって本発明は、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) のエノラーゼのアミノ酸配列で抗原となりうる部分配列を利用し、マラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発することができるペプチドまたはその類似体、ペプチド化合物によるマラリア感染に対する免疫状態の診断材料 (免疫検査)、マラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原若しくは当該抗原を発現可能な免疫用DNAワクチンを提供する。マラリア原虫には、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の他に、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*) の3種が含まれるが、これら3種のマラリア原虫ではエノラーゼ遺伝子が単離されておらず、病原性の発生にエノラーゼが関与していないと考えられている。

【0011】より具体的には、本発明は、ヒトエノラーゼタンパク質のアミノ酸配列と熱帯熱マラリア原虫エノラーゼタンパク質のアミノ酸配列との間の構造的相違部位を含むペプチドであってマラリア原虫に対する免疫学的応答を誘発しうるペプチドまたはその類似体を提供する。本発明の以下において、このペプチドまたはその類似体を合わせて、本発明のペプチド化合物という。本発明においてはさらに、上述した本発明のペプチド化合物を固相表面に結合させることからなる熱帯熱マラリア感染の免疫診断材、当該本発明のペプチド化合物を有効成分として含有する熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑制する免疫用抗原を提供する。本発明は、このペプチドをコードするDNA若しくはそのDNAにハイブリダイズするDNA、当該DNAを含有する熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑制する免疫用DNAワクチンもまた提供する。

【0012】エノラーゼ (ホスホピルビン酸ヒドラターゼあるいは2-ホスホグリセリン酸デヒドラターゼとも呼ぶ) は、以下の式

【化1】2-ホスホグリセリン酸 → 2-ホスホエノールピルビン酸 + H₂O

の反応を触媒する解糖系酵素として知られている。ヒト由来エノラーゼは分子量約44~47 kDの3種類のサブユニットα、β、γよりなる二量体で、現在5種類のアイソ

ザイム (αα、αβ、ββ、αγ、γγ) の存在が明らかになっている。これに対して、ヒトには存在せず熱帯熱マラリア原虫にのみ特有なアミノ酸配列を有するペプチドはヒトにとって異物であり、抗原部位 (エピトープ) になりうる。これを特定するためにアミノ酸配列の比較を行った。表1に示したのは熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼタンパク質 (SEQ ID NO: 2) とヒトエノラーゼα型サブユニットタンパク質 (Human alpha enolase, SEQ ID NO: 3) との配列比較の例である。βやγ型サブユニットと熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼの配列で比較をおこなってもよい。なお、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はともに、M. Readら (Read, M. et al., European Journal of Biochemistry, vol.220, pp. 513-520 (1994). GenBank登録番号U00152、登録日1994年6月6日) およびKawazu, S.ら (GenBank登録番号 AB026051、登録日1999年4月16日) により発表されている。

【0013】その中からアミノ酸残基の構造的相違部位を含むペプチドをすべて抽出した。本発明において“構造的相違部位”とは、対応するアミノ酸残基が異なる (置換) 部位、対応するアミノ酸残基が欠失、または挿入した部位を含む。本発明における具体的な一態様において、選択されたアミノ酸配列を含む、10~30残基のアミノ酸配列を選択した。表1で示す4種の部分配列ペプチド、

GG14 : Gly Ser Lys Asn Glu Trp Gly Trp Ser Lys Ser Lys Leu Gly (SEQ ID NO: 4) ;

AA13 : Ala Ala Pro Asn Lys Val Ser Leu Tyr Lys Tyr Leu Ala (SEQ ID NO: 5) ;

GL16 : Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Asn Ala Asn Glu Ala Leu Asp Leu Leu (SEQ ID NO: 6) ; および

AD22 : Ala Ser Glu Phe Tyr Asn Ser Glu Asn Lys Thr Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Thr Pro Asn Asn Asp (SEQ ID NO: 7) ;

は選択できるアミノ酸配列の一部の例であるが、本発明においてはこれらのペプチドには限定されない。

【0014】本発明のペプチドの類似体とは、ペプチドを構成するアミノ酸が置換、欠失および/または挿入することにより生成されるペプチドであって、免疫学的応答に関して本発明のペプチドと同等の活性を有するペプチドのことをいう。

【0015】本発明において“免疫学的応答”とは、細胞性免疫学的応答と体液性免疫学的応答の両方を含む概念である。このうち、細胞性免疫学的応答とは、例えばマクロファージ、ナチュラルキラー細胞 (NK細胞)、好酸球、T細胞などにより引き起こされる免疫のことをいい、熱帯熱マラリア原虫に対する細胞性免疫学的応答としては、キラーT細胞が関与するものが知られている。また、体液性免疫学的応答とは、抗原の認識と排除に対して、抗体が関与する免疫のことをいい、熱帯熱マラリ

ア原虫に対する体液性免疫学的応答としては、熱帯熱マラリア原虫由来のタンパク質、糖鎖などに対して特異的に結合することができる宿主由来の抗体により引き起こされるものが知られている。本発明においては、マラリア原虫のタンパク質に対して体液性免疫学的応答として抗体を誘導することが好ましい。

【0016】上述したような免疫学的応答を引き起こしやすくするため、本発明のペプチド化合物は、マラリア原虫由来エノラーゼのエピトープの高次構造を含みうるアミノ酸配列を有することが好ましい。このような構造部分10は、エノラーゼタンパク質の高次構造において分子の外側に露出している部分に相当し、マクロファージやNK細胞、T細胞などの免疫系細胞、あるいは抗体により認識されやすい部分である。

【0017】本発明のペプチド化合物は、有機化学的方法、生化学的方法などいずれの合成方法によっても調製することができる。有機化学的方法により本発明のペプチド抗原を調製する方法としては、例えば、(1)本発明のペプチド抗原をいくつかの部分に分けて別個に合成し、それらを結合させることにより本発明のペプチド抗20原を得る方法；(2)固相担体上にアミノ酸を順次結合して最後に切り出すことで本発明のペプチド抗原を得る方法；を使用することができ、これらについては本明細書の実施例中にて説明する。しかし、これらの方法に限定される訳ではなく、本発明の実施例で開示した方法以外の合成手順を用いて合成しても良い。例えば、ペプチド自動合成装置により本発明のペプチド化合物の合成など当業者が使用可能なペプチド合成法の何れを使用してもよい。

【0018】本発明のペプチド化合物は生化学的方法30（すなわち組換えDNA技術）によっても得ることができる。例えば大腸菌発現ベクターのプロモータ下流に熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼ遺伝子の全配列（SEQ ID NO: 1）または部分配列をコードするDNAを挿入してなるエノラーゼタンパク質発現ベクターを用いて、大腸菌発現系を使用してエノラーゼタンパク質を発現させることによって達成される。この発現ベクターは、公知の方法（例えば、Sambrook and Russell, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd edition (2001)）にしたがって構築することができる。このベクターを用いて公40知の方法に基づき大腸菌を形質転換させ、タンパク質を産生、回収、精製することにより、エノラーゼの部分配列をもつペプチド化合物を得ることができる。

【0019】熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼのアミノ酸配列のうちヒト由来エノラーゼのアミノ酸配列との構造的相違部位に基づく、上述したように製造した本発明のペプチド化合物は、宿主生体に投与することにより、宿主体内で熱帯熱マラリア原虫に対する免疫学的応答を引き起こすことができる。

【0020】より具体的には、本発明のペプチド化合物50

は、宿主生体に投与することにより、血清中に熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑える中和抗体を誘導することができる。このことから、本発明のペプチド化合物は、マラリア原虫の増殖を抑えることができるか、あるいはマラリア原虫の融解を引き起こすことができる免疫用抗原として使用できることがわかった。

【0021】本発明においては、上述した本発明のペプチド化合物を含む、マラリア原虫感染の予防用または治療用医薬組成物を提供することもできる。このような医薬組成物には、医薬的に許容可能な賦形剤、希釈剤またはキャリアーを含んでいてもよい。また、そのような賦形剤には、宿主の免疫活性を高めるためのアジュバントが含まれていてもよい。

【0022】本発明の一態様において、複数の本発明のペプチド化合物をスペーサー物質により連結することにより、1分子中に複数個の本発明のペプチド化合物を含む物質を作成することができる。このスペーサー物質は、直線状にペプチド化合物を並べて高分子量化するために利用される。上記複数のペプチド化合物は、1種類の本発明のペプチド化合物を複数連結してもよく、あるいは複数種類の本発明のペプチド化合物を連結してもよい。

【0023】ここで使用することができるスペーサー物質には、ペプチド、ジカルボン酸化合物、ジアミン化合物、などがあるが、これらのものには限定されない。本発明においては、ペプチドを使用することが好ましい。

【0024】例えばスペーサー物質がペプチドである場合には、複数の本発明のペプチド化合物は、組換えDNA技術にしたがって作成することができる。より具体的には、本発明のペプチド化合物とスペーサーであるペプチドが連結したものをコードする核酸分子を作製し、その核酸分子を周知の発現系（例えば、Sambrook and Russell, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd edition (2001)）に従って発現させることにより、複数の本発明のペプチドがスペーサーペプチドにより連結した、目的とするペプチド化合物を作成することができる。

【0025】本発明のペプチド化合物は、投与される宿主生体において抗原と免疫系細胞との結合（conjugate）を亢進し、より高い免疫活性を付与するため、高分子量化して免疫原性を向上させてから投与することもできる。本発明による結合（conjugate）の実現に使用し得るキャリアー分子もしくは高分子担体の一例として、破傷風トキソイド、オボアルブミン、血清アルブミン、ヘモシアニン等のような天然タンパク質が挙げられる。キャリアーがヘモシアニンである場合は、例えばBoquetらの方法（P. Boquet et al, Molecular Immunology (1988) vol. 19, pp. 1441-1549）によって、ペプチドおよびキャリアーそれぞれのアミノ基同士をグルタルアルデヒドで結合させることもできる。例えばMAPまたは

リシンデンドリマーと呼ばれる合成高分子キャリアーも使用可能である。

【0026】エピトープもしくは抗原決定基 (immunogenic determinant) を有する10~30個のアミノ酸残基を有するペプチド配列で、特に化学的に合成し易いものに関し、そのin vivoでの免疫原性を増大するには該ペプチド配列を生理学的に許容され得る無毒性のキャリアー分子と共有結合によって結合させ、分子量がおおよそ10kDa以上になるように高分子量化することが必要である。通常分子量が10 kDaを上回る分子量を有する他の種類の 10 使用可能な高分子キャリアーもまた、公知である。

【0027】MAPまたはリシンデンドリマーと呼ばれる合成高分子キャリアーを用いた多量体ペプチドの合成は、例えばTamの方法が挙げられる (James P. Tam., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1988) vol. 85, 5409-5413)。公知の合成法により、βアラニン-システイン (S-アセトアミドメチル) のジペプチドを固定した樹脂にリシンをステップワイズに反応結合させることにより目的とする架橋体を調製することができる。すなわち、ジペプチドにリシンひとつの結合体は2量体の分岐ペ 20 プチドとして、さらにリシンを反応させて得られるリジン3個結合体は4量体の分岐ペプチドとして、さらにリシンを反応させて得られるリジン7個の結合体は8量体の架橋体として使用することができる。また8量体はシステイン残基のアセトアミドメチル基をヨウ素で酸化的に脱保護し、ジスルフィド結合を形成させることでも得ることができる。これら架橋体に目的とするペプチドの構成アミノ酸を通常の方法により順次反応結合させることにより多量体ペプチドを合成することができる。n量体のnは 30 2以上の整数を意味し、特に制限されないが、実用性の点からnは2~8が好ましい。

【0028】前述したように、47 kD抗原タンパク質、すなわち分子量48.7 kDの解糖系酵素、エノラーゼへの免疫学的反応性を調べたところ、重症>中程度>軽症の順に陽性率が高いことがわかった。そして、エノラーゼ部分アミノ酸配列を利用した本発明のペプチド化合物は、人工抗原として熱帯熱マラリア患者の血清中にある抗エノラーゼ抗体とよく免疫的に反応する。したがって、本発明においてはこの事実に基づいて、本発明のペ 40 プチド化合物またはスパーサー物質で連結した複数の本発明のペプチド化合物を使用して末梢血中の抗47 kD抗原タンパク質抗体、すなわち抗エノラーゼ抗体を検出することにより、マラリア感染の重症度を推測することができる。

【0029】抗エノラーゼ抗体と結合した本発明のペプチド化合物またはスパーサー物質で連結した複数の本発明のペプチド化合物を、当該技術分野において既知の検出系、例えば蛍光ELISA法など、を用いて検出できる。このことから、本発明のペプチド化合物は熱帯熱マラリア感染の免疫診断材料に利用することができる新規化 50

合物として使用できることがわかった。したがって、本発明のペプチド配列は、マラリア感染を診断するための診断材、特に、マラリア患者の血清抗体と、非常に反応しやすい人工抗原として有用である。

【0030】本発明のペプチド化合物またはスパーサー物質で連結した複数の本発明のペプチド化合物は、固相表面に結合させ、固定化し、若しくは吸着させることにより、マラリア診断材として提供することができる。ここで固相表面としては、例えばフィルム、ラテックス粒子、プラスチックプレートまたはマイクロビーズなどの固相表面が挙げられるが、これらには限定されない。例えば、フィルム状にした本発明のペプチド化合物は、スピンキャスト法で調製することができ、このフィルム上に試験試料をプロットすることにより試験試料中の抗体の存在を検出することができる。ラテックス粒子に結合した本発明の化合物は、乳化重合法、懸濁重合法に従って調製することができ、凝集反応に使用することができる。プラスチックプレート上またはマイクロビーズ上への固定化は、50 mg/0.1 mLの本発明の化合物をプラスチックプレートのウェル中に適量を滴下することにより、または200 mg/0.1 mLの本発明の溶液中にマイクロビーズを浸すことにより行うことができる。

【0031】実際の使用にあたっては、本発明のペプチド化合物またはスパーサー物質で連結した複数の本発明のペプチド化合物を、単独または上述した形態で、提供することができるほか、これらを含むキットの形態でも提供することができる。例えば、本発明のペプチド化合物を使用した診断方法の具体例としては、上記抗原の1種以上を所定量だけ滴定マイクロプレートのカップ内 1 に入れること、前記ウェル内へ、診断されるべき生物学的液体、例えば血清を希釈したもの、を希釈度を上げながら導入すること、マイクロプレートをインキュベートすること、マイクロプレートを適当な緩衝液で注意深く洗浄すること、特異的に標識した、血液免疫グロブリンに対する抗体をカップ内に添加すること、及び、生物学的流体中にエノラーゼ抗体が存在することを指示する形成された抗原抗体複合体を検出することを含む。

【0032】抗免疫グロブリン抗体の標識は、基質を加水分解し得る諸酵素中から選択した酵素によって実施するのが好ましく、このような酵素としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (ALP) などが知られているが、これらのみには限定されない。前記基質はその放射線吸収に、少なくとも所定の波長帯内で変化をこうむる。基質を好ましくは対照との比較において検出することによって、感染や病状回復度が測定できる。

【0033】マラリアの重症度は、熱帯熱マラリア原虫の赤血球感染率により決定される。すなわち、末梢赤血球のうち5%以上が熱帯熱マラリア原虫の感染を受けている場合に重症マラリアと判断され、これを原虫数に換

算すると、末梢血1μl中に原虫が25万個以上存在することに相当する。それ以下の感染率である場合あるいは末梢血中原虫数である場合には軽症マラリアと判断される。末梢血中に存在するマラリア原虫数の測定は、顕微鏡下で赤血球中の原虫の数を数える方法などの方法で検出することにより行う。

【0034】このように好ましい方法は、特にELISA技術による酵素免疫測定法あるいは蛍光抗体法による検出である。滴定は、蛍光抗体法による測定か、あるいは直接的または間接的酵素免疫測定であってもよい。こうして、調査血清中の抗体を定量的に滴定し得る。例えばG. H. Campbell et al., American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (1987) vol.37, pp.17-21に述べられている。

【0035】本発明のペプチド化合物を含むワクチン組成物または症状改善薬組成物は、水溶液の状態、または乾燥状態のいずれで提供しても良い。これらのペプチド組成物は、免疫原性を高めるためにアジュバント (adjuvant)、安定剤、溶解助剤、増量剤、等張剤等の慣用の添加剤を含んでもよい。本発明の化合物を含むペプチド組成物をヒトまたは動物に投与する場合には、水溶液の状態ではそのままの濃度でまたは生理食塩水または適当なバッファーなどで希釈して用いることができる。乾燥状態で保存されている場合には、生理食塩水または適当なバッファーで適当に希釈して用いることができる。投与は皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などの方法により行うことができる。一回当たりの投与量は、皮下投与の場合には1~500 mg、より好ましくは10~50 mgの量で、筋肉内投与の場合には0.01~200 mg、より好ましくは0.1~50 mgの量で投与することができる。ワクチン投与は、1回で全量を投与しても、2回またはそれ以上の回数に分けて全量を投与してもよい。2回またはそれ以上の回数に分けて投与する場合には、2週間~3週間程度の間隔をあけて行うのが好ましい。

【0036】本発明のペプチド化合物を含むワクチン組成物または症状改善薬組成物は、徐放性固形物などの形で提供することもできる。本発明の場合、マラリア原虫の増殖を抑制することができる徐放性固形物は、ポリマー形成剤に本発明のペプチド化合物等を溶解し、それを固形化することにより作製することができる。本発明において使用することができるポリマー形成剤には、アクリロイル-L-プロリンメチルエステル (acryloyl-L-Proline methyl ester)、アクリロイル-L-アラニンメチルエステル (acryloyl-L-Alanine methyl ester)、メタクリロイル-L-アラニンメチルエステル (methacryloyl-L-Alanine methyl ester) などが含まれるが、これらには限定されない。

【0037】たとえばアクリロイル-L-プロリンメチルエステルにより徐放性固形物を作製する場合、本発明の

化合物をアクリロイル-L-プロリンメチルエステル水溶液に溶かした後、ガラスアンプルに充填し、 ^{60}Co 線源からのγ線照射をすることによりポリマーに転換することにより作成することができる。このような徐放性ワクチン組成物は、1~10週間継続的に本発明のペプチド化合物を放出することができる。当業者であれば、所望の速度で本発明の化合物を放出するように、徐放性固形物中に含まれる本発明の化合物量を容易に決定することができる。

【0038】ワクチンや症状改善薬としての効果の判定は、TragerとJensenの培養法の変法に従い、培養上清中に一定量の抗体を添加して、マラリア原虫の増殖の阻害を形態的に観察することにより行うことができる (W. Trager and J. B. Jensen (1976) Science, 193, 673-675)。本発明のワクチン組成物または症状改善薬組成物をヒトまたは動物に投与し、所定時間後に採取したヒトまたは動物の血清抗体を用いて、赤血球に寄生した熱帯熱マラリア原虫のin vitro培養系での増殖を抑制できるかどうかを調べる。

【0039】本発明の一態様においては、上述したような本発明のペプチド化合物またはスパーサーペプチドにより連結された複数の本発明のペプチド化合物をコードするDNAも提供する。このようなDNA分子は、本発明のペプチド化合物をコードする天然のDNA配列からなっているものであっても、あるいはこのようなペプチド化合物をコードすることができる縮重配列からなるDNA分子であってもよい。このようなDNA分子は、目的とする本発明のペプチド化合物を発現するための使用することができる。具体的には、上述したDNA分子を当該技術分野において周知の発現ベクターに連結し、当該発現ベクターをその発現ベクターの発現に適した宿主中に導入して発現させることにより、本発明のペプチド化合物を発現することができる。

【0040】本発明の別の一態様においては、上述した本発明のペプチド化合物をコードするDNA分子またはそれにハイブリダイズするDNA分子を含有し、マラリア原虫の増殖を抑制する免疫用DNAワクチンもまた提供する。本発明のペプチド化合物をコードするDNA分子は、前述したように当該技術分野において既知のin vivo発現系を用いて生体内で本発明のペプチド化合物を発現させ、体内で免疫反応を引き起こすために使用することができる。本発明のペプチド化合物をコードするDNA分子にハイブリダイズするDNA分子は、生体内でmRNAへの転写を行うことにより、アンチセンス化合物を合成することができる。これにより、マラリア原虫はエノラーゼタンパク質を合成することができなくなり、増殖を抑制されることになる。

【0041】

【発明の効果】本発明のアミノ酸配列に従って合成した本発明のペプチド化合物は、マラリア原虫に対する免疫

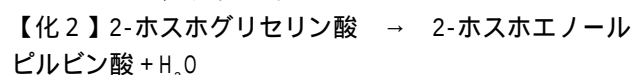
学的応答を誘発することができる。本発明のペプチド化合物はまた、人工抗原として熱帯熱マラリア患者の血清中にある抗エノラーゼ抗体とよく反応し、抗エノラーゼ抗体を検出できる。さらに、本発明のペプチド化合物を免疫感作させたウサギ血清は完全に赤血球に寄生した熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の *in vitro* 培養系での増殖を著しく抑制したことから、本発明のアミノ酸配列は熱帯熱マラリアの診断材料として使用することができる。さらに症状改善薬やワクチンとしての効果があることがわかった。従って、本発明のペプチド化合物は熱帯熱マラリア感染の免疫診断材料として、さらに症状改善薬やワクチンとして使用することができる。

【0042】

【実施例】以下、本発明の化合物を実施例にて説明する。実施例で用いた熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼ部分配列の選択方法の一例を表1に示す (GG14、AA13、GL16、AD22)。次いで、これらの部分配列ペプチドを利用した免疫診断材料の応用および効果を実施例によって具体的に記述する。しかしながら、これらの実施例は本発明を具体的に説明するだけのものであり、本発明の範囲を限定することを意図しているものではない。

【0043】実施例1：熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼ部分配列の選択

エノラーゼは、以下の式



の反応を触媒する解糖系酵素として知られている。ヒト由来エノラーゼは分子量約44~47 kDの3種類のサブユニット α 、 β 、 γ よりなる二量体で、現在5種類のアイソ

ザイム ($\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$) の存在が明らかになっている。これに対して、ヒトには存在せず熱帯熱マラリア原虫にのみ特有なアミノ酸配列を有するペプチドはヒトにとって異物であり、抗原部位 (エピトープ) になりうる。これを特定するためにアミノ酸配列の比較を行った。表1に示したのはヒトエノラーゼ α 型サブユニットタンパク質 (Human alpha enolase、SEQ ID NO: 1) と熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼタンパク質 (SEQ ID NO: 2) の配列比較の例である。 β や γ 型サブユニットと熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼの配列で比較をおこなってもよい。

【0044】その中からアミノ酸残基の構造的相違部位、すなわち置換、欠失、または挿入、を含むペプチドをすべて抽出した。このようなペプチドの中から、選択されたアミノ酸配列を含む、10~30残基のアミノ酸配列を選択した。以下の実施例で示す部分配列ペプチド4種 (GG14、AA13、GL16、AD22) は下記の表1に下線で示し、これらのペプチドは以下の配列：

GG14 : Gly Ser Lys Asn Glu Trp Gly Trp Ser Lys Ser Lys Leu Gly (SEQ ID NO: 3) ;

AA13 : Ala Ala Pro Asn Lys Val Ser Leu Tyr Lys Tyr Leu Ala (SEQ ID NO: 4) ;

GL16 : Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Asn Ala Asn Glu Ala Leu Asp Leu Leu (SEQ ID NO: 5) ; および

AD22 : Ala Ser Glu Phe Tyr Asn Ser Glu Asn Lys Thr Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Thr Pro Asn Asn Asp (SEQ ID NO: 6) ;

を有する。これらのペプチドは、選択できるアミノ酸配列の一部の例である。

【表1】

【表1】熱帯熱マラリア原虫由来エノラーゼ（f）（GenBank登録番号 AB026051）とヒト由来αエノラーゼ（h）（GenBank登録番号 M14328）のアミノ酸配列の比較。（実施例で示したエノラーゼ部分配列、GG14、AA13、GL16、AD22、は下線で標記。）

h	1	MSILKIH--AREIFDSRGNPTVEVDLETSKGLFRAAVPSGASTGIYEALRLDNDKTRYMGKQVSKAYEHINKTIAPALV	78
f	1	MAHYITRINAREILDNRGNPTVEVDLETNLGLFRAAVPSGASTGIYEALRLDNDKSHYLGKGVQKAIKNINEIAPKLI	80
h	79	SKKLVNTEQEKIDKLMIE-MDGTEN-----K-KFCANAILGVSLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGN-SE-VILPVPAP	150
f	81	--GMNCTEQKKIDNLMVEELDGSKNEWGWSKSLGANAIIAISMAVCRAGAAANKVSLYKYLAQLAGKKSDQMVLVPVCL	158
		GG14 AA13	
h	151	NYINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFREANRIGAEVYHNLKNVIXEKYKQDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTA	230
f	159	NVINGGSHAGNKLSEFQEFMIVPVGAPSFKEALRYGAEVTHTLKSEIKKKYCIDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTA	238
		GL16	
h	231	IGKAGYTDKVVIGNDVAASEFFRSQ-K-YDLOFKSPD-DPSRYISPOQLADLYKSFIDYPPVVSIEDPFDQDDNGAWQKF	317
f	239	IKSAGYEGKYKIAMDVAASEFYNSENKTYDLOFKTPNDKSLYKTGAQLVDIYIDLYKKYPVVSIEDPFDQDDWENYAKL	318
		AD22	
h	310	TASAGI--QVVGDDLTVTNPKRIKAVNHEKSCNCLLKVNQIGSVTESLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLV	387
f	319	TAAIGKQVQIVGDDLLVTNPTRIKALEKNACNALPLKVNQIGSITEATEACLLSQKNNWGMVSHRSGETEDVFIADLV	398
h	388	VGLQTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGSKAKFAGRNFRNPLAK	436
f	399	VALRTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLLRIEESLGNNAYFAGEXFALQIN	446

【0045】実施例2：エノラーゼの部分配列を含む抗原ペプチド化合物の合成

以下の実施例で用いた部分配列を含むペプチド化合物には、直線状の検査用抗原ペプチド、および分岐型の検査用・抗体産生用抗原ペプチドを用いた。AD22（SEQ ID N 0：6）を一例として、直線状抗原ペプチドを図1に、分岐型抗原ペプチドを図2に示した。これらの合成法は公知の方法、すなわち、2種類の有機化学的方法により合成した。一つは本発明のペプチド抗原をいくつかの部分に分けて別個に合成し、それらを結合させることにより10 目的とするペプチド抗原を得る方法である。他の方法は固相担体上にアミノ酸を順次結合して最後に切り出すことで本発明のペプチド抗原を得る方法である。

【0046】実施例3：エノラーゼ部分配列による熱帯熱マラリア感染者の検出

実施例2で合成したマラリア原虫由来エノラーゼの部分配列ペプチド（GG14、AA13、GL16、AD22；各100 mg）と卵アルブミン（100 mg）を緩衝液（1 ml、pH 9.6、0.1 M炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム混合水溶液）に溶かした。その後、以前に記載された方法に従い、この20 溶液を、暗室にて、0、24時間にわたって攪拌を行い、アルブミンに合成抗原を結合（conjugate）させた（幅誠二、浜岡利之、“免疫実験操作法”、抗原VII-5、p1129、日本免疫学会編（1974））。

【0047】次いで、合成抗原にリンクしたタンパク質を、96ウェル抗原吸着用プレート（Microfluor B "U" Bottom Plate [B-Plate], Dynex Technologies, Inc.,

USA）に吸着させるため、合成抗原にリンクしたタンパク質溶液をウェルに滴下した後、37 で3時間処理した。一つのウェル当たりの合成抗原濃度は、0.5 mgである。

【0048】患者血清としてはブラジルのマラリア患者の血清を、対照血清としては非感染者（日本人）の血清を、それぞれ用いた。マラリア患者の血清および対照血清は、2%NGS-PBS緩衝液、pH 7.2（0.15 Mリン酸緩衝液を1容に対し、0.85%生理的食塩水を3容の割合で加え、さらに正常ヤギ血清を2%加えた）を用いて、1/800倍希釈した。この希釈血清（0.5 mg/ウェル）を合成抗原にリンクしたタンパク質が吸着しているウェルに滴下した。インキュベーションは、37、60分行った。インキュベーション後、Buffer I（0.15 Mリン酸緩衝液、pH 7.2、を1容に対し、0.85%生理的食塩水を3容の割合で加え、さらにTween 20を全量の0.1%加えた）にて5分おきに3回洗浄した。

【0049】次いで、2%NGS-PBS緩衝液にて、1/5000倍希釈した酵素標識抗体（アルカリフォスタファゼ結合-抗ヒトIgGモノクローナル抗体）を50 μl/ウェル注入し、37、60分、インキュベーションした。反応終了後、Buffer Iにて5分おきに3回洗浄した。その後、0.1 M Tris-HCl緩衝液にて、200 μMに希釈した蛍光基質（4-メチルアンペリフェリル（umbelliferyl）-ホスフェート）を50 μl/ウェル分注し37、60分、インキュベーションした。測定は、Micro FLUOR Reader（DYNATEC LABORATORIES, INC.）で行った。抗体価の測定結果は、相

対蛍光単位 (Relative Fluorescence Units, RFU値) で表示した。

【0050】図3に示したように、実施例で合成した直線状の部分配列ペプチド、GG14、AD22、AA13、GL16を用いて熱帯熱マラリア患者血清(P)の抗体価を蛍光ELISA法で測定した。比較として非感染者血清(H)との抗体価を示す。何れの部分ペプチドでも患者の抗体価(RFU値)は非感染者より平均値では大きい。また、エノラーゼの全長配列を抗原として使用しても同様に患者の抗体価(RFU値)は非感染者より平均値では大きいことがわかった。すなわち実施例で用いたエノラーゼ部分配列は全長配列から特定され、免疫診断に用いることのできる抗原配列であるとわかる。すなわち免疫診断材料として有効である。

【0051】実施例4：エノラーゼ部分配列による熱帯熱マラリア感染者の病状検査

図4に示したように、マラリア原虫由来エノラーゼの部分配列ペプチド、AD22、AA13、GL16を用いて熱帯熱マラリア患者血清の抗体価(RFU値)を蛍光ELISA法で測定し、経日変化を追跡(days)した。何れの部分ペプチドでも患者が入院した日(0日目)から重症化が進むにつれて抗体価が増大し(0~10日目)、症状が改善してくるに従い急速に減少してくることがわかる(10日目以降)。これは抗エノラーゼ抗体が重症化と症状改善の指標になることを示している。比較例として症状が改善せず、悪化し、死亡した患者例では抗体価の減少が見られないことがわかった。

【0052】さらに、部分配列ペプチドと比較するため、熱帯熱マラリア原虫そのもの(破碎した原虫試料)との反応について検討し、その結果を図5に示す。この結果からも明白なように、破碎した原虫試料では症状の改善に伴う抗体価の減少が見られない。従って、症状改善の指標としては使えないことがわかった。一方、エノラーゼの全長配列を抗原として用いたときには患者の症状改善経過の追跡が可能である。すなわち実施例で選択されたエノラーゼ部分配列は全長配列から特定された症状の回復経過を見る免疫診断に用いることのできる抗原配列であるとわかる。すなわち部分配列ペプチド(AD22、SEQ ID NO: 6)は熱帯熱マラリア感染者の症状を追跡するための材料としても有効であることがわかる。

【0053】実施例5：エノラーゼ部分配列ペプチドによる抗部分ペプチド血清および抗部分ペプチド抗体の作成

初回免疫は図2に例示したような、分岐型エノラーゼ部分配列ペプチドをそれぞれ600 μ g、完全フロイントアジュバントと共にウサギ(日本白色種、メス、11週齢)背部皮下に投与した。追加免疫は初回免疫より2週間後、4週間後、6週間後にそれぞれ300 μ g、150 μ g、100 μ gを不完全フロイントアジュバントと共に初回同様に免疫した。最終免疫より1週間後、ウサギをペントバルビター

ルによる全身麻酔導入後、頸静脈より全採血を行った。採血後、血清を分離した。必要場合はIgGを抗体精製用カラム(ImmunoPure Protein A, Pierce社(米国))により分離精製して用いた。

【0054】得られた血清を使用して、組み換え型熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ(全長配列)をSDS-PAGE及びウェスタンブロットにより試験した。SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)はタンパク質試料を分子量によって分離し、タンパク質の分離、同定、純度検定、分子量決定を行う手段である。その結果抗ペプチド血清は組み換え型エノラーゼを認識することがわかった。すなわち実施例で選択されたエノラーゼ部分配列は全長配列から特定されたエノラーゼを認識できるエピトープ配列であることがわかった。

【0055】実施例6：徐放製剤化したエノラーゼ部分配列ペプチドによる抗部分ペプチド血清および抗部分ペプチド抗体の作成

図2に例示したような、分岐型エノラーゼ部分配列ペプチドを2 mgのエノラーゼ部分配列ペプチドを0.2 mlの70%アクリロイル-L-プロリンメチルエステル水溶液に溶かしたのち、0.5 cm内径のガラスアンプルに充填した。次いで、このアンプルを窒素雰囲気下、氷温で 60 Co線源からの γ 線を、10 kGy/hの線量率、2時間照射した。照射により、アクリロイル-L-プロリンメチルエステルは重合しポリマーになる。この放射線重合により、合成抗原を包括したロッド状の徐放性固形物を得た。

【0056】得られた徐放性固形物からの合成抗原の放出を、37 $^{\circ}$ Cの生理食塩水中で測定したところ、 $44 \pm 8 \mu$ g/日の速度で35日間にわたって徐々に放出することがわかった。この徐放性固形物に対するマラリアワクチンとしての効果を調べるため、ウサギ(日本白色種、メス、11週齢)背部皮下に埋め込んだ。徐放性固形物を埋め込んでから7週間後、ウサギをペントバルビタールによる全身麻酔導入後、頸静脈より全採血を行った。採血後、血清を分離した。必要場合はIgGを抗体精製用カラムクロマトグラフィー(ImmunoPure Protein A, Pierce社(米国))により分離精製して用いた。

【0057】実施例7：抗部分配列ペプチド血清による熱帯熱マラリア原虫の増殖抑制実験

増殖抑制実験はTragerとJensenの培養法の変法に従い(Trager & Jensen前述)、培養上清中に一定量の抗体を添加して、マラリア原虫の増殖阻害を観察することにより行った。

【0058】実施例5で得られた抗部分配列ペプチド血清を熱帯熱マラリア原虫の培養中に10倍、20倍、200倍希釈で添加した。その結果、血清の希釈率を上げることで増殖率が抑えられることがわかった。図6にAD22部分ペプチドで免疫したウサギ血清とコントロール(免疫前のウサギ血清)による熱帯熱マラリア原虫増殖阻害率の結果

を示す。この時の原虫の形態をギムザ染色で顕微鏡観察したところ、抗部分配列ペプチド血清を添加したものはシゾンに成熟できず、赤血球中で死んで行く様子が観察された。シゾンは分裂体と呼ばれ、血流中の増殖サイクルの1形態である。赤血球中のトロフォゾイト（栄養体、輪状体）がシゾン（分裂体）へ成熟し、患者の発熱と新たな赤血球への感染を引き起こすメロゾイトとなる。シゾンへの成熟を止めることにより、患者の発熱と重症化（新たな赤血球への感染）を直接抑えることができる。

【0059】図7には抗組み換えエノラーゼ抗体（抗エノラーゼIgG）とコントロール（標準ウサギIgG）による

<110> 日本原子力研究所（Japan Atomic Energy Research Institute）

<120> マラリア感染診断材及びマラリア原虫の増殖を抑える免疫用抗原（Material for diagnosing Malaria infection and immunogens for suppressing the growth of Plasmodium.）

<130> 010995

<160> 6

<200> 1

<211> 1341

<212> DNA

<213> Plasmodium falciparum

<220>

<223> Nucleotide sequence of Plasmodium falciparum enolase

<400> 1

```
atggctcatg taataactcg tattaatgcc cgtg
aaattt tagattctag aggaaacca 60
actgtagaag ttgacttaga gaccaactta ggta
ttttca gagctgccgt accatctggt 120
gcctccactg gtatttatga agccttggaa ttaa
gagata atgacaagag caggtactta 180
ggaaaggggtg ttcaaaaagc tatcaagaac atta
atgaaa ttattgctcc aaaattgatt 240
ggaatgaatt gtactgaaca aaagaaaatt gaca
atttaa tggttgaaga attagatgga 300
agtaaaaatg aatggggatg gtcaaaaagt aagt
taggag ctaatgctat ttagctata 360
tccatggctg tatgtagagc tggtcagct gcta
ataaag tatctttata caaatatttg 420
gcacaattag ctggaagaa aagtaccaa atgg
tattac cagtaccttg tttaaacgtt 480
atcaatggag gatcccatgc aggaaacaaa ttat
ctttcc aagaatttat gatagtcca 540
gttggtgctc catcatttaa agaagcctta agat
atggtg ctgaagtata tcatactta 600
aatcagaaa ttaaaaagaa atatggtatt gatg
caacca atgtagggtga tgaagggtga 660
tttgctccaa atatatttaa cgctaatgaa gctc
```

熱帯熱マラリア原虫増殖率の比較を示した。エノラーゼの全長配列を抗原として使用しても熱帯熱マラリア原虫の増殖率の抑えられることがわかる。従って図6に示した部分配列での実施例は全長配列から抜き出された増殖抑制効果のあるエピトープ配列による効果であることがわかる。すなわちヒトと熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼアミノ酸配列の比較により選択された部分配列ペプチドは、マラリア原虫の増殖抑制に有効であることがわかった。

10 【0060】

【配列表】

<211> 446
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum
 <220>
 <223> Amino acid sequence of PI
 asmodium falciparum enolase
 <400> 2
 atg gct cat gta ata act cgt att aat gcc
 cgt gaa att tta gat tct
 Met Ala His Val Ile Thr Arg Ile Asn Ala
 Arg Glu Ile Leu Asp Ser
 5 10 15
 aga gga aac cca act gta gaa gtt gac tta
 gag acc aac tta ggt att
 Arg Gly Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu
 Glu Thr Asn Leu Gly Ile
 20 25 30
 ttc aga gct gcc gta cca tct ggt gcc tcc
 act ggt att tat gaa gcc
 Phe Arg Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser
 Thr Gly Ile Tyr Glu Ala
 35 40 45
 ttg gaa tta aga gat aat gac aag agc agg
 tac tta gga aag ggt gtt
 Leu Glu Leu Arg Asp Asn Asp Lys Ser Arg
 Tyr Leu Gly Lys Gly Val
 50 55 60
 caa aaa gct atc aag aac att aat gaa att
 att gct cca aaa ttg att
 Gln Lys Ala Ile Lys Asn Ile Asn Glu Ile
 Ile Ala Pro Lys Leu Ile
 65 70 75 80
 gga atg aat tgt act gaa caa aag aaa att
 gac aat tta atg gtt gaa
 Gly Met Asn Cys Thr Glu Gln Lys Lys Ile
 Asp Asn Leu Met Val Glu
 85 90 95
 gaa tta gat gga agt aaa aat gaa tgg gga
 tgg tca aaa agt aag tta
 Glu Leu Asp Gly Ser Lys Asn Glu Trp Gly
 Trp Ser Lys Ser Lys Leu
 100 105 110
 gga gct aat gct att tta gct ata tcc atg
 gct gta tgt aga gct ggt
 Gly Ala Asn Ala Ile Leu Ala Ile Ser Met
 Ala Val Cys Arg Ala Gly
 115 120 125
 gca gct gct aat aaa gta tct tta tac aaa
 tat ttg gca caa tta gct
 Ala Ala Ala Asn Lys Val Ser Leu Tyr Lys
 Tyr Leu Ala Gln Leu Ala
 130 135 140

225	230	235	2
40			
tca gct ggt tat gaa gga aag gtt aaa att			
gct atg gat gtt gca gct			
Ser Ala Gly Tyr Glu Gly Lys Val Lys Ile			
Ala Met Asp Val Ala Ala			
245	250	255	
tct gaa ttt tac aac agt gaa aac aaa aca			
tac gat tta gat ttc aaa			
Ser Glu Phe Tyr Asn Ser Glu Asn Lys Thr			
Tyr Asp Leu Asp Phe Lys			
260	265	270	
act cca aat aat gac aaa tca tta gtt aag			
act gga gct caa tta gtt			
Thr Pro Asn Asn Asp Lys Ser Leu Val Lys			
Thr Gly Ala Gln Leu Val			
275	280	285	
gac tta tac att gat tta gta aag aaa tat			
cca att gtt tct att gaa			
Asp Leu Tyr Ile Asp Leu Val Lys Lys Tyr			
Pro Ile Val Ser Ile Glu			
290	295	300	
gat cca ttt gat caa gat gat tgg gaa aat			
tat gct aaa tta aca gca			
Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Glu Asn			
Tyr Ala Lys Leu Thr Ala			
305	310	315	3
20			
gct att gga aag gat gtt caa att gtt ggt			
gat gat tta tta gtt aca			
Ala Ile Gly Lys Asp Val Gln Ile Val Gly			
Asp Asp Leu Leu Val Thr			
325	330	335	
aac cca acc aga att act aaa gct ctt gaa			
aaa aat gct tgc aat gct			
Asn Pro Thr Arg Ile Thr Lys Ala Leu Glu			
Lys Asn Ala Cys Asn Ala			
340	345	350	
tta cct ctt aaa gtt aac caa atc ggt tct			
att act gaa gct att gaa			
Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser			
Ile Thr Glu Ala Ile Glu			
355	360	365	
gct tgc tta tta tct caa aaa aat aac tgg			
ggt gtt atg gtt tct cac			
Ala Cys Leu Leu Ser Gln Lys Asn Asn Trp			
Gly Val Met Val Ser His			
370	375	380	
aga tct ggt gaa acc gaa gat gtt ttt att			
gct gat tta gtt gtt gct			
Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Val Phe Ile			
Ala Asp Leu Val Val Ala			
385	390	395	4

20	25	30	
Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly			
Ile Tyr Glu Ala Leu Glu			
35	40	45	
Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Tyr Met			
Gly Lys Gly Val Ser Lys			
50	55	60	
Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala			
Pro Ala Leu Val Ser Lys			
65	70	75	80
Lys Leu Asn Val Thr Glu Gln Glu Lys Ile			
Asp Lys Leu Met Ile Glu			
85	90	95	
Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe			
Gly Ala Asn Ala Ile Leu			
100	105	110	
Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly			
Ala Val Glu Lys Gly Val			
115	120	125	
Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala			
Gly Asn Ser Glu Val Ile			
130	135	140	
Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn			
Gly Gly Ser His Ala Gly			
145	150	155	1
60			
Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile			
Leu Pro Val Gly Ala Ala			
165	170	175	
Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala			
Glu Val Tyr His Asn Leu			
180	185	190	
Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys			
Asp Ala Thr Asn Val Gly			
195	200	205	
Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu			
Glu Asn Lys Glu Gly Leu			
210	215	220	
Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala			
Gly Tyr Thr Asp Lys Val			
225	230	235	2
40			
Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu			
Phe Phe Arg Ser Gly Lys			
245	250	255	
Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp			
Pro Ser Arg Tyr Ile Ser			
260	265	270	
Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser			
Phe Ile Lys Asp Tyr Pro			
275	280	285	
Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln			

420

425

430

Ala Lys

<200> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<220>

<222> Position 100-113 of amino
acid sequence of Plasmodium falciparu
m

enolase which is described in SEQ ID NO
: 2.

<223> Partial amino acid sequen
ce designated GG14 from Plasmodium fal
ci
parum enolase.

<400> 4

Gly Ser Lys Asn Glu Trp Gly Trp Ser Lys
Ser Lys Leu Gly

5

10

<200> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<220>

<222> Position 129-141 of amino
acid sequence of Plasmodium falciparu
m

enolase which is described in SEQ ID NO
: 2.

<223> Partial amino acid sequen
ce designated AA13 from Plasmodium fal
ci
parum enolase, glycolytic enzyme.

<400> 5

Ala Ala Pro Asn Lys Val Ser Leu Tyr Lys
Tyr Leu Ala

5

10

<200> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<220>

<222> Position 220-235 of amino
acid sequence of Plasmodium falciparu
m

enolase which is described in SEQ ID NO
: 2.

<223> Partial amino acid sequen
ce designated GL16 from Plasmodium fal
ci
parum enolase.

<400> 6

5
Lys Thr Pro Asn Asn Asp
19 20

10

15

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、エノラーゼ部分配列の1つ、AD22に基づく直線状の検査用抗原ペプチドを示す。

【図2】 図2は、エノラーゼ部分配列の1つ、AD22、に基づく分岐型の検査用・抗体産生用抗原ペプチドを示す。

【図3】 図3は、マラリア原虫由来エノラーゼの部分配列を利用したペプチド化合物、GG14、AD22、AA13、GL16と、様々なブラジル人マラリア患者血清(P)との蛍光ELISA法による抗体価(RFU値)測定を示したグラフである。比較として非感染者の血清(H)によるデータを示してある。

【図4】 図4は、マラリア原虫由来エノラーゼの部分 *

*配列ペプチド、AD22、AA13、GL16を用いて、熱帯熱マラリア患者血清の抗体価(RFU値)の経日変化を調べた結果を示す。

【図5】 図5は、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ部分配列ペプチド、または熱帯熱マラリア原虫そのもの(破碎した原虫試料)に対する、熱帯熱マラリア患者血清の反応について検討した結果を示す。

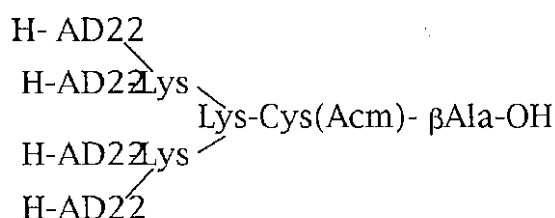
【図6】 図6は、AD22部分ペプチドで免疫したウサギ血清とコントロール(免疫前のウサギ血清)による熱帯熱マラリア原虫増殖阻害率の結果を示す。

【図7】 図7は、抗組み換えエノラーゼ抗体(抗エノラーゼIgG)とコントロール(標準ウサギIgG)による熱帯熱マラリア原虫増殖率の比較を示した図である。

【図1】

H-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-
Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-OH

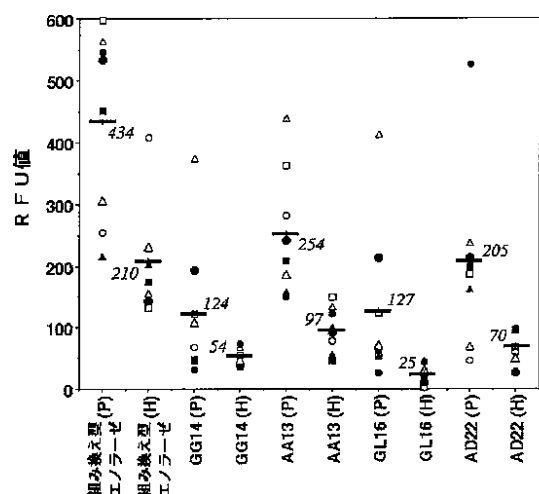
【図2】



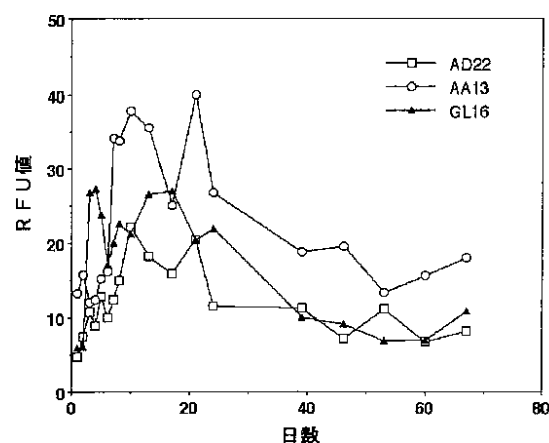
AD22 =

-Ala-Ser-Glu-Phe-Tyr-Asn-Ser-Glu-Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-

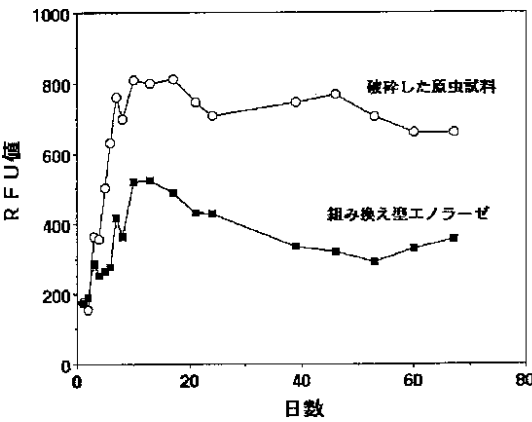
【図3】



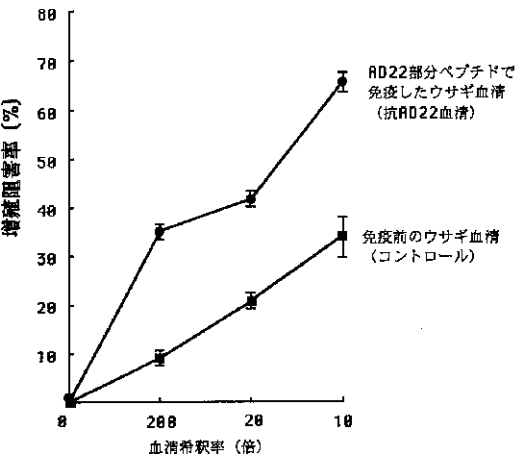
【図4】



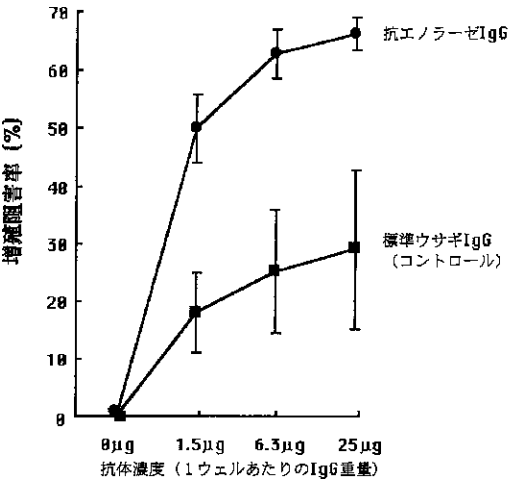
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト [*] (参考)
// C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/53	S
	Z N A	33/569	A
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/569			A
(72)発明者 鈴木 守		F タ-ム(参考)	4B024 AA01 AA13 BA61 HA17
群馬県高崎市石原町2514 - 2			4C084 AA13 NA10 ZB092 ZB382
(72)発明者 狩野 繁之			4C085 AA03 BA06 BB11 DD62
東京都中野区江古田 3 - 14 - 5			4H045 AA11 AA30 BA09 BA62 CA22
			DA86 EA31 EA52

专利名称(译)	疟疾感染诊断材料和抗原免疫抑制疟疾寄生虫的生长		
公开(公告)号	JP2002371098A	公开(公告)日	2002-12-26
申请号	JP2001176044	申请日	2001-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	日本原子力研究所		
申请(专利权)人(译)	日本原子力研究所		
[标]发明人	吉田勝 奥浩之 片貝良一 鈴木守 狩野繁之		
发明人	吉田 勝 奥 浩之 片貝 良一 鈴木 守 狩野 繁之		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/015 A61K48/00 A61P33/06 C07K14/445 C07K17/00 C12N15/09 G01N33/569		
CPC分类号	Y02A50/412		
FI分类号	C07K14/445 A61K39/015 A61K48/00 A61P33/06 C07K17/00 G01N33/53.S G01N33/569.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA61 4B024/HA17 4C084/AA13 4C084/NA10 4C084/ZB092 4C084/ZB382 4C085/AA03 4C085/BA06 4C085/BB11 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA62 4H045/CA22 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供一种肽或类似物, 其能够利用与人和其他动物的免疫反应引起对疟原虫的免疫应答。本发明的肽化合物具有恶性疟原虫的糖醇解酶烯醇酶的部分氨基酸序列, 其源自与人烯醇酶的氨基酸序列不同的部分。本发明的生物或化学合成的肽化合物通过与患者血清反应产生用于恶性疟原虫感染的诊断试剂, 并产生抑制恶性疟原虫生长或引起疟原虫融化的抗体。可以用作免疫抗原。此外, 本发明的肽化合物可以用作在恶性疟原虫感染的患者中引起主动免疫的症状改善剂, 以及在未感染的个体中具有保护性免疫的疫苗。