

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/097996

発行日 平成20年2月28日 (2008. 2. 28)

(43) 国際公開日 平成17年10月20日 (2005. 10. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C07K 14/435 (2006.01)	C07K 14/435	4 B O 6 4
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4 B O 6 5
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4 C O 8 4
C12P 21/00 (2006.01)	C12P 21/00 C	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 28 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2006-512155 (P2006-512155)	(71) 出願人	591281220 日本全薬工業株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/007191		福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の
(22) 国際出願日	平成17年4月7日 (2005. 4. 7)		1
(31) 優先権主張番号	特願2004-116089 (P2004-116089)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成16年4月9日 (2004. 4. 9)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	津久井 利広 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ダニアレルゲン

(57) 【要約】

ダニアレルギー疾患の治療剤、診断薬としてアナフィラキシー誘発性不純物を含まない安全かつ有効な組換えダニアレルゲンの提供。以下の (a) 又は (b) の組換えタンパク質。(a) 配列番号 2 または 3 5 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質 (b) 配列番号 2 または 3 5 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有するタンパク質

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の (a) 又は (b) の組換えダニアレルゲン。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列を含む組換えダニアレルゲン

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有する組換えダニアレルゲン

【請求項 2】

以下の (a) 又は (b) の組換えダニアレルゲン。

(a) 配列番号 35 で表わされるアミノ酸配列を含む組換えダニアレルゲン

10

(b) 配列番号 35 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有する組換えダニアレルゲン

【請求項 3】

以下の (a) 又は (b) のダニアレルゲンをコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列を含むダニアレルゲン

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有するダニアレルゲン

【請求項 4】

20

以下の (a) 又は (b) のダニアレルゲンをコードする遺伝子。

(a) 配列番号 35 で表わされるアミノ酸配列を含むダニアレルゲン

(b) 配列番号 35 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有するダニアレルゲン

【請求項 5】

以下の (c) 又は (d) の DNA を含む遺伝子。

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA

(d) 配列番号 1 の塩基配列を含む DNA と相補的な配列を含む DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、ダニアレルゲン活性を有するタンパク質をコードする DNA

30

【請求項 6】

以下の (c) 又は (d) の DNA を含む遺伝子。

(c) 配列番号 34 で表される塩基配列を含む DNA

(d) 配列番号 34 の塩基配列を含む DNA と相補的な配列を含む DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、ダニアレルゲン活性を有するタンパク質をコードする DNA

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のダニアレルゲンの断片ペプチド。

【請求項 8】

40

配列番号 3 から 19 で表されるアミノ酸配列を少なくとも 1 つ含むアミノ酸配列からなる請求項 7 記載の断片ペプチド。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の断片ペプチドをコードするダニアレルゲンの断片遺伝子。

【請求項 10】

請求項 3 から 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子または請求項 9 に記載の断片遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 11】

請求項 1 または 2 に記載のダニアレルゲンと他のタンパク質との融合タンパク質。

【請求項 12】

50

請求項10記載の発現ベクターで形質転換された細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞。

【請求項13】

請求項12記載の細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞を該遺伝子の発現可能な条件下で培養して、組換えダニアレルゲンを産生させ、次いで該組換えダニアレルゲンを回収することを特徴とする組換えダニアレルゲンの製造方法。

【請求項14】

請求項12記載の細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞を該遺伝子の発現可能な条件下で培養して、融合組換えダニアレルゲンを産生させ、該融合組換えダニアレルゲンを回収し、次いで、融合している他のタンパク質を脱離せしめることを特徴とする組換えダニアレルゲンの製造方法。

10

【請求項15】

請求項1または2に記載の組換えダニアレルゲン、請求項7記載の断片ペプチドまたは請求項11記載の融合タンパク質を有効成分とするダニアレルギー疾患治療剤。

【請求項16】

請求項1または2に記載の組換えダニアレルゲン、請求項7記載の断片ペプチドまたは請求項11記載の融合タンパク質を有効成分とするダニアレルギー疾患診断薬。

【請求項17】

請求項1または2に記載のダニアレルゲンに対する抗体。

【請求項18】

モノクローナル抗体である請求項17記載のダニアレルゲンに対する抗体。

20

【請求項19】

請求項18記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項20】

請求項17から19のいずれか1項に記載の抗体を用いる屋内塵中のダニアレルゲンの免疫学的測定方法。

【請求項21】

E L I S Aである請求項20記載の屋内塵中のダニアレルゲンの免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、アレルギー活性を有する組換えダニアレルゲンに関し、特にイヌのアトピーの原因となるダニアレルゲンに関する。本発明は、さらに該アレルギーをコードする遺伝子、該遺伝子を発現させ得る発現ベクター、発現ベクターで形質転換された形質転換体、該組換えダニアレルゲンの製造方法、ダニアレルギー疾患治療剤、およびダニアレルギー疾患診断薬に関する。

30

【背景技術】

アトピー性皮膚炎、気管支喘息等のアレルギー疾患の主要な原因として、屋内塵性ダニが知られている。従来、アレルギー疾患の治療剤としては、アレルギーの原因物質である減感作療法が、最も重要な根本治療とされ、特に花粉症を始め屋内塵、真菌アレルギー等の吸入性アレルギー等の回避が困難な抗原で引き起こされる疾患においては、該減感作療法が広く行われている。しかしながら、減感作療法では感作抗原によるアナフィラキシーの危険が伴う為、安全な治療用抗原の投与が必要とされ、そのような安全な感作抗原の研究が進められている。

40

ダニアレルギー疾患については、屋内塵中のアレルギー源としてヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 及びコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) の2種のダニが報告されている (非特許文献1および2を参照)。これらのダニから、主要ダニアレルゲンが分画されており、それらはダニ排泄物及び/又はダニ虫体中に含有されている分子量24-28kDの糖蛋白 (pI 4.6-7.2)、及び/又は分子量14.5-20kDのタンパク質 (pI 5-7.2) であることがわかっている (非特許文献3から7を参照)。

ダニアレルゲンの遺伝子について、ヤケヒョウヒダニの主要アレルギーである *D e r*

50

p1 (分子量: 25, 371) 及び Der p2 (分子量: 14, 131) が、またコナヒョウヒダニの主要アレルゲンである Der f1 (分子量: 25, 191) 及び Der f2 (分子量: 14, 021) がクローニングされ塩基配列も決定されている (非特許文献8から15を参照)。これらのアレルゲンについて組換えアレルゲンも作製されており、アレルゲンの研究が進んでいる。また、分子量約30, 000のアレルゲンとして Der f3 もその塩基配列が報告されている (非特許文献16を参照)。さらにダニアレルゲンとして、ma10, ma3, ma15, ma29, ma44, ma50, ma113, ma114, ma115 (特許文献1を参照) も報告されといる。さらに、抗 Der f2 血清と強い交差反応性を示す、ma124 も報告されている (特許文献2を参照)

10

また、イヌにおいて98kDaと109kDaの Der f15 (非特許文献17を参照) 及び60kDaの Der f18 (非特許文献18を参照) がIgEが強く反応するアレルゲンであるとの報告がある。

ダニアレルギー疾患の診断方法としては、従来、問診を主体とし、屋内塵 (ハウスダスト) 抽出物および/またはダニ虫体抽出物を用いる皮内反応試験が主流であった。RAST (radio allergosorbent test) 法による血清中のIgE抗体価 (相対値) の測定、吸入誘発試験、鼻粘膜誘発試験等も併用されてはいたが、ダニアレルギー疾患を直接的に診断するのはかなり困難であった。

従来より、屋内塵 (ハウスダスト) 抽出液を用いて、屋内塵性ダニを特異的アレルゲンとする気管支喘息の減感作治療法が行われてきた。しかし、屋内塵の組成は十分分析されていなかった。また、屋内塵には多種類の不純物が含まれるので、アナフィラキシーを誘発する危険もあり、その際の屋内塵の投与量も極度に制限されていた。このため従来の減感作治療は効果が極めて低かった。従って、より有効でありかつ安全な減感作治療用抗原が望まれていた。従来より、高分子粗ダニ排泄物画分に減感作治療に有効なアレルゲンが存在することが知られていたが、このような画分からは減感作治療用に十分な量のダニアレルゲンは得られなかった。従って、ダニ飼育物からのダニアレルゲンの抽出、精製による方法では、治療用抗原の安定供給は困難である。また、前記のように、従来より遺伝子組換え技術により種々の組換えダニアレルゲンについて報告されていた。しかしながら、これらのアレルゲンは必ずしも、実際の治療に有効とはいえず、より有効な新たなダニアレルゲン活性の高い組換えダニアレルゲンの提供が望まれていた。

20

30

【特許文献1】特開平7-112999号公報

【特許文献2】特開平7-278190号公報

【非特許文献1】Allerg. Asthma, 10, 329~334 (1964)

【非特許文献2】J. Allergy, 42, 14~28 (1968)

【非特許文献3】J. Immunol., 125, 587~592 (1980)

【非特許文献4】J. Allergy Clin. Immunol., 76, 753~761 (1985)

【非特許文献5】Immunol., 46, 679~687 (1982)

【非特許文献6】Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 81, 214~223 (1986)

40

【非特許文献7】J. Allergy Clin. Immunol., 75, 686~692 (1985)

【非特許文献8】Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 85, 127~129 (1988)

【非特許文献9】J. Exp. Med., 167, 175~182 (1988)

【非特許文献10】J. Exp. Med., 170, 1457~1462 (1989)

【非特許文献11】Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 118~123 (1990)

【非特許文献12】Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 124~129 (1990)

50

【非特許文献13】 Jpn. J. Allergol., 39, 557~561 (1990)

【非特許文献14】 Clinical and Experimental Allergy, 21, 25~32 (1991)

【非特許文献15】 Clinical and Experimental Allergy, 21, 33~37 (1991)

【非特許文献16】 FEBS Lett., 377, 62~66 (1995)

【非特許文献17】 Vet. Immunol. Immunopathol, 78, 231~247 (2001)

【非特許文献18】 J. Allergy Clin. Immunol, 112, 79~86 (2003) 10

【発明の開示】

本発明は、ダニアレルギー疾患の治療剤、診断薬としてアナフィラキシー誘発性不純物を含まない安全かつ有効な組換えダニアレルゲンの提供を目的とする。より具体的には、本発明は、ダニ虫体由来の遺伝子を提供することを目的とし、また、該遺伝子を発現させ得る発現ベクターを提供することを目的とする。さらに、本発明は、ダニ虫体由来の遺伝子の発現によって得られるアレルゲン活性を有する新規なダニアレルゲンの提供を目的とする。さらにまた、本発明は、組換えダニアレルゲンを有効成分とする新規なダニアレルギー疾患治療剤の提供および組換えダニアレルゲンを含む新規なダニアレルギー疾患診断薬の提供を目的とする。 20

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規なダニアレルゲンを見出し、該アレルゲンが減感作治療に優れた効果を奏することを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は以下のとおりである。

[1] 以下の (a) 又は (b) の組換えダニアレルゲン、

(a) 配列番号2または35で表わされるアミノ酸配列を含む組換えダニアレルゲン

(b) 配列番号2または35で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有する組換えダニアレルゲン

[2] 以下の (a) 又は (b) のダニアレルゲンをコードする遺伝子、 30

(a) 配列番号2または35で表わされるアミノ酸配列を含むダニアレルゲン

(b) 配列番号2または35で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつダニアレルゲン活性を有するダニアレルゲン

[3] 以下の (c) 又は (d) のDNAを含む遺伝子、

(c) 配列番号1または34で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号1または34の塩基配列を含むDNAと相補的な配列を含むDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、ダニアレルゲン活性を有するタンパク質をコードするDNA

[4] [1] のダニアレルゲンの断片ペプチド、 40

[5] 配列番号3から19で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含むアミノ酸配列からなる [4] の断片ペプチド、

[6] [4] または [5] の断片ペプチドをコードするダニアレルゲンの断片遺伝子、

[7] [2] もしくは [3] の遺伝子または [6] に記載の断片遺伝子を含有する組換えベクター、

[8] [1] のダニアレルゲンと他のタンパク質との融合タンパク質、

[9] [7] の発現ベクターで形質転換された細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞、

[10] [9] の細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞を該遺伝子の発現可能な条件下で培養して、組換えダニアレルゲンを産生させ、次いで該組換えダニアレルゲンを回収することを特徴とする組換えダニアレルゲンの製造方法、 50

[11] [9]の細菌、酵母、昆虫細胞又は動物細胞を該遺伝子の発現可能な条件下で培養して、融合組換えダニアレルゲンを産生させ、該融合組換えダニアレルゲンを回収し、次いで、融合している他のタンパク質を脱離せしめることを特徴とする組換えダニアレルゲンの製造方法、

[12] [1]の組換えダニアレルゲン、[4]の断片ペプチドまたは[8]記載の融合タンパク質を有効成分とするダニアレルギー疾患治療剤、

[13] [1]の組換えダニアレルゲン、[4]の断片ペプチドまたは[8]記載の融合タンパク質を有効成分とするダニアレルギー疾患診断薬、

[14] [1]に記載のダニアレルゲンに対する抗体、

[15] モノクローナル抗体である[14]のダニアレルゲンに対する抗体、

10

[16] [15]のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、

[17] [14]から[16]のいずれかの抗体を用いる屋内塵中のダニアレルゲンの免疫学的測定方法、ならびに

[18] ELISAである[17]の屋内塵中のダニアレルゲンの免疫学的測定方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2004-116089の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

図1は、リコンビナントイヌFcεRIα鎖の電気泳動の結果を示す写真である。

図2は、リコンビナントイヌFcεRIα鎖のIgE結合性を示す図である。

図3は、*Dermatophagoides farinae*特異的IgEの検出の結果を示す図である。

20

図4は、リコンビナントイヌFcεRIα鎖を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図5は、*Dermatophagoides farinae*抽出抗原の2次元電気泳動パターンを示す写真である。

図6は、*Dermatophagoides farinae*アレルゲンタンパク質の2次元電気泳動ウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図7-1は、Zen1遺伝子の部分塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。

図7-2は、Zen1遺伝子の部分塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である(図7-1の続き)。

30

図8-1は、Zen1遺伝子の全長cDNA塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。

図8-2は、Zen1遺伝子の全長cDNA塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である(図8-1の続き)。

図8-3は、Zen1遺伝子の全長cDNA塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である(図8-2の続き)。

図8-4は、Zen1遺伝子の全長cDNA塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である(図8-3の続き)。

図9は、大腸菌を用いて作製・精製したリコンビナントZen1のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

40

図10は、抗Zen1ポリクローナル抗体のウエスタンブロッティングによる反応解析の結果を示す写真である。レーン1はリコンビナントZen1を、レーン2はダニ虫体の結果を表す。

図11は、リコンビナントZen1のIgE反応性をELISAにて解析した結果を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

(1) ダニアレルゲンZen1タンパク質の単離および部分配列決定

臨床的にダニアレルギーと診断された動物から得られたダニアレルゲン特異的IgEを用いてダニアレルギーを特定する。具体的には、例えばダニアレルゲン特異的IgEを含

50

む血清、ダニ抽出物およびアレルギー特異的 I g E を認識する I g E レセプターを用いたウエスタンブロッティングよりダニアレルギーを同定すればよい。アレルギーの同定は公知の方法により行うことができる。

このようにして同定される本発明の新規なダニアレルギーである Z e n 1 タンパク質は、分子量 150 k D a ~ 200 k D a のタンパク質である。

同定されたダニアレルギーの単離は、電気泳動を行い、ダニアレルギーのスポットからダニアレルギーを抽出することにより行うことができる。この際、他のタンパク質と完全に分離するためには、2次元電気泳動を行うことが望ましい。

抽出したダニアレルギーを用いて、公知の方法で部分配列決定を行うことができる。部分配列を決定する公知の方法として、MS / MS 解析による d e n o v o s e q u e n c i n g やペプチドマッピングがある。

(2) R T - P C R による c D N A クローンの作製

ダニより m R N A を抽出し、該 m R N A を鋳型にしてダニアレルギー c D N A を合成し、c D N A ライブラリーを作製し、スクリーニングすることにより、本発明のダニアレルギーをコードする D N A を得ることができる。

m R N A の供給源はダニ虫体であり、好ましくは屋内塵性ダニであるコナヒョウヒダニやヤケヒョウヒダニ等の虫体であるが、これらには限定されない。m R N A の調製は、通常行われる手法により行うことができる。得られた m R N A を鋳型として、上記 (1) により得られた配列情報に基づいてプライマーを設計し、ダニアレルギーをコードする c D N A 断片を合成する。得られた断片を p G E M (P r o m e g a 製) 等の適当なベクターにサブクローニングし、常法により、例えばサイクルシークエンス法により塩基配列を決定する。

本発明のダニアレルギーの部分アミノ酸配列を配列番号 3 から 19 に示す。このうち、配列番号 3 から 7 に示される配列が d e n o v o s e q u e n c i n g により決定した配列であり、配列番号 19 に N 末端アミノ酸配列を示す。配列番号 8 から 18 に示される配列がペプチドマッピングにより決定した配列である。

本発明は、ダニアレルギーである Z e n 1 タンパク質の断片であって、配列番号 3 から 19 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 1 つを含むアミノ酸配列からなるダニアレルギーを含む。

配列番号 1 に本発明のダニアレルギーである Z e n 1 タンパク質をコードする Z e n 1 遺伝子の D N A の部分塩基配列を、配列番号 34 に全長塩基配列を示す。配列番号 2 に本発明のダニアレルギーである Z e n 1 タンパク質の部分アミノ酸配列を、配列番号 35 に全長アミノ酸配列を例示する。

これらのアミノ酸配列からなるタンパク質がダニアレルギー活性を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも 1 個、好ましくは 1 若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。

例えば、配列番号 2 または配列番号 35 で表されるアミノ酸配列の少なくとも 1 個、好ましくは 1 又は数個 (例えば 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個) のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列に少なくとも 1 個、好ましくは 1 又は数個 (例えば 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個) のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の少なくとも 1 個、好ましくは 1 又は数個 (例えば 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個) のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

このような配列番号 2 または配列番号 35 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列として、配列番号 2 または配列番号 35 のアミノ酸配列と、B L A S T (B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l a t t h e N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o l o g i c a l I n f o r m a t i o n (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール)) 等 (例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ) を用いて計算したときに、少なくとも 85 % 以上、好ましくは 90 % 以上、さらに好ま

しくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有しているものが挙げられる。

このような配列番号2または配列番号35のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号2または配列番号35のアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一である。

また、上記配列番号1または配列番号34に示すDNA配列を有する遺伝子と相補的な配列からなるDNAと下記の条件下でハイブリダイズすることができるDNAであってダニアレゲン活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。すなわち、DNAを固定したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSCとは150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる)を用い、
10
68℃で洗浄することにより同定することができる条件をいう。あるいは、サザンブロッティング法によりニトロセルロース膜上にDNAを転写、固定後、ハイブリダイゼーション緩衝液[50% フォルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×デンハルト(Denhardt's)溶液、100μg/mlサケ精子DNA]中で42℃で一晩反応させることによりハイブリッドを形成することができるDNAである。

さらに、上記DNAに対するRNA、又は該RNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるRNAであってダニアレゲン活性を有するタンパク質をコードするRNAも本発明に含まれる。

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、細菌、酵母又は動物細胞等の宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクターDNAは、広く普及した入手の容易なものが用いられる。例えば、pUC19、pTV118N(宝酒造社製)、pUEX2(アマシャム社製)、pGEX-4T、pKK233-2(ファルマシア社製)、pMAM-neo(クロンテック社製)等が挙げられる。

本発明の発現ベクターの構築方法は、特に限定されるものではなく常法により行うことができる。例えば、ダニアレゲンcDNAのEcoRIで消化した断片を、プラスミドpUC19のマルチクローニング部位のEcoRI部位に挿入することができる。また、
30
該断片をプラスミドベクターpGEX-4TのEcoRI部位に連結して発現ベクターを得ることができる。

本発明の発現ベクターで形質転換された細菌、酵母又は動物細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであれば特に制限されないが、例えば、細菌としては大腸菌、枯草菌等が、酵母としてはサッカロマイセス・セレビィシエ等が、動物細胞としては、チャイニーズ・ハムスター・卵巣(CHO)細胞、ヨトウガの卵巣細胞であるSf21細胞やSf9細胞、サルCOS細胞、マウス線維芽細胞等が挙げられる。

本発明の組換えダニアレゲンには、直接発現に加えて、他のタンパク質との融合タンパク質として発現されたものも含まれ、以下、該融合タンパク質を融合組換えダニアレゲンという。ここで、融合する他のタンパク質としては特に限定されないが、例えば、β-ガラクトシダーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、プロテインA、マルトース
40
結合タンパク質等が挙げられる。

本発明の組換えダニアレゲンは、アレゲン活性に必須な領域のみのペプチド断片であってもよく、また、アレゲン活性に必須な領域からなるものであってもよい。また、ダニアレゲンタンパク質のみを発現させて得られたものの他に、融合タンパク質として発現したもののから他のタンパク質を脱離せしめて得られたものでもよい。

すなわち、本発明の組換えダニアレゲンは、ダニ虫体由来の遺伝子の発現によって得られ、ダニアレゲン活性を有するタンパク質である。ここで、ダニアレゲン活性を有するとは、哺乳動物に対してアレルギー反応を誘導し得ることをいう。

本発明のダニアレゲンは、以下の方法により製造することができる。上記形質転換株の培養終了後、菌体を集菌し、種々のプロテアーゼインヒビターを含む緩衝液に懸濁して
50

超音波処理で破壊する。細胞デブリスにある膜局在性のタンパク質をフェニルメタンスルフォニル・フルオリド、モノヨード酢酸、ペプスタチンA、エチレンジアミン四酢酸等のプロテアーゼインヒビター及びラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、トリトンX-100、ノニデットP40等の界面活性剤を含む緩衝液で抽出する。その抽出液から、又は培養濃縮液から得られたダニアレルゲン・グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質を、例えばグルタチオン固定化アフィニティークロマトグラフィー及び抗ダニ虫体抗体固定化アフィニティークロマトグラフィー等で精製する。なお、グルタチオン固定化担体は、ファルマシア社製のものである。また、抗ダニ虫体抗体固定化担体は、活性化されたトレシル担体 (例えば、トレシルGMゲル (栗田工業社製)、トレシルトヨパール (東ソー社製)、トレシルセファロース (ファルマシア社製) 等が用いられる) にウサギ抗ダニ虫体抗体を共有結合させたものである。また、ダニアレルゲンと6×His等のHis tagとの融合タンパクを得て、金属を固定化した固定化金属アフィニティービーズ等を用いて精製することもできる。

精製された融合組換えダニアレルゲンは、プロテアーゼで消化し、ELISA及びダニアレルギー疾患患者白血球ヒスタミン遊離試験 (アレルギー, 37, 725 (1988)) でモニター下に、例えばゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、イオン交換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、疎水クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、等電点電気泳動法、ゲル電気泳動法等の公知の精製法を単独又は組み合わせで分画する。

本発明は、ダニアレルゲンを有効成分として含むダニアレルギー疾患治療剤をも包含する。該治療剤は、各種のダニアレルギー疾患の治療剤として用いられる。ここでダニアレルギー疾患とは、アトピー性気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎等、ダニの特異抗原が原因となるあらゆるアレルギー疾患をいう。

本発明のダニアレルギー疾患治療剤は、特に制限はないが、例えば、前記の方法により精製された組換えダニアレルゲンまたはその断片ペプチドを乾燥して粉末状で採取し、ダニアレルギー疾患に対する減感作治療剤として調製することができる。本発明のダニアレルギー疾患治療剤は、減感作治療剤として用いられる場合、そのまま、または必要に応じて一般的に用いられるアジュバントや各種の添加剤、例えば安定剤、賦形剤、溶解補助剤、乳濁化剤、緩衝剤、無痛化剤、保存剤、着色剤等を常法により添加した配合剤として用いることができる。例えば、粉末状の精製された組換えダニアレルゲンをフェノールを添加した生理食塩水に溶解し、減感作治療用抗原の原液として用いる。

本発明のダニアレルギー疾患治療剤は、通常の投与経路例えば経皮、経口、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内等の投与方法により行うことができる。更に、例えば、トローチ、舌下錠、点眼剤、鼻腔内噴霧剤、パップ剤、クリーム剤、ローション剤等の経皮、経粘膜薬としても使用することができる。また、本発明のダニアレルギー疾患治療剤の投与量及び投与回数は、投与経路、症状などに応じて成人1回あたり約20 μ g以下の範囲となるように適宜選択し、毎週1から数回程度投与される。

また、本発明のダニアレルギー疾患治療剤は、ダニアレルギー疾患に対する治療剤のみならず予防剤としても有用である。また、アナフィラキシー誘発作用もなく、人体に対して安全に用いることができる。

本発明のダニアレルギー疾患診断薬は、ダニアレルギー疾患に対する皮内反応診断試薬及びダニアレルギー診断用滴定試薬として用いられる。皮内反応診断試薬として用いる場合は、前記の方法により精製された組換えダニアレルゲンまたはその断片ペプチドを常法により調製して得るが、例えば組換えダニアレルゲンを乾燥して粉末状とし、これをフェノールを含む生理食塩水で溶解し、希釈して用いる。皮内反応診断試薬として用いる方法は、常法に従って用いられる。

また、ダニアレルギー診断用滴定試薬として用いる場合も同様に常法により調製されるが、例えば、組換えダニアレルゲンまたはその断片ペプチドをハンクス緩衝液で適当に溶解し、希釈してヒスタミン遊離滴定用試薬として用いる。この方法は通常、以下の操作手順によりなされる。即ち、ダニアレルギー疾患患者の血液及びこの血液から遠心分離によ

10

20

30

40

50

り得られた血球画分を緩衝液に懸濁した血球浮遊液の一定量を、組換えダニアレルゲンを滴定試薬として用いて滴定し、アレルギー刺激により好塩基球から遊離するヒスタミン量をHPLCを用いて測定する〔アレルギー, 37, 725 (1988)〕。

このヒスタミン遊離滴定では、最大遊離量の50%量(滴定曲線の変曲点)から遊離されるヒスタミン量を求める。この滴定では、(1)血球浮遊液の滴定値から患者のアレルゲン感受性を直接測定することになる。(2)血漿と組換えダニアレルゲンを予め反応させた後、その液で血球浮遊液を滴定して得られる値(血液滴定曲線値)は、通常、組換えダニアレルゲンで血球浮遊液を滴定して得られる値(血球浮遊液滴定曲線値)より高い値が得られる。これは、血漿中にアレルギー中和能を持つIgG抗体(遮断抗体)が存在するためである。従って、対血液滴定曲線の、対血球浮遊液滴定曲線からのシフトの大きさから、遮断抗体価が得られる。アレルギー感受性とこの遮断抗体価から、ダニアレルギーの正確な診断が可能となる。また、このヒスタミン遊離滴定試験は減感作治療効果のモニターとしても有用である。

10

本発明は、本発明のダニアレルゲンまたはその断片ペプチドに対する抗体も包含する。該抗体は公知の方法によりポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得られる。該抗体は、例えば屋内塵ダスト中のダニアレルゲンの有無等を測定するのに用いることができる。該測定は公知の免疫学的方法により行うことができ、例えばELISAにより行うことができる。この際、屋内塵からタンパク質を抽出し、測定すればよい。

なお、本発明のダニアレルゲンの組換えタンパク質を発現させ、発現させた当該組換えタンパク質を用いてダニアレルギー患者犬との特異IgE反応、あるいは皮内反応などの試験を実施することにより、本発明のダニアレルゲンタンパク質がアレルギータンパク質としての機能を確定させることができる。

20

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

尚、各実施例において使用した試薬は特記しない限り、ナカライテスク、和光純薬、シグマ、ディフコなどから購入した市販のものを使用した。また、制限酵素などの遺伝子工学用試薬は宝酒造、東洋紡、インビトロジェン、などから購入し、販売者の指示に従って使用した。

【実施例1】

IgE検出系の確立

30

イヌ高親和性IgEレセプター α 鎖(Fc ϵ R1 α)cDNAのシグナルペプチド部位を除いた細胞外領域を制限酵素EcoRI及びXhoI部位を付加したかたちでPCRにて増幅し、大腸菌発現プラスミドベクターpGEX4T-1(アマシャムバイオサイエンス社製)のEcoRI及びXhoI部位にT4-DNAリガーゼで連結し、得られた組換えプラスミドをE. coli TOP10株(インビトロジェン社製)に形質転換した。この形質転換株をアンピシリン100 μ g/mLを含有するLB培地中、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後、少量を新たなLB培地に継代し、600nmのODが1.0になるまで培養した。ついで、最終濃度1mMになるようにIPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)を添加した後3時間目に集菌し、PBS(pH7.4)で1回洗浄した。再度集菌した細胞をPBS(pH7.4)中で超音波処理することにより溶解し、遠心により不溶画分を除去し、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)と融合したイヌFc ϵ R1 α を含む可溶性画分を回収した。次いで、この可溶性画分からグルタチオンセファロース4Bカラム(アマシャムバイオサイエンス社製)によりGSTと融合したイヌFc ϵ R1 α を得た。10リットルの培養液から1.0mgの融合タンパク質(GST-Fc ϵ R1 α)を得た。得られた精製GST-Fc ϵ R1 α はSDS-PAGEにおいて45kDaの単一のバンドを呈することを確認した(図1)。イムノプレートに(ナルジェヌンク社製)リコンビナントイヌIgE(BETHYL社製)と精製イヌIgGを1.0 μ g、つぎに0.1 μ g、0.05 μ g、0.025 μ g、0.0125 μ g、0.00625 μ gと2倍階段希釈で固相化し、精製GST-Fc ϵ R1 α の反応性を確認したところ、IgEと反応しIgGと反応しないことを確認した(図

40

50

2)。イムノプレート（ナルジェヌンク社製）にコナヒョウヒダニ抽出抗原（GREER社製） $4.0\mu\text{g}$ を固相化し、コナヒョウヒダニ陽性イヌ血清（コナヒョウヒダニ抗原液（GREER社製）を生理食塩水にて50倍に希釈したものをを用いた皮内反応によりコナヒョウヒダニに陽性を呈したイヌ血清）を反応させ、ビオチン標識したGST-FcεRIαを加え、さらにペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジン（Jackson Immuno Research社製）及び基質添加による発色反応によりGST-FcεRIα鎖がダニアレルゲン特異的IgEを認識することを確認した（図2）。さらにコナヒョウヒダニ抽出抗原（GREER社製） $4.0\mu\text{g}$ をイムノプレート（ナルジェヌンク社製）に固相化し、コナヒョウヒダニ抽出抗原を免疫したイヌ血清を反応させた。本GST-FcεRIαと 56°C にて1時間熱処理したコナヒョウヒダニ陽性イヌ血清とは反応しないこと、またイヌ精製IgGとは反応しないこと、そしてリコンビナントイヌIgE（BETHYL社製）と反応が確認されることにより、本GST-FcεRIαはアレルゲン特異的IgEを認識するものと考えられた（図3）。図3中「-」は 56°C にて1時間処理しないものを、「+」は 56°C にて1時間処理したものを示し、「cont.」は、非免疫血清を示す。

10

【実施例2】

ウエスタンブロッティングによるダニ主要アレルゲンの解析

アトピー性皮膚炎を発症し、コナヒョウヒダニアレルゲン抽出抗原液（GREER社製）を用いた皮内反応及び実施例1にて確立したリコンビナントイヌFcεRIα鎖を用いたELISA法にてダニアレルギーと診断された8頭のイヌ血清及び血漿を用いてウエスタンブロット解析を実施した。コナヒョウヒダニ抽出抗原液 $100.0\mu\text{L}$ にβ-メルカプトエタノールを終濃度 $50.0\mu\text{L}/\text{mL}$ になるように添加したLaemmliサンプルバッファー（BIO-RAD社製） $200\mu\text{L}$ を加え、 100°C で5分間熱処理した後、ゲル濃度5~20%のポリアクリドアミドゲル（PAGEEL; ATTO社製）にアプライし、電気泳動を行った。電気泳動が終了した後、PVDFメンブラン（Hybond-P; アマシャムバイオサイエンス社製）にトランスファーし、メンブランをブロッキング液（5%スキムミルク添加PBST（PBSに終濃度0.1%になるようにTween20を加えたもの））中で 4°C にて一晩放置した。メンブランをPBSTで10分間洗浄したのち、イヌ血清または血漿をブロッキング液で10倍希釈しメンブランに添加し室温にて3時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を3回行った後、ビオチン標識したイヌFcεRIαをブロッキング液で希釈しメンブランに添加し室温にて2時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を3回行った後、PBSTで10,000倍に希釈したストレプトアビジン-HRPコンジュゲート（アマシャムバイオサイエンス社製）をメンブランに添加し室温にて1時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を5回行った後、ECL Plus ウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムバイオサイエンス社製）反応液をメンブラン上に添加し5分間室温にて反応させた後、X線フィルム（Hyperfilm ECL; アマシャムバイオサイエンス社製）を用いてシグナルを検出した。その結果、分子量 150kDa から 250kDa の間に強く反応するタンパク質を検出した（図4）。図4中、矢印で示したバンドが分子量 150kDa から 250kDa の間の強く反応するタンパク質のバンドである。図4中、1から8までの数字は、8頭のイヌのそれぞれを示し、「ct.」は陰性血清を示す。

20

30

40

【実施例3】

2次元電気泳動によるダニアレルゲンタンパク質の解析

分子量 150kDa から 250kDa の間のIgEの強く反応するアレルゲンタンパク質の単離を2次元電気泳動にて実施した。2次元電気泳動はプロティアンIEFセル（BIO-RAD社製）を用いて実施した。コナヒョウヒダニ抽出抗原（GREER社製） 1.0mg を 1.0mL の膨潤バッファー（2-D スターターキット; BIO-RAD社製）に溶解した。溶解液 $300\mu\text{L}$ を 17cm のIPG Readyストリップゲル（pH4-7; BIO-RAD社製）にフォーカシングトレイを用いてActive条件（50V, 20°C , 12時間）にて膨潤させた。膨潤後、以下の条件にてフォーカシングを行

50

った。まず、STEP 1 (250 V, 20分, 20℃)にて過剰の塩類を除く操作を行い、STEP 2にて6時間かけて電圧を250 Vから10,000 Vまで上昇させた。STEP 3にて電圧10,000 V、トータルボルトアワー値60,000 VHにてフォーカシングを行った。2次元目の電気泳動を行う前にIPG ReadyストリップゲルをSDS-PAGE平衡化バッファーI (6M 尿素、0.375M Tris pH8.8、2% SDS、20% グリセロール、2% (w/v) DTT; BIO-RAD社製)を用いて10分間穏やかに振とうした。その後、SDS-PAGE平衡化バッファーII (6M 尿素、0.375M Tris pH8.8、2% SDS、20% グリセロール、2.5% (w/v) ヨードアセテアミド; BIO-RAD社製)にてさらに10分間穏やかに振とうすることにより平衡化を行った。平衡化を行ったIPG ReadyストリップゲルをPIIレディーゲル(8-16%; BIO-RAD社製)の上に1% (v/w) ローメルトアガロース(BIO-RAD社製)を用いて密着させた。40mA定電流(初期電圧値135 V、最終電圧値400 V)でおおよそ3時間電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをBio-Safe(BIO-RAD社製)にて染色し、タンパク質スポットのパターン解析を行った(図5)。

10

【実施例4】

ウエスタンブロット解析によるアレルゲンスポットの同定

2次元電気泳動後、タンパク質スポットをPVDFメンブラン(Hybond-P; アマシャムバイオサイエンス社製)にトランスファーし、メンブランをブロッキング液(5%スキムミルク添加PBST(PBSに終濃度0.1%になるようにTween 20を加えたもの)中で4℃にて一晩放置した。メンブランをPBSTで10分間洗浄したのち、イヌ血清または血漿をブロッキング液で10倍希釈しメンブランに添加し室温にて3時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を3回行った後、ビオチン標識したイヌFcεRIαをブロッキング液で希釈しメンブランに添加し室温にて2時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を3回行った後、PBSTで10,000倍に希釈したストレプトアビジン-HRPコンジュゲート(アマシャムバイオサイエンス社製)をメンブランに添加し室温にて1時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を5回行った後、ECL Plusウエスタンブロット検出システム(アマシャムバイオサイエンス社製)反応液をメンブラン上に添加し5分間室温にて反応させた後、X線フィルム(Hyperfilm ECL; アマシャムバイオサイエンス社製)を用いてシグナルを検出した。その結果、分子量が150 kDa~250 kDaの間で、pHがおおよそ4.5に強く反応するスポットを検出し、本発明のアレルゲンタンパク質(Zen1)スポットを得た(図6)。図6中左上の図(6-1)は、コナヒョウダニの2次元電気泳動パターン(pH4~7)を示し、右上の図(6-2)は、コナヒョウダニ陽性アトピー性皮膚炎発症イヌ患畜血清を用いたウエスタンブロット解析(pH4~7)を示し、左下の図(6-3)は、コナヒョウダニの2次元電気泳動パターン(pH3.9~5.1)を示し、右下の図(6-4)は、コナヒョウダニ陽性アトピー性皮膚炎発症イヌ患畜血清を用いたウエスタンブロット解析(pH3.9~5.1)の反応スポット(図中上部に黒い円形のスポットとしてみえる矢印の部分)を2次元電気泳動パターンに照らし合わせたものである。矢印のスポットに強い反応が認められた。

20

30

40

【実施例5】

Zen1タンパク質のプロテオーム解析

2次元電気泳動により単離したZen1タンパク質スポットをゲルより切り出し、MS/MS解析を行った。多くのMS/MSデータを得ることが出来たが、何もヒットしなかった。新規タンパク質であると考えられた5つのペプチドについてde novo sequencing法を行いアミノ酸配列(配列番号3から7)を決定した(表1)。これらのアミノ酸配列に関し、BLASTサーチを実施したが、明確なヒットは得られなかった。

【表 1】
表 1

部分配列 415	: MKSLLNEANELLK
部分配列 445	: SAQDVLEK
部分配列 847	: FMQSLLEADELLR
部分配列 448	: LPDSDLKDELAK
部分配列 491	: LPDSDLKNELAEK

10

de novo sequencing 法により決定した Zen1 の部分アミノ酸配列

【実施例 6】

Zen1 タンパク質のペプチドマッピング解析

2次元電気泳動により単離した Zen1 タンパク質スポットをゲルより切り出し、ペプチドマップを作製し、8つのピークに対してアミノ酸シーケンスを実施した。その結果、11のアミノ酸断片の配列（配列番号8から18）を決定した（表2）。BLASTサーチを実施したが、明確なヒットは得られなかった。

20

【表 2】

表 2

部分配列 21	: MYNFHLEAY
部分配列 28	: IAHFLELE
部分配列 32	: IAHFELE
部分配列 23-1	: KFQSLLEANEAN
部分配列 23-2	: IAHLESE(T)
部分配列 24	: KFQSLLEANEAN
部分配列 22	: DAQLEXE
部分配列 9-1	: SAQDVSL
部分配列 9-2	: RNEMNE
部分配列 20-1	: MFQSLLEANEAN
部分配列 20-2	: DLARDVXL

30

40

Zen1 のペプチドマッピングにより得られたピークのアミノ酸配列

【実施例 7】

Zen1 タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析

2次元電気泳動により単離した Zen1 タンパク質スポットをゲルより切り出し、HP G1005A Protein Sequencing System を用いて定法により Zen1 タンパク質の N 末端アミノ酸配列（配列番号 19）を決定した（表 3）。この配列に関して BLAST サーチを実施したが、明確なヒットは得られなかった。

【表3】
表3

N末配列：DNRDDVLKQTEE

Zen1のN末端アミノ酸配列

10

【実施例8】

ダニ全RNAの抽出とダニポリ(A)mRNAの分離

常法によりコナヒョウヒダニを培養増殖させて得られる生ダニ虫体を飽和食塩水約2.0Lに入れ、良くかき回した後30分間放置した。上清のダニ虫体を茶漉しを用いてすくい取り、生理食塩水を用いて洗浄した後乾燥させた。ダニ虫体1.0gをFastTrack 2.0 kit (インビトロジェン社製)を用いてそのマニュアルに従って全RNAの抽出とダニポリ(A)mRNAの分離を行った。

【実施例9】

ダニcDNAの合成

実施例8にて分離したダニポリ(A)mRNAのうち100ngを鋳型とし、cDNA合成キット(ReverTraAce-α-; TOYOBO社製)を用いてそのマニュアルに従って逆転写反応を行った。 20

【実施例10】

PCRによるZen1遺伝子の増幅

Zen1タンパク質のN末端アミノ酸配列をもとにプライマーN-1(5'-GAYGAYGTNTTRAARCARACNGARGAR-3'(配列番号20):Y=C or T, N=A or C or G or T, R=A or G,)とN-2(5'-GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR-3'(配列番号21):Y=C or T, N=A or C or G or T, R=A or G,)を設計し、それぞれセンスプライマーとした。また、de novo sequencing法により得られたアミノ酸配列をもとに12のプライマー(配列番号22から33)を設計し(表4)、それぞれリバースプライマーとした。実施例9にて合成したダニcDNAを鋳型とし、1.0μgを使用しEx taqポリメラーゼ(TaKaRaバイオ社製)を用い、マニュアルに従ってサンプルを調整し、94℃にて2分間熱変性処理した後、94℃1分間、65℃2分間、72℃3分間を1サイクルとし、これを35回行った後、72℃9分反応後、4℃に保存するサイクルで行った。リバースプライマー415-4(5'-RTTNAGNAGRTCYTTNGCRTCYTT-3'(配列番号25):N=A or C or G or T, R=A or G, Y=C or T,)を用いてPCRを行った際におよそ1,000bpを、また491-2(5'-RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT-3'(配列番号29):N 40

【表4】

表4

N-1 : 5'-GAY GAY GTN TTR AAR CAR ACN GAR GAR-3'
 N-2 : 5'-GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR-3'
 415-1 : 5'-RTT RAA RAA RTC YTT NGC RTC YTT RAA-3'
 415-2 : 5'-RTT NAG RAA RTC YTT NGC RTC YTT-3'
 415-3 : 5'-RTT RAA NAG RTC YTT NGC RTC YTT-3'
 415-4 : 5'-RTT NAG NAG RTC YTT NGC RTC YTT-3'
 445-1 : 5'-RTT RTC RAA NAC YTC RTG NGC-3'
 445-2 : 5'-RTT RTC NAG NAC YTC RTG NGC-3'
 491-1 : 5'-RTT RTC NGC RAA RTC YTT RTT-3'
 491-2 : 5'-RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT-3'
 448-1 : 5'-RTT NGC RAA RTC YTC RTT RAA YTC-3'
 448-2 : 5'-RTT NGC NAG RTC YTC RTT RAA YTC-3'
 448-3 : 5'-RTT NGC RAA RTC YTC RTT NAG YTC-3'
 448-4 : 5'-RTT NGC NAG RTC YTC RTT NAG YTC-3'

10

Zen1 遺伝子の増幅のために合成した Mixture プライマー配列

N-1 と 415-4 を用いて PCR を行った際におよそ 1000bp の断片、N-1 と 491-2 を用いて PCR を行った際におよそ 880bp の断片を得た。

N=A or C or G or T, R=A or G, Y=C or T

20

【実施例 11】

Zen1 遺伝子のクローニング

実施例 10 にてプライマー N-1 と 415-4 を用いて増幅した DNA 断片をアガロースゲルより回収し (Takara 社製 SUPREC-01)、pGEM-T Easy Vector (Promega 社製) のクローニングサイトに T4 DNA リガーゼを用いて結合させ、宿主大腸菌 TOP10 (Invitrogen 社製) を形質転換した。すなわち、大腸菌コンピテントセルとプラスミドを混和後、氷上で 30 分、42℃ で 30 秒、氷上で 2 分の温度処理を行い、SOC 培地 (2% Trypton、0.5% yeast extract、0.05% NaCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM Glucose) に浮遊して 37℃ で 1 時間インキュベートした。その後 50 μg/ml アンピシリンを添加した LB 寒天培地上 (1% yeast extract、0.5% trypton、1% NaCl) に形質転換した大腸菌を 37℃、一晚培養後に大腸菌コロニーを得た。白色の挿入断片を含むと考えられるクローンを選択し、一晚 50 μg/ml アンピシリンを添加した LB 培地で培養後、プラスミド DNA を GFX (登録商標) Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience 社製) により精製した。アマシャム社製のダイプライマーサイクルシーケンスキットを用いてシーケンス反応を行い、蛍光 DNA シークエンサー (島津製作所社製) により塩基配列の解析を行った。なお、最終的な塩基配列の決定は、3 クローンの塩基配列解析を行い、各クローンの塩基配列の完全一致をもって決定とした (図 7-1 および図 7-2)。

30

40

【実施例 12】

Zen1 遺伝子の解析

実施例 11 にてクローニングした Zen1 遺伝子の遺伝子解析を Genetyx-win ver. 6 ソフトウェア (ソフトウェア開発社製) を用いて実施した。塩基数は 1020bp でアミノ酸残基は 340 であった (図 7-1 および図 7-2、配列番号 1 および 2)。本遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列に関して BLAST サーチを実施したが、明確なヒットは得られず、本 Zen1 遺伝子は新規のものと考えられた。

【実施例 13】

Zen1 完全長 cDNA の単離

完全長の cDNA の単離は Rapid Amplification of cDNA

50

Ends (RACE) 法を用いた。実施例 8 において使用したダニ虫体より SV Total RNA Isolation Kit (Promega 社製) を用いて全 RNA を抽出した後、GeneRacer (登録商標) Kit (Invitrogen 社製) を用いて RACE 用のテンプレートをマニュアルに従って作製した。また、実施例 12 において得られた Zen1 の部分配列をもとに 5' 及び 3' 末端を増幅するための 1st PCR 及び Nested PCR 用のプライマーを合成した (表 5)。5' 及び 3' 末端の増幅反応は、上記において作製した RACE 用のテンプレートを 1.0 μ L とり、GeneRacer (登録商標) Kit に付属の 5' 及び 3' 用プライマーを各 3.0 μ L、dNTP ミックス溶液 (10 mM each) を 1.0 μ L、Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH 社製) に付属の 10 \times cDNA PCR reaction buffer を 5.0 μ l、Advantage cDNA polymerase Mix を 1.0 μ L、10 μ M に調整した上記において合成した 1st PCR 用の遺伝子特異的プライマーを 1.0 μ L 加え、滅菌蒸留水にて 50.0 μ L に調整した。遺伝子の増幅は Touchdown PCR 法を用いた。調整したサンプル液を 94 $^{\circ}$ C にて 1 分間熱変性処理した後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 4 分間を 1 サイクルとしたものを 5 回行い、つづいて 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、70 $^{\circ}$ C で 4 分間を 1 サイクルとしたものを 5 回行い、最後に 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、68 $^{\circ}$ C で 4 分間を 1 サイクルとしたものを 25 回行った後、4 $^{\circ}$ C に保存するサイクルで行った。1st PCR が終了した後、5' 及び 3' 末端の増幅反応液からそれぞれ 1.0 mL とり、GeneRacer (登録商標) Kit に付属の Nested PCR 用の 5' 及び 3' 用プライマーを各 1.0 μ L、dNTP ミックス溶液 (10 mM each) を 1.0 μ L、Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH 社製) に付属の 10 \times cDNA PCR reaction buffer を 5.0 μ l、Advantage cDNA polymerase Mix を 1.0 μ L、10 μ M に調整した上記において合成した 1st PCR 用の遺伝子特異的プライマーを 1.0 μ L 加え、滅菌蒸留水にて 50.0 μ L に調整した。遺伝子の増幅は上記の Touchdown PCR 法を用いた。得られた 5' 及び 3' 末端の増幅断片を 1.0% のアガロースゲルにて電気泳動により確認した後、これらを切り出して回収し (TaKaRa 社製 SUPREC-01)、pGEM-T Easy Vector (Promega 社製) のクローニングサイトに T4 DNA リガーゼを用いて結合させ、宿主大腸菌 TOP10 (Invitrogen 社製) を形質転換した。すなわち、大腸菌コンピテントセルとプラスミドを混和後、氷上で 30 分、42 $^{\circ}$ C で 30 秒、氷上で 2 分の温度処理を行い、SOC 培地 (2% Trypton、0.5% yeast extract、0.05% NaCl、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM Glucose) に浮遊して 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。その後 50 μ g/ml アンピシリンを添加した LB 寒天培地上 (1% yeast extract、0.5% trypton、1% NaCl) に形質転換した大腸菌を 37 $^{\circ}$ C、一晚培養後に大腸菌コロニーを得た。白色の挿入断片を含むと考えられるクローンを選択し、一晚 50 μ g/ml アンピシリンを添加した LB 培地で培養後、プラスミド DNA を GFX (登録商標) Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience 社製) により精製した。アマシャム社製のダイプライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行い、蛍光 DNA シークエンサー (島津製作所社製) により塩基配列の解析を行った。なお、最終的な塩基配列の決定は、3 クローンの塩基配列解析を行い、各クローンの塩基配列の完全一致をもって決定とした。その結果、Zen1 の 5' 及び 3' 末端の塩基配列を決定することが出来た (図 8-1 から図 8-4、配列番号 34 および 35)。

【表 5】

表 5

プライマー名	配列	使用目的
Zen1 RS-1	5'-AAT TAC AAA CAT GAG TTA GAA-3'	3' RACE 1st PCR
Zen1 RS-2	5'-GAA TTG TTG ACA ATG TTC AAA-3'	3' RACE Nested PCR
Zen1 RR-1	5'-GAT TTC ATC TTT CAA ATC TGA-3'	5' RACE 1st PCR
Zen1 RR-2	5'-CTT TTC CAA TAC ATC CTG GGC-3'	5' RACE Nested PCR

10

(上から、それぞれ配列番号36、37、38および39)

RACE法に用いたプライマーとその配列

【実施例14】

リコンビナントZen1の精製

実施例13にて得られたZen1のcDNAを制限酵素BamHI及びXhoI部位を付加したかたちでPCRにて増幅し、大腸菌発現プラスミドベクターpGEX4T-1(アマシャムバイオサイエンス社製)のBamHI及びXhoI部位にT4-DNAリガーゼで連結し、得られた組換えプラスミドをE. coli TOP10株(インビトロジェン社製)に形質転換した。この形質転換株をアンピシリン100 μ g/mLを含有するLB培地中、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後、少量を新たなLB培地に継代し、600nmのODが1.0になるまで培養した。ついで、最終濃度1mMになるようにIPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)を添加した後3時間目に集菌し、PBS(pH7.4)で1回洗浄した。再度集菌した細胞をPBS(pH7.4)中で超音波処理することにより溶解し、遠心により不溶画分を除去し、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)と融合したZen1を含む可溶性画分を回収した。次いで、この可溶性画分からグルタチオンセファロース4Bカラム(アマシャムバイオサイエンス社製)によりGSTと融合したZen1を得た。精製したGSTと融合したZen1を含む溶液にこの融合タンパク濃度のおよそ1/100重量のThrombin(アマシャムバイオサイエンス社製)を加え、22 $^{\circ}$ Cにて20時間反応させることによりGSTとZen1とを切り離した。その後、Benzamidin Sepharose(アマシャムバイオサイエンス社製)によりThrombinを除去し、リコンビナントZen1を精製した。得られた精製Zen1はSDS-PAGEにおいておよそ60kDaの単一のバンドを呈することを確認した(図9)。

20

30

【実施例15】

抗Zen1ポリクローナル抗体の作製とダニタンパク質との反応性の解析

実施例14において精製したリコンビナントZen1をマウス(BALB/c、メス、4週齢)6頭に1週間隔にて5回免疫し、その後これらのマウスから採血して血清を分離し、ELISAにてIgG抗体の反応を解析した。ELISAは、イムノプレート(ナルジェヌンク社製)にリコンビナントZen1 1.0 μ g及びコナヒョウヒダニ抽出抗原(GREER社製)4.0 μ gをそれぞれ固相化し、ブロッキング液(10% FBS添加PBSに終濃度0.05%になるようにTween20を加えたもの)にて37 $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキングした後、マウス血清をブロッキング液にて1000倍に希釈したものを室温で1時間反応させた。イムノプレートを洗浄した後、ブロッキング液にて2000倍希釈したHRP標識したヤギ抗マウスIgGモノクローナル抗(ZYMED社製)を反応させ、イムノプレートを洗浄した後、酵素基質溶液(ABTS液)100 μ Lを各ウエルに添加し、37 $^{\circ}$ C10分間反応させた。酵素反応は各ウエルに100 μ Lの0.32%フッ化ナトリウム溶液を添加して停止させた。各ウエルの414nmの吸光度をイムノリーダー(BioRad社)で測定した。本ELISAにてIgGが反応することを確認した上で、Zen1に対するポリクローナル抗体とした。

40

50

本ポリクローナル抗体のリコンビナントZen1及びダニ虫体におけるマウスIgGの反応性はウエスタンブロットにおいて解析した。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したリコンビナントZen1タンパク液100.0 μL とコナヒョウヒダニ抽出抗原液100.0 μL に β -メルカプトエタノールを終濃度50.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ になるように添加したLaemmliサンプルバッファー(BIO-RAD社製)200 μL を加え、100°Cで5分間熱処理した後、ゲル濃度5~20%のポリアクリドアミドゲル(PAGE; ATTO社製)にアプライし、電気泳動を行った。電気泳動が終了した後、PVDFメンブラン(Hybond-P; アマシャムバイオサイエンス社製)にトランスファーし、メンブランをブロッキング液(5%スキムミルク添加PBST(PBSに終濃度0.1%になるようにTween20を加えたもの))中で4°Cにて一晩放置した。メンブランをPBSTで10分間洗浄したのち、HRP標識したヤギ抗マウスIgGモノクローナル抗体(ZYMED社製)をPBSTで20,000倍希釈しメンブランに添加し室温にて2時間反応させた。PBSTで10分間洗浄を5回行った後、ECL Plusウエスタンブロット検出システム(アマシャムバイオサイエンス社製)反応液をメンブラン上に添加し5分間室温にて反応させた後、X線フィルム(Hyperfilm ECL; アマシャムバイオサイエンス社製)を用いてシグナルを検出した。その結果、分子量およそ60 kDaのリコンビナントZen1に反応するシグナルと分子量150 kDaから250 kDaの間に反応する天然型のZen1のシグナルを検出した(図10)。このことにより、実施例13において単離した完全長のZen1 cDNAは、ダニ虫体中の分子量が150 kDaから250 kDaの間のアレルゲンタンパク質をコードしているということを確認したことになる。

10

20

【実施例16】

リコンビナントZen1のIgE反応性の解析

実施例14において精製したリコンビナントZen1のアレルゲン性の評価をELISAにて実施した。イムノプレート(ナルジェヌンク社製)にリコンビナントZen1 1.0 μg を固相化し、ブロッキング液(10% FBS添加PBSに終濃度0.05%になるようにTween20を加えたもの)にて37°Cで1時間ブロッキングした後、9頭のコナヒョウヒダニ陽性イヌ血清(コナヒョウヒダニ抗原液(GREER社製)を生理食塩水にて50倍に希釈したものを用いた皮内反応によりコナヒョウヒダニに陽性を呈したイヌ血清)と陰性コントロールイヌ血清を反応させ、ビオチン標識したGST-Fc ϵ R1 α を加え、さらにペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジン(Jackson Immuno Research社製)及び酵素基質溶液(ABTS液)添加による発色反応を行い、酵素反応を各ウエルあたり100 μL の0.32%フッ化ナトリウム溶液を添加することにより停止させた。各ウエルの414 nmの吸光度をイムノリーダー(Biorad社)で測定した。すなわち、この操作により皮内反応にてダニに陽性と確認されたイヌ9頭及び陰性イヌ(control)の血清中のIgEのリコンビナントZen1に対する反応をリコンビナントイヌFc ϵ R1 α を用いたELISA系にて解析した。その結果、陰性イヌの値(点線)を上回る値が確認された。このことにより、リコンビナントZen1がIgEに反応するアレルゲンタンパク質であることを確認した(図11)。

30

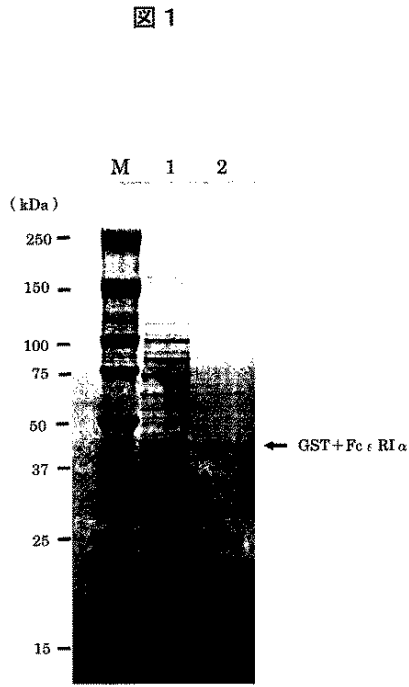
40

【産業上の利用可能性】

本発明により、ダニアレルギー疾患の治療剤、診断薬としてアナフィラキシー誘発性の不純物を含まない安全かつ有効な組換えダニアレルゲンを提供することが可能となった。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

【図1】



M: 分子マーカー (BIO-RAD社製)
 1: 大腸菌BL21のIPTG誘導後の可溶化分画
 2: 精製GSTタンパク質融合イヌFcεRIα鎖

【図2】

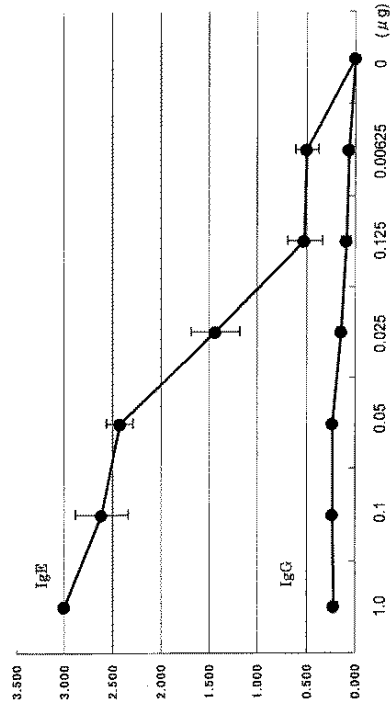


図2

【図3】

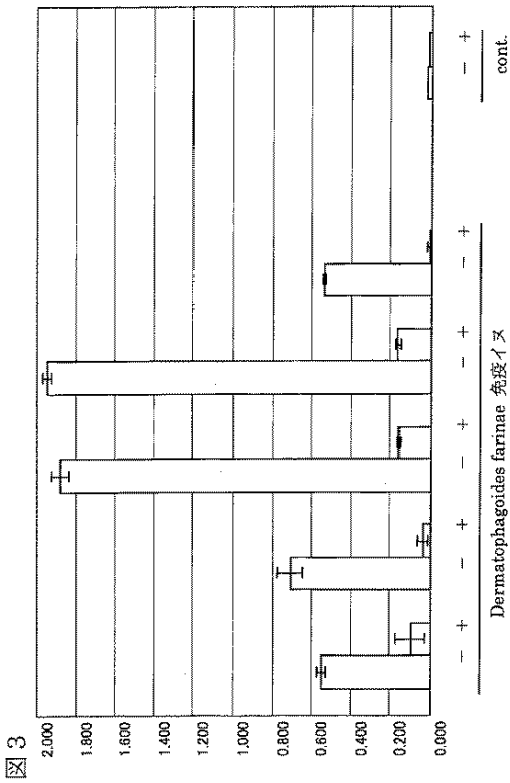


図3

【図4】

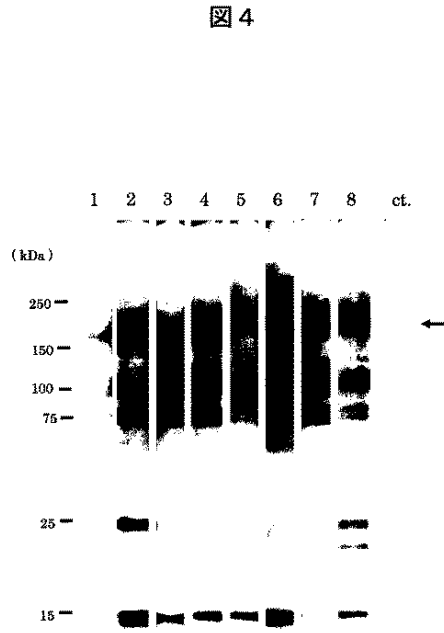
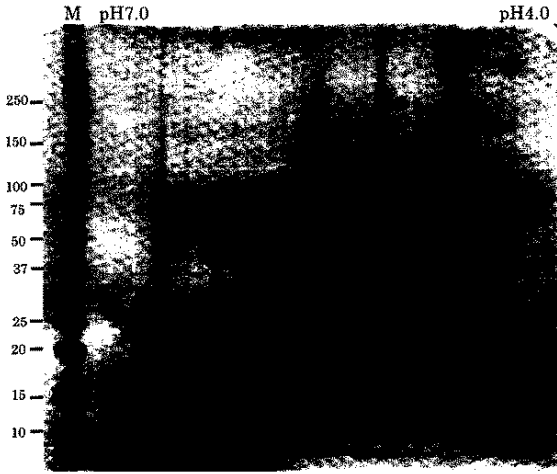


図4

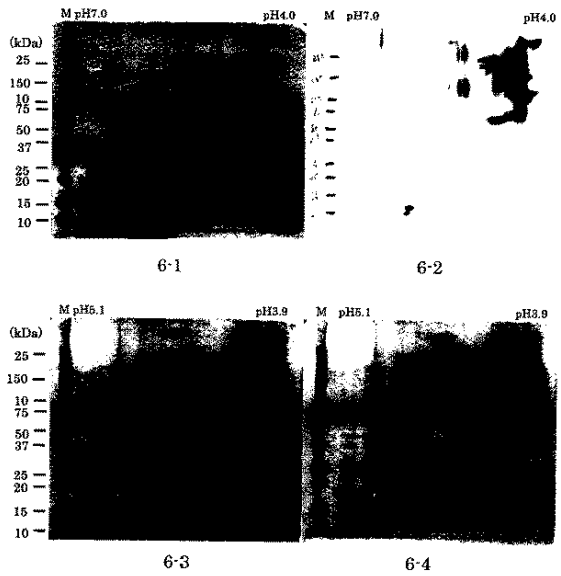
【図5】

図5



【図6】

図6



【図7-1】

図7-1

gac gat gta tta aag cag act gag geg cct att aaa agt gcc cag gat 48
 Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp
 1 5 10 15

gta ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aag gat gas atc gca gaa 96
 Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu
 20 25 30

aaa ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa 144
 Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys
 35 40 45

aat cca atc aaa atc gcc cat tit gaa ttg gaa ttg tta aca atg ttc 192
 Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Thr Met Phe
 50 55 60

aaa aag ttc caa tta ttg aac gaa gcl aat gaa att atc aaa tcc 240
 Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser
 65 70 75 80

ttg aca acc aca aca aag gaa cag aca acc cca act cct gaa cca aca 288
 Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
 85 90 95

aca aca act cct gaa cag act acc aca acc ccc gaa cag act acc aaa 336
 Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys
 100 105 110

aca cag gaa cca aca aca cca act cct gaa cag act acc aaa acc ccc 384
 Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
 115 120 125

gaa cag act acc aca aca cag gaa cca aca aca cca act cca gaa cag 432
 Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro
 130 135 140

act acc aas aca cag gaa cca aca aca cca act cct gaa cag act acc 480
 Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr
 145 150 155 160

aaa acc ccc gaa cag act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act 528
 Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
 165 170 175

【図7-2】

図7-2

ccg gac cgc tac caa aac ccc cga cag cta cca aaa cac cgg acc atc 576
 Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile
 180 185 190

cac ccc aac tcc gaa cag act acc aca aca cct gaa cca tcc act cca 624
 His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro
 195 200 205

act cag gaa cag act acc aca acc ccc gaa cag act acc aca aca cag 672
 Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
 210 215 220

gaa cca tca acc cca act cag gaa cag act acc aca aca cag gaa cca 720
 Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro
 225 230 235 240

tca acc cca act cag gaa cag act acc aca aca cag gaa cca tca aag 768
 Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr
 245 250 255

act aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aca aca gcl gaa gag ctt 816
 Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu
 260 265 270

att aca aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg 864
 Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu
 275 280 285

aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat 912
 Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His
 290 295 300

gag tta gaa aat gca aca aca cca atc aca atc gcc cat ctt gaa tgg 960
 Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser
 305 310 315 320

gaa ttg ttg aca atg ttc aca atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc 1008
 Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala
 325 330 335

aac gaa ctc ctg aa 1022
 Asn Glu Leu Leu 340

【 8 - 1】

8 - 1

atg aas tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gca 48
Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala
1 5 10 15

ggc att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aas cgt gat aat cgg gat 96
Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp
20 25 30

gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt ett aas agt gcc cag gat gta 144
Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val
35 40 45

ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa 192
Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys
50 55 60

ctg gaa acc atg aag cat tcc aas cat aag tta gaa aat gca aas aat 240
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

caa atc aas atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aas 288
Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys
85 90 95

aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gat aat gaa att atc aaa tcc ttg 336
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu
100 105 110

aca acc aca aca acg gaa cgg aca acc cca act cct gaa aca aca aca 384
Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr
115 120 125

aca act cct gaa cgg act acc aas acc ccc gaa cgg act acc aas aca 432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr
130 135 140

【 8 - 2】

8 - 2

ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa cgg act acc aas acc ccc gaa 480
Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu
145 150 155 160

ccg act acc aas aca cgg gaa cca aca aca cca act cca gaa cgg act 528
Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
165 170 175

acc aas aca cgg gaa cca aca aca cca act cct gaa cgg act acc aas 576
Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Lys
180 185 190

acc ccc gaa cgg act acc aas aca cct gaa cca tcc acc cca act cgg 624
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro
195 200 205

gac cgc tac cna aac ccc cga cgg cta cca aas cac cgg acc atc cac 672
Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His
210 215 220

ccc aac tcc gaa cgg act acc aas aca cct gaa cca tcc act cca act 720
Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
225 230 235 240

ccg gaa cgg act acc aas acc ccc gaa cgg act acc aas aca cgg gaa 768
Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu
245 250 255

cca tca acc cca act cgg gaa cgg act acc aas aca cgg gaa cca tca 816
Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser
260 265 270

acc cca act cgg gaa cgg act acc aas aca cgg gaa cca tca cgg act 864
Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr
275 280 285

【 8 - 3】

8 - 3

aag aas cct aat cgg gat gat gtt ttg aas cca gct gaa gag ctt att 912
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile
290 295 300

aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa 960
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys
305 310 315 320

aat gaa atc gaa aas ctg gca acc atg aag aat tac aas cat gag 1008
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu
325 330 335

tta gaa aat gaa aas aat cca atc aas atc gcc ont ctt gaa tgg gaa 1056
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu
340 345 350

ttg ttg aca atg ttc aas atg ttc cna tca ttg ttg aac gaa gct gat 1104
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp
355 360 365

gaa att atc aga tcc ttg aca act acg aag gaa cgg aca aca ttg aat 1152
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn
370 375 380

agc acc act cgg gaa cgg aca aca ttg aat agc acc act cgg gaa cgg 1200
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro
385 390 395 400

aca aca ttg aat agc acc act cgg gaa cgg aca aca ttg aat agc acc 1248
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr
405 410 415

act cgg gaa cgg aca aca ttg aat agc acc act cgg gaa cgg aca aca 1296
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr
420 425 430

【 8 - 4】

8 - 4

ttg aat agc acc act cgg gaa cgg aca aca ttg aat agc acc act cgg 1344
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro
435 440 445

gaa cgg aca aca ttg aat agc acc act cgg gaa cgg aca aca ttg aat 1392
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn
450 455 460

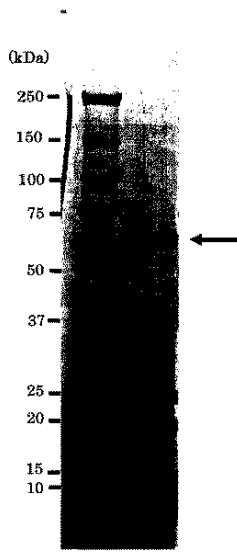
agc acc act tca gaa cca aag aat tca atc aat aga aas aca agt gaa 1440
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu
465 470 475 480

ttt cat tct tat cgg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata 1488
Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile
485 490 495

ttt tct aas cat ttt att ctt ttg att tga 1518
Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile Stop
500 505

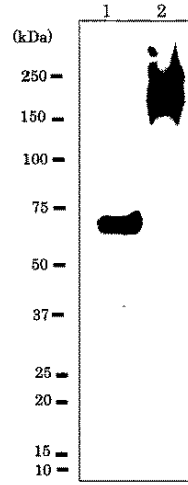
【図 9】

図 9

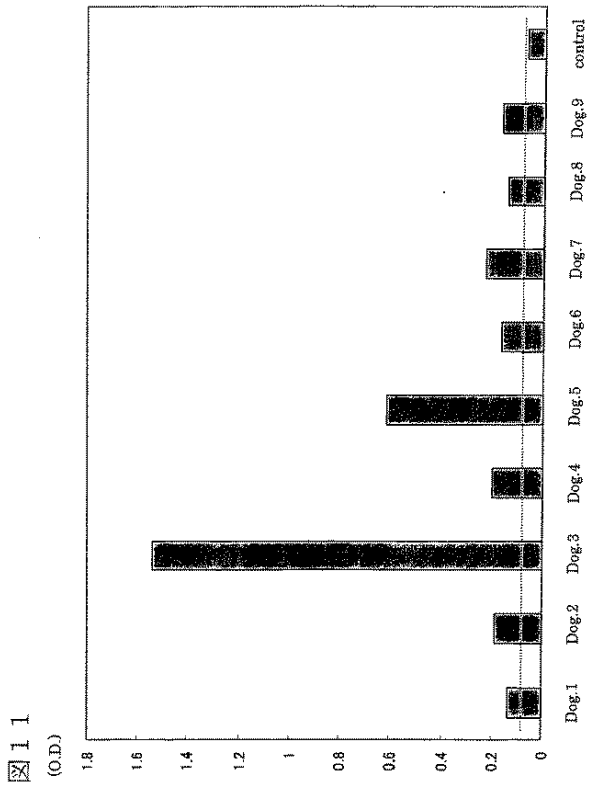


【図 10】

図 10



【図 11】



【配列表】
2005097996000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/007191
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K39/35, 49/00, A61P11/02, 11/06, 17/04, 27/14, 37/08, C07K14/435, 16/18, C12N1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, G01N33/53//C12P21/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K39/35, 49/00, A61P11/02, 11/06, 17/04, 27/14, 37/08, C07K14/435, 16/18, C12N1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, G01N33/53//C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shumann R.J. et al., Characterization of house dust mite and scabies mite allergens by use of canine serum antibodies. Am.J.Vet.Res., 2001, 62(9), p.1344-8	1-21
A	Toshihiro TSUKUI et al., "Recombinant Dog Koshinwasei IgE Receptor α Sa (Fc ϵ RI α) o Mochiita Dog IgE Kenshutsukei no Kakuritsu.", Dai 136 Kai Japanese Society of Veterinary Science Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu, 2003, page 202, HS-9	1-21
A	KURATA, K. et al., Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. J.Vet.Med.Sci., 2004, January, 66(1), p.25-9	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 May, 2005 (11.05.05)		Date of mailing of the international search report 31 May, 2005 (31.05.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007191

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	McCall C. et al., Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. Vet.Immunol. Immunopathol., 2001, 78(3-4), p.231-47	1-21
A	Weber E. et al., Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. J. Allergy Clin.Immunol., 2003, 112(1), pages 79 to 86	1-21

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/007191									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K39/35, 49/00, A61P11/02, 11/06, 17/04, 27/14, 37/08, C07K14/435, 16/18, C12N1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, G01N33/53 // C12P21/08											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K39/35, 49/00, A61P11/02, 11/06, 17/04, 27/14, 37/08, C07K14/435, 16/18, C12N1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02, G01N33/53 // C12P21/08											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	Shumann R. J. et al., Characterization of house dust mite and scabies mite allergens by use of canine serum antibodies. Am. J. Vet. Res., 2001, 62 (9), p. 1344-8	1-21									
A	津久井利広, 他 8 名, リコンビナントイヌ高親和性 IgE レセプター α 鎖 (Fc ϵ RI α) を用いたイヌ IgE 検出系の確立. 第 136 回 日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2003, p. 202, HS-9	1-21									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 11.05.2005		国際調査報告の発送日 31.5.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 渡邊 潤也	4B 3131								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/007191

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kurata K. et al., Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. J. Vet. Med. Sci., 2004 Jan, 66(1), p. 25-9	1-21
A	McCall C. et al., Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. Vet. Immunol. Immunopathol., 2001, 78(3-4), p. 231-47	1-21
A	Weber E. et al., Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. J. Allergy Clin. Immunol., 2003, 112(1), p. 79-86	1-21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 33/14 (2006.01)	A 6 1 P 33/14	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Q
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,QW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 辻本 元

東京都文京区本郷7丁目3番1号 池乃端宿舎R A 3 6

(72)発明者 岩淵 成紘

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全業工業株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA43 BA53 CA02 CA07 DA02 GA01 GA11
 HA01 HA15
 4B064 AG27 AG31 CA10 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 AC20 BA02 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 DC50 NA14
 ZB131 ZB132 ZB371 ZB372 ZC611
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA50 DA76 DA86 EA22 EA50 FA72
 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新螨过敏原		
公开(公告)号	JPWO2005097996A1	公开(公告)日	2008-02-28
申请号	JP2006512155	申请日	2005-04-07
申请(专利权)人(译)	Nihonzen'yakukogyo有限公司		
[标]发明人	津久井利広 辻本元 岩淵成紘		
发明人	津久井 利広 辻本 元 岩淵 成紘		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/435 C07K19/00 C12N5/10 C12P21/00 C12P21/08 C07K16/18 A61K38/00 A61P37/08 A61P33/14 G01N33/53 C12N1/21 C12N1/19 A61K39/00 A61K39/35 A61K49/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/04 A61P27/14 C12N15/12 C12P21/02 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/35 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/04 A61P27/14 C07K14/43531 G01N33/56905 G01N33/6854		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/435 C07K19/00 C12N5/00.B C12P21/00.C C12P21/08 C07K16/18 A61K37/02 A61P37/08 A61P33/14 G01N33/53.Q C12N1/21 C12N1/19		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB371 4C084/ZB372 4C084/ZC611 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2004116089 2004-04-09 JP		
其他公开文献	JP4733022B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供不含有引起过敏反应的杂质的安全有效的重组螨过敏原，作为螨过敏性疾病的治疗剂或诊断剂。以下(a)或(b)的重组蛋白。(a)删除由SEQ ID NO: 2或35表示的氨基酸序列组成的蛋白质(b)删除由SEQ ID NO: 2或35表示的氨基酸序列中的1个或几个氨基酸，包括被取代或添加的氨基酸序列，具有螨过敏原活性的蛋白质

N末端序列: DNRDDVLKQTEE