

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4733022号
(P4733022)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
請求項の数 26 (全 24 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-512155 (P2006-512155)	(73) 特許権者	591281220 日本全薬工業株式会社 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の 1
(86) (22) 出願日	平成17年4月7日(2005.4.7)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/007191	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(87) 国際公開番号	W02005/097996	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開日	平成17年10月20日(2005.10.20)	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
審査請求日	平成20年2月28日(2008.2.28)	(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
(31) 優先権主張番号	特願2004-116089 (P2004-116089)		最終頁に続く
(32) 優先日	平成16年4月9日(2004.4.9)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 新規ダニアレルゲン

(57) 【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と90%以上の同一性を有する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
- (b) 配列番号35で表わされるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有する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】

コナヒョウヒダニ(Dermatophagoides farinae)由来のダニアレルゲンであって、以下の(i)~(iv)の特性を有するダニアレルゲン：

- (i) SDS-PAGEで測定した場合に150kDa~200kDaの分子量を有する；
- (ii) N末端アミノ酸配列が配列番号19に表される；
- (iii) 配列番号4及び10で表される部分アミノ酸配列を有する；及び
- (iv) コナヒョウヒダニ抗原に対するIgEに反応する。

【請求項4】

配列番号35で表わされるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を

含み、かつダニアレルゲン活性を有する、請求項 3 記載のダニアレルゲン。

【請求項 5】

さらに、以下の特性(v)を有する請求項 3 又は 4 に記載のダニアレルゲン：

(v) 等電点電気泳動及びSDS-PAGEの 2 次元電気泳動を行った場合に、分子量が150kDa ~ 250kDaで、pHが4.5のスポットに検出される。

【請求項 6】

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と 90%以上の同一性を有する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

10

【請求項 7】

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 3 5 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 3 5 で表わされるアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有する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 8】

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とストリンジェ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

20

【請求項 9】

以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。

(c) 配列番号 3 4 で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号 3 4 の塩基配列を含むDNAと相補的な配列を含むDNAとストリンジェ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 10】

請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載のダニアレルゲンをコードするDNAを含む遺伝子

【請求項 11】

請求項 8 または 9 に記載の遺伝子によりコードされる、組換えダニアレルゲン。

30

【請求項 12】

請求項 6 から 10 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 13】

請求項 1 または 2 に記載の組換え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 14】

請求項 3 から 5 のいずれか 1 項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 15】

請求項 12 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。

40

【請求項 16】

請求項 15 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 17】

請求項 15 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。

【請求項 18】

50

請求項 1 または 2 に記載の組換えダニアレルゲンまたは請求項 1 3 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 1 9】

請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載のダニアレルゲンまたは請求項 1 4 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 2 0】

請求項 1 または 2 に記載の組換えダニアレルゲンまたは請求項 1 3 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 2 1】

請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載のダニアレルゲンまたは請求項 1 4 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。

10

【請求項 2 2】

請求項 1 または 2 に記載の組換えダニアレルゲンに対するモノクローナル抗体。

【請求項 2 3】

請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載のダニアレルゲンに対するモノクローナル抗体。

【請求項 2 4】

請求項 1 1 に記載の組換えダニアレルゲンに対するモノクローナル抗体。

【請求項 2 5】

請求項 2 2 から 2 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いる屋内塵中の請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載のダニアレルゲンの免疫学的測定方法。

20

【請求項 2 6】

ELISAである請求項 2 5 記載の屋内塵中の請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載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。

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 - 28 kD の糖蛋白 (pI 4.6 ~ 7.2)、及び / 又は分子量 14.5 - 20 kD 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)。

40

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 Der p 1 (分子量: 25, 371) 及び Der p 2 (分子量: 14, 131) が、またコナヒョウヒダニの主要アレルギーである Der f 1 (分子量: 25, 191) 及び Der f 2 (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)。これらのアレルギーについて組換えアレルギーも作製されてお

50

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 f 3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、ma 10, ma 3, ma 15, ma 29, ma 44, ma 50, ma 113, ma 114, ma 115(特許文献1を参照)も報告されといる。さらに、抗Der f 2血清と強い交差反応性を示す、ma 124も報告されている(特許文献2を参照)。

また、イヌにおいて98kDaと109kDaのDer f 15(非特許文献17を参照)及び60kDaのDer f 18(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。

【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)

【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)

【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)

10

20

30

40

50

【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)

【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。

10

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。

20

[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、

(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

30

[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ент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、

[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、

40

[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、

[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、

50

[1 2] [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、
 [1 3] [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、
 [1 4] [1] に記載のダニアレルゲンに対する抗体、
 [1 5] モノクローナル抗体である [1 4] のダニアレルゲンに対する抗体、
 [1 6] [1 5] のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、
 [1 7] [1 4] から [1 6] 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
 [1 8] E L I S A である [1 7] の屋内塵中のダニアレルゲンの免疫学的測定方法。

10

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2 0 0 4 - 1 1 6 0 8 9 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 F c R I 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 F c R I 鎖の I g E 結合性を示す図である。

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

図 4 は、リコンビナントイヌ F c R I 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。

20

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、Z e n 1 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、Z e n 1 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) 。

図 8 - 1 は、Z e n 1 遺伝子の全長 c D N A 塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。

図 8 - 2 は、Z e n 1 遺伝子の全長 c D N A 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) 。

30

図 8 - 3 は、Z e n 1 遺伝子の全長 c D N A 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、Z e n 1 遺伝子の全長 c D N A 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 Z e n 1 の S D S - P A G E の結果を示す写真である。

図 1 0 は、抗 Z e n 1 ポリクローナル抗体のウエスタンブロット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 Z e n 1 を、レーン 2 はダニ虫体の結果を表す。

図 1 1 は、リコンビナント Z e n 1 の I g E 反応性を E L I S A にて解析した結果を示す図である。

40

【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 Z e n 1 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 I g E 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 I g E を含む血清、ダニ抽出物およびアレルゲン特異的 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トティングよりダニアレルゲンを同定すればよい。アレルゲン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ゲンである Z e n 1 タンパク質は

50

、分子量150kDa~200kDaのタンパク質である。

同定されたダニアレゲンの単離は、電気泳動を行い、ダニアレゲンのスポットからダニアレゲン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。

抽出したダニアレゲンを用いて、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*de novo sequencing*やペプチドマッピングがある。

(2) RT-PCRによるcDNAクローンの作製

ダニよりmRNAを抽出し、該mRNAを鋳型にしてダニアレゲンcDNAを合成し、cDNAライブラリーを作製し、スクリーニングすることにより、本発明のダニアレゲンをコードするDNAを得ることができる。

mRNA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。mRNA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mRNA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、ダニアレゲンをコードするcDNA断片を合成する。得られた断片をpGEM(Promega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ケンス法により塩基配列を決定する。

本発明のダニアレゲン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*de novo sequencing*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、ダニアレゲンであるZen1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ゲンを含む。

配列番号1に本発明のダニアレゲンであるZen1タンパク質をコードするZen1遺伝子のDNA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ゲンであるZen1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ゲン活性を有する限り、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もよい。

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、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(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。

10

20

30

40

50

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、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、サザンブロットリ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〕

10

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。

20

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、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。

30

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、-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他に、融合タンパク質として発現したも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。

40

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

50

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20µg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、アレルゲン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

10

20

30

40

50

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と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、血漿中にアレルゲン中和能を持つ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。アレルゲン感受性とこの遮断抗体価から、ダニアレルギ-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。

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-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ゲンタンパクとしての機能を確定させることができる。

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

イヌ高親和性IgEレセプター鎖(FcRI)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100µg/mLを含有するLB培地中、37°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FcRI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FcRI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-FcRI)を得た。得られた精製GST-FcRI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1.0µg、つぎに0.1µg、0.05µg、0.025µg、0.0125µg、0.00625µgと2倍階段希釈で固相化し、精製GST-FcRI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)4.0µg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-FcR

10

20

30

40

50

I 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-Fc RI 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)。さらにコナヒョウダニ抽出抗原 (GREER社製) 4.0 μg をイムノプレート (ナルジェヌンク社製) に固相化し、コナヒョウダニ抽出抗原を免疫したイヌ血清を反応させた。本 GST-Fc RI と56 にて1時間熱処理したコナヒョウ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-Fc RI 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 にて1時間処理しないものを、「+」は56 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Fc RI 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。コナヒョウダニ抽出抗原液100.0 μLに -メルカプトエタノールを終濃度50.0 μL/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 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 (PAGEL; ATTO社製) にアプ
ライシ、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Fc RI 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

【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アンIEFセル (BIO-RAD社製) を用いて実施した。コナヒョウダニ抽出抗原 (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 μL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, 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った。まず、STEP1 (250V, 20分, 20) にて過剰の塩類を除く操作を行い、STEP2にて6時間かけて電圧を250Vから10,000Vまで上昇させた。STEP3にて電圧10,000V、トータルボルトアワー値60,000Vh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S

40

50

DS - PAGE 平衡化バッファ-I (6 M 尿素、0.375 M Tris pH 8.8、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、DS - PAGE 平衡化バッファ-II (6 M 尿素、0.375 M Tris pH 8.8、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135V、最終電圧値400V)でおよそ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Tween20を加えたもの))中で4時間一晩放置した。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FcRII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150kDa~250kDaの間で、pHがおよそ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

【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。

40

【表 1】
表 1

部分配列 415	: MKSLLINEANELLK
部分配列 445	: SAQDVLEK
部分配列 847	: FMQSLLNEADELLR
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	: KFQSLLNEAN
部分配列 23-2	: IAHLESE(T)
部分配列 24	: KFQSLLN(E)A
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	: MFQSLLNKADFD
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、HPG1005A 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 2.0 L 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 1.0 g を Fast Track 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 100 ng を鋳型とし、cDNA 合成キット (ReverTraAce - - ; 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、1.0 μg 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 1,000 bp を、また 491-2 (5' - RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT - 3' (配列番号 29) : 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 880 bp の DNA 断片を得た。

30

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 シーケンサー (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 1020 bp 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1.0µLとり、GeneRacer (登録商標) Kitに付属の5'及び3'用プライマーを各3.0µL、dNTPミックス溶液(10mM each)を1.0µL、Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH社製)に付属の10×cDNA PCR reaction bufferを5.0µL、Advantage cDNA polymerase Mixを1.0µL、10µM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1.0µL加え、滅菌蒸留水にて50.0µL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℃にて1分間熱変性処理した後、94℃で30秒間、72℃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℃で30秒間、70℃で4分間を1サイクルとしたものを5回行い、最後に94℃で30秒間、68℃で4分間を1サイクルとしたものを25回行った後、4℃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1.0mL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1.0µL、dNTPミックス溶液(10mM each)を1.0µL、Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH社製)に付属の10×cDNA PCR reaction bufferを5.0µL、Advantage cDNA polymerase Mixを1.0µL、10µM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1.0µL加え、滅菌蒸留水にて50.0µL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℃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50µg/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50µg/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シークエンス(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100µg/mLを含有するLB 20
培地中、37℃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、この可溶化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℃にて20時間反応させることによりGSTと 30
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)。

【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(ナルジェヌック社製)にリコンビナントZen1 1.0µg及びコナヒョウヒダニ抽出抗原 40
(GREER社製)4.0µg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℃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)100µLを各ウェルに添加、37℃10分間反応させた。酵素反応は各ウェルに100µLの0.32%フッ化ナトリウム溶液を添加して停止させた。各ウェルの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。 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 µg/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にメルカプトエタノールを終濃度50.0 µL/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 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 L; 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(Hyb ond-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Twe en 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分間洗淨したのち、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分間洗淨を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(Hyper film 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。

【実施例16】

リコンビナントZen1のIgE反応性の解析

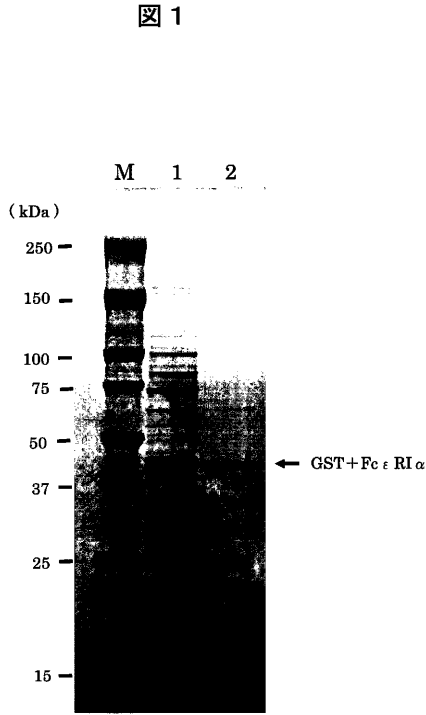
実施例14において精製したリコンビナントZen1のアレルゲン性の評価をELISAにて実施した。イムノプレート(ナルジェヌンク社製)にリコンビナントZen1 1.0 µgを固相化し、ブロッキング液(10% FBS添加PBSに終濃度0.05%になるようにTwe en 20を加えたもの)にて37 で1時間ブロッキングした後、9頭のコナヒョウヒダニ陽性イヌ血清(コナヒョウヒダニ抗原液(GREER社製)を生理食塩水にて50倍に希釈したものをを用いた皮内反応によりコナヒョウヒダニに陽性を呈したイヌ血清)と陰性コントロールイヌ血清を反応させ、ピオチン標識したGST-Fc RI を加え、さらにペルオキシダーゼ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 RI 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)。

【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 】

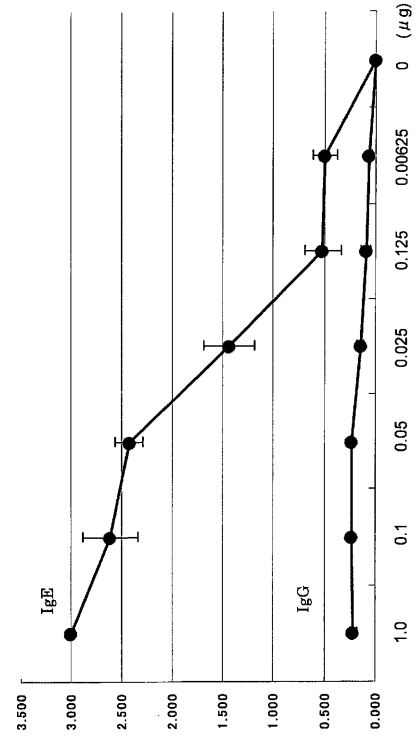
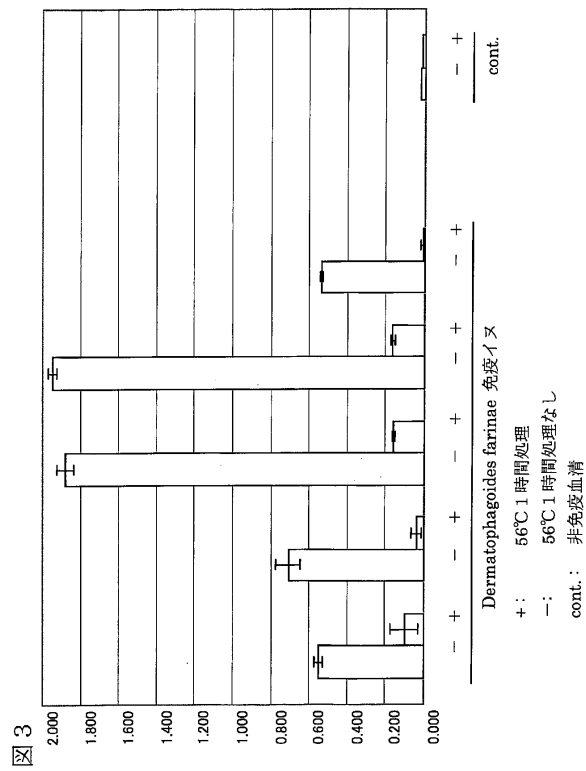
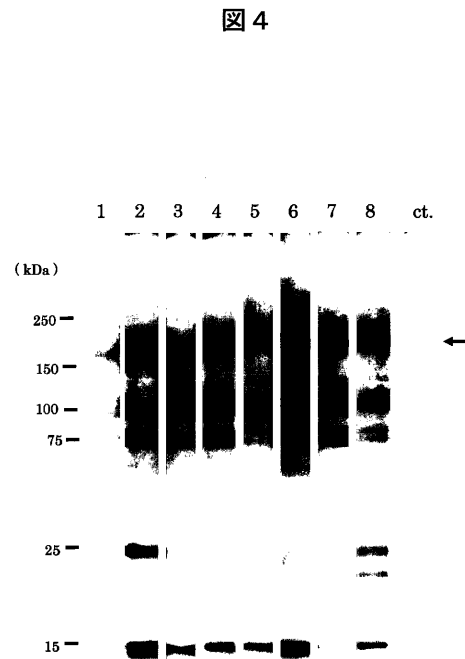


図 2

【 図 3 】

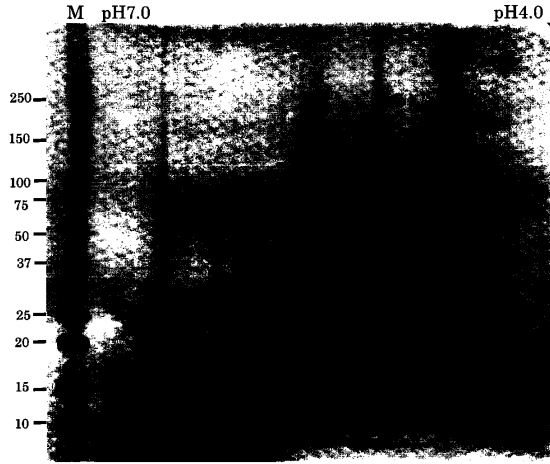


【 図 4 】



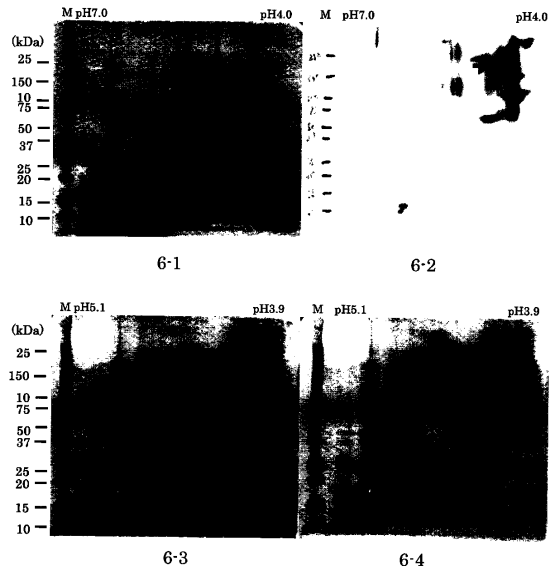
【 図 5 】

図 5



【 図 6 】

図 6



【 図 7 - 1 】

図 7 - 1

gac gat gta tta aag cag act gag gag 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 aaa gat gaa 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 ttt 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 tca tta ttg aac gaa gct 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 acg gaa cag aca acc cca act cct gaa cca aca 288
 Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr
 85 90 95

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

act acc aaa 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

cag gac cgc tac caa aac ccc cga cag cta cca aaa cac cag 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 aaa 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 aaa acc ccc gaa cag act acc aaa 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 aaa 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 aaa aca cag gaa cca tca acc 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 cag gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt 816
 Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu
 260 265 270

att aaa 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 aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tca 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 aaa 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 etc ctg aa 1022
 Asn Glu Leu Leu
 340

【 8 - 1 】

8 - 1

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

ggt att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa 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 att asa 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 asa 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 gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa aat 240
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aaa 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 gct 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 cca aca aca 384
Thr 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 aaa acc ccc gaa cgg act acc aaa aca 432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr
130 135 140

【 8 - 3 】

8 - 3

aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa 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 gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa 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 gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat 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 aaa atg ttc caa 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 cgg 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 - 2 】

8 - 2

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

cgg act acc aaa 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 aaa aca cgg gaa cca aca aca cca act cct gaa cgg act acc aaa 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 aaa 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 caa aac ccc cga cgg cta cca aaa 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 gga cgg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act 720
Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
225 230 235 240

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

【 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 tog aat 1392
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn
450 455 460

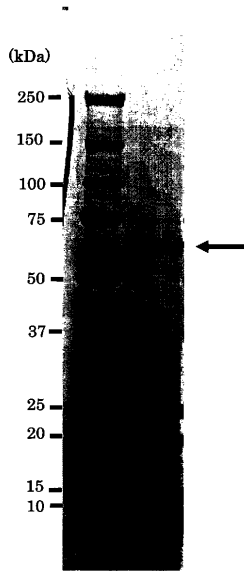
agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa 1440
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu
465 470 475 480

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

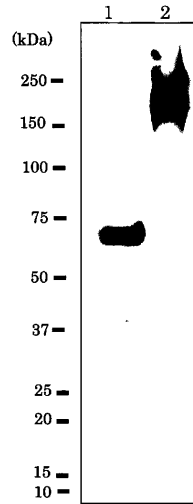
【 9 】

9

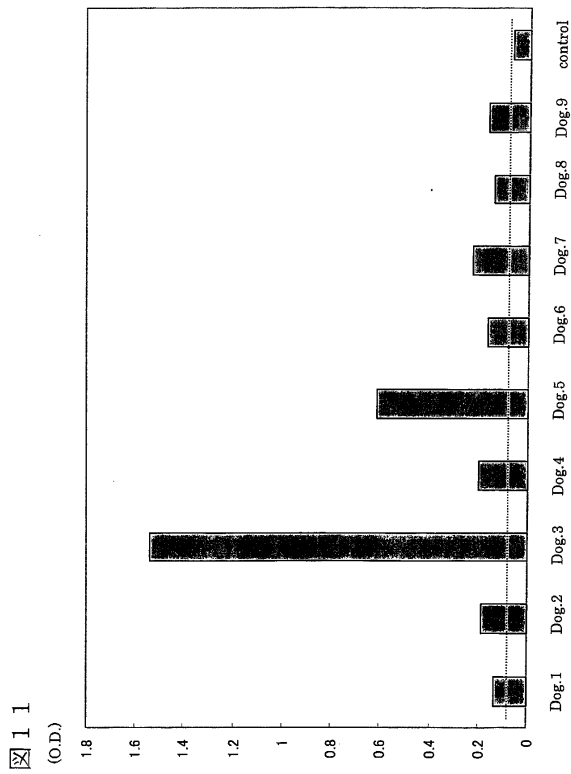


【 10 】

10



【 11 】



【配列表】

0004733022000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/08
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/18
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> 37/02
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 37/08
<i>A 6 1 P</i>	<i>33/14</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i> 33/14
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/53
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/21
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/19
			Q

(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 日本全薬工業株式会社内

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 Am.J.Vet.Res.,2001,62(9),p.1344-8

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

WPI

BIOSIS(DIALOG)

专利名称(译)	新螨过敏原		
公开(公告)号	JP4733022B2	公开(公告)日	2011-07-27
申请号	JP2006512155	申请日	2005-04-07
申请(专利权)人(译)	Nihonzen'yakukogyo有限公司		
当前申请(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 C12P21/02 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 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 C12N5/00.102 C12P21/02.C C12P21/08 C07K16/18 A61K37/02 A61P37/08 A61P33/14 G01N33/53.Q C12N1/21 C12N1/19		
优先权	2004116089 2004-04-09 JP		
其他公开文献	JPWO2005097996A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供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，其不含过敏性诱导杂质。提供以下重组蛋白(a)或(b):(a)包含SEQ ID NO:2或35所示氨基酸序列的蛋白质;或(b)包含通过缺失，取代或添加一个或几个氨基酸并具有螨过敏原活性而衍生自SEQ ID NO:2或35所示氨基酸序列的氨基酸序列的蛋白质。

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

(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