

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-168506

(P2005-168506A)

(43) 公開日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	K	4 B O 6 4
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10		4 C O 8 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08		4 H O 4 5
C O 7 K 14/37	C O 7 K 14/37		
審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 72 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2004-368355 (P2004-368355)	(71) 出願人	302019245
(22) 出願日	平成16年12月20日 (2004.12.20)		タカラバイオ株式会社
(62) 分割の表示	特願平9-521926の分割		滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
原出願日	平成8年12月10日 (1996.12.10)	(74) 代理人	100095832
(31) 優先権主張番号	特願平7-346627		弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成7年12月12日 (1995.12.12)	(72) 発明者	竹迫 一任
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		滋賀県大津市秋葉台4丁目20番208号
(31) 優先権主張番号	特願平8-257612	(72) 発明者	大門 尚志
(32) 優先日	平成8年9月5日 (1996.9.5)		京都府相楽郡木津町木津川台2丁目2番5号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	八木原 朋子
(31) 優先権主張番号	特願平8-257613		滋賀県彦根市中藪町601番地1号
(32) 優先日	平成8年9月5日 (1996.9.5)	(72) 発明者	黒田 正伸
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		滋賀県大津市瀬田2丁目1番15号
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マラセチア由来の抗原性蛋白質

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質として精製されたマラセチアアレルギー、好ましくはマラセチアアレルギー患者に対する主要アレルギーを提供し、それらの蛋白化学的な性質を明らかにする。

【解決手段】 マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有する、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な単離された抗原性蛋白質であって下記 (1)、(2) からなる群より選択される抗原性蛋白質： (1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質： (a) 特定なる配列の部分アミノ酸配列を有する蛋白質、 (b) 還元条件下の分子量約 2 万 (SDS-PAGE)、 (c) 非還元条件下の分子量約 4 万 (SDS-PAGE)、 (d) 未変性下の等電点約 4.8、 (e) 8 M 尿素変性下の等電点約 5.8 (2) 特定なる配列のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも 1 つを生じさせた配列からなる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質であって、下記(1)及び(2)からなる群より選択される抗原性蛋白質。

(1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質

- (a) 配列表の配列番号：46、47又は48に示す部分アミノ酸配列を有する蛋白質
- (b) 還元条件下の分子量約20000 (SDS-PAGE)
- (c) 非還元条件下の分子量約40000 (SDS-PAGE)
- (d) 未変性下の等電点約4.8 および
- (e) 8 M 尿素変性下の等電点約5.8、

10

(2) 配列表の配列番号：9に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列からなる抗原性蛋白質

【請求項 2】

マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質であって、下記(1)及び(2)からなる群より選択される抗原性蛋白質。

(1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質

- (a) 配列表の配列番号：49、50又は51に示す部分アミノ酸配列を有する蛋白質
- (b) 還元条件下の分子量約27000 (SDS-PAGE)
- (c) 非還元条件下の分子量約27000 (SDS-PAGE)
- (d) 未変性下の等電点約5.2 および
- (e) 8 M 尿素変性下の等電点約6.5、

20

(2) 配列表の配列番号：10に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列からなる抗原性蛋白質

【請求項 3】

マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質であって、下記(1)及び(2)からなる群より選択される抗原性蛋白質。

30

(1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質

- (a) 配列表の配列番号：52に示す部分アミノ酸配列を有する蛋白質
- (b) 還元条件下の分子量約26000 (SDS-PAGE)
- (c) 非還元条件下の分子量約26000 (SDS-PAGE)
- (d) 未変性下の等電点約5.2 および
- (e) 8 M 尿素変性下の等電点約6.3、

(2) 配列表の配列番号：11に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列からなる抗原性蛋白質

40

【請求項 4】

マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質であって、下記(1)及び(2)からなる群より選択される抗原性蛋白質。

(1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質

- (a) 配列表の配列番号：53に示す部分アミノ酸配列を有する蛋白質
- (b) 還元条件下の分子量約66000 (SDS-PAGE)
- (c) 8 M 尿素変性下の等電点約6.1、

(2) 配列表の配列番号：12に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列か

50

らなる抗原性蛋白質

【請求項 5】

マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質であって、下記(1)及び(2)からなる群より選択される抗原性蛋白質。

(1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質

(a) 配列表の配列番号：54 に示す部分アミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 還元条件下の分子量約 43000 (SDS-PAGE)

(c) 8M 尿素変性下の等電点約 6.2、

(2) 配列表の配列番号：13 に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列からなる抗原性蛋白質

【請求項 6】

マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質であって、下記(1)及び(2)からなる群より選択される抗原性蛋白質。

(1) 下記理化学的性質を有する抗原性蛋白質

(a) 配列表の配列番号：55 に示す部分アミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 還元条件下の分子量約 15000 (SDS-PAGE)

(c) 8M 尿素変性下の等電点約 6.0、

(2) 配列表の配列番号：14 に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせた配列からなる抗原性蛋白質

【請求項 7】

請求項 1~6 いずれか記載の抗原性蛋白質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 7 記載のポリヌクレオチドに 0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール 400、0.01% 変性サケ精子 DNA を含む 6xSSC 中、50 で 12~20 時間インキュベートした後、0.5% SDS を含む 0.1xSSC 中、50 で洗浄する条件においてハイブリダイズ可能であり、かつマラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有する抗原性蛋白質をコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入した細胞で発現された抗原性蛋白質を単離する工程を包含する、マラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有する抗原性蛋白質の製造方法。

【請求項 10】

請求項 1~6 いずれか記載の抗原性蛋白質に対する抗体。

【請求項 11】

請求項 1~6 いずれか記載の抗原性蛋白質を有効成分とすることを特徴とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の診断薬。

【請求項 12】

請求項 1~6 いずれか記載の抗原性蛋白質を有効成分とすることを特徴とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の治療薬。

【請求項 13】

請求項 1~6 いずれか記載の抗原性蛋白質をマラセチアアレルゲンの標準品とし、該抗原性蛋白質に対する抗体を用いてマラセチアアレルゲンの免疫学的定量を行うことを特徴とする、マラセチアアレルゲンの定量方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、マラセチア菌を原因菌とするアレルギー疾患及び感染症の診断、治療、予防に利用可能な、マラセチア菌より単離精製された新規な抗原性蛋白質、その抗原性断片、該抗原性蛋白質又は抗原性断片に対する抗体等に関する。

【0002】

さらに、本発明は、組換えマラセチア抗原性蛋白質、該抗原性蛋白質をコードする遺伝子、さらにその蛋白質のエピトープ等に関する。

【背景技術】

【0003】

アレルギー疾患の多くは、その疾患の原因抗原に感作されることにより、血清および組織で抗原（アレルゲン）に特異的なIgE抗体（レアギン抗体）が産生され、再びその抗原に暴露されることにより、肥満細胞又は好塩基球と結合したIgEと特異的なアレルゲンが組み合わさると、IgEが細胞表面上で架橋し、IgE-抗原相互作用の生理学的効果を生ずる。これらの生理学的効果としては、ヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、好酸球遊走因子又は各種ロイコトリエン等の放出が挙げられる。そして、それにより長期間の気管支平滑筋の収縮を起こす。放出されたこれらの物質は、ケミカルメディエーターであり、IgEと特定のアレルゲンの組み合わせにより起こるアレルギー症状を惹起する。アレルゲンの効果はそれらを通じて現れる。これらの効果は抗原が体内に入る経路及び肥満細胞又は好塩基球上にIgEが沈着するパターンに依存して全身的又は局所的に起こり得る。局所的な症状は一般にアレルゲンが体内に入った位置の上皮表面に起こる。全身的効果は、血管内の抗原へのIgE-好塩基球応答の結果であり、アナフィラキシーショックがその典型である。これらの一連の反応において重要な働きをしているのが、ヘルパーT（Th）細胞である。抗原刺激により活性化されたTh細胞の産生する種々のサイトカインのうち、IL4はIgE産生を促進する。

【0004】

ヒトにアレルギー症状を惹起させる物質は多岐にわたっており、これまでアレルゲンは、花粉あるいは室内塵に代表される多くの物質の集合体として扱われていた。近年になって、分離精製技術及びアレルゲン活性評価法が進展した結果、アレルゲンは単独あるいは数種の主要な物質がその本体であることが明らかとなった。特に、スギ花粉、ダニ、ネコアレルゲン等において急速な進歩を遂げ、スギ花粉よりCry j 1、Cry j 2、ダニよりDer f 1、Der f 2、Der f 3、ネコよりFel d 1といった主要アレルゲンが単離されている。更に、それらのアレルゲン蛋白質をコードする遺伝子も単離され、遺伝子工学的手法により純粋なアレルゲン蛋白質を大量に調製することが可能になっている。

【0005】

アレルギー疾患の診断においては、まず原因となっている抗原を同定する必要があるため、そのためにまず100種を超える市販の抗原エキス、時には自製のものについて、疑わしい抗原エキスを用いて皮内テストにより試験を行っている。原因抗原としての可能性の高い抗原が見つかり、RAST法等による血清中のIgE抗体価の測定、誘発テスト、又は全血やリンパ球を用いたヒスタミン遊離試験により抗原を特定することができる。しかし、これらの抗原エキスには明確な力価が規定されていないため、使用の際にはアナフィラキシー誘発の危険性を伴うため注意が必要である。アレルギー疾患の治療法としては、抗ヒスタミン薬、ステロイド性抗炎症薬、メディエーター遊離抑制薬などが使用されているが、診断により特定された抗原を用いた減感作療法が優れた治療法である。しかし、現在の減感作療法は抗原液を週1~2回、少量ずつ皮内に投与し3~4ヶ月かけて増量し、維持量に上げ、更に1~3年投与し続ける必要がある。増量が容易であれば、優れた治療効果をより容易に得られることが期待できる。しかし、前記のように使用する抗原の力価がはっきりしないため、更にその抗原が多く不純物を伴っているため、重篤な副作用が起こることがあり、使用に大きな制限がある。

【0006】

マラセチア（*Malassezia*、以下、M.と略す）属に属する菌としては、*M. furfur*（*Pityr* 50

osporum ovale や *Pityrosporum orbiculare* と呼ばれている), *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*等が知られている。マラセチアは各種動物やヒトの体表に常在しているといわれており、その病原性及びアレルギー疾患における役割については、古くから研究されてきた。病原性については、皮膚炎、癬風、毛包炎、フケなどの原因菌として疑われている。また、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患との関連も疑われており、原因菌として関わっている可能性が高い。

【0007】

現在、マラセチア由来の抗原エキスが市販されているが、これらは *M. furfur* (以下、*M. ファーフア*と記す)の培養物より得られた未精製または部分精製物であり、当然、蛋白質、糖、脂質を始めとする複雑な混合物であると考えられる。

10

【0008】

従来、このようにして得られた抗原エキス中に含有されるマラセチア由来のアレルゲン性蛋白質としては、マラセチア菌由来の粗抽出物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)により分離後、アレルギー患者の血清中 IgE 抗体を用いたイムノブロッティングにより検出される、87, 76, 67, 45, 37, 28, 25, 14, 13 kDa等の多くの IgE 結合性蛋白質がアレルゲン性物質として報告されている (非特許文献 1~3)。このようにマラセチア菌の生産する蛋白質は、非常に多岐にわたるため、SDS-PAGEによる分離だけでは不十分であり、従来報告されている SDS-PAGEにおける単一の蛋白バンドが、均一の蛋白質であるとは到底考えられない。すなわち、SDS-PAGE上、同一の蛋白バンドを示す蛋白質は通常複数個存在するため、IgE 結合性蛋白質が単一の蛋白バンドを示したとしても、そのバンド中に含まれる他の多くの蛋白質と分離する必要がある。そのためには他の効果的な分離方法を組み合わせる必要がある。更に、診断、治療の目的で利用されるためには、抗原性蛋白質を単離し、複数の患者血清を用いて、抗原性を明らかにすること、主要アレルゲンであることを明らかにすること、さらに蛋白化学的に品質を明確にした抗原性蛋白質を供給するための製造法を確立する必要がある。そのため、各種クロマトグラフィーによる分離、抗原活性の測定を繰り返し、均一かつ単一の抗原性蛋白質を単離する必要があり、最終的に得られた蛋白質については、SDS-PAGEの単一性のほかに、イオン交換クロマトグラフィーによる単一性、等電点電気泳動的な単一性を確認する必要がある。

20

【0009】

しかしながら、前記各種の報告によればそれらの SDS-PAGE 上で観察される物質は、まるで各々単一の IgE 結合性蛋白質であるかのように扱われている。しかし、実際にはそれらの単離精製には誰も成功しておらず、そのバンドがいかに相互に無関係の、また多くの蛋白質の混合物であるかについては、全く考察されていない。従って、当然、その複雑な混合物の中から IgE 結合性蛋白質を単離し、さらに単離された蛋白質としてアレルギー患者血清を用いて抗原性の確認を行おうとした例は全くない。さらに、その蛋白化学的性質、アミノ酸配列に関しては全く報告されていない。そのため、上記の報告に見られる IgE 結合性蛋白質相互の異同、関連性 (一方が他方のプロテアーゼによる分解物である等)等については全く不明である。

30

【0010】

このように、マラセチア菌は、アトピー性皮膚炎を始めとするアレルギー性疾患の原因真菌として注目されているにも関わらず、それらの複雑な蛋白質混合物である粗抽出物から IgE 結合性蛋白質の単離精製には誰も成功していない。もちろん、単離された蛋白質としてアレルギー患者血清を用いた抗原性の確認は行われていない。さらに、その蛋白化学的性質、アミノ酸配列に関しては全く報告されていない。また、その蛋白質をコードする遺伝子の単離の報告例もない。

40

【0011】

【非特許文献 1】Siv Johansson ら, *Acta Derm Venereol*, 71巻, 11-16 頁, 1991年

【非特許文献 2】E. Jensen-Jarolim ら, *J. Allergy Clin Immunol*, 89 巻, 44-51 頁, 1992年

【非特許文献 3】Zargari ら, *Allergy*, 49 巻, 50-56 頁, 1994年

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

原因菌の可能性を診断するためには、微生物学的培養試験の他、上記のようなマラセチア菌体抽出物である粗抗原を用いた皮膚試験、誘発試験、RAST法やヒスタミン遊離測定などによる各種IgE抗体の定量試験、等により診断が行われている。しかし、この粗抗原は多種類の不純物を含んでいるため、正確な診断ができない。また、皮膚試験、誘発試験に用いる際、副作用等が生ずる危険性がある。さらに、アレルギー疾患の有用な治療法である減感作療法に使用するためには、アナフィラキシー誘発の危険性を伴うため、この粗抗原の投与量が極度に制限され、治療効果を期待できず、また、感染防御のためにワクチンとして利用することも難しい。現在までのところ、このマラセチア由来の精製された、純粋な抗原の単離に成功した例はなく、マラセチア菌による感染やアレルギー疾患の診断、治療に非常に大きな困難が生じている。

10

【0013】

従って、かかる現状を考慮し、本発明は次の目的を達成するものである。

(1) 本発明の第1の目的は、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質、すなわち精製されたマラセチアアレルギー、好ましくはマラセチアアレルギー患者に対する主要アレルギーを提供し、それらの蛋白質化学的な性質を明らかにすることにある。さらに、該抗原性蛋白質と免疫学的に同等の性質を有する機能的同等の抗原性蛋白質をも提供することにある。

20

【0014】

(2) 本発明の第2の目的は、これらの精製された抗原性蛋白質に含まれる抗原エピトープを有する抗原性断片を提供することにある。

【0015】

(3) 本発明の第3の目的は、前記の抗原性蛋白質又は抗原性断片に対する抗体又は抗体断片を提供することにある。

【0016】

(4) 本発明の第4の目的は、前記の抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とする、マラセチアを原因菌とするアレルギー疾患等の疾病の診断薬を提供することにある。

【0017】

(5) 本発明の第5の目的は、前記の抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とする、マラセチアを原因菌とするアレルギー疾患等の疾病の治療薬を提供することにある。

30

【0018】

(6) 本発明の第6の目的は、マラセチアアレルギーの免疫学的定量方法を提供することにある。

【0019】

(7) 本発明の第7の目的は、前記(1)の精製抗原性蛋白質と同等の免疫学的性質を有する新規な組換えマラセチア抗原性蛋白質を提供することにある。

【0020】

(8) 本発明の第8の目的は、新規な組換えマラセチア抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供することにある。

40

【0021】

(9) 本発明の第9の目的は、組換えマラセチア抗原性蛋白質に含まれる抗原エピトープを有する抗原性断片を提供することにある。

【0022】

(10) 本発明の第10の目的は、前記組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片に特異的に結合する抗体又は抗体断片を提供することにある。

【0023】

(11) 本発明の第11の目的は、前記ポリヌクレオチドとハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又は合成オリゴヌクレオチドプライマーを提供することにある。

50

【 0 0 2 4 】

(1 2) 本発明の第 1 2 の目的は、前記組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の診断薬を提供することにある。

【 0 0 2 5 】

(1 3) 本発明の第 1 3 の目的は、前記組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の治療薬を提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 6 】

本発明者らは、アレルギー患者の診断、治療に有用なマラセチアアレルゲンの単離を目的として、マラセチア属に属する一菌株である M . フェーファ T I M M 2 7 8 2 の菌体内の成分に着目し、菌体抽出物である粗抗原を用いた皮膚テスト陽性で、R A S T 陽性の患者血清を用いて探索した結果、M F - 1 ~ 1 3 と命名した 1 3 種の抗原性蛋白質の単離に成功すると共に、これらの抗原性蛋白質のいくつかについては部分アミノ酸配列の決定にも成功した。そして、単離されたマラセチア抗原性蛋白質の部分アミノ酸配列の情報をもとに合成したプライマーとなるポリヌクレオチドを用いて、M . フェーファ細胞の m R N A 由来の c D N A を材料としてポリメラーゼ・チェイン・リアクション (P C R) を行い、目的とするマラセチア抗原性蛋白質をコードする遺伝子の一部を得た。次に、この P C R 断片の全部または一部をプローブとして用い、M . フェーファ細胞の c D N A ライブラリーより目的とする遺伝子を単離した。また、M F - 1 のアミノ酸配列を基にオーバーラッピングペプチドを合成し、これを用いて患者血清の I g E 抗体に対するエピトープの検索、M F - 1 モノクローナル抗体に対するエピトープの検索を行い、T 細胞エピトープ及び B 細胞エピトープを見出すことができることを明らかにし、本発明を完成した。

10

20

【 0 0 2 7 】

即ち、本発明の 1 の態様は、アレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質又はその抗原性断片に関する。

【 0 0 2 8 】

本発明の他の態様は、本発明の単離精製された抗原性蛋白質と同等の免疫学的性質を有することを特徴とする組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片に関する。

30

【 0 0 2 9 】

本発明の他の態様は、本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片をコードするポリヌクレオチドに関する。

【 0 0 3 0 】

本発明の他の態様は、本発明の単離精製された抗原性蛋白質又はその抗原性断片、あるいは本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片に対する抗体又は抗体断片に関する。

【 0 0 3 1 】

本発明の他の態様は、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又は合成オリゴヌクレオチドプライマーに関する。

40

【 0 0 3 2 】

本発明の他の態様は、本発明の単離精製された抗原性蛋白質又はその抗原性断片、あるいは本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片を有効成分とすることを特徴とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の診断薬に関する。

【 0 0 3 3 】

本発明の他の態様は、本発明の単離精製された抗原性蛋白質又はその抗原性断片、あるいは本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片を有効成分とすることを特徴とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の治療薬に関する。

【 0 0 3 4 】

50

本発明の他の態様は、本発明の単離精製された抗原性蛋白質又は本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質をマラセチアアレルゲンの標準品とし、該抗原性蛋白質に対する抗体を用いてマラセチアアレルゲンの免疫学的定量を行うことを特徴とする、マラセチアアレルゲンの定量方法に関する。

【発明の効果】

【0035】

本発明により、単離されたマラセチア由来の高純度の精製抗原性蛋白質、これらに由来する抗原性断片、およびこれらの抗原性蛋白質又は抗原性断片に対する特異的抗体を提供することができる。また、これらの抗原性蛋白質、抗原性断片を有効成分とするマラセチアアレルギー疾患の診断薬、治療薬、予防薬を提供することができる。

10

さらに、本発明により、新規な組換えマラセチア抗原性蛋白質及びそれをコードする遺伝子、並びに該蛋白質のエピトープなどが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

以下に本発明について詳細に説明する。

(1) 本発明の精製抗原性蛋白質及びそれに機能的同等の抗原性蛋白質

本発明の抗原性蛋白質は、アレルギー疾患患者由来のIgE抗体に対して結合能を有することを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の実質的に純粋な、単離された抗原性蛋白質(以下、単に「マラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質」、あるいは単に「精製抗原性蛋白質」と略す場合がある。)である。ここで「実質的に純粋な、単離された」とは、蛋白質として実質的に均一であり、他の不純な蛋白質を実質的に含まず、SDS-PAGEにおいても等電点電気泳動においても単一な物質として認識される単離された蛋白質であることをいう。

20

【0037】

また、本発明の精製抗原性蛋白質は、マラセチア粗抗原に対して皮膚反応陽性のアレルギー疾患患者が反応する、マラセチア由来の主要アレルゲンであることを特徴とする蛋白質である。

【0038】

また、本発明の精製抗原性蛋白質は、マラセチア属の真菌細胞内に存在する抗原性蛋白質である。

30

【0039】

また、本発明の精製抗原性蛋白質は、アレルギー疾患患者由来のIgE抗体、特にマラセチアアレルギー疾患患者由来のIgE抗体に認識されるエピトープを有することを特徴とする蛋白質である。

【0040】

また本発明の精製抗原性蛋白質を得るのに用いられる菌株としてはマラセチア属に属する菌株であればいかなる菌株でもよく、その具体例としては、例えばM.furfur(マラセチアファーファ)TIMM2782株が挙げられる。該菌株はMalassezia furfur TIMM2782と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所〔あて名；日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)〕にFERM BP-5611(原寄託日；平成7年9月12日、国際寄託への移管請求日；平成8年7月29日)として寄託されている。

40

【0041】

本明細書でいうマラセチア由来の主要アレルゲンとは、マラセチアアレルギー患者(市販のマラセチア粗抗原である抗原エキスに対して皮膚反応陽性のアレルギー疾患患者)の50%以上に反応する、IgE抗体に認識される精製抗原性蛋白質である。

【0042】

本明細書でいうアレルギー疾患患者由来のIgE抗体に対する結合能は、¹²⁵I標識抗IgE血清を用いたRAST法、酵素標識抗IgE血清を用いたDirect-RASTRIA法やELISA法により測定して、標準血清との比較等により有意な結合が得られることをいう。

50

【0043】

本発明のマラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質は、分子量が10000～100000 (SDS-PAGE、還元条件下または非還元条件下)で、等電点(未変性下または8M尿素変性下)が4～10のものであり、マラセチア属の真菌細胞内に存在するものである。具体的には、以下のMF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-5、MF-6、MF-7、MF-8、MF-9、MF-10、MF-11、MF-12、MF-13等が挙げられる。以下、これらについての分子量、等電点、部分アミノ酸配列について述べる。

【0044】

(I) MF-1は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約21kDa、非還元条件下で約40kDaの分子量を示し、未変性下の等電点は約4.8および8M尿素変性下の等電点は約5.3であり、配列表の配列番号：45で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

10

【0045】

(II) MF-2は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約20kDa、非還元条件下で約40kDaの分子量を示し、未変性下の等電点は約4.8および8M尿素変性下の等電点は約5.8であり、配列番号：46、配列番号：47、および配列番号：48で示されるアミノ酸配列を含んでおり、N末端はブロックされている。

【0046】

(III) MF-3は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約27kDa、非還元条件下でも約27kDaの分子量を示し、未変性下の等電点は約5.2および8M尿素変性下の等電点は約6.5であり、配列番号：49、配列番号：50、および配列番号：51で示されるアミノ酸配列を含んでおり、N末端はブロックされている。

20

【0047】

(IV) MF-4は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約26kDa、非還元条件下でも約26kDaの分子量を示し、未変性下の等電点は約5.2および8M尿素変性下の等電点は約6.3であり、配列番号：52で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

【0048】

(V) MF-5は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約66kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約6.1であり、配列番号：53で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

【0049】

(VI) MF-6は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約43kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約6.2であり、配列番号：54で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

30

【0050】

(VII) MF-7は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約15kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約6.0であり、配列番号：55で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

【0051】

(VIII) MF-8は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約30kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約5.4であり、N末端がブロックされている。

40

【0052】

(IX) MF-9は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約40kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約5.3である。

【0053】

(X) MF-10は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約44kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約6.2であり、配列番号：56で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

【0054】

(XI) MF-11は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約45kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約6.4であり、N末端がブロックされている。

50

【0055】

(XII) MF-12は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約100kDaの分子量を示し、8M尿素変性下の等電点は約5.0である。

【0056】

(XIII) MF-13は、SDS-PAGEにより、還元条件下で約16kDaの分子量を示し、未変性下の等電点は約8.1であり、配列番号：57で示されるアミノ酸配列を含んでいる。

【0057】

本発明のマラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質としては、マラセチア由来のヒトを始めとする哺乳類の抗原として認識される蛋白質であればよく、上記に例示した13種類の精製抗原性蛋白質に制限されるものではない。 10

【0058】

更に、これらの精製抗原性蛋白質を用いた診断は、従来のマラセチア粗抗原である抗原エキスをを用いた皮膚試験やRAST法による診断の結果と相関している。即ち、粗抗原を用いた皮膚試験で陽性の患者の多くがマラセチア粗抗原に対するIgE抗体価陽性である。そして、これらの粗抗原に対するIgE抗体価陽性の患者の50%以上が、上記の単離精製された本発明の精製抗原性蛋白質に対して高いIgE抗体価を有している（後述の実施例における表2及び表3を参照）。

【0059】

また、本発明の精製抗原性蛋白質は、マラセチアアレルギー患者に投与した場合、投与された患者のマラセチア菌に対するアレルギー応答を軽減させることができるものである。 20

【0060】

さらに、本発明においては、前記のような精製抗原性蛋白質と免疫学的に同等の性質を有する機能的同等の抗原性蛋白質をも提供する。例えば、上記13種類の精製抗原性蛋白質と免疫学的に同等の性質を有する機能的同等物として、例えば、各種*M. furfur*、更に*M. furfur*以外のマラセチア属真菌の機能的同等物も本発明に含まれる。即ち、MF-2は、ペルオキシゾーム膜蛋白質であるPMP-20〔L. ガラード(L. Garrard)ら、ジャーナルバイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)第23巻、第13929-13937頁(1989年)〕とホモロジーがあり、同様の免疫学的性質を有するマラセチア由来の蛋白質は本発明に含まれる。また、MF-3及びMF-4は異なる蛋白質であるが、いずれも鉄ノマンガン-スーパーオキシドジスムターゼとホモロジーがあり〔T. マツモト(T. Matsumoto)ら、バイオケミストリー(Biochemistry)、第30巻、第3210-3216頁(1991)；M. L. ルドウィッグ(M. L. Ludwig)ら、ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー(J. Mol. Biol.)、第219巻、第335-358頁(1991)〕、またMF-5はジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(DLDH)、MF-6はマレートデヒドロゲナーゼ(MDH)、MF-13はシクロフィリンとそれぞれホモロジーがあり、同様の免疫学的性質を有するマラセチア由来の蛋白質も本発明に含まれる。 30

【0061】

なお、安定性の強化及び/又は所望の反応性の強化、すなわち診断目的からすれば、抗原と抗体の特異的結合を強化し、治療目的からすればアレルギー反応を減弱化または酵素活性を消失させるために、本発明の精製抗原性蛋白質を改変し、誘導体化したり、ポリエチレングリコール(PEG)法〔ヴィー(Wie)ら、インターナショナルアーカイブスオブアレルギーアンドアプライドイムノロジー(Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.)、第64巻、第84-99頁(1981)〕を用いてPEGと結合させることができる。蛋白質の改変には、ピリジルエチル化、還元、アルキル化、アシル化、適当な担体への化学的カップリング、温和なホルマリン処理、又は塩酸グアニジン処理も含まれる。 40

【0062】

(2) 本発明の抗原性断片

本発明の抗原性断片は、前記の精製抗原性蛋白質に含まれる抗原エピトープを有するこ 50

とを特徴とする精製抗原性蛋白質由来の抗原性断片である。例えば、MF - 1、MF - 2、MF - 3、MF - 4、MF - 5、MF - 6、MF - 7、MF - 8、MF - 9、MF - 10、MF - 11、MF - 12、MF - 13等に含まれる抗原エピトープを少なくとも1個含む精製抗原性蛋白質由来の抗原性断片が例示される。なかでも、少なくとも1個のT細胞エピトープ又はB細胞エピトープを含むものが好適なものとして挙げられる。本発明の抗原性断片に、哺乳類、特にヒトにおける免疫応答、例えば最小量のIgEの刺激、IgEの結合、IgG及びIgM抗体の生産の誘起、又は増殖などのT細胞応答及び/又はリンホカイン分泌及び/又はT細胞アナーキー誘導などを引き起こす、マラセチア由来の精製抗原性蛋白質の断片が含まれる。

【0063】

本発明の抗原性断片を治療目的で用いる場合には、T細胞応答性活性化作用が小さいか、又はT細胞アナーキー作用を誘起するものが望ましい。また、本発明の抗原性断片は、マラセチア菌に特異的なIgE抗体に対して実質的に結合能を有しないか、IgE抗体への結合が起こる場合でも、肥満細胞又は好塩基球からヒスタミン等のメディエーターを遊離しないような程度の結合能であるのが好ましい。即ち、IgE抗体への結合が起こる場合でも、該抗原性断片は、マラセチア由来の精製抗原性蛋白質より実質的に低い程度でIgE抗体に結合するものが好ましい。このように本発明の抗原性断片は、治療目的で用いる場合には、精製抗原性蛋白質より少ないIgE賦活活性を有するものが好ましい。従って、マラセチアアレルギー患者に投与した場合、投与された患者のマラセチア菌に対するアレルギー応答を軽減させることができるものである。

10

【0064】

本発明の抗原性断片の抗原性は、ヒトのボランティアへの皮膚試験、皮内試験の他、RAST、ELISA、又はヒスタミン遊離などの試験管内試験においても評価することができる。

20

【0065】

エピトープとは、レセプター、特に抗体(免疫グロブリン)、組織適合性抗原及びT細胞レセプターにより認識される基本的要素又は最小単位であり、エピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸配列を含む。エピトープのアミノ酸配列を模してあり、マラセチアアレルギーに対するアレルギー応答を下げる可以降低のアミノ酸配列もエピトープとして用いることができる。現在利用できる蛋白質の構造に関する情報を用い、マラセチアアレルギー患者に十分な量で投与すると、マラセチア菌に対する患者のアレルギー応答を変えるであろうマラセチアアレルギーペプチドを設計することができる。また、マラセチアアレルギーの患者にアレルギー反応を誘起する作用を阻害することができる試薬又は薬剤を設計することもできる。そのような薬剤は、例えばマラセチアアレルギーに対するIgE抗体に結合し、それによりIgE-アレルギー結合及びその後の肥満細胞からの脱顆粒を妨げるように設計することができる。

30

【0066】

また、T細胞エピトープを含むペプチドの選択は、マラセチアアレルギーに対して感受性の個体(IgE仲介免疫応答を有する個体)から得られたT細胞を含むリンパ球をアレルギー由来のペプチドと共に培養し、例えばトリチウム化チミジンの細胞への取り込み促進作用を測定し、ペプチドに反応してT細胞の増殖が起こるかどうかを決定することによって、ヒトT細胞の刺激活性(幼若化活性)を測定することができる。B細胞エピトープを含むペプチドの選択は、マラセチアアレルギーに対して感受性の個体から得られた血清を用いて、アレルギー由来のペプチドと反応させ、結合したIgE量を測定することにより、IgE結合ペプチドを選択することができる。

40

【0067】

本発明の抗原性断片の範囲内には、マラセチアアレルギーを始めとするマラセチア由来の精製抗原性蛋白質の断片と免疫学的に関連する、例えばその断片に対する特異的な抗体や特異的なT細胞に認識される、交差反応性を有するペプチドも含まれる。

【0068】

本発明の抗原性断片を調製するには、単離された精製抗原性蛋白質を原料として、リジ

50

ルエンドペプチダーゼ、トリプシン等のプロテアーゼによる酵素消化、臭化シアン等による化学的処理による切断後、目的の抗原性を有する断片を蛋白質の精製において既知の方法により単離精製することにより得ることができる。また、マラセチア由来の抗原性蛋白質をコードする遺伝子の一部を用いて、目的の抗原性断片を発現、調製することもできる。更に、抗原性断片の化学構造に関する情報を基に、ペプチド合成技術を利用して化学合成による製造も可能である。

【0069】

また、遺伝子工学的手法、化学合成的手法を用いることにより、アミノ酸の置換、挿入及び欠失も可能である。例えば、安定性の強化及び/又は所望の反応性の強化のために、本発明の抗原性断片を改変し、誘導体化したり、少なくとも1個のアミノ酸を欠失、挿入、置換、付加させることもできる。更にD-アミノ酸、非天然アミノ酸、又は非天然アミノ酸類似体に置換したり又はこれらを付加して本発明の範囲内の改変蛋白質又はペプチドを製造することができる。更に、本発明の抗原性断片をポリエチレングリコールと結合させ、化学的に修飾することができる。該抗原性断片の改変には、還元、アルキル化、アシル化、又は適した担体への化学的カップリングも含まれる。

10

【0070】

このようにして得られた抗原性断片について免疫応答活性(T細胞応答性活性化作用、T細胞アナージー作用、抗体との結合作用等)を測定することにより、抗原性断片を決定、単離することができる。

【0071】

次に、本発明の精製抗原性蛋白質の製造法について述べる。従来使用されていた粗抗原は、培養物の培養液の凍結乾燥物であったり、又は、培養菌体を適当な方法で破碎し、抽出物を得、これを硫酸沈殿、凍結乾燥するといった、極めて限られた方法で精製されたものであった。本発明者らも、これらの粗抗原を原料として蛋白質の精製法として一般的に用いられている方法、例えばゲル濾過、イオン交換等のクロマトグラフィーによる精製を試みたが、これらの手法のみでは単一の純粋な抗原性蛋白質の単離に成功しなかった。

20

【0072】

本発明のマラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質は、マラセチア菌体より調製した粗抗原を原料として、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、キレート樹脂クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を用いた効果的な分離方法を組み合わせて分画した後、各画分について患者血清IgE抗体との結合をRAST法やイムノプロットング等で測定することにより、アレルギー患者血清中のIgE抗体と結合する蛋白質を探索する、又は患者のリンパ球を用いて免疫応答活性(T細胞応答性活性化作用、T細胞アナージー作用等)を誘起する蛋白質を種々の方法で探索することにより単離することができる。

30

【0073】

即ち、まず、M. furfur等のマラセチア属菌をディクソン(Dixon)培地等のオリブオイル又はツィーン40、60を添加した、マラセチア菌の生育に適した栄養分を含む培地を用い、適当な温度、通気等の条件下で培養し、得られた菌体を適当な方法で破碎し、抽出物を得る。この抽出物よりイオン交換クロマトグラフィー、キレート樹脂クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーを含む分離手段を用いて抗原性蛋白質を精製することができる。即ち、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、キレート樹脂クロマトグラフィー、電気泳動、もしくはマラセチア由来の抗原性蛋白質又はその抗原性断片に特異的な抗体を結合させた樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィー等の、ペプチド及び蛋白質の精製に関して既知の方法を各種組み合わせることにより高純度な蛋白質として単離することができる。培養液中に含まれる抗原性蛋白質も同様の方法により単離することができる。

40

【0074】

具体的には、実施例で示すように、分子量的に分離不可能な蛋白質を、等電点の違いを利用したイオン交換クロマトグラフィーや疎水性の違いを利用した疎水クロマトグラフィ

50

一、金属とのキレート能の違いを利用したキレート樹脂クロマトグラフィー、および分子量の違いを利用したゲル濾過クロマトグラフィー等を組合せることにより、よく似た多数の蛋白質の集合を相互に分離することができる。これらのことは、従来のSDS-PAGEのイムノブロッティングによる分子量的な抗原性蛋白質に関する知見からは予想されなかったことであり、例えば、MF-1とMF-2は分子量的にはほとんど同じであり、従来のSDS-PAGEでは分離不可能なものである。また、MF-3とMF-4も分子量的には分離することが不可能である。

【0075】

更に各種分離手段の組み合わせについて具体例を述べれば、下記の工程が例示される。

工程a：マラセチア菌の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけその上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー；和光純薬工業株式会社製）にかけ0.1MのNaClによる溶出画分を取得する工程、 10

工程b：工程aで得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー；ファルマシア社製）にかけ分子量3～5万の溶出画分を取得する工程、

工程c：工程bで得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー；ファルマシア社製）にかけ分子量約4万に溶出される画分を取得する工程、

工程d：工程cで得られる溶出画分を亜鉛キレートクロマトグラフィー（例えば、亜鉛キレートセファロースファーストフローカラムクロマトグラフィー；ファルマシア社製）にかけ、素通り画分をさらに銅キレートクロマトグラフィーにかけて素通り画分又はpH約4で溶出される画分を取得する工程、 20

工程e：工程dで得られる素通り画分又はpH約4で溶出される画分を濃縮後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー；ファルマシア社製）で精製し分子量約4万の溶出画分を取得する工程、および

工程f：工程eで得られる溶出画分をさらにMono Qイオン交換クロマトグラフィーにかけて精製する工程。

【0076】

あるいは、下記の工程も一例として挙げるができる。

工程a：マラセチア菌の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけその上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー）にかけ0.1MのNaClによる溶出画分を取得する工程、 30

工程b：工程aで得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量3～5万の溶出画分を取得する工程、

工程c：工程bで得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量約4万に溶出される画分を取得する工程、

工程d：工程cで得られる溶出画分を亜鉛キレートクロマトグラフィー（例えば、亜鉛キレートセファロースファーストフローカラムクロマトグラフィー）にかけ、pH約5で溶出される画分を取得する工程、および 40

工程g：工程dで得られる溶出画分を濃縮後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）で精製する工程。

【0077】

次に、本発明の精製抗原性蛋白質（MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、およびMF-13）の製造方法の例についてより詳細に説明する。しかし、以下の工程は、単なる例示であってこれに限定されるものではない。

【0078】

1. MF-1の製造例について

M.furfur（マラセチア ファーファ）TIMM2782の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけ 50

その上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE - セルロースカラムクロマトグラフィー）にかけ0.1MのNaClによる溶出画分を取得し、限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量3～5万の溶出画分を取得し、得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量約4万に溶出される画分を取得し、ついで亜鉛キレートクロマトグラフィー（例えば、亜鉛キレートセファロースファーストフローカラムクロマトグラフィー）にかけ素通り画分を銅キレートクロマトグラフィーにかけpH約4で溶出される画分を取得し、濃縮後ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）で精製し分子量約4万の溶出画分を取得して得られる。

10

【0079】

2. MF-2の製造例について

M. furfur（マラセチア ファーフア）TIMM2782の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけその上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE - セルロースカラムクロマトグラフィー）にかけ0.1MのNaClによる溶出画分を取得し、限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量3～5万の溶出画分を取得し、得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量約4万に溶出される画分を取得し、ついで亜鉛キレートクロマトグラフィー（例えば、亜鉛キレートセファロースファーストフローカラムクロマトグラフィー）にかけ、pH約5で溶出される画分を取得し、濃縮後ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）で精製して得られる。

20

【0080】

3. MF-3の製造例について

M. furfur（マラセチア ファーフア）TIMM2782の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけその上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE - セルロースカラムクロマトグラフィー）にかけ0.1MのNaClによる溶出画分を取得し、限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量3～5万の溶出画分を取得し、得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量約4万に溶出される画分を取得し、ついで亜鉛キレートクロマトグラフィー（例えば、亜鉛キレートセファロースファーストフローカラムクロマトグラフィー）にかけ素通り画分を取得し、銅キレートクロマトグラフィーにかけ、素通り画分を濃縮した後ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）で精製し分子量約4万の溶出画分を取得し、さらにMono Q陰イオン交換クロマトグラフィーで精製して得られる。

30

【0081】

4. MF-4の製造例について

M. furfur（マラセチア ファーフア）TIMM2782の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけその上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE - セルロースカラムクロマトグラフィー）にかけ0.1MのNaClによる溶出画分を取得し、限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量3～5万の溶出画分を取得し、得られる溶出画分を限外ろ過膜（MW 10,000）で濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）にかけ分子量約4万に溶出される画分を取得し、ついで亜鉛キレートクロマトグラフィー（例えば、亜鉛キレートセファロースファーストフローカラムクロマトグラフィー）にかけ素通り

40

50

画分を取得し、銅キレートクロマトグラフィーにかけ、素通り画分を濃縮した後ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィー）で精製し分子量約4万の溶出画分を取得し、さらにMono Q陰イオン交換クロマトグラフィーで精製して得られる。

【0082】

5. MF-13の製造例について

M. furfur(マラセチア ファーファ)TIMM2782の培養菌体破碎抽出液を遠心分離にかけその上清を凍結乾燥した後、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー）にかけ非吸着画分を集め、ゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、スーパーデックス75 pg）にかけ、分子量2万以下の溶出画分を取得し、得られる画分をSP陽イオン交換クロマトグラフィーにかけ、0.2MのNaClで溶出画分を取得し、さらにゲルろ過クロマトグラフィー（例えば、スーパーデックス75 pg）で精製して得られる。

10

【0083】

また、本発明のマラセチア由来の抗原性蛋白質は、前記のアミノ酸配列の情報をもとに、PCR等により該蛋白質をコードする遺伝子を単離し、これらを利用して遺伝子工学的的手法により大腸菌、酵母、カビ、哺乳類細胞等において発現されるようにベクターに組み込み、組換え蛋白質として調製することもできる。

【0084】

(3) 本発明の精製抗原性蛋白質又はその抗原性断片に対する抗体又は抗体断片

20

マラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質又はその抗原性断片に対する本発明の抗体は、本発明のマラセチア由来の精製抗原性蛋白質、該蛋白質の酵素的又は化学的方法による処理により得られる抗原性断片、又は化学合成的に得られる抗原性ペプチドを抗原として使用することにより調製することができる。抗体の作製は常法により行うことができるが、例えば上記の蛋白質又はその断片をアジュバントと共にウサギ等の動物に免疫することによって、抗血清として得ることができる。また、モノクローナル抗体は、抗原を免疫して得られた抗体産生B細胞とミエロマ細胞を融合し、目的の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、この細胞を培養することによって調製することができる。これらの抗体は、後述のように、抗原性蛋白質の製造やマラセチアアレルゲン抗原エキスの力価測定等において使用することができる。前記のハイブリドーマとして、抗原性蛋白質MF-1に対するM-40モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは5B4、抗原性蛋白質MF-2に対するM-3モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは8G11、また抗原性蛋白質MF-3に対するM-1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは10C1とそれぞれ命名、表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所〔あて名；日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）〕にそれぞれFERM BP-5608、FERM BP-5609、FERM BP-5610（原寄託日；平成7年9月12日、国際寄託への移管請求日；平成8年7月29日）として寄託されている。

30

【0085】

(4) 本発明の精製抗原性蛋白質又はその抗原性断片を有効成分とする診断薬

本発明は、マラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質又はそれに由来する少なくとも1個の抗原エピトープを有する抗原性断片を用いる、マラセチア菌を原因菌としたアレルギー性疾患又は感染症の診断薬を提供する。

40

【0086】

ここで述べるマラセチア菌による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、マラセチア菌が原因となるあらゆるアレルギー性疾患を言う。また、マラセチア菌による感染症とは、癩風、マラセチア毛包炎、フケ等のマラセチア菌が原因となるあらゆる感染症をいう。

【0087】

本発明のアレルギー疾患診断薬は、マラセチア菌によるアレルギー疾患に対する皮内反応診断試薬及び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

50

いる場合は、本発明の単離された精製抗原性蛋白質又は本発明の抗原性断片をフェノールを含む生理食塩水で溶解し、希釈し常法に従って用いられる。

【0088】

また、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、例えば本発明の単離された精製抗原性蛋白質又は本発明の抗原性断片をハッ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。使用方法は、通常、以下の操作手順による、即ち、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に対し、該精製抗原性蛋白質の溶液を滴定試薬として滴定し、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。

10

【0089】

本発明の単離された精製抗原性蛋白質又は本発明の抗原性断片は、マラセチアアレルギー疾患の検出及び診断に用いることもできる。例えば、これはマラセチア菌に対する感受性を評価しなければならない患者から得た血液又は血液成分を、本発明の単離された精製抗原性蛋白質等と適当な条件下でインキュベートし、精製抗原性蛋白質と血液中の成分（例えば抗体、T細胞、B細胞）との結合の程度を決定することにより診断を行うことができる。

【0090】

(5) 本発明の精製抗原性蛋白質又はその抗原性断片を有効成分とする治療薬

本発明は、マラセチア由来の単離された精製抗原性蛋白質又は少なくとも1個の抗原エピトープを有する抗原性断片を有効成分とする、マラセチア菌を原因菌としたアレルギー疾患の治療薬を提供する。

20

【0091】

本発明のアレルギー疾患治療剤は、通常の投与経路例えば経口、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内等の投与経路により行うことができる。更に、例えば、トローチ、舌下剤、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、経粘膜薬として使用することができる。本発明の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20mg以下の範囲となるように適宜選択し、毎週1回程度投与される。また、本発明のアレルギー疾患治療剤は、マラセチア菌による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。アナフィラキシー誘発作用は少ないか又はなく、人体に対して安全に用いることができるからである。

30

【0092】

本発明のマラセチアアレルギー疾患治療剤は、前記の精製された抗原性蛋白質、その抗原性断片を有効成分とするものであり、各種のマラセチア菌によるアレルギー疾患の治療剤および予防剤として用いられる。

【0093】

本発明のアレルギー疾患治療剤の調製方法は、特に制限はない。例えば、本発明の精製抗原性蛋白質またはエピトープを有する抗原性断片を乾燥して粉末状とし、マラセチア菌によるアレルギー疾患に対する減感作治療剤として用いることができる。その場合、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抗原性蛋白質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。

40

【0094】

減感作治療剤として用いるためには、エピトープを有し、かつマラセチア菌に特異的なIgEに結合しないかまたは結合しても肥満細胞もしくは好塩基球からヒスタミンを放出させないものが特に有利である。

【0095】

(6) マラセチアアレルギーの定量方法

本発明はマラセチアアレルギーの定量方法をも提供する。マラセチア由来の精製抗原性

50

蛋白質に対する抗体は、マラセチア菌を原因菌としたアレルギー性疾患又は感染症の診断に使用されるマラセチアアレルゲンの免疫学的定量に用いることができる。

【0096】

本発明の単離された精製抗原性蛋白質あるいは後述の組換え抗原性蛋白質をマラセチアアレルゲンの標準品として、それに対する抗体を用いた、ELISA等の定量方法を確立することが容易である。マラセチア抗原エキスとしては、前記のように市販のものがいくつかある、また、マラセチア菌がヒトの頭皮を始めとする皮膚の常在菌であることから、市販のハウスダスト中にもマラセチアアレルゲンが含有されていると考えられる。これらの市販の抗原エキスについてマラセチアアレルゲンの含量を明らかにすることは、診断、治療上非常に有用である。

10

【0097】

(7) 本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質

本発明は、アレルギー疾患患者由来のIgE抗体に対する結合能を有するマラセチア由来の純粋な単離された前記(1)の精製抗原性蛋白質と同等の免疫学的性質を有する組換えマラセチア抗原性蛋白質(以下、単に「組換え抗原性蛋白質」と略す場合がある)を提供する。これは例えば、配列番号：8～14のアミノ酸配列を有するrMF-1～7(ここで、rMF-1～7という表示は、MF-1～7を遺伝子組換え手法により得たものを意味する。)からなるペプチド群、及び該ペプチドの機能的同等物が挙げられる。即ち、配列番号：8～14のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるペプチド、又は該ペプチドを含むペプチドであって、rMF-1～7に対応するMF-1～7のそれぞれが有する免疫学的性質と同等の免疫学的性質を有するもの、さらに配列番号：8～14のいずれかに記載のアミノ酸配列、又はその一部からなるアミノ酸配列において、1又は2以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせ、かつ、rMF-1～7に対応するMF-1～7のそれぞれが有する免疫学的性質と同等の免疫学的性質を有するものが本発明に含まれる。

20

【0098】

例えば、rMF-1を例にすると、MF-1と同等の免疫学的性質を有する抗原性蛋白質であって、配列表の配列番号：8に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるペプチド、又は該ペプチドを含む組換えマラセチア抗原性蛋白質がrMF-1に含まれる。さらに、配列表の配列番号：8に記載のアミノ酸配列、又はその一部からなるアミノ酸配列において、1又は2以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせ、かつMF-1と同等の免疫学的性質を有する組換えマラセチア抗原性蛋白質もrMF-1に含まれる。rMF-2～7についても同様である。

30

【0099】

ここで、免疫学的性質が同等であるとは、同等のマラセチアアレルゲン活性を有することであり、マラセチアアレルゲン活性とは、アレルギー疾患患者由来のIgE抗体、特にマラセチアアレルギー疾患患者由来のIgE抗体との結合活性をいう。

【0100】

本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質は、後述の本発明の遺伝子を利用して遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌、出芽酵母などの酵母、麹菌などのカビ、昆虫細胞又は哺乳類細胞等で発現されるように適宜ベクターを選択し、発現ベクターを作製して該細胞に導入し、組換え蛋白質として得られる。従って、本質的にマラセチア由来の他の蛋白質を含まないものである。

40

【0101】

本発明の組換え抗原性蛋白質の機能的同等物は、本発明の組換え抗原性蛋白質をコードするDNAの特定部位の突然変異誘発を用い、既知の方法により組換え抗原性蛋白質の構造を改変することができる。例えば、後述のポリヌクレオチド上の1又は2以上の塩基の置換、挿入、欠失又は付加によってアミノ酸残基の置換、挿入、欠失又は付加を起こすことができる。さらに、生物活性を保持したままの変異体を選択することも可能である。

【0102】

50

該変異体の作製方法としては、ギャップド・デュプレックス法〔ヌクレイック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Research) 第12巻, 第24号, 第9441~9456頁(1984)〕、デレーション法〔ジーン (Gene) 第33巻, 第103~119頁(1985)〕、PCR法〔ジーン (Gene) 第102巻, 第67-70頁(1991)〕、ウラシルDNA法〔メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 第154巻, 第367~382頁(1987)〕、プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ U S A (Proc Natl Acad Sci USA), 第79巻, 第7258~7262頁(1982)〕やカセット変異法〔ジーン (Gene), 第34巻, 第315~323頁(1985)〕等が知られている。

【0103】

本発明の組換え抗原性蛋白質の精製を容易にしたり、溶解度を向上させるために、ペプチド鎖にタグ基を付加することができる。タグ基の例としてはポリヒスチジン等が挙げられ、金属アフィニティークロマトグラフィーで精製することができる。さらに必要ならタグ基と目的のペプチドの間にエンドプロテアーゼ特異的な認識部位を導入して該プロテアーゼで処理することにより、無関係な配列を含まないペプチドの単離を容易にすることができる。

10

【0104】

ペプチド抗原に対する患者の脱感作に成功するためには、ペプチドへの官能基の付加又はペプチド中に疎水性T細胞エピートプ、疎水性エピートプもしくは疎水性領域を含有しないことにより、ペプチドの溶解度を上げることが必要である。また、ペプチド抗原内のT細胞エピートプの適した抗原プロセッシングを助けるために、それぞれ少なくとも1個のT細胞エピートプを含む領域間にエンドプロテアーゼ認識部位を、前述の組換え又は合成により作製することができる。例えば、LysLys又はArgArgなどの帯電アミノ酸対をペプチド内の領域間に導入することができ、得られるペプチドはカテプシン及び/又は他のトリプシン様酵素による切断に感受性となり、1又は2個以上のT細胞エピートプを含むペプチド断片を生成することができる。さらにそのような帯電アミノ酸残基はペプチドの溶解度を向上させることも可能である。

20

【0105】

(8) 本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチド

本発明は、組換えマラセチア抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチド又はその抗原性断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。これは、配列表の配列番号：1~7に記載の塩基配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、rMF-1~7又はそれらと同等の免疫学的性質を有する抗原性蛋白質をそれぞれコードするポリヌクレオチドが挙げられる。また、配列表の配列番号：1~7に記載の塩基配列、又はその一部からなる塩基配列において、1又は2以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせ、かつ、rMF-1~7と同等の免疫学的性質を有する抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。さらにこれらのポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な、マラセチアアレルゲン活性を有する抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

30

【0106】

例えば、rMF-1を例にすると、配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部、又は一部からなるポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、rMF-1又はそれと同等の免疫学的性質を有する抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドが本発明に含まれる。また、配列表の配列番号：1に記載の塩基配列、又はその一部からなる塩基配列において、1又は2以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも1つを生じさせている、rMF-1と同等の免疫学的性質を有する抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドが本発明に含まれる。さらに、これらのポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なマラセチアアレルゲン活性を有する抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。rMF-2~7をコードするポリヌクレオチドについても同様である。

40

【0107】

50

組換えマラセチア抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、以下の方法により、取得可能である。通常の種類クロマトグラフィーを組み合わせるにより精製されたマラセチア抗原性蛋白質、又は一次元電気泳動もしくは二次元電気泳動により精製されたマラセチア抗原性蛋白質よりN末端アミノ酸配列又は内部アミノ酸配列を決定することが可能である。これらアミノ酸配列をコード可能なオリゴヌクレオチドを合成、精製する。通常、1種のアミノ酸は複数のコドンによりコードされているため、このオリゴヌクレオチドはこれら全てのコドンを考慮に入れて合成された混合物である。このオリゴヌクレオチドとオリゴ(dT)をプライマーとして用い、マラセチア菌より抽出、精製された全RNAより合成されたcDNA又は抽出、精製されたゲノムDNAを鋳型としてPCRを行えば、本発明のマラセチア抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドが得られる。PCRに用いるプライマーは、抗原性蛋白質の二箇所のアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを用いても良く、また1回のPCRでcDNAが増幅しないときは、さらにPCRを繰り返しても良い。

10

【0108】

このPCR反応により得られたcDNA断片をDNAハイブリダイゼーションのためのプローブとして用いて、マラセチア菌のポリ(A)⁺RNA又はゲノムDNAより作製されたcDNAライブラリー又はゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、容易に全配列を含むポリヌクレオチド又はハイブリダイズ可能な抗原性蛋白質をコードするポリヌクレオチドを得ることが可能である。ライブラリー作製に用いられるベクターは、ファージ由来でもプラスミド由来でもどちらでも良い。

20

【0109】

別の方法として、マラセチア菌より精製されたポリ(A)⁺RNAよりcDNA発現ライブラリーを作製し、このライブラリーより産生された蛋白質に対してアレルギー疾患患者由来のIgE抗体と結合するクローンをスクリーニングすれば、マラセチアアレルゲン活性を有するマラセチア抗原性蛋白質をコードするcDNAクローンが得られる。このcDNAクローンより発現する蛋白質は、マラセチア抗原性蛋白質である。

【0110】

後述のマラセチア由来のエピトープをコードする遺伝子も本発明の発明の範囲内であり、マラセチアアレルゲンの全アミノ酸配列をコードする塩基配列より塩基の数が少ない配列を言う。一般に、エピトープをコードする塩基配列は成熟蛋白質をコードする塩基配列から選ばれるが、ある場合には本発明のリーダー配列部分を含むように選ぶのが望ましい。本発明の遺伝子は、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含むリンカー配列及び/又は、所望の遺伝子のクローニング、発現あるいは精製に有用な配列も含むことができる。即ち、具体的には少なくとも1つのB細胞エピトープをコードし、かつ配列番号：1～7の塩基配列の一部を有するポリヌクレオチド、又は化学的、物理的方法により一部を改変させたポリヌクレオチドも本発明に含まれる。例えば、本発明に使用した以外のM.ファーファおよびそれ以外のマラセチア属の真菌、例えばM.pachydermatis, M.symptodialisの有する、対応するポリヌクレオチドも本発明に含まれる。すなわち、M.ファーファはその生理学的性質から5群に分類可能であり(医真菌誌、内田勝久)、それぞれが対応する遺伝子を有していると思われ、これらも本発明に含まれる。

30

40

【0111】

さらに、本発明には配列番号：1～7の塩基配列又は少なくとも1つのB細胞エピトープをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドも本発明に含まれる。本発明において、ハイブリダイズ可能とは、次のような条件でハイブリダイズできることをいう。すなわち、DNAを固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400、0.01%変性サケ精子DNAを含む6×SSC(1×SSCは0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0を示す)中で、50にて12～20時間、プローブとともにインキュベートする。インキュベーション終了後、0.5% SDSを含む2×SSC中、37での洗浄から始めて、SSC濃度は0.

50

1倍までの範囲で、また、温度は50℃までの範囲で変化させ、固定されたDNA由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄したうえ、プローブの検出を行う。また、こうして得られた新たなDNAについて、そこにコードされているタンパクの有する活性を上記同様の方法によって調べることにより、得られたDNAが目的とするものであるかどうかを確認することができる。

【0112】

本発明の遺伝子とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、例えば、本発明で使用したM.ファーフアTIMM2782菌は配列番号：5のMF-5遺伝子を有すると共に、この塩基配列と90%以上のホモロジーを有する、図17に示した推定塩基配列を有する遺伝子をも有している。両遺伝子のコードする蛋白質は既知の蛋白質の中でジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(DLDH)とホモロジーを有する。また、本菌は配列番号：6のMF-6遺伝子を有すると共に、この塩基配列と90%以上のホモロジーを有する、図18に示した推定塩基配列をも有する遺伝子をも有している。両遺伝子のコードする蛋白質は既知の蛋白質の中でマレートデヒドロゲナーゼ(MDH)とホモロジーを有する。さらに、本発明のMF-1遺伝子(配列番号：1)とMF-2遺伝子(配列番号：2)も塩基配列で60%以上のホモロジーを有し(図19)、ハイブリダイズ可能である。両遺伝子のコードする蛋白質はCandida boidinii由来のペルオキシゾーム膜蛋白質(PMP-20)とホモロジーがある。また、本発明のMF-3遺伝子(配列番号：3)とMF-4遺伝子(配列番号：4)も塩基配列上60%以上のホモロジーを有し(図20)、相互にハイブリダイズ可能である。両遺伝子のコードする蛋白質はスーパーオキシドデスムターゼとホモロジーがあり、実際その酵素活性を有している。従って、アレルギーの原因となっている他の真菌の有する、本発明の塩基配列とハイブリダイズ可能な、組換え抗原性蛋白質をコードする遺伝子も本発明に含まれる。

10

20

【0113】

本発明の遺伝子は特に限定されないが、DNA又はRNAであり、天然又は合成どちらでも構わない。本発明の遺伝子を発現させるために適したプロモーター、エンハンサー及び他の発現調節要素を含む発現ベクターは、例えば、1989年コールドスプリングハーバーラボラトリー発行、J. サンプルック(J. Sambrook)ほか著、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory manual)第2版に記載されているものを利用することができる。哺乳類、酵母、カビ、又は昆虫細胞で発現された組換え体は、グリコシル化及び適したジスルフィド結合等の修飾を受けることができる。酵母細胞での発現に適したベクターとしては、pYES2, YEpSec等が挙げられ、入手可能である。昆虫細胞では、バキュロウイルスベクターが商業的に入手でき(ファルミンゲン社製、サンディエゴ、CA)、哺乳類の細胞ではpMSGベクターが入手可能である(ファルマシア社製)。

30

【0114】

大腸菌における発現の場合、pTV118ベクター等を使用すればよい。また、pMAL、pSEM、pGEXを用いると、それぞれマルトース結合蛋白質、 α -ガラクトシダーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として発現させることができる。融合蛋白質として発現させる場合、キャリアー蛋白質とマラセチア由来の抗原性蛋白質又はその断片の間の融合連結部位に酵素認識部位を導入するのが特に有利である。融合蛋白質として単離精製後、酵素認識部位での切断、続いて従来の方法を用いた生化学的精製手段により、抗原性蛋白質又はその断片のみを回収することができる。酵素認識部位には血液凝固因子Xaまたはトロンビンの認識部位が含まれ、これらの酵素は市販のものが利用できる。さらに、IPTG又は温度等による発現誘導可能なベクターも利用できる。

40

【0115】

発現ベクターの宿主細胞への導入方法は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、又はエレクトロポレーション法などの従来法を用いて行う。

【0116】

50

(9) 本発明の抗原性断片

本発明は、少なくとも1つの抗原エピトープを含む抗原性断片を提供し、これにはその機能的に同等な誘導体も本発明に含まれる。具体的には、配列表の配列番号：8～14のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなる組換えマラセチア抗原性蛋白質に含まれる抗原エピトープを含む抗原性断片である。本発明の抗原性断片は、マラセチア菌に特異的なIgE抗体に対して結合能を有しないか、IgE抗体への結合が起こる場合でも、そのような結合は肥満細胞又は好塩基球からヒスタミンを放出させない程度であることを特徴とする。また、本発明の抗原性断片は、マラセチア由来の抗原性蛋白質より実質的に低い程度でIgE抗体に結合することを特徴とする。また、本発明の抗原性断片は、抗原性蛋白質より少ないIgE賦活活性を有することを特徴とする。

10

【0117】

本発明の抗原性断片は、例えば、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む抗原性断片が挙げられる。あるいは、少なくとも1つのB細胞エピトープを含む抗原性断片が挙げられ、例えば、該B細胞エピトープが配列表の配列番号：42～44のいずれかに記載のアミノ酸配列から選ばれるものが挙げられる。これらの抗原性断片はペプチド合成技術を利用して化学的に合成することもできるし、遺伝子の一部を用いて形質転換された宿主細胞中で目的のエピトープが発現された組換えマラセチアアレルゲンとしても得ることができる。例えば、抗原性蛋白質を重複のない所望の長さの断片に任意に分けたり、好ましくは所望の長さの重複したペプチド断片に分け、調製する。それらのペプチド断片を抗体との結合作用を測定したり、免疫応答活性を測定する（T細胞応答性活性化作用、T細胞アナーキー作用等）ことにより、抗原性を決定する。

20

【0118】

(10) 本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片に対する抗体又は抗体断片

本発明は、前記組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片に特異的に結合する抗体又は抗体断片を提供する。本発明の抗体は常法により得ることができ、ポリクローナル抗体でも、モノクローナル抗体のいずれでもよい。抗体断片は前記組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片に特異的に結合するものであれば特に限定されない。

【0119】

(11) 本発明の合成オリゴヌクレオチドプローブ又は合成オリゴヌクレオチドプライマー

30

本発明は、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ、合成オリゴヌクレオチドプライマーを提供する。例えば、本発明は、配列番号：1～7の塩基配列の全部または一部を含有するプローブ又はプライマーを含む。このプローブを用いたハイブリダイゼーション法により、同等の機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を単離することができる。このプローブは、例えば前記遺伝子または遺伝子断片を適当なベクターに挿入し、大腸菌に導入して複製させた後、菌体破碎液からフェノール等により抽出する。そして、該挿入部位を認識する制限酵素で切断して電気泳動を行った後、ゲルより切り出して調製する。また、プローブは、配列番号：1～7の塩基配列に基づき、DNA合成機による化学合成やPCRによる遺伝子増幅技術によっても調製できる。該プローブは使用時の検出感度を上げるために放射性同位体や蛍光で標識することもできる。

40

【0120】

(12) 本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とする診断薬

本発明は、本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とするマラセチアアレルギ-疾患又はマラセチア感染症の診断薬を提供する。ここで述べるマラセチアアレルギ-疾患とは、アトピー性気管支喘息、アレルギ-性鼻炎、アレルギ-性結膜炎、アトピー性皮膚炎等、マラセチア菌が原因となるあらゆるアレルギ-性疾患を言う。また、マラセチア感染症とは、癩風、マラセチア毛包炎、フケ等のマラセチア菌が原因となるあらゆる感染症をいう。

50

【0121】

本発明のアレルギー疾患診断薬は、マラセチア菌によるアレルギー疾患に対する皮内反応診断試薬及び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、本発明の組換え抗原性蛋白質又は本発明の抗原性断片をフェノールを含む生理食塩水で溶解し、希釈し常法に従って用いられる。

【0122】

また、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、例えば本発明の組換え抗原性蛋白質又は本発明の抗原性断片をハッ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。使用方法は、通常、以下の操作手順による、即ち、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に対し、該組換え抗原性蛋白質の溶液を滴定試薬として滴定し、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。

10

【0123】

本発明の組換え抗原性蛋白質又は本発明の抗原性断片は、マラセチアアレルギー疾患の検出及び診断に用いることもできる。例えば、これはマラセチア菌に対する感受性を評価しなければならない患者から得た血液又は血液成分を、本発明の組換え抗原性蛋白質等と適当な条件下でインキュベートし、組換え抗原性蛋白質と血液中の成分（例えば抗体、T細胞、B細胞）との結合の程度を決定することにより診断を行うことができる。

【0124】

(13) 本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とする治療薬
本発明は、本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質又は抗原性断片を有効成分とするマラセチアアレルギー疾患又はマラセチア感染症の治療薬を提供する。マラセチア由来の抗原性断片を治療目的で用いる場合、本来のマラセチアアレルギーとIgEが結合する場合より実質的に低い濃度で、そのようなIgEと結合し、その際、肥満細胞又は好塩基球からメディエーターを遊離しない抗原性断片が好ましい。T細胞応答性活性化作用を有すること、及び/又はT細胞アナージー作用を誘起することができるものがさらに好ましい。組換えマラセチア抗原性蛋白質又はその抗原性断片は、実験動物、ヒトのボランティアへの皮膚試験、皮内試験の他、RAST、ELISA、又はヒスタミン遊離などの試験管内試験において評価することができる。

20

30

【0125】

本発明の組換え抗原性蛋白質並びにその遺伝子は、マラセチアアレルギー疾患治療剤として利用可能である。該治療剤は、前記の組換えマラセチア抗原性蛋白質、その抗原性断片、あるいはエピトープを有するペプチドを有効成分とするものであり、各種のマラセチア菌によるアレルギー疾患の治療剤として用いられる。さらに、前記の遺伝子も治療剤として利用することができ、その際、哺乳類で発現可能なベクターに挿入し、裸のDNA分子として、または適当なウイルスベクターに組み込んでウイルス粒子として投与すればよい。この投与により、トランスを誘導し、疾患を治療することが可能である。

【0126】

本発明のアレルギー疾患治療剤の調製方法は、特に制限されないが、例えば、前記の方法により調製された組換えマラセチア抗原性蛋白質、その抗原性断片、もしくはエピトープを有するペプチド、または該遺伝子をベクターに組み込んだDNA分子を乾燥して粉末状で採取し、マラセチア菌によるアレルギー疾患に対する減感作治療剤として用いられる。本発明の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マラセチア抗原性蛋白質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。

40

【0127】

50

本発明のアレルギー疾患治療剤は、通常の投与経路例えば経口、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内等の投与経路により行うことができる。更に、例えば、トローチ、舌下剤、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、経粘膜薬として使用することができる。本発明の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20mg以下の範囲となるように適宜選択し、毎週1回程度投与される。また、本発明のアレルギー疾患治療剤は、マラセチア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。アナフィラキシー誘発作用は少ないか又はなく、人体に対して安全に用いることができるからである。

【0128】

本発明のマラセチアアレルギー疾患治療剤は、前記の組換え抗原性蛋白質、その抗原性断片等を有効成分とするものであり、各種のマラセチアアレルギー疾患の治療剤および予防剤として用いられる。減感作治療剤として用いるためには、エピトープを有し、かつマラセチア菌に特異的なIgEに結合しないかまたは結合しても肥満細胞もしくは好塩基球からヒスタミンを放出させないものが特に有利である。

【実施例】

【0129】

以下、実施例および比較例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

【0130】

実施例1

マラセチア由来の抗原性蛋白質の単離及びその物理化学的性質

1-1) マラセチア部分精製粗抗原2782の調製

M. furfur TIMM2782株(FERM BP-5611)をディクソン培地(バクトマルトエキス、トラクトブロス6.0%、バクトオックスゴール2.0%、ツイーン401.0%、グリセロール-モノオレイン酸0.25%)150mlを入れた500ml容三角フラスコ50本中で27、5日間振とう培養して得た培養物から、遠心分離によって集めた菌体をリン酸緩衝食塩水(PBS)で5回洗浄した後、菌体湿重量の2倍量のPBSに浮遊させ、等量の0.5mm径のガラスビーズを加え、MSKセルホモゲナイザー(B.ブラウン社製)により菌体を破碎抽出した。得られた菌体破碎抽出液を遠心分離(18,000rpm, 30min)にかけ、上清を得た。この上清を精製水に対して透析、0.45μmのメンブレンフィルターで過滅菌後、凍結乾燥することによりマラセチア粗抗原2782約900mgを得た。

【0131】

前記マラセチア粗抗原2782約800mgを0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解して、硫酸塩析を行った。硫酸50%から90%飽和で沈殿する画分を遠心で集め、0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、続いて同緩衝液に透析し、マラセチア部分精製粗抗原2782とした。

【0132】

1-2) マラセチア由来の抗原性蛋白質の探索

マラセチア部分精製粗抗原2782を凍結乾燥後、4mg/mlとなるように2M硫酸アンモニウムを含有する0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で溶解後、そのうち100μlを2M硫酸アンモニウムを含有する同緩衝液(pH 7.0)で予め平衡化したPhenyl Superose PC1.6/5(カラム容積0.1ml、ファルマシア社製)にかけ、0.1M同緩衝液で硫酸アンモニウム2Mから0Mまでの直線的グラジエント溶出を行った。得られた抗原性蛋白質含有画分をピストリス緩衝液(pH 6.5)に対して透析した後、MonoQ PC 1.6/5(カラム容積0.1ml、ファルマシア社製)にかけ、同緩衝液で食塩0Mから0.3Mまでの直線的グラジエント溶出を行った(図1、流速:100μl/分、検出:280nm)。50μlずつ26本に分画後、分画1~20について患者血清を用いたDirect RAST(EIA)法によるIgE抗体結合性を調べた。

【0133】

即ち、各分画を0.01% ツイーン20入り0.1M ほう酸緩衝液(pH8.0)で10、100、1000

倍希釈し、その45 μ lを臭化シアンで活性化したペーパーディスクにカップリングし、ついでエタノールアミンでブロッキングした。その後、各ディスクに5倍希釈したプール血清(RAST法で高値を示した患者血清10名分をまとめたもの)50 μ lずつを加えて、その後、希釈した γ -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgE抗血清を反応させ、酵素基質を加え、415nmの吸光度を測定した。その結果を図2に示した。図2より複数のアレルゲン蛋白質が存在することが明らかであるが、例えばフラクション6及びフラクション12、13付近に患者IgEと結合する蛋白質が存在する。

【0134】

また、各分画をSDS-PAGE後、クーマシーブリリアントブルー(CBB)染色により蛋白質の検出(図3)を行うと共に、代表的画分について下記のようにイムノブロッティングを行った。

10

【0135】

即ち、それぞれの画分をSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜へトランスファーし、3%ウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングし、そして患者プール血清で処理した。その後、希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgE抗血清を反応させ、酵素基質を加え、アレルゲン蛋白質を検出した。その結果、図4のように、複数のアレルゲン蛋白質の存在が明らかとなった。例えば、フラクション12に、SDS-PAGE上の20kDa付近に検出される蛋白質(アレルゲンMF-1として単離した)等がアレルゲン蛋白質として含まれていることが明らかである。フラクション6には、フラクション12の20kDaとほぼ同じ分子量のアレルゲン蛋白質(アレルゲンMF-2として単離した)および80kDa付近に検出される蛋白質等が含まれていることが明らかである。

20

【0136】

1-3)精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4及びMF-13の単離

前記のマラセチア部分精製粗抗原2782の凍結乾燥物0.25mgをピストリス緩衝液(pH6.5)溶液1mlに溶解後、1-2)に示したMono Qによるクロマトグラフィーと同様の方法で、Mono Q HR 5/5(カラム容積1ml、ファルマシア社製)にかけ、ピーク1(図1のフラクション5,6対応分画)、ピーク2(図1のフラクション10,11,12対応分画)、ピーク3(図1のフラクション15,16対応分画)、ピーク4(図1のフラクション18,19,20対応分画)を集めた。それぞれのピークについて、ゲルろ過、疎水クロマトグラフィー、最後にMono Qによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、ピーク1よりMF-2、ピーク2よりMF-1、ピーク3よりMF-3、ピーク4よりMF-4と命名した、純粋な抗原性蛋白質を単離した。また、マラセチア部分精製抗原2782のMono Q非吸着画分を疎水クロマトグラフィーにかけ、MF-13と命名した純粋な抗原性蛋白質を単離した。単離された5種類の蛋白質については、上記の患者プール血清を用いたEIA法によるIgE抗体結合性を調べることにより、マラセチアアレルゲン蛋白質であることを確認した。

30

【0137】

精製方法について詳しく説明すると、Mono Qにより分離されたピーク1~4をそれぞれ4M硫酸アンモニウムを含有する0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で2倍に希釈後、2M硫酸アンモニウムを含有する0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したPhenyl Superose PC1.6/5(カラム容積0.1ml、ファルマシア社製)にかけ、0.1M同緩衝液で硫酸アンモニウム2Mから0Mまでの直線的グラジエント溶出を行った。得られた抗原性蛋白質含有画分を限外濾過膜(MW10,000)で濃縮後、セファデックスG-75スーパーファインカラム(1.5x100cm)によるゲルろ過クロマトグラフィーを行い、分子量4万付近に溶出される画分を得た。さらに、得られたゲルろ過物を再度Mono Q PC 1.6/5によるイオン交換クロマトグラフィーを行い、前記と同様の溶出を行い、抗原性蛋白質を単離した。即ち、ピーク2よりMF-1(図5)、ピーク1よりMF-2を(図6)、ピーク3よりMF-3を(図7)、ピーク4よりMF-4を(図8)単離した。また、Mono Q非吸着画分を上記と同じPhenyl Superose PC1.6/5(カラム容積0.1ml、ファルマシア社製)にかけ、0.1M同緩衝液で硫酸アンモニウム2Mから0Mまでの直線的グラジエント溶出(図24)を行い、MF-13と命名した、純粋な抗原性蛋白質を単離した。

40

50

【0138】

1-4) 二次元電気泳動によるMF-1~4の同定及び精製抗原性蛋白質MF-5~12の単離

さらに前記のマラセチア部分精製粗抗原2782の150 μ gを8M尿素、0.5%NP-40、2% -メルカプトエタノール、0.8% Pharmalyte (ファルマシア製)、0.01%プロモフェノールブルーを含む溶液に溶解した。一次元目の等電点電気泳動は、Immobiline DryStrip ゲル (pH 4~7、ファルマシア製) を用いて常法により行った。二次元目のSDS-PAGEは、ExelGel SDS-Homogeneous (12.5%、ファルマシア社製) を用いて行った後、CBB染色により蛋白質の検出 (図9) を行うと共に、PVDF膜 (ミリポア社製) に転写後、皮膚テストにおいて粗抗原に対して陽性で、RAST法で高値を示したアレルギー患者血清 (IgE抗体) および健常者血清 (IgE抗体) を用いてイムノプロットを行い、陽性スポットを検出した (図10)。陽性スポットのうち、陽性率が高いと判断された分子量約21kDaで等電点約5.3、分子量約20kDaで等電点約5.8、分子量約27kDaで等電点約6.5、分子量約26kDaで等電点約6.3のスポットについて、N末端配列の結果などをもとに、各々MF-1、MF-2、MF-3、およびMF-4であると同定した。また、新たに分子量約66kDa、等電点約6.1 (MF-5と命名)、及び分子量約43kDa、等電点約6.2 (MF-6と命名)、分子量約15kDa、等電点約6.0 (MF-7と命名)、分子量約30kDa、等電点約5.4 (MF-8と命名)、分子量約40kDa、等電点約5.3 (MF-9と命名)、分子量約44kDa、等電点約6.2 (MF-10と命名)、分子量約45kDa、等電点約6.4 (MF-11と命名)、分子量約100kDa、等電点約5.0 (MF-12と命名) の蛋白質がアレルギー患者IgE抗体に結合する蛋白質であることを見出し、これらの蛋白質をゲルより抽出し、単離した。

10

20

【0139】

1-5) 精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-5、MF-6、MF-7、MF-8、MF-9、MF-10、MF-11、MF-12、MF-13の物理化学的性質

単離したMF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-13はSDS-PAGEで単一のバンドを示した (図11)。MF-1~MF-13のSDS-PAGE、等電点電気泳動による分析の結果を表1に示した。MF-1~4の未変性下での等電点電気泳動は、IsoGel Plate pH3~10 (FMC社製) を用いて常法により行った。MF-5~12のSDS-PAGE、等電点電気泳動による分析結果は図9の二次元電気泳動の結果より算出した。

30

【0140】

【表 1】

	SDS-PAGE (kDa)		等電点 ²⁾
	還元 ¹⁾ 条件下	非還元条件下	
MF-1	21	40	4.7 (5.3)
MF-2	20	40	4.8 (5.8)
MF-3	27	27	5.2 (6.5)
MF-4	26	26	5.2 (6.3)
MF-5	66	—	— (6.1)
MF-6	43	—	— (6.2)
MF-7	15	—	— (6.0)
MF-8	30	—	— (5.4)
MF-9	40	—	— (5.3)
MF-10	44	—	— (6.2)
MF-11	45	—	— (6.4)
MF-12	100	—	— (5.0)
MF-13	16	—	8.1

¹⁾還元：3%メルカプトエタノール処理

²⁾()内の数字は8M尿素変性下での等電点を示す。

【0141】

1-6) 精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-13の大量調製

上記のマラセチア部分精製粗抗原2782の0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)溶液を予め同緩衝液で平衡化しておいたDEAE-セルロースカラムに吸着させた。同緩衝液で洗浄後、0.1M、0.2M、0.5Mの食塩を含む同緩衝液で段階的に溶出させた。0.1M食塩入り緩衝液溶出画分を限外濾過膜(MW 10,000)で濃縮後、セファクリルS-200HR カラムクロマトグラフィー(1.5 x 90cm)にかけた。見掛け上の分子量3~5万の溶出画分を集め、限外濾過膜(MW 10,000)で濃縮後、セファデックスG-75スーパーファインカラム(1.5 x 100 cm)でクロマトグラフィーを行い、分子量約4万に溶出される画分F2を得た。このF2画分を0.5M食塩入り0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に対して透析後、予め亜鉛イオンをキレートさせ、同緩衝液で平衡化したキレーティングセファロースファーストカラム(1 x 15 cm)クロマトグラフィーにかけた。同緩衝液で洗浄後、緩衝液のpHを7.0、6.0、5.0、4.0と低下させて溶出した。pH 5.0の緩衝液で溶出される画分を集め濃縮後、セファデックスG-75スーパーファインカラム(1.5 x 100 cm)クロマトグラフィーで更に精製することにより、MF-2を単離した。

【0142】

亜鉛キレートクロマトグラフィーにおける素通り画分は、次に銅キレートクロマトグラフィーで精製した。即ち、予め銅イオンをキレートさせ、0.5M食塩入り0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化したキレーティングセファロースファーストカラム(1 x 15 c

m) クロマトグラフィーを行った。同緩衝液で洗浄後、緩衝液のpHを7.0、6.0、5.0、4.0と低下させて溶出した。pH 4.0溶出画分を限外濾過膜(MW 10,000)で濃縮後、前記セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィーで更に精製し、分子量約4万の溶出画分MF-1を得た。また、素通り画分は限外濾過膜(MW 10,000)で濃縮後、前記セファデックスG-75スーパーファインカラムクロマトグラフィーで精製し、分子量約4万の溶出画分を取得後、更にMono Q陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製し、MF-3及びMF-4を単離した。

【0143】

上記のマラセチア部分精製抗原2782 DEAE-セルロースカラム非吸着画分の一部を0.05M NH₄HCO₃で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75pg(ファルマシア社製)にかけ、分子量2万以下の画分を集めた。得られた画分を0.05M 酢酸緩衝液(pH5)で平衡化したHiTrap SPに吸着させ、0.2M NaClを加えた同緩衝液で溶出させた。溶出画分を0.05M NH₄HCO₃で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75pgにかけ、MF-13を単離した。

【0144】

最終的に、約0.5gのマラセチア部分精製粗抗原2782を出発材料として用い、MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-13を各々10mg、2mg、3mg、2mg、2mgずつ得た。このように大量調製された抗原性蛋白質は、SDS電気泳動、等電点電気泳動、N末端ミノ酸配列分析において、前記1-4)及び実施例10で述べた結果と同様であった。

【0145】

実施例2

モノクローナル抗体の作製

2-1) マウスの免疫、細胞融合及びハイブリドーマのクローニング

実施例1のようにして得られた、精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2及びMF-3を、それぞれ10µgずつフロイント完全アジュバントに懸濁させ、5週令の雄のBALB/cマウスの腹腔内に投与した。4週後に、フロイント完全アジュバントに懸濁させたアレルゲン20µgで腹腔内に追加免疫後、更にその4週後に生理食塩水に溶解した同じアレルゲン20µgを静脈内に投与した。

【0146】

最終免疫から3日後に脾臓細胞を取り出し、4:1の割合でミエローマ細胞(P3X63-Ag 8.653)と混合し、43%ポリエチレングリコール2000を加えて細胞融合を実施した。これを96穴マイクロプレートのウェルに脾臓細胞2x10⁵個/ウェルの割合でまき込み、HAT培地中でハイブリドーマを選択的に増殖させた。培養上清を用いて目的の抗体産生の有無をELISAにより測定し、抗体産生細胞を選択した。その結果、精製抗原性蛋白質MF-1に対するM-40モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローンとして5B4株(FERM BP-5608)を取得した。精製抗原性蛋白質MF-2に対するM-3モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローンとして8G11株(FERM BP-5609)を取得した。精製抗原性蛋白質MF-3に対するM-1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローンとして10C1株(FERM BP-5610)を取得した。

【0147】

2-2) 腹水の調製及びモノクローナル抗体の精製

予めプリスタンで前処理したヌードマウスの腹腔内に10⁷個のハイブリドーマを注射して増殖させ、1~2週後に腹水を採取した。得られた腹水からプロテインAカラムのキット(アマーシャム社製)によりモノクローナル抗体を精製した。MF-1に対するM-40モノクローナル抗体、MF-2に対するM-3モノクローナル抗体、MF-3に対するM-1モノクローナル抗体を得た。これらのモノクローナル抗体のアイソタイプは、すべてIgG1であった。

【0148】

2-3) モノクローナル抗体の固定化カラムの調製及び同カラムを用いた抗原性蛋白質MF-3の精製

10

20

30

40

50

上記の M - 1 モノクローナル抗体 15 mg をカップリング緩衝液 (0.1M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) で透析後、1 g の臭化シアン活性化セファロース 4 B (ファルマシア社製) に常法に従ってカップリングさせ、抗体の固定化樹脂を調製した。

【0149】

得られた樹脂を 5 ml の小カラムに移し、マラセチア部分精製粗抗原 2782 を 40 mg とし、これを 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解後、カラムにかけた。0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で十分に洗浄後、抗体に結合した抗原性蛋白質を 0.1M グリシン - 塩酸緩衝液 (pH 2.5) で溶出した。溶出液は直ちに 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて中性に戻した後、限外ろ過膜 (MW 10,000) で濃縮後、上記と同様にセファデックス G-75 スーパーファインカラム (1.5 x 100 cm) によるゲルろ過クロマトグラフィーを行い、純度の高い MF - 3 を約 300 μg 単離した。

10

【0150】

実施例 3

精製抗原性蛋白質の診断への応用

3 - 1) RAST法による特異的 I g E 抗体の測定方法

臭化シアンによるペーパーディスクの活性化、及び精製アレルゲンのペーパーディスクへのカップリングは宮本らの方法 (アレルギー、22巻、584 - 594頁、1973年) に準じて行った。ポリスチレンチューブにアレルゲンをカップリングさせたペーパーディスク 1 枚と患者血清 50 μl を加えて、室温で 3 時間インキュベートした。0.2% の Tween 20 を含む生理食塩水でペーパーディスクを 3 回洗浄後、ファルマシア製 RAST-RIA キットの ¹²⁵I 標識抗ヒト I g E 抗体 50 μl を加えて室温で一晩インキュベートした。再度 3 回洗浄後、ガンマカウンターで放射能を測定した。同時に測定したキットのリファレンス試薬で作成した標準曲線から I g E 抗体価を算出した。標準曲線の上限 (> 17.5 PRU/ml) より高い値が得られた検体は、ウマ血清で 10 倍、又は 100 倍に希釈してから再測定を行い、抗体価を算出した。

20

【0151】

3 - 2) 精製抗原性蛋白質 MF - 1、MF - 2、MF - 4、MF - 13 による診断

アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis: 以下 AD と略す。)、アレルギー性喘息 (Bronchial Asthma: 以下 BA と略す。) 及び両方の合併 (AD + BA) の患者に対して、マラセチア粗抗原による皮膚試験を実施したところ、AD 患者が 57 名中 43 名 (75%)、BA 患者が 919 名中 108 名 (12%)、AD + BA 患者が 102 名中 47 名が陽性であり、AD 患者で非常に高い陽性率を示した。また、皮膚テスト陽性の AD、BA、及び AD + BA 患者中、各々 100%、59%、及び 85% の患者が RAST 法による I g E 抗体測定において陽性であった。

30

【0152】

マラセチア粗抗原を用いた皮膚試験で陽性、更に RAST 陽性 (スコア 1 以上) の患者 76 例 (AD: 30 名, BA: 20 名, AD + BA: 26 名) を対象にして、3 種類の精製抗原性蛋白質 MF - 1、MF - 2、MF - 4 に対する I g E 抗体価を RAST 法 (RIA 法) で測定した。皮膚試験陰性者 (健常人) 12 名についても同様に抗原性蛋白質に対する I g E 抗体価を測定した。その結果、表 2 に示すように非常に高率に患者血清中に抗原性蛋白質に対する I g E 抗体が存在することが明確になった。特に、MF - 1、MF - 2 に対する陽性率が高かった。更に、驚くべきことに I g E 抗体価が非常に高く (表 3)、特に AD の患者では MF - 1、MF - 2 に対して平均 100 PRU、最高 1000 PRU を超える患者もあった。また、マラセチア粗抗原に対する RAST 陽性の患者全員の血清中に精製抗原性蛋白質 MF - 1、MF - 2、MF - 4 のいずれかに対する I g E 抗体が存在していた。

40

【0153】

また、マラセチア粗抗原を用いた皮膚試験で陽性、更に RAST 陽性の AD 患者 11 例について、MF - 13 に対する I g E 抗体価を RAST 法で測定した。その結果、11 名中 9 人が RAST 陽性であった。

【0154】

50

【表 2】

	アレルギー疾患患者 (R A S T 陽性率)				健康人 (n=12)
	B A (n=20)	A D + B A (n=26)	A D (n=30)	計 (n=76)	
MF-1	100 (20 / 20)	96 (25 / 26)	90 (27 / 30)	95 (72 / 76)	0 (0 / 12)
MF-2	100 (20 / 20)	100 (26 / 26)	87 (26 / 30)	95 (72 / 76)	0 (0 / 12)
MF-4	75 (15 / 20)	88 (23 / 26)	87 (26 / 30)	84 (64 / 76)	0 (0 / 12)

B A : アレルギー性喘息患者

A D : アトピー性皮膚炎患者

A D + B A : アトピー性皮膚炎とアレルギー性喘息合併患者

【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

【表 3】

	アレルギー疾患患者 (I g E抗体価 (PRU値))			
	BA (n=20)	AD+BA (n=26)	AD (n=30)	健常人 (n=12)
MF-1	1.65±0.66	14.73±4.15	119.73±56.95	<0.35
MF-2	4.32±2.59	16.01±4.45	112.84±52.23	<0.35
MF-4	3.54±2.08	9.75±2.43	94.75±42.43	<0.35

BA : アレルギー性喘息患者

AD : アトピー性皮膚炎患者

AD+BA : アトピー性皮膚炎とアレルギー性喘息合併患者

10

【0156】

3-3) 精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4の免疫学的性質

患者プール血清を用いたRAST cross-inhibitionテストで、3種の精製抗原性蛋白質(MF-1、MF-2、MF-4)の交差反応性を見たところ(表4)、互いに交差しなかった。即ち、それぞれに対して特異的I g E抗体が患者血清中に存在することが明らかとなった。

20

【0157】

【表 4】

固相抗原	固相抗原と患者I g Eとの結合を50%阻害するために必要な各種抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	MF-1	MF-2	MF-4
MF-1	0.038 (1)	8.6 (230)	52 (1370)
MF-2	>100(>7700)	0.013 (1)	>100(>7700)
MF-4	18 (290)	30 (480)	0.062 (1)

30

【0158】

次に、精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4を段階的に希釈し、抗原としての強さをDirect RAST EIA法により測定した。すなわち、精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4の希釈液を臭化シアンで活性化したペーパーディスクにカップリングし、ついでエタノールアミンでブロッキングした。その後、各ディスクに5倍希釈したプール血清50 μl ずつを加えて、その後、希釈した α -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒトI g E抗血清を反応させ、酵素基質を加え、415nmの吸光度を測定した。その結果を図12に示したが、MF-1が最も低濃度で患者血清I g Eに結合することが明らかとなった。

40

【0159】

また、精製抗原性蛋白質MF-3を段階的に希釈し、抗原としての強さをELISA法により測定した。すなわち、精製抗原性蛋白質MF-3の希釈液をマイクロプレートにコーティングした後、0.01%ツイーン20を含む生理食塩水で洗浄し、3%BSAを含むPBSでブロッキングし、0.01%ツイーン20を含む生理食塩水で洗浄した後、プール血清を加えた。37 $^{\circ}\text{C}$ 、2時間放置後、二次抗体であるペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトI g E抗血清を加え、次に基質溶液を加え、発色後、450nmの吸光度を測定した。その結

50

果を図13に示した。

【0160】

実施例4

精製抗原性蛋白質MF-2のシステイン残基のピリジルエチル化物の調製

精製抗原性蛋白質MF-2(0.04mg)をホウ酸緩衝食塩水(pH 8.0)200 µlに溶解し、これに800 µlの5M塩酸グアニジン、1 µlの4-ピニルピリジン、2 µlのトリブチルホスフィンを加えた。窒素ガス置換後、37 °Cで一晩反応、そしてHPLC(カラム: µ-Bondasphere C4-300、2×150mm、ウォーターズ(Waters)社製; 溶媒: 0.05% TFA / 水で15分洗浄、60分後0.05% TFA/アセトニトリル80%となるように直線的グラジエント溶出; 流速: 220 µl / 分; 検出: 220nm; カラム温度: 40 °C、図14)により単離精製した。得られたものは、非還元条件(メルカプトエタノール非存在)下でのSDS電気泳動において20kDa付近に泳動されること、また、リジルエンドペプチダーゼ消化後得られたペプチド断片(図15)のうち、配列番号47及び48のN末端アミノ酸配列を有するペプチド断片(各々28、20、31、15に溶出)がピリジルエチルシステイン基を有することから、MF-2のピリジルエチル化物であることが明らかとなった。得られたMF-2のピリジルエチル化物は、MF-2と同様にマラセチアアレルギー患者血清IgEへ結合することが、SDS電気泳動後のイムノブロッティングにより確認された。

10

【0161】

実施例5

精製抗原性蛋白質MF-3由来の抗原性断片ペプチドの単離

精製抗原性蛋白質MF-3(0.04 mg)をホウ酸緩衝食塩水(pH 8.0)100 µlに溶解し、これに900 µlの5M塩酸グアニジン、1 µlの4-ピニルピリジン、2 µlのトリブチルホスフィンを加えた。窒素ガス置換後、37 °Cで一晩反応、そしてHPLC(カラム: µ-Bondasphere C4-300、2×150mm、ウォーターズ(Waters)社製; 溶媒: 0.05% TFA / 水で15分洗浄、60分後0.05% TFA/アセトニトリル80%となるように直線的グラジエント溶出)により単離精製した。得られた精製抗原性蛋白質MF-3の塩酸グアニジン処理体に50mM N-エチルモルフィン-酢酸(pH 9.0)100 µl、リジルエンドペプチダーゼ(Achromobacter protease I、和光純薬社製)を加え、37 °Cで一晩反応後、HPLC(カラム: µ-Bondasphere C18-300、2×150mm、ウォーターズ(Waters)社製; 溶媒: 0.05% TFA / 水から0.05% TFA/アセトニトリル60%までの直線的グラジエント溶出; 流速: 200 µl / 分; 検出: 214nm; カラム温度: 40 °C; 図16)にかけた。各ペプチド断片を分取、凍結乾燥後、各ペプチド断片についてマラセチアアレルギー患者血清IgEに対する結合性を下記のようにELISA法により測定した。

20

30

【0162】

即ち、各ペプチド断片(各約10~100 pmol)をペプチドコーティングキット(宝酒造製)を用いて、マイクロプレートにコーティング後、0.01% ツィーン20を含む生理食塩水で洗浄し、3%BSAでブロックし、そして患者血清で処理した。その後、希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgE抗血清を反応させ、酵素基質を加え、一定時間後吸光度を測定し、抗原性断片を検出した。その結果、20.02、21.41、24.07分付近に溶出されるピークに患者血清IgEと結合する抗原性断片が存在すると思われる。これらのうち、21.41分のピークはHHQTYVNNLNAA XK(配列番号: 58、Xは未決定のアミノ酸である)からなるアミノ酸配列を有するペプチドが含まれていた。

40

【0163】

実施例6

リンパ球幼若化試験

被験者[アレルギー患者8名(表5中No. 1~8)、健常人2名(表5中No. 9、10)]より静脈血をヘパリン採血し、フィコール比重遠心法でリンパ球を分離した。細胞数が 5×10^5 / mlになるように10% FCS添加RPMI1640培地で調製後、0.2mlずつ96ウェルマイクロプレートに分注し、上記のマラセチア部分精製粗抗原2782を10、100 µg/mlとなるように、精製抗原性蛋白質(MF-1、MF-2、MF-4)を1、10 µg/mlとなるよ

50

うに添加し、5% CO₂、37℃で高湿度条件下に5日間培養した。4日目に、0.5 μCiのトリチウム化(³H) - チミジンを加えた。培養終了後、リンパ球を集め、液体シンチレーションカウンターで³H - チミジン取り込み量を測定した。実験は3連で行い、その平均値を用い、抗原非添加群と添加群の³H-チミジン取り込み量の比をS I (stimulation index) として表わした。結果を表5に示した。表5より明らかなように、患者No. 4由来のリンパ球は、精製抗原性蛋白質MF - 1、MF - 2に反応して増殖している。また、患者No. 1、No. 6由来のリンパ球は特にMF - 2に反応して増殖している。

【 0 1 6 4 】

【表 5】

SI (低濃度アレルゲン添加時/高濃度アレルゲン添加時*)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MF-1	7.7/2.5	4.3/1.4	1.0/0.9	4.2/3.7	2.6/2.0	2.1/1.0	1.7/1.2	2.1/1.7	1.1/0.5	2.0/0.7
MF-2	4.0/2.9	1.3/1.5	1.9/1.2	7.8/4.2	2.3/2.3	3.1/2.6	2.0/1.8	1.4/1.7	2.0/0.7	1.6/1.0
MF-4	1.8/1.3	1.2/1.1	1.0/0.9	2.5/1.4	1.2/1.8	1.9/1.7	1.1/0.9	1.3/1.3	1.9/0.8	0.9/0.6

*：低濃度アレルゲン添加時とはMF-1、MF-2、又はMF-4を1 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合を言う。
高濃度アレルゲン添加時とはMF-1、MF-2、又はMF-4を10 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合を言う。

1～8：アレルギー患者
9～10：健康人

10

20

30

40

50

【0165】

実施例 7

マラセチアアレルギー-皮内反応診断試薬および診断用滴定試薬の調製

精製されたアレルゲン活性成分を乾燥して粉末状で採取して、マラセチアアレルギー疾患に対する皮内反応診断試薬及びマラセチアアレルギー診断用滴定試薬として用いる。皮内反応診断試薬には0.5%フェノールを添加した0.9%生理食塩水を溶媒とし、アレルゲン活性成分の20万倍希釈液を調製して用いる。また、マラセチアアレルギー診断用滴定試薬には、アレルゲン活性成分を1mg/mlの濃度でハックス緩衝液に溶解し、これをヒスタミン遊離滴定用試薬の原液としてその希釈液を用いる。

【0166】

実施例8

減感作治療用抗原製剤の調製

精製されたアレルゲン活性成分を乾燥して粉末状で採取して、マラセチアアレルギー疾患に対する減感作治療剤として用いる。アレルゲン活性成分を1mg/mlの濃度で0.5%フェノールを添加した0.9%生理食塩水に溶解し、減感作治療用抗原の原液とする。

【0167】

実施例9

室内塵中の精製抗原性蛋白質MF-1の定量とマラセチアの培養

気管支喘息患者住居の室内や寝具などから掃除機により塵を一定条件で採集した。MF-1の定量は、ウサギポリクローナル抗体と実施例2-2)で得られたマウスモノクローナル抗体(M-40)を用いるサンドイッチELISA法で行い、塵は1:10(w/v)で抽出した上清をMF-1定量のための試料とした。マラセチアの培養のためには、塵を滅菌水で1:10(w/v)となるように混濁し、平板培地上にまいた。また、寝具表面に滅菌テープを一度貼り、剥がして平板培地上に置いた。培地はPDA、M40YA、ディクソン寒天培地を用いて、25℃で1週間培養後コロニー数を算定した。

【0168】

サンドイッチELISA法により、1ng/g塵以上のMF-1の定量が可能であり、寝具由来の塵24検体中16検体に87.1~1.1ng/g塵のMF-1が検出された。テープ法による寝具表面のマラセチアの培養成績は、24検体中10検体が陽性であった。なお、24検体中、サンドイッチELISA法によるMF-1の検出結果と培養成績の結果が一致していた検体は、陽性8検体、陰性6検体の合計14検体(58%)であった。

【0169】

実施例10

精製抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-3、MF-4、MF-5、MF-6、MF-7、MF-10、MF-13の部分アミノ酸配列の決定

N末端アミノ酸配列分析を常法により行った。その結果、MF-1は

Pro Gly Asp Pro Thr Ala Thr Ala Lys Gly Asn Glu Ile Pro Asp Thr Leu Met Gly Tyr
Ile Pro Trp Thr Pro Glu Leu Asp(配列番号:45)

のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0170】

MF-2については、N末端がブロックされていたため、ピリジルエチル化後、リジルエンドペプチダーゼで消化し、得られたペプチド断片をC18逆相HPLCにより分析した。得られた種々のピークを分取し、いくつかについてアミノ酸配列決定を行い、27.07、28.20、31.15分に溶出された3種類のペプチド断片のN末端アミノ酸配列をそれぞれ、

Val Glu Tyr Phe Gly Ile Asp Glu Gly Glu Pro Lys(配列番号:46)

Asp Asn Leu Thr Phe Ala Gln Asp Val Asn Cys Glu Phe(配列番号:47)、

Val Val Ile Val Ala Val Pro Gly Xaa Phe Thr Pro Thr Cys Thr Ala Asn His Val Pro
Xaa Tyr Xaa Glu(配列番号:48)(Xaaは未決定のアミノ酸である)、

と決定した。

【0171】

MF-3についても、N末端がブロックされていたため、ピリジルエチル化後、リジルエンドペプチダーゼで消化し、得られたペプチド断片をC18逆相HPLCにより分析した。得られた種々のピークを分取し、いくつかについてアミノ酸配列決定を行い、35.68、36.68

、29.15分に溶出された3種類のペプチド断片のN末端アミノ酸配列をそれぞれ
 Asp Gln Asp Pro Leu Thr Thr His His Pro Val Ile Gly Trp Asp Xaa Xaa Glu His Ala
 (配列番号: 49) (Xaaは未決定のアミノ酸である)、
 Ala Trp Trp Asn Val Val Asn Trp Ala Glu Ala Glu Lys (配列番号: 50)、
 Phe Xaa Gly Gly Gly His Ile Asn Xaa Ser Leu Phe (配列番号: 51) (Xaaは未決定
 のアミノ酸である)、
 と決定した。

【0172】

また、MF-4は、N末端アミノ酸配列分析の結果、
 Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu Pro Ala Ile Ser Gly 10
 Glu Ile Met Glu Thr His Tyr Glu Lys His (配列番号: 52)
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0173】

また、MF-5は、N末端アミノ酸配列分析の結果、
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Pro Tyr Asp Val Ile Val Ile Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr
 Val Ala Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gln (配列番号: 53) (Xaaは未決定のアミノ酸である
)
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0174】

また、MF-6は、N末端アミノ酸配列分析の結果、 20
 Arg Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ser Gly Gly Ile Gly Gln Pro Leu Ser Leu Leu Met
 Lys Leu Asn Pro Lys Val Thr Glu Leu Arg (配列番号: 54)
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0175】

また、MF-7は、N末端アミノ酸配列分析の結果、
 Gly Asn Asn Gly Leu Ser Glu Val Val Tyr Lys Pro Asp Xaa Gln Xaa Thr Xaa Glu Phe
 Xaa Val Ile (配列番号: 55) (Xaaは未決定のアミノ酸である)
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0176】

また、MF-10は、N末端アミノ酸配列分析の結果、 30
 Val Asp Gln Xaa Tyr Phe Gly Leu Xaa (配列番号: 56) (Xaaは未決定のアミノ酸で
 ある)
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0177】

また、MF-13は、N末端アミノ酸配列分析の結果、
 Ser Asn Val Phe Phe Asp Ile Thr Lys Asn Gly Ser Pro Leu Gly Thr Ile Lys Phe Lys
 Leu Phe Asp Asp Val (配列番号: 57)
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

その他の抗原性蛋白質はN末端ブロック等のために解析できなかった。

【0178】

既知蛋白質とのホモロジー検索の結果、MF-2は、配列番号: 48の部分アミノ酸配列
 がカンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) 由来のペルオキシゾーム膜蛋白質 (PMP-20
) と、MF-3は上記の部分アミノ酸配列が鉄/マンガン-スーパーオキシドジスムターゼ
 とホモロジーのある蛋白質であることが明らかとなった。また、MF-4は、上記のN末端
 アミノ酸配列が、MF-3と同じく鉄/マンガン-スーパーオキシドジスムターゼとホモロ
 ジーのある蛋白質であることが明らかとなった。また、MF-5は上記のN末端アミノ酸
 配列からデヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼとホモロジーのある蛋白質であることが明
 らかとなった。また、MF-6は上記のN末端アミノ酸配列からマレートデヒドロゲナー
 ゼとホモロジーのある蛋白質であることが明らかとなった。また、MF-7、MF-10
 についてはそれらのN末端アミノ酸配列からは既知の蛋白質とのホモロジーは見出せなか 40
 50

った。またMF-13は上記のN末端アミノ酸配列からシクロフィリンとホモロジーのある蛋白質であることが明らかとなった。

【0179】

実施例11

M. ファーフア由来の抗原性蛋白質MF-1遺伝子のクローニング

11-a) M. ファーフアからの全RNAの精製

M. ファーフアTIMM2782株の菌体より全RNAを得るため、該菌株を300mlのYNB培地(0.67%バクトイーストナイトロゲンベース、0.5%バクトカシトン、0.1%ツィーン60、2.0%グルコース、5%MEM-ビタミン液)で72時間培養後、3000rpmで15分間の遠心分離により集菌し、菌体を液体窒素により急速凍結した。乳鉢により凍結菌体を粉末状に破砕した後、RNAエクストラクションキット(ファルマシア社製)により1.3mgの全RNAを回収、精製した。

【0180】

11-b) MF-1遺伝子のRT-PCRによる増幅

実施例10に記載のMF-1蛋白質のN末端からのアミノ酸配列より推定されるオリゴヌクレオチドMF1F1とMF1F2を合成、精製しPCRのプライマーとした。MF1F1とMF1F2の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号:15と16に示す。実施例11-a)で精製された全RNA1μgを用いて、RNA PCR キットVer.2(宝酒造社製)を使用し、RT-PCR法によりMF-1cDNAを増幅した。具体的には、オリゴ(dT)₂₀-M4アダプタープライマーを用いて、1μgの全RNAからAMV逆転写酵素の反応(42、60分間)によりcDNAを合成した。このcDNAを鋳型とし、MF1F1とキットに含まれているM13M4プライマーを用いて、94で1分、55で2分、72で1.5分の温度シフトを40サイクル繰り返し、PCR反応を行った。さらに、このPCR反応液を鋳型として、2回目のPCR反応(nested PCR反応)を行った。この反応では、MF1F2とM13M4プライマーを使用した。PCRの結果、約570bpの長さのcDNA断片が増幅した。このcDNAをpUC118ベクター(宝酒造社製)にクローニングした後、塩基配列を決定した。その塩基配列を配列表の配列番号:17に示す。配列番号:17より予想されるアミノ酸配列は、MF-1蛋白質より決定したアミノ酸配列と一致したことから、このcDNA断片はMF-1遺伝子であることが明らかとなった。

【0181】

11-c) M. ファーフアのcDNAライブラリーの作製

オリゴテックス-dT30<スーパー>(宝酒造社製)を用いて、実施例11-a)の全RNA1mgから20μgのポリ(A)⁺RNAを精製した。該ポリ(A)⁺RNA5μgを用いて、cDNA合成キット(宝酒造社製)によりcDNAを合成した。合成されたcDNAとラムダファージベクターSHloxTM(ノヴァジェン社製)と連結した後、ファージメーカーシステムとファージパックエクストラクト(ノヴァジェン社製)によりインビトロパッケージングを行い、cDNAライブラリーを構築した。

【0182】

11-d) MF-1cDNAのクローニング

実施例11-c)で得られたcDNAライブラリーを宿主大腸菌ER1647株に感染させ、トップアガロス(0.7%バクトアガーを含むLB培地)と混合後、LBプレート上に重層し、37で一晩培養することによりプラークを形成させた。生じたプラークをナイロンメンブレン(Hybond-N、アマシャム社製)へ移し、プラークハイブリダイゼーションを行った。実施例11-b)で得られたMF-1の約570bpのcDNA断片を、ランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造社製)を用いて[³²P]dCTPで標識し、ハイブリダイゼーションのプローブとして使用した。1.6×10⁵個のプラークをスクリーニングした後、陽性のクローンの中からシグナルの強い10個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージからMF-1cDNAを含む領域を自動的にサブク

10

20

30

40

50

ローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の600bpのcDNAを含むpMF1-7を選んだ。該cDNAをpUC118ベクター(宝酒造社製)へサブクローニングし、塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号:1に示す通りであり、MF-1遺伝子は、配列表の配列番号:8に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

【0183】

11-e) M.ファーフアからのゲノムDNAの精製

M.ファーフアTIMM2782株の菌体よりゲノムDNAを得るため、該菌株を200mlのYNB培地で72時間培養後、3000rpmで15分間の遠心分離により集菌し、洗浄液(0.9%NaCl、0.05%ツイーン80)で5回、PKバッファー(0.15M NaCl、0.1M Tris-HCl(pH7.5)、10mM EDTA)で3回洗浄した。菌体を8mlのPKバッファーに懸濁した後、等容量のガラスビーズ(径425~600μm、シグマ社製)を加え、ミニビービーター(バイオスペースプロダクツ社製)により菌体を破碎した。菌破碎液にプロテアーゼKとSDSをそれぞれ終濃度0.15mg/ml、1%(w/v)となるように加え、ゆっくりと攪拌しながら50℃で3時間処理した。該破碎液をフェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、及びクロロホルム抽出(各1回)し、エタノール沈殿を行って核酸を精製した。1000rpmで15分間の遠心分離により得られた核酸をTEバッファー(10mM Tris-HCl、1mM EDTA)に溶解した後、RNアーゼAを終濃度40μg/mlとなるように加え、37℃で40分間処理した。該溶液をフェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出(各1回)し、エタノール沈殿によりDNAを回収、精製した。

10

20

【0184】

11-f) MF-1ゲノムDNAのクローニング

実施例11-e)で得られたゲノムDNAをBamHI又はPstIにより完全切断した後、それぞれの断片をpUC118ベクターにクローニングし、2種類のゲノムDNAライブラリーを作製した。実施例11-d)で得られたMF-1のcDNAをプローブとして用いて、該ライブラリーからMF-1ゲノムDNAをコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。BamHI断片を含むライブラリーより8.5kbp、PstI断片を含むライブラリーより4.9kbpのDNAを含むクローンが得られた。4.9kbpのPstI断片について、cDNAの塩基配列をもとにして、塩基配列を決定した。MF-1遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列は、配列表の配列番号:18に示す。この塩基配列よりMF-1遺伝子は、配列表の配列番号:19に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

30

【0185】

さらに、ゲノムDNAには37bpと39bpのイントロンが2ヶ所存在していることが明らかになった。ゲノムDNAとcDNAの関係を図23に示す。

【0186】

実施例12

M.ファーフア由来の抗原性蛋白質MF-2遺伝子のクローニング

40

12-a) MF-2遺伝子のRT-PCRによる増幅

実施例10に記載のMF-2蛋白質の内部アミノ酸配列より推定されるオリゴヌクレオチドMF2F1を合成、精製しPCRのプライマーとした。MF2F1の塩基配列は、配列表の配列番号:20に示す。実施例11-b)に記載の方法に従って、RT-PCRを行い、MF-2cDNA断片を増幅した。PCR反応にはMF2F1とM13M4プライマーを用いた。1回目のPCR反応の結果、約280bpの長さのcDNA断片が増幅した。増幅したcDNA断片の塩基配列を配列表の配列番号:21に示す。配列番号:21より予想されるアミノ酸配列は、MF-2蛋白質より決定したアミノ酸配列と一致したことから、このcDNA断片はMF-2遺伝子であることが明らかとなった。

【0187】

50

12 - b) MF - 2 cDNA のクローニング

実施例 11 - d) に記載の方法により、実施例 12 - a) で得られた配列番号：21 で表わされる約 280 bp の MF - 2 cDNA 断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性のクローンの中からシグナルの強い 10 個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージから MF - 2 cDNA を含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の 550 bp の cDNA を含む pMF2 - 2 を選んだ。該 cDNA を pUC118 ベクターへサブクローニングし、塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号：2 に示す通りであり、MF - 2 遺伝子は配列表の配列番号：9 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

10

【0188】

実施例 13

M. ファーフア由来の抗原性蛋白質 MF - 3 遺伝子のクローニング

13 - a) MF - 3 遺伝子の RT - PCR による増幅

実施例 10 に記載の MF - 3 蛋白質の内部アミノ酸配列より推定されるオリゴヌクレオチド MF3F1、MF3F2、MF3R3 を合成、精製し PCR のプライマーとした。MF3F1、MF3F2、MF3R3 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号：22 ~ 24 に示す。実施例 11 - b) に記載の方法に従って、RT - PCR を行い、MF - 3 cDNA 断片を増幅した。1 回目の PCR 反応には MF3F1 と M13M4 プライマーを用い、2 回目の PCR 反応には MF3F1 と MF3R3 の組み合わせと MF3F2 と M13M4 プライマーの組み合わせを用いた。PCR 反応の結果、MF3F1 と MF3R3 の組み合わせでは約 380 bp、MF3F2 と M13M4 プライマーの組み合わせでは約 280 bp の長さの cDNA 断片が増幅した。増幅した cDNA 断片の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号：25 と 26 に示す。配列番号：25 と 26 より予想されるアミノ酸配列は、MF - 3 蛋白質より決定したアミノ酸配列と一致したことから、これらの cDNA 断片は MF - 3 遺伝子であることが明らかとなった。

20

【0189】

13 - b) MF - 3 cDNA のクローニング

実施例 11 - d) に記載の方法により、実施例 13 - a) で得られた配列表の配列番号：25 で表わされる約 380 bp の MF - 3 cDNA 断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性のクローンの中からシグナルの強い 6 個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージから MF - 3 cDNA を含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の約 750 bp の cDNA を含む pMF3 - 1 を選び、該 cDNA の塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号：3 に示す通りであり、MF - 3 遺伝子は配列表の配列番号：10 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

30

【0190】

実施例 14

M. ファーフア由来の抗原性蛋白質 MF - 4 遺伝子のクローニング

14 - a) MF - 4 遺伝子の RT - PCR による増幅

実施例 10 に記載の MF - 4 蛋白質の N 末端アミノ酸配列より推定されるオリゴヌクレオチド MF4F1 と MF4F2 を合成、精製し PCR のプライマーとした。MF4F1 と MF4F2 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号：27 と 28 に示す。実施例 11 - b) に記載の方法に従って、RT - PCR を行い、MF - 4 cDNA 断片を増幅した。1 回目の PCR 反応には MF4F1 と M13M4 プライマーを用い、2 回目の PCR 反応には MF4F2 と M13M4 プライマーを用いた。PCR 反応の結果、約 700 bp の長さの cDNA 断片が増幅した。増幅した cDNA 断片の塩基配列を配列表の配列番号：29 に示す。配列番号：29 より予想されるアミノ酸配列は、MF - 4 蛋白質より決定したア

40

50

ミノ酸配列と一致したことから、この c D N A 断片は M F - 4 遺伝子であることが明らかとなった。

【 0 1 9 1 】

1 4 - b) M F - 4 c D N A のクローニング

実施例 1 1 - d) に記載の方法により、実施例 1 4 - a) で得られた配列表の配列番号 : 2 9 で表わされる約 7 0 0 b p の M F - 4 c D N A 断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性のクローンの中からシグナルの強い 4 個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージから M F - 4 c D N A を含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の約 8 2 0 b p の c D N A を含む p M F 4 - 4 を選び、該 c D N A の塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号 : 4 に示す通りであり、M F - 4 遺伝子は配列表の配列番号 : 1 1 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

【 0 1 9 2 】

実施例 1 5

M . ファーフア由来の抗原性蛋白質 M F - 5 遺伝子のクローニング

1 5 - a) M F - 5 遺伝子の R T - P C R による増幅

実施例 1 0 に記載の M F - 5 蛋白質の N 末端アミノ酸配列より、この蛋白質は D L D H とホモロジーがあるものと考えられたため、該アミノ酸配列と他生物の D L D H アミノ酸配列を基にアミノ酸配列 G Y V A A I K A をコードするオリゴヌクレオチド混合物 M F 5 F 1 と、他生物間の D L D H アミノ酸配列を比較しホモロジーの高い領域 (アミノ酸配列 M L A H K A E E) に対応するオリゴヌクレオチド M F 5 R 2 を合成、精製し P C R のプライマーとした。M F 5 F 1 と M F 5 R 2 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号 : 3 0 と 3 1 に示す。実施例 1 1 - b) に記載の方法に従って、R T - P C R を行い、M F - 5 c D N A 断片を増幅した。1 回目の P C R 反応には M F 5 F 1 と M 1 3 M 4 プライマーを用い、2 回目の P C R 反応には M F 5 F 1 と M F 5 R 2 を用いた。P C R 反応の結果、約 9 0 0 b p の長さの c D N A 断片が増幅した。増幅した c D N A 断片の塩基配列を配列表の配列番号 : 3 2 に示す。配列番号 : 3 2 より予想されるアミノ酸配列は、M F - 5 蛋白質より決定したアミノ酸配列と一致したことから、この c D N A 断片は M F - 5 遺伝子であることが明らかとなった。

【 0 1 9 3 】

1 5 - b) M F - 5 c D N A のクローニング

実施例 1 1 - d) に記載の方法により、実施例 1 5 - a) で得られた配列表の配列番号 : 3 2 で表わされる約 9 0 0 b p の M F - 5 c D N A 断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性のクローンの中からシグナルの強い 1 2 個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージから M F - 5 c D N A を含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の約 1 . 6 k b p の c D N A を含む p M F 5 - 6 と p M F 5 - 7 を選び、該 c D N A の塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号 : 5 と 3 3 に示す通りであり、M F - 5 遺伝子は配列表の配列番号 : 1 2 と 3 4 に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。これら 2 種類の遺伝子は、塩基配列で 9 2 % 、コードするアミノ酸配列で 9 6 % のホモロジーを有し、実施例 1 0 に記載の M F - 5 蛋白質より決定したアミノ酸配列とほぼ一致したため、両方とも M F - 5 遺伝子であることが明らかとなった。

【 0 1 9 4 】

実施例 1 6

M . ファーフア由来の抗原性蛋白質 M F - 6 遺伝子のクローニング

1 6 - a) M F - 6 遺伝子の R T - P C R による増幅

実施例 1 0 に記載の M F - 6 蛋白質の N 末端アミノ酸配列から推定されるオリゴヌクレオチド混合物 M F 6 F 1 と M F 6 F 2 を合成、精製し P C R のプライマーとした。M F 6

10

20

30

40

50

F 1 と M F 6 F 2 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号：35と36に示す。実施例 11 - b) に記載の方法に従って、RT - PCRを行い、MF - 6 cDNA断片を増幅した。1回目のPCR反応にはMF 6 F 1とM 1 3 M 4プライマーを用い、2回目のPCR反応にはMF 6 F 2とM 1 3 M 4プライマーを用いた。PCR反応の結果、約1.0 kbpの長さのcDNA断片が増幅した。増幅したcDNA断片をpUC 118ベクターへクローニングした結果、制限酵素切断パターンが違う2種類のcDNAが検出された。これらのcDNA断片の塩基配列は配列表の配列番号：37と38に示す通りであり、塩基配列で90%、塩基配列より予想されるアミノ酸配列で94%のホモロジーを有するが、異なる遺伝子であった。配列番号：37と38より予想されるアミノ酸配列は、実施例10に記載のMF - 6蛋白質より決定したアミノ酸配列とほぼ一致したことから、これらのcDNA断片はMF - 6遺伝子であることが明らかとなった。

10

【0195】

16 - b) MF - 6 cDNAのクローニング

実施例11 - d)に記載の方法により、実施例16 - a)で得られた配列表の配列番号：37及び38で表わされる約1.0 kbpのMF - 6 cDNA断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性のクローンの中からシグナルの強い10個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージからMF - 6 cDNAを含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の約1.2 kbpのcDNAを含むpMF 6 - 13を選び、該cDNAの塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号：6に示す通りであり、MF - 6遺伝子は配列表の配列番号：13に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。この遺伝子は、N末端のアミノ酸配列のコード領域を欠いているが、実施例16 - a)で得られたMF - 6のcDNA断片とほぼ一致したため、MF - 6遺伝子であることが明らかとなった。

20

【0196】

実施例17

M. ファーフア由来の抗原性蛋白質MF - 7遺伝子のクローニング

17 - a) MF - 7遺伝子のRT - PCRによる増幅

実施例10に記載のMF - 7蛋白質のN末端アミノ酸配列から推定されるオリゴヌクレオチド混合物MF 7 F 1とMF 7 F 2を合成、精製しPCRのプライマーとした。MF 7 F 1とMF 7 F 2の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号：39と40に示す。実施例11 - b)に記載の方法に従って、RT - PCRを行い、MF - 7 cDNA断片を増幅した。1回目のPCR反応にはMF 7 F 1とM 1 3 M 4プライマーを用い、2回目のPCR反応にはMF 7 F 2とM 1 3 M 4プライマーを用いた。PCR反応の結果、約0.4 kbpの長さのcDNA断片が増幅した。増幅したcDNA断片をpUC 118ベクターへクローニングした。このcDNA断片の塩基配列は配列表の配列番号：41に示す通りである。配列番号：41より予想されるアミノ酸配列は、実施例10に記載のMF - 7蛋白質より決定したアミノ酸配列とほぼ一致したことから、これらのcDNA断片はMF - 7遺伝子であることが明らかとなった。

30

40

【0197】

17 - b) MF - 7 cDNAのクローニング

実施例11 - d)に記載の方法により、実施例17 - a)で得られた配列表の配列番号：41で表わされる約0.4 kbpのMF - 7 cDNA断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。陽性のクローンの中からシグナルの強い5個のクローンについて、さらに解析した。すなわち、大腸菌内でのオートマチックサブクローニングにより、これらのファージからMF - 7 cDNAを含む領域を自動的にサブクローニングされたプラスミドを有する大腸菌を得た。これらの大腸菌からプラスミドを精製し、最長の約0.4 kbpのcDNAを含むpMF 7 - 1を選び、該cDNAの塩基配列を決定した。その塩基配列は配列表の配列番号：7に示す通りであり、MF - 7遺伝子は配列表の

50

配列番号：14に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

【0198】

実施例18

MF-1オーバーラップペプチドの合成及び抗体結合部位の推定

18-a) MF-1オーバーラップペプチドの合成

ペプチド合成機(PSSM-8、(株)島津製作所製)を用いて、MF-1オーバーラップペプチドを合成した。各ペプチドのアミノ酸配列は配列番号：8に示すMF-1の配列に基づき、全配列を33種類のペプチドで網羅した(図21)。各ペプチドは15残基(一部16または17残基)のアミノ酸からなり、アミノ酸10残基ずつをオーバーラップしている。

10

【0199】

各ペプチドのC末端アミノ酸のFmoc体があらかじめ結合(0.2~0.5mmol/g樹脂)した樹脂(50mg)をまず、30%ピペリジン/DMF(0.5ml)で処理してFmoc基を除去した。DMF(0.6ml×5回)で樹脂を洗浄後、PyBOP及びHOBtで活性化した目的のアミノ酸のFmoc体(C末端アミノ酸の量に対して10倍過剰量を含むDMF溶液として用いた)及びN-メチルモルホリン/DMF溶液を加え、室温で30分間反応させた。DMF(0.6ml×5回)で樹脂を洗浄した。この一連の操作を、目的とする配列を有するペプチドが得られるまで繰り返した。

【0200】

次に、この樹脂にTFAを主成分とする混合溶液(94%TFA、5%アニソール、1%エタンジチオール(EDT))(0.7ml)を加えて室温で2時間放置した(尚、トリプトファン含有ペプチドに対しては、TFA(94%)、アニソール(3%)、EDT(3%)、2-メチルインドール(5mg)を、アルギニン含有ペプチドに対しては、TFA(82%)、H₂O(5%)、チオアニソール(5%)、EDT(3%)、エチルメチルスルフィド(2%)、フェノール(3%)の混合溶液を用い、アルギニン含有ペプチドの場合は室温で8時間放置した)。樹脂を濾去し、濾液にエチルエーテル(14ml)を加えて結晶化した。析出した結晶を遠心分離(3000rpm、10分)で回収し、エチルエーテルで洗浄後、再び遠心分離して上清を除き、結晶を減圧乾燥した。得られた結晶は逆相HPLCで純度を検定した。さらに、必要に応じて、LC-MSで分子量を確認し、逆相HPLCで精製した。

20

30

【0201】

18-b) ヒト血清中のIgE抗体に対する結合ペプチドの同定

ペプチドコーティングキット(宝酒造社製)を用いて、96ウェルマイクロプレートに図21のペプチドを1μg/ウェルとなるようにコーティングした。各ウェルにM.ファーフアRAST陽性の患者血清13人分、及びプール血清1、計14種の血清の2倍希釈液を加え、マニュアルに従い反応させた後、 α -ガラクトシダーゼ標識抗IgE抗体、続いて酵素基質を加え、415nmの吸光度を測定した。33個のペプチドに対する健常者由来の血清における吸光度が平均20であった。この2倍の40以上の吸光度を示したものを陽性とし、さらに、40以上を4段階に分け図22に結果を示した。M.ファーフアRAST陽性の患者血清は、4~5種類のペプチド断片に対して強く反応した。

40

【0202】

18-c) MF-1に対するマウスモノクローナル抗体のエピトープの推定

実施例18-b)に記載の図21のペプチドをコーティングしたマイクロプレートに、MF-1に対する3種類のモノクローナル抗体である、M-40、MmAb37およびMmAb51を加え反応させた後、 α -ペルオキシダーゼ標識抗IgG抗体、続いて酵素基質を加え、450nmの吸光度を測定した。M-40およびMmAb37は、ペプチド5に反応し、MmAb51はペプチド25、26に反応した。図22の結果を合わせて考えると、これらのペプチドにはB細胞エピトープが含まれていることが明らかとなった。

【0203】

実施例19

50

組換えマラセチア抗原性蛋白質の診断への応用

19 - a) RAST法による特異的 I g E 抗体の測定方法

臭化シアンによるペーパーディスクの活性化、及び組換えマラセチア抗原性蛋白質のペーパーディスクへのカップリングは宮本らの方法（アレルギー、22巻、584-594頁、1973年）に準じて行った。ポリスチレンチューブに該抗原性蛋白質をカップリングさせたペーパーディスク1枚と患者血清50 μ lを加えて、室温で3時間インキュベートした。0.2%の Tween20を含む生理食塩水でペーパーディスクを3回洗浄後、ファルマシア製 RAST-RIAキットの¹²⁵I 標識抗ヒト I g E 抗体50 μ lを加えて室温で一晩インキュベートした。再度3回洗浄後、ガンマカウンターで放射能を測定した。同時に測定したキットのリファレンス試薬で作成した標準曲線から I g E 抗体価を算出した。標準曲線の上限 (>17.5 PRU/ml) より高い値が得られた検体は、ウマ血清で10倍、又は100倍に希釈してから再測定を行い、抗体価を算出した。

10

【0204】

19 - b) 組換えマラセチア抗原性蛋白質 rMF - 1、rMF - 2、rMF - 4 による診断

アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis: 以下 AD と略す。) 、アレルギー性喘息 (Bronchial Asthma: 以下 BA と略す。) 及び両方の合併 (AD + BA) の患者に対して、該抗原性蛋白質による皮膚試験を実施したところ、AD 患者が57名中43名 (75%) 、BA 患者が919名中108名 (12%) 、AD + BA 患者が102名中47名が陽性であり、AD 患者で非常に高い陽性率を示した。また、皮膚テスト陽性の AD、BA、及び AD + BA 患者中、各々100%、59%、及び85%の患者が RAST法による I g E 抗体測定において陽性であった。

20

【0205】

該抗原性蛋白質を用いた皮膚試験で陽性、更に RAST陽性 (スコア1以上) の患者76例 (AD: 30名, BA: 20名, AD + BA: 26名) を対象にして、3種類の組換え抗原性蛋白質 rMF - 1、rMF - 2、rMF - 4 に対する I g E 抗体価を RAST法 (RIA法) で測定した。皮膚試験陰性者 (健常人) 12名についても同様に該抗原性蛋白質に対する I g E 抗体価を測定した。その結果、非常に高率に患者血清中に抗原性蛋白質に対する I g E 抗体が存在することが明確になった。特に、rMF - 1、rMF - 2 に対する陽性率が高かった。更に、驚くべきことに I g E 抗体価が非常に高く、特に AD の患者では rMF - 1、rMF - 2 に対して平均100 PRU、最高1000 PRU を超える患者もあった。また、マラセチア抗原に対する RAST陽性の患者全員の血清中に組換え抗原性蛋白質 rMF - 1、rMF - 2、rMF - 4 のいずれかに対する I g E 抗体が存在していた。

30

【0206】

配列表

配列番号: 1

配列の長さ: 618

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

40

配列:

```

GCCTGGTGAT CCTACTGCTA CTGCCAAGGG TAACGAGATC CCCGACACCC TCATGGGCTA    60
CATCCCCTGG ACCCCGGAGC TCGACTCGGG TGAGGTGTGT GGTATCCCCA CCACCTTCAA    120
GACCCGCGAC GAGTGGAAAG GCAAGAAGGT TGTGATTGTC TCGATCCCGG GTGCCTACAC    180
CCCCATCTGC CACCAGCAGC ACATCCCCCC GCTTGTGAAG CGTGTGGATG AGCTCAAGGC    240
CAAGGGTGTC GACGCCGTGT ACGTCATTGC GTCGAACGAC CCCTTCGTCA TGGCTGCCTG    300
GGGCAACTTC AACAACGCCA AGGACAAGGT CGTCTTTGCC ACCGACATTG ACCTGGCCTT    360
CTCCAAGGCT CTCGGCGCGA CGATCGACCT GAGCGCCAAG CACTTTGGTG AGCGCACGGC    420
CCGCTACGCT CTGATCATTG ACGACAACAA GATTGTGCAC TTTGCTTCGG ACGAGGGCGA    480
CACTGGCAAG CTCCAGAACG CGTCGATCGA CACGATCCTC ACCAAGGTCT AAAATGGCGC    540

```

50

ATGTGCGTTG TGTGACCACT ACCTAAAGGG TCCGTAGAGT TCCAAGTCAA GTCGTATATT 600
 TTTTTTTTAA AAAAAAAAAA 618

配列番号 : 2

配列の長さ : 551

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

CGGAAATTGG CTCGACGATC CCAACGCTA CGTTTGCATA CGTGCCGTAC AGCCCCGAGC 60
 TCGAGGACCA CAAAGTGTGT GGCATGCCGA CGAGCTTCCA GAGCCACGAG CGCTGGAAGG 120
 GCAAGAAGGT GGTGATTGTC GCGGTGCCCG GTGCGTTCAC GCCGACGTGC ACCGCGAACC 180
 ATGTGCCGCC GTACGTGGAA AAGATCCAGG AGCTCAAGAG CAAGGGCGTC GACGAGGTCG 240
 TGGTGATCTC GGCGAACGAC CCGTTCGTGC TGAGCGCATG GGCATCACC GAGCACGCCA 300
 AGGACAACCT GACGTTTGC GAGGACGTCA ACTGCGAGTT CTCCAAGCAC TTTAACGCGA 360
 CGCTGGACCT GTCGTCGAAG GGCATGGGCC TGCGCACCGC GCGCTACGCG CTGATCGCGA 420
 ACGACCTCAA GGTGAGTAC TTTGGCATCG ACGAGGGCGA GCCGAAGCAG TCGTCGGCCG 480
 CGACGGTGCT GAGCAAGCTG TAGTGCCGTT CTACTTAGTC AAACAATCGG GTATAGTCGC 540
 GTAAAAAAAAA A 551

10

20

配列番号 : 3

配列の長さ : 728

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

GGGAACGTCA TGA CTGAGTA CACTCTCCCT CCTCTGCCCT ACGCCTACGA TGCCTGGAG 60
 CCGTTTATCT CTAAGGAGAT CATGACGGTC CACCACGACA AGCACCACCA GACCTACGTG 120
 AACAACTCA ACGCCGCCGA GAAGGCGTAC GCTGAGGCGA CGGCCGCGAA CGACGTGCTT 180
 AAGCAGATCC AGCTGCAGAG TGCGATCAAG TTCAACGGCG GTGGCCACAT CAACCACTCG 240
 CTGTTCTGGA AGAACCTGGC CCCCAGAGC GAGGGTGGTG GCCAACTGAA CGATGGCCCT 300
 CTCAAGCAGG CCATCGAGCA GGAGTTCGGC GACTTTGAGA AGTTCAAGAC GACCTTCAAC 360
 ACGAAGGCGG CCGGCATCCA GGGTTCGGGC TGGCTGTGGC TCGGTGTTGC CCCGACGGGC 420
 AACCTCGACC TGGTCGTTGC CAAGGACCAG GACCCGCTCA CGACGCACCA CCCCGTCATT 480
 GGCTGGGATG GCTGGGAGCA CGCCTGGTAC CTGCAGTACA AGAACGACAA GGCTTCCTAC 540
 CTTAAGGCCT GGTGGAACGT GGTGAACTGG GCCGAGGCCG AGAAGCGCTT CCTCGAGGGT 600
 AAGAAGAAGG CCCAGCTGTA ATGGCACGTT TGTAGATGAT GAACGACACA CGATTTTAGG 660
 TCGCACGGCC GAGGCTACTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 720
 AAAAAAAAAA 728

30

40

配列番号 : 4

配列の長さ : 812

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

GATGTTACAG CTTGCTACGC GCCGCGCTGC TGCCGCCCCC CTCGCGAACG CCGCCCAGAT 60

50

GGGTGTGCGC	ACCAAGTACA	CGCTGCCGCC	GCTGCCGTAC	GACTACGGCG	CGCTCGAGCC	120	
GGCGATCTCG	GGCGAGATCA	TGGAGACGCA	CTACGAGAAG	CACCACCGCA	CCTACGTCAA	180	
CAACCTGAAC	GCCGCGGAGG	ACAAGCTGAT	CGACGCGCTC	CCGCAGCAGA	GCCCGCTCGG	240	
CGAGATTGCG	CAGCTGAACG	CGATCAAGTT	CAACGGCGGT	GGCCACATCA	ACCACTCGCT	300	
CTTCTGGAAG	AACCTCGCGC	CGACGAACAA	GGGCGGCGGC	GAGCTCGACT	CGGGCGAGCT	360	
GCGCTCCGCG	ATCGACCGCG	ACTTTGGCTC	GGTCGACGCC	ATGAAGGAGA	AGTTCAACGC	420	
GGCGCTCGCG	GGCATCCAGG	GCAGCGGCTG	GGGCTGGCTC	GGCCTGAACC	CCACGACGCA	480	
GAAGCTCGAC	ATCATCACGA	CCGCGAACCA	GGACCCGCTC	CTGTGCGACA	AGCCGCTGAT	540	
TGGCATCGAT	GCGTGGGAGC	ACGCGTTCTA	CCTGCAGTAC	AAGAACGTCA	AGGCCGACTA	600	
CTTCAAGGCG	ATCTGGACCG	TGATCAACTT	TGAGGAGGCC	GAGAAGCGTC	TCAAGGAGGC	660	10
GCTCGCCAAG	AACTAGACAC	GTTCGGTTTT	TTTTTCTCC	GTAGCTTCGC	AATGACCTGC	720	
CCACGCTAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	780	
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AA			812	

配列番号 : 5

配列の長さ : 1607

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

GTTGAGCTCT	GTGCTGAAGC	GCTCGCCGCA	GCTCTCTACT	AAGGCTCTGA	AGCAGCCGCT	60	
TACGCTCCCG	CGTCTGCTCC	CCATTGGCGC	TACGCCGCTG	GCTCGTGGCT	ACGCCTCGAG	120	
CTCGGAGCCG	TACGATGTCA	TTGTGATCGG	CGGTGGCCCC	GGTGGCTACG	TGGCCGCCAT	180	
CAAGGCCGCA	CAGGGTGGTC	TGAAGACTGC	GTGTGTTGAG	AAGCGTGGTG	CCCTTGGCGG	240	
TACGTGCTTG	AACGTGGGCT	GTATCCCGTC	CAAGTCGTTG	CTCAACAAC	CGCACATCTA	300	
CCACCAGACG	CAGCATGACC	TCAAGAACCG	CGGTATTGAC	GTCGGCGACA	TTAAGCTGAA	360	
CCTGCCGCAG	ATGCTCAAGG	CGAAGGAGAG	CTCGGTTACT	GCACTACCA	AGGGTGTCTGA	420	
GGGTCTGTTC	AAGAAGAACA	AGGTCGACTA	CATCAAGGGC	ACTGCCAGCT	TTGCCAGCCC	480	
CACGACGGTG	GACGTGAAGC	TGAACGATGG	TGGTGAGCAG	CAGATCGAGG	GCAAGAACAT	540	30
CATCATTGCA	ACCGGCTCTG	AGGTGACGCC	CTTCCCGGGT	GTTGAAATCG	ACGAGGAGCA	600	
GATCATCAGC	TCGACGGGTG	CGCTCTCGCT	CAAGGAGGTG	CCCGAGAAGA	TGGTCTGTGAT	660	
CGGTGGTGGT	GTGATCGGTC	TTGAGCTTGG	CAGCGTGTGG	ACCCGTCTGG	GTGCCAAGGT	720	
GACCGTGGTC	GAGTTCAGG	AGGCGATCGG	TGGTCCCGGT	CTGGACAGCG	AGGTGAGCCA	780	
ACAGTTCAAG	AAGCTGCTCG	AGAAGCAGGG	CATCCACTTC	AAGCTCGGCA	CCAAGGTCAA	840	
CGGCATTGAG	AAGGAGAACG	GCAAGGTGAC	TGTCCGCACT	GAGGGTAAGG	ATGGCAAGGA	900	
GCAGGACTAC	GATGCCAATG	TTGTGCTCGT	GTCCATTGGC	CGTCGCCCGG	TGACCAAGGG	960	
CCTCAACCTC	GAGGCGATCG	GGGTCGAGCT	CGACAAGAAG	GGCCGCGTGG	TGGTGGACGA	1020	
CGAGTTCAAC	ACGACGTGCA	AGGGTGTCAA	GTGCATTGGT	GACGCGACGT	TCGGCCCCAT	1080	
GCTTGCGCAC	AAGGCCGAGG	ACGAGGGTAT	TGCCGTGCGC	GAGATGCTTG	CGACCGGTTA	1140	40
TGGCCACGTC	AACTACGACG	TGATCCCTGC	GGTGATCTAC	ACGCACCCTG	AGATCGCGTG	1200	
GGTCGGCAAG	TCGGAGCAGG	AGCTCAAGAA	CGAGGGCGTC	CAGTACAAGG	TGGGCAAGTT	1260	
CCCCTTCTCG	GCCAACCTCG	GTGCCAAGAC	CAACGTGAC	ACCGACGGCT	TCGTCAAGTT	1320	
CCTCGTGGAG	AAGGAGACCG	ACAAGATTCT	CGGCGTGTTC	ATTATCGGCC	CGAACGCTGG	1380	
CGAGATGATC	GCCGAGGCTG	GCCTGGCTAT	GGAGTACGGC	GCGAGTGCTG	AGGATGTTGC	1440	
GCGCACCTGC	CACGCGCACC	CGACGCTCTC	CGAGGCGTTC	AAGGAGGGTG	CGATGGCCGC	1500	
CTACTCGAAG	CCATCCACT	TTTGATTTTCG	TAGGCTACCC	CCGATAGGCG	CCCATACTGT	1560	
TTTCTCTCCA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA		1607	

配列番号 : 6

50

配列の長さ：940

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

CGGATCTCTC	GCACATCAAC	ACCCCCGCGG	TGACTTCGGG	CTACGCCAG	GACGACCTCG	60	
AGGGTGCCGT	CGACGGTGCG	GAGATTGTGC	TGATCCCCGC	CGGTATGCCG	CGCAAGCCCC	120	
GCATGACCCG	TGACGACCTG	TTCAACTCGA	ACGCCTCGAT	TGTCCGTGAC	CTCGCCAAGG	180	
TCGTGGCTAA	GGTCGCCCA	AAGGCTTACA	TCGGCGTCAT	CTCGAACCCC	GTCAACTCGA	240	10
CGGTGCCGAT	CGTCGCTGAG	GTGTTCAAGA	AGGCCGGTGT	GTACGACCCC	AAGCGCCTCT	300	
TCGGTGTGAC	CACGCTCGAC	ACCACGCGCG	CGGCCACCTT	CCTGTCGGGC	ATTGCTGGCT	360	
CGGACCCGCA	GACCACCAAC	GTCCCCGTCA	TTGGTGGCCA	CTCGGGTGTG	ACCATTGTGC	420	
CCCTGATCTC	GCAGGCCGCC	CAGGGTGACA	AGGTGCAGGC	TGGCGAGCAG	TACGACAAGC	480	
TTGTGCACCG	CATCCAGTTC	GGTGGTGACG	AGGTCGTCAA	GGCCAAGGAC	GGTGCCGGCT	540	
CGGCGACGCT	CTCGATGGCC	TACGCCGCCG	CTGTCTTCAC	CGAGGGCCTG	CTCAAGGGTC	600	
TCGACGGTGA	GGCGGTGACG	CAGTGCACCT	TCGTGAGAG	CCCCCTGTTC	AAGGACCAGG	660	
TCGACTTCTT	CGCCTCGCCC	GTCGAGTTCG	GCCCCGAGGG	TGTGAAGAAC	ATCCCTGCTC	720	
TGCCGAAGCT	CACCGCCGAG	GAGCAGAAGC	TGCTCGACGC	CTGCCTGCC	GACCTTGCCA	780	
AGAACATCAA	GAAGGGCGTT	GCGTGGGCCG	CCGAGAACCC	GTAATGCGC	AAAGCAATCT	840	20
TTTACGGAGC	TTGCGCGAAG	GAAAGGAAAT	GTACGTTTCT	ATAGAACGTA	GATCTGTCCC	900	
TTTCCACCTA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA			940	

配列番号：7

配列の長さ：306

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

GAAGTGGTGT	ACAAGCCGGA	CTCGCAGTCC	ACGGACGAGT	TCATCGTCAT	CGTCAACCCC	60	
GACTCGTACC	AGTCGTGGCG	CTCGGGCAAC	CGCACCATCC	CGCTCGCGGA	TGTCGTGAC	120	
TCCTTCCACA	TCTACCACTC	GGGCCAGGGC	AGCCAGGGCA	TCCTCGGCCA	GGTGTGGAAG	180	
CAGCAGCTCG	ACTCCGTGTT	CGGTACCGCG	AAGGAGGACG	AGGCGGTGAT	CCTCATCCTC	240	
GAGCGCGGCC	ACCTCCAGCA	CGGCAAATG	CGTGGCCACG	ACAAGTCGGG	CCGCAACAGC	300	
TCGCGC						306	

配列番号：8

配列の長さ：176

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro	Gly	Asp	Pro	Thr	Ala	Thr	Ala	Lys	Gly	Asn	Glu	Ile	Pro	Asp	
				5					10					15	
Thr	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Trp	Thr	Pro	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	
				20					25					30	
Glu	Val	Cys	Gly	Ile	Pro	Thr	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Asp	Glu	Trp	
				35					40					45	

50

Lys Gly Lys Lys Val Val Ile Val Ser Ile Pro Gly Ala Tyr Thr
 50 55 60
 Pro Ile Cys His Gln Gln His Ile Pro Pro Leu Val Lys Arg Val
 65 70 75
 Asp Glu Leu Lys Ala Lys Gly Val Asp Ala Val Tyr Val Ile Ala
 80 85 90
 Ser Asn Asp Pro Phe Val Met Ala Ala Trp Gly Asn Phe Asn Asn
 95 100 105
 Ala Lys Asp Lys Val Val Phe Ala Thr Asp Ile Asp Leu Ala Phe
 110 115 120
 Ser Lys Ala Leu Gly Ala Thr Ile Asp Leu Ser Ala Lys His Phe
 125 130 135
 Gly Glu Arg Thr Ala Arg Tyr Ala Leu Ile Ile Asp Asp Asn Lys
 140 145 150
 Ile Val Asp Phe Ala Ser Asp Glu Gly Asp Thr Gly Lys Leu Gln
 155 160 165
 Asn Ala Ser Ile Asp Thr Ile Leu Thr Lys Val
 170 175

10

配列番号 : 9

20

配列の長さ : 166

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Glu Ile Gly Ser Thr Ile Pro Asn Ala Thr Phe Ala Tyr Val Pro
 5 10 15
 Tyr Ser Pro Glu Leu Glu Asp His Lys Val Cys Gly Met Pro Thr
 20 25 30
 Ser Phe Gln Ser His Glu Arg Trp Lys Gly Lys Lys Val Val Ile
 35 40 45
 Val Ala Val Pro Gly Ala Phe Thr Pro Thr Cys Thr Ala Asn His
 50 55 60
 Val Pro Pro Tyr Val Glu Lys Ile Gln Glu Leu Lys Ser Lys Gly
 65 70 75
 Val Asp Glu Val Val Val Ile Ser Ala Asn Asp Pro Phe Val Leu
 80 85 90
 Ser Ala Trp Gly Ile Thr Glu His Ala Lys Asp Asn Leu Thr Phe
 95 100 105
 Ala Gln Asp Val Asn Cys Glu Phe Ser Lys His Phe Asn Ala Thr
 110 115 120
 Leu Asp Leu Ser Ser Lys Gly Met Gly Leu Arg Thr Ala Arg Tyr
 125 130 135
 Ala Leu Ile Ala Asn Asp Leu Lys Val Glu Tyr Phe Gly Ile Asp
 140 145 150
 Glu Gly Glu Pro Lys Gln Ser Ser Ala Ala Thr Val Leu Ser Lys
 155 160 165
 Leu

30

40

50

配列番号 : 1 0
 配列の長さ : 206
 配列の型 : アミノ酸
 鎖の数 : 1 本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : ペプチド
 配列 :

Gly Asn Val Met Thr Glu Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Ala	
5 10 15	
Tyr Asp Ala Leu Glu Pro Phe Ile Ser Lys Glu Ile Met Thr Val	10
20 25 30	
His His Asp Lys His His Gln Thr Tyr Val Asn Asn Leu Asn Ala	
35 40 45	
Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Glu Ala Thr Ala Ala Asn Asp Val Leu	
50 55 60	
Lys Gln Ile Gln Leu Gln Ser Ala Ile Lys Phe Asn Gly Gly Gly	
65 70 75	
His Ile Asn His Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ala Pro Gln Ser	
80 85 90	
Glu Gly Gly Gly Gln Leu Asn Asp Gly Pro Leu Lys Gln Ala Ile	20
95 100 105	
Glu Gln Glu Phe Gly Asp Phe Glu Lys Phe Lys Thr Thr Phe Asn	
110 115 120	
Thr Lys Ala Ala Gly Ile Gln Gly Ser Gly Trp Leu Trp Leu Gly	
125 130 135	
Val Ala Pro Thr Gly Asn Leu Asp Leu Val Val Ala Lys Asp Gln	
140 145 150	
Asp Pro Leu Thr Thr His His Pro Val Ile Gly Trp Asp Gly Trp	
155 160 165	
Glu His Ala Trp Tyr Leu Gln Tyr Lys Asn Asp Lys Ala Ser Tyr	30
170 175 180	
Leu Lys Ala Trp Trp Asn Val Val Asn Trp Ala Glu Ala Glu Lys	
185 190 195	
Arg Phe Leu Glu Gly Lys Lys Lys Ala Gln Leu	
200 205	

配列番号 : 1 1
 配列の長さ : 224
 配列の型 : アミノ酸
 鎖の数 : 1 本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : ペプチド
 配列 :

Met Phe Thr Leu Ala Thr Arg Arg Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ala	
5 10 15	
Asn Ala Ala Gln Met Gly Val Arg Thr Lys Tyr Thr Leu Pro Pro	
20 25 30	
Leu Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu Pro Ala Ile Ser Gly Glu	
35 40 45	
Ile Met Glu Thr His Tyr Glu Lys His His Arg Thr Tyr Val Asn	50

	50	55	60	
Asn Leu Asn Ala Ala Glu Asp Lys Leu Ile Asp Ala Leu Pro Gln				
	65	70	75	
Gln Ser Pro Leu Gly Glu Ile Ala Gln Leu Asn Ala Ile Lys Phe				
	80	85	90	
Asn Gly Gly Gly His Ile Asn His Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu				
	95	100	105	
Ala Pro Thr Asn Lys Gly Gly Gly Glu Leu Asp Ser Gly Glu Leu				
	110	115	120	
Arg Ser Ala Ile Asp Arg Asp Phe Gly Ser Val Asp Ala Met Lys				10
	125	130	135	
Glu Lys Phe Asn Ala Ala Leu Ala Gly Ile Gln Gly Ser Gly Trp				
	140	145	150	
Gly Trp Leu Gly Leu Asn Pro Thr Thr Gln Lys Leu Asp Ile Ile				
	155	160	165	
Thr Thr Ala Asn Gln Asp Pro Leu Leu Ser His Lys Pro Leu Ile				
	170	175	180	
Gly Ile Asp Ala Trp Glu His Ala Phe Tyr Leu Gln Tyr Lys Asn				
	185	190	195	
Val Lys Ala Asp Tyr Phe Lys Ala Ile Trp Thr Val Ile Asn Phe				20
	200	205	210	
Glu Glu Ala Glu Lys Arg Leu Lys Glu Ala Leu Ala Lys Asn				
	215	220		

配列番号：12

配列の長さ：507

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

30

配列：

Leu Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Gln Leu Ser Thr Lys Ala				
	5	10	15	
Leu Lys Gln Pro Leu Thr Leu Pro Arg Leu Leu Pro Ile Gly Ala				
	20	25	30	
Thr Pro Leu Ala Arg Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Glu Pro Tyr Asp				
	35	40	45	
Val Ile Val Ile Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile				
	50	55	60	
Lys Ala Ala Gln Gly Gly Leu Lys Thr Ala Cys Val Glu Lys Arg				40
	65	70	75	
Gly Ala Leu Gly Gly Thr Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser				
	80	85	90	
Lys Ser Leu Leu Asn Asn Ser His Ile Tyr His Gln Thr Gln His				
	95	100	105	
Asp Leu Lys Asn Arg Gly Ile Asp Val Gly Asp Ile Lys Leu Asn				
	110	115	120	
Leu Pro Gln Met Leu Lys Ala Lys Glu Ser Ser Val Thr Ala Leu				
	125	130	135	
Thr Lys Gly Val Glu Gly Leu Phe Lys Lys Asn Lys Val Asp Tyr				50

	140	145	150	
Ile Lys Gly Thr	Ala Ser Phe Ala Ser	Pro Thr Thr Val	Asp Val	
	155	160	165	
Lys Leu Asn Asp	Gly Gly Glu Gln Gln	Ile Glu Gly Lys	Asn Ile	
	170	175	180	
Ile Ile Ala Thr	Gly Ser Glu Val Thr	Pro Phe Pro Gly	Val Glu	
	185	190	195	
Ile Asp Glu Glu	Gln Ile Ile Ser Ser	Thr Gly Ala Leu	Ser Leu	
	200	205	210	
Lys Glu Val Pro	Glu Lys Met Val Val	Ile Gly Gly Gly	Val Ile	10
	215	220	225	
Gly Leu Glu Leu	Gly Ser Val Trp Thr	Arg Leu Gly Ala	Lys Val	
	230	235	240	
Thr Val Val Glu	Phe Gln Glu Ala Ile	Gly Gly Pro Gly	Leu Asp	
	245	250	255	
Ser Glu Val Ser	Gln Gln Phe Lys Lys	Leu Leu Glu Lys	Gln Gly	
	260	265	270	
Ile His Phe Lys	Leu Gly Thr Lys Val	Asn Gly Ile Glu	Lys Glu	
	275	280	285	
Asn Gly Lys Val	Thr Val Arg Thr Glu	Gly Lys Asp Gly	Lys Glu	20
	290	295	300	
Gln Asp Tyr Asp	Ala Asn Val Val Leu	Val Ser Ile Gly	Arg Arg	
	305	310	315	
Pro Val Thr Lys	Gly Leu Asn Leu Glu	Ala Ile Gly Val	Glu Leu	
	320	325	330	
Asp Lys Lys Gly	Arg Val Val Val Asp	Asp Glu Phe Asn	Thr Thr	
	335	340	345	
Cys Lys Gly Val	Lys Cys Ile Gly Asp	Ala Thr Phe Gly	Pro Met	
	350	355	360	
Leu Ala His Lys	Ala Glu Asp Glu Gly	Ile Ala Val Ala	Glu Met	30
	365	370	375	
Leu Ala Thr Gly	Tyr Gly His Val Asn	Tyr Asp Val Ile	Pro Ala	
	380	385	390	
Val Ile Tyr Thr	His Pro Glu Ile Ala	Trp Val Gly Lys	Ser Glu	
	395	400	405	
Gln Glu Leu Lys	Asn Glu Gly Val Gln	Tyr Lys Val Gly	Lys Phe	
	410	415	420	
Pro Phe Leu Ala	Asn Ser Arg Ala Lys	Thr Asn Val Asp	Thr Asp	
	425	430	435	
Gly Phe Val Lys	Phe Leu Val Glu Lys	Glu Thr Asp Lys	Ile Leu	40
	440	445	450	
Gly Val Phe Ile	Ile Gly Pro Asn Ala	Gly Glu Met Ile	Ala Glu	
	455	460	465	
Ala Gly Leu Ala	Met Glu Tyr Gly Ala	Ser Ala Glu Asp	Val Ala	
	470	475	480	
Arg Thr Cys His	Ala His Pro Thr Leu	Ser Glu Ala Phe	Lys Glu	
	485	490	495	
Gly Ala Met Ala	Ala Tyr Ser Lys Pro	Ile His Phe		
	500	505		

配列番号：13
 配列の長さ：273
 配列の型：アミノ酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列：

Asp Leu Ser His Ile Asn Thr Pro Ala Val Thr Ser Gly Tyr Ala	
5 10 15	
Gln Asp Asp Leu Glu Gly Ala Val Asp Gly Ala Glu Ile Val Leu	10
20 25 30	
Ile Pro Ala Gly Met Pro Arg Lys Pro Gly Met Thr Arg Asp Asp	
35 40 45	
Leu Phe Asn Ser Asn Ala Ser Ile Val Arg Asp Leu Ala Lys Val	
50 55 60	
Val Ala Lys Val Ala Pro Lys Ala Tyr Ile Gly Val Ile Ser Asn	
65 70 75	
Pro Val Asn Ser Thr Val Pro Ile Val Ala Glu Val Phe Lys Lys	
80 85 90	
Ala Gly Val Tyr Asp Pro Lys Arg Leu Phe Gly Val Thr Thr Leu	20
95 100 105	
Asp Thr Thr Arg Ala Ala Thr Phe Leu Ser Gly Ile Ala Gly Ser	
110 115 120	
Asp Pro Gln Thr Thr Asn Val Pro Val Ile Gly Gly His Ser Gly	
125 130 135	
Val Thr Ile Val Pro Leu Ile Ser Gln Ala Ala Gln Gly Asp Lys	
140 145 150	
Val Gln Ala Gly Glu Gln Tyr Asp Lys Leu Val His Arg Ile Gln	
155 160 165	
Phe Gly Gly Asp Glu Val Val Lys Ala Lys Asp Gly Ala Gly Ser	30
170 175 180	
Ala Thr Leu Ser Met Ala Tyr Ala Ala Ala Val Phe Thr Glu Gly	
185 190 195	
Leu Leu Lys Gly Leu Asp Gly Glu Ala Val Thr Gln Cys Thr Phe	
200 205 210	
Val Glu Ser Pro Leu Phe Lys Asp Gln Val Asp Phe Phe Ala Ser	
215 220 225	
Pro Val Glu Phe Gly Pro Glu Gly Val Lys Asn Ile Pro Ala Leu	
230 235 240	
Pro Lys Leu Thr Ala Glu Glu Gln Lys Leu Leu Asp Ala Cys Leu	40
245 250 255	
Pro Asp Leu Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Val Ala Trp Ala Ala	
260 265 270	
Glu Asn Pro	

配列番号：14
 配列の長さ：102
 配列の型：アミノ酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

```

Glu Val Val Tyr Lys Pro Asp Ser Gln Ser Thr Asp Glu Phe Ile
      5              10              15
Val Ile Val Asn Pro Asp Ser Tyr Gln Ser Trp Arg Ser Gly Asn
      20              25              30
Arg Thr Ile Pro Leu Ala Asp Val Val Asp Ser Phe His Ile Tyr
      35              40              45
His Ser Gly Gln Gly Ser Gln Gly Ile Leu Gly Gln Val Ser Lys
      50              55              60
Gln Gln Leu Asp Ser Val Phe Gly Thr Ala Lys Glu Asp Glu Ala
      65              70              75
Val Ile Leu Ile Leu Glu Arg Gly His Leu Gln His Gly Lys Met
      80              85              90
Arg Gly His Asp Lys Ser Gly Arg Asn Ser Ser Arg
      95              100

```

10

配列番号：15

配列の長さ：23

配列の型：核酸

20

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCNGGNGAYC CNACNGCNAC NGC

23

配列番号：16

配列の長さ：26

配列の型：核酸

30

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACNYTNATGG GNTAYATHCC NTGGAC

26

配列番号：17

配列の長さ：599

配列の型：核酸

40

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

```

ACACTGATGG GATACATTCC CTGGACCCCG GAGCTCGACT CGGGTGAGGT GTGTGGTATC 60
CCCCACCACC TTCCAAGACC CGCGACGAGT GGAAGGGCAA GAAGGTTGTG ATTGTCTCGA 120
TCCCGGGTGC CTACACCCCC ATCTGTCCAC CAGCAGAACA TCCCCCGCT TTGTGAAGCG 180
TGTGGATGAG CTCAAGGCCA AGGGTGTCCC GACGCCGTGT ACGTCATTGC GTCGAACGAC 240
CCCTTCGTCA TGGCTGCCTG GGGCCAACCT CAACAACGCC AAGGACAAGG TCGTCTTTGG 300
CACCGACATT GACCTGGCCT TCTCCCAAGG CTCTCGGCGC GACGATCCGA CCTGAGCGCC 360
AAGCACTTTG GTGAGCGCAC GGCCCGCTAC GCTCTGATCA TTGACGACAA CAAGATTGTC 420
GACTTTGGTT CGGACGAGGG CGACACTGGC AAGCTCCAGA ACGCGTCGAT CGACACGATC 480

```

50

	110	115	120
Phe Ser Lys Ala	Leu Gly Ala Thr Ile Asp	Leu Ser Ala Lys His	
	125	130	135
Phe Gly Glu Arg	Thr Ala Arg Tyr Ala Leu Ile Ile Asp Asp Asn		
	140	145	150
Lys Ile Val Asp	Phe Ala Ser Asp Glu Gly Asp Thr Gly Lys Leu		
	155	160	165
Gln Asn Ala Ser	Ile Asp Thr Ile Leu Thr Lys Val		
	170	175	

10

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 D N A)

配列 :

ACNTTYGCNC ARGAYGTNAA YTGYG

25

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 261

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

ACCTTTGCAC AGGACGTCAA TTGCGAGTTC TCCAAGCACT TTAACGCGAC GCTGGACCTG	60
TCGTGCAAGG GCATGGGCTT GCGCACCGCG CGCTACGCGC TGATCGCGAA CGACCTCAAG	120
GTCGAGTACT TTGGCATCGA CGAGGGCGAG CCGAAGCAGT CGTCGGCCGC GACGGTGCTG	180
AGCAAGCTGT AGTGCCGTTT TACTTAGTCA AACAATCGGG TATAGTCGCG TTGGAAAAAA	240
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	261

30

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 D N A)

配列 :

CARACNTAYG TNAAYAAYYT NAYGC

26

40

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 D N A)

配列 :

ACNCAYCAYC CNGTNATHGG NTGGG

25

50

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 D N A)

配列 :

ATNACNGGRT GRTGNGTNGT NARNGG 26

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 371

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

CAGACCTATG TCAACAACCT GAACGCCGCC GAGAAGGCGT ACGCTGAGGC GACGGCCGCG 60
 AACGACGTGC TTAAGCAGAT CCAGCTGCAG AGTGCGATCA AGTTCAACGG CCGTGGCCAC 120
 ATCAACCACT CGCTGTTCTG GAAGAACCTG GCCCCCCAGA GCGAGGGTGG TGGCCAACCTG 180
 AACGATGGCC CTCTCAAGCA GGCCATCGAG CAGGAGTTCG GCGACTTTGA GAAATTCAAG 240
 ACGACCTTCA ACACGAAGGC GGCCGGCATC CAGGGTTCGG GCTGGCTGTG GCTCGGTGTT 300
 GCCCCGACGG GCAACCTCGA CCTGGTCGTT GCCAAGGACC AGGACCCGCT GACCACCCAT 360
 CACCCCGTGA T 371

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 263

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

ACGCATCATC CCGTGATTGG CTGGGATGGC TGGGAGCACG CCTGGTACCT GCAGTACAAG 60
 NACGACAAGG CTTCTACCT TAAGGCCTGG TGGAACGTGG TGAAGTGGC CGAGGCCGAG 120
 AAGCGCTTCC TCGAGGGTAA GAAGAAGGCC CAGCTGTAAT GGCACGTTTG TAGATGATGA 180
 ACGACACACG ATTTTAGGTC GCCAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 240
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 263

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 D N A)

配列 :

CCNCCNYTNC CNTAYGAYTA YGGNGC 26

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

10

20

30

40

50

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GARCCNGCNA THWSNGGNGA RATHATGG 28

配列番号：29

配列の長さ：630

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

GAACCTGCTT TCTGGGGGGA GATAATGGAG ACGCACTACG AGAAGCACCA CCGCACCTAC 60
 GTCAACAACC TGAACGCCGC GGAGGACAAG CTGATCGACG CGCTCCCGCA GCAGAGCCCG 120
 CTCGGCGAGA TTGCGCAGCT GAACGCGATC AANTTCATCG GCGGTGGCCA CATCAACCAC 180
 TCGCTCTTCT GGAAGAACCT CGCGCCGACG AACAAGGGCG GCGGCGAGCT CGACTCGGGC 240
 GAGCTGCGCT CCGCGATCGA CCGCGACTTT GGCTCGGTCG ACGCCATGAA GGAGAAGTTC 300
 AACGCGGGCGC TCGCGGGCAT CCAGGGTATC GGCTGGGGCT GGCTCGGCCT GAACCCACG 360
 ACGCAGAAGC TCGACATCAT CACGACCGCG AACCAGGACC CGCTCCTGTC GCACAAGCCG 420
 CTGATTGGCA TCGATGCGTG GGAGCACGCG TACTACCTGC AGTACAAGAA CGTCAAGGCC 480
 GACTACTTCA AGGCGATCTG GACCGTGATC AACTTTGAGG AGGCCGAGAA GCGTCTCA?G 540
 GAGGCGCTCG CCAAGAACTA GACACGTTCC GTTTTTTTTT TATCACTAGC TTAGCAATGA 600
 CCTGCCACG CTAAAAAAAA AAAAAAAAAA 630

配列番号：30

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：3、9、12、15番目のNはイノシンを示す。

配列：

GGNTAYGTNG CNGCNATHAA RGC 23

配列番号：31

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：6、15、18番目のNはイノシンを示す。

配列：

TCYTCNGCYT TRTGNGCNAR CAT 23

配列番号：32

配列の長さ：938

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

10

20

30

40

50

配列：

GGGTNCGTGG CGGCGATAAA GGCCGCGCAG GGTGGTCTGA AGACTGCATG TGTTGAGAAG 60
 CGCGGTGCGC TTGGTGGTAC CTGCTTGAAC GTGGGCTGTA TCCCTTCAA GTCGTTGGTG 120
 AACAACTCGC ACATCTTCCA CCAGACGCAG CACGACCTCA AGAACCGCGG TATTGACGTC 180
 AGCGAGGTCA AGTTGANCTT GCCGCAGATG CTCAAGGCGA AGGAGAGCTC GGTCACCTGCG 240
 CTCACCAAGG GTGTGCGAGGG CCTGTTCAAG AAGAACAAGG TCGCCTACCT CAAGGGGACA 300
 GACAGATTCG CGAGCCCTAC GACGGTGGAC GTGAAGCTGA GCGATGGCGG TGAACAGNAG 360
 ATTGAGGGCA AGAACATTAT CATTGCGACT GGCTCTGAGG TGACGCCTTN CCCTGGTGTG 420
 GAGATCGCCG AGGAGCAGAT TATCAGCTCG ACGGGTGCAG TCTCGCTCAA GGAGGTGCCT 480
 NAGAAGATGG TCGTGATCGG TGGTGGTGTG ANCGCTCTTG AGCTCGNTAG CGTGTGGAGC 540
 CGTCTGGNCC CCAAGGTGAC CGTGGNTGAG TTCCAGGACG CGATTGTTGC CCCCAGTCTG 600
 GACAGCGAGG TGACCCAGCA GTTCAAGAAG CTGCTCGAGA AGCAGGGCAT CCAGTTCAAG 660
 CTTGCCACTA AGGTGAACGG GATTGAGAAG CAGGATGCCA AAGTGATGGT CCGCACCGAG 720
 GGCAAGGACG GCAAGGAGCA GGACNACGAC GCCAACGTTG TGCTCGTGTC CATCGGTCNC 780
 CNCCCAGTGA CGAAGGGCTT GAACCTCGAG GCGATCGGCG TTGAGCTTGA TAAGAAGGCC 840
 CGCGTGGTGG TGGACGATGA GTTCAACACG ACGTGCAAGG GTGTCAAGTG CATTGGTGAC 900
 GCGACGTTCG GCCCTATGCT CGCCACAAG GCCGAAGA 938

10

配列番号：33

配列の長さ：1600

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

GTTGAGCTCT GTGCTGAAGC GCTCGCCGCA GCTCTCTACT AAGGCTCTGA AGCAGCCGCT 60
 TACGCTCCCG CGTCTGCTGC CCATTGGTGC TCGCCGCTG GCTCGTGGCT ATGCCTCGAG 120
 CTCGGAGCCA TACGATGTCA TTGTGATTGG TGGTGGCCCC GGTGGCTACG TGGCCGCGAT 180
 CAAGGCCGCG CAGGGTGGTC TGAAGACTGC ATGTGTTGAG AAGCGCGGTG CGCTTGGTGG 240
 TACCTGCTTG AACGTGGGCT GTATCCCTTC CAAGTCGTTG CTGAACAACCT CGCACATCTT 300
 CCACCAGACG CAGCACGACC TCAAGAACCG CGGTATTGAC GTCAGCGAGG TCAAGTTGAA 360
 CCTGCCGCGAG ATGCTCAAGG CGAAGGAGAG CTCGGTCACT GCGCTCACCA AGGGTGTCTGA 420
 GGGCTGTTC AAGAAGAACA AGGTCGACTA CCTCAAGGGC ACAGCCAGCT TCGCGAGCCC 480
 TACGACGGTG GACGTGAAGC TGAACGATGG CGGTGAACAG CAGATTGAGG GCAAGAACAT 540
 TATCATTGCG ACTGGCTCTG AGGTGACGCC CTTCCCTGGT GTGGAGATCG ACGAGGAGCA 600
 GATTATCAGC TCGACGGGTG CGCTCTCGCT CAAGGAGGTG CCTGAGAAGA TGGTCGTGAT 660
 CGGTGGTGGT GTGATCGGTC TGGAGCTCGG TAGCGTGTGG AGCCGTCTGG GCGCCAAGGT 720
 GACCGTGGTT GAGTTCCAGG ACGCGATTGG TGGCCCCGGT CTGGACAGCG AGGTGAGCCA 780
 GCAGTTCAAG AAGCTGCTCG AGAAGCAGGG CATCCAGTTC AAGCTTGGCA CTAAGGTGAA 840
 CGGGATTGAG AAGCAGGATG GCAAAGTGAT GGTCCGCACC GAGGGCAAAG ACGGCAAGGA 900
 GCAGGACTAC GACGCCAACG TTGTGCTCGT GTCCATCGGT CGCCGCCCGG TGACGAAGGG 960
 CTTGAACCTC GAGGCGATCG GCGTTGAGCT TGATAAGAAG GGCCGCGTGG TGGTGGACGA 1020
 TGAGTTCAAC ACGACGTGCA AGGGTGTCAA GTGCATTGGT GACGCGACGT TCGGCCCTAT 1080
 GCTTGCGCAC AAGGCCGAGG ACGAGGGTAT CGCCGTTGCT GAGATGCTCG CGACCGGCTA 1140
 CGGCCACGTC AACTACGACG TGATCCCTGC GGTGATCTAC ACGCACCCCG AGATTGCGTG 1200
 GGTGCGCAAAG TCGGAGCAGG AGCTCAAGAA CGATGGCGTG CAGTACAAGG TGGGCAAGTT 1260
 CCCCTTCTCG GCCAACTCGC GTGCTAAGAC CAACGTGAC ACCGACGGTT TTGTCAAGTT 1320
 CCTCGTGGAG AAGGACACCG ACAAGATTCT CGGCGTGTTC ATCATCGGTC CGAACGCCGG 1380
 CGAGATGATT GCCGAGGCTG GCCTGGCTAT GGAGTACGGT GCGAGTGCAG AGGATGTCGC 1440
 GCGCACCTGC CACGCGCACC CGACGCTCTC GGAGGCCTTC AAGGAGGGTG CGATGGCCGC 1500

30

40

50

CTACTCGAAG CCGATTCACT TTTGATTTCCG TAGGTTTCCC CCGATAGGCG CCCGATACGT 1560
 CTTCTCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1600

配列番号 : 3 4

配列の長さ : 507

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Leu Ser Ser Val	Leu Lys Arg Ser Pro Gln Leu Ser Thr Lys Ala	
	5 10 15	
Leu Lys Gln Pro	Leu Thr Leu Pro Arg Leu Leu Pro Ile Gly Ala	
	20 25 30	
Ala Pro Leu Ala Arg Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Glu Pro Tyr Asp		
	35 40 45	
Val Ile Val Ile Gly Gly Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile		
	50 55 60	
Lys Ala Ala Gln Gly Gly Leu Lys Thr Ala Cys Val Glu Lys Arg		
	65 70 75	20
Gly Ala Leu Gly Gly Thr Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser		
	80 85 90	
Lys Ser Leu Leu Asn Asn Ser His Ile Phe His Gln Thr Gln His		
	95 100 105	
Asp Leu Lys Asn Arg Gly Ile Asp Val Ser Glu Val Lys Leu Asn		
	110 115 120	
Leu Pro Gln Met Leu Lys Ala Lys Glu Ser Ser Val Thr Ala Leu		
	125 130 135	
Thr Lys Gly Val Glu Gly Leu Phe Lys Lys Asn Lys Val Asp Tyr		
	140 145 150	30
Leu Lys Gly Thr Ala Ser Phe Ala Ser Pro Thr Thr Val Asp Val		
	155 160 165	
Lys Leu Asn Asp Gly Gly Glu Gln Gln Ile Glu Gly Lys Asn Ile		
	170 175 180	
Ile Ile Ala Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe Pro Gly Val Glu		
	185 190 195	
Ile Asp Glu Glu Gln Ile Ile Ser Ser Thr Gly Ala Leu Ser Leu		
	200 205 210	
Lys Glu Val Pro Glu Lys Met Val Val Ile Gly Gly Gly Val Ile		
	215 220 225	40
Gly Leu Glu Leu Gly Ser Val Trp Ser Arg Leu Gly Ala Lys Val		
	230 235 240	
Thr Val Val Glu Phe Gln Asp Ala Ile Gly Gly Pro Gly Leu Asp		
	245 250 255	
Ser Glu Val Ser Gln Gln Phe Lys Lys Leu Leu Glu Lys Gln Gly		
	260 265 270	
Ile Gln Phe Lys Leu Gly Thr Lys Val Asn Gly Ile Glu Lys Gln		
	275 280 285	
Asp Gly Lys Val Met Val Arg Thr Glu Gly Lys Asp Gly Lys Glu		
	290 295 300	50

Gln Asp Tyr Asp Ala Asn Val Val Leu Val Ser Ile Gly Arg Arg
 305 310 315
 Pro Val Thr Lys Gly Leu Asn Leu Glu Ala Ile Gly Val Glu Leu
 320 325 330
 Asp Lys Lys Gly Arg Val Val Val Asp Asp Glu Phe Asn Thr Thr
 335 340 345
 Cys Lys Gly Val Lys Cys Ile Gly Asp Ala Thr Phe Gly Pro Met
 350 355 360
 Leu Ala His Lys Ala Glu Asp Glu Gly Ile Ala Val Ala Glu Met
 365 370 375
 Leu Ala Thr Gly Tyr Gly His Val Asn Tyr Asp Val Ile Pro Ala
 380 385 390
 Val Ile Tyr Thr His Pro Glu Ile Ala Trp Val Gly Lys Ser Glu
 395 400 405
 Gln Glu Leu Lys Asn Asp Gly Val Gln Tyr Lys Val Gly Lys Phe
 410 415 420
 Pro Phe Leu Ala Asn Ser Arg Ala Lys Thr Asn Val Asp Thr Asp
 425 430 435
 Gly Phe Val Lys Phe Leu Val Glu Lys Asp Thr Asp Lys Ile Leu
 440 445 450
 Gly Val Phe Ile Ile Gly Pro Asn Ala Gly Glu Met Ile Ala Glu
 455 460 465
 Ala Gly Leu Ala Met Glu Tyr Gly Ala Ser Ala Glu Asp Val Ala
 470 475 480
 Arg Thr Cys His Ala His Pro Thr Leu Ser Glu Ala Phe Lys Glu
 485 490 495
 Gly Ala Met Ala Ala Tyr Ser Lys Pro Ile His Phe
 500 505

10

20

30

40

50

配列番号 : 3 5

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列 :

AARGTNGCNG TNYTNGGNGC NWSNGG

26

配列番号 : 3 6

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列 :

YTNWSNYTNY TNATGAARYT NAAAYCC

26

配列番号 : 3 7

配列の長さ : 1009

配列の型 : 核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

TTCTCTCTGT	TGATGAAGCT	CAACCCCAAG	GTCACCGAGC	TGCGCCTGTA	CGACATCCGT	60	
CTTGCTCCGG	GTGTTGCTGC	GGACCTCTCG	CACATCAACA	CGCCTGCGGT	GACCTCGGGC	120	
TACGCCCAGG	ACNATCTTGA	GGGTGCCGTT	GACGGCGCAA	AGATTGTCCT	GATCCCCGCC	180	
GGTATGCCGC	GCAAGCCCGG	CATGACCCGT	GACGATCTGT	TCAACTCGAA	CGCCTCGATC	240	
GTCCGTGACC	TCGCCAAGAC	CGTGGCCAAG	GTTGCCCCCA	AGGCCTACAT	TGGTATCATC	300	
TCGAACCCCG	TCAACTCGAC	GGTGCCGATC	GTCGCCGAGG	TGTTCAAGAA	GGCGGGTGTG	360	10
TACGACCCCA	AGCGCCTCTT	CGGTGTGACC	ACGCTCGACA	CCACGCGTGC	GGCCACCTTC	420	
CTGTCCGGCA	TCACTGGCTC	GGAACCGCAG	ACCACCAATG	TCCC GGTCAT	TGGTGGTCAC	480	
TCGGGTGTGA	CCATCGTGCC	TCTGGTCTCG	CAGGCCCCCC	AGGGTGACAA	GGTGCAGGCC	540	
GGCGAGCAGT	ACGACAAGCT	CGTCCACCGC	ATTCAGTTCG	GTGGTGACGA	GGTCGTAAAG	600	
GCCAAGGACG	GTGCGGGTTC	GGCGACGCTG	TCGATGGCCT	ACGCCGCCGC	TGTCTTCACT	660	
GAGGGCCTGC	TCAAGGGTCT	TGACGGTGAG	GCGGTGACGC	AGTGCACCTT	CGTTGAGAGC	720	
CCCCTGTTCA	AGGACCAGGT	TGACTTCTTC	GCTTCGCCCG	TCGAGTTCGG	CCCCGAGGGC	780	
GTGAAGAACA	TCCCTGCCCT	GCCCAAGCTC	ACCGCTGAGG	AGCAGAAGCT	GNTNGACGCC	840	
TGCCTGCCCG	ACCTTGCCAA	GAACATCAAG	AAGGGTGTG	CGTGGGTGTC	CGAGAACCCC	900	
TAAATGCGCA	GAACCAGCTT	CCACGGAGCT	TGCGCCAAGG	AAAGGAAACG	CACATTTNTA	960	20
TAGAGCGTAG	CTTTGTCCCT	TTCCATTTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA		1009	

配列番号：38

配列の長さ：1008

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

CTAAGATTCT	TGATGAAGCT	GAACCCCAAG	GTTACCGAGC	TCCGCCTGTA	CGACATCCGC	60	30
CTCGCTCCGG	GTGTTGCTGC	GGATCTCTCG	CACATCAACA	CCCCCGCGGT	GACTTCGGGC	120	
TACGCCCAGG	ACGACCTCGA	GGGTGCCGTC	GACGGTGCGG	AGATTGTGCT	GATCCCCGCC	180	
GGTATGCCGC	GCAAGCCCGG	CATGACCCGT	GACGACCTGT	TCAACTCGAA	CGCCTCGATT	240	
GTCCGTGACC	TCGCCAAGGT	CGTGGCTAAG	GTCGCCCCAA	AGGCTTACAT	CGGCGTCATC	300	
TCGAACCCCG	TCAACTCGAC	GGTGCCGATC	GTCGCTGAGG	TGTTAAAGAA	GGCCGGTGTG	360	
TACGACCCCA	AGCGCCTCTT	CGGTGTGACC	ACGCTCGACA	CCACGCGCGC	GGCCACCTTC	420	
CTGTCCGGCA	TTGCTGGCTC	GGAACCGCAG	ACCACCAACG	TCCC CGTCAT	TGGTGGCCAC	480	
TCGGGTGTGA	CCATTGTGCC	CCTGATCTCG	CAGGCCGCCC	AGGGTGACAA	GGTGCAGGCT	540	
GGCGAGCAGT	ACGACAAGCT	TGTGCACCGC	ATCCAGTTCG	GTGGTGACGA	GGTCGTCAAG	600	
GCCAAGGACG	GTGCCGGTTC	GGCGACGCTC	TCGATGGCCT	ACGCCGCCGC	TGTTTTCACC	660	40
GAGGGCCTGC	CCAAGGGTCT	CGACGGTGAG	GCGGTGACGC	AGTGCACCTT	CGTCGAGAGC	720	
CCCCTGTTCA	AGGACCAGGT	CGANTTCTTC	GCTTCGCCCG	TCGAGTTCGG	CCCCGAGGGT	780	
GTGAAGAACA	TCCCTGNTCT	GCCGAAGCTC	ACCGCCGAGG	AGCAGAAGCT	GNTNGACGCC	840	
TGCCTGCCCG	ACCTTGCCAA	GAACATCAAG	AAGGGCGTTG	CGTGGGCCGC	CGAGAACCCG	900	
TAAATGCGCA	AAGCAATNTT	TTACGGAGCT	TGCGCGAAGG	AAAGGAAATG	TACGTTTNTA	960	
TAGAACGTAG	ATCTGTCCCT	TTCCACCTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA		1008	

配列番号：39

配列の長さ：23

配列の型：核酸

50

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：3、12、15、18番目のNはイノシンを示す。

配列：

GGNAAYAAAYG GNYTNWSNGA RGT 23

配列番号：40

配列の長さ：20

配列の型：核酸

10

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：6、9、18番目のNはイノシンを示す。

配列：

GARGTNGTNT AYAARCCNGA 20

配列番号：41

配列の長さ：427

配列の型：核酸

20

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

GAAGTGGTGT	ACAAGCCGGA	CTCGCAGTCC	ACGGACGAGT	TCATCGTCAT	CGTCAACCCC	60
GACTCGTACC	AGTCGTGGCG	CTCGGGCAAC	CGCACCATCC	CGCTCGCGGA	TGTCGTGCGAC	120
TCCTTCCACA	TCTACCACTC	GGGCCAGGGC	AGCCAGGGCA	TCCTCGGCCA	GGTGTGCGAAG	180
CAGCAGCTCG	ACTCCGTGTT	CGGTACCGCG	AAGGAGGACG	AGGCGGTGAT	CCTCATCCTC	240
GAGCGCGGCC	ACCTCCAGCA	CGGCAAAATG	CGTGGCCACG	ACAAGTCGGG	CCGCAACAGC	300
TCGCGCTAAG	CCATAGTGGT	ACAGTAGGTA	CCGGGCCCCC	AAGGCCCGAT	GCGGGCGCTG	360
CCGCCTGCTA	TCCAACATGA	TTGTACCTAC	GTAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	420
AAAAAAAA						427

配列番号：42

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

40

Ile Pro Trp Thr Pro Glu Leu Asp Ser Gly Glu Val Cys Gly Ile
5 10 15

配列番号：43

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

50

Ser Lys Ala Leu Gly Ala Thr Ile Asp Leu Ser Ala Lys His Phe
 5 10 15

配列番号 : 4 4

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Thr Ile Asp Leu Ser Ala Lys His Phe Gly Glu Arg Thr Ala
 5 10 15

10

配列番号 : 4 5

配列の長さ : 2 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Gly Asp Pro Thr Ala Thr Ala Lys Gly Asn Glu Ile Pro Asp
 5 10 15
 Thr Leu Met Gly Tyr Ile Pro Trp Thr Pro Glu Leu Asp
 20 25

20

配列番号 : 4 6

配列の長さ : 1 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Val Glu Tyr Phe Gly Ile Asp Glu Gly Glu Pro Lys
 5 10

30

配列番号 : 4 7

配列の長さ : 1 3

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Asp Asn Leu Thr Phe Ala Gln Asp Val Asn Cys Glu Phe
 5 10

40

配列番号 : 4 8

配列の長さ : 2 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Val Val Ile Val Ala Val Pro Gly Xaa Phe Thr Pro Thr Cys Thr
 5 10 15

50

Ala Asn His Val Pro Xaa Tyr Xaa Glu
20

配列番号 : 4 9
配列の長さ : 2 0
配列の型 : アミノ酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
配列 :

Asp Gln Asp Pro Leu Thr Thr His His Pro Val Ile Gly Trp Asp 10
5 10 15
Xaa Xaa Glu His Ala
20

配列番号 : 5 0
配列の長さ : 1 3
配列の型 : アミノ酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
配列 :

Ala Trp Trp Asn Val Val Asn Trp Ala Glu Ala Glu Lys 20
5 10

配列番号 : 5 1
配列の長さ : 1 2
配列の型 : アミノ酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
配列 :

Phe Xaa Gly Gly Gly His Ile Asn Xaa Ser Leu Phe 30
5 10

配列番号 : 5 2
配列の長さ : 3 0
配列の型 : アミノ酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
配列 :

Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu 40
5 10 15
Pro Ala Ile Ser Gly Glu Ile Met Glu Thr His Tyr Glu Lys His
20 25 30

配列番号 : 53
配列の長さ : 28
配列の型 : アミノ酸
鎖の数 : 1 本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
配列 :

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Pro Tyr Asp Val Ile Val Ile Gly Gly
 5 10 15
 Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gln
 20 25

配列番号 : 54

配列の長さ : 30

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

10

配列 :

Arg Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ser Gly Gly Ile Gly Gln Pro
 5 10 15
 Leu Ser Leu Leu Met Lys Leu Asn Pro Lys Val Thr Glu Leu Arg
 20 25 30

配列番号 : 55

配列の長さ : 23

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

20

配列 :

Gly Asn Asn Gly Leu Ser Glu Val Val Tyr Lys Pro Asp Xaa Gln
 5 10 15
 Xaa Thr Xaa Glu Phe Xaa Val Ile
 20

配列番号 : 56

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

30

配列 :

Val Asp Gln Xaa Tyr Phe Gly Leu Xaa
 5

配列番号 : 57

配列の長さ : 25

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

40

配列 :

Ser Asn Val Phe Phe Asp Ile Thr Lys Asn Gly Ser Pro Leu Gly
 5 10 15
 Thr Ile Lys Phe Lys Leu Phe Asp Asp Val
 20 25

50

配列番号：58
 配列の長さ：14
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列：

His His Gln Thr Tyr Val Asn Asn Leu Asn Ala Ala Xaa Lys
 5 10

10

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1】図1は、マラセチア部分精製粗抗原2782のMono Qによるクロマトグラフィーの結果を示す図である。

【図2】図2は、マラセチア部分精製粗抗原2782のMono Q分画物について、患者血清中のIgE抗体との結合性を示す図である。

【図3】図3は、マラセチア部分精製粗抗原2782のMono Q分画物のSDS-PAGE後にCB染色を行った電気泳動の図である。

【図4】図4は、マラセチア部分精製粗抗原2782のMono Q分画物のSDS-PAGE後にイムノプロットングを行った電気泳動の図である。

20

【図5】図5は、Mono Q クロマトグラフィーによるMF-1のピークを示す図である。

【図6】図6は、Mono Q クロマトグラフィーによるMF-2のピークを示す図である。

【図7】図7は、Mono Q クロマトグラフィーによるMF-3のピークを示す図である。

【図8】図8は、Mono Q クロマトグラフィーによるMF-4のピークを示す図である。

【図9】図9は、マラセチア粗抗原2782の二次元電気泳動の図である。クーマシーブルー染色により蛋白質の検出を行う。

【図10】図10は、マラセチア粗抗原2782の二次元電気泳動の図である。健常者IgE抗体(A)およびアレルギー患者IgE抗体(B)を用いてイムノプロット法によりスポットを検出する。

【図11】図11は、MF-1、MF-2、MF-3、MF-4及びMF-13のSDS-PAGE(還元条件下)による電気泳動の図である。

30

【図12】図12は、抗原性蛋白質MF-1、MF-2、MF-4のIgE結合性の濃度依存性を示す図である。

【図13】図13は、MF-3のIgE結合性の濃度依存性を示す図である。

【図14】図14は、MF-3のピリジルエチル化物のHPLCによる精製を示す図である。

【図15】図15は、MF-2(ピリジルエチル化物)のリジルエンドペプチダーゼ消化物のHPLC分析結果を示す図である。

【図16】図16は、MF-3(ピリジルエチル化物)のリジルエンドペプチダーゼ消化物のHPLC分析結果を示す図である。

40

【図17】図17は、2種類のMF-5cDNAのヌクレオチド配列の比較の図である。

【図18】図18は、2種類のMF-6PCR断片のヌクレオチド配列の比較の図である。

【図19】図19は、MF-1cDNAとMF-2cDNAのヌクレオチド配列の比較の図である。

【図20】図20は、MF-3cDNAとMF-4cDNAのヌクレオチド配列の比較の図である。

【図21】図21は、MF-1オーバーラッピングペプチドのアミノ酸配列である。

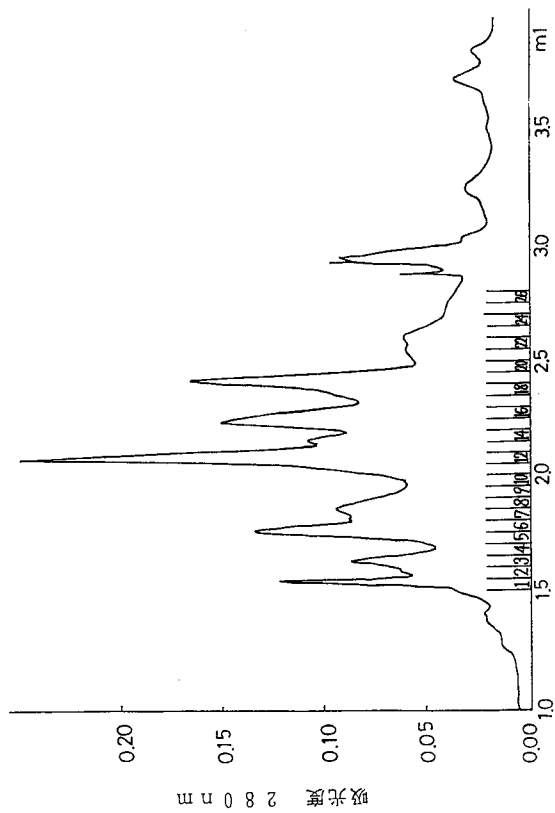
【図22】図22は、MF-1オーバーラッピングペプチドとM.ファーフアR A S T陽性患者血清の反応である。

50

【図23】図23は、MF-1cDNAとMF-1ゲノムDNAの比較の図である。

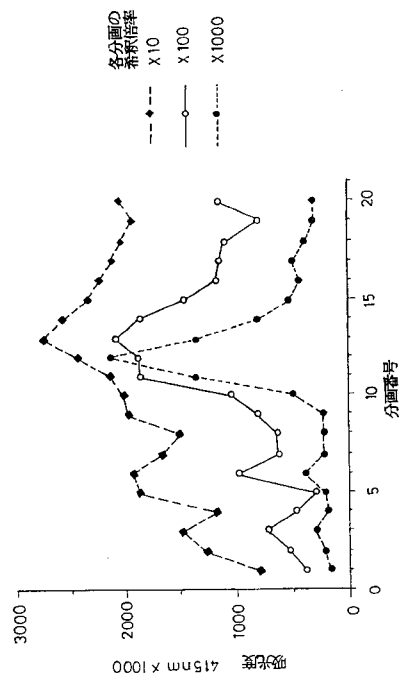
【図24】図24は、Phenyl SuperroseクロマトグラフィーによるMF-13のピークを示す図である。

【図1】



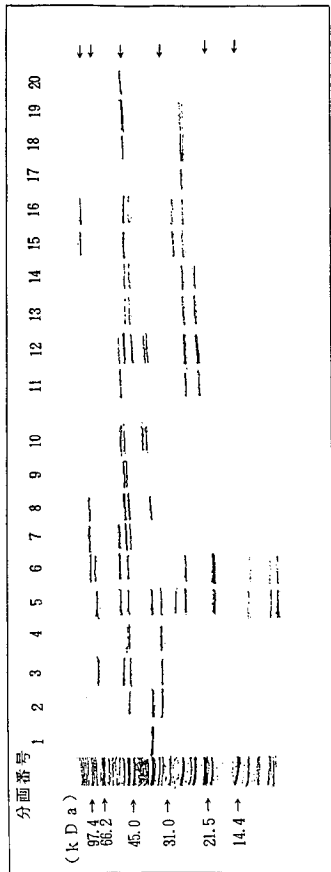
第1図

【図2】



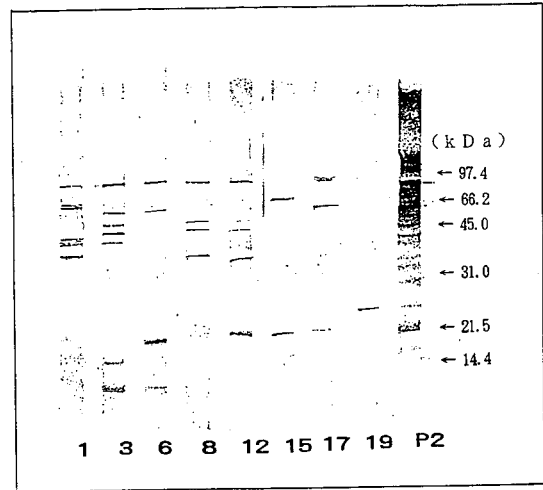
第2図

【 図 3 】



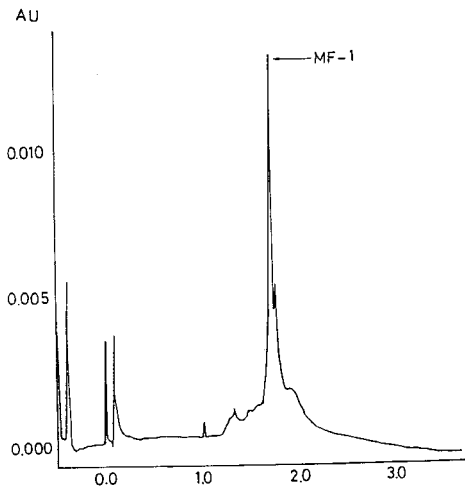
第 3 図

【 図 4 】



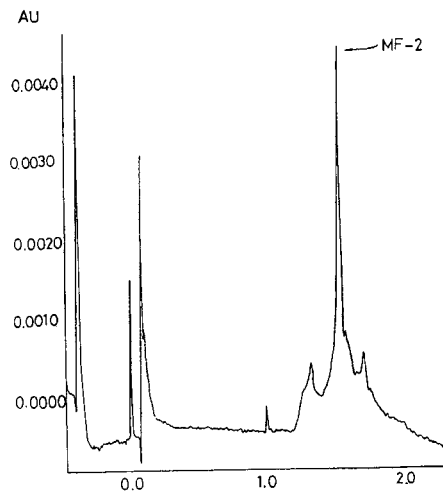
第 4 図

【 図 5 】



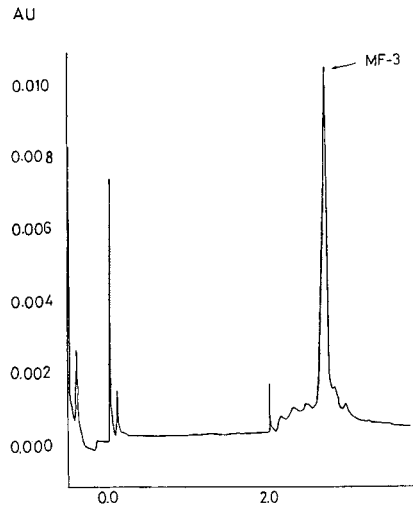
第 5 図

【 図 6 】



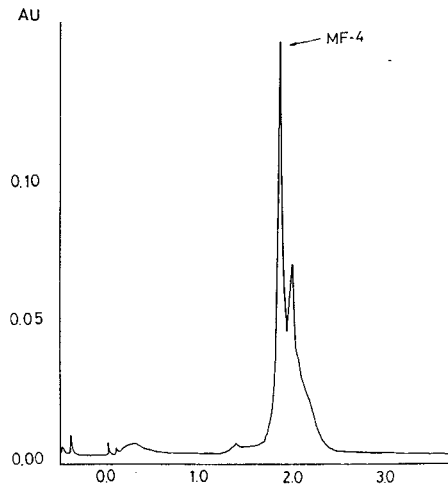
第 6 図

【 図 7 】



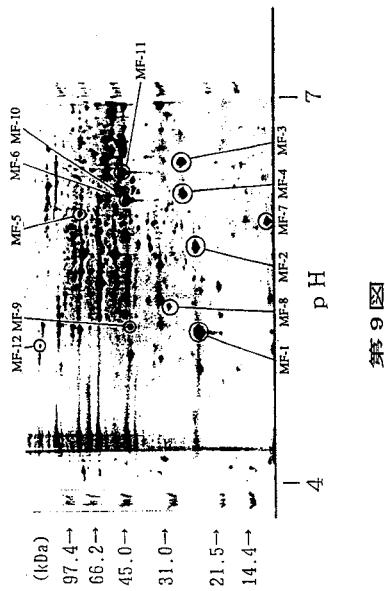
第 7 図

【 図 8 】



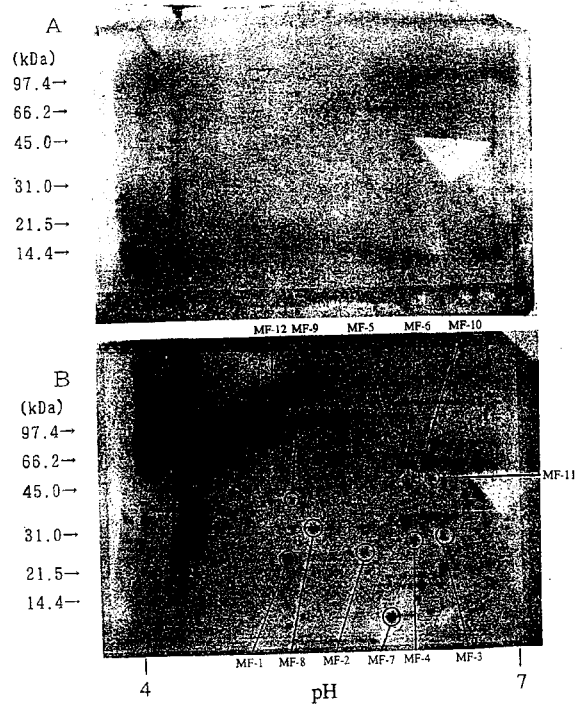
第 8 図

【 図 9 】



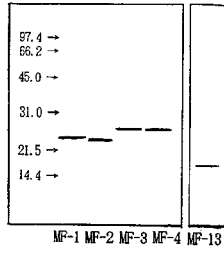
第 9 図

【 図 10 】



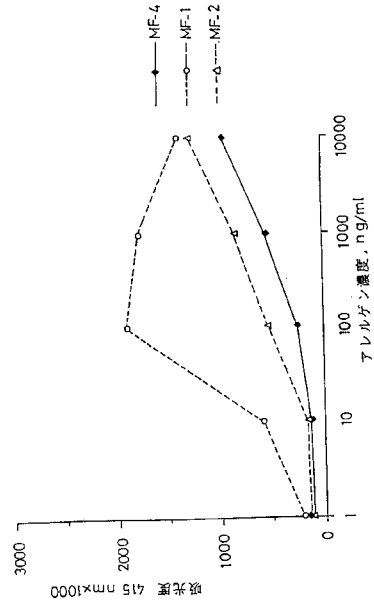
第 10 図

【 図 1 1 】



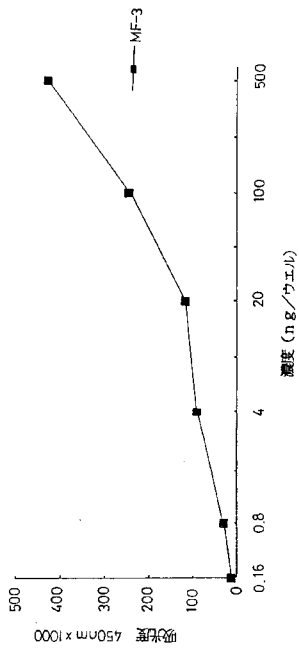
第 1 1 図

【 図 1 2 】



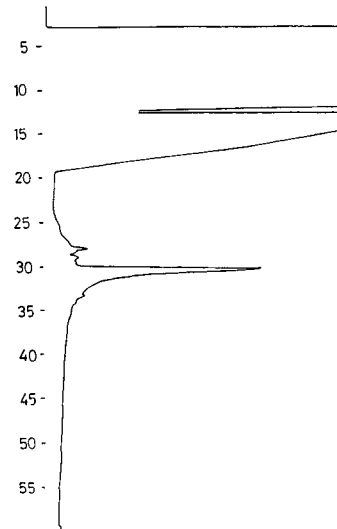
第 1 2 図

【 図 1 3 】



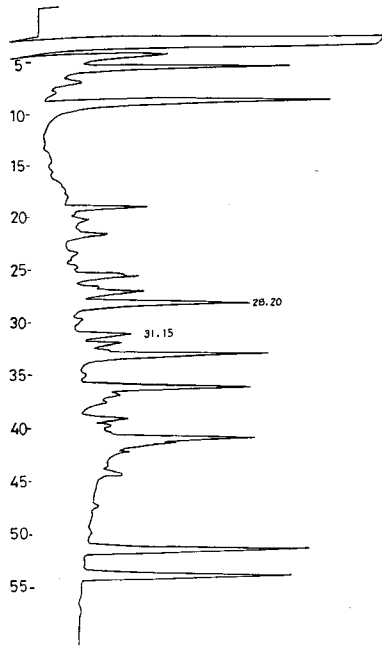
第 1 3 図

【 図 1 4 】



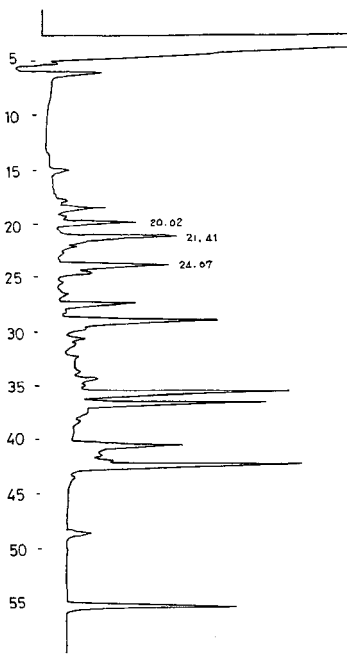
第 1 4 図

【 図 15 】



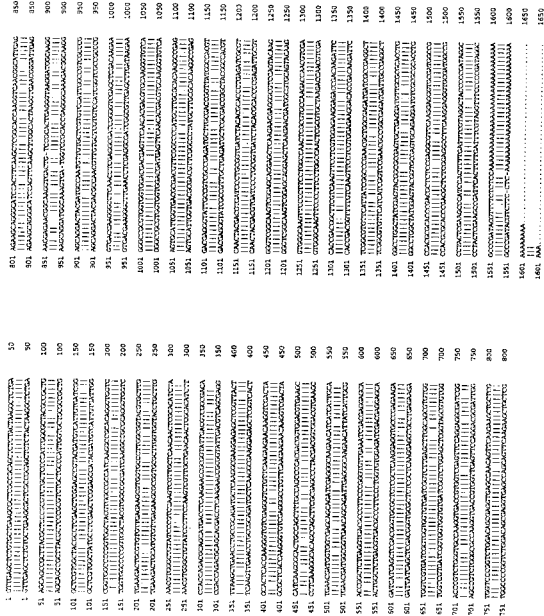
第 15 図

【 図 16 】



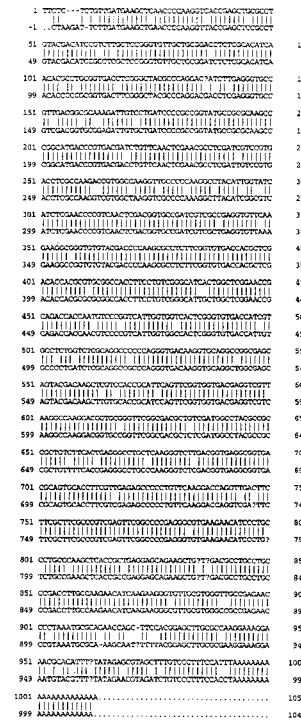
第 16 図

【 図 17 】



第 17 図

【 図 18 】



第 18 図

【 図 19 】

```

MF-1 1 GCCTGGTATCCTACTCTACTCCCAAGGTTAAGACATCCCGACACC 50
MF-2 -1 ..C-GGAAT--TG--GCT-C-G-A-----CGA--TCCTC-A-ACCC 48
51 T-CATGGGC--TACATCCCTCGA--CCCGGAGCTCGA--CTCGGCTGAG 100
49 TAGCTTTCATCAGTCCGCTACAGCCCG-AGCTCGAGGC-CACAA-AG 98
101 GTGTGTGGTATCCCAACCACTTCAAGACCCCGACGAG-TGGAAGGGCA 150
99 -TGTGTGCATCCCGACAGAGTTCAGAGCCACGA-GCGCTGAAGGGCA 148
151 AGRAGGTTGTGATTTCTCTGAT-CCGGGTGCTACACCCCGATC-TGCC 200
149 AGRAGGTTGTGATTTCTCTGAT-CCGGGTGCTACACCCCGATC-TGCC 198
201 ACCAGCGACAC-ATCCCGCCCTTGTGAGCCGTGTG----GAT---G-AG 250
199 ACC-GC-GAACCATGTGCG-CC-CT-A--CGTG-GAAAAATCCAGGAG 248
251 CTCAGG-GCCAAAGGCTGCGAGCCGCT-GTACGTCAT-TGGTCTGAAGCA 300
249 CTCAGGAGC-AAGGCGCTGCGAGGCTGTG-GTACCT-CGCGACACCA 298
301 CCCCTACCT-CATG-GCTCCCTGGGGCA--ACTTCAA-CAACGCCAAGGA 350
299 CCCGTCCTGC-TGAGC-GCATGGGCACTGAC--CGAGCA-CGCAAGGCA 348
351 CAAGGTCGTC-TTTC-CACCGACATGACCTG-CCCTTCTCCAAAGCTC 400
349 CAACCT-GACGTTTGGCGAG-GACCTGAC-TGCGAGTTCTCGAG-CAC 398
401 TCGG-CCGACGATCGACCTGAGCGCC-AG--CACTTTCG-TGAGCGC 450
399 TTTAACCGGACGCTGAGCTGT-CCTCGAAGGGCA-TG-GGCTG--CGC 448
451 ACGGCGCTGACGCTCTGTGTCATGTA-CGACAAAGATGTCGA---CT 500
449 ACGGCGCTGACGCTCTGTGTCATGTA-CGACAAAGATGTCGA---CT 498
501 TTG-CTTCCGACGGGGCA-CACTGCGAGCTCCAGACGGCTGATCG 550
499 TTGCGTCC-ACGAGGGGAGC-C-G--AAGG--AGT-CG--TCGGCCG 548
551 AC-AGATCTTCCACCAAGGCTGTAATAAATGCGCAATGCGT--RT-GTGA 600
549 -CGACGCTGCTGAGCGAGCTGAG-TGCG--T-T-C-TACT-TAGTCA 598
601 CCATACCTAAAGGCTCGTAGGT-TCACCACTCAAGTGTATATTTTT 650
599 --A--AC--AA-----TC-G-G-GTAC-A-GTC--G-GTA-A----- 648
651 TTTTAAAAA..... 700
649 -----AAAAA..... 698

```

第 19 図

【 図 20 】

```

MF-3 1 GG-GA--AAG-T-C-A-----TGACTGA-G-----TA-C-A-C 50
MF-4 1 GATGTTGAGCTTGTACGCCCCCGCTG-CTGCCCCCCCCCTCGGAGC 50
51 TCT-CCC--T-----C-C-----T-C-----TGCC-CTAC-GCC-TA 100
51 GCGCCGAGATGGTGTGCGACCAAGTACGCGCTGCGCCGCTGCGGTA 100
101 CGA-T-G-CGC--TGGAGCCCTTATCTCTAAG-GAGATCATG-ACGCT 150
101 CGACTAGCGTCCGCTGAGCCCGGATCTGG-GCGAGATCATG-GA- 150
151 C-CACCCGACAGGCAACACAG-ACCTACGTGAACAACTCAAGCCCGC 200
151 CGCCTACGAGAGGCAACAC-CCACCTACGTGAACAACTCAAGCCCGC 200
201 CAGAGAAG-CCTAAGCTGAGGGAGG-CC-CGCGAA-C-GA-CGTGCTTA 250
201 -G-GA-GGACA-A-GCTGAT-CGAGCGCTCCGCGAGCGAGCCCGCTCG 250
251 AGC-AGAT--C-CAGCTGAGAGTGGATCAAGTCAACGGCGCTGCCA 300
251 -GGAGATTCGCGACTG-A-AC-GCATCAAGTTCAGCGCGCTGCGCA 300
301 CATCAACCACTCGCTGTCTGGAAGAACCTGGCCCC--C--CAGAGCA 350
301 CACTCAACCTCGCTGTCTGGAAGAACCTGGCCCGAGCA-AG-G- 350
351 G-GGTGTG-CC-CACT-GAAGA--TGCCCTCAAGAGCCCATCG 400
351 GCGGCGAGAGCTGAGCTCGGGAGGCTG-CGCTC-C-G-G--ATCG 400
401 AGCAG-GAGTT--C--GG-CGACTTTG-A-GAAGTCAAGAGACCTT 450
401 ACC-GGACTTTGGCTGCTGAC--GCAATGAGG-A-GAG--TT 450
451 CAACAGAG-CCG-GCGCGCATCCAGGTTTC-G-GGCTGGCT-TGGCT 500
451 CAGCGG--GCTCTCGCGCCACACAGG--CAGCGG-TGCTG-CCTT 500
501 CGG--TGTGCCC-CGAGG-GCAACCTGACCTGGTGTG-CCAAG-G 550
501 GCGCTCAACCCACAGCGAG-AGCTGCGACATCAC-GACC--GG 550
551 A-CCAGAGCCGCTCAC-GACGACACCCCG-TCATTGC-TGGATGG 600
551 AAGCGAGCCACAGCGAG-AGCTGCGACATCAC-GACC--GG 600
601 C-TGGAGCACGCGCTGCTGCTGCTGAGTACAGCAAGCAAGGCTTC-CT 650
601 CGTGGAGCACGCGCTGCTGCTGCTGAGTACAGCAAGCAAGGCTTC-CT 650
651 ACCTT-AAGGCC-TGGTGAACCTGTTGACTG-G-GCCGAGCCCGAGAA 700
651 AC-TTCAGCGGATC-TGAGCCGATCAACACTTTGAG--GAGGCGAGAA 700
701 GCGCTTCCCTCGGGTGAAGAGAGGC-C-CAGCT--GTA-TG-CAGG 750
701 GCG-T-C-TC-A-----A-G-GA-GCGCTC-GCCAAG-ACCTGACACG 750
751 TTTGTAGATGATGAGCAGCAGGATTTTGTG-CCGACG-CC-G---A 800
751 TTG--GTTTTTTTTT-CTC-CG-T--AGCTGCGAATGACCTGCCA 800
801 GCTACTTAAAAA..... 850
801 CGCTAAAAA..... 850
851 AAAAA..... 900
851 AAAAA..... 900

```

第 20 図

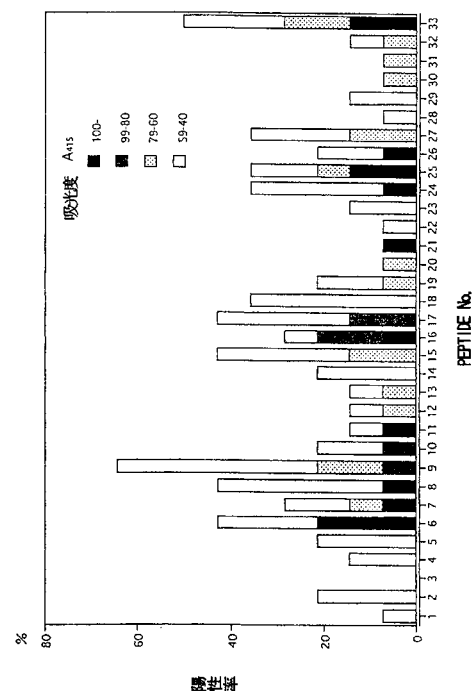
【 図 21 】

No.	アミノ酸配列	残基数	HPLC保持時間(分)
1	PGDPTATAKGNEIPDT	16	23.5
2	ATAKNEIPDTLMGY	15	32.4
3	NEIPDTLMGYIPWPEL	17	44.0
4	TLMGYIPWPELDSG	15	40.8
5	IPWPELDSGEVCGI	15	39.4
6	ELDSGEVCGIPTTFK	15	33.0
7	EVCGIPITTFKTRDEW	15	42.1
8	PTTFKTRDEWKGKIV	15	22.9
9	TRDEWKGKIVVIVSI	15	29.9
10	KGKIVVIVSIPGAYT	15	29.9
11	VIVSIPGAYTPICHQ	15	34.0
12	PGAYTPICHQHIPLV	17	44.6
13	PICHQHIPLVKRV	15	27.7
14	QHIPPLVKRVDELKA	15	29.9
15	LVKRVDELKAKGVDA	15	23.3
16	DELKAKGVDAVYVIA	15	31.3
17	KGVDAVYVIASNDPFVM	17	39.8
18	VYVIASNDPFVMAAW	15	43.2
19	SNDPFVMAAWGNFNNA	16	39.1
20	VMAAWGNFNNAKDKV	15	30.4
21	GNFNNAKDKVVFATD	15	26.8
22	AKDKVVFATDIDLAF	15	37.4
23	VFATDIDLAFSKALG	15	39.6
24	IDLAFSKALGATIDL	15	40.3
25	SKALGATIDLSAKHF	15	29.8
26	ATIDLSAKHFGERTA	15	26.3
27	SAKHFGERTARYALI	15	28.4
28	GERTARYALIIDDNK	15	27.5
29	RYALIIDDNKIVDFA	15	35.7
30	IDDNKIVDFADEGD	15	29.3
31	IVDFADEGDTGKLG	15	28.1
32	SDEGDTGKLGNASID	15	22.6
33	TGKLGNASIDTILYKV	16	34.8

HPLC分析条件: TSK-geI0DS4.6 φ × 250mm, UV210nm, 0→60% 0.05XTPA入り
アセトニトリルの60分間直線グラジエント溶出, 1.0 ml/min, 40℃

第 21 図

【 図 22 】



第 22 図

【 図 2 3 】

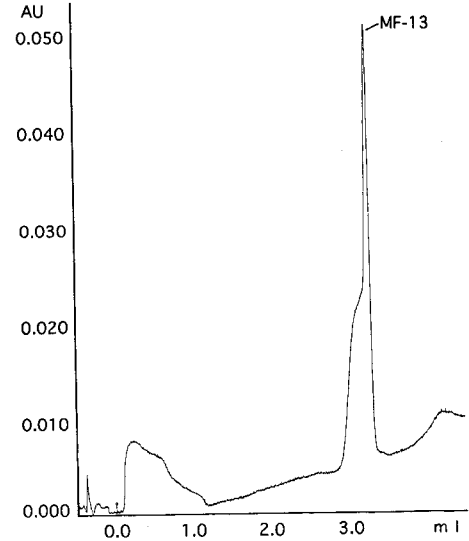
```

5' /ADNA 1 AGCAGCAGGGACATGGTTPGGAAGCACAATTCGCGTAGCTGGCGCTGAAGCGATAC 60
cDNA 1 1
61 GCTGAGAAATTCACCTTTCCTCCCGCTGACGGCCAGACCCCGAATCTGCCGAATTACCA 120
1 1
121 AGCAANTGCACGTGACGTTTGTGGAGGCTGGGGATTATCAGGCCACGTATCAGTGAGCC 180
1 1
181 GAGCACCGCGTGGCTTGGCTGGCTGCATATRAAGCCGGTGGCCGCTGCACAGCTTC 240
1 1
241 ATCTTCCACGACAAATCATTTATGCTGCTGGTGTAGGTACCGGGAAGTGACACCGCATGCTGACC 300
1 M P G
301 ATCAGGATCCCTACTGCTACTGCGCAAGGTTAAGGAGATCCCGACACCCATGAGGCTAGA 360
1 D P T A T A K G N E I P D T L M G Y
361 TCCCTGGACCCCGGAGCTCGACTCCGGTGAAGTGTGTGGTATCCCCACCACTTCAAGA 420
19 I P W T P E L D S G E V C G I P T T F K
421 CCCTGACGAGTGGAAAGGCAAGAAGTGTGTGTTGTCTCGATCCCGGCTGACACCC 480
39 T R D E W K G K K V V I V S I P G A Y T
481 CCAATCGCCACAGCAGCACATCCCGCGCTGTGAAGCGTGTGATGAGCTCAAGCCCA 540
59 P I C H Q Q H I P P L V K R V D E L K A
541 AGGCTGCGACCGCTGTAGTCAATTCGCTGCAACGACCCCTTCGTGATGGGTATGACT 600
79 K G V D A V V V I A S N D P P V M
601 GCTCTGATTTCTTTATGCTAACCGACAGCTGCTGGGGCACTTCAACACCGCCAGG 660
95 A A W G N F N N A K
661 AGAAGTGTGTTTGTGACCGAGCAATGACCTGCTCTCCGAGGCTCTCCGGCGGAGCA 720
11 D K V V P A T D I D L A F S K A L G A T
721 TCGACTGAGCGCCAGCACCTTGTGTGAGCGCACGGCCCGCTACGCTCTGATCATTTGACG 780
31 I D L S A K H F G E R T A R Y A L I I D
781 ACAACAGATTTGCGACTTTCCTTCGAGCGAGGGCGCACCTGGCAAGCTCCAGAACCGGT 840
51 D N K I V D F A S D E G D T G K L Q N A
841 CGATCGACAGATTCCTCAACAGGCTAAAATGGCCGATGTGCGTGTGTGACCACTACC 900
71 S I D T I L T K V *
901 TBAAGGTCCTGAGAGTTCCAAGTCAAGTCTATATTTTTTTTTTACAGGATGTGTGTA 960
80
961 CTGCCACCTGCCCTTTGAGCAAGGCGTCCAG 991
80

```

第 2 3 図

【 図 2 4 】



第 2 4 図

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/14	C 0 7 K 16/14	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年8月31日第40回日本医真菌学会総会事務局発行の「第40回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集」に発表

(72)発明者 大西 佳美

京都府京都市伏見区下板橋町598番地1号

(72)発明者 加藤 郁之進

京都府宇治市南陵町1丁目1番150号

(72)発明者 秋山 一男

神奈川県川崎市宮前区けやき平1丁目10番402号

(72)発明者 安枝 浩

神奈川県相模原市桜台18番地1号

(72)発明者 山口 英世

神奈川県川崎市多摩区栗谷2丁目15番5号

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA31 BA49 CA04 CA12 CA20 DA02 GA05
 HA01
 4B064 AG26 AG31 BA13 BA14 BA15 BF03 BF04 BF05 CA05 CA20
 CC24 CE10 DA01 DA13 DA15
 4C085 AA03 BA49 EE01
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA15 DA75 DA86 EA20 EA50
 EA52 FA74 GA21 GA26 GA30

专利名称(译)	马拉色菌衍生的抗原蛋白		
公开(公告)号	JP2005168506A	公开(公告)日	2005-06-30
申请号	JP2004368355	申请日	2004-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	宝酒造公司		
申请(专利权)人(译)	TakaraBio公司		
[标]发明人	竹迫一任 大門尚志 八木原朋子 黒田正伸 大西佳美 加藤郁之進 秋山一男 安枝浩 山口英世		
发明人	竹迫 一任 大門 尚志 八木原 朋子 黒田 正伸 大西 佳美 加藤 郁之進 秋山 一男 安枝 浩 山口 英世		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61P31/10 A61P37/08 C07K14/37 C07K16/14 C12N15/09 C12P21/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.K A61P31/10 A61P37/08 C07K14/37 C07K16/14 C12P21/02.C G01N33/53.N C07K14/37.ZNA C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12P21/08 G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA49 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA01 4B064/AG26 4B064/AG31 4B064/BA13 4B064/BA14 4B064/BA15 4B064/BF03 4B064/BF04 4B064/BF05 4B064/CA05 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4C085/AA03 4C085/BA49 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA15 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA26 4H045/GA30		
优先权	1995346627 1995-12-12 JP 1996257612 1996-09-05 JP 1996257613 1996-09-05 JP		
其他公开文献	JP3983246B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供纯化的马拉色氏菌变应原，作为一种基本上纯净的分离的抗原蛋白，衍生自马拉色氏菌属的一种真菌，优选为马拉色氏菌变态反应患者的主要变应原，并阐明其蛋白质化学性质。到一种基本上纯净的，分离的，来源于马拉色酵母属真菌的抗原蛋白，具有与来源于马拉色霉菌过敏性疾病患者的IgE抗体结合的能力，包括以下(1)和(2)：选自以下的抗原蛋白：

(1)具有以下物理化学性质的抗原蛋白：(a)具有特定序列的部分氨基酸序列的蛋白，(b)分子量约为20,000(在还原条件下为SDS)-PAGE)，(c)在非还原条件下的分子量约为40,000(SDS-PAGE)，(d)未变性的等电点为4.8，(e)在8M尿素变

性下的等电点为5.8 (2。) 特定序列的氨基酸序列，或在该氨基酸序列中缺失，添加，插入或取代1至几个氨基酸残基中的至少一个的序列。

[选择图]无

	SDS-PAGE (kDa)		等電点 ²⁾
	還元 ¹⁾ 条件下	非還元条件下	
MF-1	21	40	4.7 (5.3)
MF-2	20	40	4.8 (5.8)
MF-3	27	27	5.2 (6.5)
MF-4	26	26	5.2 (6.3)
MF-5	66	—	— (6.1)
MF-6	43	—	— (6.2)
MF-7	15	—	— (6.0)
MF-8	30	—	— (5.4)
MF-9	40	—	— (5.3)
MF-10	44	—	— (6.2)
MF-11	45	—	— (6.4)
MF-12	100	—	— (5.0)
MF-13	16	—	8.1