

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-252380

(P2007-252380A)

(43) 公開日 平成19年10月4日(2007.10.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
CO7K 16/14 (2006.01)	CO7K 16/14	4B064
CO7K 14/37 (2006.01)	CO7K 14/37	4H045
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-118138 (P2007-118138)	(71) 出願人	302019245 タカラバイオ株式会社
(22) 出願日	平成19年4月27日 (2007.4.27)		滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
(62) 分割の表示	特願2004-368355 (P2004-368355) の分割	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
原出願日	平成8年12月10日 (1996.12.10)	(72) 発明者	竹迫 一任 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7-346627	(72) 発明者	大門 尚志 京都府相楽郡木津町木津川台2丁目2番5号
(32) 優先日	平成7年12月12日 (1995.12.12)	(72) 発明者	八木原 朋子 滋賀県彦根市中藪町601番地1号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	黒田 正伸 滋賀県大津市瀬田2丁目1番15号
(31) 優先権主張番号	特願平8-257612		
(32) 優先日	平成8年9月5日 (1996.9.5)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願平8-257613		
(32) 優先日	平成8年9月5日 (1996.9.5)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

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】

【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、すなわち精製されたマラセチアアレルゲン、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ゲンを提供し、それらの蛋白化学的な性質を明らかにすること。

【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ことを特徴とする、マラセチア属の真菌由来の単離された抗原性蛋白質であって、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。

【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単離された抗原性蛋白質であって、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。

【請求項 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、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単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 3】

配列表の配列番号：4 に記載の塩基配列からなる請求項 2 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 3 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 6 x SSC 中、50 で 12 ~ 20 時間インキュベートした後、0.5% SDS を含む 0.1 x SSC 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。

20

【請求項 5】

請求項 2 ~ 4 いずれか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 6】

請求項 1 記載の抗原性蛋白質に対するモノクローナル抗体。

【請求項 7】

請求項 1 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 8】

請求項 1 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。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【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。

40

【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 I g E 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 I g E と特異的なアレルゲンが組み合わさると、I g E が細胞表面上で架橋し、I g E - 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

50

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、I g E 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 I g E 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。全身的效果は、血管内の抗原への I g E - 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 (T h) 細胞である。抗原刺激により活性化された T h 細胞の産生する種々のサイトカインのうち、I L 4 は I g E 産生を促進する。

【 0 0 0 4 】

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 C r y j 1、C r y j 2、ダニより D e r f 1、D e r f 2、D e r f 3、ネコより F e l 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。

【 0 0 0 5 】

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、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、R A S T 法等による血清中の I g E 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の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。

【 0 0 0 6 】

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

【 0 0 0 7 】

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。

【 0 0 0 8 】

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 I g E 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 I g E 結合性

10

20

30

40

50

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る。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。

10

【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。

20

【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。

30

【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

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

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。

40

【0012】

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

50

原性蛋白質、すなわち精製されたマラセチアアレルゲン、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ゲンを提供し、それらの蛋白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。

【0013】

(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。

【0014】

(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。

10

【0015】

(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。

【0016】

(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。

【0017】

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

【0018】

(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。

20

【0019】

(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。

【0020】

(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。

【0021】

(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。

30

【0022】

(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。

【0023】

(12) 本発明の第12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。

【0024】

(13) 本発明の第13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。

40

【課題を解決するための手段】

【0025】

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. フェーフアTIMM2782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、RAST陽性の患者血清を用いて探索した結果、MF-1~13と命名した13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

50

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.ファーフア細胞のmRNA由来のcDNAを材料としてポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)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PCR断片の全部または一部をプローブとして用い、M.ファーフア細胞のcDNAライブラリーより目的とする遺伝子を単離した。また、MF-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IgE抗体に対するエピトープの検索、MF-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。

【0026】

即ち、本発明の1の態様は、マラセチア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単離された抗原性蛋白質であって、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に関する。

10

【0027】

本発明の他の態様は、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、マラセチア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に関する。

【0028】

本発明の他の態様は、配列表の配列番号：4に記載の塩基配列からなる請求項2記載のポリヌクレオチドに関する。

20

【0029】

本発明の他の態様は、前記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6×SSC中、50で12～20時間インキュベートした後、0.5%SDSを含む0.1×SSC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IgE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に関する。

【0030】

本発明の他の態様は、前記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IgE抗体に対して結合能を有する抗原性蛋白質の製造方法に関する。

30

【0031】

本発明の他の態様は、前記抗原性蛋白質に対するモノクローナル抗体に関する。

【0032】

本発明の他の態様は、前記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に関する。

【0033】

本発明の他の態様は、前記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。

40

【発明の効果】**【0034】**

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。

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。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

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 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（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、S D S - P A G E 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。 10

【0036】

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。

【0037】

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。

【0038】

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 I g E 抗体、特にマラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 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。 20

【0039】

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 ファーフア) 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 F E R M B P - 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。 30

【0040】

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、I g E 抗体に認識される精製抗原性蛋白質である。

【0041】

本明細書でいうアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体に対する結合能は、¹²⁵I 標識抗 I g E 血清を用いた R A S T 法、酵素標識抗 I g E 血清を用いた Direct - R A S T R I A 法や E L I S A 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。

【0042】

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 (S D S - P A G E、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 8 M 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、M F - 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。 40

【0043】

(1) MF - 1 は、S D S - P A G E により、還元条件下で約 21 k D a、非還元条件下で約 40 k D a の分子量を示し、未変性下の等電点は約 4.8 および 8 M 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。

【0044】

(II) MF - 2 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 20 kDa、非還元条件下で約 40 kDa の分子量を示し、未変性下の等電点は約 4.8 および 8 M 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。

【0045】

(III) MF - 3 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 27 kDa、非還元条件下でも約 27 kDa の分子量を示し、未変性下の等電点は約 5.2 および 8 M 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。

【0046】

(IV) MF - 4 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 26 kDa、非還元条件下でも約 26 kDa の分子量を示し、未変性下の等電点は約 5.2 および 8 M 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。

【0047】

(v) MF - 5 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 66 kDa の分子量を示し、8 M 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。

【0048】

(VI) MF - 6 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 43 kDa の分子量を示し、8 M 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。

【0049】

(VII) MF - 7 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 15 kDa の分子量を示し、8 M 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。

【0050】

(VIII) MF - 8 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 30 kDa の分子量を示し、8 M 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。

【0051】

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

【0052】

(X) MF - 10 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 44 kDa の分子量を示し、8 M 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。

【0053】

(XI) MF - 11 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 45 kDa の分子量を示し、8 M 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。

【0054】

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

【0055】

(XIII) MF - 13 は、SDS - PAGE により、還元条件下で約 16 kDa 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。

【0056】

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。

【0057】

10

20

30

40

50

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R A S T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I g E抗体価陽性である。そして、これらの粗抗原に対するI g E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I g E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)。

【0058】

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。

10

【0059】

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/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。

20

【0060】

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。

30

【0061】

(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I g Eの刺激、I g Eの結合、I g G及びI g M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。

40

【0062】

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I g E抗体に対して実質的に結合能を有しないか、I g E抗体へ

50

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、I g E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I g E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I g E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。

【0063】

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、R A S T、E L I S A、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。

10

【0064】

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I g E抗体に結合し、それによりI g E - 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。

20

【0065】

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（I g E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I g E量を測定することにより、I g E結合ペプチドを選択することができる。

30

【0066】

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。

【0067】

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。

40

【0068】

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

50

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。

【0069】

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。

【0070】

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。

10

【0071】

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。

20

【0072】

即ち、まず、*M. furfur*等のマラセチア属菌をディクソン（Dixon）培地等のオリー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。

30

【0073】

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ー、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のイムノプロット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。

40

【0074】

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、

50

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) にかける分子量 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) にかける分子量約 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) にかける、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、

10

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。

【 0 0 7 5 】

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) にかける 0.1M の NaCl による溶出画分を取得する工程、

20

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) にかける分子量 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) にかける分子量約 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) にかける、pH 約 5 で溶出される画分を取得する工程、および

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。

30

【 0 0 7 6 】

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。

【 0 0 7 7 】

1 . MF - 1 の製造例について

M. furfur (マラセチア フェーファ) 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) にかける 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) にかける分子量 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) にかける分子量約 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) にかける素通り画分を銅キレートクロマトグラフィーにかける 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。

40

【 0 0 7 8 】

50

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) にかけて 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) にかけて分子量 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) にかけて分子量約 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) にかけて、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。

10

【0079】

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) にかけて 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) にかけて分子量 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) にかけて分子量約 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) にかけて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。

20

【0080】

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) にかけて 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) にかけて分子量 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) にかけて分子量約 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) にかけて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

40

【0081】

5. MF - 13 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) にかけて非吸着画分を集め、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) にかけて、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

50

得られる。

【0082】

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。

【0083】

(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

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ギー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FERMBP-5608、FERMBP-5609、FERMBP-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。

【0084】

(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。

【0085】

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。

【0086】

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。

【0087】

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。

【0088】

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

10

20

30

40

50

一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。

【0089】

(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性疾患の治療薬を提供する。

10

【0090】

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。

【0091】

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。

20

【0092】

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

30

【0093】

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。

【0094】

(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ギーの免疫学的定量に用いることができる。

40

【0095】

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ギーの標準品として、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ギー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ギー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。

【0096】

(7) 本発明の組換えマラセチア抗原性蛋白質

50

本発明は、アレルギー疾患患者由来の I g E 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 ~ 1 4 のアミノ酸配列を有する r M F - 1 ~ 7 (ここで、r M F - 1 ~ 7 という表示は、M F - 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 ~ 1 4 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、r M F - 1 ~ 7 に対応する M F - 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 ~ 1 4 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、r M F - 1 ~ 7 に対応する M F - 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。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

例えば、r M F - 1 を例にすると、M F - 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 r M F - 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 M F - 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 r M F - 1 に含まれる。r M F - 2 ~ 7 についても同様である。

【 0 0 9 8 】

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ギー活性を有することであり、マラセチアアレルギー活性とは、アレルギー疾患患者由来の I g E 抗体、特にマラセチアアレルギー疾患患者由来の I g E 抗体との結合活性をいう。

【 0 0 9 9 】

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。

【 0 1 0 0 】

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 D N A 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。

【 0 1 0 1 】

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 アシツズ 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)]、P C R 法 [ジーン (Gene) 第 102 巻、第 67-70 頁 (1991)]、ウラシル D N A 法 [メソツズ 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。

【 0 1 0 2 】

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。

【0103】

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細胞エピートープ、疎水性エピートー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細胞エピートー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細胞エピートー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細胞エピートー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。

【0104】

(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。

【0105】

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。

【0106】

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。通常の種類のコ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

10

20

30

40

50

を繰り返しても良い。

【0107】

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。

【0108】

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、マラセチアアレルギー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。

【0109】

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、マラセチアアレルギー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. sympodialis 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る、これらも本発明に含まれる。

【0110】

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0.1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。

【0111】

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. ファーファ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

10

20

30

40

50

る、図18に示した推定塩基配列をも有する遺伝子も有している。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ジ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

【0112】

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)。 20

【0113】

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。 30

【0114】

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。

【0115】

(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體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が、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。 40

【0116】

本発明の抗原性断片は、例えば、少なくとも1個のT細胞エピトープを含む抗原性断片 50

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。

【0117】

10

(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。

【0118】

(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

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。

20

30

【0119】

(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ー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。

【0120】

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。

40

【0121】

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ンクス緩衝液で適当に溶解し、希釈してヒスタミン遊離滴定用試薬として用いる。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、アレルゲン刺激により好塩基球から遊離するヒスタミン量をHPLC

50

を用いて測定する。

【0122】

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。

【0123】

(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ゲンと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。

10

【0124】

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、トレランスを誘導し、疾患を治療することが可能である。

20

【0125】

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。

30

【0126】

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。

40

【0127】

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

50

ラセチア菌に特異的な I g E 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】

【0128】

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。

【0129】

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 (FERMBP-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%、ツィーン40 1.0%、グリセロール - モノオレイン酸 0.25%) 150 ml を入れた500 ml 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0.5 mm 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 (18,000 rpm, 30 min) にかけて、上清を得た。この上清を精製水に対して透析、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌後、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。

【0130】

前記マラセチア粗抗原 2782 約800 mg 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。

【0131】

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、4 mg / ml となるように2 M 硫酸アンモニウムを含有する0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で溶解後、そのうち100 μl を2 M 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 Pheny I Superose PC1.6/5 (カラム容積0.1 ml、ファルマシア社製) にかけて、0.1 M 同緩衝液で硫酸アンモニウム2 M から0 M 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0.1 ml、ファルマシア社製) にかけて、同緩衝液で食塩0 M から0.3 M までの直線的グラジエント溶出を行った (図1、流速: 100 μl / 分、検出: 280 nm)。50 μl 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I g E 抗体結合性を調べた。

【0132】

即ち、各分画を0.01% ツィーン20入り0.1 M ほう酸緩衝液 (pH8.0) で10、100、1000倍希釈し、その45 μl 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クした。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 μl ずつを加えて、その後、希釈した - 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I g E と結合する蛋白質が存在する。

【0133】

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。

【0134】

10

20

30

40

50

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20 kDa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20 kDa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80 kDa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。

【0135】

10

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(pH 6.5)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粗抗原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。

20

【0136】

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(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)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。

30

【0137】

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

40

さらに前記のマラセチア部分精製粗抗原2782の150µgを8M尿素、0.5%NP-40、2%β-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

50

性率が高いと判断された分子量約 21 kDa で等電点約 5.3、分子量約 20 kDa で等電点約 5.8、分子量約 27 kDa で等電点約 6.5、分子量約 26 kDa 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 66 kDa、等電点約 6.1 (MF-5 と命名)、及び分子量約 43 kDa、等電点約 6.2 (MF-6 と命名)、分子量約 15 kDa、等電点約 6.0 (MF-7 と命名)、分子量約 30 kDa、等電点約 5.4 (MF-8 と命名)、分子量約 40 kDa、等電点約 5.3 (MF-9 と命名)、分子量約 44 kDa、等電点約 6.2 (MF-10 と命名)、分子量約 45 kDa、等電点約 6.4 (MF-11 と命名)、分子量約 100 kDa、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

【0138】

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。

【0139】

【表 1】

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。

【0140】

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ト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。

【0141】

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スファーストカラム (1 x 15 cm) 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。

【0142】

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 NH_4HCO_3 で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75pg (ファルマシア社製) につけ、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 NH_4HCO_3 で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75pgにつけ、MF-13を単離した。

【0143】

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末端ア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。

【0144】

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10 μg 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20 μg 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20 μg を静脈内に投与した。

【0145】

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2 x 10⁵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 (FERMBP-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 (FERMBP-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 (FERMBP-5610) を

【0146】

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。

【0147】

10

20

30

40

50

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

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。

【0148】

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 とり、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

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

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

【0152】

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

50

陽性であった。

【 0 1 5 3 】

【 表 2 】

表 2

	アレルギー疾患患者 (R A S T 陽性率)				計 (n=76)	健康人 (n=12)
	B A (n=20)	A D + B A (n=26)	A D (n=30)			
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喘息合併患者

10

20

30

40

【 0 1 5 4 】

【表 3】

表 3

	アレルギー疾患患者 (I g E 抗体価 (P R U 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

【 0 1 5 5 】

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 R A S T 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

【 0 1 5 6 】

【表 4】

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

【 0 1 5 7 】

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 γ -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、415 nm の吸光度を測定した。その結果を図 1 2 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

【 0 1 5 8 】

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% ツィーン 20 を含む生理食塩水で洗浄し、3% BSA を含む PBS

50

でブロッキングし、0.01% ツィーン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、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IgE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。その結果を図13に示した。

【0159】

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、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プロットングにより確認された。

【0160】

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; 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。

【0161】

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でブロッキングし、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。

【0162】

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 $\mu\text{g/ml}$ となるように、精製抗原性蛋白質 (MF-1、MF-2、MF-4) を 1、10 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、5% CO_2 、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 3 】

【表 5】

表 5

S I (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 μ 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 μ 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

【0164】

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

50

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、アレルギー活性成分の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、アレルギー活性成分を1 mg / 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。

【0165】

実施例 8

減感作治療用抗原製剤の調製

精製されたアレルギー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。アレルギー活性成分を1 mg / 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。 10

【0166】

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。 20

【0167】

サンドイッチELISA法により、1 ng / 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87.1~1.1 ng / 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。

【0168】

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

 30

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。

【0169】

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、 40
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。

【0170】

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 50

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。

【0171】

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
 Glu Ile Met Glu Thr His Tyr Glu Lys His (配列番号: 52) 10
 のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

【0172】

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。

【0173】

また、MF - 6 は、N末端アミノ酸配列分析の結果、
 Arg Lys Val Ala Val Leu Gly Ala Ser Gly Gly Ile Gly Gln Pro Leu Ser Leu Leu Met 20
 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。

【0174】

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。

【0175】

また、MF - 10 は、N末端アミノ酸配列分析の結果、
 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 30
 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 - 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。

【0177】

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 40
 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 50

る蛋白質であることが明らかとなった。

【0178】

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 T I M M 2 7 8 2 株の菌体より全 RNA を得るため、該菌株を 3 0 0 m l の Y N B 培地 (0 . 6 7 % パクトイーストナイトロゲンベース、0 . 5 % パクトカシトン、0 . 1 % ツィーン 6 0、2 . 0 % グルコース、5 % M E M - ビタミン液) で 7 2 時間培養後、3 0 0 0 r p m で 1 5 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碎した後、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 . 3 m g の全 RNA を回収、精製した。

10

【0179】

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 MF 1 F 1 と MF 1 F 2 を合成、精製し PCR のプライマーとした。MF 1 F 1 と MF 1 F 2 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 RNA 1 μ g 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 - 1 c D N A を増幅した。具体的には、オリゴ (d T) ₂₀ - M 4 アダプタープライマーを用いて、1 μ g の全 RNA から AMV 逆転写酵素の反応 (4 2、6 0 分間) により c D N A を合成した。この c D N A を鋳型とし、MF 1 F 1 とキットに含まれている M 1 3 M 4 プライマーを用いて、9 4 で 1 分、5 5 で 2 分、7 2 で 1 . 5 分の温度シフトを 4 0 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 (n e s t e d P C R 反応) を行った。この反応では、MF 1 F 2 と M 1 3 M 4 プライマーを使用した。PCR の結果、約 5 7 0 b p の長さの c D N A 断片が増幅した。この c D N A を p U C 1 1 8 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 c D N A 断片は MF - 1 遺伝子であることが明らかとなった。

20

【0180】

11 - c) M. ファーフアの c D N A ライブラリーの作製

オリゴテックス - d T 3 0 < スーパー > (宝酒造社製) を用いて、実施例 11 - a) の全 RNA 1 m g から 2 0 μ g のポリ (A) ⁺ RNA を精製した。該ポリ (A) ⁺ RNA 5 μ g を用いて、c D N A 合成キット (宝酒造社製) により c D N A を合成した。合成された c D N A とラムダファージベクター S H 1 o x ^{T M} (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、c D N A ライブラリーを構築した。

30

【0181】

11 - d) MF - 1 c D N A のクローニング

実施例 11 - c) で得られた c D N A ライブラリーを宿主大腸菌 E R 1 6 4 7 株に感染させ、トップアガロース (0 . 7 % パクトアガーを含む L B 培地) と混合後、L B プレート上に重層し、3 7 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 (H y b o n d - 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 5 7 0 b p の c D N A 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 [³² P] d C T P で標識し、ハイブリダイゼーションのプロープとして使用した。1 . 6 \times 1 0 ⁵ 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 1 0 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 - 1 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

40

50

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。

【0182】

11-e) M.ファーファからのゲノムDNAの精製

M.ファーファ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(0.15MNaCl、0.1MTris-HCl(pH7.5)、10mMEDTA)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425~600 μ m、シグマ社製)を加え、ミニビーダー(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 $^{\circ}$ C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(10mMTris-HCl、1mMEDTA)に溶解した後、RNアーゼAを終濃度40 μ g/mlとなるように加え、37 $^{\circ}$ C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

【0183】

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

【0184】

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。

【0185】

実施例12

M.ファーファ由来の抗原性蛋白質MF-2遺伝子のクローニング

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。

40

【0186】

12-b) MF-2cDNAのクローニング

50

実施例 1 1 - d) に記載の方法により、実施例 1 2 - a) で得られた配列番号 : 2 1 で表わされる約 2 8 0 b p の M F - 2 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 0 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ニングにより、これらのファージから M F - 2 c D N A を含む領域を自動的にサブクロ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 5 5 0 b p の c D N A を含む p M F 2 - 2 を選んだ。該 c D N A を p U C 1 1 8 ベクターへサブクロニングし、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、M F - 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

【 0 1 8 7 】

実施例 1 3

M . ファーフア由来の抗原性蛋白質 M F - 3 遺伝子のクローニング

1 3 - a) M F - 3 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 - 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 M F 3 F 1、M F 3 F 2、M F 3 R 3 を合成、精製し P C R のプライマーとした。M F 3 F 1、M F 3 F 2、M F 3 R 3 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号 : 2 2 ~ 2 4 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 - 3 c D N A 断片を増幅した。1 回目の P C R 反応には M F 3 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 3 F 1 と M F 3 R 3 の組み合わせと M F 3 F 2 と M 1 3 M 4 プライマーの組み合わせを用いた。P C R 反応の結果、M F 3 F 1 と M F 3 R 3 の組み合わせでは約 3 8 0 b p、M F 3 F 2 と M 1 3 M 4 プライマーの組み合わせでは約 2 8 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 断片の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 : 2 5 と 2 6 に示す。配列番号 : 2 5 と 2 6 より予想されるアミノ酸配列は、M F - 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 c D N A 断片は M F - 3 遺伝子であることが明らかとなった。

20

【 0 1 8 8 】

1 3 - b) M F - 3 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 3 - a) で得られた配列表の配列番号 : 2 5 で表わされる約 3 8 0 b p の M F - 3 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 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ニングにより、これらのファージから M F - 3 c D N A を含む領域を自動的にサブクロ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 7 5 0 b p の c D N A を含む p M F 3 - 1 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 : 3 に示す通りであり、M F - 3 遺伝子は配列表の配列番号 : 1 0 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

【 0 1 8 9 】

実施例 1 4

M . ファーフア由来の抗原性蛋白質 M F - 4 遺伝子のクローニング

1 4 - a) M F - 4 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 - 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 M F 4 F 1 と M F 4 F 2 を合成、精製し P C R のプライマーとした。M F 4 F 1 と M F 4 F 2 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号 : 2 7 と 2 8 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 - 4 c D N A 断片を増幅した。1 回目の P C R 反応には M F 4 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 4 F 2 と M 1 3 M 4 プライマーを用いた。P C R 反応の結果、約 7 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 : 2 9 に示す。配列番号 : 2 9 より予想されるアミノ酸配列は、M F - 4 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 - 4 遺伝子であることが明らか

40

50

となった。

【0190】

14 - b) MF - 4 c DNA のクローニング

実施例 11 - d) に記載の方法により、実施例 14 - a) で得られた配列表の配列番号 : 29 で表わされる約 700 bp の MF - 4 c DNA 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 MF - 4 c DNA 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 820 bp の c DNA を含む pMF 4 - 4 を選び、該 c DNA 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、MF - 4 遺伝子は配列表の配列番号 : 11 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

【0191】

実施例 15

M . ファーフア由来の抗原性蛋白質 MF - 5 遺伝子のクローニング

15 - a) MF - 5 遺伝子の RT - PCR による増幅

実施例 10 に記載の MF - 5 蛋白質の N 末端アミノ酸配列より、この蛋白質は DL DH 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 DL DH アミノ酸配列を基にアミノ酸配列 GYVA AIKA をコードするオリゴヌクレオチド混合物 MF 5 F 1 と、他生物間の DL DH 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 ML AHK AEE) に対応するオリゴヌクレオチド MF 5 R 2 を合成、精製し PCR のプライマーとした。MF 5 F 1 と MF 5 R 2 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号 : 30 と 31 に示す。実施例 11 - b) に記載の方法に従って、RT - PCR を行い、MF - 5 c DNA 断片を増幅した。1 回目の PCR 反応には MF 5 F 1 と M 13 M 4 プライマーを用い、2 回目の PCR 反応には MF 5 F 1 と MF 5 R 2 を用いた。PCR 反応の結果、約 900 bp の長さの c DNA 断片が増幅した。増幅した c DNA 断片の塩基配列を配列表の配列番号 : 32 に示す。配列番号 : 32 より予想されるアミノ酸配列は、MF - 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 DNA 断片は MF - 5 遺伝子であることが明らかとなった。

20

【0192】

15 - b) MF - 5 c DNA のクローニング

実施例 11 - d) に記載の方法により、実施例 15 - a) で得られた配列表の配列番号 : 32 で表わされる約 900 bp の MF - 5 c DNA 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 12 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 - 5 c DNA 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 kbp の c DNA を含む pMF 5 - 6 と pMF 5 - 7 を選び、該 c DNA 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 33 に示す通りであり、MF - 5 遺伝子は配列表の配列番号 : 12 と 34 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 92%、コードするアミノ酸配列で 96% のホモロジーを有し、実施例 10 に記載の MF - 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 MF - 5 遺伝子であることが明らかとなった。

30

40

【0193】

実施例 16

M . ファーフア由来の抗原性蛋白質 MF - 6 遺伝子のクローニング

16 - a) MF - 6 遺伝子の RT - PCR による増幅

実施例 10 に記載の MF - 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 MF 6 F 1 と MF 6 F 2 を合成、精製し PCR のプライマーとした。MF 6 F 1 と MF 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

50

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MF6F1とM13M4プライマーを用い、2回目のPCR反応にはMF6F2とM13M4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pUC118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

【0194】

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pMF6-13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

【0195】

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MF7F1とMF7F2を合成、精製しPCRのプライマーとした。MF7F1とMF7F2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MF7F1とM13M4プライマーを用い、2回目のPCR反応にはMF7F2とM13M4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pUC118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

【0196】

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pMF7-1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。

40

50

【0197】

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。

【0198】

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 ~ 0.5 mmol / g 樹脂) した樹脂 (50 mg) をまず、30% ピペリジン / DMF (0.5 ml) で処理して Fmoc 基を除去した。DMF (0.6 ml x 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 (0.6 ml x 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。

【0199】

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)) (0.7 ml) 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 (5 mg) 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 (14 ml) を加えて結晶化した。析出した結晶を遠心分離 (3000 rpm、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。

【0200】

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 1 µg / ウェルとなるようにコーティングした。各ウェルに M. ファーファ 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、415 nm 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. ファーファ 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。

【0201】

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、MmAb 37 および MAb 51 を加え反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体、続いて酵素基質を加え、450 nm の吸光度を測定した。M-40 および MmAb 37 は、ペプチド 5 に反応し、MAb 51 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。

【0202】

実施例19

組換えマラセチア抗原性蛋白質の診断への応用

10

20

30

40

50

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%のツイーン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 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。

【0203】

19 - b) 組換えマラセチア抗原性蛋白質 r MF - 1、r MF - 2、r MF - 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。

【0204】

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r MF - 1、r MF - 2、r 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、r MF - 1、r 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、特にADの患者ではr MF - 1、r 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r MF - 1、r MF - 2、r MF - 4のいずれかに対するI g E抗体が存在していた。

【0205】

なお、本発明の態様として、以下のものが挙げられる。

〔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) 8M尿素変性下の等電点約5.8、

(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

〔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

10

20

30

40

50

- (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、
- (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
- [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。 10
- (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
- [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。 20
- (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らなる抗原性蛋白質
- [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。 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：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) 8 M 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
- [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。 40
- (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) 8 M 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
- [7] 前記 [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 50

クレオチド。

〔 8 〕 前記〔 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 6 × SSC 中、50 で 12 ~ 20 時間インキュベートした後、0.5% SDS を含む 0.1 × SSC 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 IgE 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。

〔 9 〕 前記〔 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 IgE 抗体に対して結合能を有する抗原性蛋白質の製造方法。

〔 10 〕 前記〔 1 〕 ~ 〔 6 〕いずれか記載の抗原性蛋白質に対する抗体。

〔 11 〕 前記〔 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。

〔 12 〕 前記〔 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。

〔 13 〕 前記〔 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。

【産業上の利用可能性】

【 0 2 0 6 】

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。

【図面の簡単な説明】

【 0 2 0 7 】

【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 C B B 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。

【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。クーマシーブルーリリアント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。

【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。

。

10

20

30

40

50

【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。

【図17】図17は、2種類のMF-5 cDNA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-6 PCR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-1 cDNAとMF-2 cDNAのヌクレオチド配列の比較の図である。

【図20】図20は、MF-3 cDNAとMF-4 cDNAのヌクレオチド配列の比較の図である。 10

【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。

【図23】図23は、MF-1 cDNA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。

【0208】

配列表

配列番号：1 20

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

配列：

```
GCCTGGTGAT CCTACTGCTA CTGCCAAGGG TAACGAGATC CCCGACACCC TCATGGGCTA 60
CATCCCTGG ACCCCGGAGC TCGACTCGGG TGAGGTGTGT GGTATCCCA CCACCTTCAA 120
GACCCGCGAC GAGTGGAAAG GCAAGAAGGT TGTGATTGTC TCGATCCCGG GTGCCTACAC 180
CCCCATCTGC CACCAGCAGC ACATCCCCCC GCTTGTGAAG CGTGTGGATG AGCTCAAGGC 240
CAAGGGTGTC GACGCCGTGT ACGTCATTGC GTCGAACGAC CCCTTCGTCA TGGCTGCCTG 300
GGGCAACTTC AACAAAGCCA AGGACAAGGT CGTCTTTGCC ACCGACATTG ACCTGGCCTT 360
CTCCAAGGCT CTCGGCGCGA CGATCGACCT GAGCGCCAAG CACTTTGGTG AGCGCACGGC 420
CCGCTACGCT CTGATCATTG ACGACAACAA GATTGTGCAC TTTGCTTCGG ACGAGGGCGA 480
CACTGGCAAG CTCCAGAAGC CGTCGATCGA CACGATCCTC ACCAAGGTCT AAAATGGCGC 540
ATGTGCGTTG TGTGACCACT ACCTAAAGGG TCCGTAGAGT TCCAAGTCAA GTCGTATATT 600
TTTTTTTTTAA AAAAAAAAA 618
```

30

配列番号：2

配列の長さ：551 40

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 CCCAACGCTA 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 GGGCATCACC GAGCACGCCA 300
```

50

AGGACAACCT GACGTTTGGC CAGGACGTCA ACTGCGAGTT CTCCAAGCAC TTTAACGCGA 360
 CGCTGGACCT GTCGTGGAAG GGCATGGGCC TGGCACCAGC GCGCTACGCG CTGATCGCGA 420
 ACGACCTCAA GGTCGAGTAC TTTGGCATCG ACGAGGGCGA GCCGAAGCAG TCGTCGGCCG 480
 CGACGGTGCT GAGCAAGCTG TAGTGCCGTT CTACTTAGTC AAACAATCGG GTATAGTCGC 540
 GTAAAAAAAA A 551

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 TGAAGTACTA CACTCTCCCT CCTCTGCCCT ACGCCTACGA TGGCTGGAG 60
 CCGTTTATCT CTAAGGAGAT CATGACGGTC CACCACGACA AGCACCACCA GACCTACGTG 120
 AACAACTCA ACGCCGCGA GAAGGCGTAC GCTGAGGCGA CGGCCGCGAA CGACGTGCTT 180
 AAGCAGATCC AGCTGCAGAG TGCATCAAG TTCAACGGCG GTGGCCACAT CAACCACTCG 240
 CTGTTCTGGA AGAACCTGGC CCCCCAGAGC 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 GGCTTCTTAC 540
 CTTAAGGCCT GGTGGAACGT GGTGAACTGG GCCGAGGCCG AGAAGCGCTT CCTCGAGGGT 600
 AAGAAGAAGG CCCAGCTGTA ATGGCACGTT TGTAGATGAT GAACGACACA CGATTTTAGG 660
 TCGCACGGCC GAGGCTACTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 720
 AAAAAAAAAA 728

10

20

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 CCGCCAGAT 60
 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
 GGGCTCGCG GGCATCCAGG GCAGCGGCTG GGGCTGGCTC GGCCTGAACC CCACGACGCA 480
 GAAGCTCGAC ATCATCACGA CCGCGAACCA GGACCCGCTC CTGTCGCACA AGCCGCTGAT 540
 TGGCATCGAT GCGTGGGAGC ACGCGTTCTA CCTGCAGTAC AAGAAGTCA AGGCCGACTA 600
 CTTCAAGGCG ATCTGGACCG TGATCAACTT TGAGGAGGCC GAGAAGCGTC TCAAGGAGGC 660
 GCTCGCCAAG AACTAGACAC GTTCGGTTTT TTTTTTCTCC GTAGCTTCGC AATGACCTGC 720
 CCACGCTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 780
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 812

30

40

配列番号 : 5

50

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
TACGCTCCCCG CGTCTGCTCC CCATTGGCGC TACGCCGCTG GCTCGTGGCT ACGCCTCGAG 120
CTCGGAGCCG TACGATGTCA TTGTGATCGG CCGTGGCCCC GGTGGCTACG TGGCCGCCAT 180
CAAGGCCGCA CAGGGTGGTC TGAAGACTGC GTGTGTTGAG AAGCGTGGTG CCCTTGGCGG 240
TACGTGCTTG AACGTGGGCT GTATCCCGTC CAAGTCGTTG CTCAACAAC TCGCACATCTA 300
CCACCAGACG CAGCATGACC TCAAGAACCG CCGTATTGAC GTCGGCGACA TTAAGCTGAA 360
CCTGCCGCGAG ATGCTCAAGG CGAAGGAGAG CTCGGTACT GCACTACCA AGGGTGTCTGA 420
GGGTCTGTTC AAGAAGAACA AGGTCGACTA CATCAAGGGC ACTGCCAGCT TTGCCAGCCC 480
CACGACGGTG GACGTGAAGC TGAACGATGG TGGTGAGCAG CAGATCGAGG GCAAGAACAT 540
CATCATTGCA ACCGGCTCTG AGGTGACGCC CTTCCCGGGT GTTCAAATCG ACGAGGAGCA 600
GATCATCAGC TCGACGGGTG CGCTCTCGCT CAAGGAGGTG CCCGAGAAGA TGGTCGTGAT 660
CGGTGGTGGT GTGATCGGTC TTGAGCTTGG CAGCGTGTGG ACCCGTCTGG GTGCCAAGGT 720
GACCGTGGTC GAGTTCCAGG 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 TCGGCCCAT 1080
GCTTGCGCAC AAGGCCGAGG ACGAGGGTAT TGCCGTCGCC GAGATGCTTG CGACCGGTTA 1140
TGGCCACGTC AACTACGACG TGATCCCTGC GGTGATCTAC ACGCACCTG AGATCGCGTG 1200
GGTCGGCAAAG TCGGAGCAGG AGCTCAAGAA CGAGGGCGTC CAGTACAAGG TGGGCAAGTT 1260
CCCCTTCTCG GCCAACTCGC GTGCCAAGAC CAACGTCGAC ACCGACGGCT TCGTCAAGTT 1320
CCTCGTGGAG AAGGAGACCG ACAAGATTCT CGGCGTGTTT ATTATCGGCC CGAACGCTGG 1380
CGAGATGATC GCCGAGGCTG GCCTGGCTAT GGAGTACGGC GCGAGTGCTG AGGATGTTGC 1440
GCGCACCTGC CACGCGCACC CGACGCTCTC CGAGGCGTTC AAGGAGGGTG CGATGGCCGC 1500
CTACTCGAAG CCCATCCACT TTTGATTTCT TAGGCTACCC CCGATAGGCG CCCGATACGT 1560
TTTCTCTCCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAA 1607

```

配列番号 : 6

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 TGAATTCCGG CTACGCCAG GACGACCTCG 60
AGGGTGCCGT CGACGGTGC GAGATTGTGC TGATCCCCGC CCGTATGCCG CGCAAGCCCG 120
GCATGACCCG TGACGACCTG TTCAACTCGA ACGCCTCGAT TGTCCGTGAC CTCGCCAAGG 180
TCGTGGCTAA GGTCGCCCA AAGGCTTACA TCGGCGTCAT CTCGAACCCC GTCAACTCGA 240
CGGTGCCGAT CGTCGCTGAG GTGTTCAAGA AGGCCGGTGT GTACGACCCC AAGCGCCTCT 300
TCGGTGTGAC CAGGCTCGAC ACCACGCGCG CCGCCACCTT CCTGTGGGGC ATTGCTGGCT 360
CGGACCCGCA GACCACCAAC GTCCCCGTCA TTGGTGGCCA CTCGGGTGTG ACCATTGTGC 420
CCCTGATCTC GCAGGCCGCG CAGGGTGACA AGGTGCAGGC TGGCGAGCAG TACGACAAGC 480
TTGTGCACCG CATCCAGTTC GGTGGTGAAG AGGTGCTCAA GGCCAAGGAC GGTGCCGGCT 540

```

CGGCGACGCT CTCGATGGCC TACGCCGCCG CTGTCTTCAC CGAGGGCCTG CTCAAGGGTC 600
 TCGACGGTGA GGCGGTGACG CAGTGCACCT TCGTCGAGAG CCCCCTGTTC AAGGACCAGG 660
 TCGACTTCTT CGCCTCGCCC GTCGAGTTCG GCCCCGAGGG TGTGAAGAAC ATCCCTGCTC 720
 TGCCGAAGCT CACCGCCGAG GAGCAGAAGC TGCTCGACGC CTGCCTGCCG GACCTTGCCA 780
 AGAACATCAA GAAGGGCGTT GCGTGGGCCG CCGAGAACCC GTAAATGCGC AAAGCAATCT 840
 TTTACGGAGC TTGCGCGAAG GAAAGGAAAT GTACGTTTCT ATAGAACGTA GATCTGTCCC 900
 TTTCCACCTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 940

配列番号：7

配列の長さ：306

10

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 TGTCGTGCAC 120
 TCCTTCCACA TCTACCACTC GGGCCAGGGC AGCCAGGGCA TCCTCGGCCA GGTGTCTGAAG 180
 CAGCAGCTCG ACTCCGTGTT CGGTACCGCG AAGGAGGACG AGGCGGTGAT CCTCATCCTC 240
 GAGCGCGGCC ACCTCCAGCA CGGCAAAATG CGTGGCCACG ACAAGTCGGG CCGCAACAGC 300
 TCGCGC 306

20

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 30
 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
 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 40
 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 50

30

40

50

155 160 165

Asn Ala Ser Ile Asp Thr Ile Leu Thr Lys Val

170 175

配列番号 : 9

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

10

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

20

30

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

40

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

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

50

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
 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
 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

10

20

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 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
 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

30

40

50

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
 200 205 210
 Glu Glu Ala Glu Lys Arg Leu Lys Glu Ala Leu Ala Lys Asn
 215 220

配列番号 : 1 2

10

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

20

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
 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

30

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
 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

40

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

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

50

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
 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
 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
 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 : 1 3
 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
 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
 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
 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
 245 250 255
 Pro Asp Leu Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Val Ala Trp Ala Ala
 260 265 270
 Glu Asn Pro

10

20

30

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

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

40

50

95 100

配列番号 : 1 5
 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 D N A)
 配列 :
 CCNGGNGAYC CNACNGCNAC NGC 23

10

配列番号 : 1 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 D N A)
 配列 :
 ACNYTNATGG GNTAYATHCC NTGGAC 26

20

配列番号 : 1 7
 配列の長さ : 599
 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 :

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
 CTCACCAAGG TCTTAAAATT GGCGCATGTG CGTTGTGGTG ACCACTACCT AAAGGGTCCG 540
 TAGAGTTCCA AGTCAAGTCG TATATTTTTA ATTTAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 599

30

配列番号 : 1 8
 配列の長さ : 991
 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 : Genomic DNA
 配列 :

AGACAGCAGG GACATGGTTT AGAAGCACAA TTCGCGGTAG CTGGCGCTGA AGCGATACTC 60
 GCTGAGAAAT TCACTTTCCC CCCGCTGACG GCCAGACCCC CGAACTGTCC CGAATTACCA 120
 AGCAAATGCA CGTGACGTTT GTGGAGGCTC GGGGATTATC AGGCCACGTA TCAGTGAGCC 180
 GAGCACCGCG TGGCTTCGGC TGGCTGCATA TAAAGCCGGG TGGGCCGTGC TCACAGCTTC 240
 ATCTTCCACG ACAATCATTG TGCCTGGTGT AGGTACCGCG AAGTGACACG CATGCTGACC 300

50

ATCAGGATCC TACTGCTACT GCCAAGGGTA ACGAGATCCC CGACACCCTC ATGGGCTACA 360
 TCCCCTGGAC CCCGGAGCTC GACTCGGGTG AGGTGTGTGG TATCCCACC ACCTTCAAGA 420
 CCCGCGACGA GTGGAAGGGC AAGAAGGTTG TGATTGTCTC GATCCCGGGT GCCTACACCC 480
 CCATCTGCCA CCAGCAGCAC ATCCCCCGC TTGTGAAGCG TGTGGATGAG CTCAAGGCCA 540
 AGGGTGTCTG CGCCGTGTAC GTCATTGCGT CGAACGACCC CTTCGTCATG GGTATGTACT 600
 GCTCTGTCTT TTCTTTATGC TAACCGACAG CTGCCTGGGG CAACTTCAAC AACGCCAAGG 660
 ACAAGGTCGT CTTTGCCACC GACATTGACC TGGCCTTCTC CAAGGCTCTC GGC GCGACGA 720
 TCGACCTGAG CGCCAAGCAC TTTGGTGAGC GCACGGCCCG CTACGCTCTG ATCATTGACG 780
 ACAACAAGAT TGTCGACTTT GCTTCGGACG AGGGCGACAC TGGCAAGCTC CAGAACGCGT 840
 CGATCGACAC GATCCTCACC AAGGTCTAAA ATGGCGCATG TCGGTTGTGT GACCACTACC 900
 TAAAGGGTCC GTAGAGTTCC AAGTCAAGTC GTATATTTTT TTTTACAGG ATGGTGTGTA 960
 CTGCCACCTG CCTTTGAGCA AGGCGTGCCA G 991

10

配列番号 : 19

配列の長さ : 177

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 :

20

Met Pro Gly Asp Pro Thr Ala Thr Ala Lys Gly Asn Glu Ile Pro
5 10 15

Asp Thr Leu Met Gly Tyr Ile Pro Trp Thr Pro Glu Leu Asp Ser
20 25 30

Gly Glu Val Cys Gly Ile Pro Thr Thr Phe Lys Thr Arg Asp Glu
35 40 45

Trp Lys Gly Lys Lys Val Val Ile Val Ser Ile Pro Gly Ala Tyr
50 55 60

Thr Pro Ile Cys His Gln Gln His Ile Pro Pro Leu Val Lys Arg
65 70 75

30

Val Asp Glu Leu Lys Ala Lys Gly Val Asp Ala Val Tyr Val Ile
80 85 90

Ala Ser Asn Asp Pro Phe Val Met Ala Ala Trp Gly Asn Phe Asn
95 100 105

Asn Ala Lys Asp Lys Val Val Phe Ala Thr Asp Ile Asp Leu Ala
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

40

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

配列番号 : 20

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

50

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

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

10

配列：

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

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DNA）

配列：

CARACNTAYG TNAAYAAYYT NAAYGC 26

20

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DNA）

配列：

ACNCAYCAYC CNGTNATHGG NTGGG 25

30

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DNA）

配列：

ATNACNGGRT GRTGNGTNGT NARNGG 26

40

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

50

配列：

CAGACCTATG TCAACAACCT GAACGCCGCC GAGAAGGCGT ACGCTGAGGC GACGGCCGCG 60
 AACGACGTGC TTAAGCAGAT CCAGCTGCAG AGTGCGATCA AGTTCAACGG CGGTGGCCAC 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：26

10

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 TGAACGTGG TGAAGTGGC CGAGGCCGAG 120
 AAGCGCTTCC TCGAGGGTAA GAAGAAGGCC CAGCTGTAAT GGCACGTTT TAGATGATGA 180
 ACGACACACG ATTTTAGGTC GCCAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 240
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 263

20

配列番号：27

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：

CCNCCNYTNC CNTAYGAYTA YGGNGC 26

30

配列番号：28

配列の長さ：28

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：

GARCCNGCNA THWSNGGNGA RATHATGG 28

40

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

50

TCGCTCTTCT GGAAGAACCT CGCGCCGACG AACAAAGGGCG GCGGCGAGCT CGACTCGGGC 240
 GAGCTGCGCT CCGCGATCGA CCGCGACTTT GGCTCGGTCTG ACGCCATGAA GGAGAAGTTC 300
 AACGCGGGCGC TCGCGGGCAT CCAGGGTATC GGCTGGGGCT GGCTCGGCCT GAACCCCACG 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 GACACGTTTC GTTTTTTTTT TATCACTAGC TTAGCAATGA 600
 CCTGCCACG CTAACAAAAA AAAAAAAA 630

配列番号 : 3 0

10

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 : 3 1

20

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 : 3 2

30

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

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 GCCGAGATG CTCAAGGCGA AGGAGAGCTC GGTCAGTGC 240
 CTCACCAAGG GTGTCGAGGG CCTGTTCAAG AAGAACAAGG TCGCCTACCT CAAGGGGACA 300
 GACAGATTCG CGAGCCCTAC GACGGTGGAC GTGAAGCTGA GCGATGGCGG TGAACAGNAG 360
 ATTGAGGGCA AGAACATTAT CATTGCGACT GGCTCTGAGG TGACGCCTTN CCCTGGTGTG 420
 GAGATCGCCG AGGAGCAGAT TATCAGCTCG ACGGGTGC GC 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

50

CGCGTGGTGG TGGACGATGA GTTCAACACG ACGTGCAAGG GTGTCAAGTG CATTGGTGAC 900
GCGACGTTTCG GCCCTATGCT CGCCCACAAG GCCGAAGA 938

配列番号 : 3 3

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 TGCGCCGCTG GCTCGTGGCT ATGCCTCGAG 120
CTCGGAGCCA TACGATGTCA TTGTGATTGG TGGTGGCCCC GGTGGCTACG TGGCCGCGAT 180
CAAGGCCGCG CAGGGTGGTC TGAAGACTGC ATGTGTTGAG AAGCGCGGTG CGCTTGGTGG 240
TACCTGCTTG AACGTGGGCT GTATCCCTTC CAAGTCGTTG CTGAACAACT 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 GAGTTCAGG 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
GGTCGGCAAAG TCGGAGCAGG AGCTCAAGAA CGATGGCGTG CAGTACAAGG TGGGCAAGTT 1260
CCCCTTCCTG GCCAACTCGC GTGCTAAGAC CAACGTGCAC ACCGACGGTT TTGTCAAGTT 1320
CCTCGTGGAG AAGGACACCG ACAAGATTCT CGGCGTGTTC ATCATCGGTC CGAACGCCGG 1380
CGAGATGATT GCCGAGGCTG GCCTGGCTAT GGAGTACGGT GCGAGTGCAG AGGATGTCTG 1440
GCGCACCTGC CACGCGCACC CGACGCTCTC GGAGGCCTTC AAGGAGGGTG CGATGGCCGC 1500
CTACTCGAAG CCGATTCACT TTTGATTTTC TAGGTTTCCC CCGATAGGCG CCCGATACGT 1560
CTTCTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1600

10

20

30

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

40

50

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
 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 10
 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
 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 20
 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
 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 30
 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
 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 40
 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 50

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

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)

20

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)

30

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 TCGCCTGTA CGACATCCGT 60

40

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

TACGACCCCA AGCGCCTCTT CGGTGTGACC ACGCTCGACA CCACGCGTGC GGCCACCTTC 420

CTGTCCGGGCA TCACTGGCTC GGAACCGCAG ACCACCAATG TCCCGGTCAT TGGTGGTCAC 480

TCGGGTGTGA CCATCGTGCC TCTGGTCTCG CAGGCCCCCC AGGGTGACAA GGTGCAGGCC 540

GGCGAGCAGT ACGACAAGCT CGTCCACCGC ATTCAGTTCG GTGGTGACGA GGTCGTTAAG 600

GCCAAGGACG GTGCGGGTTC GCGACGCTG TCGATGGCCT ACGCCGCCGC TGTCTTCACT 660

50

GAGGGCCTGC TCAAGGGTCT TGACGGTGAG GCGGTGACGC AGTGCACCTT CGTTGAGAGC 720
 CCCCTGTTCA AGGACCAGGT TGA CTTCTTC GCTTCGCCCC TCGAGTTCGG CCCCAGGGGC 780
 GTGAAGAACA TCCCTGCCCT GCCCAAGCTC ACCGCTGAGG AGCAGAAGCT GNTNGACGCC 840
 TGCCTGCCCC ACCTTGCCAA GAACATCAAG AAGGGTGTG CGTGGGTTGC CGAGAACCCC 900
 TAAATGCGCA GAACCAGCTT CCACGGAGCT TGCGCCAAGG AAAGGAAACG CACATTTNTA 960
 TAGAGCGTAG CTTTGTCCCT TTCCATTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1009

配列番号 : 38

配列の長さ : 1008

配列の型 : 核酸

10

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
 CTCGCTCCGG GTGTTGCTGC GGATCTCTCG CACATCAACA CCCCCGCGGT GACTTCGGGC 120
 TACGCCCAGG ACGACCTCGA GGGTGCCGTC GACGGTGCGG AGATTGTGCT GATCCCCGCC 180
 GGTATGCCGC GCAAGCCCGG CATGACCCGT GACGACCTGT TCAACTCGAA CGCCTCGATT 240
 GTCCGTGACC TCGCCAAGGT CGTGGCTAAG GTCGCCCAA AGGCTTACAT CGGCGTCATC 300
 TCGAACCCCG TCAACTCGAC GGTGCCGATC GTCGCTGAGG TGTTAAAGAA GGCCGGTGTG 360
 TACGACCCCA AGCGCCTCTT CGGTGTGACC ACGCTCGACA CCACGCGCGC GGCCACCTTC 420
 CTGTCCGGCA TTGCTGGCTC GGAACCGCAG ACCACCAACG TCCCCGTCAT TGGTGGCCAC 480
 TCGGGTGTGA CCATTGTGCC CCTGATCTCG CAGGCCGCC AGGGTGACAA GGTGCAGGCT 540
 GGCAGCAGT ACGACAAGCT TGTGCACCGC ATCCAGTTCG GTGGTGACGA GGTCGTCAAG 600
 GCCAAGGACG GTGCCGGTTC GCGGACGCTC TCGATGGCCT ACGCCGCCGC TGTTTTACC 660
 GAGGGCCTGC CCAAGGGTCT CGACGGTGAG GCGGTGACGC AGTGCACCTT CGTCGAGAGC 720
 CCCCTGTTCA AGGACCAGGT CGANTTCTTC GCTTCGCCCC TCGAGTTCGG CCCCAGGGGT 780
 GTGAAGAACA TCCCTGNTCT GCCGAAGCTC ACCGCCGAGG AGCAGAAGCT GNTNGACGCC 840
 TGCCTGCCCC ACCTTGCCAA GAACATCAAG AAGGGCGTTG CGTGGGCCGC CGAGAACCCG 900
 TAAATGCGCA AAGCAATNTT TTACGGAGCT TGCGCCAAGG AAAGGAAATG TACGTTTNTA 960
 TAGAACGTAG ATCTGTCCCT TTCCACCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1008

20

30

配列番号 : 39

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、12、15、18番目のNはイノシンを示す。

配列 :

40

GGNAAYAAAYG GNYTNWSNGA RGT 23

配列番号 : 40

配列の長さ : 20

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、9、18番目のNはイノシンを示す。

配列 :

50

GARGTNGTNT AYAARCCNGA 20

配列番号 : 41

配列の長さ : 427

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 10
 GACTCGTACC AGTCGTGGCG CTCGGGCAAC CGCACCATCC CGCTCGCGGA TGTCGTGCAC 120
 TCCTTCCACA TCTACCACTC GGGCCAGGGC AGCCAGGGCA TCCTCGGCCA GGTGTGGAAG 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
 AAAAAAA 427

配列番号 : 4 2

配列の長さ : 1 5 20

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 :

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

配列番号 : 4 3

配列の長さ : 1 5 30

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 :

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 40

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

配列番号 : 4 5

配列の長さ : 2 8 50

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

配列番号：4 6

10

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

配列番号：4 7

20

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

配列番号：4 8

30

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

Ala Asn His Val Pro Xaa Tyr Xaa Glu

20

配列番号：4 9

40

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

5 10 15

Xaa Xaa Glu His Ala

20

配列番号：5 0

50

配列の長さ：13

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

5 10

配列番号：51

配列の長さ：12

10

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

5 10

配列番号：52

配列の長さ：30

20

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

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

30

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

40

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

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

50

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

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

10

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

配列 :

Val Asp Gln Xaa Tyr Phe Gly Leu Xaa

5

20

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

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

30

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

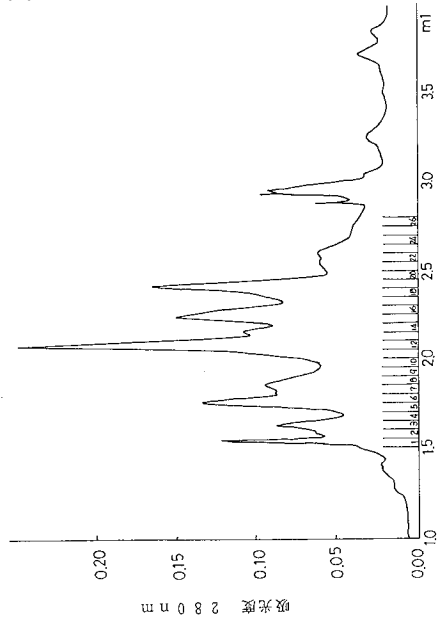
配列 :

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

5 10

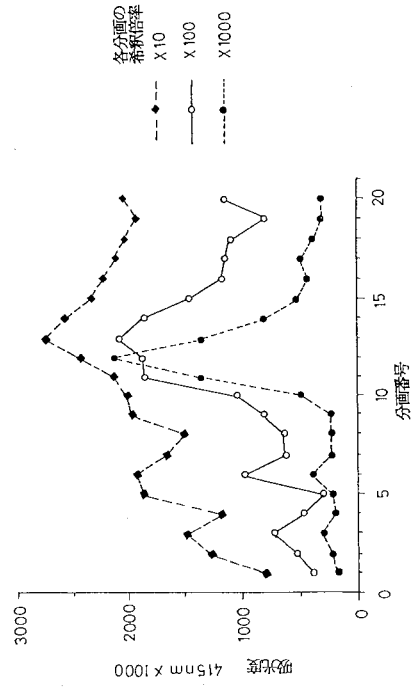
40

【 図 1 】



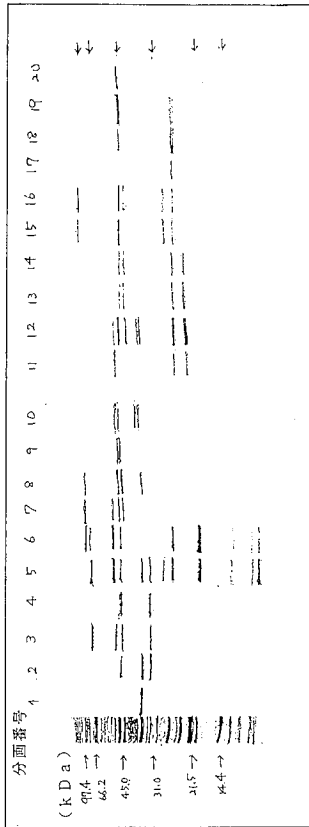
第 1 図

【 図 2 】



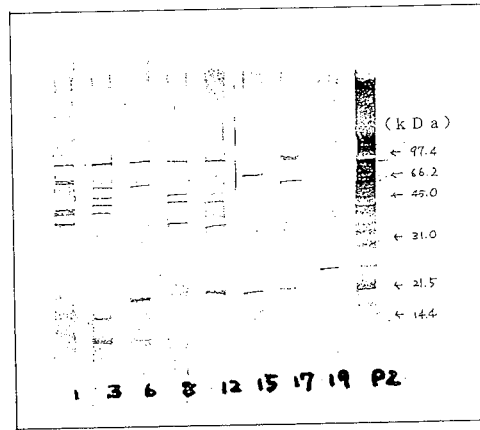
第 2 図

【 図 3 】



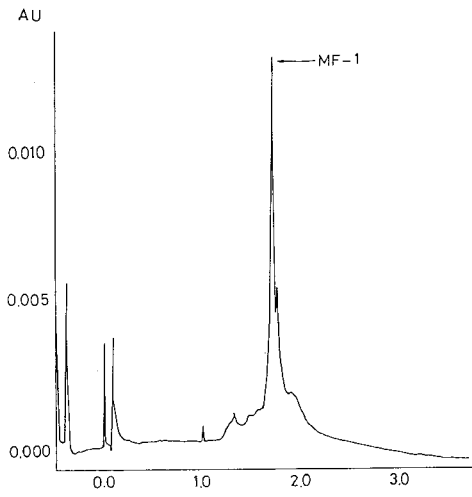
第 3 図

【 図 4 】



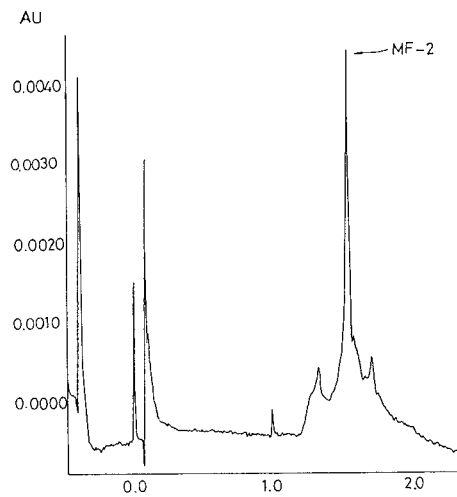
第 4 図

【 図 5 】



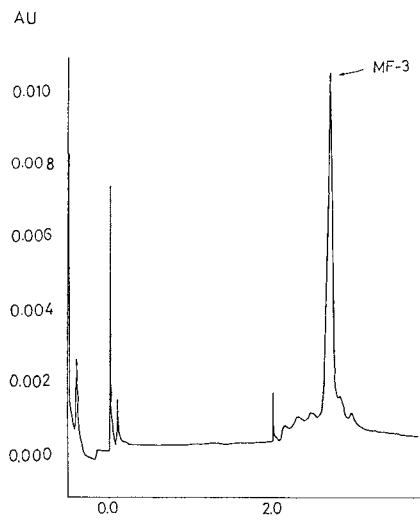
第 5 図

【 図 6 】



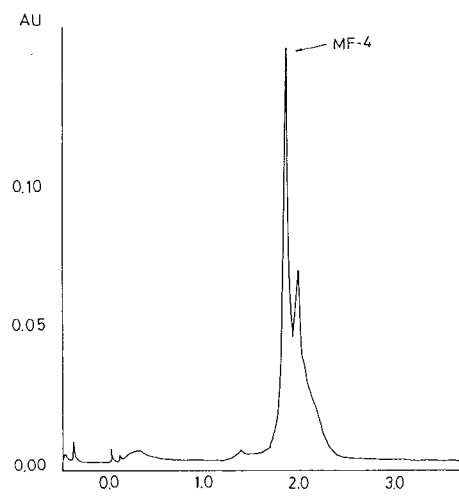
第 6 図

【 図 7 】



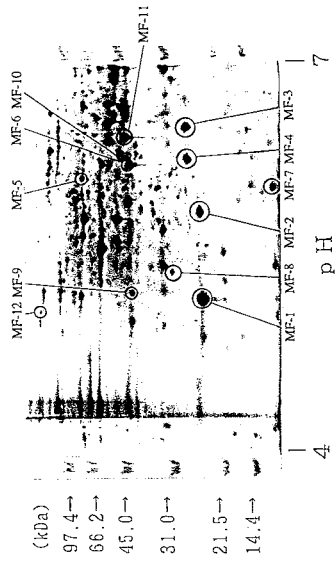
第 7 図

【 図 8 】



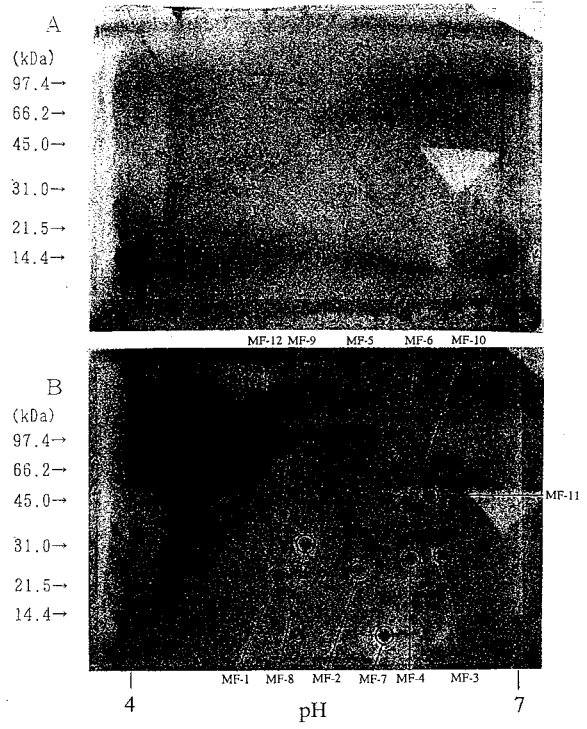
第 8 図

【 図 9 】



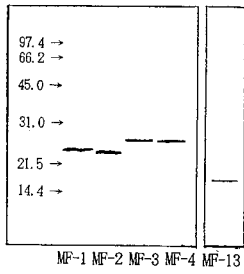
第 9 図

【 図 1 0 】



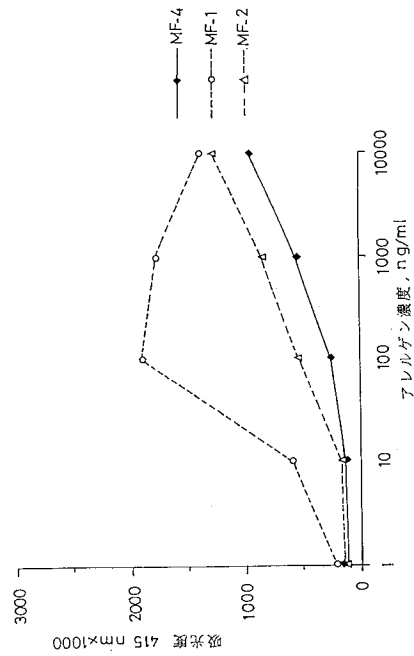
第 1 0 図

【 図 1 1 】



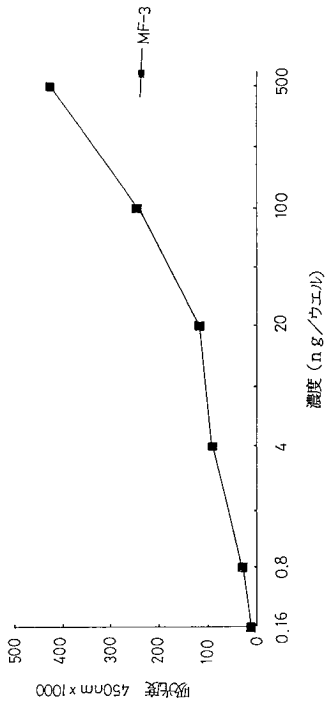
第 1 1 図

【 図 1 2 】



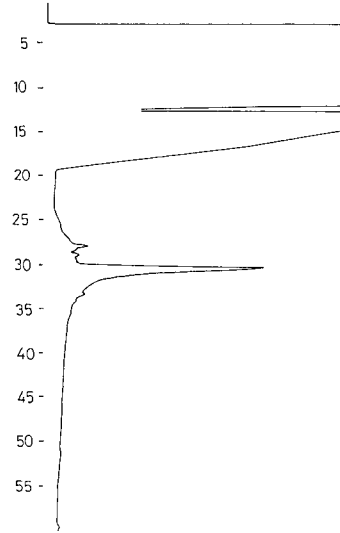
第 1 2 図

【 図 1 3 】



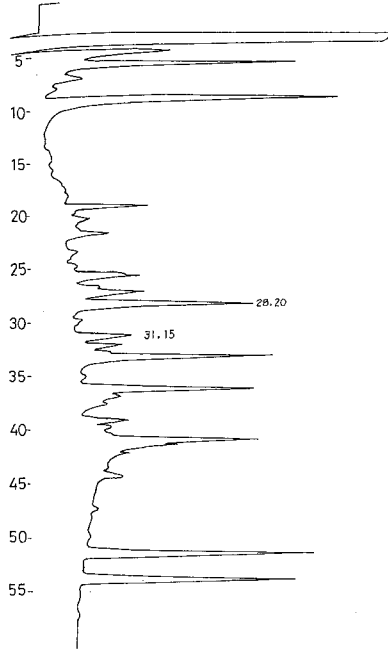
第 1 3 図

【 図 1 4 】



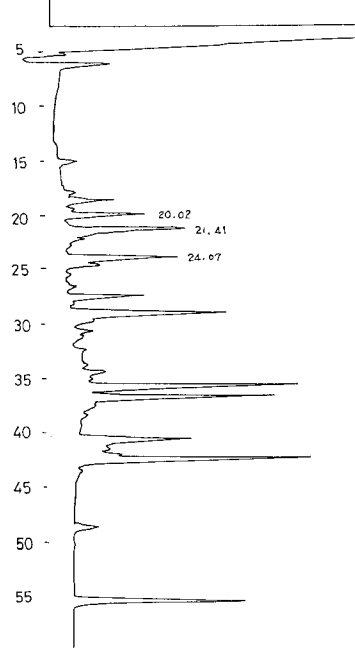
第 1 4 図

【 図 1 5 】



第 1 5 図

【 図 1 6 】



第 1 6 図

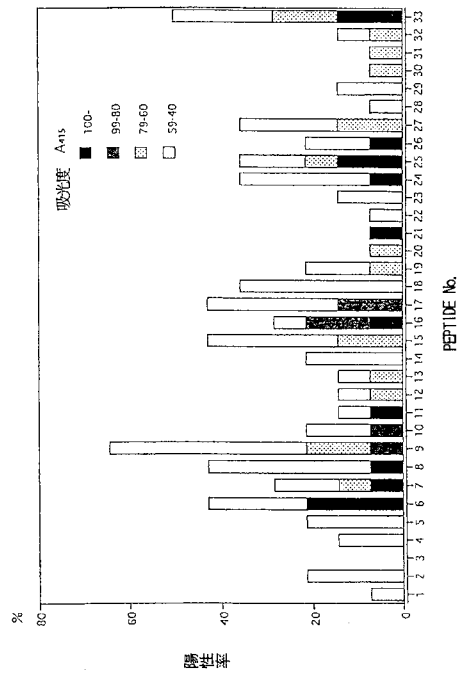
【 図 2 1 】

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	NEIPDTLMGYIPWTPPEL	17	44.0
4	TLMGYIPWTPPELDSG	15	40.8
5	IPWTPPELDSGEVCGI	15	39.4
6	ELDSGEVCGIPTTFK	15	33.0
7	EVCGIPTTFKTRDEW	15	42.1
8	PTTFKTRDEWKGGKV	15	22.9
9	TRDEWKGGKVVIVSI	15	29.9
10	KGKVVIVSIPGAYT	15	29.9
11	VIVSIPGAYTPIGHQ	15	34.0
12	PGAYTPIGHQHIPPLV	17	44.6
13	PICHQHIPPLVKRV	15	27.7
14	QHIPPVKRVDELKA	15	29.9
15	LVKRVDELKAGVDA	15	23.3
16	DELKAGVDVAVVIA	15	31.3
17	KGVDVAVVIASNDPFVM	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	GERTARYALIIDNK	15	27.5
29	RYALIIDNKIVDFA	15	35.7
30	IDDNKIVDFASDEGD	15	29.3
31	IVDFASDEGDTGKLQ	15	28.1
32	SDEGDTGKLQNASID	15	22.6
33	TGKLQNASIDTLYKV	16	34.8

HPLC分析条件: TSK-gel10BS4.6 φ×250mm, UV210nm, 0→60%0.05%TFA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 2 1 図

【 図 2 2 】



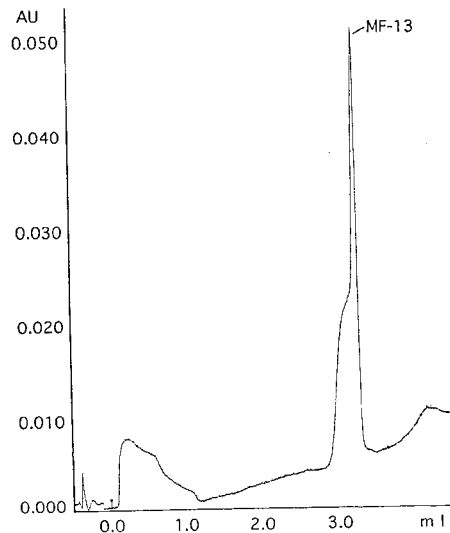
第 2 2 図

【 図 2 3 】

ゲノムDNA	1	AGACAGCAGCGACATGTTTAGAGGCACAAATTCGCGTAGCTGGCGGTGAAGCGATACCTC	60
cDNA	1		1
	61	GCTGAGAAATTCACCTTCCGCCCGCTGACGGCCAGACCCCGAACTGTCCCGAATTACCA	120
	1		1
	121	AGCAAATGCACGTGACGTTTGTGAGGCTCGGGATTATCAGGCCAAGTATCAGTGAACC	180
	1		1
	181	GAGCACCCGCTGCTCGGCTGCTATATAAGCCGGTGGGCGGTGCTCACAGCTTC	240
	1		1
	241	ATCTTCCACGCAATCATTTATCCCTGGTGTAGGTACCGGAAAGTGACAGCATCTGACC	300
	1	M P G	1
	301	ATCAGGATCCTACTGCTACTGCAAGGGTAAGCAGATCCCGACACCCCTCATGGCGTACA	360
	1	D P T A T A K G N E I P D T L M G Y	360
	18		1
	361	TCCCTGAGACCCGGAGCTCGACTCGGCTGAGGTGTGTGGTATCCCGACACCCCTCAAGA	420
	19	I P W T P E L D S G E V C G I P T T F K	38
	38		1
	421	CCCGGACAGCTGGAAGGCAAGAGGTTGTGATTTGCTCGATCCGGGTGCTACACCC	480
	39	T R D E W K G K K V V I V S I P G A Y T	58
	58		1
	481	CCATCTGCCACAGCAGCAGATCCCGCGCTTGTGAGCGGTGCGATGAGCTCAAGGCCA	540
	59	P I C H Q Q H I P P L V K R V D E L K A	78
	78		1
	541	AGSGTGTGACCGCGTGTACTGATTCGCTCGAAGCAGCCCTTCGTCATGGGTATGTACT	600
	79	K G V D A V Y V I A S N D P F V M	95
	95		1
	601	GCTCTGTCAATTTCTTTATGCTAACCGACCTCCCTCGGCACTTCAACAGCCCAAGG	660
	95	A A W G N F N N A K	10
	10		1
	661	ACAAGTTCGCTCTTGGCCACCGAGATTGACCTGGCTTCTCCAGGCTCTCGGCGCAGCA	720
	11	D K V V F A T D I D L A F S K A L G A T	30
	30		1
	721	TGACCTGAGGSCCAAGCACTTTGGTGGCGCACCGCCCGCTAGCGCTTGTGATCATGACG	780
	31	I D L S A K H F G E R T A R Y A L I I D	50
	50		1
	781	ACAACAAGATTGTGACTTTGCTTCGACGAGGGCGACACTGCGCAGGTCACAGACCGCT	840
	51	D N K I V D F A S D E G D T G K L Q N A	70
	70		1
	841	CGATCGACAGATCCTCACAAGGCTTAAAMVSGAGATGIGGGTGTGTGAGCACTAAC	900
	71	S I D T I L T K V *	80
	80		1
	901	TAAAGGTCCTAGAGTCCAAAGTCAAGTGTATATTTTTTTTTTCAAGATGTTGTGTA	960
	80		80
	961	CTGCCACTGCCTTTGAGCAAGGCTGCCAG	991
	80		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.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Q
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	F

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 AA11 AA13 BA31 CA02 DA06 EA04 GA01 GA11 HA08
4B064 AG27 AG31 CA02 CA05 CA10 CA19 CA20 CC24 DA15
4H045 AA11 BA09 CA15 CA40 DA76 DA86 EA20 EA52 FA74 GA01
GA15 GA30

专利名称(译)	马拉色菌衍生的抗原蛋白		
公开(公告)号	JP2007252380A	公开(公告)日	2007-10-04
申请号	JP2007118138	申请日	2007-04-27
[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	C12N15/09 C07K16/14 C07K14/37 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/569		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/14 C07K14/37 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/53.Q G01N33/569.F A61K39/00.K C07K14/37.ZNA C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA15 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA15 4H045/GA30 4C085/AA02 4C085/AA14 4C085/BA49 4C085/BB11 4C085/HH15 4C085/KA04 4C085/LL03		
优先权	1995346627 1995-12-12 JP 1996257612 1996-09-05 JP 1996257613 1996-09-05 JP		
其他公开文献	JP4044605B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供源自马拉色菌属真菌的实际上纯的和分离的抗原蛋白质，即纯化的马拉色菌过敏原，优选地是对马拉色菌过敏患者的主要过敏原，并阐明其蛋白质化学性质。解决方案：从马拉色菌属真菌衍生和分离的抗原蛋白的特征在于抗原蛋白对源自马拉色菌过敏患者的IgE抗体具有结合能力，其中抗原蛋白包含描述为SEQ ID NO：11的氨基酸序列。在序列表中或具有氨基酸序列中一个或几个氨基酸残基的缺失，添加，插入或取代中的至少一个的序列。Ž

	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