

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-95101

(P2005-95101A)

(43) 公開日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/35	C O 7 K 14/35	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-334977 (P2003-334977)	(71) 出願人	501203344 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
(22) 出願日	平成15年9月26日 (2003. 9. 26)		茨城県つくば市観音台3-1-1
特許法第30条第1項適用申請有り		(74) 代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎
		(74) 代理人	100086221 弁理士 矢野 裕也
		(72) 発明者	森 康行 茨城県つくば市要1-2
		(72) 発明者	永田 礼子 茨城県つくば市吾妻2-11-804-103
		(72) 発明者	吉原 一浩 千葉県柏市篠籠田1003-16
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヨーネ菌抗原タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、及び該タンパク質を用いるヨーネ病の診断方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 I F N - 誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原タンパク質を提供すること、ヨーネ菌抗原タンパク質に関する遺伝的情報を解明し、ヨーネ菌抗原タンパク質の容易且つ大量生産を可能とすること、並びに、I F N - 誘導能を有するヨーネ菌抗原タンパク質を用いた正確且つ高感度なヨーネ病の診断方法を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質；特定の塩基配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子；前記遺伝子が発現可能に導入された細胞；被検動物の細胞に前記タンパク質又は前記細胞を添加して培養した後、培養上清中のインターフェロン・ガンマ濃度を検出することを特徴とするヨーネ病の診断方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質。

【請求項 2】

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質。

【請求項 3】

配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 4】

配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子。 10

【請求項 5】

請求項 3 又は 4 記載の遺伝子が発現可能に導入された細胞。

【請求項 6】

被検動物の細胞に請求項 1 又は 2 記載のヨーネ菌抗原タンパク質を添加して培養した後、培養上清中のインターフェロン・ガンマ濃度を検出することを特徴とするヨーネ病の診断方法。

【請求項 7】

被検動物の細胞に請求項 5 記載の細胞を添加して培養した後、培養上清中のインターフェロン・ガンマ濃度を検出することを特徴とするヨーネ病の診断方法。 20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ヨーネ菌抗原タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、及び該タンパク質を用いるヨーネ病の診断方法に関し、詳しくは、インターフェロン・ガンマ (IFN -) 誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、及び該タンパク質を用いることにより、ヨーネ病を正確且つ高感度に診断できるヨーネ病の診断方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

ヨーネ病は、現在我が国で発生している家畜法定伝染病の中で最も摘発頭数が多い疾病であり、診断方法の改良等、本病防疫対策の一層の高度化が要求されている。

原因菌であるヨーネ菌に対する細胞性免疫を指標としたヨーネ病の診断方法は、早期診断法として重要である。特に、最近、牛の血液細胞をヨーネ菌由来抗原で刺激し、IFN - の産生を検出するヨーネ病の診断方法が注目されている (例えば、非特許文献 1 及び 2 参照)。

【0003】

これらの診断法では、ヨーネ菌由来抗原として本菌の培養上清から調製した精製ツベルクリンタンパク質体 (Purified Protein Derivative、PPD) が用いられている。

しかし、ヨーネ菌の培養期間が長期に及ぶため、PPD の調製には最短でも 2 ヶ月以上 40 が必要とされる。しかも、PPD の調製には、特殊な装置が必要とされる。

さらに、PPD 中には種々のタンパク質等が含まれ、それらの中には他の抗酸菌と交差反応性を有する抗原も含まれる。従って、PPD は特異性の点でも問題があり、ヨーネ病の正確な診断には問題があった。

従って、IFN - の検出によるヨーネ病の診断方法に際し、容易に且つ大量に作製することが可能で、しかも特異性の高い抗原の開発が期待されている。

【0004】

一方、ヨーネ菌抗原の遺伝的情報が明らかとなれば、遺伝子組換えタンパクを用いることにより、IFN - 誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原を、容易に、且つ大量に作製することが可能となると考えられる。

ヨーネ菌のゲノムDNAを他の類似菌と比較することにより、種々の遺伝子を見出そうとする試みが既に報告されているが（非特許文献3及び4参照）、ヨーネ菌のゲノムDNAを他の類似菌と単に比較するだけでは、ヨーネ菌抗原の抗原性や生物活性に関する情報を得ることは困難であり、IFN-誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原に関する遺伝的情報を解明することはできなかった。

【0005】

【非特許文献1】Stabel JR. & Whitlock RH. An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet Immunol Immunopathol.* 79, 69-81 (2001)

【非特許文献2】Jungersen G. Huda A, Hansen JJ, & Lind P. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 453-60 (2002) 10

【非特許文献3】Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr; 40(4): 1303-10

【非特許文献4】Bannantine JP, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiol.* 2003 May 9; 3(1): 10. Epub 2003 May 09 20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の第一の目的は、IFN-誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原タンパク質を提供することにある。

また、本発明の第二の目的は、ヨーネ菌抗原タンパク質に関する遺伝的情報を解明し、ヨーネ菌抗原タンパク質の容易且つ大量生産を可能とすることにある。

更に、本発明の第三の目的は、このような特異性の高いヨーネ菌抗原タンパク質を用いた正確且つ高感度なヨーネ病の診断方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】 30

【0007】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、鋭意検討を重ねた。その過程で、ヨーネ菌DNAの組換え大腸菌を作製し、それらの中からIFN-誘導能を示すものを分離し、クローニングサイトに挿入された塩基配列を解析したところ、264ヌクレオチド及び1,248ヌクレオチドからなる2つの塩基配列を確認した。

これらの塩基配列をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌へ導入して得た組換え大腸菌から精製された組換えタンパク質は、ヨーネ菌感染牛の血液細胞中のIFN誘導能を強く誘導した。

このような検討の結果から、本発明者らは、264ヌクレオチド及び1,248ヌクレオチド部分がそれぞれコードする88アミノ酸及び416アミノ酸は、IFN-誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原タンパク質であり、これらは正確且つ高感度なヨーネ病の診断に有用であることを見出し、本発明に到達した。 40

本発明は、係る知見に基づくものである。

【0008】

請求項1記載の本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質である。

請求項2記載の本発明は、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質である。

請求項3記載の本発明は、配列表の配列番号3に記載の塩基配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子である。 50

請求項 4 記載の本発明は、配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列からなるヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子である。

請求項 5 記載の本発明は、請求項 3 又は 4 記載の遺伝子が発現可能に導入された細胞である。

【0009】

請求項 6 記載の本発明は、被検動物の細胞に請求項 1 又は 2 記載のヨーネ菌抗原タンパク質を添加して培養した後、培養上清中のインターフェロン・ガンマ濃度を検出することを特徴とするヨーネ病の診断方法である。

請求項 7 記載の本発明は、被検動物の細胞に請求項 5 記載の細胞を添加して培養した後、培養上清中のインターフェロン・ガンマ濃度を検出することを特徴とするヨーネ病の診断方法である。

10

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、IFN - 誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原タンパク質が提供される。

また、本発明によれば、ヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子が提供されるので、ヨーネ菌抗原タンパク質の大量生産への道が開かれる。

更に、本発明によれば、IFN 誘導能を有するヨーネ菌抗原タンパク質を用いた正確且つ高感度なヨーネ病の診断方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0011】

(1) ヨーネ菌抗原タンパク質

まず、本発明のヨーネ菌抗原タンパク質について、説明する。

本発明のヨーネ菌抗原タンパク質は、請求項 1 に係る本発明のヨーネ菌抗原タンパク質と、請求項 2 に係る本発明のヨーネ菌抗原タンパク質の 2 つのタンパク質である。

まず、請求項 1 に係る本発明のヨーネ菌抗原タンパク質は、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる。この請求項 1 に係る本発明のタンパク質は、実施例 1 に示すように、本発明者らが請求項 3 に係る本発明の遺伝子の塩基配列から解読されて、IFN - 誘導能の存在によりヨーネ菌抗原タンパク質であることが明らかにされたものである。

一方、請求項 2 に係る本発明のヨーネ菌抗原タンパク質は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる。この請求項 2 に係る本発明のタンパク質は、実施例 1 に示すように、本発明者らが請求項 4 に係る本発明の遺伝子の塩基配列から解読されて、IFN - 誘導能の存在によりヨーネ菌抗原タンパク質であることが明らかにされたものである。

30

【0012】

本発明のヨーネ菌抗原タンパク質は、ヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) から得ることができる。ここで、ヨーネ菌としては、ATCC 19698 株を用いることができる。例えば、後述の請求項 3 に係るヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子、又は請求項 4 に係るヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子を発現させて得ることができ、具体的には例えば、後述の(3)細胞の項で説明するように、請求項 3 又は 4 に係る遺伝子が発現可能に導入された細胞を培養し、発現誘導を行って、十分に発現が誘導された段階で細胞を収穫してからアフィニティーカラム等により精製して得ることができる。

40

一方、ペプチド合成装置等を用いて配列表の配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を人工的に合成して製造することもできる。

【0013】

本発明のヨーネ菌抗原タンパク質は、IFN - 誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原であることから、ヨーネ病の診断用抗原として用いることができる。また、ヨーネ病のワクチンに応用することもできる。

【0014】

(2) ヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子

50

本発明のヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子は、請求項 3 に係る本発明の遺伝子と、請求項 4 に係る本発明の遺伝子の 2 つの遺伝子である。

まず、請求項 3 に係る本発明のヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子は、配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる。請求項 3 に係る本発明の遺伝子は、請求項 1 にかかる本発明のヨーネ菌抗原タンパク質に対応する遺伝子である。

一方、請求項 4 に係る本発明のヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子は、配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列からなる。請求項 4 に係る本発明の遺伝子は、請求項 2 にかかる本発明のヨーネ菌抗原タンパク質に対応する遺伝子である。

【0015】

本発明のヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子は、ヨーネ菌から、以下のようにして取得することができる。ヨーネ菌については、(1)ヨーネ菌抗原タンパク質の項で説明した通りである。

DNA の調製は、例えばヨーネ菌の菌体をリパーゼ、リゾチーム、タンパク質分解酵素等を用いて酵素分解(溶菌)し、フェノールクロロフォルム等の溶媒抽出及びエタノール沈殿により行うことができる。

次に、DNA ライブラリーを作製する。即ち、まず、DNA を適当な制限酵素で限定消化する。制限酵素としては、種々の酵素を用いることができるが、本発明者らは、実施例 1 に示すように、S a u 3 A I を用いた。限定消化の条件は、使用する制限酵素の種類に応じて切断反応温度、時間等を調節する。例えば、S a u 3 A I の場合、切断反応温度は 30 ~ 40 、好ましくは 37 、切断反応時間は 30 分 ~ 1 時間とすることができる。

【0016】

次いで、限定消化された DNA を、ベクターにライゲーションする。ベクターとしては、上記限定消化の際に用いた制限酵素(例えば、S a u 3 A I)サイトと相補的な制限酵素(例えば、B a m H I)サイトを持つベクターを用いることができる。

ライゲーションは、限定消化された DNA とベクターとを混合し、これに T 4 DNA リガーゼを作用させて行うことができる。

尚、ベクターとして、市販の ZAP Express Vector (STRATAGENE 社製)を用いると、ライゲーションから後述の *in vivo* Excision までの処理を ZAP Express Predigested Vector Kit and ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kits (STRATAGENE 社製)添付のプロトコールに従い実施することができ、簡便である。

【0017】

こうして作製された DNA ライブラリー(ファージライブラリー)から、ヨーネ菌実験感染牛から分離された血液細胞における IFN - 誘導能により、ヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子を選抜する。

即ち、まず、DNA ライブラリーを *in vivo* excision により、大腸菌等の細胞に導入し、組換え細胞を得る。例えば、細胞が大腸菌の場合を例にとると、アンピシリン加 LB 培地で 1 ~ 5 時間、更に IPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド)を添加して更に 2 ~ 10 時間培養した後、ヨーネ菌感染動物の細胞とともに培養する。ここで、ヨーネ菌感染動物の細胞とは、ヨーネ菌に感染する可能性のある動物の細胞であり、例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の反芻動物のほか、シカ、キツネ、ウサギ、サル、ヒト等のヨーネ病に感染する可能性のある動物全般の細胞、具体的には例えば、末梢血単核球(PBMC)等の血液細胞である。培養条件は、被検動物の細胞が生育可能で、且つ IFN - の誘導が阻害されない条件とすれば、特に限定されず、例えば、PBMC の場合、牛胎児血清加 RPMI 1640 培地を用いて、培養期間は 1 ~ 3 日、培養温度は 37 ~ 38 とすることができる。培養後、IFN - の産生量を ELISA 法、イミュノクロマトグラフィー等により測定し、非組換え細胞を同様に培養し、これを陰性コントロールとして IFN - の誘導能を判定する。

【0018】

IFN - の誘導能が確認された組換え細胞から、プラスミドを調製し、クローニング

10

20

30

40

50

サイトに挿入された塩基配列を切り出して、本発明のヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子を得ることができる。本発明のプラスミドの調製は、Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (PROMEGA社製)を用いると、簡便に行うことができる。また、得られた配列が配列表の配列番号3又は4に記載の塩基配列を有することの確認は、サイクルシーケンス法(実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック、P 123 - 129、1996、羊土社)により解析することができる。

一方、ヌクレオチド合成装置等を用いて配列表の配列番号3又は4に記載の塩基配列を人工的に合成して製造することもできる。

【0019】

このような本発明のヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子は、前述したヨーネ菌抗原タンパク質の容易且つ大量な生産に用いることができるので、有用である。 10

【0020】

(3) 細胞

請求項5に係る本発明の細胞は、請求項3又は4記載の遺伝子が発現可能に導入されたものである。

ここで、細胞としては、大腸菌(JM109株等)、酵母等通常遺伝子の発現に用いられる各種細胞を使用できる。

請求項5に係る本発明の細胞は、上述の請求項3又は4記載の遺伝子をプラスミドベクターにクローニングし、これを細胞へ導入して得ることができる。

即ち、まず、請求項3又は4記載の遺伝子の両端に制限酵素サイトをそれぞれ付加する。ここで、制限酵素サイトとしては、種々の酵素に対応した制限酵素サイトを用いることができるが、本発明者らは、実施例1に示すように、BamHIサイト及びPstIサイトを用了。サイト付加の条件は、使用する制限酵素の種類に応じて温度、時間等を調節して行うことができる。 20

【0021】

次に、両端に制限酵素サイトの付加された遺伝子を、プラスミドベクターの対応する制限酵素サイトにライゲーションする。プラスミドベクターとしては、対応する制限酵素サイトを有するものであれば、特に制限なく用いることができ、本発明者らは、実施例1に示すように、pQE30を用了。ライゲーションは、Ligation high (TOYOBO社製)を用いて、キット添付のプロトコールに従い実施すると簡便である。 30

そして、プラスミドベクターを細胞に導入することにより、請求項5に係る本発明の細胞を得ることができる。プラスミドベクターの細胞への導入は、細胞が大腸菌の場合はN末端にヒスチジン・タグを付加したタンパク質として導入すると、ヒスチジン・タグとニッケルとの親和性を利用したアフィニティーカラムにより、ヨーネ菌抗原タンパク質を容易に製造することができる。

【0022】

このよう請求項5に係る本発明の細胞は、前述したヨーネ菌抗原タンパク質の容易且つ大量な生産に用いることができる。

請求項5に係る本発明の細胞からのヨーネ菌抗原タンパク質の精製は、細胞を培養後、発現誘導を行って、十分に発現が誘導された段階で細胞を収穫してからアフィニティーカラム等により精製して得ることができる。 40

細胞の培養、並びに発現誘導は、細胞が大腸菌の場合を例にとると、アンピシリン加LB培地で1~5時間、更にIPTGを添加して更に2~10時間培養して行うことができる。

精製は、例えば、細胞を超音波破碎した後、可溶性分画又は不溶性の沈殿分画を用いて、組換えタンパク質に付加されたヒスチジン・タグとニッケルとの親和性を利用したアフィニティーカラムにより行うことができる。即ち、ヒスチジン・タグ付加組換えタンパク質をカラムに流し、組換えタンパク質をニッケル担体に結合させ、非吸着成分を洗浄により除去した後、イミダゾール液等を用いて溶出する。このようにして、精製されたヨーネ菌抗原タンパク質を得ることができる。 50

【0023】

(4) ヨーネ病の診断方法

請求項6に係る本発明のヨーネ病の診断方法は、被検動物の細胞に請求項1又は2記載のヨーネ菌抗原タンパク質を添加して培養した後、培養上清中のIFN-濃度を検出することを特徴とする。

被検動物としては、例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の反芻動物のほか、シカ、キツネ、ウサギ、サル、ヒト等のヨーネ病に感染する可能性のある動物全般が挙げられる。

細胞としては、末梢血単核球(PBMC)等の血液細胞が挙げられる。

【0024】

請求項6に係る本発明のヨーネ病の診断方法においては、このような被検動物の細胞に請求項1又は2記載のヨーネ菌抗原タンパク質を添加して培養する。ここで、請求項1又は2記載のヨーネ菌抗原タンパク質を直接添加することもできるが、請求項7に記載するように、請求項5記載の細胞を添加して、細胞内でタンパク質を発現させることもできる。

ここで、請求項1又は2記載のヨーネ菌抗原タンパク質を添加する場合は、培地に対し1~20 μ g/ml、中でも5~10 μ g/ml程度とすることが好ましい。1 μ g/ml未満であると、添加した効果がなく、一方、20 μ g/mlを超えると、培地に悪影響を及ぼしたり、IFN-誘導が抑制される可能性がある。また、請求項5記載の細胞を添加する場合、培地に対し $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ cells/ml、特に 2×10^6 cells/ml程度とすることが好ましい。2 $\times 10^5$ cells/ml未満であると、添加した効果がなく、一方、 2×10^7 cells/mlを超えると、培地に悪影響を及ぼしたり、IFN-誘導が抑制される可能性がある。

その他の培養条件については、被検動物の細胞が生育でき、且つ、INF-の誘導が阻害されない条件を適宜設定することができる。例えば、培養期間は1~3日、培養温度は37~38とすることができる。

【0025】

請求項6に係る本発明のヨーネ病の診断方法においては、続いて、培養上清中のIFN-濃度を検出する。検出の方法としては、IFN-を検出できる方法であれば、いずれも適用することができる。このようなIFN-を検出できる方法としてはELISA法や免疫クロマトグラフィー法等を挙げることができるが、最も簡便な点で、ELISA法が最も好ましい。ELISA法による場合、例えば、被検動物に対応した抗IFN-モノクローナル抗体がコーティングされた96穴マイクロプレートを用意し、細胞上清を各穴に添加して15~30で1~3時間感作させた後、洗浄してから更にビオチンで標識した被検動物に対応する抗IFN-抗体を添加し、30分~2時間感作、洗浄後、酵素で標識したストレプトアビジンを添加し、1時間感作する。再度洗浄後、基質(テトラメチルベンチジン、TMB)を添加して5~15分感作後、吸光度を測定し、IFN-濃度を検出することができる。

被検動物がヨーネ病に感染しているか否かの判断は、ヨーネ病にかかっていないことが明らかな動物の細胞に、同様に組換え細胞を作用させ、IFN-濃度の比較を行うことにより、明らかである。

【0026】

このような本発明の診断方法により、ヨーネ病を正確且つ高感度に診断できる。

【実施例】

【0027】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

実施例1(ヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子の解明)

ヨーネ菌ATCC19698株から、以下の手順でDNAを調製した。即ち、ヨーネ菌100mgを、リパーゼ8,000IU、リゾチーム5mg/ml、及びプロテアーゼK(タンパク質分解酵素)2mg/mlで処理し、フェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿により精製DNAを調製した。

10

20

30

40

50

次に、調製したDNAを制限酵素S a u 3 A I (T O Y O B O社製) で37、1時間処理して限定消化して、ZAP Express Vector (STRATAGENE社製) のB a m H Iサイトにライゲーションすることにより、ファージライブラリーを作製した。ライゲーションは、ZAP Express Predigested Vector Kit and Express Predigested Gigapack Cloning Kits (STRATAGENE社製) を用いて、キット添付のプロトコールに従って実施した。

その後、パッケージング、ファージライブラリーの増幅、及びin vivo excisionを、上記キットを用いてキット添付のプロトコールに従って実施し、プラスミドベクターを大腸菌X L O L R株に導入した。

【0028】

一方、ヨーネ菌実験感染牛から末梢血単核球 (P B M C) を分離し、牛胎児血清10%添加R P M I 1 6 4 0培地に再浮遊した。尚、牛胎児血清10%添加R P M I 1 6 4 0培地とは、RPMI medium 1640 (Invitrogen社製) に10%牛胎児血清 (JRH Biosciences社製) を添加した培地である。

一方、上記の組換え大腸菌を、アンピシリン100 μ g/ml加LB培地で2時間培養した後、I P T G (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) を1mM添加後、4時間培養した。この組換え大腸菌を、上記のP B M Cに接種後、37、5%炭酸ガス下で3日間培養した。培養温度は、C l o n e 37については30、C l o n e 60については37とした。

続いて、培養上清を20倍に希釈し、E L I S A法によりI F N - 濃度を測定して、I F N - 誘導能を判定した。判定基準は、非組換え大腸菌接種培養上清を20倍に希釈したものを陰性コントロールとして、この陰性コントロールのE L I S A吸光度 (450nm) と比較して0.2以上高い値を示した場合に、I F N - 誘導能を有すると判定した。

【0029】

その結果、組換え大腸菌のうちの2株 (C l o n e 37及びC l o n e 60) がI F N - 誘導能を示した。そこで、これらの組換え大腸菌から、Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (PROMEGA社製) を用いてプラスミドを調製し、クローニングサイトに挿入されたヨーネ菌由来塩基配列を、サイクルシーケンシング法により解析した。

その結果、C l o n e 37及びC l o n e 60のそれぞれにおいて、配列表の配列番号3記載の塩基配列からなる領域、及び配列表の配列番号4記載の塩基配列からなる領域が - ガラクトシダーゼをコードしている領域に組み込まれていることが明らかとなった。

【0030】

実施例2 (組換え大腸菌の製造、及び該細胞からのヨーネ菌抗原タンパク質の精製)

実施例1で得られた2種類の塩基配列は、それぞれ、配列表の配列番号1記載の88アミノ酸からなるアミノ酸配列、及び配列表の塩基配列2記載の416アミノ酸からなるアミノ酸配列をコードする領域が、 - ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現が予想された。

そこで、実施例1で得られた配列表の配列番号3記載の塩基配列からなる領域、及び配列表の配列番号4記載の塩基配列からなる領域を、それぞれプラスミドベクターp Q E 30 (Quiagen社) へクローニングした。即ち、それぞれの塩基配列の両端に、P C R法により制限酵素B a m H Iサイト及びP s t Iサイトをそれぞれ付加し、制限酵素B a m H I及びP s t I処理後、プラスミドベクターp Q E 30のB a m H Iサイト及びP s t Iサイトへライゲーションした。ライゲーションは、Ligation high (T O Y O B O社製) を用いて、キット附属のプロトコールに従い実施した。

【0031】

続いて、プラスミドベクターを大腸菌J M 1 0 9株へ導入し、N末にヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質を大腸菌で発現させた。即ち、組換え大腸菌を、アンピシリン100 μ g/ml加LB培地で2時間培養した後、I P T G (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) を1mM添加後、4時間培養した。培養温度は、C l o n e 3

7については30、Clone 60については37とした。

さらに、培養後の組換え大腸菌を超音波破碎し、Clone 37については可溶性分画を、Clone 60については不溶性の沈殿分画を用いて、組換えタンパク質に付加されたヒスチジン・タグとニッケルとの親和性を利用したアフィニティーカラムにより精製した。まず、ヒスチジン・タグ付組換えタンパクをカラムに流し、組換えタンパク質をニッケル担体に結合させた。非吸着成分を洗浄により除去した後、300 mM イミダゾール液を用いて、2種類の精製された遺伝子組換えヨーネ菌抗原タンパク質を溶出した。

【0032】

実施例3（ウシのヨーネ病の診断）

実施例2で得られた2種類の遺伝子組換えヨーネ菌抗原タンパク質が、ヨーネ病の診断に用いることができるか、の確認を行った。

ヨーネ菌実験感染牛3頭（31、33及び35）及び健康対照牛2頭（0826及び0829）より比重遠心法によりPBMCを分離した。即ち、各個体から採取した血液を2倍希釈して得られるヘパリン加血液を、Ficoll-Paque PLUS（Amersham Biosciences社製）に重層し、1,800 rpmで30分間遠心後、パフィーコート（白血球層）を採取し、HANK'S BALANCED SALT SOLUTION（ハンクス液）で洗浄した後、牛胎児血清10%添加RPMI 1640培地を用いて細胞濃度 2×10^6 cells/mlに再浮遊した。

【0033】

24穴細胞培養用プレートに、1穴当たり1mlずつ、各個体のPBMC浮遊液を分注し、さらに、実施例2で得られた2種類の遺伝子組換えヨーネ菌抗原タンパク質をそれぞれ、最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ に添加後、37、5%炭酸ガス下で3日間培養した。

細胞培養上清を回収し、抗牛IFN-モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いたELISAサンドイッチ法により、遺伝子組換え牛IFN-（rbIFN-）を標準品として細胞培養上清中のIFN-濃度を算出した。即ち、まず、抗牛IFN-モノクローナル抗体（Serotec社製）がコーティングされた96穴マイクロプレートを作製した。プレートを洗浄後、各細胞培養上清を各穴に添加し、室温で2時間感作させた。プレートを洗浄後、ビオチン標識抗牛IFN-抗体を添加し、1時間感作、洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加し、1時間感作する。再度洗浄後、基質（テトラメチルベンチジン、TMB）を添加して5~15分感作後、ELISAリーダーにて波長450nmにおける吸光度を測定した。

一方、rbIFN-を $25 \text{ ng/ml} \sim 0.2 \text{ ng/ml}$ まで希釈し、同様にELISAを行ない、rbIFN-の濃度-吸光度曲線を作成し、該曲線より得られた計算式により、各サンプル中のIFN-濃度を吸光度より計算した。

各細胞培養上清のIFN-濃度（ng/ml）を図1及び表1に示す。

【0034】

【表1】

	ヨーネ菌実験感染牛			健康対照牛	
	#31	#33	#35	#0826	#0829
clone37	1.48	7.28	2.48	0.582	0
clone60	2.39	9.14	3.81	0.62	0
Control	0.03	0.82	0.06	0	0

【0035】

図1及び表1から明らかなように、ヨーネ菌実験感染牛由来のPBMCを精製遺伝子組換えタンパク抗原で刺激して得られる細胞培養上清中には、健康対照牛由来のそれに比べ、高い濃度のIFN-が検出された。

このように、遺伝子組換えヨーネ菌抗原タンパク質の刺激により、ヨーネ菌感染牛のP

10

20

30

40

50

BMC から IFN- γ 産生を強く誘導することが可能であることから、ヨーネ病の正確な診断が可能であることが実証された。

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明によれば、IFN- γ 誘導能を有する単一のヨーネ菌抗原タンパク質が提供される。

また、本発明によれば、ヨーネ菌抗原タンパク質をコードする遺伝子が提供されるので、ヨーネ菌抗原タンパク質の大量生産への道が開かれる。

更に、本発明によれば、IFN- γ 誘導能を有するヨーネ菌抗原タンパク質を用いた正確且つ高感度なヨーネ病の診断方法が提供される。

10

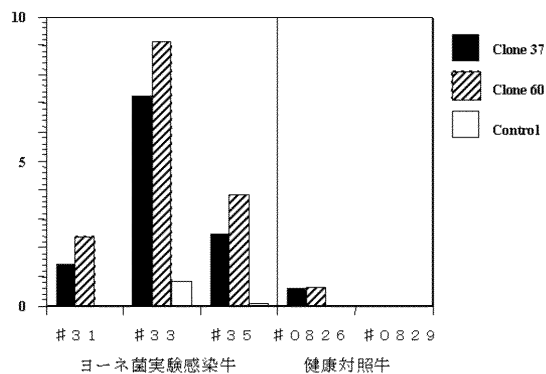
【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】各細胞培養上清の IFN- γ 濃度 (ng/ml) を示すグラフである。

【図1】

IFN- γ (ng/ml)



【配列表】

2005095101000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	P
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 宗田 吉広

茨城県つくば市吾妻2 - 1 1 - 8 0 7 - 7 0 7

(72)発明者 横溝 祐一

茨城県つくば市並木4 - 9 1 9 - 1 0 3

Fターム(参考) 4B024 AA10 AA13 BA31 CA03 DA06 EA03 HA11 HA17
 4B065 AA26X AA36Y AB01 BA01 CA24 CA43 CA46
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 DA86 EA29 EA52 FA74