

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3613577号
(P3613577)

(45) 発行日 平成17年1月26日(2005.1.26)

(24) 登録日 平成16年11月12日(2004.11.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 39/002
A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 33/10
C O 7 K 14/435

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/002
A 6 1 K 39/395 Q
A 6 1 P 33/10
C O 7 K 14/435

請求項の数 10 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-796 (P2002-796)
(22) 出願日 平成14年1月7日(2002.1.7)
(65) 公開番号 特開2003-199576 (P2003-199576A)
(43) 公開日 平成15年7月15日(2003.7.15)
審査請求日 平成14年1月7日(2002.1.7)

(73) 特許権者 501203344
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研
究機構
茨城県つくば市観音台3-1-1
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72) 発明者 辻 尚利
茨城県つくば市松代4丁目415-1
(72) 発明者 磯部 尚
茨城県つくば市東2丁目22-13

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豚回虫 (*Ascarissuum*) 感染幼虫の16kDa抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)に示す豚回虫(*Ascarissuum*)の16kDa抗原蛋白質をコードするDNA。

(a) 配列表の配列番号2で示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列表の配列番号2で示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚回虫(*Ascarissuum*)の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質。

【請求項2】

以下の(c)又は(d)に示すDNAである請求項1に記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号1の76位から525位の塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号1の76位から525位の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ豚回虫(*Ascarissuum*)の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項3】

以下の(a)又は(b)に示す蛋白質。

(a) 配列表の配列番号2で示す豚回虫(*Ascarissuum*)の16kDa抗原蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列表の配列番号2で示す豚回虫(*Ascarissuum*)の16kDa抗

原蛋白質のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚回虫 (*Ascaris suum*) の 16 kDa 抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含む組換え体分子。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のベクターを含む組換え体細胞。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換え体細胞を培養し、その培養物から豚回虫 (*Ascaris suum*) の 16 kDa 抗原蛋白質を採取することを特徴とする、豚回虫 (*Ascaris suum*) の 16 kDa 抗原蛋白質を産生する方法。

【請求項 8】

請求項 3 に記載の豚回虫 (*Ascaris suum*) の 16 kDa 抗原蛋白質を認識する抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体である請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 3 に記載の豚回虫 (*Ascaris suum*) の 16 kDa 抗原蛋白質を含む、回虫感染防御のための全身性及び粘膜誘導型ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、寄生虫の感染防御に関わる蛋白質、それをコードする DNA 及びそれらの使用に関する。具体的には、*Ascaris* 及び *Toxocara* 属を含む *Ascarid* 線虫の感染防御抗原蛋白質、該感染防御蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターを保持する組換え体細胞、寄生虫の感染防御抗原に対する抗体及び寄生虫の感染を防御するワクチンに関する。本発明により、*Ascaris* 及び *Toxocara* 属の回虫感染防御を目的とした化合物の合成、あるいは人および動物における回虫感染から守るためのワクチン開発や治療薬の開発に応用できる。

【0002】

【従来の技術】

人類や家畜生産に甚大な被害をもたらしてきた感染症は、ワクチンの普及によってその多くは制圧されてきた。しかし、ワクチンが開発途上にある寄生虫感染症は、依然として世界各地に分布している。とりわけ、熱帯・亜熱帯地域では寄生虫の蔓延に加え衛生状態の不備から寄生虫による人への健康被害、家畜生産への被害は莫大な額にのぼる。また、先進諸国でも最近では寄生虫による新興、再興の人畜共通感染の脅威が大きな社会問題になりつつある。寄生虫病防除の中心は化学療法剤などの薬剤利用に深く依存している。しかしながら、薬剤の連続使用によるいわゆる薬剤耐性がいずれの薬剤に対しても確立され、殺虫効果の消失するものも少なくない。さらに、薬剤の使用には常に人あるいは動物への副作用を考えなくてはならず、同時に、食と環境の安全性を脅かす薬物残留問題があり、消費者から敬遠される傾向にある。そのうえ、薬剤の使用には有効性及び適用範囲に加えて、膨大な開発コストの面からも限界が生じつつあり、21世紀における寄生虫による人および家畜生産の被害を薬剤使用によって防ぐことは非常に難しい状況にある。

【0003】

人や家畜、愛玩動物の小腸に寄生する回虫 (*Ascaris* や *Toxocara* 属) は、熱帯・亜熱帯地域に限らず先進諸国を含め世界的に分布する寄生虫である。一般に、寄生線虫は固有宿主が限定されているが、回虫に関しては本来の固有宿主ではない非固有宿主への感染が顕著に見られる寄生虫である。そのため、豚を固有宿主とする豚回虫 (*Asc*

10

20

30

40

50

arissuum) や犬回虫 (*Toxocara canis*) の人への感染例が多数報告され、人畜共通感染症としても重要視されている (松山ら, 日本呼吸器学会誌 36:208-212 (1998), Maruyama et al., Lancet 347:1766-1767 (1996))。また、マウス等の実験動物でも感染が成立し、豚の代替宿主として豚回虫 - マウス感染系は広く免疫学的試験等に利用されている (Kennedy et al., Clin Exp Immunol 80:219-224 (1990))。

【0004】

寄生虫感染でもウイルスや細菌感染症に見られるような宿主の再感染防御能の獲得が知られており、古くから実験室段階で実証されている (Maizels et al., Immunol Rev 171:125-147 (1999))。こうした背景から寄生虫ワクチンとして実用化に至った寄生虫は Poynter によって開発された牛肺虫である (Poynter, D., Adv. Parasitol., 1:179-212 (1963))。しかし、感染幼虫を放射線照射によって製造された寄生虫ワクチンには常に人為感染の副作用があり、また、生ワクチンであるため投与の煩雑さで敬遠されるに至った。豚回虫感染においても、虫体抽出物あるいは放射線照射した感染ステージである第3期幼虫 (L3) で防御免疫が誘導されることは、豚、ウサギ、マウスで明らかにされている (Stewart et al., Vet Parasitol 17:319-326 (1985), Stankiewicz et al., J Parasitol 36:245-257 (1990))。なかでも、豚回虫幼虫ステージの抽出抗原や表層抗原を免疫した動物では、顕著な感染阻止が認められることから、幼虫抗原には防御免疫を誘導する分子が含まれていることが示唆されてきている (Hill et al., Vet Immunol Immunopathol 42:161-169 (1994))。

【0005】

遺伝子組換え技術は、他の感染症と同様に寄生虫ワクチン開発に向け有効な手段となっている。現在、各国で感染防御抗原あるいは寄生虫に特有な変態関連酵素等をコードする遺伝子クローニングが精力的に進められ、安全なワクチン蛋白質の製造が試みられてきている (Blaxter et al., Parasitol Today 16:5-6 (2000))。しかし、ワクチン候補分子を製造しても、感染の成立する宿主が限定されてしまうため、マウス等の実験小動物を用いた有効性評価が難しく、組換え技術によって製造された寄生虫感染を防ぐいわゆる感染防御抗原の評価が大きな障害となり、現状では単一分子あるいは複数の分子を組み合わせた組換え抗原によるワクチンの実用化に至っていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、寄生虫の駆除及び寄生虫感染から家畜及び人を守るための化合物の合成を提供し、様々な人畜共通の寄生虫感染症の防除法を提供するものである。具体的には、*Ascaris* 及び *Toxocara* 属回虫の感染防御抗原蛋白質、該感染防御抗原蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターを保持する組換え体細胞、寄生虫の感染防御抗原に対する抗体及び寄生虫の感染を防御するワクチンを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、豚回虫感染幼虫から、新規な 16 kDa の抗原をコードする DNA を単離し、該 DNA がコードする抗原がマウスにおいて回虫感染を防御することを見出し、該抗原が回虫感染防御抗原であることを突き止め本発明を完成するに至った。本発明は寄生虫における感染防御抗原をコードする遺伝子 (*Ascaris suum* L2R37 遺伝子)、該感染防御抗原蛋白質及び該感染防御抗原蛋白質コード領域を蛋白質発現ベクターに挿入し、精製した組換え感染防御抗原蛋白質の作製に関連する。また、本発明は感染防御

10

20

30

40

50

抗原に対する抗体、及び抗体の作製方法に関連する。さらに、本発明は該感染防御蛋白質をワクチンとして用いた、回虫感染防御能の誘導に関連する。

【0008】

即ち、本発明は以下のとおりである。

(1) 以下の(a)又は(b)に示す豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質をコードするDNA。

(a) 配列表の配列番号2で示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列表の配列番号2で示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質。

10

(2) 以下の(c)又は(d)に示すDNAである請求項1に記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号1の76位から525位の塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号1の76位から525位の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(3) 以下の(a)又は(b)に示す蛋白質。

(a) 配列表の配列番号2で示す豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列表の配列番号2で示す豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質。

20

(4) (1)または(2)のDNAを含む組換え体分子。

(5) (1)または(2)のDNAを含むベクター。

(6) (5)のベクターを含む組換え体細胞。

(7) (6)の組換え体細胞を培養し、その培養物から豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質を採取することを特徴とする、豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質を産生する方法。

(8) (3)の豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質を認識する抗体。

30

(9) モノクローナル抗体である(8)の抗体。

(10) (3)の豚回虫(*Ascaris suum*)の16kDa抗原蛋白質を含む、回虫感染防御のための全身性及び粘膜誘導型ワクチン。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

本発明におけるcDNAライブラリーの作製、遺伝子のクローニング、スクリーニングおよび塩基配列の決定等の分子生物学、寄生虫学、免疫学並びに生化学的な技術はJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989): *Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press*; Ed Harlow and David Lanc (1988): *Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 獣医臨床寄生虫学編集委員会編(1998)、獣医臨床寄生虫学、文英堂、等の当業者に良く知られた文献に記載された方法に従って行えばよい。また、DNA解析は、MacVector(登録商標)(コダック社)およびGENETYX(ソフトウェア開発社)等のソフトウェアを用いて行うことができる。

40

50

【0011】

本発明のDNAは、配列表の配列番号2で示すアミノ酸配列を有する豚回虫 (*Ascaris suum*) の16kDa抗原蛋白質をコードする総てのDNAを含む。また、配列表の配列番号2で示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚回虫 (*Ascaris suum*) の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質をコードする総てのDNAも含む。ここで、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚回虫 (*Ascaris suum*) の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質とは、下に記載のとおりである。

【0012】

さらに、本発明のDNAは、配列番号1の76位から525位までの塩基配列からなるDNA (豚回虫感染幼虫の16kDa抗原をコードするDNA、すなわち*Ascaris suum* L2R37遺伝子) または配列番号1に示す全塩基配列からなるDNAを含む。さらに、これらのDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる総てのDNAも含む。ここで、ストリンジェントな条件とは、豚回虫感染幼虫の16kDa抗原をコードするDNA配列と90%以上の相同性、好ましくは95%以上の相同性、より好ましくは97%以上の相同性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。通常、完全ハイブリッドの融解温度より約5 ~ 約30、好ましくは約10 ~ 約25 低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合をいう。ストリンジェントな条件については、J. Sambrook 20
ら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)* に記載されており、ここに記載の条件を使用し得る。

【0013】

また、本発明の蛋白質は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するもの又は、その類似蛋白質すなわち配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同等の性質を有し、アミノ酸配列中、1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものであり、豚回虫感染幼虫16kDa抗原のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の相同性を有するのが望ましい。ここで 30
、実質的に同質の性質とは、豚回虫 (*Ascaris suum*) 感染幼虫の16kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有することを意味し、生物学的活性を有するとは豚回虫感染防御能を有することを意味する。

【0014】

本発明の豚回虫感染幼虫の16kDa抗原をコードするcDNAは、以下のような方法で得ることができる。

【0015】

Ascaris 属または*Toxocara* 属回虫の成虫は、回虫感染豚より得ることができる。成虫から未成熟卵を得て、Douvres and Urban, *J Parasitol.*, 69: 549-558 (1983) からの方法によって感染ステージ 40
ある第3期幼虫 (L3) を含む成熟卵に発育させ、cDNAのライブラリーの作成のために供することができる。

【0016】

回虫L3より、通常行われる方法または市販のmRNA単離キットを用いて、mRNA (poly (A) RNA) を精製する。例えば、回虫L3を、グアニジン試薬、フェノール試薬等で処理して全RNAを得た後、オリゴdT-セルロースやセファロース2B等を担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法、又はパッチ法により poly (A) + mRNA を得ることができる。

【0017】

このようにして得られたmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合 50

成し、DNAポリメラーゼを用いて二本鎖DNAを合成し、適当なベクターに組み込んで、該ベクターを用いて大腸菌等を形質転換してcDNAライブラリーを作製する。cDNAは、適当な制限酵素とリガーゼを用いる通常の方法でベクターに組込むことができる。例えば、得られたcDNAを、適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位に挿入してベクターに連結する方法などがある。この際、後述のベクター、宿主細胞を用いてcDNAライブラリーを得ることが出来る。

【0018】

このようにして得られたクローン化DNAライブラリーから、目的のDNAを選択する。選択方法として、イムノスクリーニング法、プラークハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法等の方法を用いることができる。例えば、得られたクローン群を、イソプロピル-1-チオ-D-ガラクトシド(IPTG)等の誘導物質により蛋白質を発現させ、これをナイロン膜若しくはセルロース膜に転写し、目的蛋白質に対する抗体または該抗体を含む血清を用いて免疫学的に対応するクローンを選択することができる。

10

このようにして調製したクローンから目的cDNAの塩基配列を決定する。

【0019】

塩基配列の決定は、例えば、マキサム・ギルバート法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 560, 1977)又はジデオキシ法(Messing, J. et al., Nucl. Acids Res., 9, 309, 1981)等により行うことができる。これらの原理を応用した塩基配列自動解析装置を用いて配列を決定することもできる。

20

【0020】

得られた目的DNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の遺伝子増幅法により増幅することができる。PCRは、例えば、蛋白質核酸酵素「PCR法最前線 基礎技術から応用まで」第4巻、第5号、1996年4月号増刊、共立出版に記載されている技術により行うことができる。目的のDNAをクローン化又は増幅した後、目的DNAを回収し、これを入手可能な適当な発現ベクターに組み込んで、さらに適当な宿主細胞に形質転換し、適当な培地中で培養、発現させ、目的蛋白質を回収、精製することができる。

【0021】

この際のベクターとして、プラスミド、ファージ、ウイルス等の宿主細胞において複製可能である限りいかなるベクターも用いることができる。例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pKC30、pCFM536等の大腸菌プラスミド、pUB110等の枯草菌プラスミド、pG-1、YEp13、YCP50等の酵母プラスミド、gt110、ZAPII等のファージのDNA等が挙げられ、哺乳類細胞用のベクターとしては、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40とその誘导体等が挙げられる。ベクターは、複製開始点、選択マーカー、プロモータを含み、必要に応じてエンハンサー、転写終結配列(ターミネーター)、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル等を含んでいてもよい。

30

【0022】

ベクターは、商業的に入手可能なものを使用することができ、例えば細菌性のものであればpQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pBluescriptIIKS、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T(Pharmacia)、pET-11a(Novagen)、真核性のものであればpXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、SV40(Pharmacia)等がある。

40

【0023】

複製開始点として、大腸菌ベクターに対して、例えばColiE1、R因子、F因子由来のものが、酵母ベクターに対して、例えば2µmDNA、ARS1由来のものが、哺乳類細胞用ベクターに対して、例えばSV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス由来のものを用いることができる。また、プロモーターとしてアデノウイルス又はSV40

50

プロモーター、大腸菌 *lac* または *trp* プロモーター、ファージラムダ P_L プロモーター、酵母用としての *ADH*、*PHO5*、*GPD*、*PGK*、*AOX1* プロモーター、蚕細胞用としての核多角体病ウイルス由来プロモーター等を用いることができる。

【0024】

選択マーカーとして、大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を、酵母用ベクターには、*Leu2*、*Trp1*、*Ura3* 遺伝子等を、哺乳類細胞には、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を挙げることができる。

【0025】

DNAのベクターへの導入は、任意の方法で行うことができる。ベクターは、種々の制限部位をその内部に持つポリリンカーを含んでいるか、または単一の制限部位を含んでいることが望ましい。ベクター中の特定の制限部位を特定の制限酵素で切断し、その切断部位にDNAを挿入することができる。本発明のDNAおよび調節配列を含む発現ベクターを適切な宿主細胞の形質転換に用いて、宿主細胞に本発明の豚回虫感染幼虫 16 kDa 抗原を発現、産生させることができる。

10

【0026】

宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌等の細菌細胞、アスペルギルス属菌株等の真菌細胞、パン酵母、メタノール資化性酵母等の酵母細胞、ドロソフィラ *S2*、スポドプテラ *Sf9* 等の昆虫細胞、*CHO*、*COS*、*BHK*、*3T3*、*C127* 等の哺乳類細胞等が挙げられる。

20

【0027】

形質転換は、塩化カルシウム、リン酸カルシウム、*DEAE*-デキストラン介在トランスフェクション、エレクトロポレーション等の公知の方法で行うことができる。

【0028】

得られたリコンビナント蛋白質は、各種の分離精製方法により、分離・精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物が *GST* 等との融合蛋白質として発現される場合は、目的蛋白質と融合している蛋白質またはペプチドの性質を利用して精製することもできる。例えばヒスチジンが6個以上並んだアミノ酸配列、いわゆるヒスチジントグとの融合蛋白質として発現させた場合、ヒスチジントグを有する蛋白質はキレートカラムに結合するので、キレートカラムを用いて精製することができる、また *GST* との融合蛋白質として発現させた場合、*GST* はグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。

30

【0029】

豚回虫感染幼虫の 16 kDa 抗原に対する抗体は、以下のようにして調製することができる。

【0030】

該 16 kDa 抗原を抗原として、当業者に良く知られた方法に従い例えばマウス、モルモット、ウサギ、ヤギ等の動物の皮下、筋肉内、腹腔内、静脈に複数回接種し、十分に免疫した後、動物から採血し、血清分離し、抗回虫感染幼虫 16 kDa 抗原抗体を作製することができる。この際、適当なアジュバントを使用することもできる。モノクローナル抗体も公知の方法により作製し得る。例えば、豚回虫感染幼虫の 16 kDa 抗原で免疫したマウスの脾細胞とマウスのミエローマ細胞との細胞融合により得られるハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマの培養上清又は該ハイブリドーマを腹腔内に投与したマウスの腹水から調製することができる。免疫抗原として用いる豚回虫感染幼虫の 16 kDa 抗原は、豚回虫から抽出した天然蛋白質、組換え蛋白質でもよいし、化学合成したものでよい。また、全アミノ酸配列を有する蛋白質でもよいし、該蛋白質の部分構造を有するペプチドフラグメントや他の蛋白質との融合蛋白質でもよい。ペプチドフラグメントは該蛋白質を適当な蛋白質分解酵素で分解した断片も用い得るし、配列番号 1 に示す塩基配列の一部

40

50

を発現ベクターに組み込んで発現させた産物でも良い。融合蛋白質は、配列番号1に示す塩基配列の一部を他の蛋白質をコードする遺伝子と連結させて、発現ベクターに組み込んで発現させて製造することもできるし、ポリペプチドフラグメントを適当なキャリア蛋白質と化学結合により結合させた上で使用することもできる。得られた抗体の反応性は、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ウエスタンブロットティング等の当業者によく知られた方法により測定することができる。

【0031】

豚回虫感染幼虫の16kDa抗原を、回虫感染防止のためのワクチンとして用いることができる。

ワクチンとして用いる豚回虫感染幼虫の16kDa抗原蛋白質は、豚回虫から抽出した天然蛋白質、組換え蛋白質でもよいし、化学合成したものでよい。また、全アミノ酸配列を有する蛋白質でもよいし、該蛋白質の部分構造を有するペプチドフラグメントや他の蛋白質との融合蛋白質でもよい。フラグメントの場合、フラグメントが回虫の感染を防御する抗体(中和抗体)が認識するエピトープ(中和エピトープ)を含んでいることが必要である。ペプチドフラグメントは該蛋白質を適当な蛋白質分解酵素で分解した断片も用い得るし、配列番号1に示す塩基配列の一部を発現ベクターに組み込んで発現させた産物でもよい。

【0032】

ワクチンは、1種又は数種のアジュバント、例えばフロイントの完全若しくは不完全アジュバント、コレラトキシン、易熱性大腸菌毒素、水酸化アルミニウム、カリウムミョウバン、サポニン若しくはその誘導体、ムラミルジペプチド、鉱物油または植物油、NAGO、ノバソームまたは非イオン性ブロック共重合体、DEAEデキストラン等を含むことができる。また、医薬上許容される担体を含んでいてもよい。医薬上許容される担体は、ワクチン接種される動物の健康に悪影響を及ぼさない(すなわち、少なくとも、該動物にワクチン接種しない場合に病気により認められる影響より著しい悪影響を及ぼさない)化合物であると理解される。医薬上許容される担体は、例えば、無菌水または無菌生理塩溶液であることが可能である。より複雑な形態の場合には、該担体は例えばバッファーであることが可能である。

【0033】

本発明のワクチンは、通常の能動免疫法で投与することができ、注射により投与する全身性ワクチンでも、注射によらず経口投与等により投与する粘膜誘導型ワクチンでもあり得る。すなわち、予防的に有効な量(すなわち、回虫による攻撃に対して動物において免疫を誘導する抗原を発現しうる免疫化抗原)にて、剤形に適合した方法による単回または反復投与により投与することができる。ワクチンは、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、経口的または鼻腔内に投与することができる。また、本発明のワクチンは、同じおよび/または他の寄生虫の他の抗原成分と有効に混合することが可能である。

【0034】

ワクチンの投与量、投与回数は対象動物により変わり得るが、例えば本発明の豚回虫感染幼虫16kDa抗原を数十 μ g含むワクチンを1週間から数週間に一度の頻度で、数回投与することにより動物に防御免疫を誘導し得る。

【0035】

さらに、本発明は分離した豚回虫感染幼虫の16kDa抗原に対するインヒビターに関する。分離した豚回虫感染幼虫の16kDa抗原蛋白質に対するインヒビターに関する言葉は、天然物あるいは核酸技術もしくは化学合成から得られたものも含まれる。

【0036】

また、本発明は、それら蛋白質、核酸、抗体、動物の治療を目的とした治療的化合物としてのインヒビター等、ならびにその応用も含まれる。

本発明の豚回虫感染幼虫の16kDa抗原蛋白質及び核酸は、寄生虫ワクチンあるいは抗寄生虫剤の新規ターゲットに利用することもできる。

【0037】

10

20

30

40

50

【実施例】

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

【0038】

実施例1 本発明における豚回虫感染幼虫の16kDa抗原塩基配列の分離及び決定
豚回虫 *A. suum* の成虫は、茨城県食肉処理場下妻支所にて *A. suum* 感染豚より採取した。成虫から得た未成熟卵は Douvres and Urban, *J Parasitol.*, 69:549-558. (1983) らの方法によって感染ステージのL3を含む成熟卵に発育させ、以下の操作に供した。豚回虫感染幼虫の16kDa抗原をコードする遺伝子は、イムノスクリーニングによる *A. suum* L3 cDNAライブラリーから単離した。使用したcDNAライブラリーは、ZapIIベクター(ストラタジーン社)を用いてメーカーの推奨する方法により作製した。使用した血清は、*A. suum* L3を4回感染させたウサギの血清であった(Kasuga et al., *Parasitology* 121:671-677. (2000))。

使用したファージは *E. Coli* XL-1Blue に感染させ、シャーレ(直径150mm)に 5×10^4 になるよう調製し、37°Cで4時間培養した。プラーク出現後、isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG)を浸漬させたニトロセルロース膜で培地の表層を覆い、さらに3時間培養した。培養シャーレから取り除いたニトロセルロース膜は、0.02% Tween 添加 Tris-HCl (TBS-T)で洗浄し、さらに5%添加 TBS-Tに室温1時間ブロッキングした。ニトロセルロース膜は、1:200に希釈した *A. suum* L3感染ウサギ血清と3時間室温で反応させ、TBS-Tで十分洗浄した後アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG山羊血清と1時間反応させ、陽性ファージを5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (NBT/BCIP)を用いて検出した。検出したクローンは、さらに上記スクリーニングを繰り返し、陽性クローンを単離した。単離したファージは Ex Assist (商標)ヘルパーファージと *E. Coli* SOLR (商標)を用いてメーカーの推奨する方法に従いDNAのインビボイクサイションを行った。

【0039】

アルカリ溶菌法により調製した組換え体プラスミドDNA(L2R37)はM13Reverse及びForwardプライマー(アプライドバイオシステム社)を用い、Dye-terminater Sequencing法(アプライドバイオシステム社テクニカルマニュアル)によりメーカーの推奨する方法に従い反応させ、反応産物をDNA sequencer Model 370A (version 1.30、アプライドバイオシステム社)を用いて解析し塩基配列を決定した。L2R37は、615塩基で構成され、5'には非翻訳領域に続き76位にATGの開始コドン526位に終止コドンがそれぞれ認められ、さらにその下流には真核生物に存在するポリAデニレーションが確認された。塩基配列から推定される蛋白質は150残基のアミノ酸から構成され、その内N末領域には18残基の真核生物シグナル配列が確認された。全アミノ酸の推定分子量は16,424Daで等電点は5.23であったのに対して、シグナル配列を除いた虫体内での予想される成熟蛋白質の分子量は、14,420Da、等電点は4.91であった。配列表の配列番号1に該DNAの塩基配列を示した。コーディング領域は、76位から525位であった。配列表の配列番号2にアミノ酸配列を示した。アミノ酸データベースとの相溶性検索から、本発明で示す推定アミノ酸構造は、人象皮症の病原体であるフィラリアの抗原分子あるいは土壤線虫のひとつである *Caenorhabditis elegans* の遺伝子産物とそれぞれ約50%の類似性を示した。しかしながら、現在のGenBank(商標)データベース上で人及びマウス等の哺乳動物で確認されている蛋白質との間で類似性を示した蛋白質は確認されなかった。このことから分離された遺伝子がコードする蛋白質は、線虫特有のものであることが示唆された。

10

20

30

40

50

【0040】

実施例2 組換え体蛋白質を発現させるベクター構築のための豚回虫感染幼虫の16kDa抗原cDNAの分離及び増幅並びに組換え体分子及び組換え体細胞の作出
上記方法で合成したA. suum L3 cDNAセンスプライマー(5'-CCGAGC TCG AGA ATG AAG TAT CTC ATC ACA GTT ACT TGC -3'; CTCGAGはXhoIサイト; 配列番号3)とアンチセンスプライマー(5'-CCG AAT TCT CAC TTA CGC ACC GCC AGC GAT TGC CTT -3'; G AAT TCはEcoRI サイト; 配列番号4)を用いたPCR反応にて増幅した。

【0041】

PCR反応は50µlの反応液[1ng A. suum L3 cDNA、1µMセンス及び1µMアンチセンスプライマー、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、2.5U AmpliTaq DNA polymerase(プロメガ社)]を調製し、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマー社)を用いて、95にて30秒間、55にて30秒間、72にて2分間の反応を35サイクルで実施した。増幅したPCR産物はゲル電気泳動を行い、増幅したDNA断片をDNA精製キット(キアゲン社)を用いて蒸留水中に回収し、回収液を制限酵素XhoI及びKpnIで3時間酵素処理した。プラスミド発現ベクターであるpTrcHis発現ベクター(インビトロゲン社)も挿入断片と同様に制限酵素XhoI及びKpnIで3時間酵素処理した。制限酵素処理した挿入断片及びベクターをDNAライゲーションキット(宝酒造社)を用いてメーカーの推奨する方法に従ってDNA断片を挿入し、大腸菌Top10を用いて形質転換を行い、L-ampプレートに蒔き白色のコロニーから豚回虫感染幼虫の16kDa抗原コード領域の挿入されたクローンを選択した。

【0042】

実施例3 大腸菌における豚回虫感染幼虫の16kDa抗原の作出及び、作出した蛋白質の性状
形質転換した大腸菌を37でアンピシリンを含んだSOB液で培養し、培養後SOB液のOD₆₀₀に到達した時点で1mMのIPTGを添加し、さらに4時間培養を続けた。経時的に産生される蛋白産生の変化は12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動{Laemmli, et al., Nature 227:680-685(1970)}を実施した後、クマーシー染色で確認した。その結果、約22kDa付近に組換え蛋白質の産生が認められ。また、同様に実施した電気泳動のゲルをニトロセルロース膜(アマシャム社)に電氣的に転写した。転写後、膜を5%スキムミルクで30分間ブロッキングし、次いで、TBSで10,000倍に希釈されたアルカリホスファターゼ標識されたT7モノクローナル抗体(ノバーゲン社)と1時間反応させた。TBSTで洗浄した後、結合した蛋白質を基質NBT/BCIP(ギブコBRLL社)を用いて可視化した。その結果、このウエスタンブロット解析によって約22kDa付近に確認された組換え蛋白質と反応することが認められ、組換え蛋白質に(His)₆が付加されていることが確認された(図1)。図1でレーン1は、発現前の大腸菌ライセート、レーン2は、発現後の大腸菌ライセート、レーン3は、精製した豚回虫感染幼虫の16kDa組換え抗原蛋白質を示している。

【0043】

実施例4 大腸菌からの豚回虫感染幼虫の16kDa抗原の精製、及び精製した豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質に対する抗体作製
豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質はメタルキレートクロマトグラフィー(インビトロゲン)を用いてメーカーの推奨するイミダゾール溶出法によって精製した(Tsujiet al., Mol Biochem Parasitol 97:69-79(1998))。溶出された蛋白質はCentrisart I(ザルトリウス社, cut off 10,000 MW)を用いて濃縮し、Slide-A-

10

20

30

40

50

Lyzer (商標) Dialysis Cassette (ピアス社) を用いてリン酸緩衝食塩液中にて透析を行った。この精製した豚回虫感染幼虫抗原組換え体蛋白質は、以下の抗体作製、各種動物の豚回虫免疫血清の反応性、豚回虫感染幼虫を用いた攻撃試験の検討に使用した。

【0044】

豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質に対するポリクローナル抗体はマウスを用いて以下のように作製した{Tsuji et al., Mol Biochem Parasitol 97: 69-79, (1998)}。豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質50μgをTiterMax Gold (商標) (シンテック社) とともに皮下接種し、4週間後再度同量を接種した。再投与2週後に採血を行い、血清を-20℃に保存した。豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質を用いたウエスタンブロット解析によって、作製された16kDa組換え蛋白質マウス免疫血清は、22kDa付近の組換え蛋白質と強く反応することが確認された。

10

【0045】

実施例5 精製した豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質の各種動物のA.suum L3免疫血清との反応性

実施例4で作製した16kDa組換え蛋白質とウサギ、マウス及び豚の豚回虫免疫血清との反応性をSDS-PAGE/ウエスタンブロット法を用いて調べた。SDS-PAGE (Laemmli, et al., Nature 227: 680-685 (1970)) で分離した16kDa抗原組換え体蛋白質を定法に従いニトロセルロース膜(アマシャム社) に転写した。転写後、膜を5%スキムミルクで30分間ブロッキングし、次いで、TBSで500倍に希釈されたウサギ、マウス及び豚の免疫血清と1時間反応させた。TBSで転写膜を洗浄した後、免疫血清と結合した蛋白質を検出するためにアルカリホスファターゼ標識された抗ウサギ、マウス及び豚-IgG抗体(カッセル社) と1時間反応させ、結合した蛋白質を基質NBT/BCIP(ギブコBRL社) を用いて可視化した。その結果、いずれの免疫血清も22kDaの抗原組換え体蛋白質と陽性反応を示し、16kDa組換え蛋白質の抗原性が確認された。

20

【0046】

実施例6 イムノブロット法によるネイティブ(天然型)豚回虫感染幼虫の16kDa抗原の性状及び人回虫及び犬回虫における豚回虫感染幼虫の16kDa抗原様分子の性状

30

実施例4で作製したマウス豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質免疫血清を用いて、豚回虫感染幼虫の16kDa抗原蛋白質抽出液のSDS-PAGE/ウエスタンブロット法を行った。SDS-PAGE (Laemmli, et al., Nature 227: 680-685 (1970)) で分離した後、定法に従いニトロセルロース膜(アマシャム社) に転写した。転写後、膜を5%スキムミルクで30分間ブロッキングし、次いで、TBSで1,000倍に希釈されたマウス豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え体蛋白質免疫血清と1時間反応させた。TBSで洗浄したのち、免疫血清と結合した蛋白質を検出するために、アルカリホスファターゼ標識された抗マウス-IgG抗体(カッセル社) と1時間反応させ、結合した蛋白質を基質NBT/BCIP(ギブコBRL社) を用いて可視化した。その結果、マウス血清と反応する約16kDaの単一バンドが確認され、A.suum L3抽出蛋白質中の天然型豚回虫感染幼虫の16kDa抗原が同定できた。この成績により本発明の表題に用いた16kDaは、L2R37がコードする豚回虫の成熟抗原の分子量である。さらに、人回虫抽出蛋白質を用いて上記の方法を行ったところ、豚回虫抽出蛋白質の場合と同様の16kDaの大きさに陽性反応が確認された。しかし、犬回虫抽出蛋白質には陽性反応は確認されなかった。これらのことから検出された16kDa抗原は豚及び人回虫に共通して存在する分子であることが示された(図2)。図2でレーン1は人回虫、レーン2は犬回虫、レーン3は豚回虫、レーン4は豚回虫感染幼虫16kDa組換え抗原蛋白質を示している。

40

【0047】

実施例7 豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え蛋白質を免疫したマウスにおけるA.

50

s u u m L 3 攻撃試験

マウス 20 匹を 4 群 (5 匹 / 1 群) に分け、それぞれ豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質免疫群、アジュバンド対照群、感染耐化群および未処置群を構成した。豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質免疫群のマウスに初回に 50 μ g の豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質をフロイトの完全アジュバント (ディフコ社) と共に皮下接種し、その 4 週間後および 6 週間後に 16 k D a 抗原組換え蛋白質をフロイトの不完全アジュバントと共に皮下接種し合計 3 回免疫処置を行った。アジュバンド対照群には、豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質免疫群で使用したアジュバントを免疫処置日と同一日に皮下接種した。感染耐化群は、A . s u u m L 3 を頻回感染させることによって作製した。すなわち、感染ステージである L 3 を含んだ成熟卵を初回 2 , 0 0 0 個 10 経口投与し、その後 4 週目および 6 週目に 4 , 0 0 0 個投与した。実験群マウスへの A . s u u m L 3 のチャレンジは最終免疫および経口投与の 1 週間後に成熟卵 5 , 0 0 0 個を経口投与することで行った。感染後、7 日目にて安楽死させ肺を取り出しベ - ルマン法により抗生物質を加えた P B S 中に肺組織内の幼虫を遊出させ、顕微鏡下でその幼虫数をカウントした。数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。感染防御の効果判定は未処置群との幼虫数増減で行った。

【 0 0 4 8 】

未処置群では、253 . 5 \pm 41 . 5 匹、アジュバンド対照群では、275 . 5 \pm 108 . 1 匹、これらに対して、豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質を免疫群では、124 . 8 \pm 95 . 3 匹、であった。また、各群のマウス血清を用いて、イムノプロット 20 法によって豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質の特異抗体を測定した。豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質を免疫群ではいずれのマウス血清も希釈倍率 1 , 600 倍あるいは 3 , 200 倍で強い陽性反応が確認された。未処置群及びアジュバンド対照群ではいずれも陽性反応は確認されなかった。すなわち、豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質の免疫によって、A . s u u m 幼虫回収率が有意に減少し、A . s u u m L 3 に対する豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質による防御免疫誘導が確認された。なお、A . s u u m L 3 感染マウスにおける A . s u u m L 3 チャレンジの防御免疫誘導は、今回設定した感染耐化群のチャレンジ試験において肺からの幼虫回収が 0 であったことから立証された。

【 0 0 4 9 】

実施例 8 経鼻免疫による豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質の感染防御能 30 実施例 7 において、実験室内で汎用されている免疫方法によって作製された豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質免疫マウスに A . s u u m L 3 感染に対する防御免疫誘導が確認された。そこで、さらにワクチン投与による動物への侵襲負担の軽減及び投与の省力化を図るため、鼻腔投与による豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質の防御免疫誘導能について検討した。アジュバントにはコレラトキシン B サブユニット (C T B 、 C - 9903、シグマ社) を用いた。

【 0 0 5 0 】

マウス 15 匹を 3 群 (5 匹 / 1 群) に分け、それぞれ豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組 40 換え蛋白質 + C T B 免疫群、C T B 免疫対照群、および未処置群を構成した。豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質 + C T B 免疫群のマウスには初回、50 μ g の豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質と 25 μ g C T B の混和液を鼻腔内にマイクロキャピラリーラウンドチップを用いて投与し、その 4 週間後および 6 週間後に同様に投与し合計 3 回の免疫処置を行った。C T B 免疫対照群には、豚回虫感染幼虫の 16 k D a 抗原組換え蛋白質免疫群で使用した C T B を免疫処置日と同一日に鼻腔投与した。

実験群マウスへの A . s u u m L 3 のチャレンジは最終免疫および経口投与の 1 週間後に成熟卵 5 , 0 0 0 個を経口投与することで行った。感染後、7 日目に安楽死させ肺を取り出し、ベ - ルマン法により抗生物質を加えた P B S 中に肺組織内の幼虫を遊出させ、顕微鏡下でその幼虫数をカウントした。回収した幼虫数は平均値 \pm 標準偏差で示した。感染防御の効果判定は未処置群との幼虫数増減で行った。また、各群のマウス血清を用いて、E 50

L I S Aによる豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え蛋白質に対する特異抗体を測定した。すなわち、0.1M炭酸バッファーpH9.6を用いて2 μ g/mlに調整した豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え蛋白質をポリスチレン性マイクロプレート(AE1640,住友ベークライト社)の各ウエルをコートした。プレートは4で16時間放置後、0.05% Tween 添加PBS(PBST)で3回洗浄した。各ウエルは1%牛血清アルブミン(BSA,シグマ社)加PBSで37で1時間ブロックした。PBSTで5回洗浄した後、系列希釈した血清を添加し37度で1時間反応させた。反応後、PBSTで5回洗浄しウエルに1:10,000に調整したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合抗マウスIgG(ベツチル社)を加え37で1時間反応させた。反応後プレートはPBSTで5回洗浄し、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)基質溶液(ABTS,KPL)を添加し37で発色させた。反応の停止は1%SDS添加によって行った。発色の測定はマイクロプレートリーダー(SPECTRAFLUOR,和光)を用いてA₄₀₅で測定した。抗体価は最高希釈倍率のreciprocal log₂ titerで示した。その結果、未処置群では、173.4 \pm 49.6匹。CTB免疫対照群では、200.8 \pm 52.8匹であった。これらに対して、豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え蛋白質+CTBの免疫群では、76.4 \pm 25.6匹であった。その結果、豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え蛋白質+CTBの免疫群では、16kDa抗原組換え蛋白質に対する特異IgG抗体価19.0 \pm 0.70が確認された。未処置群及びCTB免疫対照群ではいずれも抗体価は<6であった。すなわち、豚回虫感染幼虫の16kDa抗原組換え蛋白質の経鼻による粘膜免疫によって、A

10

20

【0051】

【発明の効果】

本発明により、豚回虫(Ascaris suum)感染幼虫の16kDa抗原蛋白質をコードするDNAからなる遺伝子、該DNAを含むベクター及び組換え体細胞、豚回虫(Ascaris suum)感染幼虫の16kDa抗原蛋白質、該抗原を認識する抗体並びに該抗原を含む豚回虫感染防御のための全身性及び粘膜誘導型ワクチンが提供され、寄生虫の駆除及び寄生虫感染から家畜及び人を守るための化合物の合成及び様々な人畜共通の寄生虫感染症の防除が可能になる。

30

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Animal Health; Bio-oriented

<120> Ascaris suum infective larvae 16kDa protein, nucleic acid molecules, and use thereof

<130> P01-0792

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 615

<212> DNA

<213> Ascaris suum

<220>

<221> CDS

<222> (76)..(525)

<400> 1

gcacgaggct catcgtgtgt tattctcgtt ctatcgcgac ggccttcaac ttcgttgtg 60

cagcgctcta acgaa atg aag tat ctc atc aca gtt act tgc cta ttc gtt 111

10

20

30

40

Met Lys Tyr Leu Ile Thr Val Thr Cys Leu Phe Val

1

5

10

cta gct ctt gtt gag gga caa aca cca tca cgc gta cca ccc ttc ttg 159

Leu Ala Leu Val Glu Gly Gln Thr Pro Ser Arg Val Pro Pro Phe Leu

15

20

25

gtt ggt gca ccc gaa agt gct gtc aaa gac ttc ttt gaa ctg att aaa 207

Val Gly Ala Pro Glu Ser Ala Val Lys Asp Phe Phe Glu Leu Ile Lys

30

35

40

10

aag gac gaa gaa aag acc gat cct gaa att gaa gcc gat atc gac gca 255

Lys Asp Glu Glu Lys Thr Asp Pro Glu Ile Glu Ala Asp Ile Asp Ala

45

50

55

60

20

ttt gtg gct aaa tta ggt gct gac tac acg aat aaa ttc aaa gcg ttc 303

Phe Val Ala Lys Leu Gly Ala Asp Tyr Thr Asn Lys Phe Lys Ala Phe

65

70

75

aaa gca gag ttg aaa gca cat gaa gca gaa tat gag aaa gca cat gcc 351

Lys Ala Glu Leu Lys Ala His Glu Ala Glu Tyr Glu Lys Ala His Ala

80

85

90

30

gca gct ata gcg aaa ttc tca cca gca gct aaa gag gca gac gct aaa 399

Ala Ala Ile Ala Lys Phe Ser Pro Ala Ala Lys Glu Ala Asp Ala Lys

95

100

105

ttg aca gca att gct gaa gac gcc aaa ctc aac gga atc caa aaa cga 447

Leu Thr Ala Ile Ala Glu Asp Ala Lys Leu Asn Gly Ile Gln Lys Arg

40

110	115	120		
caa aaa atc aag gaa act atg gaa agt cta cca aaa gaa gtc cgc gat			495	
Gln Lys Ile Lys Glu Thr Met Glu Ser Leu Pro Lys Glu Val Arg Asp				
125	130	135	140	
gaa ctc gaa aag gca atc gct ggc ggt gcg taagctcata tcgacctatcg			545	10
Glu Leu Glu Lys Ala Ile Ala Gly Gly Ala				
	145	150		
tacgaacacc tcttaattgc tgacttcgtg taataaagct atttgcttcg ttaaaaaaaaa			605	
aaaaaaaaaa			615	20
<210> 2				
<211> 150				
<212> PRT				
<213> Ascaris suum				
<400> 2				30
Met Lys Tyr Leu Ile Thr Val Thr Cys Leu Phe Val Leu Ala Leu Val				
1	5	10	15	
Glu Gly Gln Thr Pro Ser Arg Val Pro Pro Phe Leu Val Gly Ala Pro				
	20	25	30	
Glu Ser Ala Val Lys Asp Phe Phe Glu Leu Ile Lys Lys Asp Glu Glu				40
	35	40	45	

Lys Thr Asp Pro Glu Ile Glu Ala Asp Ile Asp Ala Phe Val Ala Lys
 50 55 60

Leu Gly Ala Asp Tyr Thr Asn Lys Phe Lys Ala Phe Lys Ala Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Ala His Glu Ala Glu Tyr Glu Lys Ala His Ala Ala Ala Ile Ala
 85 90 95

Lys Phe Ser Pro Ala Ala Lys Glu Ala Asp Ala Lys Leu Thr Ala Ile
 100 105 110

Ala Glu Asp Ala Lys Leu Asn Gly Ile Gln Lys Arg Gln Lys Ile Lys
 115 120 125

Glu Thr Met Glu Ser Leu Pro Lys Glu Val Arg Asp Glu Leu Glu Lys
 130 135 140

Ala Ile Ala Gly Gly Ala
 145 150

10

20

30

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial
Sequence

<400> 3

ccgagctcga gaatgaagta tctcatcaca gttacttgc 39

10

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial
Sequence

<400> 4

ccgaattctc acttacgcac cgccagcgat tgcctt 36

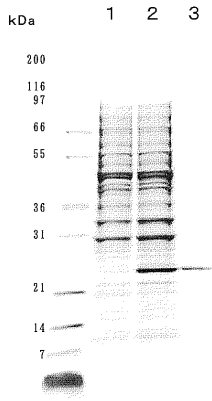
【図面の簡単な説明】

30

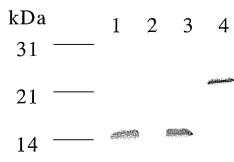
【図1】豚回虫感染幼虫の16kDa抗原の電気泳動の結果を示す図である。

【図2】イムノプロット法による人回虫における豚回虫感染幼虫の16kDa関連抗原ならびにネイティブ型豚回虫感染幼虫の16kDa抗原の結果を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷		F I		
C 0 7 K	16/18	C 0 7 K	16/18	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	5/00	A
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08	
(C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 R	1:19)	C 1 2 R	1:19	

(72)発明者 春日 春江

茨城県つくば市松代3丁目311-202

(72)発明者 新川 武

沖縄県那覇市首里石嶺町2丁目96-1 宿舎4号棟301号室

(72)発明者 松本 安喜

東京都北区王子6丁目2-7-304

審査官 新留 豊

- (56)参考文献 ・MBAsBWA205M13R *Ascaris suum* (parasitic nematode) body wall muscle and hypodermis *Ascaris suum* cDNA , Database EMBL/Genbank/DDBJ , 1999年11月12日 , ACCESSION : AW165788
 ・ INFECTION AND IMMUNITY , 2001年12月 , Vol.69, No.12 , P.7285-7292

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , D B名)

C12N15/00-15/90

C07K1/00-19/00

A61P1/00-43/00

A61K39/00-39/44;49/00-49/04

JICSTファイル(JOIS)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)

PubMed