

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012年1月5日(05.01.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/002180 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/063965
- (22) 国際出願日: 2011年6月17日(17.06.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-145907 2010年6月28日(28.06.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP). 国立大学法人お茶の水女子大学(OCHANOMIZU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木 成江(SASAKI Narie) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 室伏 きみ子(MUROFUSHI Kimiko) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁

目1番1号 国立大学法人お茶の水女子大学内 Tokyo (JP). 前田 桂(MAEDA Katsura) [JP/JP]; 〒1710042 東京都豊島区高松2丁目18番18号 Tokyo (JP).

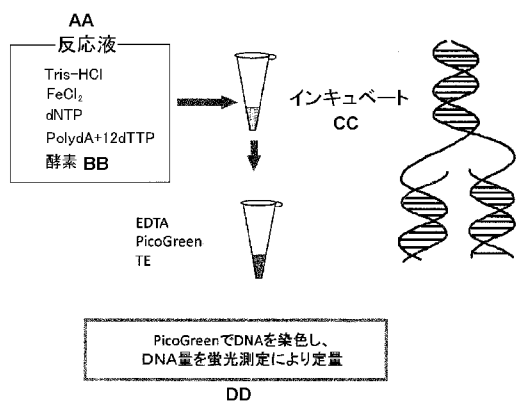
- (74) 代理人: 萩野 幹治(HAGINO Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ1丁目1番地 Gifu (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINATION OF ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL DNA POLYMERASE OF PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA, AND METHOD FOR SCREENING FOR ANTI-MALARIA COMPOUND

(54) 発明の名称: 熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア DNA ポリメラーゼの活性測定法及び抗マラリア化合物のスクリーニング法

[図2]



- AA REACTION SOLUTION
- BB ENZYME
- CC INCUBATION
- DD DNA IS STAINED WITH PicoGreen AND THE AMOUNT OF DNA IS QUANTIFIED BY FLUORESCENCE MEASUREMENT

(57) Abstract: Disclosed is a means which is useful for the development of an anti-malaria agent. It is found that a mitochondrial DNA polymerase of plasmodium falciparum malaria requires a bivalent iron ion. Thus, disclosed is a method for determining the activity of a DNA polymerase, comprising the steps of: (1) incubating a solution containing a bivalent iron ion, a mitochondrial DNA polymerase of plasmodium falciparum malaria, template DNA, and at least one deoxyribonucleoside triphosphate or deoxyribonucleoside triphosphate derivative to synthesize double-stranded DNA; (2) detecting the synthesized double-stranded DNA; and (3) calculating the activity of the DNA polymerase from the results of the detection carried out in step (2).

(57) 要約: 抗マラリア薬の開発に有用な手段を提供することを課題とする。熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア DNA ポリメラーゼが二価鉄イオン要求性であることが明らかとなった。そこで、(1)二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア DNA ポリメラーゼと、鋳型 DNA と、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ; (2)合成された二本鎖 DNA を検出するステップ; (3)ステップ(2)の検出結果より、前記 DNA ポリメラーゼ

の活性を算出するステップを含む、DNA ポリメラーゼ活性測定法が提供される。

WO 2012/002180 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, (規則 5.2(a))
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼの活性測定法及び抗マラリア化合物のスクリーニング法

技術分野

[0001] 本発明は熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼを用いた試験方法（アッセイ）に関する。詳しくは、当該ミトコンドリアDNAポリメラーゼの活性測定法、及び当該ミトコンドリアDNAポリメラーゼに対する阻害活性を指標にした、抗マラリア化合物のスクリーニング法に関する。本出願は、2010年6月28日に出願された日本国特許出願第2010-145907号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

背景技術

[0002] マラリアは、熱帯地域に蔓延する重篤な感染症の1つである。その被害は甚大で、アフリカを中心に年間3～5億人が感染し、100～200万人が命を落としているといわれている（WHO推計、2005年）。マラリアは、エイズ、結核と並んで世界の三大感染症に挙げられ、特に途上国の発展において大きな問題となっている。日本でも、マラリア蔓延地域への渡航により感染し、帰国後発症するケースが増加しており、毎年100例以上の感染が報告され、死亡例も年間数例出ている（厚生労働省検疫所）。

[0003] 病原体は単細胞生物であるマラリア原虫（*Plasmodium* spp.）であり、ハマダラカ（*Anopheles* spp.）によって媒介される。マラリア原虫はアピコンプレクサ門 孢子虫綱 コクシジウム目に属し、微細構造および分子系統解析からアルベオラータという系統に属する。ここに属する生物には、他に渦鞭毛藻類が知られており、最近になってマラリア原虫からもアピコプラストという独自のDNAをもつ色素体の痕跡であるオルガネラが発見された（非特許文献1）。このことから、その全てが寄生生物であるアピコンプレクサ類も祖先

は渦鞭毛藻類と同じ光合成生物であったと考えられている。ヒトの病原体となるものは熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*) の四種類であり、特に熱帯熱マラリア原虫によるマラリアは症状が重い。

[0004] 熱帯熱マラリア原虫（以下「マラリア原虫」と略称する）の生活環を図3に示した。マラリア原虫に感染したハマダラカの雌がヒトに吸血する際、マラリア原虫（スポロゾイト）が蚊の唾液と共にヒトの血管内に侵入する。血管内に侵入した感染型原虫は肝細胞に移動し、7～10日は肝細胞内で増殖する。十分に増殖・成熟すると、原虫が肝細胞を破壊し血液中に放出される。放出された原虫は赤血球に侵入し、リング（輪状体）、トロホゾイト（栄養体）、シゾン（分裂体）と発育し、二十数個のメロゾイト（娘虫体）が新しく生まれる。この発育の際、原虫は赤血球中のヘモグロビンを分解し、得られたアミノ酸を栄養とする。次いで赤血球が破壊されメロゾイトが放出されるが、このときマラリア特有の発熱が起こる。血液中に放出された原虫は、より多くの赤血球に侵入して増殖を繰り返す。メロゾイトの一部は生殖母体となり、ハマダラカがこの患者から吸血した際、蚊の胃内に取りこまれる。蚊の体内に取り込まれた原虫は有性分裂してスポロゾイトを形成し、蚊の唾液腺に移動する。この蚊が別のヒトを吸血することで感染が広がっていく。

[0005] 現在、マラリア原虫に対するワクチンはなく、感染を薬剤で予防することはできない。抗マラリア剤はいくつか開発されており、代表的な治療薬としてキニーネが昔から用いられているが、副作用が非常に強いという問題点がある。また、クロロキン、メフロキン、ファンシダール、プリマキン等の薬剤も開発され、その中でもクロロキンは他の薬剤よりは副作用が少ないため、予防薬や治療の初期に試す薬として使われることが多い。しかし、近年、クロロキンを含めマラリア治療薬に耐性を示す原虫が蔓延し始めており、大きな問題となっている。そのほかにも、殺虫剤に耐性を持つハマダラカも現れていることなどからも、新規薬剤の開発が急がれている。その薬剤開発の

ターゲットとして注目されているのが、アピコプラスト、ミトコンドリアといったマラリア原虫オルガネラである。

[0006] ミトコンドリアもアピコプラストもそれぞれ独自のDNAをもち、そこにコードされている遺伝子産物と核にコードされている遺伝子産物の両者から構成されている(図4)。アピコプラストは前述の通り、色素体の痕跡であると考えられているオルガネラで、光合成を行うことはできない。マラリア原虫の核ゲノムのうち、約500遺伝子がアピコプラストをターゲットとするタンパク質をコードしている。アピコプラストDNA(以下、「apDNA」と略称する)の複製には、DNAジャイレース(トポイソメラーゼII)が必要であることが分かっている(非特許文献2、3)。また、最近になって、apDNAの複製をおこなうDNAポリメラーゼPF14_0112(POMI / Pfprex)が同定された(非特許文献4)。しかし、詳細な複製機構については分かっていない。

[0007] 一方で、マラリア原虫のミトコンドリアDNA(以下、「mtDNA」と略称する)複製に関与するDNAポリメラーゼは未だ同定されていない。ローリングサークル型という特殊な複製様式を用いていると考えられているが、複製機構の詳細や、複製・転写に関与するタンパク質は全く同定されていない。これまでに、mtDNAの複製に関与する酵素であるDNAポリメラーゼ γ 様の酵素が、マラリア原虫から部分精製されている(非特許文献5)。この部分精製された酵素は(1)アフィディコリン耐性、(2)N-エチルマレイミド(NEM)感受性などといった、既知の哺乳動物のDNAポリメラーゼ γ (pol γ)と同様の性質を持つ反面、(3)ddTTP耐性、(4)PMEApp耐性などといった異なる性質をもつことが明らかになっている(非特許文献5)。しかし、マラリア原虫の大量培養やミトコンドリアの精製が困難であることなどから、マラリア原虫からのmtDNAポリメラーゼの単離・精製は成功していない。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Wilson et al. Infect. Agents Dis. 3: 29-37, 1994

非特許文献2: Fichera et al. Nature 390:407-409, 1997

非特許文献3: Weissig et al. DNA Cell Biol. 16:1483-1492, 1997

非特許文献4: Seow et al. Molecular & Biochemical Parasitology 141:145-153, 2005

非特許文献5: Charavalitsheewinkoon-Permitr et al. Parasitology International 49 279-288, 2000

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は抗マラリア薬の開発等に有用な手段（ツール）を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、マラリア原虫のmtDNAポリメラーゼに注目して検討を進めた。マラリア原虫のミトコンドリアは、マラリア原虫の生存に必須のオルガネラであり、またその構造のユニークさから新規創薬のターゲットとして有力と考えられ、mtDNAの複製機構を解明することは、医学的見地からも非常に重要である。

[0011] 近年、高等植物から大腸菌DNAポリメラーゼI(polI)に類似したDNAポリメラーゼが同定された (Christensen et al. Plant Cell. 17(10):2805-2816 2005, Kimura et al. Nucleic Acids Res. 1;30(7):1585-1592 2002, Mori et al. Biochem Biophys Res Commun. 19;334(1):43-50. 2005, Ono et al. Plant Cell Physiol. 48(12):1679-1692. 2007)。また、本発明者らの研究グループにおいても、真正粘菌(Physarum polysepharum)からDNAポリメラーゼI類似のミトコンドリアDNAポリメラーゼ(PpPoIA)が同定された。このPpPoIAは、最もDNAポリメラーゼIに類似しており、原始的なミトコンドリアDNAポリメラーゼであることが予想された。そこで、PpPoIAの配列に基づき相同性検索や局在解析などを行い、マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼを見出すことを目指した。その結果、マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼとして機能する可能性の高い配列を特定することに成功した。そして、試行錯誤の末、無細胞合成系を利用することによって当該配列の発現にも成功し

た。発現させたタンパク質の特性を検討した結果、驚くべきことに、その活性の発揮に二価鉄イオン (Fe^{2+}) が必要であることが判明した。即ち、他のDNAポリメラーゼと異なり、マグネシウムやマンガンなどの二価金属イオンではなく二価の鉄イオン要求性を示すという、予想し得ない特性が明らかとなった。この特性はミトコンドリア画分を用いた実験にもよっても確認された。

[0012] 以上の通り、本発明者らの検討によって、マラリア原虫ミトコンドリアDNAポリメラーゼの活性発揮に必須の条件が見出された。この成果により、本酵素の活性を *in vitro* で測定すること、即ち「本酵素の活性測定系の構築」が可能になった。当該活性測定系は研究用ツールとしてはもちろんのこと、抗マラリア化合物をスクリーニングするための手段としても利用できる。つまり、抗マラリア薬の開発に資する技術でもあり、その価値は計り知れない。尚、本酵素の特性を詳細に検討した結果、 Fe^{2+} に関する濃度依存性やpH依存性等、活性測定系を最適化する上で有益な知見も得られた。

[0013] 以下に列挙する本発明は主として上記成果に基づく。

[1] 以下のステップ(1)~(3)を含む、DNAポリメラーゼ活性測定法：

(1)二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼと、鋳型DNAと、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ；

(2)合成された二本鎖DNAを検出するステップ；

(3)ステップ(2)の検出結果より、前記DNAポリメラーゼの活性を算出するステップ。

[2] 前記ミトコンドリアDNAポリメラーゼが、配列番号1~7のいずれかの配列又は該配列の一部を改変した配列を含み且つDNAポリメラーゼ活性を示すタンパク質からなる、[1]に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[3] 前記ミトコンドリアDNAポリメラーゼが無細胞合成系で調製したタンパク質からなる、[1]又は[2]に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[4] 前記鋳型DNAが、活性化二本鎖DNA、又は一本鎖DNAや一種類のデオキ

シリボヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチド鎖とそれに相補的なプライマーとの組合せ、である、[1]～[3]のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[5] 二本鎖DNAの検出が、二本鎖DNA特異的な蛍光染色により行われる、[1]～[4]のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[6] 前記溶液の二価鉄イオン濃度が5mM～15mMである、[1]～[5]のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[7] 前記溶液のpHが7～8である、[1]～[6]のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[8] ミトコンドリアDNAポリメラーゼが50℃～90℃の温度条件で予め熱処理されている、[1]～[7]のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[9] ステップ(1)のインキュベートを被験物質の存在下で行うことを特徴とする、[1]～[8]のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[10] 以下のステップ(i)～(iii)を含む、抗マラリア化合物のスクリーニング法：

(i)被験物質の存在下、二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼと、鋳型DNAと、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ；

(ii)合成された二本鎖DNAを検出するステップ；

(iii)ステップ(ii)の検出結果に基づき被験物質の有効性を判定するステップであって、二本鎖DNA合成の阻害が認められることが有効性の指標となるステップ。

[11] 被験物質非存在下であること以外はステップ(i)と同一条件下でインキュベートしたサンプル（コントロール群）を用意し、該コントロール群についてのステップ(ii)の検出結果と比較してステップ(iii)における有効性

の判定を行う、[10]に記載のスクリーニング法。

[12] ステップ(iii)において有効性を認めた被験物質について、熱帯熱マラリア原虫の核内DNAポリメラーゼに対する阻害活性を評価するステップ、を更に含む、[10]又は[11]に記載のスクリーニング法。

[13] ステップ(iii)において有効性を認めた被験物質について、ヒトのDNAポリメラーゼに対する阻害活性を示さないことを確認するステップ、を更に含む、[10]～[12]のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1]マラリア原虫ミトコンドリアDNAポリメラーゼの活性測定法の一例。放射性同位体を利用して二本鎖DNAを検出する。また、没食子酸などを添加し、三価鉄を錯体化することで消光（クエンチング）を防止する。
- [図2]マラリア原虫ミトコンドリアDNAポリメラーゼの活性測定方法の一例。蛍光を利用して二本鎖DNAを検出する。
- [図3]マラリア原虫の生活環を示す図。下段の囲みは各ステージのマラリア原虫のギムザ染色像。
- [図4]マラリア原虫のオルガネラとオルガネラDNAの構造を示す図。
- [図5]PFF1225cの全長アミノ酸配列（配列番号1）を示す図。
- [図6]小麦胚芽無細胞系タンパク質発現システムの概略。
- [図7]小麦胚芽無細胞系タンパク質発現系を用いたタンパク質発現実験の結果。a. 発現を試みた領域、b. 発現後のタンパク質の抗His-tag抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果。*は予測される各領域のタンパク質のバンド。
- [図8]PFF1225c（C1フラグメント）を用いたイオン要求性の検討結果。
- [図9]PFF1225c（C1フラグメント）のポリメラーゼ活性の解析結果。a. 至適鉄イオン濃度を示すグラフ。b. 酵素の至適pHを示すグラフ。c. 酵素の熱安定性を示すグラフ。Fe²⁺濃度が5mMから15mMにかけて高い活性を示した（至適濃度は10mM）。また、pH7から8にかけて良好な活性を示した（至適pHは7.5）。一方、50℃～90℃で熱処理すると活性が上昇し、70℃の熱処理で最も活性

化した。

[図10]ヒトミトコンドリアDNAポリメラーゼ γ を用いたイオン要求性の検討結果。

[図11]PF1225c (C1フラグメント)を用いた阻害剤への感受性の検討結果。a. 各DNAポリメラーゼの阻害剤に対する感受性を示す表。b. アフィディコリン (Aphidicolin) に対する感受性を示すグラフ。c. NEMに対する感受性を示すグラフ。d. ddTTPに対する感受性を示すグラフ。

[図12]様々なDNAポリメラーゼのクロロキンへの感受性の検討結果。a. PF1225c (C1フラグメント)の感受性を示すグラフ。b. 真正粘菌ミトコンドリアDNAポリメラーゼ (PPpoLA)の感受性を示すグラフ。c. ヒトミトコンドリアDNAポリメラーゼ γ 感受性を示すグラフ。

[図13]様々なDNAポリメラーゼのスラミンへの感受性の検討結果。a. PF1225c (C1フラグメント)の感受性を示すグラフ。b. 真正粘菌ミトコンドリアDNAポリメラーゼ (PPpoLA)の感受性を示すグラフ。c. ヒトミトコンドリアDNAポリメラーゼ γ の感受性を示すグラフ。

[図14]マラリア原虫ミトコンドリア画分を用いたDNAポリメラーゼ活性の測定結果。

発明を実施するための形態

[0015] (用語)

上記の通り、本明細書中ではミトコンドリアDNAポリメラーゼのことを「mtDNAポリメラーゼ」と略称する。尚、特に言及することなく「mtDNAポリメラーゼ」と記載した場合には、マラリア原虫のmtDNAポリメラーゼを意味する。

[0016] 1. DNAポリメラーゼ活性測定法

本発明の第1の局面はマラリア原虫 (*Plasmodium* spp.) のミトコンドリアDNAポリメラーゼ (mtDNAポリメラーゼ) の活性測定法に関する。本発明の活性測定法はマラリア原虫のmtDNAポリメラーゼの研究用ツールとして有用である。また、当該mtDNAポリメラーゼに対して阻害活性を示す物質を探索する手段としても有用である。mtDNAポリメラーゼに対して阻害活性を示す物質は抗

マラリア薬として或いは抗マラリア薬のリード化合物としてその利用・応用が期待される。

[0017] 本発明の活性測定法では以下のステップ(1)~(3)を行う。

(1)二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼと、鋳型DNAと、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ

(2)合成された二本鎖DNAを検出するステップ

(3)ステップ(2)の検出結果より、前記DNAポリメラーゼの活性を算出するステップ

[0018] 本発明者らの検討によって、マラリア原虫のmtDNAポリメラーゼが二価鉄イオン要求性を示すことが明らかとなった。この知見に基づきステップ(1)では、反応液中に二価鉄イオンが存在する条件下で反応させる。この点が本発明の最大の特徴である。例えば、塩化鉄 (FeCl_2) や硫酸鉄 (FeSO_4) 等、二価鉄イオンを生成する化合物を添加、溶解することによって、当該条件を満たす反応液を用意できる。反応液中の二価鉄イオンの量、即ち反応液の二価鉄イオン濃度は、mtDNAポリメラーゼの活性化が生ずる限り、特に限定されない。但し、本発明者らの検討によってもたらされた知見に従えば（後述の実施例を参照）、二価鉄イオン濃度を5mM~15mMにするとよい。より好ましくは、二価鉄イオン濃度を約10mMとする。尚、測定誤差の低減や再現性の向上などを図るために、脱気水を使用するなどして反応液中の二価鉄イオンの酸化を防止することが望ましい。

[0019] 反応液には、二価鉄イオンの他、酵素反応の主体であるmtDNAポリメラーゼ、DNA合成の開始点を提供する鋳型DNA、DNA合成の基質（材料）が含まれることになる。以下、これら各要素について説明する。

[0020] (a) mtDNAポリメラーゼ

mtDNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼ活性を示す限り、完全長でなくてもよい。換言すれば、DNAポリメラーゼ活性に必要な領域を含む限り、部分配

列であってもよい。mtDNAポリメラーゼの配列の一例（PFF1225c）を配列表の配列番号1に示す。当該配列は公共のデータベースにおいてDNAポリメラーゼ I-likeタンパク質としてアノテーションされていた配列である（NCBI, Protein Database, DEFINITION:DNA polymerase 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]., ACCESSION: XP_966236）。当該アミノ酸配列をコードする塩基配列（遺伝子のコード領域）を配列番号8に示す。また、当該アミノ酸配列のDNAポリメラーゼドメイン（polAc）を含む部分配列の例を配列番号2～7に示す。これらの部分配列が対応する領域は以下の通りである。

配列番号2：配列番号1の配列の104番アミノ酸～1444番アミノ酸

配列番号3：配列番号1の配列の276番アミノ酸～1444番アミノ酸

配列番号4：配列番号1の配列の426番アミノ酸～1444番アミノ酸

配列番号5：配列番号1の配列の618番アミノ酸～1444番アミノ酸

配列番号6：配列番号1の配列の732番アミノ酸～1444番アミノ酸

配列番号7：配列番号1の配列の990番アミノ酸～1444番アミノ酸

[0021] 使用可能なmtDNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼ活性を示す限り、上記の例（配列番号1～7）に限定されるものではない。例えば、上記の例のいずれかの配列の一部を改変した配列からなり、DNAポリメラーゼ活性を示すもの（典型的にはpolAcを含むことになる）であれば、同様にmtDNAポリメラーゼとして使用可能である。ここでの「一部の改変」とは、アミノ酸配列を構成する1～数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1～数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変化が生ずることをいう。アミノ酸配列の変異の位置は特に限定されず、また、複数の位置で変異を生じていてもよい。ここでの複数とは、アミノ酸配列を構成する全アミノ酸の例えば10%以内に相当する数であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内に相当する数である。さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内に相当する数である。このような改変はpolAc以外の領域に対して施されることが好ましい。尚、polAc以外の領域が改変対象になる場合には、DNAポリメラーゼ活性への影響が小さい（或いは実質的にない）ことから、大幅な改変も許容される。

[0022] mtDNAポリメラーゼは、例えば、公知のタンパク質合成系を利用して調製することができる。但し、汎用的な大腸菌発現系を利用する場合には、大腸菌による当該タンパク質の発現が困難であったこと（後述の実施例を参照）を踏まえ、コドンの使用頻度を考慮した配列の調整・修正を施した上で発現させるとよい。mtDNAポリメラーゼの合成に利用可能なDNA配列（即ち、mtDNAポリメラーゼをコードするDNA）の具体例として、大腸菌での発現に最適化したDNA配列（配列番号6のアミノ酸配列に対応する）を配列番号9に示す。

[0023] 好ましくは無細胞合成系を利用してmtDNAポリメラーゼを調製する。本発明において無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）とは、生細胞を用いるのではなく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAやタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞合成系では一般に、細胞破碎液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したりボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

[0024] タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する3種類の開始因子、3種類の伸長因子、終結に関与する4種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルトRNAホルミル転移酵素からなる31種類の因子の遺伝子が大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

[0025] 用語「無細胞タンパク質合成系」は、無細胞転写／翻訳系、in vitro翻訳

系又はin vitro転写／翻訳系と交換可能に使用される。in vitro翻訳系ではRNAが鋳型として用いられてタンパク質が合成される。鋳型RNAとしては全RNA、mRNA、in vitro転写産物などが使用される。他方のin vitro転写／翻訳系ではDNAが鋳型として用いられる。鋳型DNAはリボソーム結合領域を含むべきであって、また適切なターミネータ配列を含むことが好ましい。尚、in vitro転写／翻訳系では、転写反応及び翻訳反応が連続して進行するように各反応に必要な因子が添加された条件が設定される。

[0026] 無細胞タンパク質合成系には以下の利点がある。まず第1に、生細胞を維持する必要がないため操作性が良好で系の自由度も高い。したがって、目的のタンパク質の性質に応じて様々な修正や修飾を施した合成系を設計することが可能となる。次に、細胞系の合成では使用する細胞に毒性のあるタンパク質の合成は基本的にできないが、無細胞系ではそのような毒性のタンパク質であっても生産することができる。さらに、多種類のタンパク質を同時にかつ迅速に合成できることからハイスループット化が容易である。生産されるタンパク質の分離・精製が容易であるという利点も備え、これはハイスループット化に有利に働く。加えて、非天然型のアミノ酸を取り込ませるなどして非天然型タンパク質を合成することも可能であるという利点も併せ持つ。

[0027] 現在広く利用されている無細胞タンパク質合成系には以下のものがある。即ち、大腸菌S30抽出液の系（原核細胞の系）、コムギ胚芽抽出液の系（真核細胞の系）、及びウサギ網状赤血球可溶化物の系（真核細胞の系）である。これらの系はキットとしても市販されており、容易に利用することが可能である。

[0028] 歴史的には大腸菌S30抽出液の系の開発が最も古く、この系を利用して様々なタンパク質の合成が試みられてきた。大腸菌30S画分は、大腸菌の集菌、菌体破碎、精製の工程を経て調製される。大腸菌30S画分の調製及び、無細胞転写・翻訳共役反応はPrattらの方法（Pratt, J. M.: Chapter 7, in “Transcription and Translation: A practical approach”, ed. by B. D. Hames &

S. J. Higgins, pp. 179-209, IRL Press, New York (1984)) やEllmanらの方法 (Ellman, J. et al.: *Methods Enzymol.*, 202, 301-336(1991)) を参考にすることができる。

[0029] コムギ胚芽抽出液の系は、高品質の真核生物タンパク質を効率的に合成できるという利点を有し、大腸菌S30抽出液の系では合成が困難な真核生物のタンパク質を合成する際によく利用される。最近になって、種子胚乳成分を洗浄除去した胚芽から抽出液を調製することによって高効率かつ安定な合成系が構築されることが報告され注目を集めている (Madin, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 559-564, 2000)。その後、高翻訳促進能を有するmRNA非翻訳配列、PCRを利用した多品目機能解析用のタンパク質合成法、専用高発現ベクターの構築などの技術開発が行われ (Sawasaki, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 14652-14657, 2002)、様々な分野への応用が期待されている。

[0030] コムギ胚芽抽出液は、コムギ胚芽をすり潰して遠心分離した後、上澄み液をゲルろ過で分離することによって得ることができる。翻訳反応については、Andersonらの方法 (Anderson, C. W. et al.: *Methods Enzymol.*, 101, 638-644(1983)) を参考にできる。改良法についても報告されており、例えば河原崎らの方法 (Kawarasaki, Y. et al.: *Biotechnol. Prog.*, 16, 517-521(2000)) やMadinらの方法 (Madin, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 559-564, 2000) 等を参考にできる。その他、コムギ胚芽抽出液の系についてはWO 00/68412 A1、WO 01/27260 A1、WO 2002/024939 A1、WO 2005/063979 A1、特開平6-7134号公報、特開2002-529531号公報、特開2005-355513号公報、特開2006-042601号公報、特開2007-097438号公報、特開2008-029203号公報等が参考になる。

[0031] ウサギ網状赤血球可溶化物の系はグロブリン生産に適する。ウサギ網状赤血球可溶化物は、ウサギにフェニルヒドラジンを数日間静脈注射して貧血状態とし、所定期間後 (例えば第8日目) に採血し、その後溶血させた液から超遠心分離処理などを経て得られる。ウサギ網状赤血球可溶化物の調製法は

、JacksonとHuntの方法（Jackson, R. J. and Hunt, T.: Methods Enzymol., 96, 50-74(1983)）を参考にして行うことができる。

[0032] 本発明の実施に際して利用できる無細胞合成系は上記のものに限られるものではなく、例えば大腸菌以外のバクテリアやコムギ以外の植物の抽出液、昆虫由来の抽出液、動物細胞由来の抽出液、又はゲノム情報を基に構築した系などを利用してよい。

[0033] ここで、無細胞合成系を利用してmtDNAポリメラーゼを合成する際に利用可能なDNA配列（即ち、mtDNAポリメラーゼをコードするDNA）の具体例として、コムギ胚芽抽出液の系用に最適化したDNA配列（配列番号6のアミノ酸配列に対応する）を配列番号10に示す。最適化によって1.5~2倍程度の発現量の増大が認められた。

[0034] ところで、後述の実施例に示す通り、mtDNAポリメラーゼのpH依存性を検討した結果、pH7から8にかけて活性のピークを示した（至適pHは7.5）。そこで、反応液のpHを好ましくはpH7~8、更に好ましくは約7.5にするとよい。

[0035] また、後述の実施例に示す通り、mtDNAポリメラーゼを熱処理することによってその活性が向上するという驚くべき現象を認めた。この知見に基づき本発明の一態様では、50℃~90℃の温度条件で予め熱処理されているmtDNAポリメラーゼを使用する。熱処理の温度条件は更に好ましくは60℃~80℃であり、最も好ましくは約70℃である。熱処理の時間は例えば1分~1時間、好ましくは2分~30分、更に好ましくは3分~15分である。このようにして活性を高めたmtDNAポリメラーゼを使用することは測定感度の向上、測定時間の短縮化、酵素使用量の低減等の効果をもたらす。尚、熱処理の温度が低すぎたり処理時間が短すぎたりすれば所望の効果を十分に発揮できない。逆に熱処理の温度が高すぎたり処理時間が長すぎたりすれば酵素の失活を招くおそれがある。

[0036] (b) 鋳型DNA

鋳型DNAはDNA合成の開始点を提供する。簡便性を担保しつつ精度ないし信頼性の高い測定を実現できる鋳型DNAを用いるとよい。当該条件を満足する鋳

型DNAとして活性化二本鎖DNAを例示できる。活性化二本鎖DNAとは、適当なDNA（サケ精子DNA、ウシ胸腺DNAなど）を処理し、ニック（切れ目）を入れたものである。活性化にはデオキシリボヌクレアーゼⅠ処理、熱処理、ソニケーションなどが用いられる。好適な鋳型DNAのもう一つの例は、一本鎖DNAに適当な長さのプライマーをアニーリングさせるものである。具体例として、一種類のデオキシリボヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチド鎖（例えばポリアデニル酸）とそれに相補的なプライマー（例えばオリゴ(dT)プライマー）との組合せ挙げられる。本明細書では、以上の2つの例に代表されるように、二本鎖DNA鎖の合成開始点を提供する材料を包括的に「鋳型DNA」と表現する。

[0037] (c) DNA合成の基質（材料）

DNA合成の基質にはデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体を用いられる。使用する鋳型DNAに対応する基質を用意する。例えば、活性化二本鎖DNAを鋳型DNAとした場合には、原則として、デオキシアデノシン三リン酸（dATP）又はその誘導体、デオキシシチジン三リン酸（dCTP）又はその誘導体、デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）又はその誘導体、及びチミジン三リン酸（dTTP）又はその誘導体の4種類の基質を併用する。他方、一種類のデオキシリボヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチド鎖とそれに相補的なプライマーを鋳型DNAとした場合には、原則として、鋳型となるポリヌクレオチド鎖と呼応する、一種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はその誘導体を用いる。例えば、ポリアデニル酸とオリゴ(dT)プライマーを採用した場合にあっては、基質にはデオキシグアノシン三リン酸（dGTP）又はその誘導体を用いられる。

[0038] ここでの「誘導体」は、通常デオキシリボヌクレオシド三リン酸と同様にDNAポリメラーゼの基質として利用され、二本鎖DNA鎖の合成・伸長を生じさせるものであれば特に制約はない。放射性同位体（³H、³²P等）や蛍光物質（CyTM 3、CyTM 5、Texas Red（登録商標）、フルオレセイン等）による標識化、保護基の導入、又は特定の原子団の置換などによって誘導体化されたデオキ

シリボヌクレオシド三リン酸を「デオキシシリボヌクレオシド三リン酸誘導体」として用いることができる。

[0039] 本発明の一態様では、二本鎖DNA鎖の合成の際（即ちステップ(1)において）に標識化も同時に行う。例えば、基質の一つとして放射性同位体（ ^3H 、 ^{32}P 等）や蛍光物質（CyTM 3、CyTM 5、Texas Red（登録商標）、フルオレセイン等）により標識されたデオキシシリボヌクレオシド三リン酸を用い、当該標識化デオキシシリボヌクレオシド三リン酸を取り込ませることによって、標識化された二本鎖DNAが合成されるようにする。この態様の場合、取り込ませた標識を利用して二本鎖DNAを検出することになる。

[0040] ステップ(1)のインキュベートの条件は、mtDNAポリメラーゼが活性を示し、且つ検出可能なレベルの二本鎖DNAが合成される限りにおいて、特に限定されない。当業者であれば予備実験などを通して適切なインキュベート条件を設定可能である。インキュベート条件の例を示すと30°C~40°Cで5分~6時間である。好ましくは、35°C~40°Cで10分~3時間、更に好ましくは約37°Cで15分~1時間の条件とする。

[0041] ステップ(2)では、合成された二本鎖DNAを検出する。通常、反応を停止後、合成された二本鎖DNAを検出する。但し、積極的な反応の停止は必須ではない。経時的な検出やリアルタイム検出を行うことにしてもよい。mtDNAポリメラーゼが二価鉄イオン要求性であることから、反応を停止させるためには例えばキレート剤の添加が有効である。もっとも、合成された二本鎖DNAの検出に影響を与えない限り、他の手段により反応を停止させることにしてもよい。

[0042] ここでの検出には各種方法を用いることができる。例えば、後述の実施例に示した二つの方法、即ち放射性同位体を利用した方法と蛍光を利用した方法を採用可能である。前者の場合、二本鎖DNAの合成の際（即ちステップ(1)）に放射性同位体標識したデオキシシリボヌクレオシド三リン酸を取り込ませることにし、放射性同位体の取込量を液体シンチレーションカウンター等で計測する。他方、蛍光を利用した方法では、例えば、二本鎖DNA特異的な蛍光

物質を添加することによって、合成された二本鎖DNAを蛍光染色し、蛍光量を蛍光リーダー等で測定する。二本鎖DNA特異的な蛍光物質の例としてPicoGreen（登録商標）、SYBR Green I（登録商標）、等を挙げることができる。尚、二本鎖DNAの合成の際（即ちステップ(1)）に蛍光標識したデオキシリボヌクレオシド三リン酸を取り込ませ、蛍光標識された二本鎖DNAが合成されるようにしてもよい。即ち、二本鎖DNAの合成と同時に蛍光標識化を行うことにしてもよい。

[0043] ところで、インキュベート条件や測定条件にもよるが、ステップ(1)の際に反応液中の二価鉄が酸化により三価鉄となり、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の沈澱が生ずるおそれがある。当該沈澱の形成は、消光（クエンチング）を引き起こし、計測の支障となる。そこで、このような問題を回避すべく、反応液中に没食子酸等を添加し、三価鉄を錯体化しておくともよい。

[0044] ステップ(3)では、ステップ(2)の検出結果を用いてmtDNAポリメラーゼの活性を算出する。典型的には、検出値からmtDNAポリメラーゼ活性を定量することになるが、半定量的又は定性的な判断をすることにしてもよい。

[0045] 本発明の一態様では、ステップ(1)のインキュベートを被験物質の存在下で行うことにし、ステップ(3)で算出した活性値に基づき、被験物質がmtDNAポリメラーゼの活性に与える影響を判定する。換言すれば、mtDNAポリメラーゼ活性に対する被験物質の作用・効果を評価する。例えば被験物質を添加したことによってmtDNAポリメラーゼ活性の低下を認めれば、mtDNAポリメラーゼに対する阻害作用を被験物質が有すると判断できる。これとは逆に被験物質の添加がmtDNAポリメラーゼ活性の上昇をもたらしたのであれば、被験物質にmtDNAポリメラーゼの活性促進作用があると判断できる。このように本発明の活性測定法は、mtDNAポリメラーゼ活性に対する被験物質の作用・効果を評価する上で有用である。本発明の活性測定法の利用形態の一つとして、この点に注目したスクリーニング法を後述する。

[0046] 以上の説明において特に言及しないその他の条件（その他の成分、反応条件）については、DNAポリメラーゼの反応に一般的なものを採用すればよい。

この点に関して、例えば、例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) 等が参考になる。尚、ステップ(1)における反応液中のmtDNAポリメラーゼの使用量、鋳型DNAの使用量、基質の使用量などは、活性測定法の使用目的や他の条件などを考慮して設定することができる。当業者であれば、DNAポリメラーゼの一般的な反応条件や過去の報告を参照すること、或いは予備実験を行うなどして、各々について適切な使用量を決定することができる。以下に使用量の例を示す。

mtDNAポリメラーゼ : $5 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$

鋳型DNA : $50 \mu\text{g/ml} \sim 5000 \mu\text{g/ml}$ (活性化DNAを使用する場合)、 $0.1 \text{nM} \sim 10 \text{nM}$ (ポリヌクレオチド鎖と相補的プライマーを使用する場合)

基質 : $1 \text{mM} \sim 1.6 \text{mM}$ (総量)

[0047] 2. 抗マラリア化合物のスクリーニング法

本発明の第2の局面は抗マラリア化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明のスクリーニング法によって選抜された化合物は抗マラリア薬の有効成分或いはリード化合物として有望である。本発明のスクリーニング法では以下のステップ(i)~(iii)を行う。

(i)被験物質の存在下、二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼと、鋳型DNAと、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ

(ii)合成された二本鎖DNAを検出するステップ

(iii)ステップ(ii)の検出結果に基づき被験物質の有効性を判定するステップであって、二本鎖DNA合成の阻害が認められることが有効性の指標となるステップ

[0048] ステップ(i)及び(ii)は被験物質を使用すること以外、本発明の活性測定法のステップ(1)及び(2)とそれぞれ同一であるため、その詳細な説明は省略す

る。被験物質としては様々な分子サイズの有機化合物又は無機化合物を用いることができる。有機化合物の例として、核酸、ペプチド、タンパク質、脂質（単純脂質、複合脂質（ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、グリコシルグリセリド、セレブロシド等）、プロスタグランジン、イソプレノイド、テルペン、ステロイド、ポリフェノール、カテキン、ビタミン（B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、A、D、E等）を例示できる。被験物質は天然物由来であっても、或いは合成によるものであってもよい。後者の場合には例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なスクリーニング系を構築することができる。尚、植物抽出液、細胞抽出液、培養上清などを被験物質として用いてもよい。また、既存の薬剤を被験物質としてもよい。2種類以上の被験物質を同時に添加することにより、被験物質間の相互作用、相乗作用などを調べることにしてもよい。

[0049] ステップ(iii)ではステップ(ii)の検出結果に基づき被験物質の有効性を判定する。そして、当該判定結果に基づき有効な被験物質が選抜される。本発明では、被験物質が有効であることの指標として「二本鎖DNA合成の阻害が認められること」を採用する。即ち、二本鎖DNA合成を阻害していることを認められた場合に被験物質は有効であると判定し、二本鎖DNA合成を阻害していることを認めない場合に被験物質は有効でないとして判定する。複数の被験物質を用いた場合には、阻害の程度に基づき、各被験物質の有効性を比較評価することができる。

[0050] 通常は、比較対象として、被験物質非存在下（その他の条件はステップ(i)と同一とする）でインキュベートした群（コントロール群）を用意し、それに対する検出（ステップ(ii)）も並行して行う。そして、当該コントロール群の検出結果と試験群の検出結果を比較することによって、二本鎖DNAの合成を被験物質が阻害したか判断する。このようにコントロール群との比較によって被験物質の有効性を判定すれば、より信頼性の高い判定結果が得られる。試験群及びコントロール群のサンプル数は特に限定されない。一般に使用するサンプルが多くなるほど信頼性の高い結果が得られるが、多数のサン

ルを同時に取り扱うことは主に操作の面で困難を伴う。そこで例えば各群に含まれるサンプル数を1～50、好ましくは2～30、さらに好ましくは3～20とする。

[0051] ステップ(iii)において有効性を認めた被験物質について、マラリア原虫の核内DNAポリメラーゼ（DNAポリメラーゼ α 、DNAポリメラーゼ β など）に対する阻害活性の有無及び／又は程度を評価することにしてもよい。この追加のステップの結果として核内DNAポリメラーゼに対しては阻害活性を示さないことが判明した場合、mtDNAポリメラーゼに対する特異性が高い物質であると評価できる。このように評価された被験物質はmtDNAに標的を絞った抗マラリア薬の有効成分又はリード化合物として有望といえる。一方、核内DNAポリメラーゼに対しても阻害活性を示すことが判明した被験物質には、mtDNAポリメラーゼのみならず核内DNAポリメラーゼをも標的とした薬効を期待できる。このように、上記ステップを追加することによって、抗マラリア薬の開発・実用化にとって有益な情報がもたらされる。

[0052] 一方、その毒性を評価するために、ステップ(iii)において有効性を認めた被験物質について、ヒトのDNAポリメラーゼに対する阻害活性を示さないことを確認することにしてもよい。

[0053] 本発明のスクリーニング方法によって選択された物質が十分な薬効を有する場合には、当該物質をそのまま抗マラリア薬の有効成分として使用することができる。一方で十分な薬効を有しない場合には化学的修飾などの改変を施してその薬効を高めた上で、抗マラリア薬の有効成分として使用することができる。勿論、十分な薬効を有する場合であっても、更なる薬効の増大を目的として同様の改変を施してもよい。

実施例

[0054] マラリア原虫のミトコンドリアDNA複製機構を解明することを目指し、ミトコンドリアDNAポリメラーゼの特性を詳細に検討した。

[0055] 1. 方法

(1) PFF1225cの全長クローニング

熱帯熱マラリア原虫の細胞株3D7は既報の方法 (Trager W and Jensen JB, Science. 1976 Aug 20;193(4254):673-675.)を一部変更して踏襲し、ヒト赤血球内で培養した。トロホゾイト期のマラリア原虫を回収し、RNeasy(QIAGEN)を用いて全RNAを抽出した。その後、GeneRacer™ (Invitrogen)を用いてcDNAを作製した。3' race、5' race法を用い、PFF1225cの全長配列 (4335 bp, A CCESSION (GenBank)XM_961143, DEFINITION Plasmodium falciparum 3D7 DNA polymerase 1, putative (PFF1225c) mRNA, complete cds.) (配列番号 8) をクローニングした。

[0056] (2) 小麦胚芽無細胞発現系を用いた組換えタンパク質の発現・精製

小麦胚芽無細胞発現は(株)セルフリーサイエンス社のENDEXT(登録商標) Wheat Germ Expression H Kitを用いて行った。

[0057] (2-1) 発現ベクターの作成

PFF1225cのDNAポリメラーゼドメイン (polAc)を含む様々な長さの部分配列 (A1: 104-1444 a.a (配列番号2)、A2: 276-1444 a.a (配列番号3)、B1: 426-1444 a.a (配列番号4)、B2: 618-1444 a.a (配列番号5)、C1: 732-1444 a.a (配列番号6)、C2: 990-1444 a.a (配列番号7))を小麦胚芽無細胞発現系のベクター (pEU-E01-His-TEV-MCS-N3: 図6)のBamHI/HindIIIサイトにフレームが合うようにして挿入した。LB液体培地600ml分を集菌し、QIAGEN plasmid Plus Midi kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。この際、キットに添付されているRNaseは添加せずに精製を行った。その後、イソプロパノール沈殿し、TEに懸濁した。

[0058] (2-2) 転写反応

精製したベクター120 μ g、5 \times 転写バッファー 240 μ l、25mM NTPs 120 μ l、80 U/ μ l RNaseインヒビター15 μ l、80 U/ μ l SP6ポリメラーゼ15 μ lを混合し、milliQ水でトータル1200 μ lに調整し、37 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで6時間インキュベートした。反応終了後は室温に静置した。

[0059] (2-3) 翻訳反応

翻訳反応は6穴プレートで行わせた。上層液のSUB-AMIX(登録商標)(翻訳

基質)を4.4mlずつ各穴に分注し、その後、下層液400.4 μ lを、液面を乱さないよう静かに重層した。下層液はmRNA 200 μ l、40mg/mlクレアチンキナーゼ0.4 μ l、WEG (小麦胚芽抽出液) 200 μ lを混合した。乾燥を防ぐためにシールで蓋をし、17°Cインキュベーター内で16時間インキュベートした。合成終了後、穏やかにピペティングし、全量をチューブに移した。

[0060] (2-4) His-tag精製

翻訳反応産物である総タンパク質 (4.8ml) に、イミダゾール (pH8.0) を20mMの濃度で添加してよく混合した。8000 rpm、4°Cで20分間遠心した後に上清を分取し、そこに50 μ lのNi-ビーズ(Ni-NTA Superflow, QIAGEN)を加えて穏やかに16時間攪拌した。その後、4000 rpm、4°C、5分間の遠心分離を行って上清を取り除き、0.5mlの洗浄バッファー(20mMリン酸バッファー、30mMイミダゾール、300mM NaCl)で2回Ni-ビーズを洗浄し、最後に50 μ lの溶出バッファー(20mMリン酸バッファー、500mMイミダゾール、300mM NaCl)で3回溶出した。各溶出画分は、透析バッファー(50mM Tris-HCl(pH 7.5)、10%グリセリン、1mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、0.1% NP-40)で12時間透析を行い、イミダゾールを除去した。

[0061] (3) RIを用いたDNAポリメラーゼ活性測定

反応液は50mM Tris-HCl、0.5mM dATP, dGTP, dCTP、50 μ M dTTP、活性化DNA (0.5 μ g/ml)、0.8 μ M [³H]dTTP (Moravek社:(MT-781)Thymidine 5'-triphosphate, tetrasodium salt, [methyl-³H])を加え、そこにさらに各濃度の酵素溶液、金属イオン、阻害剤等を加えた(総量10 μ l)。10 μ lあたり、0.1 μ gのC1フラグメントを加えることとした。混合した反応液は37°Cで30分間インキュベートした後にろ紙に吸着、乾燥させ、5%Na₂HPO₄で4回洗浄した後に(各10分間)、蒸留水(DW)で2回洗浄し(各5分間)、最後に100%エタノールで5分間振とうした。その後ろ紙を乾燥させ、乾燥したろ紙を4mlのトルエンカクテルの入ったバイアル瓶に入れ、液体シンチレーションカウンターで、³Hの取り込み量を測定した。

[0062] (4) 鉄イオンを添加した場合のRIを用いたDNAポリメラーゼ活性測定 (図1

)

液体シンチレーションカウンターでDNA鎖に取り込まれた³H量を測定する場合に、鉄イオンの色素がクエンチングをおこし、正確な測定ができない。クエンチングには化学消光、酸素消光、および着色消光の3種類があり、液体シンチレーションカウンターの計数効率が低下する。軟β線である³Hの場合に特に問題となり、鉄イオンの場合には着色消光が問題となる。そこで、鉄と錯体を形成する没食子酸を用い、紫色の錯体である没食子酸鉄を形成させた。その結果、消光クエンチングを大幅に減少させることができた。以下に、鉄イオンを添加した場合のプロトコールを示す。

[0063] 反応液は50mM Tris-HCl、0.5mM dATP, dGTP, dCTP、50 μM dTTP、活性化DNA (0.5 μg/ml)、0.8 μM [³H]dTTP (Moravek社:(MT-781)Thymidine 5'-triphosphate, tetrasodium salt, [methyl-³H])、10mM FeCl₂を加え、総量9 μlとした。鉄の酸化を防ぐために、反応液を窒素ガスに30分間さらし、脱気した。反応液9 μlあたり、1 μl(0.1 μg)のC1フラグメントを加えることとした。混合した反応液は37°Cで30分間インキュベートした後に、反応液と等量10 μlの1% 没食子酸を加えてよく懸濁し没食子酸鉄を形成させた。その後、全量をろ紙に吸着、乾燥させ、5%Na₂HP0₄で10回洗浄(合計で30分間)した後に、蒸留水(DW)で2回洗浄し(各5分間)、最後に100%エタノールで5分間振とうした。その後、ろ紙を乾燥させ、乾燥したろ紙を4mlのトルエンカクテルの入ったバイアル瓶に入れ、液体シンチレーションカウンターで、³Hの取り込み量を測定した。

[0064] (5) PicoGreen (登録商標) を用いたDNAポリメラーゼ活性測定 (図2)

反応液は50mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM dTTP、40nM PolydA-dT12、10mM FeCl₂を加え脱気した蒸留水(DW)で総量20 μlとした。そこにC1フラグメント(0.2 μgタンパク質/μl)を5 μl加え、37°Cで30分間インキュベートした。インキュベーション後、100mM EDTA 10 μlを加えることで鉄イオンをキレートし、反応を停止させた。DNAポリメラーゼにより合成されたDNA量を定量するために、二本鎖DNAに特異的に結合するPicoGreen (登録商標) (Molecular Probes

)を用いた。96穴プレート上でTEで1/200希釈したPicoGreen (登録商標) 200 μ lと上記の反応産物10 μ lを混合し、CytoFluor (登録商標) Multi Well Plate Reader series 4000 (Applied Biosystems)を用い、励起波長 (Ex) :485 /20、蛍光波長 (Em) :530/25の条件で測定した。

[0065] 2. 結果

(1) マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼの同定

動物でこれまでに見つかっているミトコンドリアDNAポリメラーゼはDNAポリメラーゼ γ (pol γ)のみである。しかし、植物や藻類でpol γ のホモログは見出されていなかった。近年、高等植物であるイネ、アラビドプシス、タバコや紅藻から大腸菌のDNAポリメラーゼI(polI)に類似したDNAポリメラーゼが同定された (Christensen et al. Plant Cell. 17(10):2805-2816 2005, Kimura et al. Nucleic Acids Res. 1;30(7):1585-1592 2002, Mori et al. Biochem Biophys Res Commun. 19;334(1):43-50. 2005, Ono et al. Plant Cell Physiol. 48(12):1679-1692. 2007)。これらの酵素は色素体とミトコンドリアの両方に局在し、酵素活性をもつことが分かった。また、当研究室においても原生動物である真正粘菌(Physarum polysepharum)からDNAポリメラーゼIに類似したミトコンドリアDNAポリメラーゼ(PpPolA)が同定された。PpPolAは、最もDNAポリメラーゼIに類似しており、原始的なミトコンドリアDNAポリメラーゼであることが予想された。

[0066] そこで、PpPolAの配列を用いてマラリア原虫のデータベースであるPlasmoDBでBLAST検索を行った。その結果、相同性の高い配列として、PF14_0112、PFF1225c、PFB0180wが得られた。これらの配列のドメイン構造をPROSITEなどの複数のサイトで予測したところ、DNAポリメラーゼドメインをもつ配列はPF14_0112、PFF1225cの二つであった。そのうちの一つ、PF14_0112はアピコプラストDNAポリメラーゼとしてすでに報告が既になされていた(Seow et al. Molecular & Biochemical Parasitology 141:145-153 2005)。一方、PFF1225cは、DNAポリメラーゼI-likeタンパク質としてアノテーションされていたが、その機能などは解析されていない。マラリア原虫の細胞内局在予測サイトであ

るPlasMitを用いて解析した結果、ミトコンドリアに局在することが予測された。さらに、実際にGFPを用いた解析でもミトコンドリアに局在することが示された。よって、PFF1225cはミトコンドリアDNAポリメラーゼとして働く可能性が高いと予想された。

[0067] (2) 小麦胚芽無細胞発現系をもちいたPFF1225c組換えタンパク質の発現

熱帯熱マラリア原虫のcDNAを用いて、PFF1225cの全長をクローニングした結果、1444アミノ酸からなるタンパク質であることがわかった(図5)。また、相同性検索により、C末端側(1126-1335a.a)にDNAポリメラーゼドメイン(polAc)を含むDNAポリメラーゼIに類似したタンパク質であることもわかった。

[0068] 実際に、PFF1225cがDNAポリメラーゼ活性を保持しているか否かを確認するために、大腸菌を用いてPFF1225c組換えタンパク質の発現を試みた。しかし、大腸菌系では発現させることができなかった。そこで、マラリア原虫のタンパク質を効率よく発現することが報告されている、小麦胚芽無細胞発現系を用いて発現を試みた(図6)。PFF1225cのDNAポリメラーゼドメイン(polAc)を含む様々な長さの部分配列(A1:104-1444a.a(配列番号2)、A2:276-1444 a.a(配列番号3)、B1:426-1444 a.a(配列番号4)、B2:618-1444 a.a(配列番号5)、C1:732-1444 a.a(配列番号6)、C2:990-1444 a.a(配列番号7))を、小麦胚芽無細胞発現系で発現させた結果、すべての組換えタンパク質が可溶化画分に確認できた(図7)。特に、C1の発現量が高かったための、以降の解析にはC1を用いることにした。

[0069] (3) 小麦胚芽無細胞発現系で作製したタンパク質を用いたDNAポリメラーゼ活性の測定

一般的に、DNAポリメラーゼはマグネシウムやマンガンなどの二価金属イオンが活性に必要である。まずPFF1225cの金属イオン要求性を明らかにするために、さまざま二価金属イオン(10mM)を用いて酵素活性を ^3H dTTPの取り込みで測定した。真正粘菌のミトコンドリアDNAポリメラーゼ(PpPolA)では、通常報告されているように Mg^{2+} イオン添加時にのみ高い活性が見られたが、PFF1

225cにおいては、 Mg^{2+} イオン添加では全く活性が見られず、 Fe^{2+} イオンを添加したときのみ高い活性がみられた（図8）。また、二価鉄イオン濃度は10mMのときに最大の活性を示した（図9 a）。このような Fe^{2+} イオン添加によるDNAポリメラーゼの活性化は、ヒトのミトコンドリアDNAポリメラーゼ γ を用いてアッセイしたときも観察されなかったことから（図10）、マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼに特徴的な性質であるといえる。さらに、至適pHの検討を行った結果、pH7.5で最大の活性を示した（図9 b）。

[0070] 次に、酵素の熱耐性を調べるために、酵素溶液をあらかじめ各温度で5分間プレインキュベートした後に、氷冷してから通常通りのDNAポリメラーゼ活性の測定を行った。その結果、非常に興味深いことに、酵素は90°Cの熱処理でも失活せず、むしろ熱処理によって活性が上昇し、70°Cの熱処理で最大の活性を示した（37°Cで処理した場合と比較して、約3倍高い）（図9 c）。

[0071] さらに、DNAポリメラーゼの阻害剤に対する感受性について検討した（図11）。まず、細胞核のDNAポリメラーゼ α の特異的阻害剤であるアフィディコリンを10~100 μ Mの濃度で加えた場合、活性はほとんど低下しなかった（図11 b）。また、DNAポリメラーゼ γ の阻害剤であるNEMとddTTPについてもその感受性を調べたところ、NEMの場合、高濃度存在下でも、ほとんど活性は低下しなかった（図11 c）。また、ddTTPの場合、DNAポリメラーゼ γ では50~100mMでほとんどその活性が阻害されてしまうことが報告されているが、PFF1125cでは、濃度が上昇するに従って弱い阻害効果がみられるが、400mMまで濃度を高くしても50%までにしか活性は低下しなかった（図11 d）。このような、阻害剤への感受性は、これまでに報告されている粘菌や植物のミトコンドリアDNAポリメラーゼと類似しており、DNAポリメラーゼ γ とは異なっていることがわかった。

[0072] 次に、マラリア原虫のアピコプラストDNAポリメラーゼ（POMI / Pfpex）の阻害剤として報告されているクロロキンとスラミンに対する感受性について調べた。クロロキンとスラミンは、それぞれマラリアやトリパノゾーマの治療薬として使われており、クロロキンは、マウスのDNAポリメラーゼ α やDN

Aポリメラーゼ γ の活性は阻害しないことが既に報告されている。まず、クロロキンのDNAポリメラーゼ活性への阻害作用を調べたところ、ヒトのDNAポリメラーゼ γ や真正粘菌のPpPolAでは阻害効果は見られなかったが、PFF1225cの活性を阻害した(図12)。また、スラミンは、さまざまなDNAポリメラーゼと非特異的に結合し、その活性を阻害することが報告されているが、PFF1225cの活性も阻害した(図13)。

[0073] (4) マラリア原虫ミトコンドリア粗画分のDNAポリメラーゼ活性の測定

上記の解析により、小麦胚芽無細胞発現系により作製したPFF1225cは、 Mg^{2+} イオン存在下でDNA合成活性を示さず、 Fe^{2+} イオン添加により活性を示すことが判明した。しかし、2000年にCharavalitshewinkoon-Permitrらは、マラリア原虫から粗精製したミトコンドリア画分を用いた解析では、 Mg^{2+} イオン存在下でDNA合成活性があることを報告している(Charavalitshewinkoon-Permitr et al., Parasitology International 49 279-288 2000.)。その解析のミトコンドリア画分にはアピコプラストが混入していることも考えられ、 Mg^{2+} イオン要求性であるアピコプラストDNAポリメラーゼの活性を測定してしまった可能性がある。そこで、アピコプラストの混入のないミトコンドリア画分を調製し、DNAポリメラーゼ活性を測定した。その結果、ミトコンドリア画分においても Mg^{2+} イオン存在下でDNA合成活性は見られず、 Fe^{2+} イオン添加時にのみ活性が見られることが分かった(図14)。

[0074] (5) コドンの最適化

最大の発現量を示したC1について、コドンを最適化したDNA配列(配列番号10)を使用して発現させた。結果、1.5~2倍程度の発現量の増大が認められた(データ示さず)。尚、大腸菌発現系を利用した場合には、コドンの最適化(最適化したDNA配列を配列番号9に示す)によって産生効率の飛躍的な向上を認めた(データ示さず)。

[0075] 3. まとめ

以上の通り、無細胞発現系の利用によってマラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼの発現に成功するとともに、当該DNAポリメラーゼが Fe^{2+} 要求

性であることを明らかにした。また、Fe²⁺に関する濃度依存性やpH依存性等、当該DNAポリメラーゼの活性測定に有益且つ重要な知見が得られた。

産業上の利用可能性

[0076] 本発明の活性測定法は例えば抗マラリア活性を示す化合物の探索に有用である。また、マラリア原虫のmtDNAポリメラーゼの研究用のツールとしても有用である。

[0077] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

- [請求項1] 以下のステップ(1)～(3)を含む、DNAポリメラーゼ活性測定法：
(1)二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼと、鋳型DNAと、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ；
(2)合成された二本鎖DNAを検出するステップ；
(3)ステップ(2)の検出結果より、前記DNAポリメラーゼの活性を算出するステップ。
- [請求項2] 前記ミトコンドリアDNAポリメラーゼが、配列番号1～7のいずれかの配列又は該配列の一部を改変した配列を含み且つDNAポリメラーゼ活性を示すタンパク質からなる、請求項1に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。
- [請求項3] 前記ミトコンドリアDNAポリメラーゼが無細胞合成系で調製したタンパク質からなる、請求項1又は2に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。
- [請求項4] 前記鋳型DNAが、活性化二本鎖DNA、又は一本鎖DNAや一種類のデオキシリボヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチド鎖とそれに相補的なプライマーとの組合せ、である、請求項1～3のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。
- [請求項5] 二本鎖DNAの検出が、二本鎖DNA特異的な蛍光染色により行われる、請求項1～4のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。
- [請求項6] 前記溶液の二価鉄イオン濃度が5mM～15mMである、請求項1～5のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。
- [請求項7] 前記溶液のpHが7～8である、請求項1～6のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。
- [請求項8] ミトコンドリアDNAポリメラーゼが50℃～90℃の温度条件で予め熱処理されている、請求項1～7のいずれか一項に記載のDNAポリメラ

ーゼ活性測定法。

[請求項9] ステップ(1)のインキュベートを被験物質の存在下で行うことを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項に記載のDNAポリメラーゼ活性測定法。

[請求項10] 以下のステップ(i)～(iii)を含む、抗マラリア化合物のスクリーニング法：

(i)被験物質の存在下、二価鉄イオンと、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアDNAポリメラーゼと、鋳型DNAと、及び一種又は二種以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸又はデオキシリボヌクレオシド三リン酸誘導体と、を含む溶液をインキュベートするステップ；

(ii)合成された二本鎖DNAを検出するステップ；

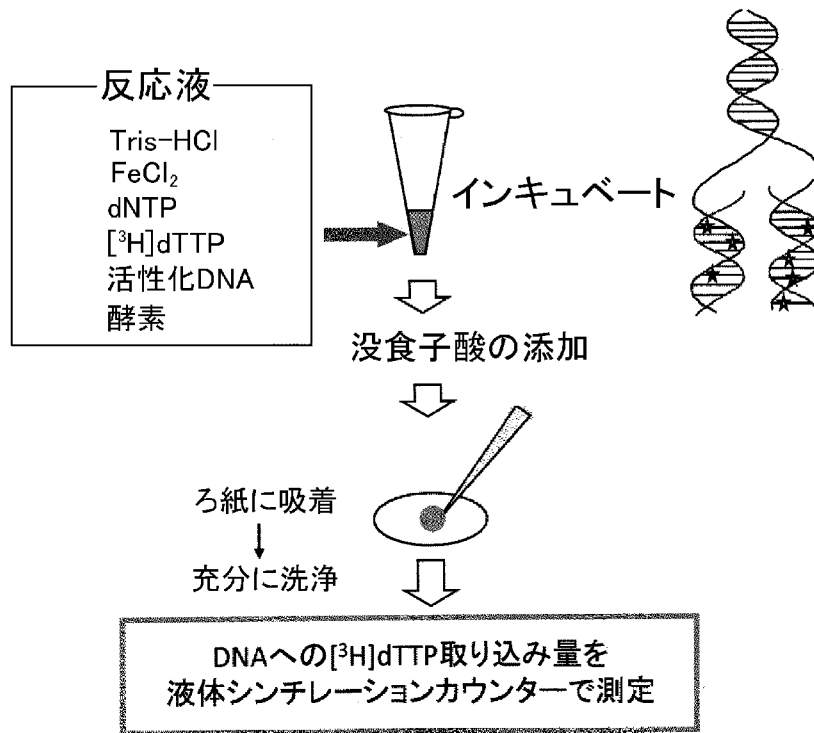
(iii)ステップ(ii)の検出結果に基づき被験物質の有効性を判定するステップであって、二本鎖DNA合成の阻害が認められることが有効性の指標となるステップ。

[請求項11] 被験物質非存在下であること以外はステップ(i)と同一条件下でインキュベートしたサンプル（コントロール群）を用意し、該コントロール群についてのステップ(ii)の検出結果と比較してステップ(iii)における有効性の判定を行う、請求項10に記載のスクリーニング法。

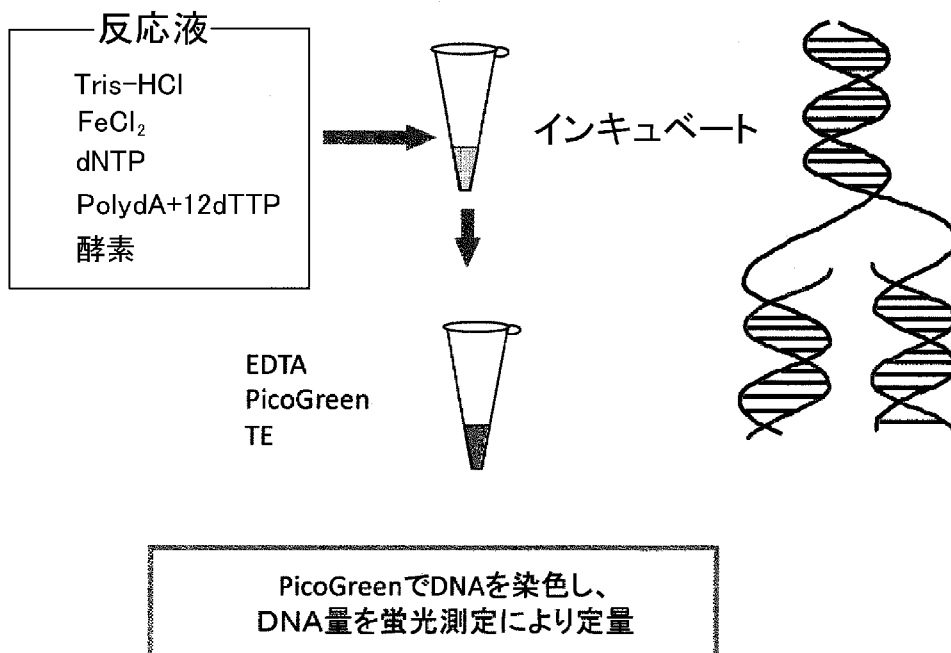
[請求項12] ステップ(iii)において有効性を認めた被験物質について、熱帯熱マラリア原虫の核内DNAポリメラーゼに対する阻害活性を評価するステップ、を更に含む、請求項10又は11に記載のスクリーニング法。

[請求項13] ステップ(iii)において有効性を認めた被験物質について、ヒトのDNAポリメラーゼに対する阻害活性を示さないことを確認するステップ、を更に含む、請求項10～12のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

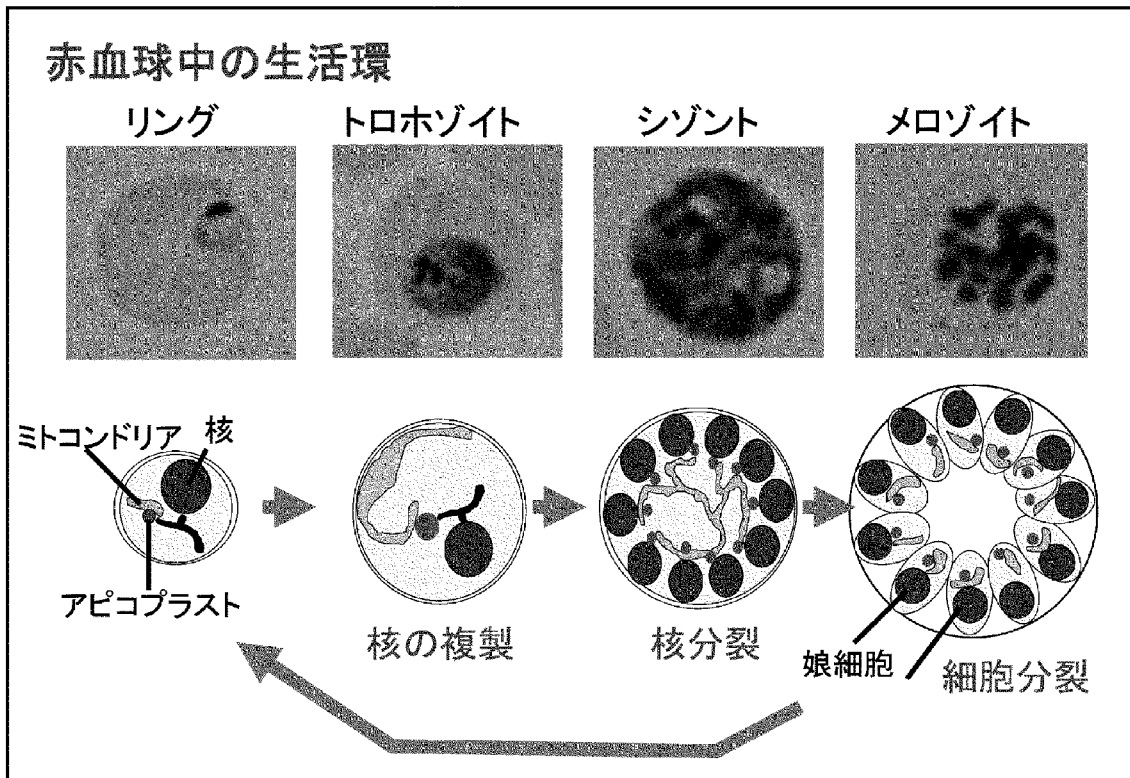
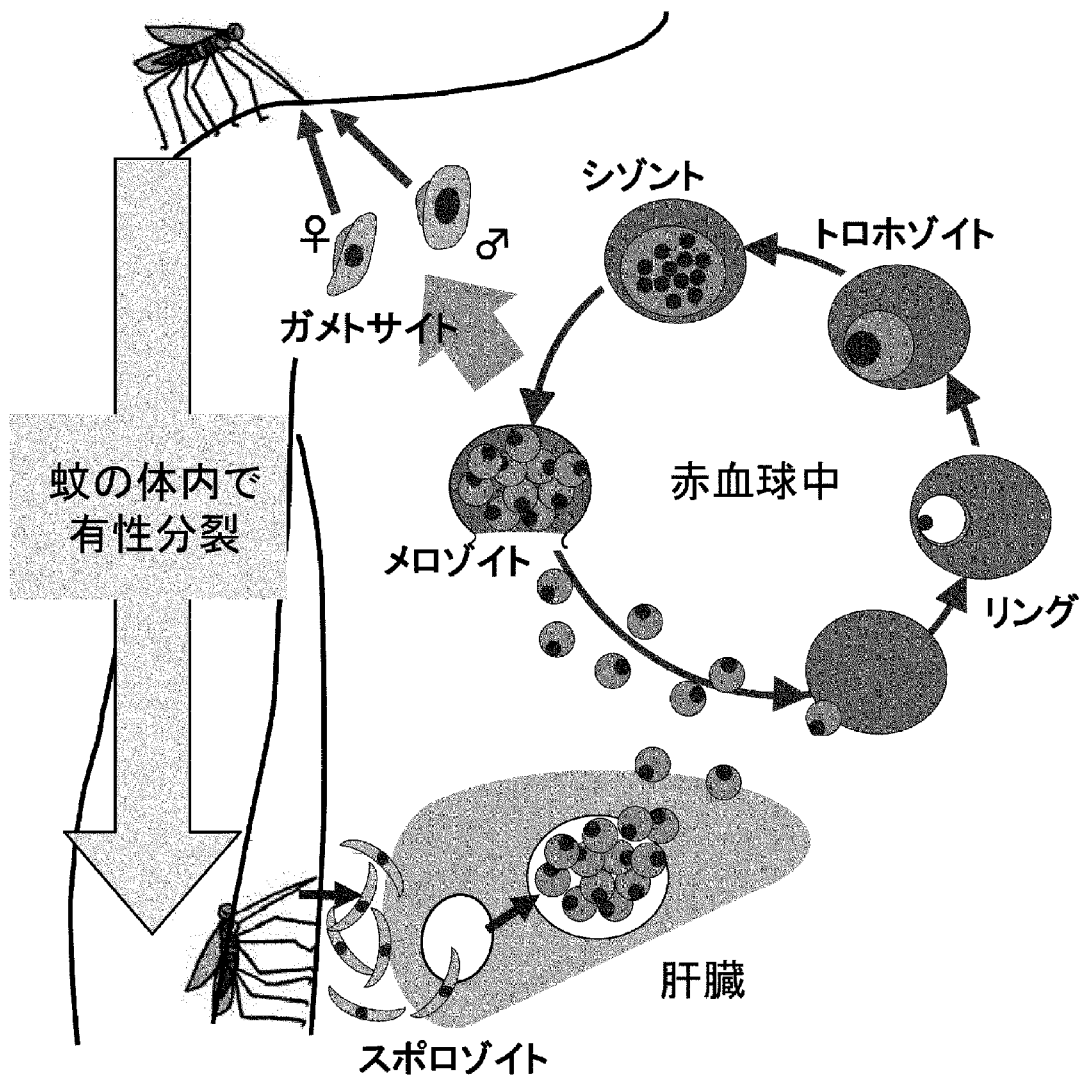
[図1]



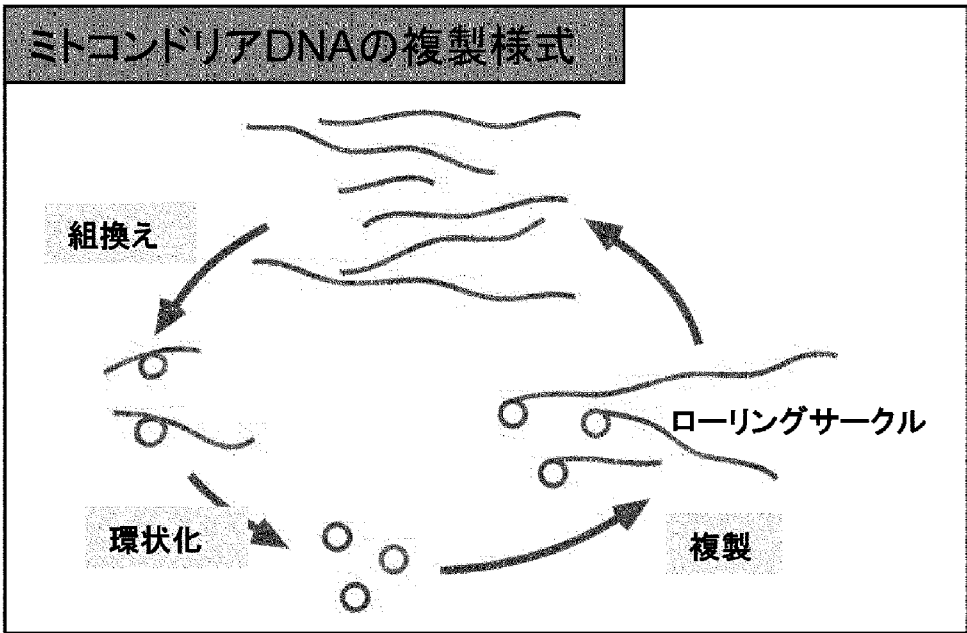
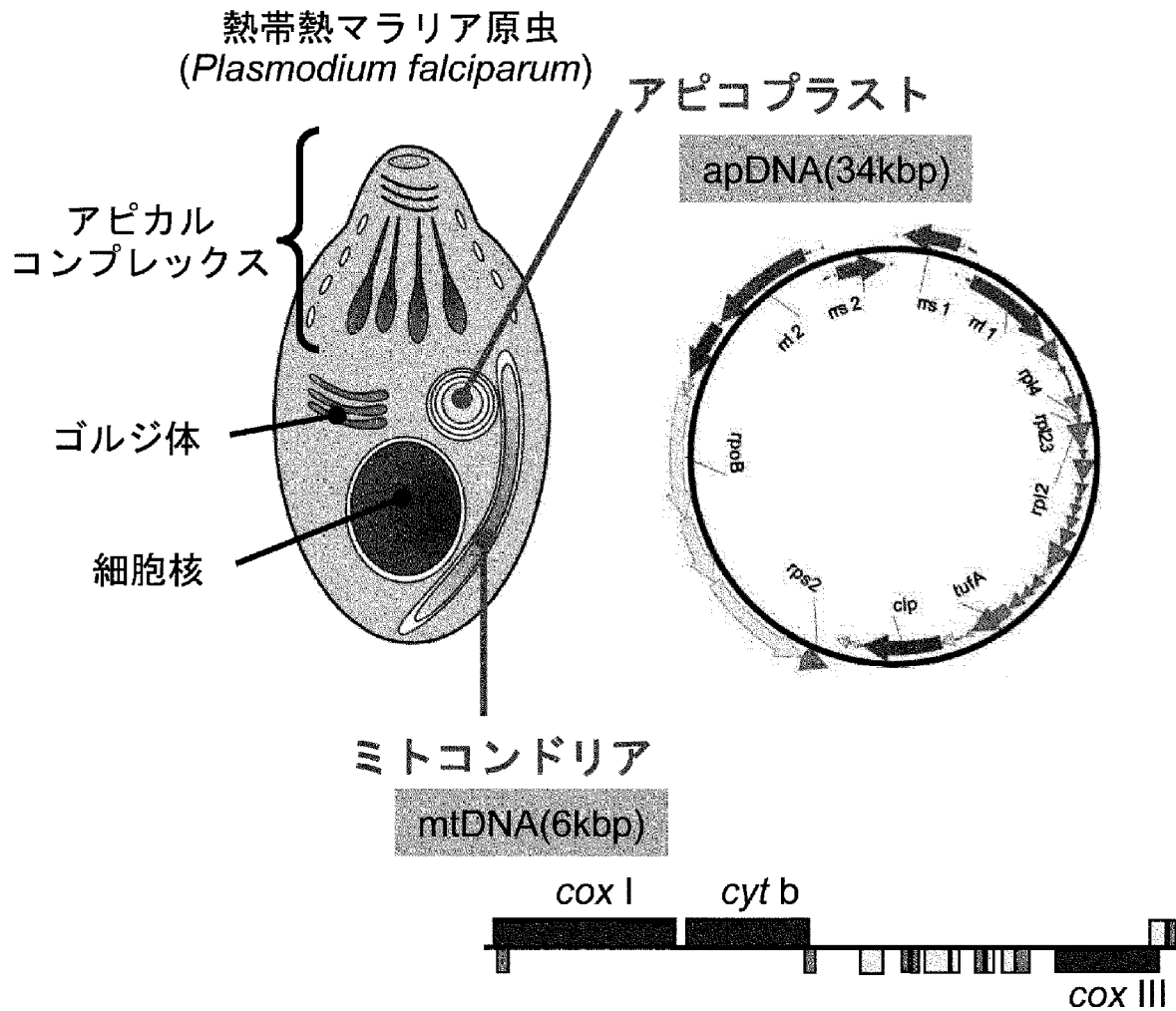
[図2]



[図3]



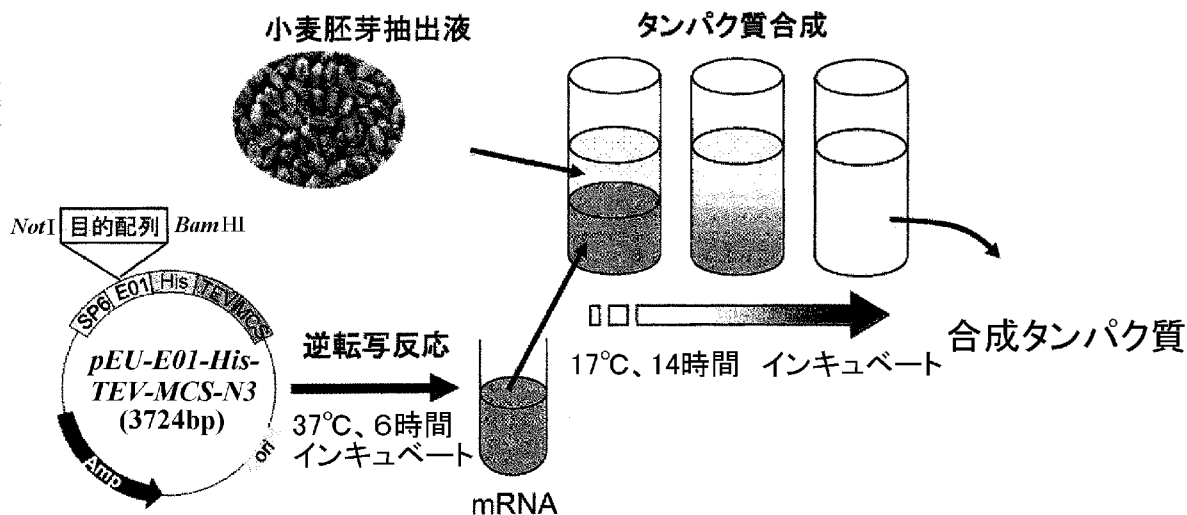
[図4]



[図5]

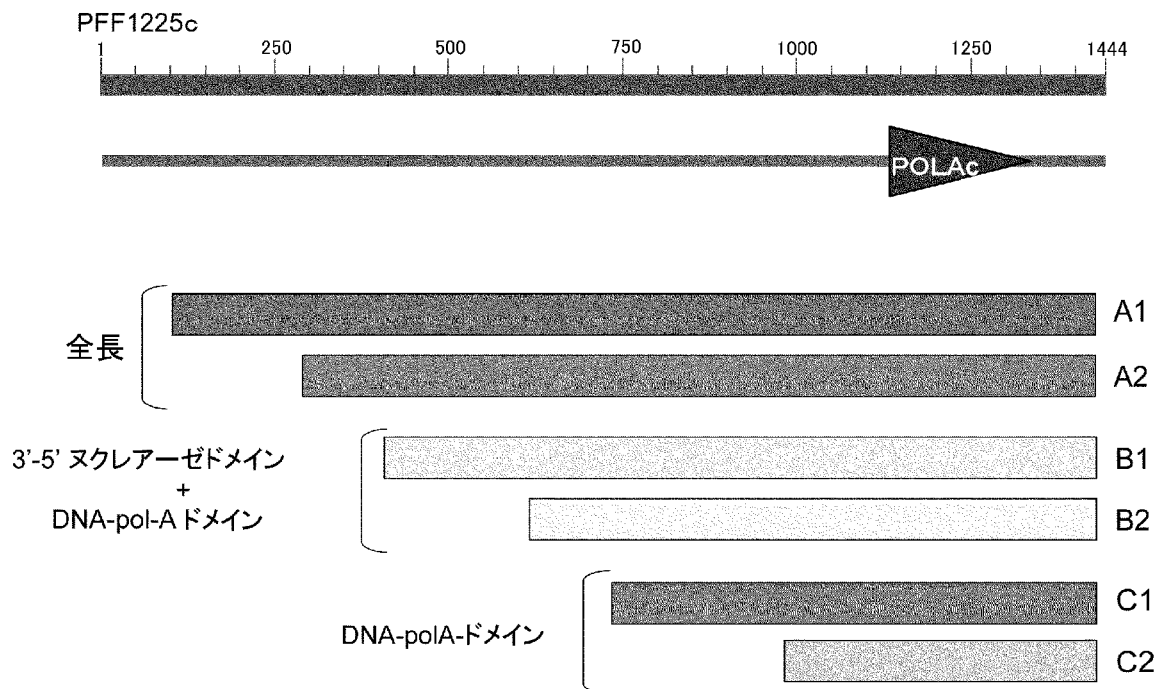
MKLFDSFFKHALIRINKRNIIYLNATRYYCNNINYNALINLLNKKNDINKEINALYSSLERL
 SNYKYKQYKDKLTLKNNINDEIKITNADKINNINIERDMNISHLDHHHNNHHHNNHHNI
 NHHNNHHHNNHHNINHHNNHHNNHHNNHFNNDYKKLIDNWKNDKIKIFISWCPEIVEDK
 YKSKCFSIPTYITFHIVITNNDIKLNNLLHNSHEYDDWNFNKIIQTINNQNLLKDKKEKEKE
 NGQQHSQEYIGNCKKGESEIPSYDFKESLLEHINESSQLNHSILSHKTKEQTHHTNNNI
 NGNYNNDHEHIEEEGKAKTKQNKTNSIIEKKKKTKKKKDEESHNDIINYTIKKKTNTNN
 SLYNIESILNIPKTYEPNIHYDKCIHKEQNHIFFFSFNISELIINDQVKTCLNECIQQNFIKQ
 NISNIHMDDLFLYVVYDYKNLIHIFNNINLKLININNIFDIYIISLIQLVQRGEKLQNVYNEY
 LNVKHKILIPNKINDIQNLSLHNFYSYFSKFAPEFSDVISAKFGLYGWGWKYQKKKDKKNK
 KQTEHHENNENYENNEYGKNNEYGKNNEYGKNNEYGKNNEYGKNNEYGKNNEYGKNNEYGK
 NNEYGKNNVHNDDTYMDISNERKNKKSKEVKNNKKMEKKNKVEKEKQNYLSFTPHNI
 >NNLQDIKKLVFGNKRNISDITEEDNICYSISRNCCLILLFEYFINKLEHNINILNLYIKVEQP
 LILCISHIEEKGIFLNQNKIEEIQKKSDDPLIYKNEIEELCKCNINLNSSKQVSSLIYKQLLDI
 SISTDHTEENMEDADEHTDHQEEHVNDNNECVDQLKAYTQTKEKERKDIYNNNNN
 ENNKNNNENYNSSKNHPLITNTNDDTSTLNAQDTSQHDNYINEHNNYNKFIKNNPF
 YNNNNNNNNNNNNNDNNNNISNRNLMNNLVNINYSLYNKKKNSHPYDENNKLFF
 LNSSHNNYNNNNNNINEMSRNKNLQTNKSLKILVDEIEKSNIYKEKEKEKLKKIIRNIKL
 YRESKKLQNYIENLPKYIQKNTNKIHCNFNQIGASTGRLSCDQPNLQNIHSRFRCAIS
 LKGKEENDTHDNNNNNNNIPQIHISTNNVSTNNVPMNIMSSTYPLYTMNKKNLITFDYK
 QMELFVMAYLSFDEQLLKLLNYSDFIETAKVLFNTNDVTNELRRMKTVIYIGILYGQT
 ENGLAKSLLISDTLASNLIENFFQFFPNVYRFMQMQKFLVKHMNCVYTLIGRKRILPNI
 KNKYRISMNTPIQGCAADIMKFSLLSCFVSNLNNIYNNKLLKMMNNINPLIHKNAFLN
 PTNLILQVHDELLLESEHDATKYIIQLLNPILENAFYNLIYYTNSIDRLKLLYDYMHDNISIK
 TYIDILQDINNKKYNDVKLYNGVYNTNVSEESHYINISNNVDHIFQKFNFKLPIKVESGG
 VYKES (配列番号1)

[図6]

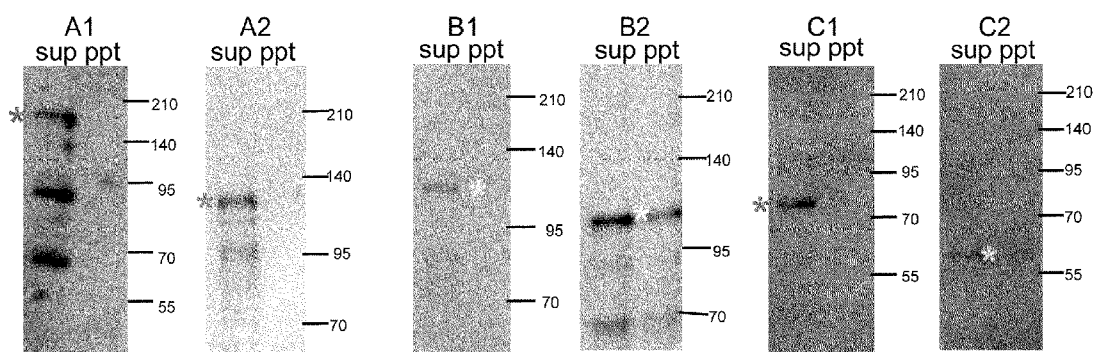


[図7]

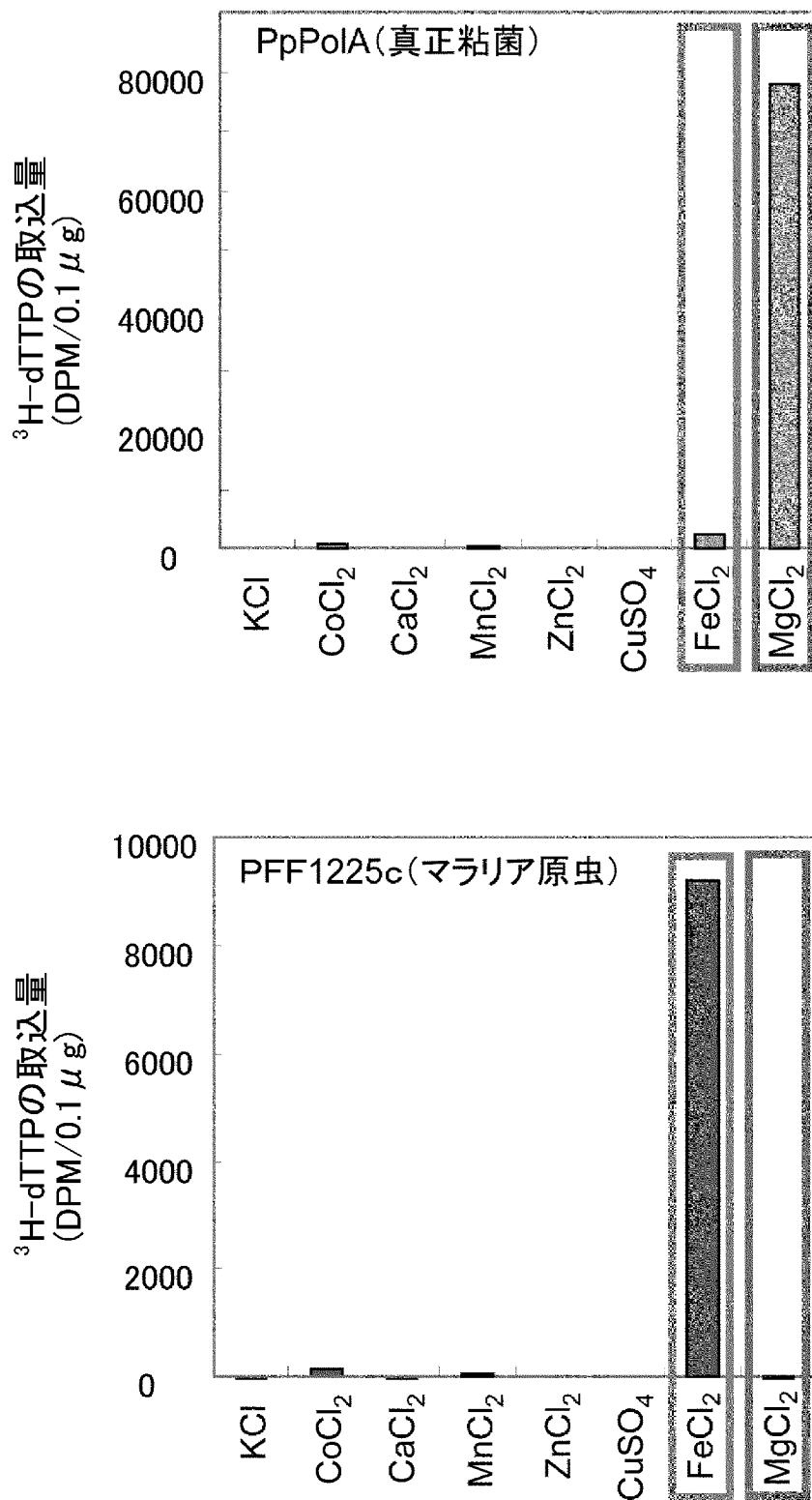
a



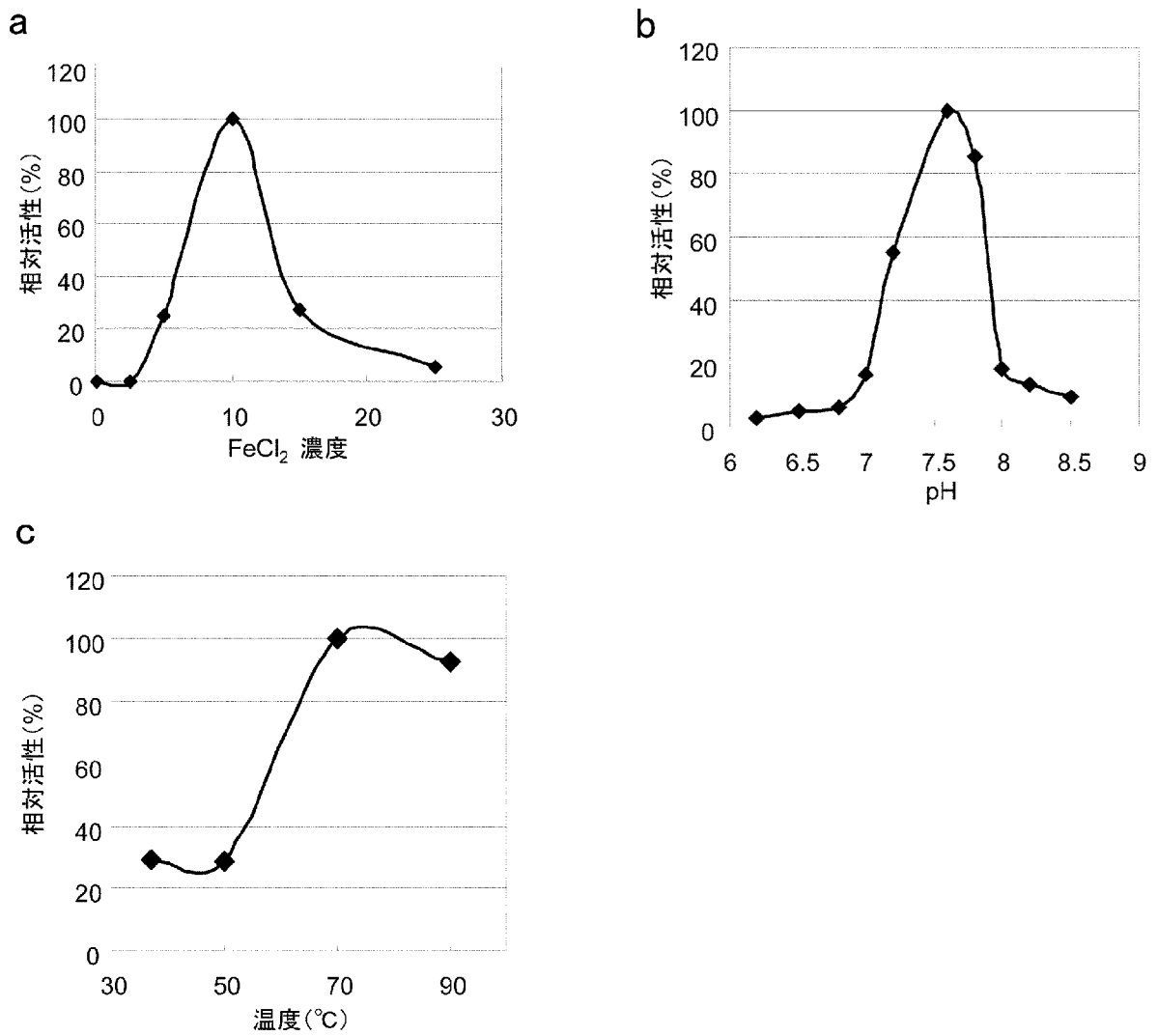
b



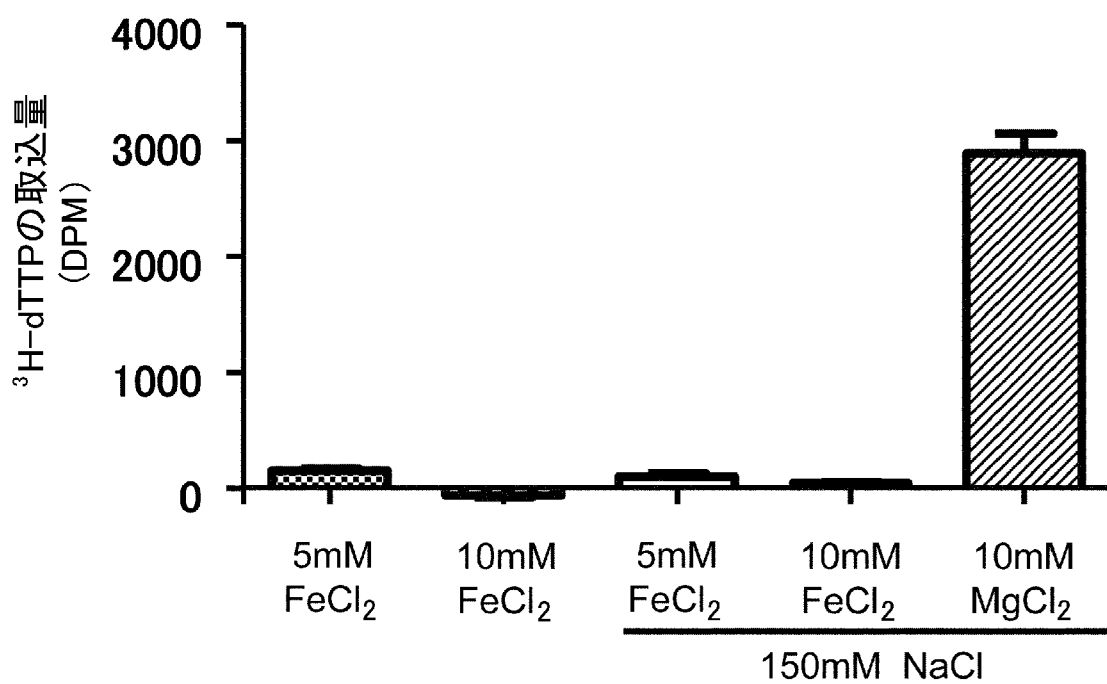
[図8]



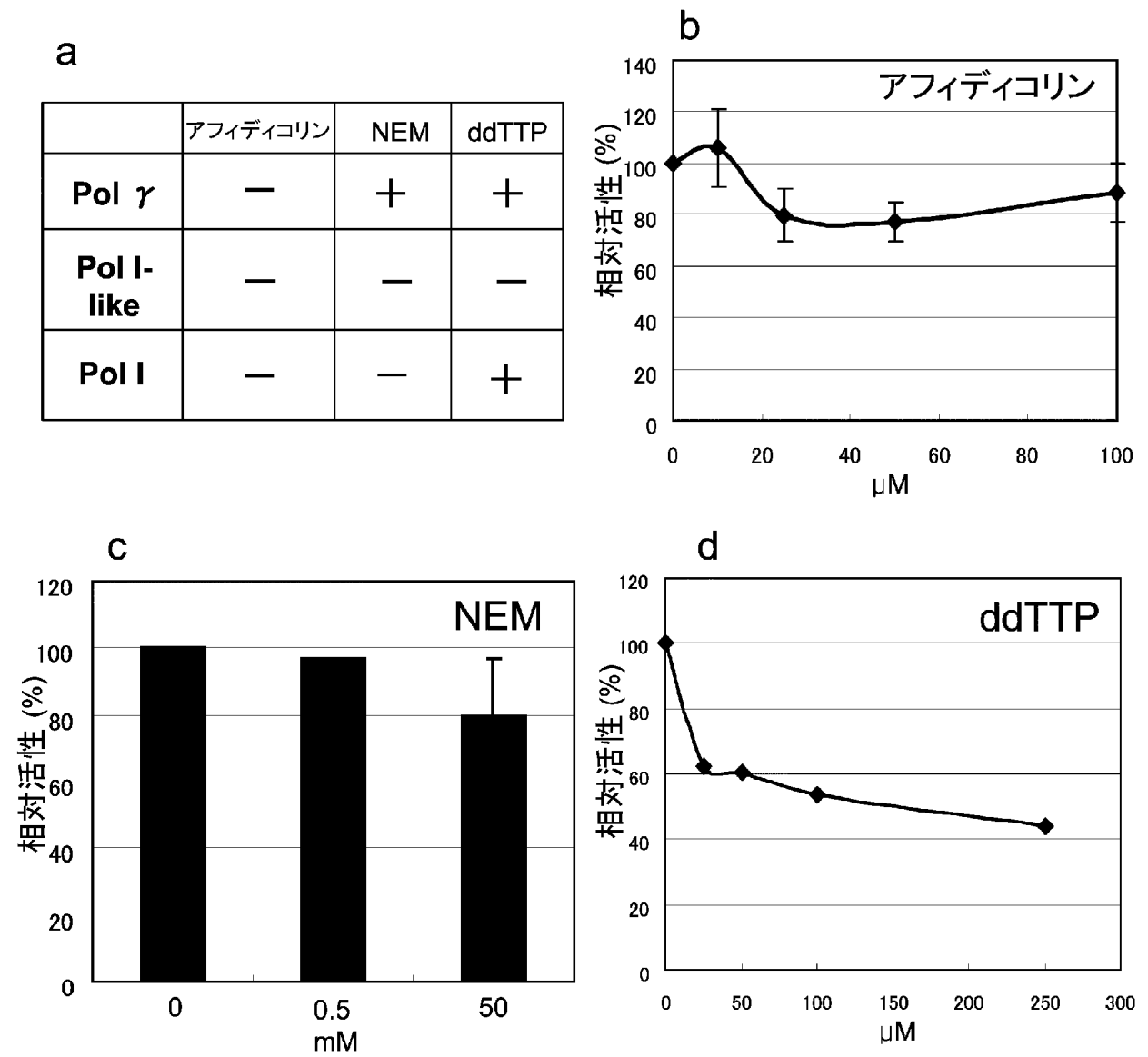
[図9]



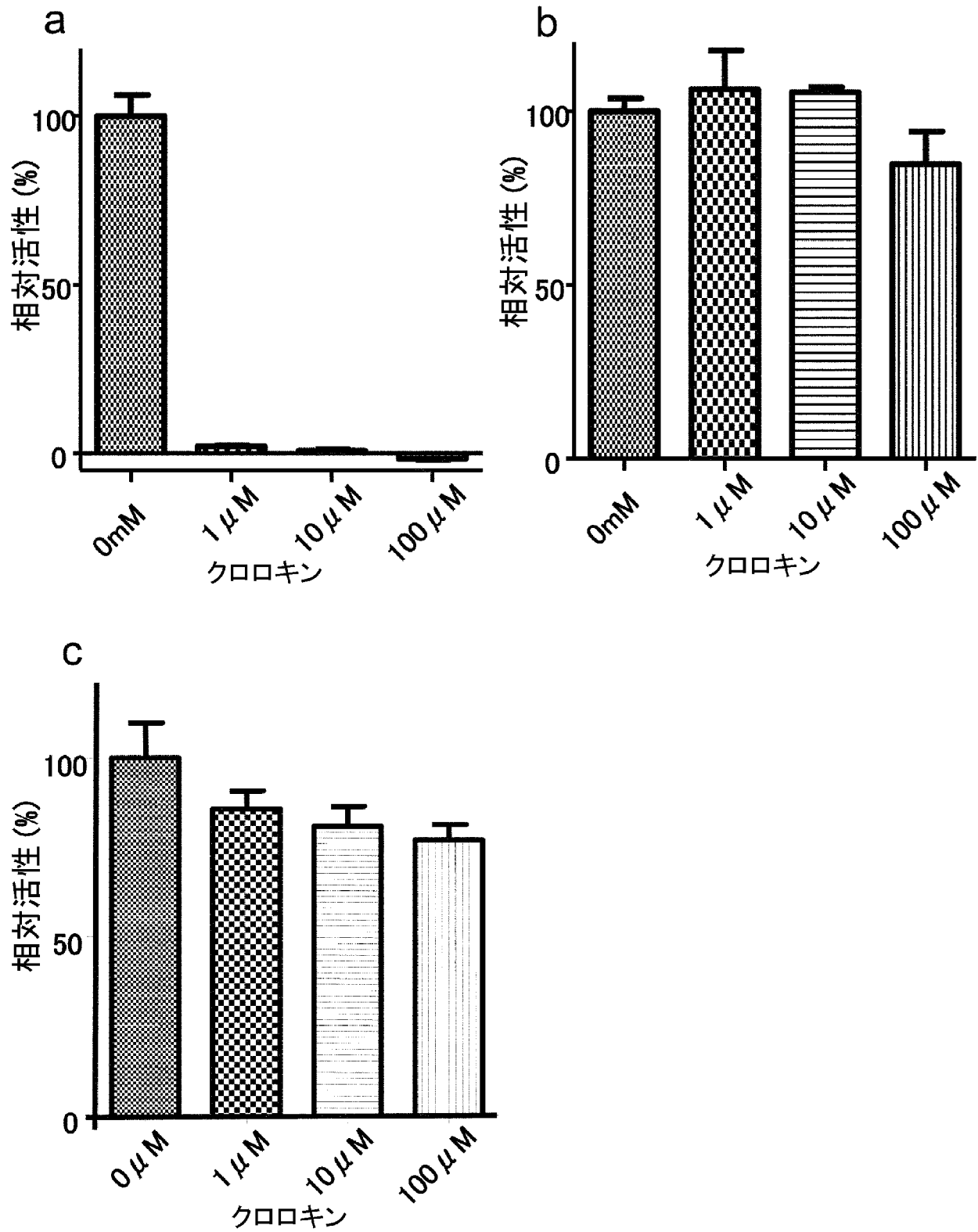
[図10]



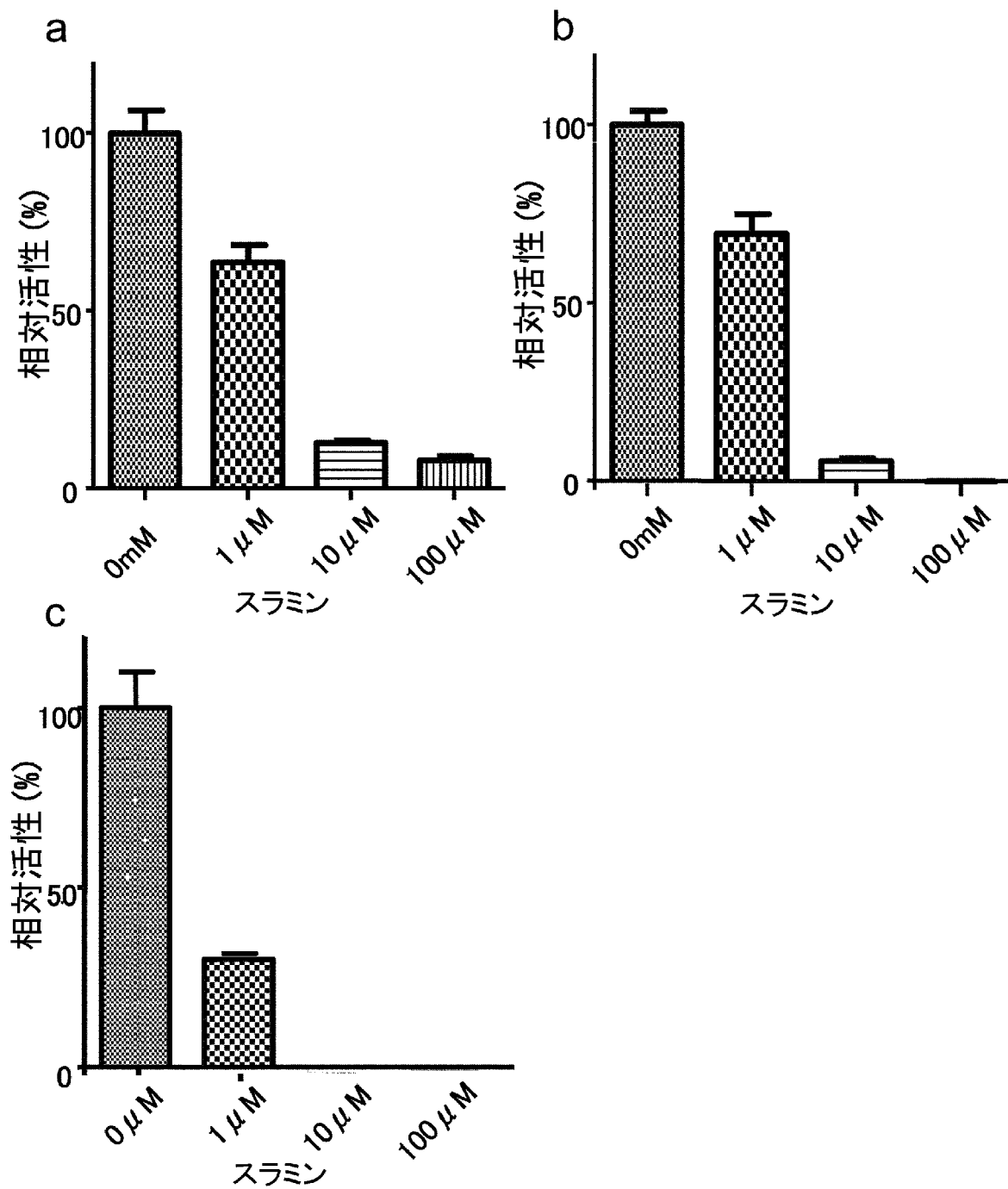
[図11]



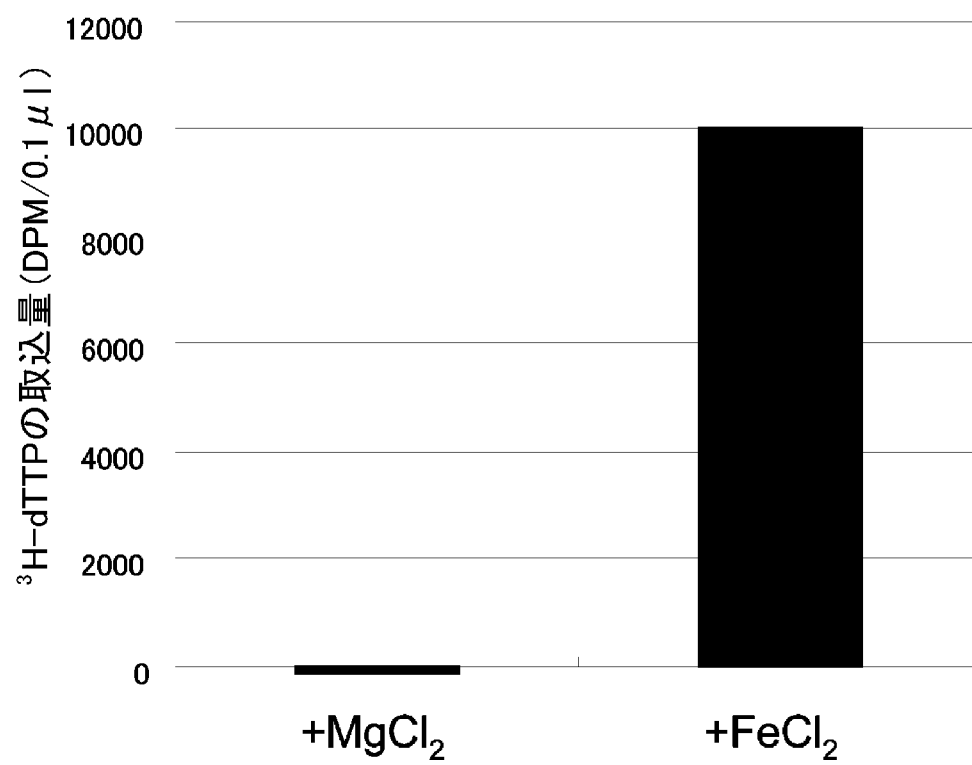
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12Q1/48(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"DNA polymerase 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7].", NCBI Protein[online]; Accession:CAG25066, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/46361202 >, 24-MAR-2009 uploaded, [retrieved on 2011-08-12]	1-13
A	GARDNER, MJ., et al., "Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.", Nature, 2002, 419(6906), 498-511	1-13
A	CHAVALITSEWINKOON-PETMITR, P., et al., "Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from Plasmodium falciparum.", Parasitol Int., 2000, 49(4), 279-88	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 August, 2011 (12.08.11)Date of mailing of the international search report
30 August, 2011 (30.08.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063965

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Narie SASAKI et al., "Malaria Genchu Organelle DNA Fukusei Tensha Machinery no Tokusei", Dai 82 Kai Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2009, Symposium 'Kisei Genchu no Dokutoku na Genome Organelle Shinka' 1S10s-2	1-13
A	Ryoko YUI et al., "Nettasei Malaria Genchu Organelle Kakuyotai Tanpakushitsu no Tansaku", Proceedings of the 73rd Annual Meeting of the Botanical Society of Japan, 2009, 187, P2-044	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/68, C12Q1/48, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	"DNA polymerase 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7].", NCBI Protein[online];Accession:CAG25066, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/46361202>, 24-MAR-2009 uploaded, [retrieved on 2011-08-12]	1-13
A	GARDNER, MJ., et al., "Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.", Nature, 2002, 419(6906), 498-511	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 12.08.2011	国際調査報告の発送日 30.08.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 神谷 昌男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P., et al., "Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from Plasmodium falciparum.", Parasitol Int., 2000, 49(4), 279-88	1-13
A	佐々木成江 外, "マラリア原虫オルガネラDNA複製・転写マシナリーの特性", 第82回日本生化学大会, 2009, シンポジウム「寄生原虫の独特なゲノム・オルガネラ進化」1S10a-2	1-13
A	由比良子 外, "熱帯性マラリア原虫オルガネラ核様体タンパク質の探索", 日本植物学会第73回大会研究発表記録, 2009, 187, P2-044	1-13