

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3692396号
(P3692396)

(45) 発行日 平成17年9月7日(2005.9.7)

(24) 登録日 平成17年7月1日(2005.7.1)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 39/00
A 6 1 P 33/00
C O 7 K 14/44
C O 7 K 16/20

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 P 33/00
A 6 1 P 33/00 1 7 1
C O 7 K 14/44

請求項の数 10 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-50208 (P2001-50208)
(22) 出願日 平成13年2月26日 (2001.2.26)
(65) 公開番号 特開2002-247989 (P2002-247989A)
(43) 公開日 平成14年9月3日 (2002.9.3)
審査請求日 平成13年2月26日 (2001.2.26)

(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 100096183
弁理士 石井 貞次
(72) 発明者 辻 尚利
茨城県つくば市松代4-415-1
(72) 発明者 磯部 尚
茨城県つくば市東2丁目22-13
(72) 発明者 春日 春江
茨城県つくば市松代3丁目311-202

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豚回虫 (Ascaris suum) 感染幼虫の14kDa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(Ascaris suum)の14kDa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14kDa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72位から509位の塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号1の72位から509位の塩基配列を含む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14kDa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(Ascaris suum)の14kDa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14kDa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14kDa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14kDa抗原蛋白質を採取することを特徴とする、豚回虫 (*Ascaris suum*) の14kDa抗原蛋白質を産生する方法。 10

【請求項8】

請求項3に記載の豚回虫 (*Ascaris suum*) の14kDa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14kDa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】 20

【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活用できる。

【0002】 30

【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や適用範囲に加えて、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。 40

【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 (*Ascaris suum*) 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 50

: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))。

【 0 0 0 4 】

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))。

10

【 0 0 0 5 】

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。

20

【 0 0 0 6 】

【 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。

30

【 0 0 0 7 】

【 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14kDa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 L2R59 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。

40

【 0 0 0 8 】

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14kDa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14kD

50

a抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質。

【0009】

(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72位から509位の塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号1の72位から509位の塩基配列を含む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14kDa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。

【0010】

(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14kDa抗原蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質。 10

(b) 配列表の配列番号2で示す豚回虫(*Ascaris suum*)の14kDa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14kDa抗原蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質。

【0011】

(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14kDa a抗原蛋白質を採取することを特徴とする、豚回虫(*Ascaris suum*)の14kDa抗原蛋白質を 20

(8) (3)の豚回虫(*Ascaris suum*)の14kDa抗原蛋白質を認識する抗体。

(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14kDa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。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

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。 30

【0013】

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14kDa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14kDa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14kDa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。 40

【0014】

さらに、本発明のDNAは、配列番号1の72位から509位までの塩基配列からなるDNA(豚回虫感染幼虫の14kDa抗原をコードするDNA、すなわち*Ascaris suum*L2R59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とストリンジェント 50

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14kDa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。

【0015】

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14kDa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、実質的に同質の性質とは、豚回虫 (*Ascaris suum*) 感染幼虫の14kDa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。

【0016】

本発明の豚回虫感染幼虫の14kDa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。

*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)らの方法によって感染ステージである第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。

【0017】

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、又はバッチ法によりpoly(A)+mRNAを得ることができる。

【0018】

このようにして選られた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。

【0019】

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、ブラン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。

【0020】

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。

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

10

20

30

40

50

析装置を用いて配列を決定することもできる。

【0021】

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。

【0022】

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とその誘導体等が挙げられる。ベクターは、複製開始点、選択マーカー、プロモーターを含み、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。

【0023】

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）、pBluescriptII KS、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。

【0024】

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2 μ mDNA、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、蚕細胞用としての角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。

【0025】

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することができる。

【0026】

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14kDa抗原を発現、産生させることができる。

【0027】

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。

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】

10

20

30

40

50

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。

10

【0029】

豚回虫感染幼虫の14kDa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。該14kDa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14kDa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14kDa抗原で免疫したマウスの脾細胞とマウスのミエロ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14kDa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もよい。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を発現ベクターに組み込んで発現させた産物でもよい。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。

20

30

【0030】

豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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もよい。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。

40

【0031】

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

50

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。

【0032】

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。

10

【0033】

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14kDa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。

さらに、本発明は分離した豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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。

【0034】

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。

20

本発明の豚回虫感染幼虫の14kDa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。

【0035】

【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。

実施例1 本発明における豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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℃で4時間培養した。ブランク出現後、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 (TBST) で洗浄し、さらに5% 添加 TBST 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、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 ExAssistTM ヘルパーファージと *E. coli* SOLRTM 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。

30

40

【0036】

アルカリ溶菌法により調製した組換え体プラスミド DNA (L2R59) 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-terminator 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

50

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。塩基配列から推定されるコード領域のアミノ酸は、C末部分は含まれていたが、N末端が欠けていた。そこで欠損部位のcDNAを得るために、5'の単離を試みた。A. suum L3よりTotal RNA Isolation Kit(プロメガ社)を用い、メーカーの推奨する方法に則り、RNAを抽出した。抽出したRNAからmRNA Isolation Kit (プロメガ社)を用い、メーカーの推奨する方法に従いpoly-RNAを精製した。Time Saver cDNA 合成キット(ファルマシア社)を用い、メーカーの推奨する方法に従い、二本鎖cDNAを合成した。コード領域の断片を得るために上記cDNAを用いて、スプライスリーダー配列(SL, Blaxter and Liu, Int J Parasitol., 26:1025-1033. (1996))及びL2R59から設計したプライマーでPCR反応を行った。PCR反応は次に示す条件で行った。50 μ lの反応液〔3 μ l A. suum L3DNA、1 μ M SLプライマー、1 μ M P1プライマー:TGG GTT ATC GGC TAT TGC GG、10mM Tris-Tris-HCL(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、2.5U Ampli Taq 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 $^{\circ}$ Cにて30秒間、50 $^{\circ}$ Cにて30秒間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の反応を35サイクルで実施した。反応液は0.8%アガロースにアプライし電気泳動を行なった後、増幅された約0.4kbのDNA断片をアガロースからDNA精製キット(キアゲン社)を用いてDWに回収した。直ちにTAクローニングベクター(インビトロゲン社)にメーカーの推奨する方法に従ってDNA断片を挿入し、INV F'プラスミドの形質転換を行い、X-Gal(ナカラ社)を含むL-ampプレートに蒔き、白色のコロニーを選択することによりアンピシリン耐性で、ガラクトシダーゼ欠損のコロニーを選択した。

10

20

【0037】

選択したコロニーをL-amp培地で培養し、アルカリ溶菌法により調製した組換え体プラスミドDNAを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)を用いて分析し塩基配列を決定した。イムノスクリーニングと5'端PCRのシーケンス結果から合成したcDNAは、623塩基で構成され、5'には非翻訳領域に続きATGの開始コドンが、また3'には真核生物に存在するポリアダ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146残基のアミノ酸から構成され、その内N末領域には16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15,576Daで等電点は10.12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、14,009Da、等電点は10.0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、72位から509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同源性検索から、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壌線虫のひとつであるCaenorhabditis eleganseの遺伝子産物とそれぞれ41および38%の類似性を示した。しかしながら、現在のGenBankTM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。

30

40

【0038】

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14kDa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'-CCG AGC TCG AGA CAA GGA C CT CAA GGA CCA CCA C-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'-CCA TAT GGT ACC CTA GCC TTG CAT CTC TTT TTG-3'; GGTACCGはKpnI サイト; 配列番号4)を用いたPCR反応にて増幅した。

【0039】

PCR反応は50 μ lの反応液〔1 ng A. suumL3cDNA、1 μ Mセンス及び1 μ M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 p

50

olymerase (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14kDa抗原コード領域の挿入されたクローンを選択した。

【0040】

10

実施例3 大腸菌における豚回虫感染幼虫の14kDa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 0.5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20 kDa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BRL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20 kDa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14kDa組換え抗原蛋白質を示している。

20

【0041】

実施例4 大腸菌からの豚回虫感染幼虫の14kDa抗原の精製、及び精製した豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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 (Tsuji et 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-LyzerTM 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。

30

【0042】

豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa抗原組換え体蛋白質50 μgをTiterMax GoldTM (シンテックス社) 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14kDa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14 kDa組換え蛋白質マウス免疫血清は、20kDa付近の組換え蛋白質と強く反応することが確認された。

40

【0043】

実施例5

精製した豚回虫感染幼虫の14kDa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14 kDa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14kDa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

50

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。TBST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20kDaの抗原組換え体蛋白質と陽性反応を示し、14kDa組換え蛋白質の抗原性が確認された。

【0044】

実施例6 イムノプロット法によるネイティブ(天然型)豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa抗原様分子の性状

実施例4で作製したマウス豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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14kDa抗原組換え体蛋白質免疫血清と1時間反応させた。TBST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14kDaの単一バンドが確認され、A.suumL3抽出蛋白質中の天然型豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDaは、L2R59がコードする豚回虫の成熟抗原の分子量である。さらに、人及び犬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14kDaの大きさに陽性反応が確認された。このことから、本発明で示した豚回虫感染幼虫14kDaは、Ascarid線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14kDa組換え抗原蛋白質を示している。

【0045】

実施例7 豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質を免疫したマウスにおけるA.suumL3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14kDa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14kDa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14kDa抗原組換え蛋白質をフロイトの完全アジュバンド(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14kDa抗原組換え蛋白質をフロイトの不完全アジュバンド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14kDa抗原組換え蛋白質免疫群で使用したアジュバンドを免疫処置日と同一日に皮下接種した。感染耐化群は、A.suumL3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L3を含んだ成熟卵を初回2,000個経口投与し、その後4週目および6週目に4,000個投与した。実験群マウスへのA.suumL3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5,000個を経口投与することで行った。感染後、7日目にで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PBS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。

【0046】

未処置群では、169.2 \pm 27.7匹アジュバンド対照群では、183.7 \pm 72.1匹これらに対して、豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質を免疫群では、83.2 \pm 63.5匹、であった。また、各群のマウス血清を用いて、イムノプロット法によって豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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14kDa抗原組換え蛋白質の免疫によって、A.suum幼虫回収率が有意に減

少し、A.suumL3に対する豚回虫感染幼虫の14kDa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.suumL3感染マウスにおけるA.suumL3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。

【0047】

実施例8 経鼻免疫による豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質の感染防御能

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14kDa抗原組換え蛋白質免疫マウスにA.suumL3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14kDa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(CTB、C-9903、シグマ社)を用いた。

10

【0048】

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14kDa抗原組換え蛋白質+CTB免疫群、CTB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14kDa抗原組換え蛋白質+CTB免疫群のマウスには初回、50 μ gの豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質と25 μ gCTB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。CTB免疫対照群には、豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質免疫群で使用したCTB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.suumL3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5,000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、ペ-ルマン法により抗生物質を加えたPBS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、ELISAによる豚回虫感染幼虫の14kDa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14kDa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 \times 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C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-スラディシュペルオキシダーゼ(HRP)結合抗マウスIgG(ベツシル社)を加え37 $^{\circ}$ C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, Kirkegaard & Perry Laboratories社)を添加し37 $^{\circ}$ C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、306.8 \pm 87.5匹。CTB免疫対照群では、342.25 \pm 96.2匹であった。これらに対して、豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質+CTBの免疫群では、126.75 \pm 77.0匹であった。その結果、豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質+CTBの免疫群では、14kDa抗原組換え蛋白質に対する特異IgG抗体価18.6 \pm 0.55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14kDa抗原組換え蛋白質の経鼻による粘膜免疫によって、A.suum幼虫回収率が有意に減少し、A.suumL3感染に対する豚回虫感染幼虫の14kDa抗原組換え蛋白質による防御免疫誘導が確認された。

20

30

40

【0049】

【発明の効果】

本発明により、豚回虫(Ascaris suum)感染幼虫の14kDa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14kDa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

50

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。

【 0 0 5 0 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Animal Health;Bio-oriented technology Research Advancement Institution

10

<120> Ascaris suum infective larvae 14kDa protein, nucleic acid molecules, and use thereof

<130> P01-0037

<140>

<141>

20

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 623

30

<212> DNA

<213> Ascaris suum

<220>

<221> CDS

<222> (72)..(509)

40

<400> 1

ggtttaatta cccaagtttg aggtgctcgt ttgaggataa aacttctcaa gaaaagcagc 60

cgcatcmeta a atg aaa gtg ctg ata att ttc gtc gca att gtt gtg ata 110

Met Lys Val Leu Ile Ile Phe Val Ala Ile Val Val Ile

1

5

10

gcc ttt gca caa gga cct caa gga cca cca ccg ttc tta gtc ggt gca 158

Ala Phe Ala Gln Gly Pro Gln Gly Pro Pro Pro Phe Leu Val Gly Ala

15

20

25

10

ccc gct aat gtc gtt gcc gaa ttc aaa caa atc atc act gga gca ccg 206

Pro Ala Asn Val Val Ala Glu Phe Lys Gln Ile Ile Thr Gly Ala Pro

30

35

40

45

20

gat aaa acc gat gct gaa att gac cgc gat att gag aac tgg gtc gcc 254

Asp Lys Thr Asp Ala Glu Ile Asp Arg Asp Ile Glu Asn Trp Val Ala

50

55

60

cga caa gga cca aaa ata aag aca gaa ttc aat aaa ttc aaa acg caa 302

Arg Gln Gly Pro Lys Ile Lys Thr Glu Phe Asn Lys Phe Lys Thr Gln

65

70

75

30

atg cag caa ggc aag gcc aga gct gag gct gcc cat cgg gca tct att 350

Met Gln Gln Gly Lys Ala Arg Ala Glu Ala Ala His Arg Ala Ser Ile

80

85

90

gca aag ttc tcg cca gcc gct aag gca gcc gac gca cag ttg acc gca 398

Ala Lys Phe Ser Pro Ala Ala Lys Ala Ala Asp Ala Gln Leu Thr Ala

40

95	100	105		
ata gcc gat aac cca aat ctc aaa gga cga gaa aag caa cag aaa att			446	
Ile Ala Asp Asn Pro Asn Leu Lys Gly Arg Glu Lys Gln Gln Lys Ile				
110	115	120	125	
act ggc ctc ctt cag tca ttg cca gct gca gtg caa gcc gaa ttt caa			494	10
Thr Gly Leu Leu Gln Ser Leu Pro Ala Ala Val Gln Ala Glu Phe Gln				
	130	135	140	
aaa gag atg caa ggc tagacgtgaa gagcgagagt attcagcaat tttccctcat			549	
Lys Glu Met Gln Gly				
	145			20
ttactatiga cattcaatgt gatacaatcg ttttagagta ataaactata ctattcaaaa			609	
aaaaaaaaaaaa aaaa			623	
<210> 2				
<211> 146				
<212> PRT				
<213> Ascaris suum				
<400> 2				
Met Lys Val Leu Ile Ile Phe Val Ala Ile Val Val Ile Ala Phe Ala				
1	5	10	15	40
Gln Gly Pro Gln Gly Pro Pro Pro Phe Leu Val Gly Ala Pro Ala Asn				

20

25

30

Val Val Ala Glu Phe Lys Gln Ile Ile Thr Gly Ala Pro Asp Lys Thr

35

40

45

Asp Ala Glu Ile Asp Arg Asp Ile Glu Asn Trp Val Ala Arg Gln Gly

50

55

60

10

Pro Lys Ile Lys Thr Glu Phe Asn Lys Phe Lys Thr Gln Met Gln Gln

65

70

75

80

Gly Lys Ala Arg Ala Glu Ala Ala His Arg Ala Ser Ile Ala Lys Phe

85

90

95

20

Ser Pro Ala Ala Lys Ala Ala Asp Ala Gln Leu Thr Ala Ile Ala Asp

100

105

110

Asn Pro Asn Leu Lys Gly Arg Glu Lys Gln Gln Lys Ile Thr Gly Leu

115

120

125

Leu Gln Ser Leu Pro Ala Ala Val Gln Ala Glu Phe Gln Lys Glu Met

130

135

140

30

Gln Gly

145

40

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

10

<400> 3

ccgagctcga gacaaggacc tcaaggacca ccac

34

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

ccatattgta ccctagcctt gcatctcttt ttg

33

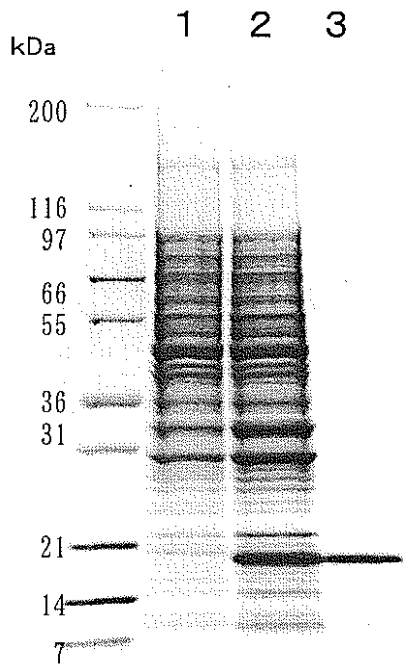
30

【図面の簡単な説明】

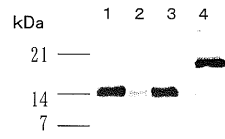
【図1】豚回虫感染幼虫の14kDa抗原の電気泳動の結果を示す図である。

【図2】イムノプロット法による人回虫及び犬回虫における豚回虫感染幼虫の14kDa関連抗原ならびにネイティブ型豚回虫感染幼虫の14kDa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 1 2 N	1/15	C 0 7 K	16/20	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08	
		C 1 2 N	5/00	A

(72)発明者 新川 武

沖縄県那覇市首里石嶺町2丁目96-1 琉球大学医学部職員宿舎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 阪野 誠司

(56)参考文献 特開2003-199576(JP, A)

Parasitology, 2000年, 121, 671-7

Parasite Immunology, 1999年, 21, 619-30

Molecular and Biochemical Parasitology, 1993年, 57, 339-44

Experimental Parasitology, 1985年, 60, 245-54

J. Vet. Med. Sci., 2001年 7月, 63(3), 683-5

Infection and Immunity, 2001年12月, 69(12), 7285-92

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/00-90

C07K 14/00-16/46

C12N 1/00-7/08

JICSTファイル(JOIS)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed

EUROPAT(QUESTEL)