

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-261070

(P2004-261070A)

(43) 公開日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 P 33/06	4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 33/06</b>	C O 7 K 14/435	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 14/435</b>	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
<b>C O 7 K 16/18</b>	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
	審査請求 有 請求項の数 11 O L	(全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-54495 (P2003-54495)

(22) 出願日 平成15年2月28日 (2003.2.28)

(71) 出願人 501203344

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

茨城県つくば市観音台3-1-1

(72) 発明者 辻 尚利

茨城県つくば市松代4-415-1

(72) 発明者 神尾 次彦

茨城県電ヶ崎市松葉2-1-72

(72) 発明者 三好 猛晴

茨城県つくば市松代5-1-3 ナルシマ  
ハイツA-206

(72) 発明者 藤崎 幸蔵

北海道帯広市大空町2-4-3 大空町住  
宅302-203

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質、それをコードする核酸分子及びそれらの利用

## (57) 【要約】

【課題】ピロプラズマ原虫などのアピコンプレックス門に属する赤血球寄生原虫症の治療及び病原虫である感染阻止に関わる蛋白質、それをコードするDNA及びそれらの使用の提供。

【解決手段】マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質及びその合成ペプチド、該抗原を認識する抗体並びに該抗原。さらにピロプラズマ原虫駆除のためのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をもとに作製した化合物の作出。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) に示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードする DNA。

(a) 配列表の配列番号 2 で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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 で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、かつマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質

10

## 【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 25 位から 246 位の塩基配列を含む DNA

(d) 配列表の配列番号 1 の 25 位から 246 位の塩基配列を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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) 若しくは (b) に示すペプチド蛋白質又はその断片。

(a) 配列表の配列番号 2 で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質

20

(b) 配列表の配列番号 2 で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、かつマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質

## 【請求項 4】

以下の (e) から (i) のいずれかのアミノ酸配列を含みマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有する、請求項 3 記載のマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の断片。

(e) 配列番号 2 のアミノ酸配列の第 23 位のアミノ酸から第 74 位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

30

(f) 配列番号 2 のアミノ酸配列の第 22 位から第 37 位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(g) 配列番号 2 のアミノ酸配列の第 33 位から第 47 位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(h) 配列番号 2 のアミノ酸配列の第 43 位から第 57 位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列の第 53 位から第 74 位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

## 【請求項 5】

請求項 3 または 4 に記載のペプチド蛋白質を有効成分とするマダニのピロプラズマ原虫駆除剤。

40

## 【請求項 6】

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 7】

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含むベクター。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターを含む組換え体細胞。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の組換え体細胞を培養し、その培養物からマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を採取することを特徴とする、マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋

50

白質を産生する方法。

【請求項 10】

請求項 3 に記載のマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を認識する抗体。

【請求項 11】

モノクローナル抗体である請求項 10 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ピロプラズマ原虫の殺虫作用に関わる蛋白質、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、ピロプラズマ原虫とはタイレリア原虫及びバベシア原虫を指し、これらのピロプラズマ原虫の殺虫作用を有するペプチド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、組換えペプチド蛋白質及び合成ペプチドに関する。本発明により、ピロプラズマ原虫が属するマラリア原虫等をアピコンプレックス門の赤血球内寄生原虫による人および動物の寄生虫病予防及び治療を目的とした化合物の合成、あるいはそれら原虫による寄生虫感染の治療薬の開発に応用できる。

10

【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、蚊やマダニなどの吸血性節足動物が媒介するマラリア原虫やピロプラズマ原虫による寄生虫感染症は人類が抱える最も難題であり、その防除対策には非常に苦慮している。赤血球に寄生する両原虫はいずれも貧血を主徴とする重篤な症状をもたらす致死的な感染症で、蚊によって伝播されるマラリアは人の寄生虫感染症であるのに対し、馬や牛などの愛玩・産業動物で多大な被害をもたらしているピロプラズマ症はマダニが媒介する。最近では動物のピロプラズマ原虫による新興、再興の人畜共通感染の脅威が米国や日本などの先進諸国で大きな社会問題になりつつある (Schuster FL, Clin. Microbiol. Rev 15: 365 - 375 (2002))。

20

【0003】

ピロプラズマ症の防除は、媒介者であるマダニと病原虫であるピロプラズマ原虫対策の 2 つに大別される。マダニ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。DTT が開発された 1950 年以降有機リン系、カーバメート系、ピレスロイド系などの化合物が殺ダニ剤としてマダニ防除に使用されてきた。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る。

30

【0004】

一方、マダニの頻回寄生に対して宿主が抵抗性を獲得する現象を応用した獲得免疫によるマダニ防除法が以前から試みられている (Fujisaki, Natl. Insit. Anim. Health Quart. (Tokyo) 18: 27 - 38 (1978))。また、宿主への接触が全くないマダニ蛋白質がマダニ感染に対する防御抗原となることも明らかにされ、実際にワクチン抗原 (Tick GARD) (Willadesen and Jogejan, Parasitology Today 15: 258 - 262 (1999)) として一部のピロプラズマ原虫に対して野外応用されているものの、その有効性は 1 宿主性のマダニ *Boophilus microplus* に対してのみで、多くのピロプラズマ原虫媒介者に対してのワクチンは依然として開発途上にあり、病原体側のピロプラズマ原虫の防除対策もマダニと同様に薬剤に深く依存しているのが実情である

40

50

。このように21世紀におけるピロプラズマ原虫による人および家畜生産の被害を既存の薬剤使用によって防ぐことは非常に難しい状況にある。

【0005】

ピロプラズマ原虫は宿主とマダニで複雑な生活環を形成している。動物のピロプラズマ症はバベシア症とタイレリア症の2つに大別される。牛バベシア症の中で最も重篤な症状をもたらす *Babesia bigemina* の生活環は、宿主赤血球に寄生したバベシア原虫(メロゾイト)は宿主体内で分裂増殖し、他の赤血球への侵入を繰り返す。牛におけるピロプラズマ症の発症はメロゾイトによるものである。マダニが媒介する動物間のバベシア原虫感染は、吸血によってバベシア感染赤血球がマダニ中腸内に取り込まれ、ガメトゴニー及びシゾゴニーによって増殖をする。唾液腺に移行したバベシア原虫はスポロゴニーによって増殖し、生じたスポロゾイト期の原虫はマダニの吸血によって宿主体内に侵入する。

10

【0006】

本発明者らは、マダニが有する微生物に対する先天的防御機構に着目し、これまでに各種の自然免疫関連分子を単離してきた。ピロプラズマ原虫やマラリア原虫を媒介するマダニや蚊は、進化の過程でそれらの原虫に対する抵抗性を確立してきたと想定され、それらの関連分子はピロプラズマ症防除のための新しい薬剤の開発に応用できるものと考えられ本発明者らを含め各国で関連の研究が精力的に実施されている(Hoffmann JA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11152-1153(1997))。

20

【0007】

【非特許文献1】

Fujisaki, Natl. Insit. Anim. Hlth Quart. (Tokyo) 18:27-38(1978)

【非特許文献2】

Willadesen and Jogejan, Parasitology Today 15:258-262(1999)

【非特許文献3】

Hoffmann JA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11152-1153(1997)

30

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ピロプラズマ原虫及びピロプラズマ原虫が属するマラリア原虫等をアピコンプレックス門の赤血球内寄生原虫による寄生虫感染症から人及び動物を守るための化合物の合成を提供し、様々な人畜共通のアピコンプレックス門の赤血球内寄生原虫による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、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質、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、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質に対する抗体及びピロプラズマ原虫の感染及び増殖を防ぐ化合物の提供を目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ピロプラズマ原虫の媒介者であるフタトゲチマダニの抗微生物蛋白質に着目し、その中からピロプラズマ原虫に対して殺虫作用を示すペプチド蛋白質を分離した。本発明者らは、マダニから分離したペプチド蛋白質がピロプラズマ原虫の発育・生存、とりわけ赤血球内に寄生する原虫ステージ、メロゾイトの原虫に対して増殖を抑制することを発見した。ピロプラズマ原虫は、マラリア症の病原虫であるプラスモディウム原虫と媒介者が異なるものの寄生虫特有の発育環はほぼ同一であり、ピロプラズマ症及びマラリア症ともに臨床症状を示すいわゆる発症状態を導く原虫ステージはメロゾイト期である。これまでにアピコンプレックス門に属する赤血球内原虫から本発明者らが分離したペプチド蛋白質がピロプラズマ原虫の発育・生存に重要であることが示された報告はなく、ピロブ

40

50

ラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードする遺伝子及びその組換え蛋白質は赤血球寄生のアピコンプレックス門原虫感染の予防・防除を目的とした化合物の作出に有効である。

【0010】

本発明者らは、ピロプラズマ原虫から新規なピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードするDNAを単離し、該DNAがコードする抗原ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の組換え抗原及びその蛋白質をもとに構築した合成ペプチドを得て、これらをピロプラズマ原虫培養液に添加したところピロプラズマ原虫の発育が完全に阻止されることを見出し、該蛋白質のピロプラズマ原虫殺虫作用を突き止め本発明を完成するに至った。本発明はピロプラズマ原虫におけるピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードする遺伝子(H1Dfs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

10

【0011】

即ち、本発明は以下のとおりである。

(1) 以下の(a)又は(b)に示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードするDNA、

(a) 配列表の配列番号2で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のアミノ酸配列を有する蛋白質

20

(b) 配列表の配列番号2で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、かつマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質

(2) 以下の(c)又は(d)に示すDNAである(1)のDNA、

(c) 配列表の配列番号1の25位から246位の塩基配列を含むDNA

(d) 配列表の配列番号1の25位から246位の塩基配列を含むDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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)若しくは(b)に示すペプチド蛋白質又はその断片、

30

(a) 配列表の配列番号2で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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で示すマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、かつマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質

(4) 以下の(e)から(i)のいずれかのアミノ酸配列を含みマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有する、(3)記載のマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の断片、

(e) 配列番号2のアミノ酸配列の第23位のアミノ酸から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

40

(f) 配列番号2のアミノ酸配列の第22位から第37位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(g) 配列番号2のアミノ酸配列の第33位から第47位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(h) 配列番号2のアミノ酸配列の第43位から第57位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(i) 配列番号2のアミノ酸配列の第53位から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列

(5) (3)または(4)のペプチド蛋白質を有効成分とするマダニのピロプラズマ原

50

虫駆除剤、

- (6) (1)または(2)のDNAを含む組換え体分子、  
 (7) (1)または(2)のDNAを含むベクター、  
 (8) (7)のベクターを含む組換え体細胞、  
 (9) (8)の組換え体細胞を培養し、その培養物からマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を採取することを特徴とする、マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を産生する方法、  
 (10) (3)のマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を認識する抗体、および  
 (11) モノクローナル抗体である(10)の抗体。

10

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

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 Lane (1988): Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 獣医住血微生物学 近代出版(1986); 獣医寄生虫学、獣医臨床寄生虫学編集委員会編、文英堂(1998); 標準医動物学 第2版, 医学書院(1998)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。

20

【0014】

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ピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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(例えば1から10個、好ましくは1から5個、さらに好ましくは1または2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、かつピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、かつピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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。

30

【0015】

また、本発明のDNAは配列表の配列番号2で示すピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のアミノ酸配列のうちシグナル配列を除いた第23位のアミノ酸から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するペプチド蛋白質又はその断片であって、ピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有するペプチド蛋白質又はその断片をコードするDNAを含む。

40

【0016】

さらに、本発明のDNAは、配列番号1の25位から247位までの塩基配列からなるDNA(ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードする遺伝子(H1Dfs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、ピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードするDNA配列とBLAST等(例えば、デフォ

50

ルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに90%以上の同一性、好ましくは95%以上の同一性、より好ましくは97%以上の同一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。

## 【0017】

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(例えば1から10個、好ましくは1から5個、さらに好ましくは1または2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、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の同一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、ピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質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ピロプラズマ原虫殺虫能を有することを意味する。ピロプラズマ原虫殺虫活性能を有するか否かは後記の実施例7に記載の方法により決定することができる。

## 【0018】

さらに、本発明は配列表の配列番号2で示すピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のアミノ酸配列のうちシグナル配列を除いた第23位のアミノ酸から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するペプチド蛋白質の断片であって、ピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有するペプチド蛋白質又はその断片を含む。このような断片として例えば、配列番号2のアミノ酸配列の第23位のアミノ酸から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド、第22位から第37位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P1)、第33位から第47位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P2)、第43位から第57位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P3)、第53位から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P4)が挙げられる。

## 【0019】

本発明のピロプラズマ原虫感染幼虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードするcDNAは、以下のような方法で得ることができる。

## 【0020】

本発明で使用したマダニであるフタトゲチマダニ、*Haemaphysalis longicornis*は、独立行政法人農業技術研究機構 動物衛生研究所原虫病研究室より得ることができる。Fujisaki [Fujisaki et al., Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 16, 122-128, (1976)]らの方法によって成ダニを生産し、Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform法 [Chomczynski et al., Anal Biochem 162: 156-159 (1987)]にてTotal RNAを抽出した。Total RNAよりmRNA Isolation Kit (Oligotex-dT30, Takara社)を用い、メーカーの推奨する方法に従いpoly A+ RNAを精製した。例えば、成ダニを、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。

## 【0021】

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

10

20

30

40

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。

【0022】

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

【0023】

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析装置を用いて配列を決定することもできる。

20

【0024】

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。

【0025】

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、パキウウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40とその誘導體等が挙げられる。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。

30

【0026】

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、例えば細菌性のもものではpQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pBluescriptIIKS、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T(Pharmacia)、pET-11a(Novagen)、真核性のもものではpXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、SV40(Pharmacia)等がある。

40

【0027】

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。

【0028】

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。

【0029】

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ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を発現、産生させることができる。

10

【0030】

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

【0031】

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。

【0032】

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

【0033】

マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質に対する抗体は、以下のようにして調製することができる。

【0034】

該ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をもとに作製した合成ペプチドを牛血清アルブミン (*BSA*) やキーホールリンベットヘモシアニン (*KLH*) と結合させてコンジュゲート抗原として、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、抗ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質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、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質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ピロプラズマ原虫感染幼虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質は、ピロプラズマ原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良い

40

50

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良い。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。

#### 【0035】

本発明のペプチド蛋白質又はその断片は、マダニのピロプラズマ原虫駆除剤として用いることができる。すなわち、本発明はピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質またはその断片を有効成分として含むマダニのピロプラズマ原虫駆除剤を含む。すなわち、配列表の配列番号2で示すピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のアミノ酸配列のうちシグナル配列を除いた第23位のアミノ酸から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するペプチド蛋白質の断片であって、ピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の生物学的活性を有するペプチド蛋白質又はその断片を含むマダニのピロプラズマ原虫駆除剤も本発明に包含される。このような断片として例えば、配列番号2のアミノ酸配列の第23位のアミノ酸から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド、第22位から第37位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P1)、第33位から第47位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P2)、第43位から第57位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P3)、第53位から第74位のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド(P4)が挙げられる。

#### 【0036】

本発明の分離したピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質は、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる駆除剤は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン性界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。その投与量は、症状、年齢、体重および投与経路に依存するであろうから、医師の判断及び各患者の状況に応じて決定すべきである。有効用量は、*in vitro*における試験または*in vivo*の動物モデル試験系から導かれる。

#### 【0037】

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、ならびにその応用も含まれる。

本発明のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質及び核酸は、ピロプラズマ原虫が属するマラリア原虫等を含むアピコンプレックス門の赤血球内寄生原虫による人および動物の寄生虫病予防及び治療を目的とした化合物の合成、あるいはそれら原虫による寄生虫感染の治療薬の開発に応用できる。

#### 【0038】

##### 【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。

#### 【0039】

10

20

30

40

50

実施例1 本発明におけるピロプラズマ原虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質塩基配列の分離及び決定

フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の成ダニは、独立行政法人農業技術研究機構 動物衛生研究所原虫病研究室より得ることができる。Fujisaki [Fujisaki et al., Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 16, 122-128, (1976)] の方法によって成ダニを生産し、以下の操作に供した。マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をコードする遺伝子は、PCR法をもとに得た。節足動物の抗菌ペプチドをコードする遺伝子をもとに遺伝子間で保存されている塩基配列をもとに遺伝子断片増幅のためのPCRプライマーを作製した。成ダニcDNAは成ダニより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。Dfs.f3 (5'-AGMGGNTAYGGNTGYCC-3' ; センス (配列番号3)) 及びDfs.r4 (5'-TARCA Y T T R C A N G T Y T G Y T T - 3' ; アンチセンス (配列番号4)) プライマーで成ダニcDNAを鋳型にPCRを実施した。PCR反応は50µlの反応液 [1ng 成ダニ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 MgCl<sub>2</sub>、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、回収液を直ちにTAK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

30

40

50

#### 【0040】

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。塩基配列解析の結果から、遺伝子増幅断片は約100bpであった。そこでマダニ抗菌ペプチドをコードする完全長のcDNAを得るために5'及び3'RACE法を用いて欠損部位遺伝子を増幅した。増幅にはMarathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification kit (クローンテック) を使用し、メーカーの推奨する方法に従い、上記に記載した100bpの塩基配列情報をもとに作製したPCRプライマーを用いてPCR反応を実施した。得られた増幅断片はそれぞれTAKローニングベクターに挿入し、定法に従って塩基配列を決定した。

#### 【0041】

マダニの抗菌ペプチドをコードする完全長のcDNAは、455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デニレーション及びポリAテイルが確認された。塩基配列から推定される蛋白質は74残基のアミノ酸から構成され、その内N末領域には22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8,024Daで等電点は8.4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、5,821Da、等電

点は 8.3 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、25 位から 246 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同性検索から、本発明で示す推定アミノ酸構造は、節足動物の抗菌ペプチドと類似性を示した。最も高い類似性を示した蛋白質はさそり由来の抗菌ペプチドであった。

#### 【0042】

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マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質 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成ダニ cDNA、センスプライマー (5' - CCG AGC TC  
G AGA CAA GAT GAC GAG AGT GAC GTG CCC - 3' 10  
; CTCGAG は XhoI サイト; 配列番号 5) とアンチセンスプライマー (5' - CC  
G AAT TCC TAC TTG CGG TAG CAC GTG CAG G  
- 3' ; GAATTC は EcoRI サイト; 配列番号 6) を用いた PCR 反応にて増幅  
した。

#### 【0043】

PCR 反応は 50  $\mu$ l の反応液 [1 ng 成ダニ cDNA、1  $\mu$ M センス及び 1  $\mu$ M アン  
チセンスプライマー、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 U 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 °C にて 30 秒間、60 °C にて 30 秒間、72 °C にて 2 分間の反応を 20  
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 EcoRI 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 Eco  
RI 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  
からマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質コード領域の挿入されたクローンを選  
択した。

#### 【0044】

実施例 3 大腸菌におけるピロプラズマ原虫感染幼虫のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋  
白質の作出及び、作出した蛋白質の性状  
形質転換した大腸菌を 37 °C でアンピシリンを含んだ SOB 液で培養し、培養後 SOB 液  
の OD<sub>600</sub> が 0.5 に到達した時点で 1 mM の IPTG を添加し、さらに 3 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 15% 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 10 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 40  
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。TBS-T 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 10 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)<sub>6</sub> 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、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の 6 kDa  
組換え抗原蛋白質を示している。

#### 【0045】

実施例 4 大腸菌からのマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の精製、及び精製  
したマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質組換え体蛋白質に対する抗体作製

マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質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-Lyzer<sup>TM</sup> Dialysis Cassette（ピラス社）を用いてリン酸緩衝食塩液中にて透析を行った。この精製したマダニピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質組換え体蛋白質は、さらにより精製度を上げるためにSDS-PAGE精製と組換えピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質に付加されているヒスチジンを含む約4 kDaを除去するための酵素処理を加えた。

10

## 【0046】

SDS-PAGE精製は、14%の均一ポリアクリルアミド（SDS-PAGE）を使用し、Laemmliらの方法に従い、上記で精製したマダニピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質組換え体蛋白質を電気泳動し、Zink Stain Kit（バイオラッド）によるネガティブ染色を施した後、約10 kDaに位置する組換え体蛋白質を含むゲル片を切り出した。ゲル片は直ちにアトプレップMF（アトー）を用いてメーカーの推奨する方法に従い、ゲル片内にある組換え体蛋白質を溶出させた。得られた組換え体蛋白質はトリス緩衝液（20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl）で一昼夜、4 で透析した。

## 【0047】

N末端付加部位4 kDaの除去は、EK AWAY（インビトロゲン社）を用いてメーカーの推奨する方法に従って実施した。

20

## 【0048】

マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質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（Tsujiet al., Mol Biochem Parasitol 97: 69-79, (1998)）。マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の推定アミノ酸配列から親水性に富む領域を選択し、アミノ酸17残基からなる合成ペプチドを作製した。牛血清アルブミンとコンジュゲーションした合成ペプチド50 µgをTiter Max Gold<sup>TM</sup>（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。作製された抗血清はウエスタンブロット解析によって、ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質組換え体蛋白質10 kDaの組換え蛋白質と強く反応することが確認された。

30

## 【0049】

実施例5 イムノブロット法によるネイティブ（天然型）マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の性状

実施例4で作製したマウスのマダニピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質組換え体蛋白質免疫血清を用いて、マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質抽出液のSDS-PAGE/イムノ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のピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質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BRLL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6 kDaの単一バンドが確認され、マダニ抽出蛋白質中の天然型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質が同定できた。

40

## 【0050】

実施例6 免疫組織化学法によるマダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の局在

50

フタトゲチマダニの成ダニをリン酸緩衝液 ( P B S ) にパラホルムアルデヒドを 4 % になるように調製した溶液で虫体を固定し、定法に従ってパラフィン切片を作製した。キシレン・アルコール系列を通した組織切片を 10 % 正常ヤギ血清で 30 分ブロッキングした。組織切片に P B S で 100 倍に希釈されたマウスのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質組換え体蛋白質免疫血清と一晚反応させた。P B S - T w e e n 20 ( P B S T ) 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、ビオチン標識された抗マウス - I g G 抗体 ( カッセル社 ) と 20 分反応させた。P B S T で洗浄した後、ペルオキダーゼ標識されたアビジンを 20 分反応させ、P B S T で洗浄した後基質ジアミノベンチジンテトラヒドロクロライド ( シグマ社 ) を用いて可視化した。その結果、天然型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の局在を示す陽性反応は、マダニの消化器官である中腸上皮に確認され、その発現は吸血によって著しく増加することが確認された。

10

## 【 0 0 5 1 】

実施例 7 マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の原虫殺虫活性の解析ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の殺虫作用は馬バベシア症の病原虫である *B. equi* 原虫のメロゾイト期の *In vitro* 培養系 [ *Avarzed et al. , J. Clin. Microbiol* 36 : 1835 - 1839 ( 1998 ) ] を用いて調べた。この培養系は *B. equi* の赤血球内ステージであるメロゾイト期の発育を再現できるものである。*In vitro* 培養系に推定アミノ酸配列から想定される成熟蛋白質の組換え型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質を添加し、経時的にギムザ染色した培養液塗末標本を作製し、顕微鏡下で *B. equi* 原虫の赤血球寄生率を計数した。組換え型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質 ( 5  $\mu$ g / ml ) の添加によって、原虫寄生率は顕著に減少し、添加後 2 日目に寄生原虫はほぼ消失した ( 図 2 )。対照に使用した - ヒトディフェンシン及び - ヒトディフェンシン - 1、 - ヒトディフェンシン - 2 ( ペプチド研究所 ) 添加群の寄生率は無処置群と同一であった。成熟蛋白質の組換え型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質をもとに作製した 16 から 22 アミノ酸残基からなる 4 種の合成ペプチド ( P 1 , P 2 , P 3 , P 4 ) を *In vitro* 培養系に添加し原虫の赤血球寄生率を計数した。それぞれのペプチドのアミノ酸配列は以下の通りであった。

20

P 1 : G l n A s p A s p G l u S e r A s p V a l P r o H i s V a l A r g V a l A r g A r g G l y ( 配列番号 7、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 22 ~ 37 位のアミノ酸 )

30

P 2 : A r g V a l A r g A r g G l y P h e G l y C y s P r o L e u A s n G l n G l y A l a C y s ( 配列番号 8、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 33 ~ 47 位のアミノ酸 )

P 3 : A s n G l n G l y A l a C y s H i s A s n H i s C y s A r g S e r I l e G l y A r g A r g ( 配列番号 9、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 43 ~ 57 位のアミノ酸 )

P 4 : S e r I l e G l y A r g A r g G l y G l y T y r C y s A l a G l y I l e I l e L y s G l n T h r C y s T h r C y s T y r A r g L y s ( 配列番号 10、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 53 ~ 74 位のアミノ酸 )

40

## 【 0 0 5 2 】

各合成ペプチド ( 10  $\mu$ g / ml ) の添加によって、寄生率は培養開始後 2 日目より減少を開始した。無処置群の寄生率は培養後 4 日目で約 6 % であったのに対して、P 1 群では約 3 . 5 %、P 2、P 3 及び P 4 群ではいずれも約 2 . 5 % まで減少した。さらに、合成ペプチド ( 15  $\mu$ g / ml ) を添加し寄生率を 4 日間調べたところ、寄生率は 2 日目より減少し、4 日目で P 2 群では約 1 . 5 %、P 3 及び P 4 群では約 1 % まで減少した。これらの成績から、52 アミノ酸残基で構成される組換え型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のピロプラズマ原虫の発育阻止が確認され、その効果は合成ペプチドでも認められることから、マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質にピロプラズマ原虫の殺虫作用が存在することが分かった。

50

## 【 0 0 5 3 】

## 【 発明の効果 】

本発明により、マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド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、マダニのピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質、該抗原を認識する抗体はピロプラズマ原虫が属するマラリア原虫等をアピコンプレックス門の赤血球内寄生原虫による寄生虫感染症防除を目的とした化合物の合成及び治療薬に応用できる。

## 【 0 0 5 4 】

## 【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

- <110> National Agricultural Research Organization  
 <110> Bio-oriented Technology Research Advancement Institution
- <120> Tick-Piroplasma-parasiticidal peptide, nucleic acid  
 molecules, and uses thereof 10
- <130> P03-0044
- <140>  
 <141>
- <160> 10 20
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1  
 <211> 456  
 <212> DNA  
 <213> Haemaphysalis longicornis 30
- <220>  
 <221> CDS  
 <222> (25)..(246)
- <400> 1  
 cacgctgacc atatacaagc agac atg aag gtc ctg gct gtt gcc ctc atc 51 40  
 Met Lys Val Leu Ala Val Ala Leu Ile



1

5

ttc gtc ctt gta gcg gga ctc ttc tgc aca gca gca gct caa gat gac 99  
 Phe Val Leu Val Ala Gly Leu Phe Cys Thr Ala Ala Ala Gln Asp Asp  
 10 15 20 25

gag agt gac gtg ccc cac gtc aga gtc cga cgc ggc ttt ggc tgc ccg 147  
 Glu Ser Asp Val Pro His Val Arg Val Arg Arg Gly Phe Gly Cys Pro  
 30 35 40

ctt aac cag ggc gcc tgc cac aac cat tgc cgt agc att ggg cgg cgc 195  
 Leu Asn Gln Gly Ala Cys His Asn His Cys Arg Ser Ile Gly Arg Arg  
 45 50 55

gga gga tac tgc gcg gga atc atc aaa cag acc tgc acg tgc tac cgc 243  
 Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Ile Ile Lys Gln Thr Cys Thr Cys Tyr Arg  
 60 65 70

aag tagagacaac ttcgctctgc ggccgccgac gacacgcctc gcaaccgaa 296  
 Lys

ggagaaccaa gttectatac actgttcagc acaagtgaac tcagccagca gctctggctc 356

acacattcac atgtggccat tagcgttgta gcgattatgt gtgtcgtcat aataaaagct 416

gagatatac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 456

10

20

30

40

<211> 74

<212> PRT

<213> *Haemaphysalis longicornis*

<400> 2

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

1 5 10 15

10

Phe Cys Thr Ala Ala Ala Gln Asp Asp Glu Ser Asp Val Pro His Val

20 25 30

Arg Val Arg Arg Gly Phe Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gly Ala Cys His

35 40 45

20

Asn His Cys Arg Ser Ile Gly Arg Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Ile

50 55 60

Ile Lys Gln Thr Cys Thr Cys Tyr Arg Lys

65 70

30

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<221> misc#feature

<222> (6)

<223> n is A, T, C or G

<220>

<221> misc#feature

<222> (12)

<223> n is A, T, C or G

<400> 3

agmggtayg gntgycc

17

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<221> misc#feature

<222> (12)

<223> n is A, T, C or G

<400> 4

10

20

30

40

tarcayttirc angtytgytt

20

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 5

ccgagctcga gacaagatga cgagagtgac gtgccc

36

20

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 6

ccgaattcct acttgcggta gcacgtgcag g

31

<210> 7

40

<211> 15

<212> PRT

<213> *Haemaphysalis longicornis*

<400> 7

Gln Asp Asp Glu Ser Asp Val Pro His Val Arg Val Arg Arg Gly  
 1                    5                    10                    15

10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> *Haemaphysalis longicornis*

<400> 8

Arg Val Arg Arg Gly Phe Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gly Ala Cys  
 1                    5                    10                    15

20

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> *Haemaphysalis longicornis*

30

<400> 9

Asn Gln Gly Ala Cys His Asn His Cys Arg Ser Ile Gly Arg Arg  
 1                    5                    10                    15

40

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> Haemaphysalis longicornis

<400> 10

Ser Ile Gly Arg Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Ile Ile Lys Gln Thr  
 1                    5                    10                    15

10

Cys Thr Cys Tyr Arg Lys  
 20

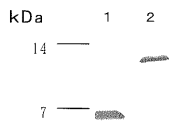
【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 マダニの天然型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の発現及び組換え型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質の結果を示す図である。

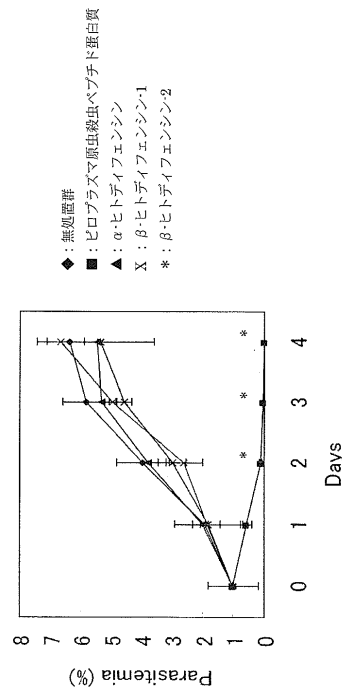
【 図 2 】 組換え型ピロプラズマ原虫殺虫ペプチド蛋白質のピロプラズマ原虫殺虫効果を示す図である。

20

【 図 1 】



【 図 2 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
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 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 バトツェツェグ バダガル

北海道帯広市大空町9 - 6 大空丘242

(72)発明者 新川 武

沖縄県那覇市首里石嶺町2 - 9 6 - 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 - 2 - 7 - 3 0 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA67 CA04 CA06 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04  
GA11  
4B064 AG01 AG27 AG30 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24  
DA02 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA86Y AA90X AB01 BA02 CA23 CA24 CA34  
CA44  
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA20 CA49 DC50 MA17 MA23  
MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA60 MA66 ZB382  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA20 DA76 DA83 EA29 FA72  
FA74