

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 250555

(P2003 - 250555A)

(43)公開日 平成15年9月9日(2003.9.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/435	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/435		C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		33/543	501 A
33/543	501		545 A

審査請求 未請求 請求項の数 29 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 52151(P2002 - 52151)

(22)出願日 平成14年2月27日(2002.2.27)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71)出願人 591222245

国立感染症研究所長

東京都新宿区戸山一丁目23番1号

(72)発明者 藤田 修

東京都清瀬市中清戸1 - 454 - 141 - 2 - 101

(72)発明者 野崎 智義

東京都江戸川区平井4 - 22 - 2 - 114

(74)代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

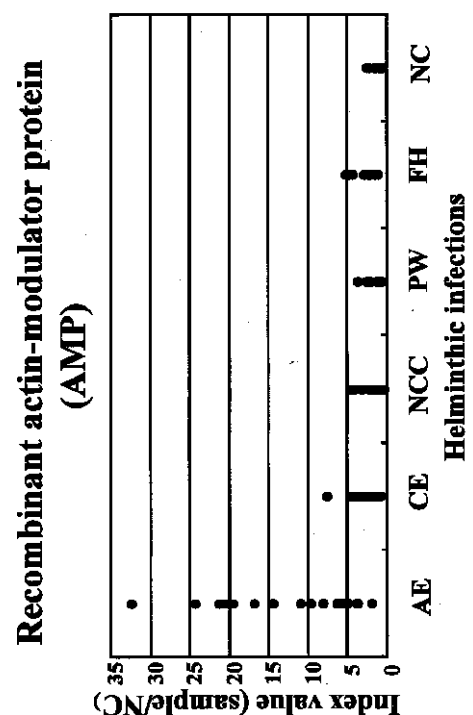
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多包虫抗原およびそれをコードする遺伝子およびヒト多包虫症の診断方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、感受性及び特異性に優れ、かつ、遺伝子組換え技術を利用することによりコスト的にも有利であるような、多包虫症に関する検査方法、診断方法等を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明は、多包虫由来のアクチン調節蛋白質(Actin-modular protein:AMP) をコードする遺伝子、この抗原蛋白質又は一部分から成るポリペプチドに対する抗体を検出する免疫学的測定方法、及びヒト多包虫症の診断方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 多包虫由来のアクチン調節蛋白質をコードする DNA。

【請求項 2】 以下の (a) 又は (b) の蛋白質をコードする塩基配列又はその部分配列を含有する DNA：

(a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、(b) アミノ酸配列 (a) 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からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

【請求項 3】 以下の (a) 又は (b) の塩基配列又はその部分配列を含む DNA：

(a) 配列番号 1 で示される塩基配列、(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質をコードする塩基配列。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の DNA を含有する組換え発現ベヒクル。

【請求項 5】 発現ベクターである請求項 4 に記載の組換え発現ベヒクル。

【請求項 6】 pBR322 由来発現ベクターである請求項 5 に記載の組換え発現ベヒクル。

【請求項 7】 請求項 4、5 又は 6 に記載の発現ベヒクルによって形質転換された形質転換体。

【請求項 8】 細菌である請求項 7 に記載の形質転換体。

【請求項 9】 大腸菌である請求項 8 に記載の形質転換体。

【請求項 10】 多包虫由来のアクチン調節蛋白質。

【請求項 11】 以下の (a) 又は (b) のアクチン調節蛋白質。(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、(b) アミノ酸配列 (a) 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からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

【請求項 12】 請求項 10 又は 11 記載の蛋白質の一部分から成るポリペプチド。

【請求項 13】 請求項 10 又は 11 記載の蛋白質を活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

【請求項 14】 請求項 12 記載のポリペプチドを活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

【請求項 15】 請求項 13 又は 14 記載の多包虫症診断用試薬を含むキット。

【請求項 16】 更に、多包虫の他の抗原蛋白質を診断用試薬として含む、請求項 15 記載の多包虫症診断用キット。

【請求項 17】 多包虫の他の抗原蛋白質がサイトビリンである、請求項 16 記載の多包虫症診断用キット。

【請求項 18】 請求項 9 又は 10 記載の蛋白質を抗原として用い、被検体中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方法。

*【請求項 19】 ELISA 法であることを特徴とする、請求項 18 記載の測定方法。

【請求項 20】 イムノプロット法であることを特徴とする、請求項 18 記載の測定方法。

【請求項 21】 検体が被験者の血清であることを特徴とする、請求項 18 乃至 20 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 22】 請求項 11 又は 12 記載のポリペプチドを抗原として用い、被検体中の請求項 9 又は 10 記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方法。

【請求項 23】 ELISA 法であることを特徴とする、請求項 22 記載の測定方法。

【請求項 24】 イムノプロット法であることを特徴とする、請求項 22 記載の測定方法。

【請求項 25】 検体が被験者の血清であることを特徴とする、請求項 22 乃至 24 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 26】 請求項 9 又は 10 記載の蛋白質を抗原として用い、被験者の体液中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

【請求項 27】 体液が血清であることを特徴とする、請求項 26 記載の診断方法。

【請求項 28】 請求項 11 又は 12 記載のポリペプチドを抗原として用い、被験者の体液中の請求項 9 又は 10 記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

【請求項 29】 体液が血清であることを特徴とする、請求項 28 記載の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な多包虫抗原蛋白質及びそれをコードする遺伝子、この抗原蛋白質又は一部分から成るポリペプチドに対する抗体を検出する免疫学的測定方法、及びヒト多包虫症の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】多包虫症は、北緯 40 度以北特に、日本国内では北海道のほぼ全域及び青森県にも見られ、キツネ、イヌ、ネコ及びタヌキ等を終宿主とする多包条虫(*Echinococcus multilocularis*) の虫卵が偶発的にヒトに感染することによって引き起こされる疾患である。世界における多包虫症患者は 10 万～30 万人と推定され、日本でも 1998 年までの患者累計が 373 名となっている。

【0003】多包虫の寄生部位は、主に、肝臓、時には肺及び脳であり、多包虫症は肝機能障害等を引き起こし、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では 4 類感染症に分類される、致死率の高い疾患である。

【0004】その病態としては、無症状期が10年と長く、血液検査でも異常なしとされることが多く、感染後10年以上経過した進行期では、肝腫大、及びき肋骨部不快感が見られ、末期では肝腫が顕著となり、肝機能障害が進行し、腹水及び門脈圧亢進症状、黄疸、及び悪液質が見られ、肝性昏睡に陥り危篤状態となる。多包虫症に対する効果的な薬物治療はなく、根治治療としては、現在のところ外科的切除以外にはない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】多包虫症の診断方法としては、問診、免疫学的診断、腹部単純撮影、超音波検査及びCTスキャン等がある。

【0006】特に、従来行われてきた免疫学的診断としては、多包虫から分離・精製したEm2（糖蛋白質）と組換え蛋白質であるサイトビルリン（cytovillin）との混合抗原を使用したELISA法がある。該診断方法は感度が高いものの、近縁種との交叉反応がかなり認められ（単包虫症とは約25%）、更に高い精製度の蛋白質が必要とされるために高価であり、感染者の一次スクリーニング及び確定・除外診断には適当ではなかった。

【0007】又、多包虫の粗抗原を用いたELISA法も検討されているが、該方法はコスト面では有利であるものの、粗抗原を使用しているために非特異的反応が多く、確定・鑑別診断として使用するには問題があった。

【0008】本発明者は、感受性及び特異性に優れ、かつ、遺伝子組換え技術を利用することによりコスト的にも有利であるような、多包虫症に関する検査方法、診断方法等を提供すべく、鋭意研究の結果、多包虫由来の新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子を見出し、本発明を完成した。

【0009】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、以下の各態様に係るものである。

1．多包虫由来のアクチン調節蛋白質(Actin-modular protein:AMP) をコードするDNA。

2．以下の(a)又は(b)の蛋白質をコードする塩基配列又はその部分配列を含有するDNA：(a)配列番号1に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、(b)アミノ酸配列(a)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からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

3．以下の(a)又は(b)の塩基配列又はその部分配列を含むDNA：(a)配列番号1で示される塩基配列、(b)塩基配列(a)からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つ、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質をコードする塩基配列。

4．上記1乃至3のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換え発現ベヒクル(Vehicle)。尚、組換え発現ベヒクルは当業者に周知の任意の遺伝子工学的手法によって調製することが出来、その種類としては、例えば、各

種プラスミドベクター及びウイルスベクター等の発現ベクター、コスミド、並びにファージ等を挙げることが出来る。

5．発現ベクターである上記4に記載の組換え発現ベヒクル。

6．pBR322由来発現ベクターである上記5に記載の組換え発現ベヒクル。

7．上記4、5又は6に記載の発現ベヒクルによって形質転換された、細菌等の原核細胞、並びに、酵母及び哺乳動物細胞等の各種真核細胞である形質転換体。

8．細菌である上記7に記載の形質転換体。

9．大腸菌である上記8に記載の形質転換体。

10．多包虫由来のアクチン調節蛋白質、特に、組換え体である該蛋白質。

11．以下の(a)又は(b)のアクチン調節蛋白質、特に、組換え体である該蛋白質。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、(b)アミノ酸配列(a)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からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

12．上記10又は11記載の蛋白質の一部分から成るポリペプチド。

13．上記10又は11記載の蛋白質を活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

14．上記12記載のポリペプチドを活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

15．上記13又は14記載の多包虫症診断用試薬を含むキット。このキットには、例えば、反应用プレート、各種緩衝液、希釈液、洗浄液、ブロッキング用溶液、各種酵素結合血清等の2次試薬、及び反応試薬（発色化合物）等の、一般に検査キットに必要な当業者には周知のその他の任意の成分の中から、診断に用いる反応原理に基づき、適宜選択して含ませることが出来る。

16．更に、多包虫の他の抗原蛋白質を診断用試薬として含む、上記15記載の多包虫症診断用キット。

17．多包虫の他の抗原蛋白質がサイトビルリンである、上記16記載の多包虫症診断用キット。

18．上記9又は10記載の蛋白質を抗原として用い、被検体中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、当業者には公知の各種の免疫学的測定方法。

19．ELISA法であることを特徴とする、上記18記載の測定方法。

20．イムノプロット法であることを特徴とする、上記18記載の測定方法。

21．検体が被験者の血清であることを特徴とする、上記18乃至20のいずれか一項に記載の測定方法。

22．上記11又は12記載のポリペプチドを抗原として用い、被検体中の上記9又は10記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方

法。

23. ELISA法であることを特徴とする、上記22記載の測定方法。

24. イムノプロット法であることを特徴とする、上記22記載の測定方法。

25. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、上記22乃至24のいずれか一項に記載の測定方法。

26. 上記9又は10記載の蛋白質を抗原として用い、被験者の体液中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

27. 体液が血清であることを特徴とする、上記26記載の診断方法。

28. 上記11又は12記載のポリペプチドを抗原として用い、被験者の体液中の上記9又は10記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

29. 体液が血清であることを特徴とする、上記28記載の診断方法。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明に係るDNA及び蛋白質などは、当該技術分野に於いて周知の技術を用いて取得調製することができる。

【0011】更に、本発明の診断用試薬及びキットも当業者であれば本願明細書中の実施例の記載などに基づき容易に製造することができる。

【0012】又、本発明の免疫学的測定方法も、当業者に公知である様々な原理、手法に基づき実施することができる。尚、本発明の多包虫由来のアクチン調節蛋白質のアミノ酸配列(343個)、及びそれをコードするDNAの塩基配列(1092塩基対)は下記に示した。

【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【0014】実施例1

多包虫由来のアクチン調節蛋白質をコードするDNAの取得・塩基配列の決定

(1) 幼虫組織からの全RNAの抽出

国立感染症研究所で継代維持しているスナネズミ腹腔内より回収した多包虫(幼虫組織)を細切し、RNAqueous Kit (Ambion, USA)を用いて、その常法に従いtotal RNA (7.4µg/370µl)を抽出した。

(2) cDNAの合成、発現ライブラリーの作成

cDNAの合成はZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene, USA)を用いて、その常法に従い行った。先に抽出したtotal RNAより合成したcDNAはZAP Express vector (pBK-CMV phagemid vector)のXho I siteへ挿入し(Xho I; New England Biolabs, USA)、それらが大腸菌XL1-Blue MRF'株に導入し、形質転換を行った。

(3) 多包虫症患者血清を用いた反応クローンの選択

形質転換を行った大腸菌の培養プレートに形成されたプラークをHybond-N; positively charged nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, UK)にて鋳型を取り、これらを多包虫症患者血清を用いて抗原抗体反応で陽性反応を示すプラークを選択した。

(4) 抗原遺伝子の塩基配列の決定等

陽性反応を示したプラークからPlasmid Mini Kit (QIAGEN, Germany)を用いてプラスミドDNAを精製した。挿入断片のDNAシーケンスはアプライドバイオシステムズABI Prism 300 (Applied Biosystems, USA)を用いて決定した。得られたDNA塩基配列の解析は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のSequence Information Survey (BLAST)を用いて行った。その結果、今回、新たに見出した3種類を含む全8種類のcDNAを得ることができた。それらを以下の表1に示す。

【0015】

【表1】

獲得した主要な抗原遺伝子

- Cyto villin (=Em10, antigen II/3): *E. multilocularis*
- Glutathione S-transferase (GST) :*E. multilocularis*
- **Actin-filament fragmenting protein ** : *Echinococcus granulosus** (97% identity)**
- **Thioredoxin peroxidase: *E. granulosus* (96%)**
- **Dynein light chain: *Drosophila melanogaster* (85%)**
- AdamsAS (=Antigen6) : *E. granulosus* (80%)
- Calcium binding protein: *Schistosoma* spp. (48%)
- Actinin: human alpha-actinin 2 (36%)

* 部分的なアミノ酸配列の同一性 が最も高い種名

** 今回の研究で多包虫(*E. multilocularis*) より獲得した新規の抗原遺伝子はアンダーラインで示した。

【0016】実験例2

組換えアクチン調節蛋白質(Actin Modulator Protein)の作成:

(1) 発現ベクターの作成、及び各ベクターを用いた組換え蛋白質の発現

実験例1(4)で得られた挿入断片をPCR法にて増幅し、制限酵素 (BamHI; NewEngland Biolabs, USA)で切断したpGEX-2Tベクター (GST 融合タンパク質発現用ベクター; Amersham Pharmacia Biotech, UK)に挿入し、さらに大腸菌(DH5 α)にて形質転換させ、IPTG (イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド; ナカライ、日本)を添加し、大量の組換え蛋白を作成した。

(2) 発現蛋白質の分離・精製等

GST融合蛋白質を合成した大腸菌細胞は超音波破碎し、Glutathione Sepharose 4Bカラム (Amersham Pharmacia Biotech, UK)を通すことによりGST融合蛋白質のみをカラムに吸着させた。0.1% トライトン・PBSでカラムを洗浄後、Thrombin (Amersham Pharmacia Biotech, UK)にて組換え蛋白質画分を溶出された。

【0017】実験例3

ELISAキットの作成及び検出:

(1) ELISA法による測定系の開発

組換え蛋白質濃度を5 μ g/mlになるようアルカリ溶液 (0.05M Bicarbonate buffer) で希釈し、96穴マイクロタイター・プレート(Immulon 2HB; Dynex Technologies, USA)に100 μ lずつ各ウェルに滴下し、37 $^{\circ}$ Cで2時間プレートへ蛋白の固相化を行う。0.05% Tween 20-PBS (PBS/T)で3回洗浄し、使用時まで-30 $^{\circ}$ Cに保存した。

(2) 各キットによる測定

予備実験にて1次及び2次血清の希釈倍率を決定した。抗原を添加した各プレートを1% BSA in PBS/T でブロッキングし、次に1% BSA in PBS/T で200倍希釈した1次血清(各患者血清)、次いで2000倍希釈した2次血清(抗ヒトIgG ペルオキシダーゼ結合; Cappel, USA)を各々37 $^{\circ}$ Cで40分間反応させた。ABTS (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)ニアンモニウム; Sigma, USA)で発色させた後、1.25% フッ化ナトリウム(Sigma, USA)にて停止。その後、ELISA マイクロプレート・リーダー (Model 550; BIO-RAD, USA)で吸光度414nmにて測定した。上記のキットにて使用した抗原の種類を以下の表2に示す。

20 【0018】

【表2】

ELISA⁹¹⁰法

- 用いた抗原
Em crude antigen
recombinant actin-modulator protein (AMP)
recombinant cytovillin
recombinant glutathione S-transferase (GST)
- 交叉反応を検討した各患者血清（検体数）
AE; alveolar echinococcosis (*E. multilocularis*)-22 samples
CE; cystic echinococcosis (*E. granulosus*)-23 samples
NCC; neurocysticercosis (*Taenia solium*)-20 samples
PW; paragonimiasis (*Paragonimus westermani*)-10 samples
FH; fascioliasis (*Fasciola* sp.)-10 samples
NC; negative control-41 samples

【0019】各抗原について得られた結果を図1～図4
 に示す。更に、それらの結果をまとめて以下の表3に示す。
 * 【0020】

【表3】

CONCLUSION

SELECTIVITY

% of false positive

Antigen	(Cut off; 95%)	(Cut off; 100%)
Em crude antigen	2.4% (M+7SD) 2 (PW 2 samples)	0% (M+8SD)
Cytovillin	0% (M+13SD)	0% (M+12SD)
GST	28% (M+7SD) 24 (CE 10; NCC 3; PW 4; FH 7)	20% (M+8SD) 20 (CE 8; NCC 3; PW 4; FH 5)
AMP	3.5% (M+7SD) 3 (CE 1; FH 2)	2.4% (M+10SD) 2 (CE 1; FH 1)

各抗原使用時に、多包虫患者の95%あるいは100%を陽性としたELISA値を各々のCut off valueとして、その値より高い値を示した他の寄生虫症患者血清をfalse positive（交叉反応陽性）とした。その%と各検体数を示した。

【0021】

【発明の効果】本発明により、感受性及び特異性に優れ、かつ、経済的にも優れた、多包虫症に関する検査方

法、診断方法等が提供される。

【0022】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Tecchno
 logy Corporation
 National Institute of Infectious D
 iseases
 <120> Echinococcus multilocula
 ris antigen and its gene and
 diagnostic method of echinococcus
 is
 <130> PA909947
 <140>
 <141>
 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1092
 <212> DNA
 <213> Echinococcus multilocula
 ris
 <220>
 <221> CDS
 <222> (31)..(1059)
 <300>
 <400> 1
 gactctaacg ttgccgacat cggctcagcg atg
 gac aga ggg gtt aag aag gag 54
 Met Asp Arg Gly Val L
 ys Lys Glu
 1 5
 tcc gcg atg acg gag aag tgt tgg gag cct
 gtt ggc aga gca acg tcg 102
 Ser Ala Met Thr Glu Lys Cys Trp Glu Pro
 Val Gly Arg Ala Thr Ser
 10 15 20
 ccc ttc ctc atg gtc tgg cgt gtc aat caa
 ttt acc ctc gag ccg gtc 150
 Pro Phe Leu Met Val Trp Arg Val Asn Gln
 Phe Thr Leu Glu Pro Val
 25 30 35 40
 ccc agt gat gaa att ggg aat ttc tac aat
 ggc gat tcc tac gtc atc 198
 Pro Ser Asp Glu Ile Gly Asn Phe Tyr Asn
 Gly Asp Ser Tyr Val Ile
 45 50 55
 tgc aag gca acg aga agc cct ggt ggt gac
 aag ctg ctc tac aat gtc 246
 Cys Lys Ala Thr Arg Ser Pro Gly Gly Asp
 Lys Leu Leu Tyr Asn Val
 60 65 70
 cat ttc tgg att ggc aag cac agc aca gct
 gat gaa tac ggt acc gct 294

Glu Gly Lys Thr Thr Tyr Met Arg Gln Val
Ala Phe Ser Lys Gln Ser

155

160

165

gtc cac tct ggt gac gtc ttc att ctg gac
ctg ggc agc cgg gcc tat 582
Val His Ser Gly Asp Val Phe Ile Leu Asp
Leu Gly Ser Arg Ala Tyr

170

175

180

cag ttt aac ggc tcc acg tgc tct gct ttt
gag aag agc ttg gct gca 630
Gln Phe Asn Gly Ser Thr Cys Ser Ala Phe
Glu Lys Ser Leu Ala Ala

185

190

195

2

00

gct ttt ctg cag gat ttg gag agc aag cgt
aat gga cgc tgc aat act 678
Ala Phe Leu Gln Asp Leu Glu Ser Lys Arg
Asn Gly Arg Cys Asn Thr

205

210

215

tcc gtc tta gat gaa gcc gac aca cca cag
gat cac gaa ttc tgg act 726
Ser Val Leu Asp Glu Ala Asp Thr Pro Gln
Asp His Glu Phe Trp Thr

220

225

230

gcg cta cct gat gta cct gtg aaa gag tta
gaa cct ccc aaa gaa gtt 774
Ala Leu Pro Asp Val Pro Val Lys Glu Leu
Glu Pro Pro Lys Glu Val

235

240

245

atc aag tcg ctc tac aag ttg tct gac tct
agt gga aaa ttg gag ttg 822
Ile Lys Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Asp Ser
Ser Gly Lys Leu Glu Leu

250

255

260

acg att gtg agc gag gga tcg gct tcc aag
cat gac att aag ccc gac 870
Thr Ile Val Ser Glu Gly Ser Ala Ser Lys
His Asp Ile Lys Pro Asp

265

270

275

2

80

gat gtc tac ata atc ctc acc aag gag ggt
ctc ttc gtc tac ata ggc 918
Asp Val Tyr Ile Ile Leu Thr Lys Glu Gly
Leu Phe Val Tyr Ile Gly

285

290

295

aag ggt tgc tct gtt ttg gag aag aga aac

65 70 75 80

Thr Ala Asp Glu Tyr Gly Thr Ala Ala Tyr
Lys Thr Val Glu Leu Asp

85 90 95

Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ala Val Gln His
Arg Glu Val Glu Gly Tyr

100 105 110

Glu Ser Gln Leu Phe Lys Ser Tyr Phe Asp
Lys Leu Val Ile Leu Lys

115 120 125

Gly Gly Tyr Ala Ser Gly Phe Arg His Val
Lys Pro Asp Glu Tyr Arg

130 135 140

Pro Arg Leu Leu Arg Phe Cys Lys Glu Gly
Lys Thr Thr Tyr Met Arg

145 150 155 1

60

Gln Val Ala Phe Ser Lys Gln Ser Val His
Ser Gly Asp Val Phe Ile

165 170 175

Leu Asp Leu Gly Ser Arg Ala Tyr Gln Phe
Asn Gly Ser Thr Cys Ser

180 185 190

Ala Phe Glu Lys Ser Leu Ala Ala Ala Phe
Leu Gln Asp Leu Glu Ser

195 200 205

Lys Arg Asn Gly Arg Cys Asn Thr Ser Val
Leu Asp Glu Ala Asp Thr

12

【図面の簡単な説明】

210

215

【図 3】ELISA法による測定系で得られた結果を示す。

【図 1】ELISA法による測定系で得られた結果を示す。

Pro Gln Asp His Glu Phe Trp Thr Ala

【図 4】ELISA法による測定系で得られた結果を示す。

【図 2】ELISA法による測定系で得られた結果を示す。

225

230

235

2

40

Glu Leu Glu Pro Pro Lys Glu Val Ile Lys
Ser Leu Tyr Lys Leu Ser

245 250 255

Asp Ser Ser Gly Lys Leu Glu Leu Thr Ile
Val Ser Glu Gly Ser Ala

260 265 270

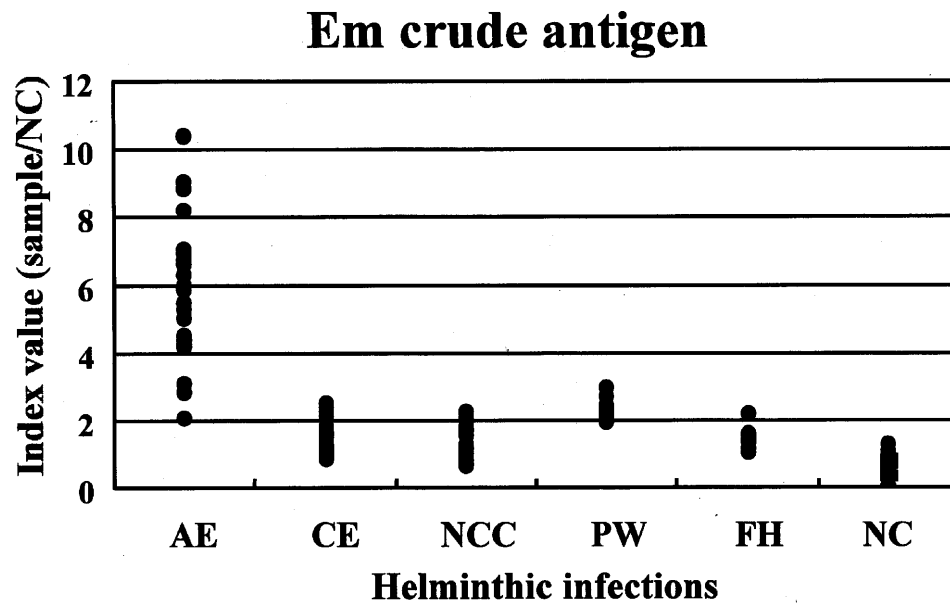
Ser Lys His Asp Ile Lys Pro Asp Asp Val
Tyr Ile Ile Leu Thr Lys

275

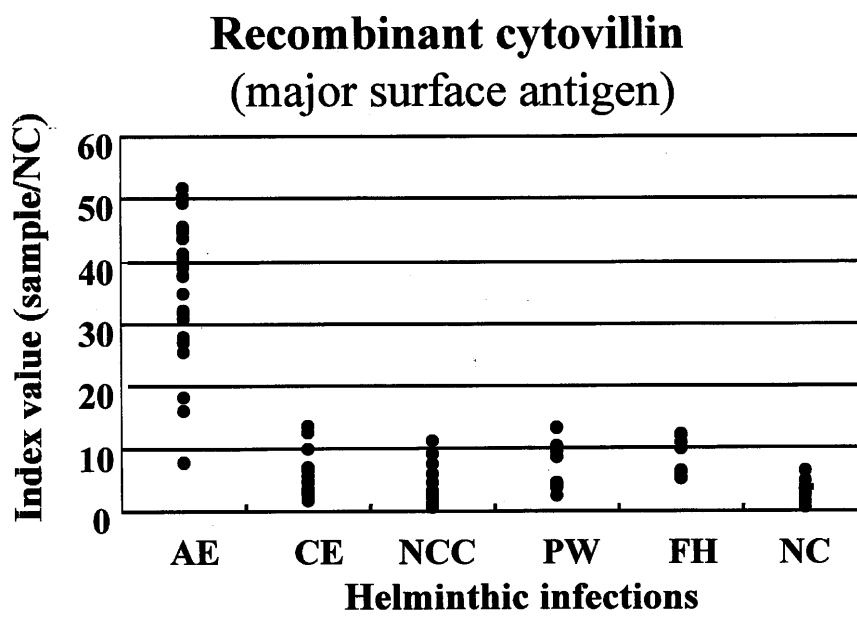
280

285

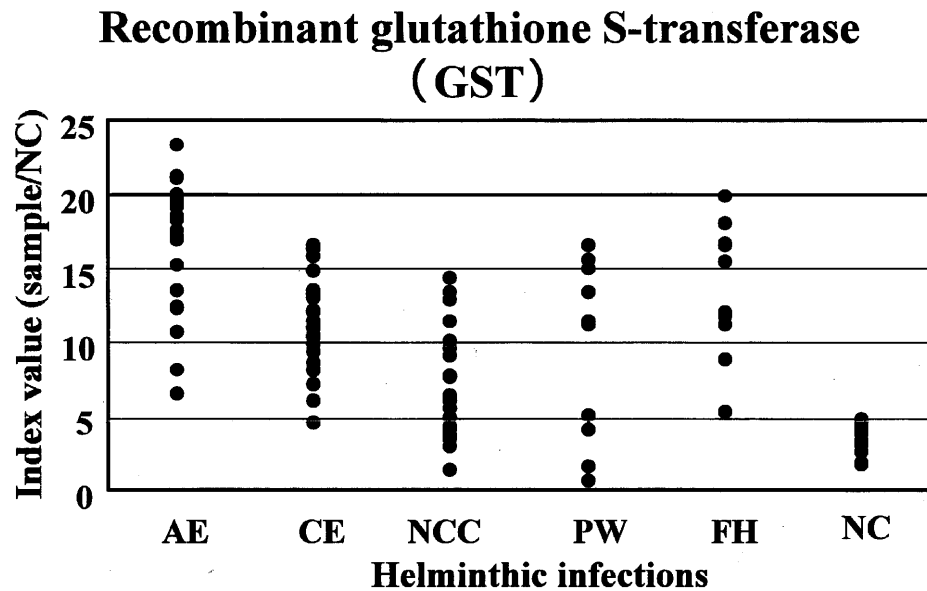
【図1】



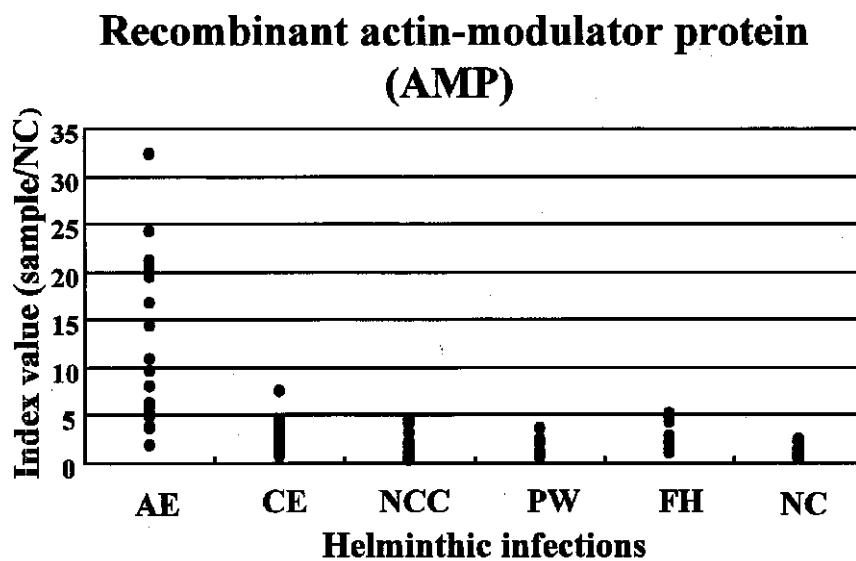
【図2】



【図3】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成14年5月31日(2002.5.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、以下の各態様に係るものである。

1. 多包虫由来のアクチン調節蛋白質(Actin-modulator protein:AMP)をコードするDNA。

2. 以下の(a)又は(b)の蛋白質をコードする塩基配列又はその部分配列を含有するDNA:

(a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、(b) アミノ酸配列(a)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からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

3. 以下の(a)又は(b)の塩基配列又はその部分配列を含むDNA:

(a) 配列番号1で示される塩基配列、(b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質をコードする塩基配列。

4. 上記1乃至3のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換え発現ベヒクル(Vehicle)。尚、組換え発現ベヒクルは当業者に周知の任意の遺伝子工学的手法によって調製することが出来、その種類としては、例えば、各種プラスミドベクター及びウイルスベクター等の発現ベクター、コスミド、並びにファージ等を挙げることが出来る。

5. 発現ベクターである上記4に記載の組換え発現ベヒクル。

6. pBR322由来発現ベクターである上記5に記載の組換え発現ベヒクル。

7. 上記4、5又は6に記載の発現ベヒクルによって形質転換された、細菌等の原核細胞、並びに、酵母及び哺乳動物細胞等の各種真核細胞である形質転換体。

8. 細菌である上記7に記載の形質転換体。

9. 大腸菌である上記8に記載の形質転換体。

10. 多包虫由来のアクチン調節蛋白質、特に、組換え体である該蛋白質。

11. 以下の(a)又は(b)のアクチン調節蛋白質、特に、組換え体である該蛋白質。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、(b) アミノ酸配列(a)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からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

12. 上記10又は11記載の蛋白質の一部分から成るポリペプチド。

13. 上記10又は11記載の蛋白質を活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

14. 上記12記載のポリペプチドを活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

15. 上記13又は14記載の多包虫症診断用試薬を含むキット。このキットには、例えば、反応用プレート、各種緩衝液、希釈液、洗浄液、ブロッキング用溶液、各種酵素結合血清等の2次試薬、及び反応試薬(発色化合物)等の、一般に検査キットに必要な当業者には周知のその他の任意の成分の中から、診断に用いる反応原理に基づき、適宜選択して含ませることが出来る。

16. 更に、多包虫の他の抗原蛋白質を診断用試薬として含む、上記15記載の多包虫症診断用キット。

17. 多包虫の他の抗原蛋白質がサイトピリンである、

上記16記載の多包虫症診断用キット。

18. 上記9又は10記載の蛋白質を抗原として用い、被検体中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、当業者には公知の各種の免疫学的測定方法。

19. E L I S A法であることを特徴とする、上記18記載の測定方法。

20. イムノブロット法であることを特徴とする、上記18記載の測定方法。

21. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、上記18乃至20のいずれか一項に記載の測定方法。

22. 上記11又は12記載のポリペプチドを抗原として用い、被検体中の上記9又は10記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方法。

23. E L I S A法であることを特徴とする、上記22記載の測定方法。

24. イムノブロット法であることを特徴とする、上記22記載の測定方法。

25. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、上記22乃至24のいずれか一項に記載の測定方法。

26. 上記9又は10記載の蛋白質を抗原として用い、被験者の体液中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

27. 体液が血清であることを特徴とする、上記26記載の診断方法。

28. 上記11又は12記載のポリペプチドを抗原として用い、被験者の体液中の上記9又は10記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

29. 体液が血清であることを特徴とする、上記28記載の診断方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】実験例2

組換えアクチン調節蛋白質(Actin-modulator protein:AMP)の作成:

(1) 発現ベクターの作成、及び各ベクターを用いた組換え蛋白質の発現

実験例1(4)で得られた挿入断片をPCR法にて増幅し、制限酵素(BamHI; NewEngland Biolabs, USA)で切断したpGEX-2Tベクター(GST融合タンパク質発現用ベクター; Amersham Pharmacia Biotech, UK)に挿入し、さらに大腸菌(DH5 α)にて形質転換させ、IPTG(イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド; ナカライ、日本)を添加し、大量の組換え蛋白を作成した。

(2) 発現蛋白質の分離・精製等

GST融合蛋白質を合成した大腸菌細胞は超音波破碎し、G

luathione Sepharose 4Bカラム (Amersham Pharmacia Biotech, UK)を通すことによりGST融合蛋白質のみをカラムに吸着させた。0.1% トライトン・PBSでカラムを洗浄

後、Thrombin (Amersham Pharmacia Biotech, UK)にて組換え蛋白質画分を溶出された。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷		識別記号	F I		テ-マコード [*] (参考)				
G 0 1 N	33/543	5 4 5	G 0 1 N	33/569	A				
	33/569		C 1 2 N	15/00	Z N A A				
(72)発明者 野崎 智義			F タ-ーム(参考)						
東京都江戸川区平井 4 - 22 - 2 - 114			4B024	AA11	CA04	CA07	DA06	EA04	
				GA11	HA08	HA11			
			4B065	AA26X	AA90Y	AB01	BA02		
				CA24	CA46				
			4H045	AA10	AA30	BA09	BA41	CA51	
			EA50	FA73	FA74				

专利名称(译)	多包虫抗原及其编码基因和用于诊断人多发性丝虫的方法		
公开(公告)号	JP2003250555A	公开(公告)日	2003-09-09
申请号	JP2002052151	申请日	2002-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 日本国立感染症研究所		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团 国立感染症研究所所长		
[标]发明人	藤田修 野崎智義		
发明人	藤田 修 野崎 智義		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/435 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/30 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/4355 G01N33/56966		
FI分类号	C07K14/435 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/543.545.A G01N33/569.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA11 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA51 4H045/EA50 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	佐伯 宪生		
其他公开文献	JP2003250555A6		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于多汗症的测试方法，诊断方法等，其利用基因重组技术具有优异的灵敏度和特异性，并且还具有成本优势。为了这个目的。本发明提供了一种编码来源于多毛蠕虫的肌动蛋白调节蛋白（AMP）的基因，用于检测针对由该抗原蛋白或其一部分组成的多肽的抗体的免疫测定，以及诊断人多囊性疾病的方法技术领域本发明涉及一种诊断人多囊性疾病的方法。

