

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18		C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 4
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		7/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10数) 最終頁に続く			

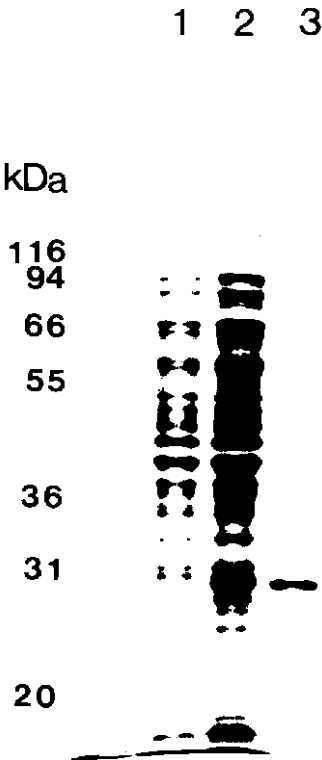
(21)出願番号	特願2000 - 196620(P2000 - 196620)	(71)出願人	591208951 バイエル株式会社 東京都港区高輪4丁目10番8号
(22)出願日	平成12年6月29日(2000.6.29)	(72)発明者	辻 尚利 茨城県つくば市観音台3 - 1 - 1
		(72)発明者	藤崎 幸蔵 北海道帯広市稲田町西二線の11
		(72)発明者	神尾 次彦 茨城県つくば市観音台3 - 1 - 1
		(74)代理人	100100181 弁理士 阿部 正博
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ダニのペルオキシレドキシンおよびそれをコードする核酸分子とその利用

(57)【要約】

【課題】 ダニの駆除及びダニ感染から家畜を守るための化合物の合成を提供し、様々な人畜共通のダニ媒介性疾病の防除法を提供するものである。

【解決手段】 本発明はダニにおけるペルオキシレドキシン(Pr x)をコードする遺伝子を分離・提供する。さらに、蛋白質コード領域を蛋白質発現プラスミドベクターに挿入し、該ベクターにより形質転換された組換え体細胞から製造・精製された組換えPr x蛋白質が酵素活性を有することを提供する。また、ダニPr xに対する抗体作製方法を提供する。さらにダニ組織標本におけるPr xの局在を提供するとともに、ワクチン候補分子のプロープに用いられているウサギのダニ免疫血清との反応性を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号 1 の塩基配列に含有される、*Haemaphysalis longicornis* ペルオキシレドキシンをコードする遺伝子。

【請求項 2】配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項 3】請求項 1 に記載の遺伝子を含有する、配列番号 1 の塩基配列又はその相補鎖塩基配列からなる核酸分子。

【請求項 4】請求項 1 若しくは請求項 2 に記載の遺伝子又は請求項 3 に記載の核酸分子を含有する組換え体分子。

【請求項 5】請求項 1 若しくは請求項 2 に記載の遺伝子又は請求項 3 に記載の核酸分子を含有するプラスミド発現ベクター。

【請求項 6】請求項 1 若しくは請求項 2 に記載の遺伝子又は請求項 3 に記載の核酸分子を含有する組換え体ウイルス。

【請求項 7】請求項 1 若しくは請求項 2 に記載の遺伝子又は請求項 3 に記載の核酸分子を含有する組換え体細胞。

【請求項 8】請求項 7 に記載の組換え体細胞を培養することからなる、*Haemaphysalis longicornis* ペルオキシレドキシンの製造方法。

【請求項 9】*Haemaphysalis longicornis* ペルオキシレドキシンに対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ダニ感染から家畜を守る過程に関与する新規産物に関連する。本発明は、ダニのペルオキシレドキシン (Prx) 蛋白質及び類似物；すなわち、ダニ Prx 遺伝子 (核酸分子) がコードする蛋白質；その蛋白質を抗原として用いて得られる抗体 (抗 - ダニ Prx 抗体)、Prx 活性を抑制する化合物 (抑制作用を有する化合物もしくは抑制物) に関連する。

【0002】また、本発明には、ダニ Prx 蛋白質の取得方法、核酸分子、抗体、抑制化合物も含まれる。さらに、本発明には、それら蛋白質、核酸分子、抗体及び抑制化合物よりなる治療用化合物、同様に、ダニによる疾病を防ぐことを目的として、治療用化合物を利用することもふくまれる。

【0003】本発明は、ダニ駆除を目的とした上記化合物の合成あるいは動物をダニ感染又はピロプラズマ病などのダニ媒介性疾病から守るためのワクチン開発や治療薬の開発に関する。

【0004】

【従来の技術】ダニ類によって動物・人に直接あるいは間接的に甚大な被害がもたらされている。前者には咬着と吸血による搔痒や失血、また吸血時の分泌唾液や腸内

容嘔吐によるアレルギー疾患やダニ麻痺の招来が知られている。後者にはウイルス、リケッチア、細菌、スピロヘータ、原虫及び線虫のなどによる様々の家畜でのその関連疾病の損害は、国内はもとより海外でも莫大な額にのぼる。また、最近はダニ類によるいわゆる新興、再興の人畜共通感染症の脅威が大きな社会問題になりつつある。

【0005】そのため、各国でダニ駆除を目的とした各種制圧方法が取られており、その中心をなしているのが有機リン、カーバメイド、ピレスロイド系あるいはマクロライド系抗生物質などの薬剤の利用である。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、殺ダニ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、消費者からの敬遠される傾向にある。そのうえ、薬剤の使用には有効性及適用範囲に加えて、膨大な開発コストの面からも限界が生じつつあり、21世紀における人畜のダニ寄生と媒介性疾病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。

【0006】ダニを含む吸血昆虫でも、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 {Fujiisaki, Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 18:27-38(1978)}。近年の遺伝子組換え技術の発達によって、その感染防御抗原あるいは吸血昆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や各国で精力的進められ、安全なワクチン蛋白質や化学療法剤の製造が試みられてきている。

【0007】しかしながら、実用化に至っているは Willadsen {Willadsen and Jongejan, Parasitol Today 15: 258-262, (1999)} らによって開発された 1 宿主性ダニの *Boophilus microplus* に対してのみで、日本を含めたアジア諸国やユーラシア大陸に広く分布し、ピロプラズマ症、Q熱、ウイルス性脳炎などの人畜共通感染症の媒介者となっている *Haemaphysalis longicornis* に対してはワクチン候補分子の探索段階であり早急なワクチン開発とその実用化が強く望まれている。

【0008】抗酸化酵素には活性酸素や硫黄種の解毒作用が知られ、これまでにカタラーゼ等が中心的役割を果たしてきたが、最近の研究から、従来から知られてきた作用機序とは異なる抗酸化作用を有するチオレドキシンペルオキシダーゼが近年分離されている {Chae, et al., Methods Enzymol 300: 219-226(1999)}。

【0009】チオレドキシンペルオキシダーゼは以前にはチオール基特異的抗酸化物と呼ばれ、その作用機序はチオレドキシンを中間供与体として過酸化水素や脂質過酸化物を還元することが分かっている。また、近年ではこうした酸化作用を有するチオレドキシンペルオキ

シダーゼ (TPx) やアルカリハイドロペルオキシド還元酵素C(AhpC)などには、構成する蛋白質のアミノ配列に高い相同性が認められることから一群をペルオキシレドキシン (Prx) と総称するようになってきている {Rhee and Chae, Mol Cell 4:137-142(1994)}。

【0010】これまでにPrxは植物から動物細胞に至る生物種で分離されてきており、生物にとって欠かすことのできない重要な生理学的意義をもっているものと推察されている {Baier and Dietzve, Plant Physiol 119:1407-1414, (1999); Chae and Rhee, Biofactors 4: 177-180(1994); McGonigle et al., Parasitol Today 14: 139-145, (1998)}。また、愛玩小動物でもっと被害の大きい寄生虫病である犬糸状虫症では、Prx蛋白質が遺伝子組換え技術を応用したワクチンの候補分子として上げられている {Klimowski et al., Mol Biochem Parasitol 90: 297-306(1997)}。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ダニの駆除及びダニ感染から家畜を守るための化合物の合成を提供し、様々な人畜共通のダニ媒介性疾患の防除法を提供することを目的とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、配列番号1の塩基配列に含有されるHaemaphysalis longicornis ペルオキシレドキシンをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する配列番号1の塩基配列又はその相補鎖塩基配列からなる核酸分子 (DNA) に係る。又、本発明は、配列番号2に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子に係る。

【0013】更に、本発明は、上記遺伝子又は核酸分子を含有する組換え体分子、上記遺伝子又は核酸分子を含有するプラスミド発現ベクター、上記遺伝子又は核酸分子を含有する組換え体ウイルス、及び、上記遺伝子又は核酸分子を含有する組換え体細胞に係る。

【0014】更に、本発明は、該組換え体細胞を培養することからなる、Haemaphysalis longicornis ペルオキシレドキシンの製造方法に係る。

【0015】更に、本発明は、Haemaphysalis longicornis ペルオキシレドキシンに対するポリクローナル又はモノクローナル等の抗体に係る。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明の具体例として、Haemaphysalis longicornis Prx遺伝子とハイブリダイズすることができる分離した核酸分子を挙げることができる。すなわち、核酸分子はチオレドキシンペルオキシダーゼとして確認されている。更に、該遺伝子又はそれを含有する塩基配列の相補鎖塩基配列からなる核酸分子も含まれる。

【0017】更に、本発明には、配列番号1に記載された塩基配列と適当なストリンジェントな条件下でハイブ

リダイズし、且つ、Haemaphysalis longicornis Prx活性を有する蛋白質をコードする核酸分子が含まれる。又、配列番号2に記載された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、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、Haemaphysalis longicornis Prx活性を有する蛋白質をコードする核酸分子が含まれる。

【0018】また、本発明には、組換え体分子、即ち、本発明で分離したPrx遺伝子を含む核酸分子、プラスミド発現ベクター、組換え体ウイルス及び組換え体細胞も含まれる。これらは、当該技術分野における任意の公知方法によって、当業者が容易に製造することが出来る。組換え体細胞としては、大腸菌のような原核細胞、動物細胞のような真核細胞が含まれる。

【0019】本発明には、さらにダニPrx蛋白質類似物も含まれる。ダニPrx蛋白質と選択的に結合する分離蛋白質、例えば、ダニPrx蛋白質の抑制化合物、及びモノクローナル及びポリクローナル等の各種抗体、並びにそれらの利用が含まれる。これらの類似物、抗体、及び抑制化合物は、当該技術分野における任意の公知方法によって、当業者が容易に製造することが出来る。

【0020】また、本発明の他の態様として、ダニPrx活性を抑制する化合物を同定する方法も含まれる。更に、本発明にはダニPrx活性を抑制する化合物を同定するテストキットも含まれる。そのキットにはPrx活性を持つダニPrx蛋白質及びインヒビター (抑制化合物) の存在下におけるPrx活性の抑制評価を検討する手段も含まれる。ここで、インヒビターとは、天然物あるいは核酸技術もしくは化学合成によって人工的にから製造されたものも含まれる。

【0021】また、本発明の他の態様には、ダニ媒介性の疾病から動物を守ることに利用できる治療的化合物も含まれる。例えば、その化合物には以下に列挙する防御化合物の単一あるいは複数が含まれる。分離したダニPrx蛋白質あるいはその類似物；分離したダニPrx核酸分子；ダニPrx蛋白質に選択的に結合する分離抗体；ダニPrx活性を抑制することによって同定されたPrx蛋白質活性のインヒビター。

【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。本発明の実施にあたっては、各種分子生物学、ダニ学、節足動物学、免疫学及び生化学の分野で公知の技術を用いた。これらの技術は、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pressやその関連書を参考にした。DNA解析ソフトはMacVector™ (コダック社)及びGENETYX (ソフトウェア開発社)を使用した。

【0023】尚、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】H. longicornis ペルオキシレドキシン塩

基配列の分離及び決定

Haemaphysalis longicornis 岡山株 {Fujisaki et al N
atI Inst Anim HealthQ (Tokyo) 16,122-128, (1976)}
の成ダニより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。PCR反応によりダニPrxのコード
領域の断片を得るためにこれまでに報告されているGenB
ankTMデータベース上(Human, accession no. Q0683
0; Mouse, P35700; Plasmodium falcipum, O. volvulu
s, AF029247; D. immitis, AF004167)の各種生物種Pr
xの塩基配列に保存されている領域から2つのプライ
マーを作製した。TPVCPTEL及びATTGRNFDのアミノ酸配列
に対するP1:(5'-ACY CCV GTK TGY ACY ACW GAR CTT-
3'; 配列番号3)及びP2(5'-ATC CCV GTK TGY ACY AC
W GAR CTT-3'; 配列番号4)をそれぞれ作製した。コード
領域の断片を増幅するPCR反応は次に示す条件で行っ
た。50µlの反応液〔1ngダニcDNA、1µMP1プライ
マー、1µMP2プライマー、10mM Tris-HCL(pH8.
3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、2.5U AmpliTaq DNA poly
merase(プロメガ社)〕を調製し、DNA Thermal Cycler
(Perkin Elmer Cetus社)を用いて、95 にて30秒間、
50 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。

【0024】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
ーゲン社)にメーカーの推奨する方法に従ってDNA断片
を挿入し、INVαF'プラスミドの形質転換を行い、X-Ga
I(ナカライ社)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、βガ
ラクトシダーゼ欠損のコロニーを選択した。

【0025】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DN
A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ユア
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。

【0026】その結果、増幅されたDNA断片にはP1及びP
2の塩基配列が確認され、塩基配列から予想されるアミ
ノ酸配列は、プライマーを構築する際に使用したアミ
ノ酸配列と一致することが確認された。そこで、完全長の
ダニPrx cDNAクローンを得るために、上記で得られた

塩基配列をもとに5'及び3'を得るためのプライマーP3:
ATCATTGCCGATGAGAAGCG(配列番号5)及びP4:CTCGCGCTTCTC
ATCGGCAATGAT(配列番号6)をそれぞれ設計した。5' DN
A断片はλZapII ベクター(ストラタジーン社)で作
製したH. longicornis成ダニ cDNA ライブラリーをテン
プレートにして次に示す条件でPCR反応を行った。50µ
lの反応液〔ダニcDNAライブラリー、1µMT3プライ
マー、1µMP3プライマー、10mM Tris-HCL(pH8.
3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、2.5U AmpliTaq DNA poly
merase(プロメガ社)〕を調製し、DNA Thermal Cycler
(Perkin Elmer Cetus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。また、3' DNA断片については同一PCR反応条
件でプライマーをP4及びT7に代えて行った。いずれも
PCR産物もTAクローニングベクター(インビトローゲン
社)にメーカーの推奨する方法に従ってDNA断片を挿入
し、上記の方法に従って塩基配列を決定した。その結
果、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を備
えた全長939bpからなるcDNAを得ることができ
た。翻訳領域から予想される蛋白質は222残基のアミ
ノ酸からなる推定分子量26,525kDa、等電点5.6であっ
た。GENETYX-MACTMのコンピューター解析によってPr
xに保存されているアミノ酸配列のPVCTが47-50番目に
確認された。第49番目にあるシステイン配列はPrx
の酵素活性部位と考えている。また、ゲノム上での存在
を確認するため、サザンブロット解析を行ったところ、
分離した遺伝子は単一コピーで存在することがわかつ
た。分離したコード領域をNational Center for Biotec
hnology Information のBLASTサーチを実施したとこ
ろ、これまでに報告されている1-CysタイプのPrxと
高い相同性を有することが確認された。

【0027】

【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H. longicornis 成虫cDNAからのPrx遺伝子の
分離及び増幅、組換え体分子及び組換え体細胞の作出
ダニPrxを上記方法によって入手したH. longicornis
成虫cDNAをテンプレートにしてセンスプライマー(5'-
CCG AGC TCG AGA ATG CCT CCC TTG AAC CTC GGC GAC-
3'; 下線部はXhoI サイトを示す; 配列番号5)とアン
チセンスプライマー(5'-CCA TAT GGT ACC TCA ATC CAT
GGT GGT GCG AAG-3'; 下線部はKpnI サイトを示す;
配列番号6)を用いたPCR反応にて増幅した。

【0028】PCR反応は50µlの反応液〔1ngダニcDN
A、1µMセンス及び1µMアンチセンスプライマー、1
0mM Tris-HCL(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、2.
5U AmpliTaq DNA polymerase(プロメガ社)〕を調製
し、DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus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ダニPr xコード領域の挿入されたクローンを選択した。

【0029】

【実施例3】大腸菌における本発明のダニPr x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℃でアンピシリンを含んだS0B液で培養し、培養後S0B液のOD₆₀₀0.5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30 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30 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。

【0030】

【実施例4】大腸菌からのダニPr x組換え体蛋白質の精製、及び精製したH1Pr x組換え体蛋白質に対する抗体作製

ダニPr xの組換え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にて透析を行った。この精製したダニPr x組換え体蛋白質は以下の抗体作製、酵素活性の検討、ウサギ免疫血清との反応性の検討に使用した。

【0031】ダニPr x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)}。精製したPr x組換え蛋白質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。再投与後2週間に採血を行い、血清を-20℃に保存した。Pr x組換え蛋白質を用いたウエスタンブロット解析によって、作製されたマウスPr x組換え蛋白質免疫血清は、30kDa付近のPr x組換え蛋白質と強く反応することが確認された（図1）。

【0032】

【実施例5】精製したPr x組換え蛋白質の酵素活性の性状

チオレドキシンペルオキシダーゼの酵素活性は、Mixed function oxidase(MFO)systemによるDNA分割がPr xの活性型によって不活化されることを利用したアッセイ系にて調べた{Lim et al., Biochem Biophys Res Commun 192: 273-280,(1993)}。すなわち、精製したPr x組換え蛋白質の存在下でスパークコイル型のプラスミドDNAのpUC18がチオール/Fe³⁺/I²-を含む酸化反応よりなるMFO systemに暴露されことで活性を調べた。この系の利用によって、精製したPr x組換え蛋白質の約50 µg/mlでプラスミドへの切れ込み（ニック型プラスミド）が阻止されることが確認された。これによって、精製したPr x組換え蛋白質には酵素活性を保持されていると同時に、実施例1で取得した塩基配列がダニのチオレドキシンペルオキシダーゼをコードする遺伝子であることが判明した。

【0033】

【実施例6】イムノブロット法によるネイティブ（天然型）Pr xの同定の性状

実施例4で作製したマウスPr x組換え蛋白質免疫血清を用いて、H. longicornis成ダニ蛋白質抽出液の二次元/ウエスタンブロット法{Tsuji and Fujisaki, K. Parasitology 109 643-648(1994)}を行った。一次元目はアンホラインのpH3.5-10(ファルマシア社)を用いた非平衡化pH勾配ゲルで成ダニ抽出蛋白液50 µgを分離し、次いで2次元目は4-20%のグラジエントゲルを用いたSDS-PAGE{Laemmli, et al., Nature 227:680-685(1970)}で分離した。分離した蛋白質は、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に希釈されたマウスPr x組換え蛋白質免疫血清と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マウス-IgG2次抗体（カッペル社）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26 kDa、pI 5.8のスポットが確認され、成ダニ抽出蛋白液中の天然型Pr xが同定できた。また、H. longicornis虫卵、幼ダニ及び若ダニを用いたところ、同様の結果が得られた。なお、交差反応は認められなかった。これらのことから、ダニPr xは全ての発育ステージで発現されていることが確認された。

【0034】

【実施例7】成ダニに組織標本における天然型Prxの局在

成ダニにおける天然型Prxの組織局在を以下に示す免疫組織化学染色で検討した。H. longicornis成ダニを4%パラホルムアルデヒド(ナカライ社)を含むリン酸緩衝液pH7.2で一夜固定した。固定したダニは定法に従い、脱水及びパラフィン包埋を行い、ミクロトムにてダニ横断面の薄切標本を作製した。スライドガラス上の薄切標本は定法に従い脱パラフィンを行い、濃度の異なったアルコール系列を通過し、PBS中に静置した。スライドガラスは内在性ペルオキシダーゼを除去するために10%メタノールを含むPBSで作製した0.3%過酸化水素液でブロックした。次いで10%山羊血清(和光純薬社)で1時間ブロックした。実施例4で取得したマウスPrx組換え蛋白質免疫血清をPBSで40倍に希釈し、スライドガラス上に滴下し、4に於て一夜反応させた。反応後、PBSで十分に洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識されたマウス-IgG2次抗体(カッペル社)を反応させ、基質3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Fast™ DAB setDAB(シグマ社))によって可視化した。発色の終了したスライドガラスは定法に従い脱水し、カバーガラスを覆い顕微鏡下で観察した。

【0035】その結果、天然型Prxが大量に発現することを示す強陽性の組織は、主として唾液腺で確認さ

*れ、唾液腺構成細胞の中のタイプII及びIII腺房で発現していることが認められた。また、腺房管でも反応が確認された。さらに、陽性部位はマルピーギ管の細胞周囲でも認められ、中心神経小体の一部との反応も確認された。その他の組織、たとえば気管、筋肉、クチクラ、脂肪組織及び生殖器官での発現は確認されなかった。

【0036】

【実施例8】本発明におけるPrx組換え体蛋白質に対する免疫血清の反応性

ウエスタンブロット法を用いてPrx組換え体蛋白質に対するウサギ免疫血清との反応性を検討した。その結果、Prx組換え体蛋白質はウサギで作製したダニ免疫血清を強く反応することが確認された(図2)。このことから、Prx組換え体蛋白質はダニワクチン候補分子の1つであることが示された。なお、免疫前のウサギ血清とPrx組換え体蛋白質との反応は認められなかった。

【0037】

【発明の効果】本発明は、ダニにおけるPrx蛋白質の発見に基づくものである。本発明のダニPrx蛋白質及び核酸は、ダニワクチンあるいは抗ダニ剤の新規ターゲットに利用できる。本発明は、Prx活性をに基づくダニの生理学的機能抑制に利用できるものである。

【0038】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:939

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖上

配列の種類:cDNA

起源:ダニ

生物種:Haemaphysalis longicornis

株名:岡山株

直接の起源:チオレドキシンペルオキシダーゼcDNA遺伝子

配列の特徴:HIPrx

配列を決定した方法:E

配列

```

1 AATTCGGCACGAGTACGCCCTGCGCGCTCGTCT
  GCAGTGAGCTCGCTTAATCGACGGTGTGTTCTTTC
  C
  CGCTTTCTGAAACTACCCAGGCGCAAAGAA
101 GATGCCTCCCTTGAACCTCGGCGACCCCTTCC
  CCAACTTCACGTGCGAGACAACCGTCGGCACGATC
  G
  ACTTTACCAAGTGGCTGGGAGACTCATGGGGC
201 ATCCTGTTCTCTACCCGGCTGACTACACTAC
  CCCGGTGTGCACCACAGAGCTTGCCCGAGCCGCC
  A
  GCTGGCGCATGTCTTCGCGCAGAAGGGCGTCA
301 AAATCATCGCCCTGTCTGCGACAGCGTCGAC
  AGTCACCACGGTTGGATCAAGGACATCGAAGCCTT
  T

```

601 TGGTGACCGAGACCAGGAAGGTGGCAACTCCC
GCTGGTTGGAAGAAAGGGACTCCCTGCATGGTCCT
G
CCATCCGTTACAGAGGAGGAGATTCCGAAGTT
701 GTTCCCCACAGGTATCAAGCAGTACGATGTGC
CTTCCGGGAAGAAGTACCTTCGCACCACCATGGAT
T
GAGTGGTGGCTCTGCAAAGACGCACCGGCTGG
801 CGGCTTCATCCCGGATCCTTGTGCTTCCTACA
CACAGCTGACATGCTTATGACGGTGTGGCAGTTTC
C
TGTTTAACTGGAACATTTATTATGCATACATT
901 AATAAAGTAAATTTTTTGACCAAAAAAAAAA
AAAAAA

配列番号：2

配列の長さ：222

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖上

配列の種類：アミノ酸

起源：ダニ

生物種：Haemaphysalis longicornis

株名：岡山株

直接の起源：チオレドキシンペルオキダーゼ cDNA遺伝子

配列を決定した方法：E

配列

MPPLNLGDPFPNFTCETTVGTIDFHQWLGD SWGIL
FSHPADYTPVCTTE 50
LARAAQLAHVFAQKGVKIIALSCDSVDSHHGWIKD
IEAFGELPDGPFYP 100
IIADEKREIAVKLGMLDPVEKDKEGLPLTCRAVFI
IGPDKKMKLSMLYPA 150
TTGRNFDEVL RATDSL LV TETR KVATPAGWKKGTP
CMVLPSVTEEEIPKL 200
FPTGIKQYDVPSGKKYLRTMD 222

配列番号：3

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖上

配列の種類：合成DNA

起源：ダニ

生物種：Haemaphysalis longicornis

株名：岡山株

直接の起源：チオレドキシンペルオキダーゼ cDNA遺伝子

配列の特徴：P1

配列を決定した方法：E

配列

ACY CCV GTK TGY ACY ACW GAR CTT

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖上

ATC CCV GTK TGY ACY ACW GAR CTT

配列番号：5

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖上

配列の種類：合成DNA

起源：ダニ

生物種：Haemaphysalis longicornis

株名：岡山株

直接の起源：チオレドキシンペルオキダーゼ c DNA遺伝子

配列の特徴：P3

配列を決定した方法：E

配列

ATC ATT GCC GAT GAG AAG CGC GAG

配列番号：6

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖上

配列の種類：合成DNA

起源：ダニ

生物種：Haemaphysalis longicornis

株名：岡山株

直接の起源：チオレドキシンペルオキダーゼ c DNA遺伝子

配列の特徴：P4

配列を決定した方法：E

配列

CTC GCG CTT CTC ATC GGC AAT GAT

配列番号：7

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖上

配列の種類：合成DNA

起源：ダニ

生物種：Haemaphysalis longicornis

株名：岡山株

直接の起源：チオレドキシンペルオキダーゼ c DNA遺伝子

配列の特徴：P5

配列を決定した方法：E

配列

CCG AGC TCG AGA ATG CCT CCC TTG AAC CTC

GGC GAC

配列番号：8

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖上

配列の種類：合成DNA

起源：ダニ

生物種：Haemaphysalis longicornis
 株名：岡山株
 直接の起源：チオレドキシンペルオキダーゼ cDNA遺伝子
 配列の特徴：P6
 配列を決定した方法：E
 配列
 CCA TAT GGT ACC TCA ATC CAT GGT GGT GCG

12

【図面の簡単な説明】AG

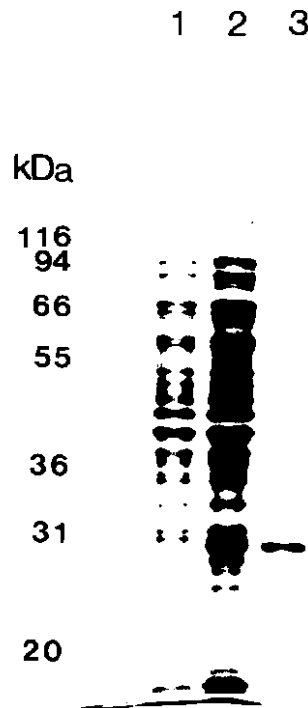
【図1】本発明の発現生成物であるダニのチオレドキシンペルオキダーゼを示す電気泳動図。
 レーン1；発現前の大腸菌ライセート。2；発現後の大腸菌ライセート。3；精製したダニチオレドキシンペル*

*オキダーゼ

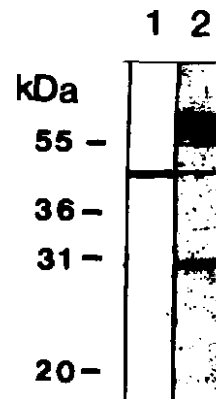
【図2】ダニのチオレドキシンペルオキダーゼとウサギのダニ免疫血清との反応性。

レーン1；免疫前血清。レーン2；免疫血清。

【図1】



【図2】



 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)
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 9/08	
7/00		C 1 2 P 21/08	
9/08		G 0 1 N 33/53	B
15/02		C 1 2 R 1:19)	
C 1 2 P 21/08		(C 1 2 N 7/00	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 R 1:93)	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:19)		5/00	A
(C 1 2 N 7/00		15/00	C
C 1 2 R 1:93)		C 1 2 R 1:19)	

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA08 BA41 BA61
CA04 CA11 DA02 DA06 EA04
GA03 GA11 HA03 HA15
4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 FF09E
LL01 LL03
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA26X AA90Y AB01 AB04
BA02 BA08 BA24 CA25 CA28
CA45 CA46
4H045 AA11 BA10 CA50 DA76 DA89
EA31 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	螨过氧化物酶及编码其的核酸分子及其用途		
公开(公告)号	JP2002010785A	公开(公告)日	2002-01-15
申请号	JP2000196620	申请日	2000-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳公司		
[标]发明人	辻尚利 藤崎幸藏 神尾次彦		
发明人	辻 尚利 藤崎 幸藏 神尾 次彦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N9/08 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/19 C12R1/93		
FI分类号	C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12N9/08 C12P21/08 G01N33/53.B C12R1/19 C12R1/93 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.C C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/16 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA08 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA15 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/FF09E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA28 4B065/CA45 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	阿部正弘		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过提供一种控制s虫和保护牲畜免受tick虫感染的化合物，提供一种控制各种人类和动物常见的tick传播疾病的方法。本发明以tick为单位分离并提供了编码过氧化物酶 (Prx) 的基因。此外，提供了将蛋白质编码区插入蛋白质表达质粒载体中，并且由用该载体转化的重组细胞产生和纯化的重组Prx蛋白质具有酶活性。还提供了一种生产抗壁虱Prx的抗体的方法。此外，它还提供了Prx在螨组织样品中的定位以及与用作疫苗候选分子探针的兔螨免疫血清的反应性。

