

(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2001 - 231580

(P2001 - 231580A)

(43)公開日 平成13年8月28日(2001.8.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 39/36	
A 6 1 K 39/36			A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08			C 0 7 K 14/415	
C 0 7 K 14/415			16/16	
16/16			C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 20数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 381403(P2000 - 381403)

(22)出願日 平成12年12月15日(2000.12.15)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 359719

(32)優先日 平成11年12月17日(1999.12.17)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(72)発明者 宮原 道則

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株

式会社医薬事業部内

(72)発明者 横山 峰彦

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株

式会社医薬事業部内

(72)発明者 紀 光助

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株

式会社医薬事業部内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マウンテンシダー花粉アレルゲンタンパク質及び該タンパク質をコードする核酸分子

(57)【要約】

【課題】 マウンテンシダー花粉症の原因となるアレルゲンタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。また、本発明は、該核酸分子を用いた組換えアレルゲンタンパク質又はその抗原性断片を提供する。

【解決手段】 マウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子をクローン化した。そして該核酸分子を用いて組換えJun a 2を単離した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子、又は該ヌクレオチド配列の機能的等価物。

【請求項2】 該ヌクレオチド配列が、本質的に配列番号：1のヌクレオチド配列のコード部分の少なくとも1断片からなる、請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】 該断片が配列番号：1のヌクレオチド配列のヌクレオチド163～1524（配列番号：2）を含む請求項1記載の核酸分子。

【請求項4】 該ヌクレオチド配列が、本質的に配列番号：1のヌクレオチド配列からなる、請求項1記載の核酸分子。

【請求項5】 単離されたマウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片。

【請求項6】 下記の特徴を有する請求項5記載の単離されたマウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2：

1)還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)による分子量測定で約43kDaの分子量を示す、

2)N末端アミノ酸配列がAsp-Val-Ala-Ile-Val-Phe-Asn-Val-Glu（配列番号：4）である、

3)ヒノキ花粉アレレルゲン抗Chao 2ポリクローナル抗体と反応する、

4)マウンテンシダー花粉症患者血液中のIgE抗体と反応する。

【請求項7】 請求項1記載の核酸分子で形質転換された宿主細胞において産生された請求項5記載のマウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片。

【請求項8】 少なくとも1つのマウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2のT細胞エピトープを含む請求項5記載の抗原性断片。

【請求項9】 請求項5～8記載のマウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2又はその抗原性断片を有効成分として含有するマウンテンシダー花粉又は該花粉と交差反応性のアレレルゲンに感受性の個人の予防・治療用組成物。

【請求項10】 マウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片と特異的に反応性である、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はそれらに免疫学的に反応性の断片。

【請求項11】 個人におけるマウンテンシダー花粉アレレルゲンに感受性を検出する方法であって、その個人から得た血液試料を、マウンテンシダー花粉アレレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片と、血液成分のタンパク質若しくはその断片との結合に適した条件で合わせ、そしてかかる結合が起きる程度を測定することを含む診断薬。

【請求項12】 結合が起こる程度を、T細胞機能、T

細胞増殖、B細胞機能、タンパク質又はその断片の血液中に存在する抗体又はその断片に対する結合、を評価することにより測定する請求項11記載の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、マウンテンシダー花粉症の治療及び診断に有用なマウンテンシダーアレレルゲンタンパク質をコードする核酸分子及び該アレレルゲンタンパク質調製物に関する。

【0002】

【従来の技術】北米中西部でしばしば見られる重篤な花粉症の原因と考えられるマウンテンシダー (*Juniperus ashei*) のアレレルゲンタンパク質としては Jun a 1 (Mido-ro-Horiuti, T., Goldblum, R. M., Kurosky, A., and Brooks, E. G. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, S91), Jun a 3 (Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R. M., Brooks, E. G., and Kurosky, A. (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, S203) と呼ばれる2種類の糖タンパク質が報告されている。これらのうち Jun a 1 はスギ花粉アレレルゲン Cry j 1 (Sone, T., Komiyama, N., Shimizu, K., Kusakabe, T., Morikubo, K., and Kino, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Communications* 199, 619-625.) 及びヒノキ花粉アレレルゲン Cha o 1 と同一性の高いことが判明している。スギ花粉症では Cry j 1の他に Cry j 2 (Komiyama, N., Sone, T., Shimizu, K., Morikubo, K., and Kino, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Communications* 201, 1021-1028.) と呼ばれる主要なアレレルゲンが報告されており、マウンテンシダー花粉症においても Cry j 2に相同なタンパク質のアレレルギー発症への関与が推察されるが、その実体はるか、その存在すらも明らかでない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、マウンテンシダー花粉症の原因となるアレレルゲンタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。また、本発明は、該核酸分子を用いた組換えアレレルゲンタンパク質又はその抗原性断片を提供する。また、本発明は、該アレレルゲンタンパク質の一次構造より、T細胞エピトープマッピング及びB細胞エピトープマッピングを可能とし、抗原特異的なペプチド免疫療法及び減感作療法、或いはDNAワクチン療法のための治療・予防用医薬組成物の開発を可能とする。さらにまた本発明は、該組換えアレレルゲンタンパク質又はその抗原性断片を用いた花粉症の診断方法を提供する。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、スギ花粉アレレルゲン Cry j 2のDNA配列から、PCRプライマーを作製し、ハイブリッド形成法及びPCR法により、マウンテンシダーアレレルゲンタンパク質の全長をコードするcDNAを増幅しクローニングした。そして、該c

DNAを大腸菌発現系で発現させたタンパク質は、花粉症患者血液中のIgE抗体と反応することを確認し、該タンパク質が真性のマウンテンシダーアレルゲンタンパク質であることを明らかにした。

【0005】すなわち、本発明は、(1) マウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子、又は該ヌクレオチド配列の機能的等価物、(2) 該ヌクレオチド配列が、本質的に配列番号：1のヌクレオチド配列のコード部分の少なくとも1断片からなる、(1)の核酸分子、(3) 該断片が配列番号：1のヌクレオチド配列のヌクレオチド163~1524(配列番号：2)を含む(1)の核酸分子、(4) 該ヌクレオチド配列が、本質的に配列番号：1のヌクレオチド配列からなる、(1)の核酸分子、(5) 単離されたマウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片、(6) 下記の特徴を有する(5)の単離されたマウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2：
 1) 還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)による分子量測定で約43kDaの分子量を示す、
 2) N末端アミノ酸配列がAsp-Val-Ala-Ile-Val-Phe-Asn-Val-Glu(配列番号：4)ある、
 3) ヒノキ花粉アレルゲン抗Chao 2ポリクローナル抗体と反応する、
 4) マウンテンシダー花粉症患者血液中のIgE抗体と反応する。
 (7) (1)の核酸分子で形質転換された宿主細胞において産生された(5)のマウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片、
 (8) 少なくとも1つのマウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2のT細胞エпитープを含む(5)の抗原性断片、(9) (5)~(8)のマウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2又はその抗原性断片を有効成分として含有するマウンテンシダー花粉又は該花粉と交差反応性のアレルゲンに感受性の個人の予防・治療用組成物、
 (10) マウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片と特異的に反応性である、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はそれらに免疫学的に反応性の断片、(11) 個人におけるマウンテンシダー花粉アレルゲンに感受性を検出する方法であって、その個人から得た血液試料を、マウンテンシダー花粉アレルゲンJun a 2又はその少なくとも1つの抗原性断片と、血液成分のタンパク質若しくはその断片との結合に適した条件で合わせ、そしてかかる結合が起きる程度を測定することを含む診断薬、(12) 結合が起る程度を、T細胞機能、T細胞増殖、B細胞機能、タンパク質又はその断片の血液中に存在する抗体又はその断片に対する結合、を評価することにより測定

する(11)の診断薬、に関する。以下に本発明を詳細に説明する

【0006】

【発明の実施の形態】本発明は、マウンテンシダー花粉アレルゲン中に見出された主要アレルゲンタンパク質Jun a 2をコードする1759ヌクレオチドからなる核酸配列(配列番号：1)を提供する。該核酸配列の最初の開始コドンATG(ヌクレオチド1~3)と、終止コドンTAG(ヌクレオチド1522~1524)との間の1524ヌクレオチドの核酸配列(配列番号：2)は、507個の推定アミノ酸配列からなるマウンテンシダー花粉アレルゲンタンパク質をコードする(配列番号：3)。

【0007】該タンパク質は、20個のCys残基及び3つのNグリコシル化可能なコンセンサス配列Asn-Xxx-Ser/Thrを含む。マウンテンシダー花粉アレルゲンと相同性の高いと考えられるヒノキ花粉アレルゲンChao 2(WO97/47648)を特異的に認識する抗体との反応性を指標に、マウンテンシダー花粉からアレルゲンタンパク質Jun a 2を精製した。該タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で解析すると、約90%の純度であった。そして、この精製タンパク質は、還元条件下でのSDS-PAGEで、みかけの分子量が約43kDaであった。該タンパク質のN末端アミノ酸9個を自動分析装置(プロテインシーケンサー)で解析すると、NH₂-Asp-Val-Ala-Ile-Val-Phe-Asn-Val-Glu(配列番号：4)であることが判明した。この配列は、配列番号：1に示す核酸配列のヌクレオチド163~189(配列番号：2のヌクレオチド1~27に対応)のコード部分に対応し、配列番号：3に示すマウンテンシダーアレルゲンタンパク質のアミノ酸配列の55~63番目に対応している。したがって、配列番号：2の核酸配列がコードするタンパク質(配列番号：5)は、天然のマウンテンシダー花粉に含まれる成熟型のJun a 2であると考えられる。さらに、本発明の核酸配列がコードする組換えアレルゲンタンパク質は、花粉症患者の血液中のIgEと特異的に反応することが証明された。

【0008】Jun a 2のヌクレオチド配列と、スギ花粉アレルゲンCry j 2(WO94/11512)及びヒノキ花粉アレルゲンChao 2(WO97/47648)のヌクレオチド配列を対応(アラインメント)させると、アミノ酸配列レベルで、それぞれ70.7%、及び82.0%の相同性を有する。

【0009】さらに、本発明は、マウンテンシダーアレルゲンタンパク質の部分、アナログ又は誘導体をコードする本発明の核酸分子の変異体を含む。変異は、例えば、自然のアレル変異のように自然に発生する。人為的に生じる変異は、当該技術分野で公知の部位特異的突然変異

誘発技術を用いて作製できる。

【0010】このような変異は、一つ又は二つ以上のヌクレオチドを含むヌクレオチドの置換、欠失、又は付加によって作製される変異を含む。該変異は、コーディング領域、又は非コーディング領域、又はその両方を変異させ得る。コーディング領域の変更は、保存的、又は非保存的アミノ酸置換、欠失、又は付加を生じ得る。精製、又は発現したマウンテンシダーアレルゲンタンパク質の機能的特性は、例えば、該花粉症患者の血液中のIgE結合活性を調べることにより可能である。

【0011】Jun a 2の抗原性断片をコードする核酸配列の断片も本発明に包含される。「抗原性断片」とは、ヒトにおいて免疫応答（例えば、IgEの結合；IgG及びIgMの産生の誘発；リンホカイン分泌；T細胞増殖応答等）を誘発するタンパク質又はポリペプチドを意味する。

【0012】本発明により、マウンテンシダーアレルゲンタンパク質の一次構造が明らかにされたので、該一次構造に基づき、当業者であるならば、該タンパク分子上のT細胞エピトープを容易に同定することができる。同定方法は当業者に公知である（例えば、WO97/32600公開公報参照）。概説すれば、該一次構造をカバーする12～20残基からなるオーバーラップペプチドを合成する。マウンテンシダー花粉症患者の末梢血リンパ球、樹立されたT細胞ライン、或いはT細胞クローンと該ペプチドを培養し、T細胞増殖応答（例えば、³H-チミジンの取り込み）を測定することによって、T細胞エピトープ部位を同定する。したがって、本発明は、このようにして同定された少なくとも1つのマウンテンシダーアレルゲンタンパク質のT細胞エピトープを含むペプチドも包含する。

【0013】該T細胞エピトープペプチドは、マウンテンシダー花粉又は該花粉と交差反応性のアレルゲンにアレルギー反応を引き起こす患者に対するペプチド免疫療法剤として有用である（Wallner, B.P. & Geffer, M.L.: Allergy, 49: 30）。

【0014】一般に、Jun a 2の断片をコードする核酸配列は、成熟タンパク質をコードする塩基から選ばれるが、ある場合には、断片の全て又は一部を本発明の核酸配列のリーダー配列から選ぶのが望ましい。本発明の核酸配列は、リンカー配列、修飾制限エンドヌクレアーゼ部位及びJun a 2又はその断片のクローニング、発現、或いは精製に有用な他の配列も含むことができる。

【0015】Jun a 2をコードする核酸配列は、例えば、マウンテンシダー花粉から以下のようにして得ることができる。

【0016】マウンテンシダー花粉からmRNAを精製し、逆転写によりcDNAを調製する。このcDNAをファージあるいはプラスミドベクターに結合し、いわゆるcDNAライブラリーを作製する。

【0017】一つの実施形態においては、配列番号：1に示すポリヌクレオチド配列からのオリゴヌクレオチドプライマーを用いることが有利である。このようなヌクレオチド配列は、少なくとも約15ヌクレオチドの断片であり、さらに好ましくは、少なくとも20ヌクレオチドである。もちろん、それより長い25～600ヌクレオチドからなる断片も有用である。このようなプライマー配列は、マウンテンシダーアレルゲンタンパク質とIgE抗体交差反応性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いてデザインすることもできる。

【0018】標識した上記プライマーをプローブとした緩和な条件でのハイブリダイゼーションを行って、相同性の高いcDNAを挿入配列として保持するクローンを選択する。また本発明の核酸配列に基づいて合成したプライマーにより、相同性の高いcDNA断片を増幅することもできる。この核酸断片の5' 或いは3'側の配列を得る方法としては、RACE法（Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 8998-9002.）がある。またcDNAを閉環してから反転PCR法を適用する事によっても、5' 或いは3'側の配列を得ることができる。

【0019】本発明のDNAに代表される核酸配列は、RNAの形態、例えば、mRNA、或いは、DNAの形態、例えば、クローニング又は合成で作製されるcDNA及びゲノムDNAを含む。該DNAは2本鎖（double-strand）、又は1本鎖（single-strand）であってもよい。1本鎖DNA、又はRNAは、コーディング鎖（センス鎖）であってもよく、また、ノンコーディング鎖（アンチセンス鎖）であってもよい。

【0020】「単離された核酸分子」とは、マウンテンシダー花粉アレルゲンから単離された核酸分子、DNA又はRNAを意味する。例えば、ベクター中に含まれる組換えDNA分子は、本発明の目的のために単離されたと考えられる。さらに、単離されたDNA分子の例は、異種の宿主細胞中に保持される組換えDNA分子を含むか、又は、溶液中の精製された（部分的に又は実質的に）DNA分子を含む。さらにまた、単離されたRNA分子は、本発明のDNA分子のin vivo又はin vitro転写産物を含む。また、本発明においては、単離された核酸分子は、化学合成の核酸分子を含む。

【0021】本発明は、単離された核酸分子を発現するための発現ベクター及び該ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。Jun a 2をコードする核酸配列又はそれらの1断片を発現ベクターに挿入し、適切な宿主でポリペプチドを発現させることによって、Jun a 2タンパク質又はそのペプチド断片を組換え的に産生させることができる。様々な発現系が当業者に公知である。特に、大腸菌（*E. coli*）を宿主とするタンパク質の大量発現系は試みてみるべきである。

【0022】大腸菌発現系としては、1)他のタンパク質(グルタチオン-S-トランスフェラーゼやマルトース結合タンパク質等のキャリアタンパク質)や、短いアミノ酸配列と核酸レベルで融合させて発現する系と、2)そのまま単独で発現させる系とがある。本発明はその何れをも用いることができる。現在、様々な大腸菌発現系が市販されており、例えば、pGEX(Pharmacia)、pMAL(New England Biolabs)、pET(Novagen)、pRSET(Invitrogen)、pET(Stratagene)、pETTRX(Novagen)、pTrx(Invitrogen)、pPpROEXHT(Gibco BRL)等が挙げられる。これらの中で、転写能力が強いT7ファージRNAポリメラーゼを利用するpETシステム(Novagen, Stratagene)が今日最も汎用されており、本発明においても好ましい発現系と考えられるが、当業者であれば、本発明の実施のために、それぞれ個々に試みてみて最もふさわしい発現系を選択することができる。

【0023】機能的特性に翻訳後修飾が必要な場合は、酵母発現系(Sreekrishna, K. et al.: Gene, 190: 55-62, 1997; Kondo, K. et al.: Nature Biotechnology, 15: 453-457, 1997)、昆虫細胞発現系[Piwnic-Worms, H.: Current Protocols in Molecular Biology(ed. Ausubel, F.M. et al.): 16.15.1-16.19.9, 1987]、ウイルス/哺乳動物細胞発現系(Moss, B. et al.: Current Protocols in Molecular Biology(ed. Ausubel, F.M. et al.): 16.15.1-16.19.9, 1987)、哺乳動物細胞発現系[Kaufman, R.J. et al.: Current Protocols in Molecular Biology(ed. Ausubel, F.M. et al.): 16.12.1-16.14.13, 1987; Sambrook, J. et al.: Molecular Cloning A Laboratory Manual/2nd ed.: 16.1-16.81, 1989]について試みてみる。

【0024】マウンテンシダー花粉アレルゲンタンパク質は適切な形、例えば、融合タンパク質として発現することができ、また、分泌シグナルのみならず、付加的な異種の機能領域を含むことができる。例えば、付加的なアミノ酸領域、特に、荷電したアミノ酸が、精製の間、或いは引き続きハンドリング及び貯蔵のあいだ、宿主細胞中での安定性及び持続性を改善するために、該タンパク質のN末端に付加することができる。また、ペプチドの一部分を精製を容易にするために付加することができる。このような領域は、該タンパク質の最終調整に先だって除くことができる。安定性を改善し、精製を容易にすべく、分泌を生じさせるために、ポリペプチドに対して、ペプチドの一部の付加は、当業者によく知られた慣用技術である。

【0025】本発明は、マウンテンシダーアレルゲンタンパク質に対する特異的抗体、及び該抗体と特異的に反応するタンパク質(或いはポリペプチド)を包含する。該抗体は、ポリクローナル、又はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、さらには、ヒト抗体を包含する。マウンテ

ンシダーアレルゲンタンパク質、若しくはそれらの変種、又はそれらを発現する細胞を抗原として、好ましくは、非ヒト動物にアジュバントとともに投与することにより、該抗原に対して該抗体を生じさせることができる。モノクローナル抗体は、当業者によく知られた技術を用いて調製することができる(Kohler, et al., Nature 256: 495, 1975; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al., ed., 1989)。マウンテンシダーアレルゲンタンパク質に対するポリクローナル抗体も、当業者に公知の方法を用いて調製できる(Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1988))。

【0026】モノクローナル抗体の調製のために、連続的セルライン培養によって産生される抗体を提供する技術は、いずれも用いることができる。このような技術は、例えば、ハイブリドーマ技術(Kohler, et al., Nature 256: 495, 1975)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor, et al., 1983, Immunology Today 4: 72)、及びEBVハイブリドーマ技術(Cole, et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)、等が挙げられる。

【0027】本発明のマウンテンシダーアレルゲンタンパク質、その機能的断片、又は抗体をマウンテンシダー花粉症を検出し及び診断に使用することもできる。例えば、検査対象のヒトから得た血液中のIgE抗体をELISA法で測定することができる。

【0028】最近DNAを投与して、そのコードするタンパク抗原に対する免疫を獲得する方法が、DNAワクチンとして報告されている。そのin vivoにおけるタンパク抗原発現機構等は未だ明らかではないが、通常用いられている免疫方法、つまりタンパク抗原を免疫すると、Th2タイプのヘルパーT細胞が誘導されるのに対して、このDNAワクチンによって誘導されるヘルパーT細胞はTh1タイプであることから、新しい免疫療法として注目されている。したがって、アレルギーを引き起こすマウンテンシダーアレルゲンJun a 2のDNAを免疫原として投与することにより、Jun a 2に対するTh1ヘルパーT細胞の誘導が期待され、アレルギーで悪玉と称されているTh2タイプのヘルパーT細胞からTh1タイプへの変化によるアレルギー治療が可能である。

【0029】

【実施例】以下、本発明を実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものでない。

【0030】[実施例1] マウンテンシダー花粉からのRNAの調製
曾根らの方法(Sone, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 199: 619-625, 1994)に準じ、以下のよう

にマウンテンシダー花粉からRNAを調製した。1gのマウンテンシダー花粉に、5mlの抽出緩衝液(0.1M LiCl, 10mM EDTA, 1% SDS, 20% 2-メルカプトエタノール、0.1M Tris-HCl, pH 9.5)と5mlのフェノール/クロロフォルム/イソamilアルコール(25:24:1)を加え、ポッター型のホモゲナイザーで処理した。10,000 x gで10分間遠心して得られた上清について、フェノール抽出とクロロフォルム/イソamilアルコール抽出をそれぞれ一回づつ行ってから、1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.6)と等容の4M LiClを加え、-20℃で一晩放置した。10,000 x gで10分間遠心して得られた沈澱を0.1%のSDSを含むTE緩衝液に溶解し、1部を希釈して紫外線の吸光度を測定し、残りを3等分してエタノール沈澱を行った。約75µgのRNAが得られた。

【0031】[実施例2] 1本鎖cDNAの合成
約5µgのマウンテンシダー花粉RNAを水に溶かし2分して、オリゴdT、或いは、ランダムヘキサマー(GIBC0-BRL 8190)と混合してから、70℃で3分間、加熱した。急冷してから、RNase Hが欠損したモロニー Maus白血球ウィルスの逆転写酵素(GIBC0-BRL 8053 SA)を使用してcDNAを合成した。反応産物は、フェノール抽出とエーテル抽出を行ってから、エタノールで沈澱させた。沈澱を0.1M NaOHに溶解して65℃で45分間加熱処理し、RNAを加水分解した。1MのHCl 1/10容量加えて中和してからエタノール沈澱を行った。70%エタノールで洗浄後乾燥し、1/5濃度のTE緩衝液50µlに溶解した。

【0032】[実施例3] 2本鎖cDNAの合成
5側プライマー(1pmole)と1本鎖cDNA溶液(3µl)を混合して50µM dNTPの反応溶液を20µl用意し、96℃で5分間加熱した。その後、30分かけて65℃から35℃に冷却してプライマーをハイブリダイズさせてから、クレノウ断片(1U/20µl)による修復合成を最初20℃、次いで37℃でそれぞれ10分間づつ行った。

【0033】[実施例4] PCRによる増幅
2本鎖cDNA溶液のDNA合成PCRは、温度サイクルインキュベーター(DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus)を使用し、96℃ 15秒、55℃ 30秒、72℃ 90秒の反応サイクルを25-35回繰り返すことにより行った。反応液(100µl)の組成は次の通りである。20mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 25mM KCl, 0.05% Tween 80, 100µg/mlゼラチン、50µM dNTPs, 10-20U/ml Taq DNAポリメラーゼ。鋳型cDNA溶液は10µlを使用し、プライマーはそれぞれ20pmoleを加えた。DNA合成酵素(Thermus aquaticus由来)は鋳型DNAを96℃で5分間変性後、55℃で3分間、プライマーとアニールした後72℃で加えた。50

その後5分たってから温度サイクルを開始した。反応終了後、反応液は直接、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、生成物の分析/精製を行った。

【0034】[実施例5] DNA断片の精製
ポリアクリルアミドゲルからのDNAの抽出は0.5M酢酸アンモニウム、10mM酢酸マグネシウム、1mM EDTA、0.1% SDSで4-16時間、37℃で行った。抽出液はブタノール濃縮してから2.5容のエタノールを加え、DNAを沈澱させた。アガロースゲルからのDNAの抽出/精製はQiagen社のQIAEXIIゲル抽出キットで行った。

【0035】[実施例6] DNA断片のクローニング
pUC19、或いはpUC118から調製したベクターアームに結合させ、大腸菌K12株(MC1061)の感受性菌の形質転換を行った。Cry j 2のcDNA塩基配列を参考に合成した種々のプライマーを使用したPCRでJun a 2のcDNAが増幅されるかどうかを実験したところ、VDGI14S(配列番号:6)とGIDI37A(配列番号:7), WKNN17S(配列番号:8)とGIDI37A(配列番号:7), GIDI37S(配列番号:9)とAEVS48A(配列番号:10), AEVS48S(配列番号:11)とLKLT70A(配列番号:12)のプライマーの組み合わせで、期待する長さのcDNA断片の増幅が観察された。VDGI14S(配列番号:6)とGIDI37A(配列番号:7)をプライマーとしたPCRでは非特異的なバンドが多数生ずるので、残りの3つで得られるcDNA断片について解析した。

【0036】WKNN17S(配列番号:8)とGIDI37A(配列番号:7)をプライマーとするPCRで増幅される約400bpのcDNA断片WK-GIにはGIDI37A(配列番号:7)で付加したSal Iの認識部位が3'-末端に存在する。そこで、このcDNA断片をSal I消化してから、pUC19のSma I-Sal Iアームに結合させてクローン化することを試みたが失敗した(DNA断片WK-GIには3'-末端に付加したSal I認識部位以外にも1ヶ所Sal Iの認識部位が存在するためクローニングの効率が低い)。そこで、結合反応の産物について、WKNN17S(配列番号:8)と逆方向のユニバーサルプライマーM13R(配列番号:13)を使用しPCRを行ったところ、約230bpのDNA断片が増幅された。そこで、このDNA断片を分離してSal I消化してからpUC19のSma I-Sal Iアームに結合させてクローン化した(pUC19WK-Sal(T)#1 pUC19WK-Sal(R)#2)。また、Sal I消化したWK-GI断片をpUC19のSal Iアームに結合させて残りの部分をクローン化した(pUC19Sal-GI(R)#1/2, pUC19Sal-GI(T)#2)。GIDI37S(配列番号:9)とAEVS48A(配列番号:10)をプライマーとするPCRで増幅される約230bpのcDNA断片GI-AEにもAEVS48A(配列番号:10)で付加したSal Iの認識部位が3'-末端に存在する。そこで、このcD

NA断片をSal I消化してからpUC19のSma I-Sal Iアームに結合させてクローン化した(pUC19GI-AE(T)#1 pUC19GI-AE(R)#2/3)。

【0037】AEVS48S(配列番号:11)とLKLT70A(配列番号:12)をプライマーとするPCRで増幅される約400bpのcDNA断片AE-LKにはAEVS48S(配列番号:11)で付加したPst Iの認識部位が5'-末端に、LKLT70A(配列番号:12)で付加したSal Iの認識部位が3'-末端に存在する。そこで、このcDNA断片をPst IとSal Iで消化してからpUC19のPst I-Sal Iアームに結合させて、大腸菌の形質転換を行った。アンピシリン耐性のクローンのプラスミドの挿入塩基配列の大きさをHind III/EcoR I消化してから調べたところ、ほとんどのクローンが200bp程度のDNAをクローン化していたが、約1/6(pUC19AE-LK(T)#3, pUC19AE-LK(R)#1/109)は期待する長さのDNA断片をクローン化していた(DNA断片AE-LKには5'-末端に付加したPst I認識部位以外にも1ヶ所Pst Iの認識部位が存在するためクローニングの効率が低い)。上記の3つの断片をクローン化する11のクローンについて挿入塩基配列をPerkin Elmer社のAmpliCycleシーケンシングキット(N808-0175)を使用したダイデオキシ法で決定した。DNAは[³²P]-dCTPで標識し、オートラジオグラムを富士写真フィルムのBAS2000で作製して塩基配列を読んだ。pUC19WK-Sal(T)#1とpUC19WK-Sal(R)#2の挿入配列は同じであり、Jun a 2のcDNAの正しい塩基配列と判断された。WK-GI断片の残りの部分をクローン化したpUC19Sal-GI(R)#1とpUC19Sal-GI(T)#2の配列を比較すると3ヶ所(いずれも1塩基の置換)で相違していた。pUC19Sal-GI(R)#2の配列は、それらの部位で他の2クローンの一方と一致し、正しい配列と考えられる。pUC19GI-AE(R)#2とpUC19GI-AE(T)#1は5ヶ所(いずれも1塩基の置換)で相違していた。pUC19GI-AE(R)#3の配列は、それらの部位で他の2クローンの一方と一致し、正しい配列と考えられる。pUC19GI-AE(R)#3では、299番目のヒスチジンのコドンがCACからCATに変化していたがpUC19AE-LK(R)#1でもCATであるのでmRNAの多型性を反映しているものと考えられる。pUC19AE-LK(T)#3とpUC19AE-LK(R)#1は5ヶ所(いずれも1塩基対の置換)で相違しているがpUC19AE-LK(R)#109はこれらの部位で他の2クローンの一方と一致し、これらの部位で正しい塩基配列であると判断された。一方、pUC19AE-LK(R)#109にも1ヶ所、他の2クローンと異なる(変異した)部位が存在していた。これらの塩基配列を総合して3つの断片の塩基配列を推定した。さらに、それらの配列を繋ぎ合わせるにより、Jun a 2のcDNAのうち約半分(820bp)の配列が判明した。

【0038】Cry j 2とCha o 2の開始コドンの直前の塩

基配列をもとに合成した5'側プライマーC2S2(配列番号:14)とJun a 2の既知のcDNA塩基配列をもとに合成した3'側プライマーARLTA(配列番号:15)による35サイクルPCRを行ったところ、期待される長さ(473bp)のDNA断片C2-ARが増幅された。このDNA断片を1.5%アガロースゲル電気泳動で分離、精製した。EcoR IとXho Iで消化してからpUC19のEcoR I-Sal Iアームに結合させ、大腸菌の形質転換を行った。アンピシリン耐性の6クローンについてプラスミドDNAの微量調製を行い、Hind III/EcoR I消化とPCRで挿入塩基配列の大きさを調べたが、挿入塩基配列は無いが、あったとしても非常に短いという結果であった。そこで36クローンについて順方向M13ユニバーサルプライマー(M13F)(配列番号:16)とARLTA(配列番号:15)を用いたでスクリーニングを行い、450bp程度の挿入塩基配列をもつ3クローンを選びだした。pUC19C2-AR#8とpUC19C2-AR#102について塩基配列の決定を行い5'側の約240bpが決定した(#8と#102で同一)。3'側プライマーの20bp上流にEcoR I認識部位があり、そのためクローニングが困難であったことが判明した。中間にSph Iの認識部位があるのでC2-AR断片をSph IとXho Iで消化してからpUC19のSph I-Sal Iアームと結合させて大腸菌の形質転換を行い、pUC19Sph-AR#1とpUC19Sph-AR#101を得た。これらの(独立のPCRから得られた)クローンの挿入塩基配列は同一であり、Jun a 2のcDNAの5'側が確定した。

【0039】Jun a 2のcDNAの3'側の配列は、3'-RACE(Rapid Amplification of cDNA ends)法で取得した。

【0040】[実施例7] 3'RACE法による3'側塩基配列の増幅

Frohman et al.(Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 8998-9002.)に準じてアダプタープライマーPNXT(17量体のオリゴdTにPst I/Not I/Xho I/Cla Iの認識配列を付加したもの)(配列番号:17)とアダプターPNXC(配列番号:18)を合成した。50pmoleのPNXT(配列番号:17)をプライマーに約2μgのRNAを鋳型に逆転写を行った。得られたcDNAはフェノール/クロロフォルム抽出とエーテル抽出を行ってからエタノール沈澱を行い、乾燥後、50μlのTE緩衝液(2mMTris/HCl, 0.2mMEDTA, pH8.0)に溶解した。このcDNAの1/25を鋳型にpUC19AE-LK(R)#1の塩基配列をもとに合成したプライマーVATCS(配列番号:19)とアダプターPNXC(配列番号:18)をプライマーに30-35サイクルのPCRを行い、反応産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、期待する易動度(約500bp)のバンドを切り出し、DNAを抽出/精製し、Not IとSal Iで消化してから予め、No

t I認識部位を組み込んだpUC19のNot I-Sal Iアームと結合させクローン化した。

【0041】Cry j 2のcDNA塩基配列と高い相同性があるクローン(pUC19VA-pA#11, 13, 14, 102, 106, 205)では、終止コドンの約20bp前にPvu IIの認識部位、約100bp後にHind IIIの認識部位がある。必要に応じて、これらの制限部位を利用したサブクローニングと塩基配列の決定を行い、結果を総合してVA-pA断片の塩基配列を推測した。VATCS(配列番号: 19)プライマーからPvu II認識部位に至るまでの配列はpUC19VA-pA#11の配列、Pvu II認識部位からHind III認識部位に至るまでの配列はpUC19VA-pA#13, 14, 205の配列、Hind III認識部位からポリAに至るまでの配列はpUC19VA-pA#102の配列がmRNAの主要成分の塩基配列を正しく反映していると思われる。

【0042】本発明者らが決定したJun a 2cDNAの塩基配列を配列番号1に示す。Juna 2のcDNA塩基配列をCry j 2のcDNA塩基配列に対応させると、N-末端に相当する部分に3塩基対の挿入、C-末端に相当する部分に3塩基対の挿入と27塩基対におよぶ欠失がある。これらの欠失/挿入部位を除いた共通部分でのJun a 2のCry j 2に対する(アミノ酸)のホモロジーは70.7%である。Cry j 2と74.7%のホモロジーのあるヒノキ花粉アレルゲンChao 2に対するJun a 2のホモロジーは82.0%である。

【実施例8】ヒスチジンタグ結合Jun a 2タンパク質の発現系

5つの短い断片として得られたJun a 2のcDNA断片を連結し、大腸菌発現ベクターに組み込んだ。

【0043】Jun a 2のcDNAの暗号化領域にはSal IとPst Iの認識部位がそれぞれ1ヶ所ずつあり、それらによって400-500bp程度の3つの断片に分割できる。この3つの断片をpUC19上にクローン化、塩基配列の確認を行ってから、繋ぎ合わせてヒスチジンタグ結合タンパクの大腸菌発現ベクターpQE9(Qiagen)に組み込んだ。

【0044】pUC19C2S#8からN-末端から56番目のアミノ酸からSph Iの認識部位に至るまでのcDNA断片をJ2AS(配列番号: 20)と逆方向M13R(配列番号: 13)によるPCRで増幅し、同時に5'末端にBamHIの認識部位を付加した。また、pUC19Sph-AR#1からM13R(配列番号: 13)とARA(配列番号: 21)をプライマーとしたKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡)によるPCRでSph Iの認識部位からARLTA(配列番号: 15)プライマーの認識部位までを増幅した。これらのDNA断片を精製してから混合し、Sph Iで消化してからT4 DNAリガーゼで再結合の反応を行った。J2AS(配列番号: 20)とリン酸化したARA(配列番号: 21)をプライマーとしたPCRで結合したDNA

断片b-ARを増幅した。一方、pUC19WK-Sal(T)#1からリン酸化したLTS(配列番号: 22)とM13R(配列番号: 13)をプライマーにしたPCRによりARLTA(配列番号: 15)プライマーの認識部位からSal Iの認識部位までのDNA断片LT-Sを増幅した。b-ARとLT-SをT4 DNAリガーゼで結合してからJ2AS(配列番号: 20)とM13R(配列番号: 1)をプライマーとしたPCRで結合したDNA断片b-Sを増幅した。b-SをBamHIとSal Iで消化してからpUC19のBamHI-Sal Iアームにクローン化し、pUC19bSとした。pUC19bS#2の挿入塩基配列をダイデオキシ法で読み、配列が正しいことを確認した。

【0045】pUC19Sal-GI(R)#2からSal Iの認識部位からGIDI37S/GIDI37A認識部位に至るまでのcDNA断片をM13R(配列番号: 13)とリン酸化したGIA(配列番号: 23)によるPCRで増幅した。また、pUC19GI-AE(R)#3からリン酸化したDIS(配列番号: 24)とAEA(配列番号: 25)をプライマーとしたPCRでGIDI37S/GIDI37Aプライマーの認識部位からAEVS48S/AEVS48Aプライマーの認識部位までを増幅した。これらのDNA断片を精製してから混合し、T4 DNAリガーゼによる結合反応を行った。M13R(配列番号: 13)とリン酸化したAEA(配列番号: 25)をプライマーとしたPCRで結合したDNA断片M13R-S-AEを増幅した。一方、pUC19AE-LK(R)#109からリン酸化したVSS(配列番号: 26)とM13F(配列番号: 16)をプライマーにしたPCRによりAEVS48S/AEVS48Aプライマーの認識部位からPst Iの認識部位までを含むcDNA断片VS-P-M13Fを増幅した。M13R-S-AEとVS-P-M13Fを4 DNAリガーゼで結合してからM13R(配列番号: 1)とM13F(配列番号: 16)をプライマーとしたPCRで結合したDNA断片M13R-S-AEVS-P-M13Fを増幅した。M13R-S-AEVS-P-M13FをSal IとPst Iで消化してからpUC19のSal I-Pst Iアームにクローン化し、pUC19SPとした。pUC19SP#2の挿入塩基配列を読み、異常がないことを確認した。

【0046】pUC19AE-LK(R)#1からPst Iの認識部位からVATCSプライマー(配列番号: 19)の認識部位に至るまでのcDNAを含むDNA断片M13R-P-VAをM13R(配列番号: 13)とリン酸化したVAA(配列番号: 27)によるPCRで増幅した。また、pUC19VA-pA(1)#11からリン酸化したTCS(配列番号: 28)とJ2CA(配列番号: 29)をプライマーとしたPCRでVATCS(配列番号: 19)プライマーの認識部位からC-末端に至るまでのDNA断片TC-J2CAを増幅し、同時に終止コドンの一部TAを付加した。M13R-P-VAとTC-J2CAをT4 DNAリガーゼで結合してからM13R(配列番号: 13)とリン酸化したJ2CA(配列番号: 29)をプライマーとしたPCRで、結合したDNA断片M13R-P-VATC-J2CAを増幅した。M13R-P-VAT

C-J2CAをPst Iで消化してからpUC19のHind III-Pst Iアームにクローン化し、pUC19Phとした。pUC19Ph#2の挿入塩基配列を読み、異常がないことを確認した。

【0047】pUC19SP#2をBamH IとHind IIIで消化し、ベクターと挿入塩基配列がSalI 認識部位でつながった3.3 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離、精製した。また、pUC19Ph#2をPst IとHind IIIで消化し、アガロースゲル電気泳動で挿入塩基配列を分離した。これらのDNA断片を結合させ、大腸菌の形質転換を行いpUC19Sh#1を得た。

【0048】pUC19Sh#1をBamH IとSal Iで消化し、ベクターと挿入塩基配列がHind III認識部位でつながった3.7 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離、精製した。また、pUC19bS#2をPst IとSal Iで消化し、アガロースゲル電気泳動で挿入塩基配列を分離した。これらのDNA断片を結合させ、大腸菌の形質転換を行いpUC19bh#1を得た。

【0049】pUC19bh#1をBamH IとHind IIIで消化し、アガロースゲル電気泳動で挿入塩基配列を分離した。このDNA断片をヒスチジンタグ結合タンパクの発現ベクター pQE9のBamH I-Hind IIIアームに結合させ、大腸菌 M13[pREP4] の形質転換を行いpQEJ2 N#1-3 (+pREP4)を得た。これらのプラスミドDNAのHind III/BamH I消化で期待される長さ(約1.4 kbp)の挿入DNAがあることを確認した。

【0050】[実施例9] ヒスチジンタグ結合Jun a 2の調製

pQEJ2 N#2 を保持する大腸菌 M13[pREP4]を400ml*

花粉症患者血漿/血清のヒスチジンタグ結合 Jun a 2 と結合する IgE の蛍光

ELISA

試料	蛍光強度
マウンテンシダー花粉症患者1血漿	2
ヒノキ花粉症患者1血清	3
ヒノキ花粉症患者2血清	1
ヒノキ花粉症患者3血清	1
ヒノキ花粉症患者4血清	12
ヒノキ花粉症患者5血清	489
健常者1血清	0
健常者2血清	0

【0053】[実施例11] マウンテンシダー花粉からのJun a 2の精製
スギ花粉アレルゲンCry j 2 よりも Jun a 2との相同性の高いヒノキ花粉アレルゲンCha o 2に対して作製した抗体との反応性を指標に、Jun a 2と思われるタンパクをマウンテンシダーから精製した。

* x 2のLB培地で培養し、濁度(A₆₀₀)が0.9になった時点で1mMになるようにIPTGを加え導入遺伝子の発現を誘導した。5時間培養を継続してから菌体を遠心して集め、封入体画分から6M塩酸グアニジンでヒスチジンタグ結合Jun a 2を抽出し、Ni-NTA カラムクロマトによる精製を行った。還元状態でのSDS-PAGEを行い、純度と収量を見積もった。純度70%程度のヒスチジンタグ結合Jun a 2が約25mg得られた。

【0051】[実施例10] ヒスチジンタグ結合Jun a 2の抗原性

ヒスチジンタグ結合Jun a 2の8M尿素溶液を1μg/mlになるように0.5M炭酸緩衝液(pH9.5)で希釈し、96-穴ELISAプレート(FluoroNunc MaxiSorp)の各穴に100μlずつ入れ4で一晚放置した。1/4に希釈したBlock Ace(雪印)でのブロッキングを行ってから、1/4に希釈したマウンテンシダー花粉症患者血漿(PlasmaLab International,16567-JF)と反応させた。さらに、-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体を反応させた後、蛍光基質(0.1mM 4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシド)で発色させた。結果を表1に示すが、マウンテンシダー花粉症患者1血漿に認められる抗Jun a2 IgEによる蛍光は僅かであった。同時に5名ヒノキ花粉症患者の血清についても抗Jun a 2 IgE測定を行った。これらの患者のうち2名には明らかにマウンテンシダー花粉と特異的に反応するIgEの存在が認められた。

【0052】

【表1】

【0054】ジエチルエーテルで脱脂したマウンテンシダー花粉を125mM炭酸緩衝液(pH8.3)に懸濁し、氷冷下に超音波処理し、一晚4でタンパクを抽出した。抽出液はDEAE-セルロースカラムクロマトにかけ素通り画分を集めた。これを亜鉛キレートカラムクロマトにかけ、吸着/溶出画分を得て、2M硫酸アン

モニウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.2)に対して透析してから、Phenyl Sepharose疎水クロマトグラフィーにて精製した。さらに、溶出画分を10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)に対して透析後、Mono S HR 5/5による陽イオン交換カラムクロマトで精製した。これらの精製操作によりJun a 2はSDS-PAGEで約90%以上の純度に精製された。

【0055】精製したJun a 2タンパクを、還元条件下でゲル濃度12.5%のSDS-PAGEで分離し、銀染色を行った(図1)。それぞれ35ng(レーン1)、105ng(レーン2)、及び175ng(レーン3)を示す。レーン4はマーカータンパクである。この精製標品は見かけの分子量が43kDaである。

【0056】[実施例12] ウエスタンブロット解析 100ngの精製Chao 2タンパクを対照として、精製Jun a 2タンパク100ngを還元条件下でSDS-PAGEで分離後、PVDF膜にブロットした。3%ウシ血清アルブミン溶液でブロッキング後、5000倍希釈抗Chao 2ウサギ抗体及びペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体でウエスタンブロット解析した(図2)。レーン1は100ngのChao 2タンパク(対照)、レーン2は100ngの精製Jun a 2タンパクを示す。矢印で示したように、抗Chao 2ウサギ抗体によってJun a 2タンパクも検出できる。

【0057】[実施例13] Jun a 2のN-末端アミノ酸配列の決定

精製したJun a 2を還元条件下でSDS-PAGEを行ってからPVDF膜に電気泳動的に転写した。クーマシー染色を行ってから、見かけの分子量が43,000のバンドを夾みで切りとり、エドマン法によりN-末端のアミノ酸配列を解析した。その結果、このタンパクのN-末端のアミノ酸配列はAsp-Val-Ala-Ile-Val-Phe-Asn-Val-Glu(配列番号:4)であることが判明した。この配列はcDNAから予想される花粉タンパクのアミノ酸配列(配列番号:3)の55番目から63番目までと一致している。

【0058】[実施例14] マウンテンシダー花粉由来のJun a 2の抗原性

マウンテンシダー花粉から精製したJun a 2抗原、スギ花粉由来のCry j 2抗原およびヒノキ花粉由来のChao 2抗原それぞれを10μg/mlになるようにリン酸緩衝液(pH7.2)で希釈し、96穴ELISAプレート(Fluor

*一晩放置した。Block Ace(雪印)でブロッキングを行ってから、Block Aceで10倍に希釈したマウンテンシダー花粉症患者血漿(PlasmaLab International,16567-JF)またはヒノキ花粉症患者血清8例および健康人血清3例と反応させた。さらに、 α -ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体を反応させた後、蛍光基質(0.1mM 4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシド)で発色させた。結果を図3に示す。陽性対照とした1例のマウンテンシダー花粉症患者血漿だけでなく、ヒノキ花粉症患者血清中にも精製したJun a 2抗原と特異的に反応する抗Jun a 2 IgEが検出された。また、陰性対照とした健康人血清3例中には、Jun a 2, Chao 2 およびCry j 2抗原に対する特異的IgEは検出されなかった。

【0059】

【発明の効果】本発明により、マウンテンシダー花粉アレルギーJun a 2をコードする核酸配列及び該核酸配列から推定されるアミノ酸配列が明らかとなった。その結果、該アミノ酸配列に基づき、マウンテンシダー花粉アレルギーJun a 2のT細胞及びB細胞エピトープの同定が可能となり、抗原特異的なマウンテンシダー花粉症治療薬・予防薬の開発が可能となった。さらに、該核酸配列を用いたアレルギーに対するDNAワクチンの開発が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 精製Jun a 2タンパクを、還元条件下でゲル濃度12.5%SDS-PAGEで分離し、銀染色を行った結果を示す。Jun a 2タンパクの注入量はレーン1:35ng、レーン2:105ng、レーン3:175ngである。レーン4はマーカータンパクを示す。

【図2】 精製Jun a 2タンパク100ngを還元条件下でSDS-PAGEで分離後、5000倍希釈抗Chao 2ウサギ抗体及びペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体によるウエスタンブロット解析した結果を示す。レーン1は100ngのChao 2タンパク(対照)、レーン2は100ngの精製Jun a 2タンパクを示す。

【図3】 各々の花粉から精製したJun a 2, Chao 2, Cry j 2抗原をそれぞれ96穴プレートにコーティングし、ヒノキ花粉症患者血清を反応させてそれぞれの抗原に対する特異的IgEを蛍光ELISAで検出した。陽性対照のマウンテンシダー花粉症患者()だけでなく、ヒノキ花粉症患者血清()にも、Jun a 2抗原と反応する特異的IgEが検出された。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Milk Products Co., Ltd.

<120> Nucleic acids encoding a mountain cedar pollen allergen

<130> 00H024

<140>

<141>

<150> JP P1999-359719

<151> 1999-12-17
<160> 29
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1759
<212> DNA
<213> Juniperus ashei
<400> 1
atgagcatga aattcatggc tgcgttggcc tttc
tggcct tgcaattgat tgtaatggcg 60
gcaggagaag atcaatctgc ccaataatg ttgg
acagtg ataccaaaca atatcatcga 120
tcgagtagga atttgagaaa acgtgttcat catg
ctcgtc atgatgttgc catcgtcttc 180
aatgtagaac actacggcgc agtggcgat ggaa
agcatg attccactga cgcatttgaa 240
aaaacatgga atgcagcatg caataagtta tcag
ccgtat ttctcgtgcc tgctaacaag 300
aaatttgttg taaacaattt agttttctac gggc
cgtgtc aacctcactt ttcttttaag 360
gttgatggga ctattgcggc ataccagat ccag
caaagt ggaagaattc gaaaatatgg 420
atgcattttg ctcggcttac agatttcaat ttaa
tgggaa cgggtgtcat tgatggacaa 480
ggaaatagat ggtggtctga ccaatgtaa acga
tcaatg gacgaacagt ctgtaacgat 540
aaaggtcgac caacagccat caaattgat tttt
ccaaga gtgtgacagt caaagaactg 600
acactgacga acatccctga atctcattta gttt
ttgggtg aatgtgacgg agtgaaaatc 660
caaggaatta aaattaaggc accgagagac agtc
ctaaca ctgacggaat tgatatcttt 720
gcatctaaaa gatttgaaat agaaaagtgc acca
taggaa caggggatga ctgtgtggca 780
gtaggcacgg gatcttctaa tattactatt aagg
atttga cttgcggtcc aggccatgga 840
atgagtatag gaagtcttg gaaagtaac tcta
gatcag aggtttcatt cgtacacctt 900
gacggggcta aattcatcga cactcaaaat ggat
tacgaa tcaaaacatg gcaggggtgt 960
tcaggattgg ccagccatat aacatatgag aacg
ttgaaa tgataaatgc ggagaatcct 1020
atattaatta atcaattcta ttgcacttcg gctg
ctgctt gcaaaaacca gaggtctgca 1080
gttaaaattc aagacgtgac gttcaagaac atac
atggaa catcagcaac aacagcagca 1140
atccaactaa tgtgcagcga cagtgtgcct tgct
caaaca taaagctaag caatgtattt 1200
ttgaaactta catcgggaaa agtcgctacc tgtg
ttaata aaaatgcaaa tggatattac 1260
actaatccc ttaacccttc atgcaagagt ttac
atccag gtcgtacgcc aaaagaactt 1320
gaactccatc aaaagccaac aactttactc atgg

atgcattttg ctccggttac agatttcaat ttaa
 tgggaa cgggtgtcat tgatggacaa 480
 ggaaatagat ggtggtctga ccaatgtaaa acga
 tcaatg gacgaacagt ctgtaacgat 540
 aaaggtcgac caacagccat caaaattgat tttt
 ccaaga gtgtgacagt caaagaactg 600
 aactgacga acatccctga atctcattta gttt
 ttggtg aatgtgacgg agtgaaaatc 660
 caaggaatta aaattaaggc accgagagac agtc
 ctaaca ctgacggaat tgatatcttt 720
 gcatctaaaa gatttgaaat agaaaagtgc acca
 taggaa caggggatga ctgtgtggca 780
 gtaggcacgg gatcttctaa tattactatt aagg
 atttga cttgcggtcc aggccatgga 840
 atgagtatag gaagtcttgg gaaaggtaac tcta
 gatcag aggtttcatt cgtacacctt 900
 gacggggcta aattcatcga cactcaaaat ggat
 tacgaa tcaaaacatg gcaggggtgt 960
 tcaggattgg ccagccatat aacatagag aacg
 ttgaaa tgataaatgc ggagaatcct 1020
 atattaatta atcaattcta ttgcacttgc gctg
 ctgctt gcaaaaacca gaggtctgca 1080
 gttaaaattc aagacgtgac gttcaagaac atac
 atggaa catcagcaac aacagcagca 1140
 atccaactaa tgtgcagcga cagtgtgcct tgct
 caaaca taaagctaag caatgtattt 1200
 ttgaaactta catcgggaaa agtcgctacc tgtg
 ttaata aaaatgcaaa tggatattac 1260
 actaatcccc ttaacccttc atgcaagagt ttac
 atccag gtcgtacgcc aaaagaactt 1320
 gaactccatc aaaagccaac aactttactc atgg
 atgaga agatgggagc atcgctgaac 1380
 tccagccctc cgaattgtaa aaataaatgc aaag
 gttgcc aacctgtaa gccaaagtta 1440
 attattgttc atcctaata gcccggaggat tatt
 atcctc agaggtgggt gtcagctgt 1500
 cataataaaa tctacaacc atag

1524

<210> 3

<211> 507

<212> PRT

<213> Juniperus ashei

<400> 3

Met Ser Met Lys Phe Met Ala Ala Leu Ala

Phe Leu Ala Leu Gln Leu

1

5

10

15

Ile Val Met Ala Ala Gly Glu Asp Gln Ser

Ala Gln Ile Met Leu Asp

20

25

30

Ser Asp Thr Lys Gln Tyr His Arg Ser Ser

Arg Asn Leu Arg Lys Arg

35

40

45

Val His His Ala Arg His Asp Val Ala Ile

His Leu Val Phe Gly Glu Cys Asp Gly Val
 Lys Ile Gln Gly Ile Lys
 210 215 220

Ile Lys Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr
 Asp Gly Ile Asp Ile Phe
 225 230 235 2
 40

Ala Ser Lys Arg Phe Glu Ile Glu Lys Cys
 Thr Ile Gly Thr Gly Asp
 245 250 255

Asp Cys Val Ala Val Gly Thr Gly Ser Ser
 Asn Ile Thr Ile Lys Asp
 260 265 270

Leu Thr Cys Gly Pro Gly His Gly Met Ser
 Ile Gly Ser Leu Gly Lys
 275 280 285

Gly Asn Ser Arg Ser Glu Val Ser Phe Val
 His Leu Asp Gly Ala Lys
 290 295 300

Phe Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile
 Lys Thr Trp Gln Gly Gly
 305 310 315 3
 20

Ser Gly Leu Ala Ser His Ile Thr Tyr Glu
 Asn Val Glu Met Ile Asn
 325 330 335

Ala Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe
 Tyr Cys Thr Ser Ala Ala
 340 345 350

Ala Cys Lys Asn Gln Arg Ser Ala Val Lys
 Ile Gln Asp Val Thr Phe
 355 360 365

Lys Asn Ile His Gly Thr Ser Ala Thr Thr
 Ala Ala Ile Gln Leu Met
 370 375 380

Cys Ser Asp Ser Val Pro Cys Ser Asn Ile
 Lys Leu Ser Asn Val Phe
 385 390 395 4
 00

Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Val Ala Thr
 Cys Val Asn Lys Asn Ala
 405 410 415

Asn Gly Tyr Tyr Thr Asn Pro Leu Asn Pro

Asp Val Ala Ile Val Phe Asn Val Glu His
 Tyr Gly Ala Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Gly Lys His Asp Ser Thr Asp Ala Phe Glu
 Lys Thr Trp Asn Ala Ala
 20 25 30
 Cys Asn Lys Leu Ser Ala Val Phe Leu Val
 Pro Ala Asn Lys Lys Phe
 35 40 45
 Val Val Asn Asn Leu Val Phe Tyr Gly Pro
 Cys Gln Pro His Phe Ser
 50 55 60
 Phe Lys Val Asp Gly Thr Ile Ala Ala Tyr
 Pro Asp Pro Ala Lys Trp
 65 70 75 80

 Lys Asn Ser Lys Ile Trp Met His Phe Ala
 Arg Leu Thr Asp Phe Asn
 85 90 95
 Leu Met Gly Thr Gly Val Ile Asp Gly Gln
 Gly Asn Arg Trp Trp Ser
 100 105 110

 Asp Gln Cys Lys Thr Ile Asn Gly Arg Thr
 Val Cys Asn Asp Lys Gly
 115 120 125

 Arg Pro Thr Ala Ile Lys Ile Asp Phe Ser
 Lys Ser Val Thr Val Lys
 130 135 140

 Glu Leu Thr Leu Thr Asn Ser Pro Glu Phe
 His Leu Val Phe Gly Glu
 145 150 155 1
 60
 Cys Asp Gly Val Lys Ile Gln Gly Ile Lys
 Ile Lys Ala Pro Arg Asp
 165 170 175

 Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe
 Ala Ser Lys Arg Phe Glu
 180 185 190

 Ile Glu Lys Cys Thr Ile Gly Thr Gly Asp
 Asp Cys Val Ala Val Gly
 195 200 205

 Thr Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Lys Asp
 Leu Thr Cys Gly Pro Gly
 210 215 220

 His Gly Met Ser Ile Gly Ser Leu Gly Lys
 Gly Asn Ser Arg Ser Glu

Met Gly Ala Ser Leu Asn Ser Ser Pro Pro
 Asn Cys Lys Asn Lys Cys
 405 410 415

Lys Gly Cys Gln Pro Cys Lys Pro Lys Leu
 Ile Ile Val His Pro Asn
 420 425 430

Gln Pro Glu Asp Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp
 Val Cys Ser Cys His Asn
 435 440 445

Lys Ile Tyr Asn Pro

450

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 6

catccccggg tagatgggat aatag

25

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ggtagtgcgac gccctgttcc tatcgt

26

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tggaagaaca atagaatatg gttgca

26

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ggtagtcgac ggatgaattt agcccca

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 11

ccatctgcag cagaggtttc atacgtg

27

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 12

ggtagtcgac ggaaatatcc atttgc

26

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gagcggataa caattcaca cagg

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 14

cgagagaatt cttttaytaa aatg

24

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 16
 gccagggttt tcccagtcac ga
 22

<210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 17
 ctgcagcggc cgctcgagat cgatttttt ttt
 ttttt 40

<210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 18
 ccatctgcag cggccgctcg agatc
 25

<210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 19
 ggtagtcgac aagtcgctac ctgtg
 25

<210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence
 <400> 20
 ggtaggatcc gttgcaatcg tcttcaatg
 29

<400> 21
cgagcaaaat gcatccatat tttcg
25

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22
gcttacagat ttcaatttaa tgggaac
27

<210> 23
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23
caaagatatc aattccgtca gtgtag
27

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24
catctaaaag attgaaata gaaaagtg
28

<210> 25
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25
gtgtacgaat gaaacctctg atctag
26

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 27

gtagcgactt ttcccgatgt aagtttc

27

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 28

ctgtgtaat aaaaatgcaa atggat

26

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

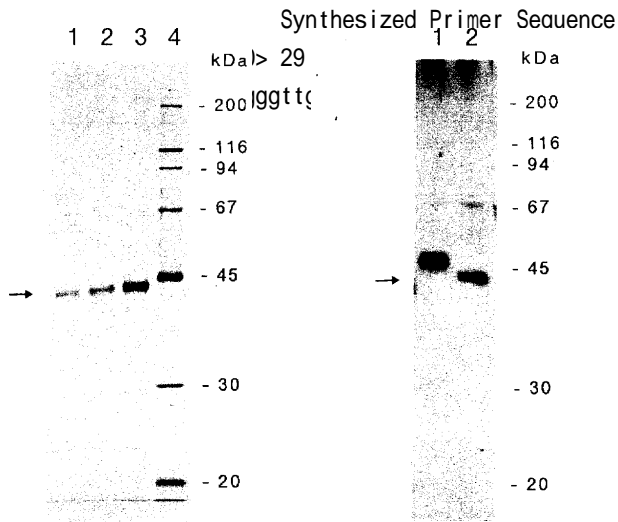
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

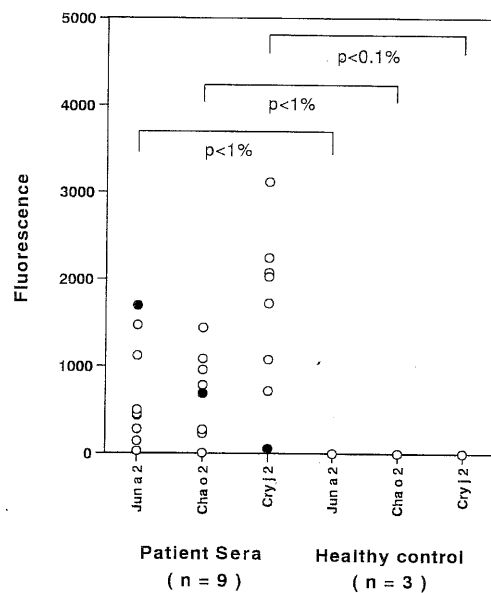
【図1】 Sequence:Artificially



銀染色

ウエスタンブロッティング

【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド ⁸ (参考)
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/53	Q
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/02	C
// C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(72)発明者 角尾 肇
神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社食品機能研究所内

专利名称(译)	山地雪松花粉过敏原蛋白和编码所述蛋白质的核酸分子		
公开(公告)号	JP2001231580A	公开(公告)日	2001-08-28
申请号	JP2000381403	申请日	2000-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	有限公司明治		
申请(专利权)人(译)	明治乳业株式会社		
[标]发明人	宫原道则 横山峰彦 纪光助 角尾肇		
发明人	宫原 道则 横山 峰彦 纪 光助 角尾 肇		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/36 A61P37/08 C07K14/415 C07K16/16 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08		
FI分类号	A61K39/36 A61P37/08 C07K14/415 C07K16/16 C12P21/08 G01N33/53.Q C12P21/02.C C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/BA21 4C085/BB04 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085/DD43 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	1999359719 1999-12-17 JP		
其他公开文献	JP2001231580A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种分离的核酸分子，该分子编码导致雪松花粉症的过敏原蛋白。本发明还提供了使用该核酸分子的重组变应原蛋白或其抗原片段。克隆了具有编码雪松花粉过敏原Jun a 2的核苷酸序列的分离的核酸分子。然后，使用核酸分子分离重组Jun a 2。

