

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年12月28日(28.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/221910 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01) *C07K 16/16* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/022604

(22) 国際出願日: 2017年6月20日(20.06.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2016-122318 2016年6月21日(21.06.2016) JP

(71) 出願人: 大鵬薬品工業株式会社
(**TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.**) [JP/
JP]; 〒1018444 東京都千代田区神田錦町
1-27 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 長田 年弘 (**OSADA, Toshihiro**);
〒3002611 茨城県つくば市大久保3 大鵬薬品工
業株式会社内 Ibaraki (JP). 田中 悠喜(**TANAKA,**
Yuki); 〒3002611 茨城県つくば市大久保3 大
鵬薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務
所(**THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA**
PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区
日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴
人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(54) **Title:** NEW CEDAR POLLEN PROTEIN

(54) 発明の名称: 新規スギ花粉タンパク質

(57) **Abstract:** Provided is a new cedar pollen protein and a drug using this cedar pollen protein, the drug being for diagnosis, prevention, and treatment of cedar-pollen-triggered allergy diseases. The cedar pollen protein is selected from (a) to (c), where: (a) is a protein which comprises an amino-acid sequence depicted in SEQ ID NO: 2; (b) is a protein which comprises the amino-acid sequence depicted in SEQ ID NO: 2, in which one or several amino acid residues are replaced, deleted, or added, and which has a cedar pollen allergenicity; and (c) is a protein which comprises amino-acid sequence having 90% or greater identity with the amino-acid sequence depicted in SEQ ID NO: 2, and which has a cedar pollen allergenicity.

(57) 要約: 新規なスギ花粉タンパク質、及びそれを用いたスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬、予防薬、及び治療薬等の提供。以下の(a)~(c)から選択されるスギ花粉タンパク質。(a)配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (b)配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルギー活性を有するタンパク質 (c)配列番号2で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルギー活性を有するタンパク質



WO 2017/221910 A1

明 細 書

発明の名称：新規スギ花粉タンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、スギ花粉に由来する新規なタンパク質、及び該タンパク質の利用に関する。

背景技術

[0002] 花粉症は、空中に飛散している花粉を吸入することにより発症し、眼のかゆみや痛み等のアレルギー性結膜炎、鼻炎、皮膚の炎症あるいは喘息等の症状を呈するアレルギー疾患である。花粉症の原因となる植物は数多く知られているが、日本でもっとも多い花粉症はスギ花粉症（スギ花粉を原因とするアレルギー疾患）である。2003年の報告では、スギ花粉症の有病率は2001年時点で19.4%と推定されており（非特許文献1）、少なくとも2000万人以上がスギ花粉症に苦しんでいることが推定され、国民病と言っても過言ではない。

[0003] スギ花粉症のさらに深刻な問題のうちの一つに、スギ花粉飛散量の経年増加が挙げられる。スギ花粉の飛散量は花粉飛散期前年の夏季の平均気温に正の相関することが知られており、日本の平均気温の上昇に伴い、スギ花粉飛散量が年々増加していることが報告されている（非特許文献2）。それに伴い、今後もスギ花粉症患者の増加が容易に予想され、日本国民の健康を損なう恐れがある。実際、38報を用いたメタアナリシスの結果によると1980年から2000年にかけてスギ花粉症有病率は2.6倍に上昇したことが報告されている（非特許文献3）。

[0004] これらスギ花粉症治療には抗ヒスタミン薬等の使用をはじめとした一連の対症療法が用いられているが、スギ花粉症の根治が期待できる唯一の治療法として、アレルゲン免疫療法（減感作療法）が期待されている。これは、アレルギー疾患の原因となるアレルゲンを皮下や舌下等に投与することにより、アレルギー症状の緩和を期待する治療法である。これらアレルゲン免疫療

法の開発や、その治療効果の向上には原因アレルゲンの特定とその理解が欠かせない。

[0005] スギ花粉症の発症に関連する主なスギ花粉アレルゲンとして、これまでにCry j 1、Cry j 2、Cry j 3が報告されており（非特許文献4、5、および6）、特にCry j 1、およびCry j 2はそれらを主成分とした標準化スギ花粉エキス（非特許文献7）が開発され、日本におけるスギ花粉症に対するアレルゲン免疫療法が実施されてきた。しかしながら、アレルゲン免疫療法が奏功しない患者群も存在する。スギ花粉中にはいまだ同定されていない新規アレルゲンが存在することが示唆されており（非特許文献8）、より有用性の高いスギ花粉症の免疫療法を目的とした、特徴的な新規アレルゲンタンパク質が求められている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 非特許文献1：Okuda M, Ann Allergy Asthma Immunol. , 91:288-296, 2003
非特許文献2：Yamada T, et al., J Allergy Clin Immunol., 133:632-639, 2014
非特許文献3：Kaneko Y, et al., Int Arch Allergy Immunol., 136:365-371, 2005
非特許文献4：Yasueda H, et al., J. Allergy Clin. Immunol., 71:77-86, 1983
非特許文献5：Sakaguchi M, et al., Allergy, 45:309-312, 1990
非特許文献6：Fujimura T, et al., Allergy, 62:547-553, 2007
非特許文献7：Yasueda H, et al., Allergol. Int., 46:135-140, 1997
非特許文献8：Fujimura T, et al., Int Arch Allergy Immunol., 133:125-135, 2004

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、新規なスギ花粉タンパク質、及びそれを用いたスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬、予防薬、及び治療薬等を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく検討したところ、スギ花粉粗抗原から、スギ花粉症患者由来のリンパ球ならびに血清中 IgE と高い反応性を示す新たなタンパク質を発見し、これがスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬、予防薬、又は治療薬として有用であることを見出した。

[0009] すなわち、本発明は、以下の 1) ～ 13) に係るものである。

1) 以下の (a) ～ (c) から選択されるスギ花粉タンパク質。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルギー活性を有するタンパク質

(c) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルギー活性を有するタンパク質

2) 以下の (a) ～ (c) から選択されるスギ花粉タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルギー活性を有するタンパク質

(c) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルギー活性を有するタンパク質

3) 以下の (d) ～ (f) から選択されるポリヌクレオチド。

(d) 配列番号 1 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド

(e) 配列番号 1 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、スギ花粉ア

ルゲン活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(f) 配列番号1で示される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

4) 上記1)のスギ花粉タンパク質を有効成分とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤。

5) 上記1)のスギ花粉タンパク質を有効成分とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬。

6) 上記1)のスギ花粉タンパク質に対する抗体。

7) モノクローナル抗体である上記6)のスギ花粉タンパク質に対する抗体。

8) スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤を製造するための、上記1)のスギ花粉タンパク質の使用。

9) スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬を製造するための、上記1)のスギ花粉タンパク質の使用。

10) スギ花粉を原因とするアレルギー疾患を予防又は治療するための、上記1)のスギ花粉タンパク質。

11) スギ花粉を原因とするアレルギー疾患を診断するための、上記1)のスギ花粉タンパク質。

12) 上記1)のスギ花粉タンパク質を患者に投与することを特徴とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療方法。

13) 上記1)のスギ花粉タンパク質を患者に投与することを特徴とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断方法。

発明の効果

[0010] 本発明のスギ花粉タンパク質は、スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬、予防薬、及び治療薬等に利用することができる。当該スギ花粉タンパク質は、Cry j 1、Cry j 2、その他既知スギ花粉タンパク質とは相同性を持たないアミノ酸一次配列を有することから、これらと組み合わせることに

よって、より有用な減感作治療が可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]精製したリコンビナントスギ花粉タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で解析した図である。

[図2]スギ花粉症患者 (ImmunoCAP Score $\geq$ 2) 4名の末梢血単核細胞を用いて、精製リコンビナントタンパク質添加による増殖反応を測定した結果を示す図である。

[図3]スギ花粉症患者 (ImmunoCAP Score $\geq$ 2) 13名の末梢血中の好塩基球が、精製リコンビナントタンパク質により活性化されCD203cの発現が増強した一方、健常者 (ImmunoCAP Score $<$ 2) 2名の末梢血中の好塩基球ではCD203cの発現が変化しないことを示したフローサイトメトリーの結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] スギ花粉タンパク質

本発明のスギ花粉タンパク質は、以下の (a) ~ (c) から選択されるタンパク質である。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質

(c) 配列番号2で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質

[0013] 本発明のスギ花粉タンパク質には、スギ花粉アレルゲン活性を有する限り、当該配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質 (上記 (b)) が包含される。このようなアミノ酸配列からなるスギ花粉タンパク質としては、例えば配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するスギ花粉タンパク質のアイソフォーム等が挙げられる。

ここで、欠失、置換又は付加される数個のアミノ酸とは、例えば1~10

個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸を意味する。また、上記の付加又は欠失には、両末端への1～数個のアミノ酸の付加や欠失が含まれる。

アイソフォームの具体例としては、例えば、C末端の4残基の欠失が挙げられる。

[0014] ここで、「スギ花粉アレルゲン活性」とは、肥満細胞上のIgEと結合し、アトピー性のヒトに即時型アレルギー反応を引き起こす活性 (De Weck, AL, et al., Int. Arch. Allergy Immunol., 146:177-189, 2008) のみならず、単に血清中のIgEと結合する活性が包含される。IgEと結合する活性は、国際公開第2012/105541パンフレット等に記載の手法で測定できる。

[0015] また、本発明のスギ花粉タンパク質には、スギ花粉アレルゲン活性を有する限り、配列番号2で示されるアミノ酸配列において相当する配列を適切にアライメントした時、配列番号2で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するタンパク質からなるタンパク質（（上記(c)））が包含される。

ここで、配列番号2で示されるアミノ酸配列との同一性は、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上である。当該アミノ酸配列の同一性は、例えばBLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information) を使用し、オプションパラメータを初期設定値で計算する方法が適用できる。

[0016] また、本発明のスギ花粉タンパク質は、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、組み換え生産の際の安定性を確保するためのタンパク質等との融合体を形成してもよい。

[0017] スギ花粉タンパク質をコードするポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、上記スギ花粉タンパク質をコードするものであり、好適には、(d) 配列番号1に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド、(e) 配列番号1で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、且つスギ

花粉アレルゲン活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、（f）配列番号1に示される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

（e）及び（f）のポリヌクレオチドには、（d）のポリヌクレオチドの変異体が含まれる。当該変異体には、天然の対立遺伝子変異体や、当該分野で周知の変異誘発技術を用いて生成され得る天然に存在しない変異体が包含される。

[0018] 本発明のポリヌクレオチドは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖といった各種1本鎖DNAやRNAをも包含する。アンチセンス鎖は、プローブ等として利用可能である。DNAには、例えばクローニングや化学合成技術又はそれらの組み合わせで得られるようなcDNAやゲノムDNAなどが含まれる。さらに、本発明にかかるポリヌクレオチドに対し、本発明にかかるポリペプチドをコードする塩基配列以外に、非翻訳領域（UTR）の配列やベクター配列（発現ベクター配列を含む）などの塩基配列が付加していてもよい。

[0019] ここで、ストリンジエントな条件とは、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition, J. Sambrook et. al, 1989)に記載の条件等が挙げられる。すなわち、6×SSC（1×SSCの組成：0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、0.5%SDS、5×デンハート及び100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65℃で8～16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件等が挙げられる。

また、配列番号1で示される塩基配列との同一性は、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上である。当該塩基配列の同一性は、例えばBLASTを使用し、オプションパラメータを初期設定値で計算する方法が適用できる。

[0020] 上記ポリヌクレオチドの変異体としては、例えば、配列番号1で示される

塩基配列の4番目のaがgに、898番目のtがcに、1029番目のgがaに、1643番目のtがaに、それぞれ変異したものが挙げられる。

[0021] スギ花粉タンパク質をコードするポリヌクレオチドの取得

本発明のスギ花粉タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、スギ花粉からクローン化することができ、クローニング方法としては、既知の手段、例えばショットガン法、PCR法を用いて行う方法が挙げられる。

例えば、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、当該プローブを用いてゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーに対してスクリーニングを行えばよい。このようなプローブとしては、本発明にかかるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いかなる配列および長さのものを用いてもよい。また人工的にポリヌクレオチドを合成する方法が挙げられる。(Kosuri S et. al., Nature Methods 11, 499-507, 2014)

[0022] また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの一部又は全部を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列を適当な原理を用いて取得することにより得ることもできる。例えば、上記の本発明のポリヌクレオチドの一部を含むポリヌクレオチドをプライマーとして用いて行うPCR法、上記の本発明のポリヌクレオチドの一部を含むポリヌクレオチドをプローブとして用いる方法が挙げられる。

例えば、PCR等の増幅手段を用いる方法は、本発明のポリヌクレオチドの5'側および3'側の配列（またはその相補配列）の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA（またはcDNA）等を鋳型にしてPCR等の増幅反応を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、当該ポリヌクレオチドを含むDNA断片を大量に取得することができる。

[0023] また、本発明で提供するポリヌクレオチドは、例えば、計画的な若しくはランダムな変異導入法等の方法により、配列番号1に示す塩基配列からなる

ポリヌクレオチドを改変することにより作製することもできる。

ここで、計画的に変異を導入する際の変異の計画は、例えば、ポリヌクレオチド配列上の特徴的な配列を参酌することにより行うことができる。また、ランダムに変異を導入する方法としては、例えば、PCR法、変異原処理による方法が挙げられる。計画的に変異を導入する方法としては、部位特異的突然変異誘発法が挙げられ、より具体的には、例えばSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット（タカラバイオ）等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR法(PCR protocols, Academic Press, New York, 1990)を用いることもできる。

[0024] スギ花粉タンパク質の製造

本発明のスギ花粉タンパク質は、スギ花粉から分離精製することにより得ることができる。分離精製方法は特に限定されるものではないが、例えば、スギ花粉抽出液をゲルろ過、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、等の従来公知の手法を用いて分離・精製すればよい。

また、適当なベクターに本発明のポリヌクレオチドを組み込むことにより作製された組換えベクターを宿主細胞に導入して、スギ花粉タンパク質を細胞内或いは細胞外に発現させて、採取することが可能である。

[0025] 宿主としては、形質転換が可能な生細胞であれば特に限定されず、例えば大腸菌、枯草菌等の細菌、酵母や糸状菌等の真菌類、Sf9細胞等の昆虫培養細胞、カイコ等の昆虫、動物細胞、植物又は植物由来細胞等が挙げられる。

[0026] 本発明のポリヌクレオチドを挿入するためのベクターは、上記の宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、導入する宿主の種類、導入方法等に応じて適宜決定できる。

例えば、プラスミドDNA、ファージDNA、ウイルスベクター等が挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクターDNAは、広く普及した入手の容易なものが用いられる。例えば、pUC19（タカラバイオ）、pTV118N（タカラバ

イオ)、pMAMneo(クロンテック)、pGEX(GEヘルスケア)、pET160(Invitrogen)、pDEST(Invitrogen)、pIEx(メルクミリポア)、pBacPAK(クロンテック)等が挙げられる。また、ウイルスベクターとしては、例えば、バキュロウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)等のレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、シミアンウイルス-40(SV-40)等のDNAウイルスやRNAウイルス等が挙げられる。

[0027] 当該組換えベクターを用いて宿主を形質転換するには、プロトプラスト法、コンピテントセル法、エレクトロポレーション法等を用いて行うことができる。得られた形質転換体は、資化しうる炭素源、窒素源、金属塩、ビタミン等を含む培地を用いて適当な条件下で培養すればよい。斯くして得られた培養液から、一般的な方法によってタンパク質の採取、精製を行い、本発明のスギ花粉タンパク質を得ることができる。例えば、宿主として大腸菌を用いた場合は、pET System Manual, 10th edition (Novagen)に記載の方法等が挙げられる。

[0028] スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤

本発明のスギ花粉タンパク質は、スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤となり、それを必要とするヒト(患者)に投与してスギ花粉を原因とするアレルギー疾患を予防又は治療するために使用できる。

ここで、スギ花粉を原因とするアレルギー疾患としては、スギ花粉の特異抗原が原因となるあらゆるアレルギー疾患が挙げられ、具体的には、例えばアトピー性気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎等が挙げられる。

斯かるスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤は、例えば、スギ花粉を原因とするアレルギー疾患に対する減感作療法剤として用いることができる。

[0029] 本発明のスギ花粉タンパク質は、GENETYX Ver.12を用いたアミノ酸相同性解析の結果、スギ花粉症の発症に関連する主なスギ花粉アレルゲンとして報告されているCry j 1、Cry j 2、Cry j 3との相同性は見られず、従来公知のCry j 1、Cry j 2、Cry j 3とは異なるタンパク質であると考えられ、これらと組み合わせることによって、より有用な減感作治療が可能となる。

[0030] 本発明のスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤を減感作治療剤として用いる場合、本発明のスギ花粉タンパク質をそのまま、或いは乾燥して粉末状とし、又は必要に応じて一般的に用いられるアジュバントや各種の添加剤、例えば安定剤、賦形剤、溶解補助剤、乳濁化剤、緩衝剤、無痛化剤、保存剤、着色剤等を常法により添加した配合剤として調製されるのが好ましい。

例えば、粉末状の精製されたスギ花粉タンパク質を、フェノールを添加した生理食塩水に溶解し、減感作治療用抗原の原液として用いることができる。

[0031] 本発明のスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤は、通常の投与経路例えば経皮、経口、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内等の投与方法により行うことができる。更に、例えば、トローチ、舌下錠、点眼剤、鼻腔内噴霧剤、パップ剤、クリーム剤、ローション剤等の経皮、経粘膜薬としても使用することができる。

[0032] 本発明のスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤の投与量及び投与回数は、投与経路、症状などに応じて異なるが、例えば、成人1回あたり約0.1～1000 μ gの範囲となるように適宜選択し、毎週1から数回程度投与される。

[0033] スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断

本発明のスギ花粉タンパク質は、スギ花粉を原因とするアレルギー疾患診断薬となり、スギ花粉を原因とするアレルギー疾患を診断するために使用できる。

斯かるスギ花粉を原因とするアレルギー疾患診断薬は、例えばスギ花粉を

原因とするアレルギー疾患に対する皮膚反応診断、すなわち皮内テスト又はプリックテスト試薬等として用いられる。加えて、特異的IgE抗体検査用試薬を調製することで患者血清または血漿を用いた診断が可能である。（鼻アレルギー診療ガイドラインー通年性鼻炎と花粉症ー2013年版、株式会社ライフ・サイエンス）

[0034] 皮膚反応診断試薬として用いる場合、前記の方法により取得された本発明のスギ花粉タンパク質を、例えば乾燥して粉末状とし、これをフェノールまたはグリセリンを含む生理食塩水に溶解し、希釈して用いられる。特異的IgE抗体検査用試薬としては、水相中または固相上で本発明のスギ花粉タンパク質に患者検体中のIgE抗体を結合させ、Fluoro enzyme immunoassay、Chemiluminescence enzyme immunoassay、enzyme immunoassay等の原理に基づき検出する方法が挙げられるが、検出方法はこれらに限定されない。

[0035] スギ花粉タンパク質に対する抗体

本発明のスギ花粉タンパク質に対する抗体は、本発明のスギ花粉タンパク質と特異的に結合することができる抗体である。上記抗体とは免疫グロブリン(IgA、IgD、IgE、IgG、IgMおよびこれらのFabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fcフラグメント)を意味し、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体およびヒト化抗体が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

上記抗体は、種々の公知の方法を用いて作製することができ、作製方法は特に限定されるものではない。

[0036] 上記抗体は、本発明のスギ花粉タンパク質を発現する生物体またはその組織もしくは細胞の同定などに利用することができる。例えば、大気中や屋内の空間またはヒトの粘膜におけるスギ花粉タンパク質の有無等を測定するために利用することができる。該測定は公知の免疫学的方法により行うことができ、例えばELISA法により行うことができる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例

[0037] 実施例 1 新規スギ花粉タンパク質の粗精製

<スギ花粉タンパク質の粗精製>

2gのスギ花粉に抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)50mLを加え、10分間超音波破碎を行った。続いて室温にて10分間混和した後、遠心(10,000g、10分)して上清を得た。この上清をさらに超遠心分離(50,000g、60分)し、上清を回収した。この上清17mLに対し、抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)で平衡化させたQ sepharose high performance樹脂 (GEヘルスケア)懸濁液を等量加え、30分間室温で振盪させた。遠心分離により(1,000g、10分)上清を除去後、抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)にて50mLまでメスアップし、転倒混和後、再度遠心分離することで樹脂を洗浄した。続いて、洗浄した樹脂に0.0125M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)を10mL加え、5分間室温で振盪させた。遠心分離(1,000g、10分)により上清を除去し樹脂に吸着したタンパク質を溶出させた。同じ操作を、0.025M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)、0.05M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)、0.1M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)、0.2M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)、0.4M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)、0.6M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)で繰り返した。最後に、0.6M NaCl含有抽出緩衝液(20mM Tris-HCl、pH9.0)を用いて溶出させたタンパク質溶液を粗精製液として回収した。

[0038] <部分内部アミノ酸配列の同定>

回収した粗精製液を、100,000MWC0スピンカラムにて濃縮操作を行った。濃縮したサンプルに対し、Novex (登録商標) NuPAGE (登録商標) SDS-PAGE system (invitrogen) の一般的なプロトコルを用いて還元及びSDS-PAGEを行った。電気泳動後のSDS-PAGEゲルは、SilverQuest (登録商標) Silver Staining Kit (ThermoFisher) の標準プロトコルを用いて銀染色した。続いて本発明タンパク質内部の部分アミノ酸配列を明らかにするために、プロテアーゼにより限定分解して得られる断片の解析を行った。即ち、分子量70 kDaバン

ド付近のゲルを細断後、細片をまとめて水及びアセトニトリルで洗浄し、DTT及びヨードアセトアミドによるアルキル化処理に供した。続いてサンプルにトリプシンを加え、37℃で16時間保温して加水分解反応を行った。反応後、25 mM 重炭酸アンモニウム、5%ギ酸、及びアセトニトリルを用いてゲル片からペプチドを抽出した。最後に抽出溶液を減圧下で乾燥した。乾燥済みのサンプルを、水、アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸からなる溶媒（体積比98:2:0.1）に溶解させ、LC-MS/MSシステム（Paradigm MS4（Michrom Bioresources社）、MS/MS：LTQ OrbiTrap XL質量分析計（ThermoFisher））にて分析した。カラムは分析用 C18 カラム L-Column Micro（化学物質評価研究機構）を、移動相A（[水]：[アセトニトリル]：[ギ酸] = 98:2:0.1（体積比））及び移動相B（[水]：[アセトニトリル]：[ギ酸] = 5:95:0.1（体積比））を選択した。サンプルを添加後、アセトニトリル送液勾配（分，%B）：（0，5）→（20，35）→（25，90）→（30，90）→（30.01，5）→（40，5）条件で溶出、分画し、MS/MSにてペプチド分子量を測定した。得られた分子量はMascot（Matrix Science）ソフトウェアを用いてペプチド配列を決定した。その結果、部分配列WIVDEATGLRが得られた。

[0039] 実施例2 精製リコンビナントタンパク質の調製

<スギtotal RNAの抽出>

液体窒素中で凍結粉碎したスギ雄花（葯）2gを、Plant RNA Isolation Reagent（Invitrogen）25mLが入っている50mLチューブに添加して混和した後、室温にて5分間静置した。

4℃にて遠心（2600 x g、5分）の後、上層をデカントにより網目サイズ100 μmのメッシュで濾過した。続いて回収した濾液に1 / 5 倍量の5M NaClと3 / 5 倍量のクロロホルムを加えた。4℃にて遠心（2600 x g、30分）の後、上層20 mLを回収し、9 / 10 倍量のイソプロピルアルコールを加え、攪拌した。室温にて10分間静置した後、4℃にて遠心（2600 x g、30分）し、RNAを沈殿させた。上清を除去後、RNAペレットに75%エタノール10mLを加えて洗浄した。さらに4℃にて遠心（2600 x g、5分）の後、上清除去後Total RNAを室温で乾燥し

てから、200 μ LのRNase free waterに溶解させた。室温にて遠心(12000 x g、3分)後、RNase-Free DNase Set (キアゲン) を用いてDNase処理を行った。すなわちTotal RNA溶液上清180 μ Lに15 μ L Buffer RDD、5 μ L DNase I stock solutionを加え室温にて10分間静置させて実施した。続いてRNeasy mini kit (キアゲン) を用いてtotal RNAのクリーンアップを実施した。すなわち、DNase処理後サンプル200 μ Lに700 μ LのBuffer RLT、500 μ Lのエタノールを添加後、RNeasy mini kit添付のカラムに添加し遠心(8000x g、15秒)した。

続いて、カラムに500 μ LのBuffer RPEを加え室温にて遠心(8000x g、15秒)し、本操作を2回繰り返した。次に、30 μ LのRNase free waterをカラムに加え室温にて遠心(8000x g、1分)し、得られた溶液をクリーンアップ済みtotal RNAとして回収した。

[0040] <スギcDNAの作製>

得られたクリーンアップ済みtotal RNAから、Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。Total RNA 2 μ gを8 μ Lの精製水に溶解し、50 μ M oligo(dT)20を1 μ L、10mM dNTPを1 μ L加えてから、65°Cで5分間インキュベートした。サンプルを氷上で冷却した後、10X RT bufferを2 μ L、25mM MgCl₂を4 μ L、0.1M DTTを2 μ L、RNase0 UT(40U/ μ L)を1 μ L、SuperScript III Reverse Transcriptaseを1 μ L加えて混和した。50°Cで50分間インキュベートした後、85°Cで5分間処理して反応を停止した。続いてサンプルにRNase Hを1 μ L加え37°Cで20分間インキュベートすることで、スギcDNAとした。

[0041] <クローニング>

得られた部分配列WIVDEATGLRについて、GENETYX Ver.12.0.4ソフトウェアを用いてcDNA配列の推定を行い、ForestGEN (<http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/ja/index.html>)データベースにてホモロジー検索を行った。その結果、cluster ID: Cj5792がヒットした。さらにヒットしたCj5796の相同遺伝子であるVitis vinifera由来未同定タンパク遺伝子配列gi|157358255|emb|CA065892.1| は、ForestGEN cluster ID: Cj822が含まれていることを見出した。

加えて、Cj5792及びCj822はスギcDNAライブラリーBY882225.1、BY900252.1とそれぞれ高い相同性を有していた。これら情報に基づき、クローニングに用いるプライマーセットをデザインし下記検討に供した。即ち、配列番号1で示すポリヌクレオチドを得るため、スギのcDNAを鋳型として、センスプライマーとしてPrimer 1(GATTTTCATGRCAGCGACAG: 配列番号3)及びその下流のPrimer 2(CATGRCAGCGACAGSGAT: 配列番号4)、アンチセンスプライマーとしてPrimer 3(TCAAAGTTGATGCAACAATTG: 配列番号5)を用いて、KOD Fx Neo(TOYOBO)によりnested PCRを行った。PCR産物をWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)にて精製した。精製したPCR産物をTOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fischer) キットを用いてpCR 2.1-TOPO TA Vectorに組み込み、配列番号1で示すポリヌクレオチドを含むベクターを作製した。

[0042] <リコンビナントタンパク質の精製>

配列番号2に示すアミノ酸一次配列（シグナル配列部分と推測される1-26番目までのアミノ酸は除く）のC末端にFlagタグを付加したリコンビナントタンパク質を、シスメックス株式会社のProCube（登録商標）サービスにて、特開2014-195411公報の方法に従って実施した。すなわち、前述で作製したベクターから配列番号1で示すポリヌクレオチド（シグナル配列部分と推測される1-26のアミノ酸をコードする1-78番目までのポリヌクレオチドは除く）を、カイコ発現用シグナル配列を有し、FlagタグをC末端に融合発現するトランスファープラスミドに組換え、バキュロウイルスを作成後、カイコ蛹に接種後、7日目に得られた蛹を磨砕バッファー（20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, Complete EDTA free 1錠/50mL, フェニルチオウレア）で磨砕した。磨砕物を超遠心後、上清を回収し、DDDDK-tagged Protein PURIFICATION GEL (MBL)を用いて添付文書に準じてアフィニティ精製することで、精製リコンビナントタンパク質を調製した。精製したリコンビナントタンパク質をSDS-PAGEにより解析した結果を図1に示す。

[0043] 実施例3 精製リコンビナントタンパク質のアレルゲン活性確認

(i) スギ花粉症患者リンパ球増殖応答

スギ花粉症患者(ImmunoCAP score $\geq$ 2)より得た末梢血30mLより末梢血単核細胞を単離し、10%非働化自己血漿入りRPMI-1640培地に 1.11×10^6 cells/mLとなるよう懸濁した。調製した細胞懸濁液180 μ Lと、20 μ Lの本発明のリコンビナントタンパク質溶液(濃度100 μ g/mL)を96 穴プレートに播種した(2×10^5 cells/well)。37°C、5% CO₂条件で3日間培養した後、³H-チミジンを添加し、16時間後までの取込量を放射活性として測定することにより細胞増殖を評価した。精製リコンビナントタンパク質添加時の³H-チミジン取込量を非添加時の取込量で除した値をStimulation indexとして算出した結果を、図2に示す。一般に、臨床検査におけるリンパ球刺激試験では、Stimulation index 1.8以上が陽性基準とされている(内田重行ら、肝臓 30巻4号439-443, 1989)。この基準に則ることにより、4例中3例(75%)が陽性と判定された。以上の結果より、スギ花粉症患者において高頻度に本発明のリコンビナントタンパク質にT細胞レベルで感作されていることが示された。

[0044] (ii) スギ花粉症患者好塩基球の活性化

アレルゲンで刺激され活性化された好塩基球では、CD203cの発現が増強することが知られている(De Weck, AL. et al., Int. Arch. Allergy Immunol., 146:177-189, 2008)。この原理に基づくAllergenicityキット(ベックマン・コールター)を用いて、スギ花粉症患者(ImmunoCAP score $\geq$ 2)又は健常者(ImmunoCAP score<2)血液中の好塩基球活性化を解析した。すなわち、ヘパリン採血した全血100 μ Lに本発明のリコンビナントタンパク質溶液20 μ Lを最終濃度 3 μ g/mLとなるように加え、陰性対照サンプルにはPBS(-)20 μ Lを加えた。続いて全てのサンプルにCD3-PC7, CRTH2-FITC及びCD203c-PEを含む抗体カクテル20 μ Lを加え、37°Cで15分間インキュベートした。反応停止液100 μ Lと溶血固定液2mLを加え、室温で10分間反応させた。遠心(200 x g、5分)後、上清を除去し、リン酸緩衝液(PBS) 3mLを加えて再び遠心した。上清を除去後、細胞を0.1%ホルムアルデヒド加PBSに懸濁し、フローサイトメーター(FACScanto、BD Biosciences)により測定した。得られたデータについて、CD3-PC7陰性かつCRTH2-FITC陽性であることを指標として血球の中の好塩基球を選

別し、CD203cの発現強度を解析した。データは、本発明タンパク質溶液刺激サンプルにおけるCD203c陽性好塩基球割合（％）から各陰性対照サンプルにおけるCD203c陽性好塩基球割合（％）を示し、健常者における最高値0.8%の2倍にあたる1.6以上の値を陽性と判定した。その結果、図3で示した通り健常者2例中2例にて、リコンビナントタンパク質添加時におけるCD203cの発現増強が認められなかった一方、スギ花粉症患者において13例中7例（54％）でCD203cの発現増強が認められ、その差は有意であった（ $p < 0.05$, Welch's *t* test）。従って、スギ花粉症患者は頻度よく本発明のリコンビナントタンパク質に結合するIgEを有しており、さらに本発明のリコンビナントタンパク質にアレルギー活性があることが示された。

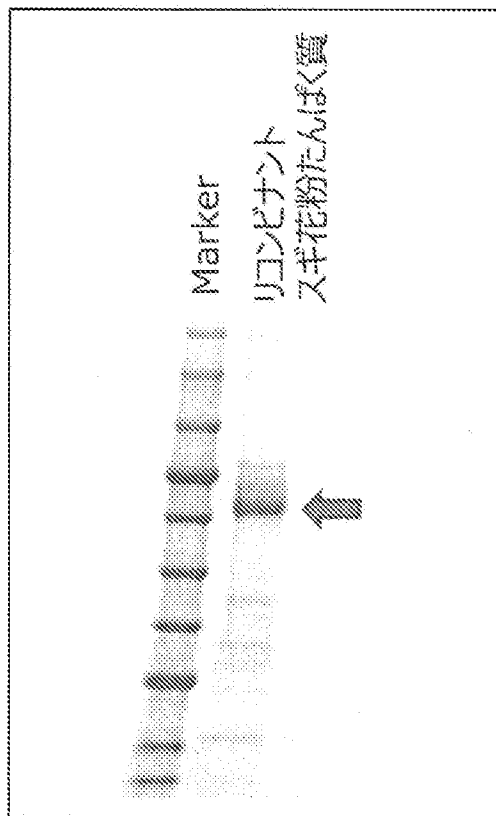
請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）～（c）から選択されるスギ花粉タンパク質。
- （a）配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - （b）配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質
 - （c）配列番号2で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質
- [請求項2] 以下の（a）～（c）から選択されるスギ花粉タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- （a）配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - （b）配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質
 - （c）配列番号2で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質
- [請求項3] 以下の（d）～（f）から選択されるポリヌクレオチド。
- （d）配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド
 - （e）配列番号1で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、スギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド
 - （f）配列番号1で示される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つスギ花粉アレルゲン活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド
- [請求項4] 請求項1記載のスギ花粉タンパク質を有効成分とするスギ花粉を原

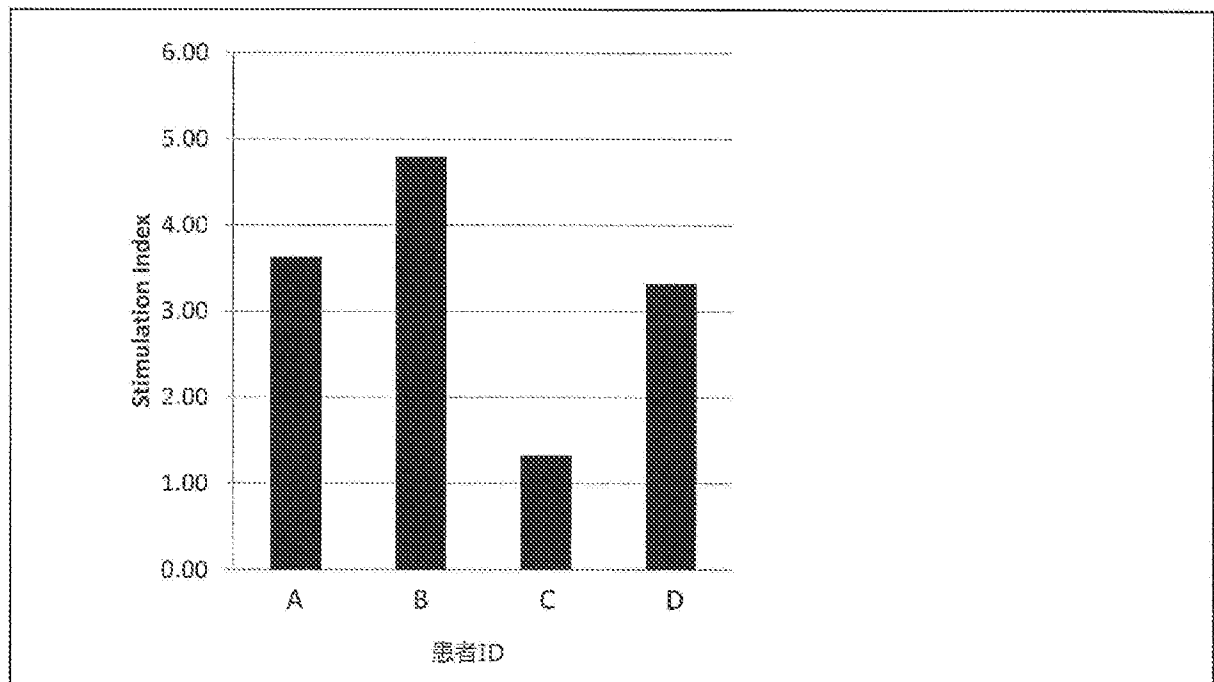
因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤。

- [請求項5] 請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質を有効成分とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬。
- [請求項6] 請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質に対する抗体。
- [請求項7] モノクローナル抗体である請求項 6 記載のスギ花粉タンパク質に対する抗体。
- [請求項8] スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療剤を製造するための、請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質の使用。
- [請求項9] スギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断薬を製造するための、請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質の使用。
- [請求項10] スギ花粉を原因とするアレルギー疾患を予防又は治療するための、請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質。
- [請求項11] スギ花粉を原因とするアレルギー疾患を診断するための、請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質。
- [請求項12] 請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質を患者に投与することを特徴とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の予防又は治療方法。
- [請求項13] 請求項 1 記載のスギ花粉タンパク質を患者に投与することを特徴とするスギ花粉を原因とするアレルギー疾患の診断方法。

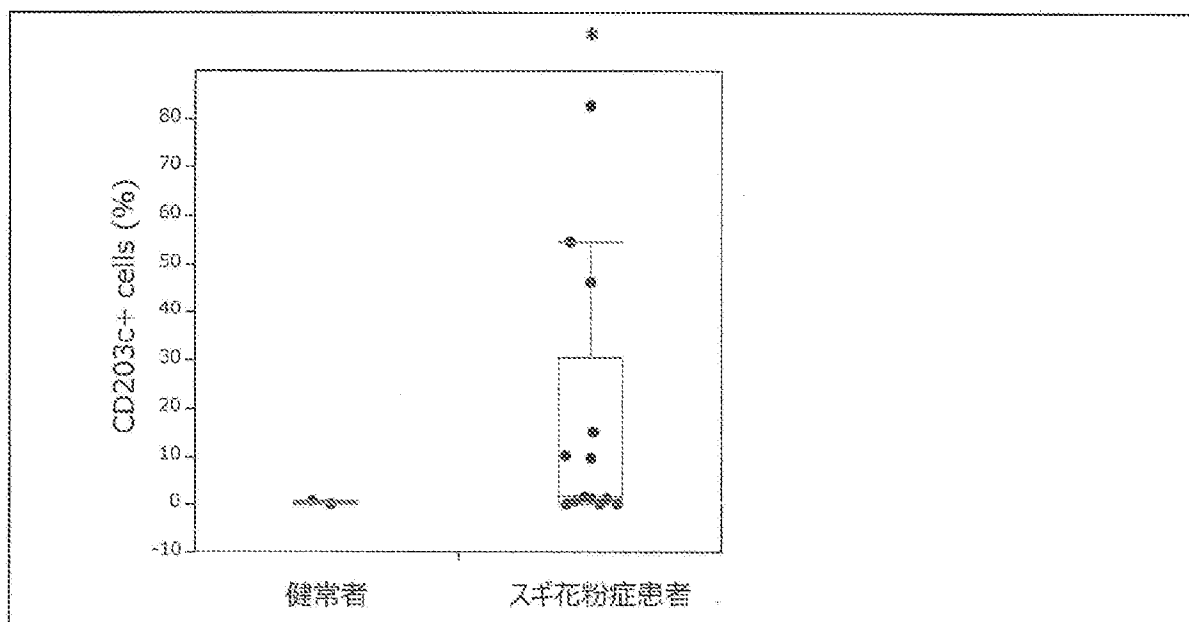
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/022604

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K38/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)i, C07K16/16(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K38/02, A61P37/08, C07K14/415, C07K16/16, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-197768 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 19 July 1994 (19.07.1994), claims; examples (Family: none)	1-13
Y	JP 7-188289 A (Hayashibara Biochemical Labs., Inc.), 25 July 1995 (25.07.1995), claims; examples & EP 655500 A1	1-13
Y	JP 8-502163 A (Immulologic Pharmaceutical Corp.), 12 March 1996 (12.03.1996), claims; examples & US 6090386 A claims; examples & WO 1994/001560 A1 & EP 659214 A1	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 September 2017 (14.09.17)

Date of mailing of the international search report
26 September 2017 (26.09.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/022604

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-238861 A (Hiroshima University), 14 September 2006 (14.09.2006), claims; examples (Family: none)	1-13
Y	JP 2006-217896 A (Japan Science and Technology Agency), 24 August 2006 (24.08.2006), claims; examples (Family: none)	1-13
Y	JP 2006-217830 A (Hiroshima University), 24 August 2006 (24.08.2006), claims; examples (Family: none)	1-13
Y	JP 2007-14311 A (Japan Science and Technology Agency), 25 January 2007 (25.01.2007), claims; examples (Family: none)	1-13
P,X P,A	TSA: Cryptomeria japonica mRNA, contig: CMFL047_007, expressed in male strobili, mRNA sequence, GenBank[online], Accession No. FX344979, 05 April 2017 (05.04.2017) [retrieval date: 07 September 2017 (07.09.2017)], Internet:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1173225710?sat=3&satkey=39732156 >, entire text	1-3,10,11 4-9,12,13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)i, C07K16/16(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A61K38/02, A61P37/08, C07K14/415, C07K16/16, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 6-197768 A (明治製菓株式会社) 1994. 07. 19, 特許請求の範囲、 実施例 (ファミリーなし)	1-13
Y	JP 7-188289 A (株式会社林原生物化学研究所) 1995. 07. 25, 特許請 求の範囲、実施例 & EP 655500 A1	1-13
Y	JP 8-502163 A (イミュロジック ファーマスーティカル コーポレ イション) 1996. 03. 12, 特許請求の範囲、実施例 & US 6090386 A 特 許請求の範囲、実施例 & WO 1994/001560 A1 & EP 659214 A1	1-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

14. 09. 2017

国際調査報告の発送日

26. 09. 2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上村 直子

4 B

4508

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-238861 A (国立大学法人広島大学) 2006.09.14, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-13
Y	JP 2006-217896 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2006.08.24, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-13
Y	JP 2006-217830 A (国立大学法人広島大学) 2006.08.24, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-13
Y	JP 2007-14311 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2007.01.25, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-13
P, X P, A	TSA: <i>Cryptomeria japonica</i> mRNA, contig: CMFL047_007, expressed in male strobili, mRNA sequence, GenBank[online], Accession No. FX344979, 2017年4月5日 [検索日: 2017年9月7日]、インターネット: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1173225710?sat=3&satkey=39732156 >、全文	1-3, 10, 11 4-9, 12, 13