(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4116680号
(P4116680)

(45)発行日　平成20年7月9日(2008.7.9)　(24)登録日　平成20年4月25日(2008.4.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/435	(2006.01)	C07K	14/435	
A61K 39/012	(2006.01)	A61K	39/012	
A61P 33/02	(2006.01)	A61P	33/02	１７３
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 13　(全 28 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-173890
(22)出願日　平成8年7月3日(1996.7.3)
(65)公開番号　特開平9-48797
(43)公開日　平成9年2月18日(1997.2.18)
審査請求日　平成15年4月8日(2003.4.8)
(31)優先権主張番号　95201801.8
(32)優先日　平成7年7月3日(1995.7.3)
(33)優先権主張国　オランダ(NL)

(73)特許権者　506196247
インターベツト・インターナシヨナル・ベー・ベー
オランダ国、５８３１・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・３５
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教

最終頁に続く

(54)【発明の名称】家禽コクシジウム症ワクチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

以下の（ａ）または（ｂ）のＥｉｍｅｒｉａタンパク質。

（ａ）配列番号２に記載の配列によって示されるアミノ酸配列から成るタンパク質

（ｂ）（ａ）に定義されるアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつ（ａ）のタンパク質に対する抗血清によって認識される（ａ）のタンパク質の誘導体タンパク質。

【請求項２】

Ｅｉｍｅｒｉａ種がＥｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａである請求項１に記載のタンパク質。

【請求項３】

請求項１または２に記載のタンパク質をコードするＤＮＡまたはＲＮＡ。

【請求項４】

当該ＤＮＡまたはＲＮＡの発現を可能とする発現制御配列に作動可能に結合した請求項３に記載のＤＮＡまたはＲＮＡを含む組換え核酸分子。

【請求項５】

請求項３に記載のＤＮＡまたはＲＮＡを含む組換えベクター。

【請求項６】

ＤＮＡまたはＲＮＡが発現制御配列に作動可能に結合していることを特徴とする請求項５に記載の組換えベクター。

【請求項７】
請求項３に記載のＤＮＡまたはＲＮＡ、請求項４に記載の組換え核酸分子、又は請求項５もしくは６に記載の組換えベクター分子で形質転換された宿主細胞又は生物。
【請求項８】
請求項７に記載の宿主細胞を培養することからなる請求項１または２に記載のタンパク質の発現方法。
【請求項９】
請求項１または２に記載のタンパク質、請求項４に記載の組換え核酸分子、請求項５もしくは６に記載の組換えベクター又は請求項７に記載の宿主細胞もしくは生物を、医薬的に許容可能なキャリヤーと共に含んでなることを特徴とする家禽コクシジウム症の予防ワクチン。
【請求項１０】
請求項７に記載の感染宿主細胞を培養し、組換えベクターを収集し、該組換えベクターを免疫活性を有する医薬品中に配合する段階からなるコクシジウム症ワクチンの製造方法。
【請求項１１】
請求項１または２に記載のタンパク質又は請求項８に記載の方法で製造したタンパク質を、免疫活性を有する医薬品中に配合することからなるコクシジウム症ワクチンの製造方法。
【請求項１２】
請求項１または２に記載のタンパク質と免疫反応性の抗体又は抗血清。
【請求項１３】
請求項９に記載のワクチンをトリに投与することからなる家禽コクシジウム症の予防方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、免疫リンパ球を刺激し得るＥｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ由来のタンパク質に関する。本発明は更に、該タンパク質の全て又は抗原として有意な部分をコードする核酸配列、該核酸配列を含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換される宿主細胞又は微生物、及び家禽コクシジウム症の予防ワクチンに関する。
【０００２】
【従来の技術】
コクシジウム症は、Ａｐｉｃｏｍｐｌｅｘａ亜門Ｅｉｍｅｒｉａ属の細胞内原生動物寄生虫である多くのコクシジウム種の１種以上に感染して生ずる疾病である。本明細書では、家禽とは、卵又は食肉源として役立ち、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ホロホロチョウ、キジ、ハト及びクジャクのような商業的に重要な種類を包含する飼育鳥類であると定義する。
【０００３】
ニワトリコクシジウム症は幾つかの異なるＥｉｍｅｒｉａ種、即ちＥｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ、Ｅ．ｍａｘｉｍａ、Ｅ．ｔｅｎｅｌｌａ、Ｅ．ｎｅｃａｔｒｉｘ、Ｅ．ｂｒｕｎｅｔｔｉ、Ｅ．ｍｉｔｉｓ、Ｅ．ｐｒａｅｃｏｘ、Ｅ．ｍｉｖａｔｉ及びＥ．ｈａｇａｎｉによって発症することが知られている。しかしながら、最後の２種についてはその存在を疑う人たちもいる。これらのＥｉｍｅｒｉａ種に僅かでも感染すると、再感染防御免疫が得られる。
【０００４】
種によってニワトリへの病原作用は異なり、ニワトリの種類もある役割を果たす。例えば、ブロイラー用のニワトリは、Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ又はＥ．ｍａｘｉｍａのような寄生虫が、食物消化に重要な役割を果たす小腸の広域部分に寄生するため、寄生虫によって大きな打撃を受ける。

【０００５】
Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａはヨーロッパ及びＵＳＡのブロイラー用鶏舎の寝わらで発見される最も一般的な種の一つである。Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａは高い生殖能力を有する。また体重増加を著しく抑制し、飼料要求を高め、上方小腸に大きな病変を生ずるために病原性であるとみなされている。
【０００６】
生活環中（表１も参照されたい）、Ｅｉｍｅｒｉａ寄生虫は幾つかの段階を経る。ニワトリが地面での給餌中に又は埃の吸入によって胞子形成オーシストとして知られる感染期の寄生虫を経口接種すると生活環が開始する。胞子形成オーシストの壁は機械的粉砕作用と化学作用との組み合わせによって砂嚢及び腸管で破壊され、４個のスポロシストが放出される。このスポロシストが十二指腸内に入ると、胆汁や消化酵素にさらされて、スポロシスト１個当たり２個のスポロゾイトが放出される。
【０００７】
【表１】

表１．感染十二指腸の染色切片でのＥｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａの内生期（McDonald V.等, Parasitol. 8, 21−30, 1982）

感染時間	組織学的観察
２４時間	未熟第１世代無性期
３６時間	半成熟第１世代シゾント
４２時間	成熟第１世代シゾント。未熟第２世代寄生虫。
４８時間	成熟第２世代シゾント。８−１６個のメロゾイトを有する僅かな第３世代シゾント。
６０時間	成熟第３世代シゾント。未熟第４世代寄生虫。

【０００８】
スポロゾイトは可動性で、適切な宿主上皮細胞を探し、そこに侵入して生殖する。上皮細胞が感染した後、寄生虫は生活環のシゾント期に入り、シゾント１個当たり８～１６個、更には２００個を超えるメロゾイトを生成する。一旦シゾントから放出されたメロゾイトは自由に別の上皮細胞に感染する。２～５回のこのような無性生殖サイクルの後に、細胞内メロゾイトは成長して、雌性即ち大配偶子母細胞及び雄性即ち小配偶子母細胞として知られる有性形態となる。小配偶子母細胞から放出された小配偶子による大配偶子母細胞の受精後に、周りに嚢子壁を生じた接合体が形成される。新たに形成されたオーシストは糞に混じって感染ニワトリの体外に出る。
【０００９】
温度や湿度の環境条件が適切で、大気中に十分な酸素があれば、オーシストは胞子形成して、新たな宿主に感染する感染期に入り、疾病が広がる。従って、寄生虫をトリからトリに移動させるのに中間宿主は不要である。
【００１０】
Ｅｉｍｅｒｉａ寄生虫がニワトリ消化管に感染すると、体重増加が抑制され、飼料要求が増し、卵の生産が停止し、場合によっては死に至ることがあり得る。この寄生虫のために、家禽の集約生産の増加は重大な損害を伴っていた。実際、コクシジウム症は経済的に最も重大な寄生虫病となった。オランダでは、家禽農家が毎年被る損害は数百万ギルダーで

ある。１９８６年度の損害は約１３００万ギルダーであった。同じ年の米国での損害は3億ドルであった。

【００１１】

【発明が解決しようとする課題】

これまでに、コクシジウム症防御のために幾つかの方法が使用されてきた。化学療法剤が登場する前は、寝わらを機械で除去すると共に消毒薬を用いて衛生状態を改善することが最も慣用的な方法であった。しかしながら、通常疾病を媒介するのに十分なオーシストが残存していた。

【００１２】

良好な管理に加えて、飼料又は飲み水にコクシジウム増殖阻止剤を導入することにより、疾病防御にある程度は成功した。このような薬剤は、一部にはコクシジウム薬剤耐性株が生ずるために、年々効能が低下することが判明した。更には、食肉中に残留して食肉を消費に適さないものとする化学療法剤があることが判明した。

【００１３】

７種全てのＥｉｍｅｒｉａに由来するオーシストを含む生ワクチンをニワトリに投与して疾病を免疫学的に防御しようとする試みがなされた。投与されるオーシストは早熟系由来のものである。このような早熟系は、ニワトリに野生集団のＥｉｍｅｒｉａ種を接種し、感染の結果として排出される正に最初の寄生虫を収集することによって得られる。収集した寄生虫をニワトリに戻し、サイクルを数回繰り返す。場合によっては、腸での無性生殖サイクルが少ない早熟系寄生虫が生成される。従って、このような系は免疫原性を保持しており、宿主ニワトリの腸での寄生虫発生が減少し、結果的に被害も少なくなる。

【００１４】

この種のワクチンの欠点は、生きたニワトリで製造する必要があり、生殖能力も低いので製造コストがかかることである。

【００１５】

遺伝子工学の到来によって、効果的なワクチンの新たな製造方法が得られた。これらの方法を用いて、ある病原性微生物の抗原性タンパク質をコードするＤＮＡをＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ又はＳａｌｍｏｎｅｌｌａ種のような宿主微生物中にクローニングすると、その結果、タンパク質がワクチン中に導入可能なほどに十分高いレベルで発現された。このようにして産生されたタンパク質の利点は、非感染性であり、製造コストが比較的安価なことである。このようにして、肝炎ウイルス、単純疱疹ウイルス及び口蹄疫ウイルスのような幾つかのウイルスに対するワクチンが製造された。

【００１６】

コクシジウム症ワクチンを遺伝子工学で製造しようとする試みがなされた。ヨーロッパ特許出願第３３７　５８９号は、Ｂ型Ｅｉｍｅｒｉａ　ｔｅｎｅｌｌａタンパク質の単離やこのタンパク質の新規発現ベクター内への挿入、及びこの発現ベクターを用いた適切な宿主の形質転換を記載している。ＰＣＴ出願ＷＯ９２／０４４６１号は、「ｍＲＮＡルート」又は「核ＤＮＡルート」を用いて抗原性タンパク質を産生する微生物の構築を記載している。このように、製造されて配列決定されたＥ．ｔｅｎｅｌｌａ及びＥ．ｍａｘｉｍａ由来の抗原もある。ワクチン内に導入するための抗原のこの種の方法での製造は単に、異種生物中に抗体を生じさせ得る抗原の選択に依存している。このアプローチは必ずしも、最も防御的な抗原の選択をもたらすものではない。

【００１７】

Ｈ．Ｓ．　Ｌｉｌｌｅｈｏｊ（Ｖｅｔ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈ．，１３，　３２１－３３０，１９８６）によれば、コクシジウムに感染したニワトリの感染防御免疫の発生は種特異的Ｔ細胞応答の発生によるものであろうと考えられ得る。

【００１８】

Ｅｉｍｅｒｉａシゾントの４２時間の発生段階から非常に免疫原性のタンパク質を単離できることが今回知見された。驚くべきことに、このタンパク質はＥｉｍｅｒｉａの細胞内に発見され、既知の異種乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）と高い配列相同性を有するよう

に思える。
【００１９】
【課題を解決するための手段】
従って、本発明では、モノマー分子量が約３７ｋＤのＥｉｍｅｒｉａ乳酸デヒドロゲナーゼの免疫反応及び／又は抗原決定基を１つ以上有するタンパク質を提供する。
【００２０】
とりわけ乳酸ヒドロゲナーゼはＥｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａに由来する。
【００２１】
本発明の第２の態様により、精製Ｅｉｍｅｒｉａ乳酸デヒドロゲナーゼの全て又は実質的な部分、特に免疫活性部分をコードする核酸配列を提供する。このような核酸配列を発現制御配列に作動可能に結合すると組換え核酸分子が得られ得る。この核酸分子を適切なベクターに挿入すると、核酸配列を発現し得る組換えベクターとなる。
【００２２】
先に定義したような組換えベクター又は核酸配列を使用して、適切な宿主細胞又は生物を形質転換することができる。このような形質転換した宿主細胞又は生物を使用して、家禽コクシジウム症の予防ワクチン内に導入するための刺激タンパク質を産生してもよい。あるいは、形質転換した宿主細胞又は生物自体をワクチン内に導入してもよい。
【００２３】
一般に、「タンパク質」という用語は、生物活性を有するアミノ酸分子鎖を指す。タンパク質は特定の長さを有するものではなく、必要とあれば例えばグリコシル化、アミド化、カルボキシル化又はリン酸化によりｉｎ　ｖｉｖｏ又はｉｎｖｉｔｒｏ改変することができる。従って、とりわけペプチド、オリゴペプチド及びポリペプチドが上記定義に包含される。
【００２４】
本発明では特に、配列番号２に示すアミノ酸配列を有し、ＬＤＨ活性又はその免疫活性部分を有するタンパク質、及びその生物機能等価物又は変異体を提供する。
【００２５】
本明細書に特に開示するタンパク質の生物機能等価物又は変異体とは、例えば１個以上のアミノ酸の欠失、挿入及び／又は置換によって上記アミノ酸配列から誘導されるタンパク質であるが、Ｅｉｍｅｒｉａ抗原の１個以上の免疫原決定基は保持している。即ち前記変異体は、宿主動物で免疫応答を誘発し得るエピトープを１つ以上有する。
【００２６】
本明細書に包含される特定のタンパク質では、個々のＥｉｍｅｒｉａ寄生虫又は株の間に自然変異が存在し得ると理解されよう。これらの変異は全配列中の１つもしくは複数のアミノ酸の相違によって又は該配列でのアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位又は付加によって示され得る。本質的に生物活性も免疫活性も変えないアミノ酸置換は、例えばＮｅｕｒａｔｈ等が「Ｔｈｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８９））に記載している。関連するアミノ酸の間のアミノ酸置換、即ち進化中に頻繁に生じた置換はとりわけ、Ｓｅｒ／Ａｌａ、Ｓｅｒ／Ｇｌｙ、Ａｓｐ／Ｇｌｙ、Ａｓｐ／Ａｓｎ、Ｉｌｅ／Ｖａｌである（Ｄａｙｈｏｆ，　Ｍ．Ｄ．，　Ａｔｌａｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ａｎｄ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，　Ｎａｔ．　Ｂｉｏｍｅｄ．　Ｒｅｓ．　Ｆｏｕｎｄ．，　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，　１９７８，　５巻，補遺３を参照されたい）。他のアミノ酸置換にはＡｓｐ／Ｇｌｕ、Ｔｈｒ／Ｓｅｒ、Ａｌａ／Ｇｌｙ、Ａｌａ／Ｔｈｒ、Ｓｅｒ／Ａｓｎ、Ａｌａ／Ｖａｌ、Ｔｈｒ／Ｐｈｅ、Ａｌａ／Ｐｒｏ、Ｌｙｓ／Ａｒｇ、Ｌｅｕ／Ｉｌｅ、Ｌｅｕ／Ｖａｌ及びＡｌａ／Ｇｌｕが含まれる。この情報に基づいて、Ｌｉｐｍａｎ及びＰｅａｒｓｏｎは迅速高感度タンパク質比較法（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２７，１４３５－１４４１，１９８５）及び同種タンパク質間の機能類似性の決定法を開発した。得られるタンパク質が免疫反応性を保持している限り、本発明の実施態様のこのようなアミノ酸置換は本発明の範囲内である。
【００２７】

更には、本明細書に特記するタンパク質の免疫原性断片又はその機能変異体も本発明に包含される。

【００２８】

本明細書で使用する「断片」という用語は、本発明の核酸配列又はタンパク質のサブ配列を含むＤＮＡ又はアミノ酸配列を指す。この断片は、Ｅｉｍｅｒｉａ抗原の免疫原決定基を１つ以上有するポリペプチドであるか又はこれをコードする。使用可能な免疫原性ポリペプチド断片の決定方法を以下に記載する。断片はとりわけ、ＤＮＡの場合は制限エンドヌクレアーゼを、ポリペプチドの場合はプロテアーゼを用いて前駆体分子を酵素開裂することによって産生され得る。他の方法には、断片の化学合成又はＤＮＡ断片によるポリペプチド断片の発現が含まれる。

【００２９】

エピトープを含む本発明のタンパク質の適切な免疫原性ポリペプチド断片は、研究中の完全ポリペプチドの部分配列と対応する一連の部分重複ペプチドを合成して、ペプチドと抗体との反応性を調べるいわゆるペプスカン法に基づく、特許出願ＷＯ第８６／０６４８７号、Ｇｅｙｓｅｎ，　Ｈ．Ｍ．等のＰｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　８１，　３９９８－４００２，　１９８４、Ｇｅｙｓｅｎ，　Ｈ．Ｍ．等のＪ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈ．　１０２，２５９－２７４，　１９８７に記載の方法によって知見され得る。

【００３０】

更には、ポリペプチドの幾つかの領域及び上記アミノ酸配列は、未だ不明のエピトープとの構造的一致や理論的考察に基づき指定されたエピトープであり得る。これらの領域の決定は、Ｈｏｐｐ及びＷｏｏｄｓ（Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　７８，　３８２４－３８２８，　１９８１）による親水性基準と、Ｃｈｏｕ及びＦａｓｍａｎ（Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　４７，　４５－１４８，　１９８７）による二次構造特徴との組合わせに基づく。

【００３１】

必要であり得るＴ細胞エピトープは理論的な根拠、例えばＢｅｒｚｏｆｓｋｙの両親媒性基準（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３５，　１０５９－６２，　１９８７）を用いて誘導され得る。

【００３２】

本発明では更に、Ｅｉｍｅｒｉａの上記タンパク質をコードする単離精製した核酸配列を提供する。これらの核酸配列の一つを配列番号１に示す。遺伝暗号の縮重によりコドン中の塩基置換が可能であり、その結果尚同一のアミノ酸をコードする他のコドンとすることができ、例えばアミノ酸であるグルタミン酸のコドンがＧＡＴ及びＧＡＡの両方であることは当業界ではよく知られている。従って、配列番号２に示すアミノ酸配列を有するタンパク質の発現のために、核酸配列が配列番号１に示す核酸配列とは異なるコドン組成を有し得ることは明白である。

【００３３】

本発明の核酸配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術を含む組換えＤＮＡ技術によりＥｉｍｅｒｉａ株から単離して増幅させてもよいし、当業界で公知の技術によりｉｎｖｉｔｒｏ化学合成してもよい。

【００３４】

本発明の核酸配列を、該核酸配列と自然界で元々会合も結合もしていない複製可能な種々のＤＮＡ配列に連結していわゆる組換えベクターを生成し、これを適切な宿主の形質転換に使用することができる。有用な組換えベクターは好ましくはプラスミド、バクテリオファージ、コスミド又はウイルスに由来する。

【００３５】

本発明の核酸配列をクローニングするために使用され得る特定のベクター又はクローニングビヒクルは当業界では公知であり、とりわけプラスミドベクター（例えばｐＢＲ３２２、種々のｐＵＣ、ｐＧＥＭ及びＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔプラスミド）、バクテリオファージ

（例えばλｇｔ－Ｗｅｓ、カロン２８及びＭ１３由来のファージ）、又はウイルスベクター（例えばＳＶ４０、アデノウイルスもしくはポリオーマウイルス）が含まれる（Ｒｏｄｒｉｑｕｅｚ，　Ｒ．Ｌ．及びＤ．Ｔ．　Ｄｅｎｈａｒｄｔ（編），　Ｖｅｃｔｏｒｓ：　Ａ　ｓｕｒｖｅｙ　ｏｆ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｌｏｎｉｎｇ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ａｎｄ　ｔｈｅｉｒ　ｕｓｅｓ，　Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，　１９８８；　Ｌｅｎｓｔｒａ，Ｊ．Ａ．等，　Ａｒｃｈ．　Ｖｉｒｏｌ．，　１１０，　１－２４，　１９９０も参照されたい）。本発明の組換えベクターの構築に使用すべき方法は当業者には公知であり、とりわけＭａｎｉａｔｉｓ，　Ｔ．　等のＭｏｌｅｃｕｌａｒＣｌｏｎｉｎｇ　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，第２版；Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，　１９８９に記載されている。

【００３６】

例えば、遺伝子及び所望のクローニングビヒクルの両方を相補的ＤＮＡ末端の生成と同じ制限酵素を用いて切断したときには、本発明の核酸配列のクローニングベクター内への挿入は容易に達成され得る。

【００３７】

あるいは、一本鎖ＤＮＡを消化するか又は適切なＤＮＡポリメラーゼを用いて一本鎖末端に充填することにより、ブラント末端内に生成される制限部位を改変する必要があり得る。その後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼのような酵素を用いてブラント末端連結を行うことができる。

【００３８】

所望とあれば、リンカーをＤＮＡ末端上に連結して制限部位を生成することができる。このようなリンカーには、制限部位配列をコードする特異的オリゴヌクレオチド配列が含まれ得る。制限酵素で開裂したベクターや核酸配列を更にホモポリマーテーリングで改変してもよい。

【００３９】

本明細書で使用する「形質転換」とは、使用する方法の如何を問わず、例えば直接の取り込みであれ形質導入であれ、異種核酸配列を宿主細胞内に導入することを指す。異種核酸配列は自律複製で維持してもよいし、あるいは宿主ゲノム内に組み込んでもよい。所望とあれば、組換えベクターに指定の宿主と適合し得る適切な制御配列を備えてもよい。これらの配列は、挿入された核酸配列の発現を調節し得る。微生物の他に、多細胞生物に由来する細胞培養物も宿主として使用され得る。

【００４０】

本発明の組換えベクターは好ましくは、所望の形質転換細胞の選択に使用され得るマーカー活性（例えばｐＢＲ３２２のアンピシリン及びテトラサイクリン耐性、ｐＵＣ８のアンピシリン耐性やβ－ガラクトシダーゼのα－ペプチド）を１つ以上含んでいる。

【００４１】

適切な宿主細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配列によって又は該核酸配列を含む組換えベクターによって形質転換することができ、また所望とあれば該核酸配列によってコードされる上記ポリペプチドを発現するために使用され得る微生物又は細胞である。宿主細胞は、原核生物起源（例えばＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ及びＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ種のような細菌）か、真核生物起源［例えばＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのような酵母又は昆虫、植物もしくは哺乳動物細胞のようなより高等真核生物細胞（ＨｅＬａ細胞及びチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む）］であり得る。昆虫細胞には、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａのＳｆ９細胞系が含まれる（Ｌｕｃｋｏｗ等，　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６，　４７－５５，　１９８８）。真核生物クローニング系での本発明の核酸配列のクローニング及び発現に関する情報は、Ｅｓｓｅｒ，　Ｋ．等のＰｌａｓｍｉｄｓ　ｏｆ　Ｅｕｋａｒｙｏｔｅｓ，　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，　１９８６に記載されている。

【００４２】

一般に、本発明で有用な組換えベクターの構築のためには原核生物が好ましい。Ｅ．ｃｏｌｉ Ｋ１２株が、特にＤＨ５ａ又はＭＣ１０６１株がとりわけ有用である。

【００４３】

発現のために本発明の核酸配列が発現ベクター内に導入される。即ち、該配列が発現制御配列に作動可能に結合される。このような制御配列にはプロモーター、エンハンサー、オペレーター、インデューサー、リボソーム結合部位等が含まれ得る。従って、本発明では、上記で同定されたＥｉｍｅｒｉａタンパク質をコードする核酸配列が発現制御配列に作動可能に結合されており、形質転換宿主細胞内で中に含まれるＤＮＡ配列を発現し得る組換えベクターを提供する。

【００４４】

勿論、クローニングベクターの選択された部位に挿入されるヌクレオチド配列は、形質転換宿主がＥｉｍｅｒｉａタンパク質抗原の免疫原決定基を少なくとも１つ以上有するポリペプチドを生成するのであれば、所望のポリペプチドの実際の構造遺伝子の部分ではないヌクレオチドを含み得るし、又は所望のタンパク質の完全構造遺伝子の断片のみを含み得ると理解すべきである。

【００４５】

宿主細胞が細菌の場合、使用され得る有用な発現制御配列には、Ｔｒｐプロモーター及びオペレーター（Ｇｏｅｄｄｅｌ等, Ｎｕｃｌ. Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ., ８, ４０５７, １９８０）；ｌａｃプロモータ及びオペレーター（Ｃｈａｎｇ等, Ｎａｔｕｒｅ, ２７５, ６１５, １９７８）；外膜タンパク質プロモーター（Ｎａｋａｍｕｒａ, Ｋ. 及びＩｎｏｕｇｅ, Ｍ., ＥＭＢＯ Ｊ., １, ７７１－７７５, １９８２）；バクテリオファージλプロモーター及びオペレーター（Ｒｅｍａｕｔ, Ｅ. 等, Ｎｕｃｌ. Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ., １１, ４６７７－４６８８, １９８３）；α－アミラーゼ（Ｂ. ｓｕｂｔｉｌｉｓ）プロモータ及びオペレーター、終結配列並びに選択された宿主細胞と適合し得る他の発現増強及び制御配列が含まれる。宿主細胞が酵母の場合、有用な発現制御配列の例には例えばα－交配因子が含まれる。昆虫細胞では、バキュロウイルスのポリヒドリン又はｐ１０プロモーターが使用され得る（Ｓｍｉｔｈ, Ｇ. Ｅ. 等, Ｍｏｌ. Ｃｅｌｌ. Ｂｉｏｌ. ３, ２１５６－６５, １９８３）。宿主細胞が哺乳動物源の場合、有用な発現制御配列の例にはＳＶ－４０プロモーター（Ｂｅｒｍａｎ, Ｐ. Ｗ. 等, Ｓｃｉｅｎｃｅ, ２２２, ５２４－５２７, １９８３）又はメタロチオネインプロモーター（Ｂｒｉｎｓｔｅｒ, Ｒ. Ｌ., Ｎａｔｕｒｅ, ２９６, ３９－４２, １９８２）又は熱ショックプロモーター（Ｖｏｅｌｌｍｙ等, Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ, ８２, ４９４９－５３, １９８５）が含まれる。あるいは、Ｅｉｍｅｒｉａ中に存在する発現制御配列を適用してもよい。遺伝子発現を最大にするために、Ｒｏｂｅｒｔｓ及びＬａｕｅｒの文献（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ, ６８, ４７３, １９７９）も参照されたい。

【００４６】

従って、本発明は更に、上述の核酸配列又は組換え核酸分子又は組換えベクターを含み、核酸配列の発現によってＥｉｍｅｒｉａタンパク質を産生し得る宿主細胞を包含する。

【００４７】

Ｅｉｍｅｒｉａ感染に対する家禽の免疫感作は、免疫学的に適した状況で本発明のタンパク質をいわゆるサブユニットワクチンとしてトリに投与することによって達成され得る。本発明のサブユニットワクチンは、場合によっては医薬的に許容可能なキャリヤーの存在下で、純粋形態のタンパク質を含み得る。タンパク質は場合によって非関連タンパク質と共有結合させることができ、これは融合生成物の精製で有利となり得る。例はβ－ガラクトシダーゼ、プロテインＡ、プロキモシン、血液凝固因子Ｘａ等である。

【００４８】

これらのタンパク質を用いた感染防御免疫の産生能力が低い場合もある。小さな断片をキャリヤー分子に接合して、免疫原性を生ずることが好ましい。この目的のための適切なキ

ャリヤーは、高分子［例えば天然ポリマー（アオガイヘモシアニン、アルブミン、毒素のようなタンパク質）、ポリアミノ酸（ポリリシン、ポリアラニン）のような合成ポリマー、又はサポニンのような両親媒性化合物のミセル］である。あるいは、これらの断片をポリマー、好ましくは線状ポリマーとして提供してもよい。

【００４９】

必要とあれば、ワクチンで使用すべき本発明のタンパク質は、例えばグリコシル化、アシル化、アミド化、カルボキシル化又はリン酸化によりｉｎ　ｖｉｔｒｏ又はｉｎ　ｖｉｖｏ改変することができる。

【００５０】

新たに開発されたワクチン種は、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡが医薬的に許容可能な形態で、例えば組織内に放つことのできる「弾丸」形態で投与されるワクチンである。プラスミドで又はＳＶ４０ウイルス由来のような適切な真核生物プロモーター配列と組み合わせて提供されるならば、この裸（ｎａｋｅｄ）ＤＮＡをワクチンとして使用することができる。このようにして、このＤＮＡをゲノムＤＮＡ内に導入して、抗原をその場で発現させることができる。

【００５１】

サブユニットワクチンに代わるものが生ワクチンである。本発明の核酸配列は、組換え微生物が尚複製して、挿入された核酸配列によってコードされるポリペプチドを発現でき、感染した宿主トリで免疫応答を誘発できるように、組換えＤＮＡ技術によって微生物（例えば細菌又はウイルス）中に導入される。

【００５２】

本発明の好ましい実施態様は、上述の異種核酸配列を含み、組換えベクターウイルスに感染した宿主細胞又は宿主トリでＤＮＡ配列を発現し得る組換えベクターウイルスである。「異種」という用語は、本発明の核酸配列が元来ベクターウイルス内に存在しないことを示す。

【００５３】

その上、本発明は更に、核酸配列の発現によってＥｉｍｅｒｉａタンパク質を産生し得る、組換えベクターウイルスに感染した宿主細胞又は細胞培養物を包含する。

【００５４】

例えば、よく知られたｉｎ　ｖｉｖｏ相同組換え技術を使用して、本発明の異種核酸配列をベクターウイルスのゲノム内に導入することができる。

【００５５】

まず、ベクターゲノムの挿入領域、即ち感染又は複製に必要とされるようなベクターの主要機能を損なわずに異種配列の取り込みに使用され得る領域に対応するＤＮＡ断片を、標準的なＤＮＡ組換え技術に従ってクローニングベクター内に挿入する。挿入領域は多数の微生物で報告されている（例えばヨーロッパ特許第８０，８０６号、ヨーロッパ特許第１１０，３８５号、ヨーロッパ特許第８３，２８６号、ヨーロッパ特許第３１４，５６９号、ＷＯ８８／０２０２２号、ＷＯ８８／０７０８８号、米国特許第４，７６９，３３０号及び米国特許第４，７２２，８４８号）。

【００５６】

第二に、所望とあれば、第１段階で得られた組換えベクター分子内に存在する挿入領域内に欠失を導入することができる。これは例えば、第１段階の組換えベクター分子の適切なエキソヌクレアーゼＩＩＩ消化又は制限酵素処理によって達成され得る。

【００５７】

第三に、異種核酸配列が、第１段階の組換えベクターに存在する挿入領域内に、即ち該組換えベクターから欠失させたＤＮＡの代わりに挿入される。挿入領域のＤＮＡ配列は、ベクターゲノムとの相同組換えが生ずるように適切な長さを有するべきである。その後、適切な細胞に野生型ベクターウイルスを感染させるか、又は適切なベクターＤＮＡ配列に隣接する挿入領域を含むために、その対応する領域とベクターゲノムとの間で組換えを生ずる組換えベクターの存在下において、細胞をベクターゲノムＤＮＡで形質転換させること

ができる。これで、後代組換えベクターが細胞培養物中に生成し得、これを例えばハイブリダイゼーション、異種核酸配列と共に組み込まれた遺伝子によってコードされる酵素活性の検出、又は組換えベクターによって免疫学的に発現される抗原性異種ポリペプチドの検出によって、例えば遺伝子型又は表現型で選択することができる。

【００５８】

次いで、この組換え微生物を免疫感作のために家禽に投与することができる。その後この微生物はしばらくその状態を維持するか又は被接種動物の体内で複製し、本発明の挿入された核酸配列によってコードされるポリペプチドをｉｎ　ｖｉｖｏ発現して被接種動物の免疫系を刺激する。本発明の核酸配列を組み込むための適切なベクターは、ウイルス［例えばワクシニアウイルス（ヨーロッパ特許第１１０，３８５号、ヨーロッパ特許第８３，２８６号、米国特許第４，７６９，３３０号及び米国特許第４，７２２，８４８号）もしくは家禽痘瘡ウイルス（ＷＯ８８／０２０２２号）のような痘瘡ウイルス、ＨＶＴ（ＷＯ８８／０７０８８号）もしくはマレック病ウイルスのようなヘルペスウイルス、アデノウイルス又はインフルエンザウイルス］か、細菌（例えばＥ．　ｃｏｌｉ又は特異Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ種）に由来し得る。この種の組換え微生物では、宿主動物で合成されるポリペプチドは表面抗原として暴露され得る。これに関連して、ＯＭＰタンパク質又は例えばＥ．　ｃｏｌｉの繊毛タンパク質又は微生物によって認識される合成シグナル及びアンカー配列とポリペプチドとの融合が考えられる。所望とあればより大きな全体の一部としてのＥｉｍｅｒｉａポリペプチドを免疫感作すべき動物内に放出することも可能である。これらの場合では全て、１つ以上の免疫原性産物が発現して、種々の病原体及び／又は所定の病原体の種々の抗原を防御することも可能である。

【００５９】

本発明のベクターワクチンは、組換え細菌又は本発明の核酸配列を含む組換えベクターに感染した宿主細胞を培養し、その後組換え細菌もしくはベクターを含む細胞及び／又は細胞内で増殖した組換えベクターウイルスを場合によっては純粋な形態で収集し、場合によっては凍結乾燥形態のワクチンとすることにより製造され得る。

【００６０】

本発明の組換えベクターで形質転換した宿主細胞は、前記核酸配列によってコードされるポリペプチドの発現に好ましい条件下で培養することもできる。ワクチンは、未精製培養物の試料、細胞溶解物又は宿主細胞抽出物を用いて製造することができるが、他の実施態様では、用途によってより精製された本発明のポリペプチドからワクチンが生成される。生成したポリペプチドを精製するために、本発明の組換えベクターで形質転換した宿主細胞を適量で培養し、生成したポリペプチドを上記細胞から又はタンパク質が分泌される場合は培地から単離する。培地中に分泌されたポリペプチドは、標準的な技術（例えば塩分画、遠心分離、限外濾過、クロマトグラフィー、ゲル濾過又は免疫親和性クロマトグラフィー）によって単離精製することができるが、細胞内ポリペプチドは、まず細胞を収集し、この細胞を例えば超音波処理又はフレンチプレスのような機械的破砕手段によって破砕し、次いでポリペプチドを他の細胞内成分と分離することによって単離することができ、そしてポリペプチドからワクチンを生成する。細胞破砕は化学的（例えばＥＤＴＡもしくはトリトンＸ１１４のような洗剤）又はリゾチーム消化のような酵素手段でも達成され得る。

【００６１】

本発明のポリペプチドに対する抗体又は抗血清は、受動免疫療法、診断イムノアッセイ及び抗イディオタイプ抗体の生成で使用可能である。

【００６２】

上記で特性分析したＥｉｍｅｒｉａタンパク質を使用して、ポリクローナル、モノ特異的、及びモノクローナルな抗体を産生することができる。ポリクローナル抗体が所望される場合、ポリクローナル血清の産生処理技術は当業界で公知である（例えばＭａｙｅｒ及びＷａｌｔｅｒ．（編），Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，

Ｌｏｎｄｏｎ，　１９８７）。免疫原に対するモノ特異的抗体は、Ｈａｌｌ等の方法（Ｎａｔｕｒｅ，　３１１，　３７９－３８７，　１９８４）の変形によってポリ特異的抗血清から親和性精製することができる。本明細書で使用するモノ特異的抗体とは、関連抗原との均一結合特性を有する単一抗体種又は多重抗体種であると定義する。本明細書で使用する均一結合とは、抗体種が特異的な抗原又はエピトープに結合する能力を指す。

【００６３】

本発明のＥｉｍｅｒｉａタンパク質に反応性のモノクローナル抗体は、当業界で公知の技術（Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ，　Ｎａｔｕｒｅ，　２５６，　４９５－４９７，　１９７５）により近交マウスを免疫感作することにより産生され得る。ハイブリドーマ細胞は、ダルベッッコ改良イーグル培地のような適切な細胞培地中ヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリン中での増殖によって選択される。好ましくはＭａｃＰｈｅｒｓｏｎの軟寒天技術（Ｓｏｆｔ　Ａｇａｒ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，　Ｋｒｕｓｅ　ａｎｄ　Ｐａｔｅｒｓｏｎ，（編），　Ａｃｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　２７６，　１９７３）を用いて、抗体を産生するハイブリドーマをクローニングする。適切な培地内の培養プレートの個々のウェルに離散したコロニーを移す。適切な免疫原でスクリーニングして、抗体産生細胞を同定する。免疫陽性ハイブリドーマ細胞を当業界で公知の技術により維持する。特異的抗モノクローナル抗体は、ハイブリドーマをｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養するか又は当業界で公知の手順によりハイブリドーマを注射した後にマウスで腹水を調製することにより産生される。

【００６４】

抗イディオタイプ抗体は、予防することが望ましい病原体の抗原の「内部像」を保有する免疫グロブリンであり、ワクチンでは免疫原として使用され得る（Ｄｒｅｅｓｍａｎ等，　Ｊ．　Ｉｎｆｅｃｔ．　Ｄｉｓｅａｓｅ，　１５１，　７６１，　１９８５）。抗イディオタイプ抗体の産生技術は当業界では公知である（ＭａｃＮａｍａｒａ等，　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２２６，　１３２５，　１９８４）。

【００６５】

本発明のワクチンは、従来の能動免疫計画で投与することができ、即ち製剤と適合し得るような方法で、予防に効果的なような量、即ち抗原又は抗原を発現し得る組換え微生物を免疫感作すると、家禽でビルレントＥｉｍｅｒｉａ寄生虫の攻撃に対する免疫が生ずる量を１回又は繰り返し投与する。免疫とは、ワクチン接種後のニワトリ集団で、ワクチン接種していないグループに比べて、有意なレベルの防御が生じることと定義する。

【００６６】

本発明のポリペプチドを含むワクチンでは、防御が増すこと以外に、被感染動物から排出されるオーシストの数も減少する。排出されたオーシストは群れの中の他の動物に感染する。排出されるオーシストの数が減少すれば、その後感染する動物の数も減り、更には感染負荷（ｉｎｆｅｃｔｉｖｅ　ｌｏａｄ）も低下する。

【００６７】

更には、ワクチンは寄生虫自体に作用せずとも、疾病頻度を下げ得る。これは、疾病症状が寄生虫によって放出された物質によって引き起こされる場合にとりわけそうである。このような物質に対するワクチンは、寄生虫を攻撃せずに症状を緩和させる。

【００６８】

生ウイルスベクターワクチンでは、ニワトリ１羽当たりの投与量は10^5－10^8ｐｆｕであり得る。本発明の通常のサブユニットワクチンは、本発明のタンパク質を１μｇ～１ｍｇ含んでいる。このようなワクチンは皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、経口又は鼻腔内に投与することができる。

【００６９】

その上、ワクチンは更に水性媒質又は含水懸濁液を、活性及び／又は貯蔵寿命を増すためにしばしば他の成分と混合して含み得る。これらの成分は塩、ｐＨ緩衝液、安定剤（例えばスキムミルク又はカゼイン水解物）、乳化剤、免疫応答を改善するためのアジュバント

（例えば油、ムラミルジペプチド、水酸化アルミニウム、サポニン、ポリアニオン及び両性物質）並びに防腐剤であり得る。

【００７０】

本発明のポリペプチドを含むワクチンは更に、Ｅ．　ｍａｘｉｍａの他の免疫原性タンパク質又は他のＥｍｅｒｉａ種の免疫原性タンパク質を含み得る。このような組み合わせワクチンは、家禽の群れで寄生虫負荷（ｐａｒａｓｉｔｉｃ　ｌｏａｄ）を低下させ、コクシジウム症の予防レベルを高める。

【００７１】

本発明のワクチンが更に、多価ワクチン製造のために、家禽の他の病原体に関連する免疫原（例えばマレック病ウイルス（ＭＤＶ）、ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）、感染性気管支炎ウイルス（ＩＢＶ）、ニワトリ貧血因子（ＣＡＡ）、レオウイルス、トリレトロウイルス、家禽アデノウイルス、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス又は大腸菌の抗原）を含み得るか又はこれらの免疫原をコードする核酸配列を含み得ることは明白である。

【００７２】

【実施例】

本発明を以下の実施例により説明する。

【００７３】

実施例１

寄生虫の取り扱い

Ｅｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ（Ｈｏｕｇｈｔｏｎ株）及びＥｉｍｅｒｉａ　ｔｅｎｅｌｌａ（Ｗｅｙｂｒｉｄｇｅ株）寄生虫を、コクシジウムの不在下に飼育したニワトリに意図的に感染させた後で回収した。感染後（ｐ．ｉ．）４日目及び５日目に、Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａオーシストを糞便物質から分離した。ｐ．ｉ．７日目にＥ．ｔｅｎｅｌｌａオーシストを盲腸から収穫した。

【００７４】

オーシストを３０℃で７時間強曝気してスポロゾイト形成し、部分的にスポロゾイト形成されたオーシストを得た。初期にＡ．Ｎ．Ｖｅｒｍｅｕｌｅｎら，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　１１０，（１９９３），２２３－２３０に記載のようにして、４８時間スポロゾイト形成したオーシストからスポロシスト及びスポロゾイトを放出させた。

【００７５】

細胞内期のＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａを得るために、５週齢のニワトリに、10^8スポロゾイト形成Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａオーシストを感染させた。４２時間後に十二指腸から細胞内寄生虫を収穫した。そのために、接種後４２時間ニワトリから放血させ、胃とメッケル憩室の間で十二指腸を取り出した。組織を洗浄し、約１ｃｍ^{3}の小片に切断した。該小片を、１０ｍｇ／ｍｌのグルコースを含むカルシウム／マグネシウム非含有ハンクスＢＳＳ（ＣＭＦ－ハンクス液）に懸濁した。ＥＤＴＡ（３５～３７℃のＣＭＦハンクス液中の２ｍＭ　ＥＤＴＡ）中で１０分間インキュベートして上皮細胞を基質から放出させた。４回のインキュベーションの上清をプールし、７５０ｇで１０分間遠心して細胞をペレット化した。次いで、細胞内寄生虫（栄養体も存在したが、以後「シゾント」と称す）をサポニン溶解（ＣＭＦ－ハンクス液中の０．１％サポニン中、室温で１５分）及び機械的剪断により宿主細胞から放出させた。

【００７６】

シゾントをペレット化し、４５％Ｐｅｒｃｏｌｌ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｆｉｎｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を介して遠心（２０分、７００ｇ、４℃）した後、宿主物質から分離した。シゾントの乾燥ペレットを後で使用するまで－７０℃で貯蔵した。

【００７７】

トリトンＸ１１４抽出

トリトンＸ１１４抽出を行ってシゾントの親水性タンパク質画分を得た。手順は、初期にＣ．Ｂｏｒｄｉｅｒ（１９８１）によりＪｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃ

ｈｅｍｉｓｔｒｙ、第２５６巻、第４号（２月）１６０４－１６０７ページに記載のものを使用した。

【００７８】

ＴＢＳ（１０mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０mMのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）１ｍｌ当たり10^8～10^9のＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａシゾントを、ミクロチップ（ｍｉｃｒｏｔｉｐ）（Ｂｒａｎｓｏｎ 音波処理装置、ポジション ７）を用いて氷上で±３×２０秒間音波処理した。ＰＭＳＦ（最終濃度：１mM）及びＤＮアーゼ／ＲＮアーゼ（最終濃度：共に０．０２ｍｇ／ｍｌ）を加えた（ＤＮアーゼ／ＲＮアーゼストック：５mMの$MgCl_2$中２ｍｇ／ｍｌのＤＮアーゼ、２ｍｇ／ｍｌのＲＮアーゼ）。

【００７９】

懸濁液中の音波処理シゾントに、予備縮合したトリトンＸ１１４を、最終濃度１０％（ｖ／ｖ）で加え、十分に混合してタンパク質を溶解した。抽出不能な物質を４℃で２０分間１２，０００ｇで遠心してペレット化した。可溶画分をスクロースクッション〔ＴＢＳ中６％スクロース、０．０６％（ｖ．ｖ）ＴＸ１１４〕上に重層し、４０℃で１０分間インキュベートし、室温で１０分間４００ｇでスピンした。親水性画分を再び同一手順で抽出した。

【００８０】

親水性画分を後で使用するまで－７０℃で貯蔵した。ＢＣＡ（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）アッセイを用いて総タンパク質濃度を測定した。

【００８１】

Ｐｒｅｐ－ｃｅｌｌ分画

親水性タンパク質を、Ｌａｅｍｍｌｉ緩衝系中、還元条件下に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけてその相対分子量に関してさらに分離した。そのために、いわゆるＰｒｅｐｃｅｌｌにおける分離用電気泳動を用いた。

【００８２】

材料：

Ｐｒｅｐｃｅｌｌカラム（３７mm ＩＤ）を備えたＰｒｅｐｃｅｌｌ装置（Ｂｉｏｒａｄ Ｌａｂｓ）

Ｐｒｅｐｃｅｌｌ用透析膜（カットオフ ６ｋＤ）

パワーサプライ（ＥＰＳ ６００ Ｐｈａｒｍａｃｉａ）

還元性試料緩衝液：６２．５mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ６．８；１０％グリセロール；２％ＳＤＳ；０．０１％ブロモフェノールブルー（Ｍｅｒｃｋ）；０．１３Ｍ ＤＴＴ（ジチオトレイトール、Ｍｅｒｃｋ）

電気泳動緩衝液／溶離緩衝液：２５mMのＴｒｉｓ、１９２mMのグリシン、０．１％ＳＤＳ ｐＨ８．６

方法及び結果：

全ての手順を４℃で実施した。親水性タンパク質の分画には、製造業者のプロトコルに従い、但し０．１％のＳＤＳを加え、Ｐｒｅｐｃｅｌｌの３７mm管（６ｃｍまで充填）中、４％のスタッキングゲル／９％の分離ゲル（ポリアクリルアミド）を用いた。

【００８３】

－７０℃で保存しておいたＴＸ１１４抽出物の親水性相を解凍し、親水性タンパク質（ラン１回当たり約８ｍｇ）を還元性試料緩衝液（総容量は±６ｍｌであった）に希釈し、３分間１００℃で沸騰させ、注射器に取り付けた細口管を用いて４％スタッキングゲル表面に装填した。

【００８４】

Ｐｒｅｐｃｅｌｌをパワーサプライに接続し、最大４０ｍＡ、５００Ｖで電気泳動を開始した。

【００８５】

約６時間後、トラッキング染料がセルから溶出したときに、画分（画分容量±２．５～３ｍｌ；流量０．６ｍｌ／分）の回収を開始した。３．５ｍｌのプラスチックチューブ（Ｓ

ａｒｓｔｅｄｔ）中で画分を一晩回収した（±１００画分）。
【００８６】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びウエスターンブロット法による分析のために、画分試料を採取した。画分を－７０℃で貯蔵した。
【００８７】
この精製法により、以下に示す分析物から、以下のようなほぼ純粋なタンパク質を含む画分を得た。
【００８８】
アミノ酸配列
Ｍｒ＝約３７ｋのほぼ純粋なバンド（ＥＡＳＣ２と称す）を含むＰｒｅｐｃｅｌｌｒｕｎ ＣＯＣ９３１４６１２の選択された画分をプールし、アセトン沈殿させて濃縮し、１２％ＰＡＡゲル上をランさせた。ゲルは間もなく非変性クーマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）染色プロトコル（染色：２０％メタノール／０．５％酢酸中の０．２％ＣＢＢ中、周囲温度で２０分；脱色：３０％メタノール中６０分）により染色された。
【００８９】
染色された３７ｋＤバンドを切り出した。ＥＡＳＣ２トリプシン消化産物の選択されたＨＰＬＣ精製ペプチドの内部アミノ酸配列を決定した（全て、Ｅｕｒｏｓｅｑｕｅｎｃｅ ＢＶ、Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ、 Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓにより実施した）。
【００９０】
トリプシンペプチドのアミノ酸配列は、ＧＷＩＫＱＥＥＶＤＤＩＶＱＫ（配列番号：２ アミノ酸２１２－２２５参照）であった。
【００９１】
このペプチドのこのコード配列はクローンのＤＮＡ配列を決定した後でも検出された。
【００９２】
実施例２
ウサギでのモノ特異的抗体の調製
予め予防接種したＳＰＦウサギの血清を、ウエスターンブロットした種々の発育期のＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ抗原及びＥ．ｃｏｌｉタンパク質のブロット上でスクリーニングした。抗体を産生させるために「陰性」のウサギを選択した。
【００９３】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより、ＥＡＳＣ２（３７ｋＤ）を含むＰｒｅｐｃｅｌｌｒｕｎ画分を選択して、プールし、Ａｍｉｃｏｎｃｅｌｌ（ＹＭ１０フィルター）を用いて３．５ｍｌに濃縮した（±３×）。
【００９４】
４週間隔で、ウサギを、ＧＮＥ（８×０．２５ｍｌ ｉ．ｃ．、１ｍｌ ｉ．ｐ．）中の濃縮抗原で２回免疫感作した。２回目の免疫感作後２週間してから、ウサギを出血させ、Ｅｉｍｅｒｉａ ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ ｅｎ ｔｅｎｅｌｌａスポロゾイト及び４２時間シゾントについてウエスターンブロット法で血清をテストした。図１は、両種のスポロゾイト抗原に対するモノ特異的抗血清の免疫検出結果を示している。抗体は、Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ（レーンＡ１）及びＥ．ｔｅｎｅｌｌａ（レーンＢ１）のいずれにおいても約３７ｋＤの寄生虫産物を認識したことが判明した。免疫感作する前の同一ウサギの対照血清は、これらのバンド（レーンＡ／Ｂ２）を認識しなかった。タンパク質は、該２種のシゾント期にも存在する（図示せず）。
【００９５】
実施例３
Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ ＴＸ１１４親水性画分及びＥＡＳＣ２によるニワトリの予防接種
シゾント物質のＴＸ１１４親水性相を分離し、４℃で０．０１ＭのＰＢＳ（ｐＨ７．３）に対して十分に透析した。
【００９６】

ＥＡＳＣ２ ３７ｋＤタンパク質を含む選択された画分を４℃で３×５リットルの０．０１Ｍ ＰＢＳ（ｐＨ７．３）に対して十分に透析した。

【００９７】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後に種々の濃度の試料をＣＢＢで染色し、染色強度とＢＳＡの基準試料とを比較して、ワクチン調製物中のタンパク質の濃度を評価した。

【００９８】

容量を較正して、精製タンパク質については±５μｇのタンパク質／用量、及び親水性画分全体については約１５μｇ／用量を得た。

【００９９】

これらを初回抗原刺激及び追加免疫予防接種用のアリコート量として－７０℃で貯蔵した。冷凍ワクチン調製物を解凍した。

【０１００】

各１５ｍｌのワクチンに、アジュバントとして、１ｍｌの０．０１Ｍ ＰＢＳ（ｐＨ７．３）量中３．２ｍｇのＱｕｉｌ Ａ Ｓｕｐｅｒｆｏｓ Ｂｉｏｓｅｃｔｏｒを加えた。

【０１０１】

ワクチンをぐるぐるかきまわして十分に混合し、０．７５ｍｌを、４～６週齢のコクシジウムのいない白色レグホンニワトリに皮下注射した。

【０１０２】

ワクチンは、１５０μｇのＱｕｉｌ Ａ／用量を含んでいた。

【０１０３】

図２は、 ワクチンとしてニワトリに注射したＥＡＳＣ２（レーン１）及び４２時間ＴＸ１１４親水性画分（レーン２）のクーマシーＢＢ染色ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示している。

【０１０４】

初回抗原刺激の４週間後に、ニワトリを同一用量を用いて同一経路により追加免疫した。追加免疫ワクチンは、冷凍抗原ストックから新たに調製した。

【０１０５】

対照ニワトリに、ＰＢＳ中１５０μｇのＱｕｉｌ Ａ／用量を接種した。各グループは１４羽のニワトリから構成した。

【０１０６】

追加免疫予防接種の１１日後に、全てのニワトリに、水中１５％スクロース１ｍｌ中の２４０のＥｉｍｅｒｉａ ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ Ｈスポロゾイト形成オーシストを経口接種した。

【０１０７】

ニワトリを１ケージ当たり２羽ずつ入れた。チャレンジ後の４～８日間に採取した糞便試料中でオーシスト排出数を評価した。

【０１０８】

表２は、この実験の結果を示している。オーシスト排出数は、対照動物の排出数に基づくオーシスト％として表す。

【０１０９】

データ分布が正常でない場合には、スチューデントのＴテスト又はＭａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙのテストを用いてオーシスト数のＬＯＧに基づいてデータの統計的評価を行った。

【０１１０】

ｐ＜０．０５であれば、差は有意であると見なした。

【０１１１】

この表は、ＴＸ１１４画分もＥＡＳＣ２ Ｐｒｅｐｃｅｌｌ精製画分も、チャレンジ後のオーシスト排出数において統計的に有意な減少（ｐ＜０．０５）を誘発することを示している。

【０１１２】

Ｐｒｅｐｃｅｌｌ精製によって、ＴＸ１１４ワクチンが誘発する保護が改善されるようであった。

【０１１３】
【表２】

表２．対照からのオーシスト排出数％及び差の統計値

免疫原	対照からのオーシスト排出数％±Ｓ．Ｄ．	対照と異なるｐ値
純粋なＥＡＳＣ２Ｐｒｅｐｃｅｌｌ±５μｇ／用量	７２±３０	ｐ＝０．０１
シゾントの親水性ＴＸ１１４タンパク質±１５μｇ／用量	８４±１７	ｐ＝０．０２

【０１１４】
ワクチンとして４２時間シゾントの全抽出物のみを用いた別の実験では、有意なオーシスト減少は誘発され得なかった（結果は示さず）。
【０１１５】
第２の実験では、０．２及び２μｇ／用量という２つの異なる濃度のＰｒｅｐｃｅｌｌ精製ＥＡＳＣ２を用いた。免疫感作及びチャレンジについて同一プロトコルに従って実施した後、１グループ当たり１０羽のニワトリにおけるオーシスト排出数の減少として保護を測定し、ＰＢＳ／Ｑｕｉｌ Ａを接種したグループと比較した。
【０１１６】
表３は、２つのＥＡＳＣ２予防接種グループに対する対照の平均オーシスト排出数％を要約したものである。この表は、ＥＡＳＣ２が、２μｇ／用量の用量で統計的に有意な差を示す用量依存的保護を行ったことを示している。
【０１１７】
【表３】

表３．対照からのオーシスト排出数％及び差の統計値

グループ	オーシスト％±Ｓ．Ｄ．（対照排出数＝１００％）	対照との差の有意性（ｐ値）
ＥＡＳＣ２／Ｑｕｉｌ Ａ ２μｇ／用量	６４．０±２２	０．００８
ＥＡＳＣ２／Ｑｕｉｌ Ａ ０．２μｇ／用量	９０．２±２７	有意ではない

【０１１８】
実施例４
ＥＡＳＣ２又はＴＸ１１４親水性タンパク質で予防接種した後の免疫刺激
上記の両保護実験において、Ｔ－リンパ球の増殖及び血清抗体のような免疫特性刺激についてニワトリを検定した。
【０１１９】
血清抗体：
ワクチン構成成分を認識する抗体は、４２時間ＴＸ１１４親水性画分で予防接種したグループからの血清においてのみ検出され、精製ＥＡＳＣ２で予防接種したグループでは検出されなかった。
【０１２０】

リンパ球の増殖：
抗原刺激後のリンパ球の増殖をリンパ球刺激テスト（ＬＳＴ）でテストした。
【０１２１】
方法：
チャレンジ前に、各グループのニワトリ全てから末梢血球を採取した。
【０１２２】
周囲温度で７分間６４ｇで全血液３ｍｌを遠心して末梢血白血球（ＰＢＬ）を分離した。ＲＰＭＩ １６４０（Ｄｕｔｃｈ改変）中にバフィーコートを回収し、２回洗浄した。細胞濃度を、１ｍｌのＲＰＭＩ １６４０当たり1×10^{7}細胞に調整した。用いたＲＰＭＩ １６４０（Ｄｕｔｃｈ改変）に、ピルビン酸ナトリウム（１ｍＭ）、グルタミン（２ｍＭ）、ペニシリン２００ Ｕ／ｍｌ及びストレプトマイシン２００μｇ／ｍｌを追加した。
【０１２３】
９６ウエルの丸底組織培養プレートに、３．０％ニワトリ血清（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）を含む０．０５ｍｌの細胞懸濁液、０．０５ｍｌの「刺激性抗原」懸濁液及び０．０５ｍｌのＲＰＭＩ １６４０を接種し、５％CO_2雰囲気下に４１℃で６４時間培養した。次いで、１８．５ＫＢｑの３－Ｈ－チミジン（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｅｋｅｎｈａｍ、Ｕ．Ｋ．）を各ウエルに加え、８時間後、９６ウエルｌｌ Ｃｅｌｌ Ｈａｒｂｅｓｔｅｒ（Ｓｋａｔｒｏｎ Ｎｏｒｗａｙ）を用い、細胞をガラス線維フィルター（Ｓｋａｔｒｏｎ Ｎｏｒｗａｙ Ｂｌｕｅｍａｔ）上に集めた。フィルターをシンチレーション液（ＬＫＢ ＢｅｔａＳｃｉｎｔ）で飽和し、Ｂｅｔａｐｌａｔｅ １２０５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ／ＬＫＢ Ｓｗｅｄｅｎ）中で計数した。
【０１２４】
「刺激性抗原」としてＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａシゾントを用いたが、これは、ミクロチップを備えたＢｒａｎｓｏｎ音波処理装置を用い、ポジション ６で、３×２０秒間音波処理し、中間冷却（ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ ｃｏｏｌｉｎｇ）し、－７０℃で貯蔵した。抗原を使用前に解凍し、刺激に用いる濃度に合うように希釈した。全グループのＰＢＬを3.10^{5}のＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａシゾントで刺激した。
【０１２５】
刺激指数（ＳＩ）〔刺激していない対照の１分当たりのカウント（ｃｐｍ）で除した刺激培養体のｃｐｍ数〕のＬＯＧに基づいてスチューデントのＴテストを用いて統計的評価を行った。$p<0.05$であれば、差は有意であると見なした。
【０１２６】
結果：
表４は、上記のＥＡＳＣ２ワクチンをＴＸ１１４親水性画分と比較した最初の実験及びＥＡＳＣ２ワクチンの２種の用量に関する第２の実験からのグループの平均Ｓ．Ｉ．を示す。
【０１２７】
全ての抗原又は用量が、チャレンジしたときに末梢血において検出可能な有意な正のＴ細胞応答を誘発させたことが判明した。
【０１２８】
しかし、どちらの実験においても、Ｐｒｅｐｃｅｌｌ純粋ＥＡＳＣ２ワクチンの用量を多くすると（２又は５μｇ／用量）、極めて高いＴ細胞刺激を誘発した。Ｔ細胞刺激のランキングは、チャレンジ後のオーシスト排出数の減少と相関していた。
【０１２９】
【表４】

表４．刺激指数（Ｓ．Ｉ．）±標準誤差（ＳＥ）で表した、種々のワクチンで免疫感作したグループからのＰＢＬによるＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａシゾントで刺激した後の^{3}Ｈ－チミジンの平均取り込み

実験	グループ	^{3}Ｈ－チミジンの取り込み Ｓ．Ｉ．±ＳＥ
Ｉ	ＥＡＳＣ２　５μｇ	１２０±４７@
	ＴＸ１１４親水性タンパク質	３１±１２@
	プラシーボ	６±１
ＩＩ	ＥＡＳＣ２　２μｇ	１１２±２８@
	ＥＡＳＣ２　０．２μｇ	２４±４@
	プラシーボ	２．３±０．３

@　対照グループより有意ｐ＜０．００１。

【０１３０】

実施例５

クローニング実験

Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａオーシストのスポロゾイト形成

６０ｍｌの10^{-4}Ｍ 亜ジチオン酸ナトリウム中の５＊10^{8}Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａオーシストの懸濁液を遠心した後、ペレットを１００ｍｌの滅菌水で１回洗浄した。細胞を５００ｍｌの２％重クロム酸カリウムに再懸濁し、次いで、強曝気の影響下に３０℃で７時間インキュベートした。次いでオーシストを遠心して回収し、２００ｍｌの滅菌水で３回洗浄した。

【０１３１】

ＲＮＡの分離

ＲＮＡの分離（Ｐａｓｔｅｒｎａｋ Ｊ．ら，Ｍｏｌ．＆Ｂｉｏｃｈ．Ｐａｒ．３，１３３－１４２，１９８１）のために、１０ｍＭのＴｒｉｓアセテート（ｐＨ７．６）、７５ｍＭの酢酸ナトリウム、１％ＳＤＳ、２ｍＭのＥＤＴＡ、０．２ｍｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫ及び１０ｍＭのバナジルリボヌクレオシド複合体を含む緩衝液２．８ｍｌ中に細胞ペレットを入れた。１３ｇのガラスビーズ（φ０．５ｍｍ）の存在下に、６０秒間（最大）ぐるぐるかきまわしてオーシストを破壊した。全抽出物に５ｍｌのフェノールを加え、混合物をさらに６０秒間ぐるぐるかきまわした。遠心後、上清液をピペットで除去し、等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）で抽出した。２．５容量のエタノールを加えた後、ＲＮＡを沈降させ、得られた沈降物を８００ｍｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．６（$T_{10}E_{0.1}$）に溶解した後、生成物を等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）でさらに２回、クロロホルム／イソアミルアルコール（２４：１）で２回抽出し、次いでエタノールで沈降させた。ポリA^{+}－ＲＮＡを、オリゴ（ｄＴ）－セルロースクロマトグラフィー（Ｍａｎｉａｔｉｓ Ｔ．ら：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒａ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８２）にかけて分離した。５＊10^{8}オーシストから約１００μｇのポリA^{+}－ＲＮＡを分離した。

【０１３２】

ｃＤＮＡの合成

ＭＭＬＶ逆転写酵素を用いてポリA^{+}－ＲＮＡをｃＤＮＡに変換した。このために、２５μｇのポリA^{+}－ＲＮＡを９０ｍｌの水に溶解し、最終濃度１０ｍＭの水酸化メチル水銀を加えて２０℃で５分間変性させた後、β－メルカプトエタノールを最終濃度４５ｍＭで加え、混合物を２０℃でさらに３分間インキュベートした。４ｍｇのオリゴ（ｄＴ）１５、１５０ＵのＲＮａｓｉｎ（Ｒ）、２０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ７．６）、３０ｍＭのＫＣ

ｌ、４mMのジチオトレイトール（ＤＴＴ）、２mMの$MgCl_2$、１mMの各ｄＮＴＰ及び３０００Ｕ ＭＭＬＶ逆転写酵素を含む緩衝液１９０ｍｌ中で酵素反応を実施した。３７℃で１時間インキュベートした後、１０ｍｌの０．５Ｍ ＥＤＴＡを加えて反応を停止した。等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）で抽出した後、最終濃度２Ｍの酢酸アンモニウム及び２．５容量のエタノールを加えて、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドを沈降させた。酵素ＤＮＡポリメラーゼＩとＲＮアーゼＨ（Ｇｕｂｂｌｅｒ Ｕ．ら，Ｇｅｎｅ ２５，２６３－２６９，１９８３）との組合わせ作用により、第２鎖（ｓｅｃｏｎｄ ｓｔｒｉｎｇ）が合成された。ペレットを、２０mMのＴｒｉｓ（ｐＨ７．６）、５mMの$MgCl_2$、１００mMの$(NH_4)_2SO_4$、０．６mMのβ－ＮＡＤ、１６ＵのＲＮアーゼ Ｈ、２００ＵのＤＮＡ－ポリメラーゼＩ及び２０ＵのＤＮＡ－リガーゼ（Ｅ．ｃｏｌｉ）を含む緩衝液９６０μｌに溶解した。１２℃で１時間、次いで２２℃で１時間インキュベートした後、等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて反応を停止し、エタノールで沈降させた。

【０１３３】

先ずｃＤＮＡを改変する目的に適合したベクター中でｃＤＮＡをクローン化した。３０mMの酢酸ナトリウム（ｐＨ５．６）、５０mMのＮａＣｌ、１mMの$ZnSO_4$及び２１ＵのＭｕｎｇ Ｂｅａｎ Ｎｕｃｌｅａｓｅを含む緩衝液１００μｌにｃＤＮＡ（５μｇ）を溶解した。３７℃で３０分間インキュベートした後、最終濃度１０mMのＥＤＴＡ及び最終濃度２５mMのＴｒｉｓを加えて反応を停止した。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）で抽出した後、混合物をＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ５０カラム上で脱塩した。溶離液（１２５μｌ）に、最終濃度５０mMのＴｒｉｓ（ｐＨ７．６）、最終濃度２．５mMのＥＤＴＡ、最終濃度５mMのＤＴＴ、最終濃度０．５mMのＳ′－アデノシルメチオニン、及び１００ＵのＥｃｏＲＩ－メチラーゼを加えた。３７℃で３０分間インキュベートした後、６５℃で３０分間加熱して反応を停止し、その後で、１００mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１００mMの$MgCl_2$及び５００mMのＮａＣｌ（ｐＨ７．５）を含む溶液１／１０容量を加え、同時に最終濃度１mMの各ｄＮＴＰ及び１２．５ＵのクレノウＤＮＡ－ポリメラーゼも加えた。２２℃で６０分間インキュベートした後、等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）を加えて反応を停止した。５００μｌのイソプロパノールと共に３５０μｌのH_2O及び５０μｌの3Ｍ 酢酸ナトリウム（ｐＨ５．６）を加えて上清液を沈降させた。１００ｍｌのH_2Oに溶解後、ペレットをＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ５０上で脱塩し、溶離物をエタノールで沈降させた。ペレットを２４μｌのH_2Oに溶解した後、２μｇのＥｃｏＲＩリンカー、最終濃度３０mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、最終濃度１０mMの$MgCl_2$、最終濃度１０mMのジチオトレイトール、最終濃度１mMのＡＴＰ、最終濃度０．１ｍｇ／ｍｌのゼラチン及び１０ＵのＴ４ＤＮＡ－リガーゼを加えて５０μｌで連結反応を実施した。４℃で１６時間インキュベートし、加熱（７０℃で１５分間）した後で反応を停止し、その後、１００mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）、５０mMのＮａＣｌ、１０mMの$MgCl_2$、２．５mMのＤＴＴ及び５００ＵのＥｃｏＲＩを含む緩衝液２１０μｌ中、制限エンドヌクレアーゼＥｃｏＲＩで切断を実施した。３７℃で９０分間インキュベートした後、等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）で抽出して反応を停止した。最終濃度３００mMの酢酸ナトリウム（ｐＨ５．６）を加えた後、２．５容量のエタノールで上清液を沈降させ、Ｂｉｏｇｅｌ Ａ１５Ｍカラムを用いてｃＤＮＡ及びリンカーを分離した。エタノールでｃＤＮＡを沈降させた後、沈降物を、１０mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１mMのＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）に溶解した。次いで、ｃＤＮＡ分子をλファージＺＡＰＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）中にクローン化した。

【０１３４】

Ｅ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａシゾントのＥＡＳＣ２タンパク質画分に対する抗体を含むｃＤＮＡバンク（$2*10^5$ｐｆｕ）をスクリーニングすると、６個の陽性ファージクローン

が現れた。これらの抗体を、１×Ｔｒｉｓ塩（１０mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０mMのＮａＣｌ、ｐＨ８．０）＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０＋１０％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）で１：２０００希釈し、フィルターと共に室温で２時間インキュベートした。次いで各フィルターを、５０ｍｌの１×Ｔｒｉｓ塩＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で各１０分ずつ４回洗浄した。２回目の抗体のインキュベーションの場合には、ヤギ－抗ウサギ抗体とアルカリホスファターゼとの結合体（１×Ｔｒｉｓ塩＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０＋１０％ＦＣＳに１：７５００希釈した）を用い、室温で３０分間インキュベートした後、最初の抗体インキュベーションの後に記載されているようにしてフィルターを洗浄した。０．３３ｍｇ／ｍｌのニトロブルーテトラゾリウム及び０．１７ｍｇ／ｍｌの５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルホスフェートを溶解した、１００mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１００mMのＮａＣｌ、１０mMの$MgCl_2$（ｐＨ９．６）中で発色反応を実施した。室温で３０分間インキュベートした後、フィルターを評価した。免疫陽性クローンをプラーク精製し、製造業者（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のプロトコルに従い、ｉｎ ｖｉｖｏで切り出して取り出した。標準プロトコル（Ｍａｎｉａｔｉｓ Ｔ．ら，前掲）に従って配列決定するために、得られたｉｎ ｖｉｖｏ切り出しクローンからプラスミドＤＮＡを分離した。部分配列情報から、全てのクローンが相同であり、最大のクローンからヌクレオチド配列が完全に決定されることが示された。ｐＢＬＵＥ ＥＡＳＣ２と称されるこのクローンは、１５６６ｂｐの挿入体を含んでいた。

【０１３５】

【配列表】

配列番号：１
配列の長さ：１６７９
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ｃＤＮＡ　ｔｏ　ｍＲＮＡ
ハイポセティカル：Ｎｏ
アンチセンス：Ｎｏ
起源
　生物名：アイメリアアセルブリナ（Ｅｉｍｅｒｉａ　ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ）
　発育期：シゾント
直接起源：
　クローン：ＥＡＳＣ２＿１
配列の特徴
　特徴を表す記号：ＣＤＳ
　存在位置：２８０．．１２６９
　他の情報：／機能＝“アイメリアラクテートデヒドロゲナーゼ”（Ｅｉｍｅｒｉａ　ｌａｃｔａｔｅ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ）
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｉｓｃ＿ｆｅａｔｕｒｅ
　存在位置：１..５１
　他の情報：／標識＝ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｉｓｃ＿ｆｅａｔｕｒｅ
　存在位置：１６２４..１６７９
　他の情報：／標識＝ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｉｓｃ＿ｆｅａｔｕｒｅ
　存在位置：４５..５４

他の情報：／標識＝ＥｃｏＲＩ－リンカー

配列の特徴

特徴を表す記号：ｍｉｓｃ＿ｆｅａｔｕｒｅ

存在位置：１６２１..１６３０

他の情報：／標識＝ ＥｃｏＲＩ－リンカー

配列

【０１３６】

【化１】

```
GCGGTGGCGG CCGCTCTAGA ACTAGTGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTC GGGTTTTTTT      60

TTTTTTTTCT ACACATTAAT ATTCTTCGTT TACGTTTATT TTGCTACAAA TAAACCCCTT     120

AAACTCTCTA TTTCCTCATA TTCTACCGCT TCATCGGTGG GTGTGTAAGA CGTACGTACG     180

TACAGCTGGG GCTGGCTTAC TGCGCACCGC TTATTTATTA CTTAATTCAT ACACATTTTA     240

TATCTTTCTT CTTCTTTTTT CTTGCTCTTT CTTGTGAAA ATG GCG GTC TTC GAG        294
                                          Met Ala Val Phe Glu
                                            1               5

AAG AAT ACA CGC CCC AAG ATT GCT ATG GTG GGC TCC GGT ATG ATT GGA       342
Lys Asn Thr Arg Pro Lys Ile Ala Met Val Gly Ser Gly Met Ile Gly
                  10                  15                  20

GGC ACC ATG GCT TTC CTG TGC AGC TTG AGG GAA CTC GGA GAT GTT GTC       390
Gly Thr Met Ala Phe Leu Cys Ser Leu Arg Glu Leu Gly Asp Val Val
              25                  30                  35

CTC TTC GAC GTT GTA CCG AAC ATG CCG ATG GGG AAG GCG ATG GAT ATA       438
Leu Phe Asp Val Val Pro Asn Met Pro Met Gly Lys Ala Met Asp Ile
          40                  45                  50

TCG CAC AAT TCG TCG GTG GTT GAC ACG GGT ATA ACA GTA TAC GGC TCA       486
Ser His Asn Ser Ser Val Val Asp Thr Gly Ile Thr Val Tyr Gly Ser
      55                  60                  65

AAT TCA TAC GAG TGC TTG AAG GGT GCG GAC GTA GTA ATA ATA ACA GCA       534
Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Lys Gly Ala Asp Val Val Ile Ile Thr Ala
  70                  75                  80                  85

GGG ATA ACA AAG ATA CCC GGA AAG AGC GAT AAA GAA TGG TCT AGA ATG       582
Gly Ile Thr Lys Ile Pro Gly Lys Ser Asp Lys Glu Trp Ser Arg Met
                  90                  95                  100
```

【０１３７】

【化２】

```
GAT CTA TTA CCT GTG AAT ATA AAG ATA ATG AGG GAG GTC GGT GCA GCA      630
Asp Leu Leu Pro Val Asn Ile Lys Ile Met Arg Glu Val Gly Ala Ala
            105                 110                 115

ATT AAA TCT TAC TGT CCT AAT GCA TTT GTT ATT AAT ATA ACA AAT CCT      678
Ile Lys Ser Tyr Cys Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile Thr Asn Pro
        120                 125                 130

TTA GAT GTG ATG GTA GCT GCT CTT CAA GAG TCA TCA GGA CTA CCT CAT      726
Leu Asp Val Met Val Ala Ala Leu Gln Glu Ser Ser Gly Leu Pro His
    135                 140                 145

CAT AGA ATC TGC GGT ATG GCT GGG ATG CTT GAT AGC TCT CGT TTT AGA      774
His Arg Ile Cys Gly Met Ala Gly Met Leu Asp Ser Ser Arg Phe Arg
150                 155                 160                 165

CGT ATG ATA GCT GAT AAA TTA GAA GTC TCT CCT AGA GAT GTA CAG GGG      822
Arg Met Ile Ala Asp Lys Leu Glu Val Ser Pro Arg Asp Val Gln Gly
                170                 175                 180

ATG GTC ATA GGT GTA CAC GGC GAT CAT ATG GTG CCC CTA AGT AGA TAT      870
Met Val Ile Gly Val His Gly Asp His Met Val Pro Leu Ser Arg Tyr
            185                 190                 195

GCA ACA GTT AAC GGC ATC CCG CTT TCT GAG TTT GTT AAG AAG GGC TGG      918
Ala Thr Val Asn Gly Ile Pro Leu Ser Glu Phe Val Lys Lys Gly Trp
        200                 205                 210

ATC AAG CAA GAA GAA GTA GAT GAT ATC GTT CAG AAG ACC AAG GTC GCT      966
Ile Lys Gln Glu Glu Val Asp Asp Ile Val Gln Lys Thr Lys Val Ala
    215                 220                 225

GGA GGA GAG ATC GTA CGC CTA TTA GGA CAA GGC TCT GCT TAC TAT GCT     1014
Gly Gly Glu Ile Val Arg Leu Leu Gly Gln Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala
230                 235                 240                 245
```

【０１３８】

【化３】

```
CCA GGG GCT TCA GCT ATT CAG ATG GCT GAG AGC TAT CTA AAG GAT AGA      1062
Pro Gly Ala Ser Ala Ile Gln Met Ala Glu Ser Tyr Leu Lys Asp Arg
                250                 255                 260

AAG AGA GTG ATG GTT TGC TCT TGC TAC TTG CAA GGA CAA TAT GGT GTA      1110
Lys Arg Val Met Val Cys Ser Cys Tyr Leu Gln Gly Gln Tyr Gly Val
            265                 270                 275

CAG AAT CAC TAC TTA GGA GTA CCT TGT GTT ATC GGT GGG AGA GGT GTT      1158
Gln Asn His Tyr Leu Gly Val Pro Cys Val Ile Gly Gly Arg Gly Val
        280                 285                 290

GAG AAG ATT ATT GAG TTA GAA TTG ACC GCA CAA GAA AGA CAG GAG CTT      1206
Glu Lys Ile Ile Glu Leu Glu Leu Thr Ala Gln Glu Arg Gln Glu Leu
    295                 300                 305

CAG GGA TCT ATC GAT GAG GTT AAG GAG ATG CAG AAG GCT ATT GCT GCT      1254
Gln Gly Ser Ile Asp Glu Val Lys Glu Met Gln Lys Ala Ile Ala Ala
310                 315                 320                 325

CTT GAT GCA TCC AAG TAAGCAGCAG CAAAATCGCA GAAGTTGCAG CGCTAGAACA      1309
Leu Asp Ala Ser Lys
                330

ACCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCCTATAG TTCTTGCTGC TGCTGTTCCT ACTACAGCTG    1369

CGGCTTTCTT CCTCGTGTTA TTATCATGAT AGTAAGCTGC TGTACCAGCA GCAGCAGCAG    1429

CAGCAGATTT TGCTTGCACC GCCGTTTGTT TTGCGTACAC CGGCAGAAAT ATTGACTTGC    1489

AGTTAGGAGA AAGAAAGAAA ACAAACACGA TCCCATCGAT CCCAATAAAC CCCACACTGT    1549

CGATCCCATC GATCCCAGCA ACTCCACGGG GCTCTTAACT GTTAAACCTA TTATTCTTAT    1609

CATTACTGTC TCCCGAATTC GATATCAAGC TTATCGATAC CGTCGACCTC GAGGGGGGGC    1669

CCGGTACCCA                                                           1679
```

【０１３９】

配列番号：２

配列の長さ：３３０

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

【０１４０】

【化４】

```
Met Ala Val Phe Glu Lys Asn Thr Arg Pro Lys Ile Ala Met Val Gly
 1               5                  10                  15

Ser Gly Met Ile Gly Gly Thr Met Ala Phe Leu Cys Ser Leu Arg Glu
            20                  25                  30

Leu Gly Asp Val Val Leu Phe Asp Val Val Pro Asn Met Pro Met Gly
        35                  40                  45

Lys Ala Met Asp Ile Ser His Asn Ser Ser Val Val Asp Thr Gly Ile
    50                  55                  60

Thr Val Tyr Gly Ser Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Lys Gly Ala Asp Val
65                  70                  75                  80

Val Ile Ile Thr Ala Gly Ile Thr Lys Ile Pro Gly Lys Ser Asp Lys
                85                  90                  95

Glu Trp Ser Arg Met Asp Leu Leu Pro Val Asn Ile Lys Ile Met Arg
            100                 105                 110

Glu Val Gly Ala Ala Ile Lys Ser Tyr Cys Pro Asn Ala Phe Val Ile
        115                 120                 125
```

【０１４１】

【化５】

Asn Ile Thr Asn Pro Leu Asp Val Met Val Ala Ala Leu Gln Glu Ser
130 135 140

Ser Gly Leu Pro His His Arg Ile Cys Gly Met Ala Gly Met Leu Asp
145 150 155 160

Ser Ser Arg Phe Arg Arg Met Ile Ala Asp Lys Leu Glu Val Ser Pro
165 170 175

Arg Asp Val Gln Gly Met Val Ile Gly Val His Gly Asp His Met Val
180 185 190

Pro Leu Ser Arg Tyr Ala Thr Val Asn Gly Ile Pro Leu Ser Glu Phe
195 200 205

Val Lys Lys Gly Trp Ile Lys Gln Glu Glu Val Asp Asp Ile Val Gln
210 215 220

Lys Thr Lys Val Ala Gly Gly Glu Ile Val Arg Leu Leu Gly Gln Gly
225 230 235 240

Ser Ala Tyr Tyr Ala Pro Gly Ala Ser Ala Ile Gln Met Ala Glu Ser
245 250 255

Tyr Leu Lys Asp Arg Lys Arg Val Met Val Cys Ser Cys Tyr Leu Gln
260 265 270

Gly Gln Tyr Gly Val Gln Asn His Tyr Leu Gly Val Pro Cys Val Ile
275 280 285

Gly Gly Arg Gly Val Glu Lys Ile Ile Glu Leu Glu Leu Thr Ala Gln
290 295 300

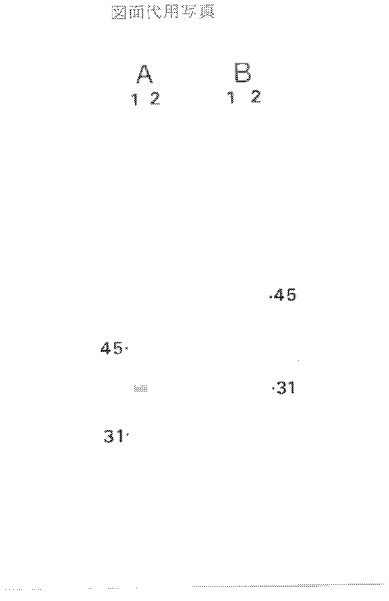
Lys Ala Ile Ala Ala Leu Asp Ala Ser Lys
325 330

【図面の簡単な説明】

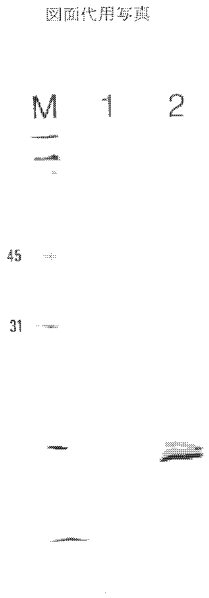
【図１】Ｐｒｅｐ－ｃｅｌｌ精製ＥＡＳＣ２タンパク質（レーン１）又は予備免疫対照血清（レーン２）に対する抗血清でプローブしたＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ（Ａ）及びＥ．ｔｅｎｅｌｌａ（Ｂ）スポロゾイトタンパク質の（電気泳動後の）ウエスターンブロットを示す写真である。マーカーは、分子量較正（ｋＤ）を示している。

【図２】Ｐｒｅｐ－ｃｅｌｌ精製ＥＡＳＣ２タンパク質（レーン１）又はＥ．ａｃｅｒｖｕｌｉｎａ４２時間シゾントのＴＸ１１４親水性画分（レーン２）のクーマシーブリリアントブルー染色ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動結果を示す写真である。レーンＭは、分子量較正マーカー（ｋＤ）を含んでいる。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C12R 1/90 (2006.01) C12N 15/00 ZNAA
C12R 1:90

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 ヤコブス・ヨアンネス・コツク
オランダ国、６５４６・デー・ハー・ニイメーヘン、ドウ・メウツセ・アツカー・１１２８
(72)発明者 ポール・フアン・デン・ボーガールト
オランダ国、５３４４・エス・セー・オツス、フアン・スアイクストラート・４３
(72)発明者 アーノルダス・ニコラース・フエルミユーレン
オランダ国、５４３１・ハー・ハー・クイク、コルホエンデルフエルト・３４

審査官 田中 耕一郎

(56)参考文献 国際公開第９４／０２４２８７（WO，Ａ１）
特開平０２－０６０５８７（ＪＰ，Ａ）
J. Vet. Med. Sci., 56 [5] (1994) p.1021-1023, １９９４年

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 1/00-C12N 15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed