

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2006-518184
(P2006-518184A)**

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A O 1 K 67/033 (2006.01)	A O 1 K 67/033	5 O 1 4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 C O 8 5
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 39/005 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 K 39/012 (2006.01)	A 6 1 K 39/005	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2004-537149 (P2004-537149)	(71) 出願人 394010986	
(86) (22) 出願日 平成15年9月19日 (2003.9.19)	アクゾ・ノベル・エヌ・ペー	
(85) 翻訳文提出日 平成17年5月17日 (2005.5.17)	オランダ国、6824・ペー・エム・ア-	
(86) 國際出願番号 PCT/EP2003/010696	ネム、フエルペルウエヒ・76	
(87) 國際公開番号 WO2004/026903	(74) 代理人 100062007	
(87) 國際公開日 平成16年4月1日 (2004.4.1)	弁理士 川口 義雄	
(31) 優先権主張番号 02078953.3	(74) 代理人 100114188	
(32) 優先日 平成14年9月20日 (2002.9.20)	弁理士 小野 誠	
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100103920	
	弁理士 大崎 勝真	
	(74) 代理人 100124855	
	弁理士 坪倉 道明	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】弱毒寄生虫生ワクチン

(57) 【要約】

本発明は特にアピコンプレックス門及びトリパノソーマ科の生きた弱毒寄生虫と、ワクチン及び前記ワクチンの製造における前記生きた弱毒寄生虫の使用に関する。更に、本発明は前記生きた弱毒寄生虫を含有するワクチンと、前記ワクチンの製造方法に関する。最後に、本発明は特定 t e t リプレッサー融合蛋白質と、前記 t e t リプレッサー融合蛋白質を含む本発明の生きた弱毒寄生虫に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

誘導性プロモーターの制御下にリボソーム蛋白質遺伝子を含むことを特徴とするアピコンプレックス (*Apicomplexa*) 門又はトリパノソーマ (*Trypanosomatidae*) 科の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 2】

前記寄生虫がコクシジウム (*Coccidia*)、ピロプラズマ (*Protozoa*) 又は住血胞子虫 (*Haemosporida*) に属することを特徴とする請求項 1 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 3】

前記寄生虫がアイメリア (*Eimeriidae*) 科、クリプトスピリジウム (*Cryptosporidium*) 科又はサルコシスティス (*Sarcocystis*) 科に属することを特徴とする請求項 2 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 4】

前記寄生虫がアイメリア (*Eimeria*) 属、クリプトスピリジウム (*Cryptosporidium*) 属、トキソプラズマ (*Toxoplasma*) 属、サルコシスティス (*Sarcocystis*) 属又はネオスポラ (*Neospora*) 属に属することを特徴とする請求項 3 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 5】

前記寄生虫がバベシア (*Babesia*) 科又はタイレリア (*Theileriidae*) 科に属することを特徴とする請求項 2 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 6】

前記寄生虫がバベシア (*Babesia*) 属又はタイレリア (*Theileria*) 属に属することを特徴とする請求項 5 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 7】

前記寄生虫がプラスモジウム (*Plasmodium*) 属に属することを特徴とする請求項 2 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 8】

前記寄生虫がトリパノソーマ (*Trypanosoma*) 属又はリーシュマニア (*Leishmania*) 属に属することを特徴とする請求項 1 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 9】

前記誘導性プロモーターがオペレーター部位と前記オペレーター部位と可逆的に結合することが可能なリプレッサー蛋白質をベースとすることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 10】

前記誘導性プロモーターが抗生物質により誘導可能であることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 11】

前記誘導性プロモーターがテトラサイクリン又は無水テトラサイクリン又はその誘導体により誘導可能であることを特徴とする請求項 10 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 12】

t e t R システムを誘導性プロモーターとして使用することを特徴とする請求項 11 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 13】

前記リボソーム蛋白質遺伝子が L 9、S 3、プラスチド - S 9 又は S 13、好ましくはトキソプラズマ・ゴンジイ (*Toxoplasma gondii*) の L 9、S 3、プラスチド - S 9 又は S 13 をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫。

【請求項 14】

ワクチンで使用するための請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫

10

20

30

40

50

。

【請求項 15】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫と医薬的に許容可能なキャリヤーを含有することを特徴とする寄生虫感染防除用ワクチン。

【請求項 16】

アピコンプレックス門又はトリパノソーマ科の寄生虫に起因する感染の防除用ワクチンの製造における請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫の使用。

【請求項 17】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫と医薬的に許容可能なキャリヤーを混合する段階を含む請求項 15 に記載のワクチンの製造方法。 10

【請求項 18】

t e t リプレッサー蛋白質と異種蛋白質又はその一部を含む t e t リプレッサー融合蛋白質をコードする DNA フラグメントであって、前記異種蛋白質又はその一部が t e t リプレッサー蛋白質の N 末端側に融合しており、前記融合蛋白質のモノマー形態が分子量 60 kD 未満であり且つ GPI アンカー、分泌 / 排泄シグナル及び膜貫通領域をもたない前記 DNA フラグメント。

【請求項 19】

前記寄生虫が t e t オペレーター部位と請求項 18 に記載の t e t リプレッサー融合蛋白質をコードする DNA フラグメントを含むことを特徴とする請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の生きた弱毒寄生虫。 20

【請求項 20】

前記寄生虫が 2 個以上の t e t オペレーター部位を含むことを特徴とする請求項 19 に記載の生きた弱毒寄生虫。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアピコンプレックス (A p i c o m p l e x a) 門及びキネトプラスト (K i n e t o p l a s t i d a) 目の生きた弱毒寄生虫、ワクチン及び前記ワクチンの製造における前記生きた弱毒寄生虫の使用、前記生きた弱毒寄生虫を含有するワクチン、前記ワクチンの製造方法、特定 t e t リプレッサー融合蛋白質並びに前記 t e t リプレッサー融合蛋白質を含む生きた弱毒寄生虫に関する。 30

【背景技術】

【0002】

原生生物界内でアピコンプレックス門とキネトプラスト目、より具体的にはトリパノソーマ (T r y p a n o s o m a t i d a e) 科には数種の有害な病原寄生虫が存在することが知られている。

【0003】

トリパノソーマ科には例えばリーシュマニア (L e i s h m a n i a) 属やトリパノソーマ (T r y p a n o s o m a) 属に属する寄生虫が存在する。

【0004】

リーシュマニア症はリーシュマニアに起因する種々の症状を表す用語である。この疾患はイヌとヒトで最も一般に発生する。寄生虫はサシチョウバエにより哺乳動物宿主に伝播され、世界の全熱帯及び亜熱帯地域に蔓延している。宿主の体内で寄生虫はマクロファージに取込まれて滞留増殖し、慢性炎症プロセスを生じる。臨床面では、イヌの疾患は体重減少、貧血、発熱及びリンパ節障害を特徴とする。皮膚障害が観察されることも多い。ヒトでは複数のリーシュマニア種が感染性であり、そのうちで最も病原性が高いものは L . i n f a n t u m であり、脾臓、肝臓及び骨髄を冒し、治療せずにおくと死に至る重症内臓リーシュマニア症 (K a l a a z a r として知られる) を生じる。他の病原性リーシュマニア種としては例えば L . m a j o r や L . m e x i c a n が挙げられる。 40

【0005】

10

20

30

40

50

ヒト及び動物の両者で多種多様の疾患の原因となる複数のトリパノソーマ種が公知である。特に、*Trypanosoma brucei*と*Trypanosoma cruzi*の2種のトリパノソーマ種が病原性であるとして知られている。

【0006】

*T. brucei*種はアフリカ諸国に存在し、ヒトの睡眠障害と動物（ウシ、ウマ、ブタ）のナガナ病の原因となる。*T. brucei*はトリポマスティゴート形態を宿主に送達するツェツェバエにより伝播される。

【0007】

*T. cruzi*種は主に南米に存在し、この寄生虫は宿主範囲が広い（家畜と野生動物を含む）が、ヒトのシャーガス病の原因となることで有名である。この寄生虫は頭部が円錐形の害虫（例えば*Rhodnius*種や*Triatomina*種）により伝播される。メタサイクリック型トリポマスティゴート段階で宿主に感染し、*T. brucei*とは異なり、各種細胞型の宿主細胞質内で増殖する。宿主細胞の破壊後に新規トリポマスティゴート形態が放出され、再び頭部が円錐形の害虫により摂取される。

10

【0008】

アピコンプレックス門には例えればアイメリシア科の寄生虫が存在する。多種多様のアイメリシア種が多種多様の哺乳動物と鳥類に存在する。ニワトリの胃腸管に感染する主要な7種として*Eimeria tenella*、*E. necatrix*、*E. brunetti*、*E. maxima*、*E. acervulina*、*E. praecox*及び*E. mitis*が挙げられる。これらのアイメリシア種はいずれも家禽のコクシジウム症に関与している。従って、アイメリシアは家禽の最重要寄生虫病の原因であり、農家に多大な経済的損失をもたらす。アイメリシアは腸の上皮細胞と粘膜下組織に感染して重症出血性腸炎を誘発し、若鶏に高死亡率をもたらす。

20

【0009】

この疾患は世界中に広がっており、現代の家禽産業で飼育されている家禽を冒す疾患として最高頻度で記録されている。

【0010】

トキソプラズマ、サルコシスティス及びネオスポラを含むサルコシスティス(*Sarcocystidae*)科にも病原性種が存在することが知られている。

30

【0011】

トキソプラズマは広範囲の寄生虫感染であり、ほぼ全哺乳動物、特にヤギ、ヒツジ及びブタに加え、ヒトにも存在する。ヒト罹病率は全人口の70%にも及ぶ。感染は寄生虫に汚染した肉を十分に加熱せずに摂取して生じることが多いが、最終宿主であるネコの糞便に放出されたオーシストの摂取により生じることもある。動物又はヒトが妊娠中に感染すると、自然流産や発生中の胎児に先天性トキソプラズマ症を生じる場合がある。その結果、神経後遺症や眼病になる恐れがある。免疫不全患者では慢性致死性感染（脳炎）を生じる恐れがある。

【0012】

ネオスポラ、特に*N. caninum*はトキソプラズマに非常によく似たコクシジウム寄生虫である。しかし、トキソプラズマとは対照的に、ネオスポラはイヌを最終宿主とする。*N. caninum*はその中間宿主に流産を誘発し、ウシに重度急性流産を生じることがある。別のネオスポラ種である*N. hughesi*はウマでウマ原虫性脊髄脳炎の原因ではないかと推測されている。

40

【0013】

ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ及びウマには多数のサルコシスティス種が存在する。経済的観点では、*Sarcocystis neurona*がウマの臨床ウマ原虫性脊髄脳炎の最も一般的な原因として認められている。米国ではウマの50%が*S. neurona*に血清反応陽性である。

【0014】

プラスモジウムは住血胞子虫類に属し、例えは蚊に伝播されるマラリアの原因として知

50

られている。ヒトでは、4種のプラスモジウム種が報告されており、そのうち、*P. falciparum*が最も病原性と致死性が高い。400,000,000人が感染していると推定され、毎年2,000,000人が死亡している。初期臨床症状は周期的発熱である。初期感染後、プラスモジウムは赤血球に寄生し、多くの場合には貧血を生じる。寄生された赤血球は内臓の毛細血管で詰まり、組織酸素欠乏を生じる。これは脳の場合に特に深刻であり、多発性点状出血を生じ、浮腫や昏睡をもたらし、死に至る場合もある。プラスモジウム種は主にヒトで報告されているが、他のプラスモジウム種も多様な脊椎動物に感染すると考えられる。

【0015】

バベシアとタイレリアはいずれもピロプラズマに属しており、多数の哺乳動物種に多様な疾患をもたらす寄生虫種を含む。バベシア種はダニにより伝播され、多様な脊椎動物に感染してバベシア症なる疾患を生じる。この疾患は脱力、貧血及び寄生虫症を特徴とし、感染動物の多臓器不全をもたらす。進行段階ではヘモグロビン尿症を生じる。ウシで重要なバベシア種としては*B. bovis*、*B. divergens*、*B. major*及び*B. bigemina*が挙げられる。イヌでは*B. canis*、*B. rossii*、*B. microti*及び*B. gibsoni*種が主にバベシア症の原因となり、一般的な死因である。*B. divergens*や*B. microti*等の所定のバベシア種はヒトにも感染することが報告されている。

【0016】

タイレリアはダニにより伝播される疾患であり、反芻動物に感染し、主にウシで問題となる。タイレリアは白血球と赤血球に感染して成長する。疾病は主に白血球内段階に起因する。ウシでは*T. parva*と*T. annulata*の2種の主要タイレリア種を特筆すべきである。*T. parva*はアフリカ諸国に特有の致命的ウシ疾患である東海岸熱の原因となる。東海岸熱は高熱、リンパ節障害、重度肺水腫及び消耗を特徴とする。*T. annulata*はウシと水牛に感染し、まずリンパ系の細胞に侵入し、やがて赤血球内形態として末梢血に現れる。*T. annulata*感染は一般に熱帯タイレリア症と呼ばれる。この疾患はまず高熱とリンパ節膨張が起こり、その後、脱力、脈拍と呼吸速度の増加及び食欲不振を生じる。疾患の最終段階では貧血が観察され、最終的に死に至る。ウマでは*Babesia equi* (*Theileria equi*と改名) も主要病原体である。

【0017】

当然のことながら、これらの寄生虫に対する種々の防除方法が多年来研究されている。

【0018】

寄生虫感染防除経路の1つは医薬成分の使用であり、例えば現在家禽コクシジウム症の治療に非常に一般的な治療剤である抗コクシジウム剤の長期使用が挙げられる。別の経路は間違いなくワクチン接種である。特に抗生物質の使用を嫌う傾向が高まっていることから、新規で有効なワクチン、特に広範な防御を提供するワクチンが必要とされていることは明白である。

【0019】

現在、寄生虫感染に対するワクチン接種には弱毒生ワクチンと不活化（死滅）ワクチンの2種の異なるアプローチが使用されている。どちらのアプローチにも以下に要約するように利点と欠点がある。

【0020】

弱毒ワクチンの主要な利点は自然感染に非常によく似ているという点であり、免疫系の全段階を活性化し、体液性IgGと局所IgAを誘導することができ、多数の防御抗原に対して免疫応答を誘導し、より長期間の免疫を提供し、交差反応性が高い。更に、低コストで殆どの場合に迅速な免疫が得られる。

【0021】

弱毒ワクチンの欠点は正しい弱毒レベルを見いだすのが困難であり、病原性復帰の可能性があり（これらは重大な欠点である）、被接種者から接触感染し、免疫不全のヒト及び

10

20

30

40

50

動物では問題がある。

【0022】

不活化ワクチンの利点はブースター投与するならば十分な体液性免疫が得られ、突然変異又は復帰突然変異を示さず（大きな利点）、免疫不全患者でも使用することができ、原則として安全である点である。

【0023】

不活化ワクチンの欠点は（細胞性）免疫を誘発しないことが多く、ブースターが必要であり、局所免疫が得られず（重要）、高価であり、不活化が100%未満の場合には使用が危険であるという点である。

【0024】

しかし、寄生虫に対するワクチンの開発は寄生虫自体が複雑であるという理由にせよ、他の微生物に比較して複雑である。更に、種々の寄生虫はアピコンプレックス門内やトリパノソーマ科内であっても、近縁であるにも拘わらずその遺伝子構成に十分な類似性がないため、これらの全寄生虫に等しく適用可能な共通の弱毒部位又は不活化方法を割り当てることができない。更に、弱毒生ワクチンを製造するには全寄生虫に適切な弱毒ターゲットを配置する必要がある。死滅ワクチンを製造するには全寄生虫についてどの抗原を不活化方法により改変せずにおくべきかを知る必要がある。更に、多くの不活化寄生虫ワクチンは従来有効ではないことが示されている。最後に、感染経路、宿主、宿主内の宿主細胞が多種多様であり、大半の寄生虫に特徴的な生活環の期間で宿主が異なることも多く、更には寄生虫毎に生活環が異なる場合もある。この点もワクチンの開発を困難にしている。

10

20

30

40

50

【0025】

従って、寄生虫感染防除用ワクチンの開発は従来困難であり、時間がかかり、あまり成功していない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

本発明の目的はアピコンプレックス門とトリパノソーマ科の寄生虫に起因する感染の防除用ワクチンとして、死滅ワクチンと弱毒生ワクチンの利点の殆どを兼備すると共にこれらのワクチンの欠点をほぼ完全に解消したワクチンを提供することである。更に、このようなワクチンの製造方法はアピコンプレックス門とトリパノソーマ科の寄生虫に広く適用可能である。

【課題を解決するための手段】

【0027】

アピコンプレックス門とトリパノソーマ科の全寄生虫の生活環には、所定段階が宿主の細胞に感染して分裂を開始する少なくとも1時点が存在する。この感染時点又はその付近でリボソーム合成を停止できるならば寄生虫は宿主細胞に侵入せず、既存リボソームプロールを使用して数回分裂することにより自然感染と完全に同様になることが今回意外にも判明した。しかし、最終的に数回分裂後に子孫寄生虫はリボソームの欠乏により死滅する。

【0028】

これは毒性感染が生じたかのように感染後の免疫応答の誘導が最も自然な方法で誘発されるが、天然状態とは異なり、寄生虫は所定時間後に不可避的に消滅するという利点がある。この目的はリボソーム蛋白質遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におくことにより達成された。

【0029】

誘導性プロモーターは故意にオン・オフ転換することができるプロモーターである。このようなプロモーターの例は後段に挙げる。

【0030】

安定な完全に機能的なリボソームの合成には原則として全リボソーム蛋白質が必要であるので、原則として各リボソーム蛋白質遺伝子をターゲットとして使用することができる。アピコンプレックス門とトリパノソーマ科の全寄生虫は細胞質リボソームをもち、その

殆どはプラスチドリボソーム及び／又はミトコンドリアリボソームをもつ。これらはいずれも寄生虫の正常な発生に必要である。従って、本発明の生きた弱毒寄生虫は、リボソーム蛋白質遺伝子がプラスチド、ミトコンドリア又は細胞質リボソームのいずれに組込むリボソーム蛋白質をコードするかに関係なく、リボソーム蛋白質遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におくことにより獲得することができる。

【0031】

リボソーム蛋白質配列は種々の寄生虫間で高度に保存されている。従って、アピコンプレックス門とトリパノソーマ科の寄生虫の各々で類似のリボソーム蛋白質を検出するためには以下に示すリボソーム配列のDNAプローブを使用することができる。更に、NCBI蛋白質データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)には多種多様の寄生虫の多数のリボソーム蛋白質遺伝子の配列が掲載されている。10

【0032】

1個のリボソーム蛋白質が欠失するだけで安定なりボソームの形成が妨げられるという事実は種々の植物、動物及び微生物で立証されている。1例を挙げると、ショウジョウバエでは80個のリボソーム蛋白質のうちの一部の突然変異の結果として例えば細く短い剛毛、遅い成長、ヘテロ接合体における雌準不妊及びホモ接合致死性等の典型的表現型となることが示されている。この表現型はMinute表現型と呼ばれ、例えばリボソーム蛋白質S13及びL9の突然変異で観察されている(Schmidt, A., Holmann, M., Schaefer, U., Mol. Gen. Genet. 251: 381-387 (1996), Saebroe-Larsen & S., Lambertsson, A., Genetics 143: 877-885 (1996))。別の例は酵母リボソーム蛋白質S3をコードする酵母のリボソーム蛋白質遺伝子YS3である。その分裂の結果、*Saccharomyces cerevisiae*の非生存性半数体胞子を生じる(Finken-Eigen, M., Domdey, H., Kohrer, K., Biochemical and Biophysical research communications 223, 397-403 (1996))。これらの研究は、單一リボソーム蛋白質をダウンレギュレートするだけでリボソーム複合体の形成及び／又は適正な機能が妨げられることを立証している。20

【0033】

リボソーム蛋白質遺伝子の転写制御のために本発明の寄生虫で使用するプロモーターはただ1つの前提条件を満足するだけでよい。即ち、寄生虫の増殖中はプロモーターをオンにしなければならない。これは当然のことながら正常増殖に必要な天然量のリボソームを本発明の寄生虫に与えるために必要である。他方、寄生虫をワクチンとして受容するレシピエント宿主ではプロモーターをオフ転換しなければならない。プロモーターは制御下の遺伝子の転写を開始する場合にオン転換されるとみなされる。本発明では、この遺伝子はリボソーム蛋白質遺伝子である。プロモーターは制御下の遺伝子の転写がオン状態の少なくとも2分の1となる場合にオフ転換されるとみなされる。転写レベルは少なくとも3分の1が好ましく、4分の1がより好ましく、5分の1が更に好ましく、6分の1又は7分の1が更に好ましい。転写の完全な阻害は必要ないことに留意すべきである。低レベルのリボソーム蛋白質転写の結果、寄生虫が消滅するまでの寿命が最終的に延びる。従って、多少長期間にわたって免疫系が活性化される。30

【0034】

原則として2つの異なる可能性があり、プロモーターはプロモーターをオフ転換する所定条件が適用されない限りオンであるか、又はプロモーターはプロモーターをオン転換する所定条件が適用されない限りオフである。40

【0035】

プロモーターは寄生虫をワクチンとして受容するレシピエント宿主に存在しない所定条件が適用されない限り、オフ転換状態であることが好ましい。

【0036】

必要に応じて2個以上のリボソーム蛋白質遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におく50

ことができる。これはプロモーターで使用する誘導性プロモーターを十分にオフ転換できない場合、例えば誘導性プロモーターがリーキープロモーターである場合や、1個の特定リボソーム蛋白質の欠失ではリボソームを脱安定化するのに不十分であるという例外的な場合に好ましい選択である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

以下、例を挙げて本発明を説明する。

【0038】

Toxoplasma gondii はネコを最終宿主とし、草食動物及び雑食動物と肉食動物を夫々順次中間宿主とする。トキソプラズマの場合には、寄生虫のオーシスト／組織囊胞段階が最終的にヒトに感染する。ヒト及び温血動物がワクチン接種のターゲット哺乳動物であるので、生きた弱毒寄生虫を必要とする寄生虫段階はトキソプラズマタキゾイトである。従って、本発明によりリボソーム蛋白質遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におく寄生虫段階はタキゾイトである。こうして作製した組換え寄生虫（生きた弱毒寄生虫とも言う）はプロモーターをオン転換する条件下で従来通りに増殖させることができる。このような状態では、リボソーム数は天然状態と同一であるか又は近似する。ワクチン目的に十分な寄生虫が増殖したならば、生きた弱毒寄生虫を回収し、ワクチンとして投与する。ワクチン接種する宿主には、プロモーターをオン転換する条件は存在しないので、プロモーターはオフ転換状態のまま維持される。リボソームプールは天然状態と同様であるのでワクチン接種時に寄生虫は野生型寄生虫として挙動する。従って、宿主の感染及び侵入プロセスは自然感染プロセスと全く同様である。寄生虫は宿主で分裂を開始するや否や、リボソームプールもその子孫に分配する。しかし、リボソーム蛋白質遺伝子の（少なくとも）1個のプロモーターは宿主細胞ではオフ転換位置にあるので、リボソームの *d e n o v o* 合成は低下するか又は全く生じない。従って、子孫はゆっくりと消滅する。他方、感染プロセス、従って免疫系の誘発は野生型寄生虫感染の場合と同様に継続している。従って、毒性野生型寄生虫感染が生じたかのように最終的に免疫は増進するが、免疫の誘導に使用される生きた弱毒寄生虫は1又は数回感染後に消滅する。以下、例を挙げて更に詳細に説明する。

【0039】

Neospora caninum の生活環はネオスポラがイヌを最終宿主とし、例えばウシ、イヌ、ヒツジ及びウマの流産の原因となる点を除いてトキソプラズマと同様である。従って、ネオスポラワクチンのアプローチは上記トキソプラズマワクチンのアプローチと密接な関係がある。トキソプラズマでは、本発明によりリボソーム蛋白質遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におく寄生虫段階はタキゾイトである。ネオスポラの分子遺伝学ツールの開発は例えば *Howe, D. K. and Sibley, L. D.* METHODS : 13 (2) : 123 - 33 (1997) に記載されている。

【0040】

生きた弱毒アイメリカ寄生虫を作製するためには、本発明によりリボソーム蛋白質遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におく寄生虫段階はメロゾイトである。しかし、この場合には、ワクチンにはメロゾイトではなく胞子形成オーシストを加える。これは、この寄生虫がニワトリにより通常摂取される形態が胞子形成オーシストであるためである。しかし、本発明により作製した初代組換えメロゾイトを複製させるには、ニワトリの消化管に導入すれば十分である。その後、ニワトリにより排泄される組換えオーシストを単離し、コクシジウム症ワクチン、例えば飲料水投与用経口ワクチンで生きた弱毒寄生虫として直接使用することができる。ニワトリ糞からのオーシストの単離は当分野で周知の標準方法である。アイメリカの遺伝子組換えは例えば *Kelleher, M. and Tomley, F. M.* (Mol. Biochem. Parasitol. 97 (1 - 2) : 21 - 31 (1998)) により記載されている。

【0041】

本発明の弱毒生マラリアワクチンは例えばプラスモジウム寄生虫の赤血球期であるプラ

10

20

30

40

50

スマジウム組換えスポロゾイトから出発して作製することができる。スポロゾイトは雌蚊により(ヒト)血流中に注入される寄生虫の段階である。スポロゾイトは注入後2分以内に肝臓に感染し、シゾントとメロゾイトを生成する。メロゾイトは赤血球に感染して複製する。この時点でリボソームプールを多数の子孫寄生虫に分配しなければならず、この時点で子孫寄生虫は消滅する。この時点で既に完全免疫防御系が完全に誘発される。この例からも本発明の組換え寄生虫をベースとするワクチンの利点は明らかであり、生ワクチンの全利点と不活化ワクチンの利点を兼備している。ワクチン接種は組換え赤血球期プラスモジウム寄生虫又は(あまり実用的ではないが)組換えスポロゾイトで実施することが好ましい。プラスモジウムの組換えDNA技術は例えばC r a b b , B . S . ら , (M o l . B i o c h e m . P a r a s i t o l . 9 0 : 1 3 1 - 1 4 4 (1 9 9 7))とW u , Y . ら , (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 9 3 : 1 1 3 0 - 1 1 3 4 (1 9 9 6) , 及びP r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 9 2 : 9 7 3 - 9 7 7 (1 9 9 5))により記載されている。
10

【0042】

本発明の弱毒生タイレリアワクチンも組換えメロゾイトをベースにすることができる。これらのメロゾイトはリンパ球で増殖維持することができる。メロゾイトはリンパ球でリンパ球の分裂と同調して分裂を開始するが、少数の遊離子孫寄生虫は他のリンパ球に感染し、野生型様免疫を誘導するが、他の例と同様にリボソームの欠乏がゆっくりと増すので最終的に子孫は消滅する。タイレリアは主にリンパ細胞で増殖培養することができる。例えばS h k a p V . ら , V e t . P a r a s i t o l . 6 5 : 1 1 - 2 0 (1 9 9 6) 20とH u l l i g e r , L . J . P r o t o z o o l . 1 2 : 6 4 9 - 6 5 5 (1 9 6 5) 参照。

【0043】

弱毒生バベシアワクチンはメロゾイト及び/又はトロフォゾイトを組換えに使用して作製することができる。これらは赤血球で培養することができる。アプローチ全体はタイレリアについて上述したアプローチと同様である。例えばL e v y , M . G a n d R i s t i c , M . S c i e n c e 2 0 7 : 1 2 1 8 - 1 2 2 0 (1 9 8 0) 参照。

【0044】

S . s u i h o m i n i s やS . n e u r o n a 等のサルコシスティス種では、スポロゾイトとメロゾイトの両者が本発明の組換えのターゲットである。この場合も原理は同様であり、組換えスポロゾイトから組換えメロゾイトが得られ、これらのメロゾイトはd e n o v o リボソーム蛋白質合成の不在下でリボソームの欠乏によりゆっくりと消滅する。組換えメロゾイトをワクチンで直接使用することができる。例えばM u r p h y , A . J . a n d M a n s f i e l d , L . S . J . P a r a s i t o l . 8 5 : 9 7 9 - 9 8 1 (1 9 9 9) 及びE l l i s o n , S . P . ら , V e t . P a r a s i t o l . 9 5 : 2 5 1 - 2 6 1 (2 0 0 1) 参照。
30

【0045】

キネtoplаст(K i n e t o p l a s t i d a) 目に関しては、T r y p a n o s o m a b r u c e i (W i r t z , E . a n d C l a y o n , C . , S c i e n c e 2 6 8 : 1 1 7 9 - 1 1 8 3 (1 9 9 5) 及びB i e b i n g e r , S . ら , M o l . & B i o c h e m . P a r a s i t o l . 8 5 : 9 9 - 1 1 2 (1 9 9 7)) 、 T r y p a n o s o m a c o n g o l e s e (I n o u e N . ら , M o l . & B i o c h e m . P a r a s i t o l . 1 2 0 : 3 0 9 - 3 1 3 (2 0 0 2)) 及びL e i s h m a n i a d o n o v a n i (Y a n , S . ら , M o l . & B i o c h e m . P a r a s i t o l . 1 1 2 : 6 1 - 6 9 (2 0 0 1)) についてテトラサイクリンの制御下の遺伝子発現が記載されており、リボソーム蛋白質遺伝子転写を制御するために次のように調節することができる。簡単に言えば、寄生虫のプロサイクリック形態がトランスフェクションのターゲットである。異種遺伝子(この場合には非リボソーム遺伝子)をテトラサイクリン依存的に制御できるようにテトラサイクリンリプレッサーをリボソームRNA反復配列の非転写スペーサーに組込む。キネtoplаст目の本発明の生きた弱毒寄生虫を構築す
40

るには、まず 1 個以上のテトラサイクリンオペレーターエレメントを含むプロモーターと共にリボソーム蛋白質遺伝子の付加コピーを挿入する。次に、内在遺伝子コピーを寄生虫ゲノムから欠失させる。これは相同組換えにより容易に実施することができ、組換え用マークの存在下に実施することが好ましい。これは下記アピコンプレックスの方法と同様である。リーシュマニアヒトリパノソーマの大半の遺伝子は同一 DNA 鎖で隣接遺伝子の大きな(> 100 ~ 500 kb) ポリシストロンクラスターとして構成されるため、リーシュマニアヒトリパノソーマでは内在リボソーム蛋白質遺伝子の直接ターゲティングは実施できない。即ち、1 個の遺伝子を阻害すると、下流に配置された全遺伝子の転写が阻害される (Myler, P. J. et al., Med. Microbiol. Immunol. 190: 9 - 12 (2001)).

10

【0046】

以上の例は実際に単に例示に過ぎない。これらの例により本発明の範囲を限定するものではない。アピコンプレックス門ヒトリパノソーマ科の全種寄生虫の例とその生活環は Encyclopaedic Reference of Parasitology, Heinz Mehlhorn, Springer Verlag (2001) (ISBN 3 - 540 - 66829 - 2) に記載されている。従って、当業者は上記例と Encyclopaedic Reference of Parasitology を使用してアピコンプレックス門ヒトリパノソーマ科の各寄生虫について本発明の生きた弱毒寄生虫を作製するための出発点としてどの段階が好ましい段階であるかを完全に決定することができる。

20

【0047】

上記科に属する寄生虫の多くは多種多様の宿主をもつ。単に 1 例を挙げると、イヌに感染する *B. canis*、ウマ、ラバ及びロバに感染する *B. caballi*、ウシ、野生反芻動物及びヒトに感染する *B. divergens* 等のバベシア種が挙げられる。しかし、いずれの場合にも寄生虫の生活環は同様である。従って、例えばバベシアに対する本発明のワクチンが組換えメロゾイトをベースにすることができるという上記記載は全バベシア種に当てはまる。ある科の種々の種の生活環に関する詳細も上記 Encyclopaedic Reference of Parasitology, Heinz Mehlhorn, Springer Verlag (2001) (ISBN 3 - 540 - 66829 - 2) に記載されている。

30

【0048】

従って、本発明の 1 態様は誘導性プロモーターの制御下にリボソーム蛋白質遺伝子を含むことを特徴とするアピコンプレックス門又はヒトリパノソーマ科の生きた弱毒寄生虫に関する。

【0049】

誘導性プロモーターの概念は上記に要約した通りである。誘導性プロモーターとは外部因子の作用下にオン・オフ転換することができるプロモーターである。このような転換因子は例えば熱等の物理的因子とすることができる、数十年来当分野で周知の多数の熱ショックプロモーターはいずれも熱により活性化される。このような因子は化学種でもよい。このような多くの因子も当分野で周知である。当分野で公知の誘導性プロモーターは枚挙にいとまがない。少数の例を以下に挙げる。IPTG 誘導性 Lac プロモーターは恐らく最も多用されている誘導性プロモーターの 1 種である。他の誘導性プロモーターシステムとしては例えばテトラサイクリンにより制御される転写活性化システム (Baron, U. et al., Oxford University Press 25: 2723 - 2729 (1995)) やエクジソン誘導性発現システム (Invitrogen) (Yao, T. P. et al., Cell 71: 63 - 72 (1992)) が挙げられる。

40

【0050】

原則として、ある条件の存在下にオン転換されるものと、ある条件の存在下にオフ転換されるものの 2 種の誘導性プロモーターが存在する。この条件は化学物質の存在でもよい。

50

【0051】

本発明のこの態様の好ましい1形態では、使用するプロモーターは宿主に天然では存在しない条件の存在下にオン転換される。このようなプロモーターを使用すると、寄生虫の天然宿主に投与するや否や自動的にオフ転換位置になる（又は転換する）という利点がある。従って、本発明の生きた弱毒寄生虫を複製させるためには「人工」条件下、即ち天然宿主には存在しない条件下で増殖させることが好ましい。

【0052】

好ましい型の誘導性プロモーターはオペレーター部位と前記オペレーター部位と可逆的に結合することが可能なリプレッサーをベースとする型の誘導性プロモーターである。この場合、リプレッサー蛋白質の結合と分離は上記のように適用される「条件」、即ち熱、化学物質等の有無により制御することができる。10

【0053】

本発明の生きた弱毒寄生虫で非常に有効に使用することができる誘導性プロモーター、又はより厳密にはプロモーター／オペレーター／リプレッサー複合体の非常に適切な例は t e t プロモーター / t e t オペレーター複合体（t e t R システムとも言う）である。

【0054】

t e t R システム自体は既に記載されており、T. brucei (Wirtzら, Science 268: 1179 - 1183 (1995)), Biebingerら (Mol. Biochem. Paras. 85: 99 - 112 (1997)) や Entamoeba histolytica (Hamannら, Mol. Biochem. Paras. 84: 83 - 91 (1997)) 等の多種多様の原虫寄生虫で機能することが立証されている。t e t R システムはミオシンAの発現を調節するためにトキソプラズマで使用するにも成功している (Meissner Mら, Nucleic Acids Res. 29 (22): E115 (2001))。更に、テトラサイクリンの制御下の発現も Giardia lamblia や Leishmania donovani で立証されており、原虫におけるその汎用性が示されている (Yan Sら, Mol. Biochem. Parasitol. 112 (1): 61 - 9 (2001), Sun, C. H. and Tai, Mol. Biochem. Parasitol. 105 (1): 51 - 60 (2000))。20

【0055】

この複合体は以下に簡単に記載し、実施例で更に詳細に説明するように作用する。30

【0056】

原則として、リボソーム蛋白質をテトラサイクリンの制御下に発現させるためには、1. テトラサイクリンリプレッサー (t e t R) 遺伝子の組込みと発現、及び2. 転写開始部位の近傍のリボソーム蛋白質遺伝子のプロモーターへの1個以上のテトラサイクリンオペレーター要素の組込みの2段階を実施する必要がある。

【0057】

t e t リプレッサー遺伝子は t e t オペレーター部位と結合して隣接遺伝子の転写を阻止することが可能な蛋白質をコードする遺伝子である。この遺伝子を構成的プロモーター（即ち組換え寄生虫で構成的なプロモーター）の制御下におき、組換えDNA技術を使用して寄生虫に導入する。こうして組換え寄生虫は t e t リプレッサー蛋白質を合成する。t e t オペレーターは STS の上流の1個以上のリボソーム蛋白質遺伝子の転写開始部位の近傍、好ましくは内在プロモーターに導入することが好ましい。従って、t e t リプレッサー蛋白質は t e t オペレーターと結合し、下流のリボソーム蛋白質遺伝子の転写を阻止する。他方、テトラサイクリンの存在下では、リプレッサーは t e t オペレーター部位から分離し、下流の遺伝子の転写を可能にする。従って、テトラサイクリンの存在下では、組換え寄生虫は天然状態と同様に複製することができる。上記例の寄生虫の大半を含む多くの寄生虫の場合のように組換え寄生虫を in vitro 増殖できる場合には、テトラサイクリンを容易に増殖培地に添加することができる。例えばアイメリカ寄生虫の場合のように天然宿主で寄生虫を増殖させる必要がある場合には、テトラサイクリンを宿主（4050

この場合にはニワトリ)に容易に経口又は注射により投与することができる。テトラサイクリンは細胞外及び細胞内寄生虫により取込まれることに留意すべきである。薬剤がリボソーム蛋白質の発現の調節に作用するために宿主細胞の細胞破壊は必要ない。

【0058】

ステップ1におけるテトラサイクリンリプレッサー遺伝子(tetR)の組込みと発現は上記文献に記載されているように実施することができる。テトラサイクリンリプレッサー遺伝子の安定な形質転換と場合により組込みを指示する適切な周知選択マーカーは例えばCAT遺伝子である(Kim, K.ら, Science 262(5135):911-4(1993))。安定なトランスフェクションの選択に適切な他のマーカーも当分野で公知であり、例えばDHFR-TS(Donald, R.G. and Roos, D.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90(24):11703-11707(1993), Roos, D.S.ら, METHODS 13:112-122(1997))やHXGprt(Donald, R.G.ら, J. Biol. Chem. 271:14010-14019(1996), Donald, R.G. and Roos, D.S., Mol. Biochem. Parasitol. 91(2):295-305(1998))が挙げられる。

【0059】

Cre-loxシステムも適切な選択システムである(例えばHardy, S.ら, Journ. Virol. 71:1842-1849(1997)参照)。

【0060】

tetRシステムを誘導性プロモーターシステムとして使用する場合には、リボソーム蛋白質遺伝子の上流のプロモーターは例えばtetオペレーターを転写開始部位の近傍にクローニングすることにより誘導可能な内在プロモーターとすることができます(tetオペレーター配列と好適挿入部位の詳細については下記参照)。言うまでもなく、リボソーム蛋白質遺伝子の十分に高い転写レベルを提供することが可能な他の任意プロモーターも適切である。

【0061】

別の誘導性プロモーターシステムを使用する場合には、このような誘導性プロモーターを使用して内在プロモーターを欠失させることは容易である。他方、tetオペレーターと同様の原理の別の調節エレメントを使用する場合には、プロモーター自体も内在プロモーターとすることができます。この場合にも言うまでもなく、下流にクローニングしたリボソーム蛋白質遺伝子の十分に高い転写レベルを提供することが可能な他の任意プロモーターも適切である。

【0062】

ステップ2においてSTSの近傍に1個以上のtetO部位(=tetオペレーター部位)を含むリボソーム蛋白質遺伝子で野生型リボソーム蛋白質遺伝子を置換するには選択リボソーム蛋白質遺伝子のプロモーターと遺伝子自体の間にtetオペレーター部位を挿入する必要がある。tetオペレーターはYan Sら(Mol. Biochem. Parasitol. 112(1):61-9(2001))、Wirtz, E. and Layon, C.(Science 268(5214):1179-83(1995))及びMeissner Mら(Nucleic Acids Res. 29(22):E115(2001))により記載されている。

【0063】

単一tetオペレーター(tetO)部位の配列は5'-TCCCTATCAGTGA TAGAGATC-3'である。

【0064】

原則として、選択リボソーム蛋白質遺伝子の手前に単一tetオペレーター部位を挿入すれば十分である。しかし、tetRシステムは全生物システムと同様に厳密に0%から100%活性まで誘導可能ではなく、またその逆も可能ではない。従って、高レベルの制御が必要な場合には、2個以上のオペレーター部位を挿入することが好みしい。

10

20

30

40

50

【0065】

tetオペレーターは下流遺伝子を転写するRNAポリメラーゼの結合を妨げる。従って、tetオペレーターは転写開始部位（本明細書ではSTSと言う）に対してヌクレオチド-100～+3の領域の所定位置に挿入することが好ましい。更に、このようなSTSの決定方法については実施例に詳しく説明する。

【0066】

1個以上のtetオペレーター部位を含む組換え遺伝子で野生型リボソーム蛋白質遺伝子を置換する段階は例えばDonald, R. G. and Roos, D. S. (Mol. Biochem. Parasitol. 91(2): 295 - 305 (1998))に記載されているヒットエンドランストラテジーを用いて実施することができる。

10

【0067】

当業者は陽性及び陰性選択マーカーの他の組み合わせを使用して代替方法を見いだすことができよう。例えばHSVチミジンキナーゼを陰性選択マーカーとして使用することができる。（Lebowitz, J. H. ら, Mol. Biochem. Parasitol. 51(2): 321 - 5 (1992), Fox, B. A. ら, Mol. Biochem. Parasitol. 116(1): 85 - 8 (2001)）。

【0068】

本発明の組換えトキソプラズマ寄生虫の構築に使用される分子ツールはネオスポラでも同様に良好に利用できる（Howe, D. K. and Sibley, L. D. M. E. T. H. O. D. S. 13(2): 123 - 133 (1997)）。

20

【0069】

アイメリカでも同一方法を適用することができる。単に1例として、E. tenellaで-D-ガラクトシダーゼを一過的に発現できることがKelleher, M. and Tomley, F. M. により報告されている（Mol. Biochem. Parasitol. 97(1-2): 21 - 31 (1998)）。

【0070】

タイレリアについては、例えば感染性単核Theileria annulataスポットを一過的にトランスフェクトする方法がAdamson, R. らにより開発されている（Mol. Biochem. Parasitol. 114(1): 53 - 61 (2001)）。

30

【0071】

プラスモジウムでは、ピリメタミン耐性を付与するように突然変異させたジヒドロ葉酸レダクターゼ-D-チミジル酸シンターゼ(dhfr-ts)コーディング配列、又はピュロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ、又はアスペルギルスのプラスチシジンSデアミナーゼ(BSD)遺伝子、又はトランスポゾンTn5由来ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII(Neo)遺伝子が選択マーカーとして記載されている（Wu, Y. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93(3): 1130 - 4 (1996), Wang, P. ら, Mol. Biochem. Parasitol. 123(1): 1 - 10 (2002), de Koning-Ward, T. F. ら(Mol. Biochem. Parasitol. 117(2): 155 - 60. (2001))）。

40

【0072】

バベシアでも同様の選択マーカーを利用できる。

【0073】

従って、当業者はアピコンプレックス(Apicomplexa)門とトリパノソーマ(Trypanosomatidae)科に属する全範囲の寄生虫に本発明を適用することができよう。

【0074】

この態様の好ましい1形態はコクシジウム(Coccidiida)、ピロプラズマ(Piroplasmida)又は住血胞子虫(Haemosporida)に属する本発明の生きた弱毒寄生虫に関する。

50

【 0 0 7 5 】

この態様のより好ましい1形態では、生きた弱毒寄生虫はアイメリア (*Eimeriidae*) 科、クリプトスパリジウム (*Cryptosporidium*) 属又はサルコシスティス (*Sarcocystidae*) 科に属する。

【 0 0 7 6 】

この態様の更に好ましい1形態では、生きた弱毒寄生虫はアイメリア (*Eimeria*) 属、クリプトスパリジウム (*Cryptosporidium*) 属、トキソプラズマ (*Toxoplasma*) 属、サルコシスティス (*Sarcocystis*) 属又はネオスpora (*Neospora*) 属に属する。

【 0 0 7 7 】

この態様の別のより好ましい形態では、生きた弱毒寄生虫はバベシア (*Babesia*) 属又はタイレリア (*Theileriidae*) 科に属する。

【 0 0 7 8 】

この態様の更に好ましい1形態では、生きた弱毒寄生虫はバベシア (*Babesia*) 属又はタイレリア (*Theileria*) 属に属する。

【 0 0 7 9 】

この態様の別のより好ましい形態では、生きた弱毒寄生虫はプラスモジウム (*Plasmodium*) 属に属する。

【 0 0 8 0 】

この態様の更に別により好ましい形態では、生きた弱毒寄生虫はトリパンソーマ (*Trypanosoma*) 属又はリーシュマニア (*Leishmania*) 属に属する。

【 0 0 8 1 】

更に好ましい1形態では、弱毒寄生虫は *Leishmania mexicana*、*L. infantum* もしくは *L. major* 種又は *Trypanosoma brucei* もしくは *T. cruzi* 種に属する。

【 0 0 8 2 】

この態様の別の好ましい1形態では、本発明の生きた弱毒寄生虫のリボソーム蛋白質遺伝子を抗生物質により誘導可能な誘導性プロモーターの制御下におく。

【 0 0 8 3 】

これらの抗生物質はテトラサイクリン又は無水テトラサイクリン、又はその誘導体がより好ましい。

【 0 0 8 4 】

この態様の別の好ましい形態では、選択リボソーム蛋白質遺伝子は *L 9*、*S 3*、プラスチド - *S 9* 又は *S 13*、好ましくは *Toxoplasma gondii* の *L 9*、*S 3*、プラスチド - *S 9* 又は *S 13* をコードする遺伝子である。

【 0 0 8 5 】

ラージサブユニットリボソーム蛋白質番号 9 (*L 9*) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列と、プロモーター領域を含む上流配列を配列番号 1 に示す。

【 0 0 8 6 】

【表1】

領域	1	2296	プロモーター	プロモーター領域
領域	2297	2461	e	エクソン1
領域	2416	2418	atg	ATG開始コドン
遺伝子	2416	4831	cds	コーディング配列
領域	2462	3838	i	イントロン1
領域	3839	4260	e	エクソン2
領域	4261	4727	i	イントロン2
領域	4728	4834	e	エクソン3
領域	4829	4831	stop	TAA停止コドン

10

20

30

【0087】

プラスチドスモールサブユニットリボソーム蛋白質番号9(S9)をコードする遺伝子のヌクレオチド配列と、プロモーター領域を含む上流配列を配列番号2に示す。

【0088】

【表2】

領域	1	3076	プロモーター	プロモーター領域
領域	3077	3616	e	エクソン1
領域	3156	3158	atg	ATG開始コドン
遺伝子	3156	4325	cds	コーディング配列
領域	3617	3874	i	イントロン1
領域	3875	4034	e	エクソン2
領域	4035	4130	i	イントロン2
領域	4131	4338	e	エクソン3
領域	4323	4325	stop	TAA停止コドン
領域	4326	4338	3'utr	3'UTR

【0089】

スモールサブユニットリボソーム蛋白質番号13(S13)をコードする遺伝子のヌクレオチド配列と、プロモーター領域を含む上流配列を配列番号3に示す。

【0090】

【表3】

領域	1	1289	プロモーター	プロモーター領域
領域	1290	1594	e	エクソン1
領域	1448	1450	atg	ATG開始コドン
遺伝子	1448	3639	cds	コーディング配列
領域	1595	2527	i	イントロン1
領域	2528	2615	e	エクソン2
領域	2616	3489	i	イントロン2
領域	3490	3639	e	エクソン3

40

50

【0091】

スモールサブユニットリボソーム蛋白質番号3(S3)をコードする遺伝子のヌクレオチド配列と、プロモーター領域を含む上流配列を配列番号4に示す。

【0092】

【表4】

領域	1	1177	プロモーター	プロモーター領域
領域	1178	1308	e	エクソン1
領域	1291	1293	atg	ATG 開始コドン
遺伝子	1291	2651	cds	コーディング配列
領域	1309	1752	i	イントロン1
領域	1753	2137	e	エクソン2
領域	2138	2249	i	イントロン2
領域	2250	2389	e	エクソン3
領域	2390	2486	i	イントロン3
遺伝子	2487	2748	e	エクソン4
領域	2649	2651	stop	TAA 停止コドン
領域	2652	2748	3'utr	3'UTR

10

20

本発明の生きた弱毒寄生虫はワクチンで使用するのに非常に適している。これは、上記に詳細に説明したように、弱毒生ワクチンと不活化ワクチンの利点を兼備し、欠点を解消したためである。従って、本発明の別の態様はワクチンで使用するための本発明の生きた弱毒寄生虫に関する。

【0093】

本発明の更に別の態様は、本発明の生きた弱毒寄生虫と医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する寄生虫感染防除用ワクチンに関する。

【0094】

医薬的に許容可能なキャリヤーは例えば滅菌水又は滅菌生理食塩水とすることができます。より複雑な形態では、キャリヤーは例えば当分野で周知の緩衝液(例えばPBS)とすることができる。

30

【0095】

本発明のワクチンは好ましい形態では更に免疫刺激物質(所謂アジュバント)を添加することができる。アジュバントは一般に非特異的に宿主の免疫応答を刺激する物質を含む。多種多様のアジュバントが当分野で公知である。ウシワクチンで多用されているアジュバントの例はムラミルジペプチド、リポ多糖、数種のグルカン及びグリカン並びにCarbopol(登録商標)(ホモポリマー)である。

【0096】

ワクチンは更に所謂「ビーグル」を加えることができる。ビーグルは蛋白質が共有結合せずに接着する化合物である。このようなビーグルは例えば脂質小胞、ISCOM(登録商標)、デンドロマー、ニオソーム、微粒子、特にキトサン系微粒子、多糖マトリックス等、バイオマイクロカプセル、アルギン酸マイクロカプセル、リポソーム及びマクロゾルであり、いずれも当分野で公知である。ワクチンビーグルとしては特に経口ワクチン接種用微粒子、より具体的にはキトサンをベースとする微粒子が非常に適切である。

40

【0097】

抗原をビーグルに部分的に埋込んだこのようなビーグルの特殊形が所謂ISCOM(EPI 109.942, EP 180.564, EP 242.380)である。

【0098】

更に、ワクチンは1種以上の適切な表面活性化合物又は乳化剤(例えばSpan(登録

50

商標)又はT w e e n(登録商標)を添加することができる。更に、1種以上の免疫刺激剤(例えばインターフェロン等のサイトカイン)もワクチンに添加することができる。

【0099】

上記生きた弱毒組換え寄生虫をベースとするワクチンは感染中に自己増殖するので不活性寄生虫に比較して比較的少量を投与することができる。従って、非常に適切な量は寄生虫 $10^2 \sim 10^7$ 匹/用量である。 10^2 匹/用量未満の量ではワクチン接種した全動物に必ずしも十分なレベルの防御を保証できない。 $10^7 \sim 10^8$ 匹/用量でもよいが、経済的観点だけから考えるとあまり実用的ではない。

【0100】

本発明の更に別の態様はアピコンプレックス門又はトリパノソーマ科の寄生虫に起因する感染の防除用ワクチンの製造における本発明の生きた弱毒寄生虫の使用に関する。 10

【0101】

本発明の更に別の態様は本発明の生きた弱毒寄生虫と医薬的に許容可能なキャリヤーを混合する段階を含む本発明のワクチンの製造方法に関する。

【0102】

本発明のワクチンは例えば皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は粘膜表面(例えば経口又は鼻腔内)投与することができる。

【0103】

t e t リプレッサー遺伝子は原核起源の遺伝子である。従って、この遺伝子のコドン使用は本発明の生きた弱毒寄生虫等の真核生物では次善の選択である。従って、当業者は真核細胞のコドン使用に対応するようにt e t リプレッサー遺伝子のコーディング配列を改変し、合成t e t リプレッサー遺伝子を得ようと考えるであろう。これはMeissner Mら(Nucleic Acids Res. 29(22): E115(2001))により実施されている。当然のことながら、この合成t e t リプレッサー遺伝子は既に真核細胞に完全に適応しているのでそれ以上最適化できないと予想される。更に、この「合成」t e t リプレッサー蛋白質は真核細胞で最適なリプレッサー蛋白質であると予想される。この蛋白質は原則として天然蛋白質と同一蛋白質であるので、t e t オペレーター部位との相互作用に最適であると定義されている。 20

【0104】

しかし、天然即ち原核t e t リプレッサーのN末端部分に融合した異種遺伝子(の部分)を含む組換え遺伝子によりコードされる融合蛋白質が完全に真核生物に適応する「合成」t e t リプレッサー遺伝子によりコードされるt e t リプレッサー蛋白質よりも著しく良好にt e t オペレーターを調節できることが今回意外にも発見された。 30

【0105】

従って、このような融合蛋白質は本発明の生きた弱毒寄生虫で使用する選択肢の一つのリプレッサー蛋白質である。t e t リプレッサー蛋白質の3D構造研究によると、N末端融合はDNA結合を妨げると予想されていたのでこれは全く予想外の発見であった。意外にも実際にはそうでなかったのである。

【0106】

異種遺伝子はt e t リプレッサー蛋白質以外の蛋白質をコードする任意遺伝子である。異種蛋白質はt e t リプレッサー蛋白質以外の任意蛋白質である。組換え遺伝子はt e t リプレッサー蛋白質のN末端をコードするt e t リプレッサー遺伝子の側に融合した異種遺伝子(の部分)を含む任意人工遺伝子である。 40

【0107】

融合蛋白質はt e t オペレーターと相互作用するために核に到達できなければならない。従って、t e t リプレッサー融合蛋白質は多数の前提条件を満たす必要があり、モノマー-t e t リプレッサー融合蛋白質の最終分子量は<60kDでなければならず、融合蛋白質の異種部分はt e t リプレッサー蛋白質のN末端側になければならず、融合蛋白質はGPIアンカー、分泌/排泄シグナル及び膜貫通領域を欠損していなければならない。原則として、これらの前提条件を満たし、(その結果として)核にターゲティングすることが 50

可能な全蛋白質又はその部分を t e t リプレッサー蛋白質との N 末端融合に使用することができる。

【 0 1 0 8 】

融合には全長異種蛋白質を使用する必要はない。このような異種蛋白質の一部を使用すれば十分である。一部とは異種融合蛋白質として少なくとも 10 アミノ酸、好ましくは少なくとも 20 アミノ酸のフラグメントとみなされる。この部分は異種蛋白質の N 末端側に由来するものが好ましい。選択異種蛋白質は例えば緑色、赤色及び黄色蛍光蛋白質や C A T 蛋白質である。

【 0 1 0 9 】

従って、本発明の別の態様は t e t リプレッサー蛋白質と、 t e t リプレッサー蛋白質の N 末端側に融合した異種蛋白質又はその一部を含むことを特徴とする t e t リプレッサー融合蛋白質をコードする D N A フラグメントに関し、融合蛋白質のモノマー形態が < 60 k D のサイズであり、融合蛋白質は G P I アンカー、分泌 / 排泄シグナル及び膜貫通領域をもたない。

【 0 1 1 0 】

本発明の更に別の態様は t e t リプレッサー蛋白質と、 t e t リプレッサー蛋白質の N 末端側に融合した異種蛋白質又はその一部を含むことを特徴とする t e t リプレッサー融合蛋白質自体に関し、融合蛋白質のモノマー形態が < 60 k D のサイズであり、融合蛋白質は G P I アンカー、分泌 / 排泄シグナル及び膜貫通領域をもたない。

【 0 1 1 1 】

「膜貫通領域」なる用語における膜とは細胞の細胞質と外界の間に位置する膜である。これらの膜は特に核と細胞質の間の膜を除外する。本発明の t e t リプレッサー融合蛋白質は融合蛋白質を核に特異的に誘導する所定シグナルをもつことが好ましい。これは当然のことながら、 t e t リプレッサー融合蛋白質は（天然 t e t リプレッサー遺伝子に要求されるように）その制御下の遺伝子の転写を制御できるようになるためには核に侵入しなければならないからである。

【 0 1 1 2 】

その汎用性により、 t e t R システムと t e t リプレッサー融合蛋白質の組み合わせは本発明の生きた弱毒寄生虫のみならず、当然のことながら他の寄生虫や、他の真核細胞及び生物でも使用することができる。この組み合わせは任意遺伝子の発現を制御するために真核細胞で広く適用可能である。

【 0 1 1 3 】

従って、本発明の生きた弱毒寄生虫は t e t オペレーターと上記 t e t リプレッサー融合蛋白質（をコードする遺伝情報）を併有する場合にワクチンの基盤として更に適切である。その結果、リボソーム遺伝子の転写を更に良好に阻害及び誘導することができる。

【 0 1 1 4 】

従って、より好ましい 1 形態では、テトラサイクリン、無水テトラサイクリン又はその誘導体により遺伝子の誘導が制御される本発明の生きた弱毒寄生虫は t e t オペレーターと上記 t e t リプレッサー融合蛋白質をコードする遺伝情報を含む。

【 0 1 1 5 】

下記実施例に示すように、上記のような t e t リプレッサー融合蛋白質の予想外の特徴は 2 個以上の t e t オペレーター部位をタンデムクローニングした場合に一層顕著になる。「タンデム」なる用語は t e t オペレーター部位を直接相互に隣接させてクローニングしてもよいし、2 個以上の t e t オペレーター部位の間にスペーサー配列を挟んでクローニングしてもよいという意味で広義に解釈すべきである。上述のように、 t e t オペレーター部位は S T S に対して - 1 0 0 ~ + 3 の領域にクローニングすることが好ましい。

【 0 1 1 6 】

従って、より好ましい形態では、本発明の生きた弱毒寄生虫は t e t R システムと上記のような t e t リプレッサー融合蛋白質に加え、1 個でなく 2 個以上の t e t オペレーター部位を含む。

10

20

30

40

50

【実施例1】

【0 1 1 7】

実験中に使用したプライマー：
挿入した制限部位を下線で示す。

【0 1 1 8】

【表5】

配列番号:	#	名称	配列 5' → 3'	
5	1	SAG3-FW	CGATAAGCTTCGAATCTCTGAACGGATGTGT	10
6	2	TUB5-RV	CG <u>AGATCT</u> GGGAATTCAAGAAAAAATGCCAACG	
7	3	TETAVR5-FW	CGAT <u>CCTAGG</u> ATGTCTAGATTAGATAAAAG	
8	4	TETPST3-RV	CGT <u>CTGCAG</u> TTAAGACCCACTTCACATTTAAG	
9	5	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGAA	
10	6	SAG1/1634-RV	CGATA <u>AGCTTC</u> GGGGGGCAAGAATTGTGT	
11	7	REV 13A	GCGCCCCATGGTGACGGAGAAAAATCG	
12	8	REV 13B (ネステッド プライマー)	GGGAACCGCAAGGTGGGAGCGGGAGAAC	20
13	9	S13PROMFUS FW	GCATA <u>AGCTT</u> CCTCGCAGAGATTGTCAGTG	
14	10	S13PROMFUS RV	GCAT <u>TCTAGAGG</u> CAGACATGCCCTTCAGG	
15	11	LACZ-AVR II FW	CGAT <u>CCTAGG</u> ATGACCATGATTACGGATTCACT	
16	12	LACZ-PSTI RV	CGAT <u>CTGCAG</u> TTATTTTGACACCAGACCAA	
17	13	S13INSTETO+3FW	GGTTCTCCCCTCAATCCCTATCAGTGATAGAGATCTC TCTTCCTTCTCT	
18	14	S13INSTETO+3RV	AGAGAAAGGAAGAGAGATCTCTATCACTGATAGGGAT TGAGGGGAGAAC	30
19	15	S13SUBTETO-23FW	CTACGCGCCGACGGTCCCTATCAGTGATAGAGATCT TCCTCGACGGGTTC	
20	16	S13SUBTETO-23RV	GAACCCGTCGAGGAAGAGATCTCTATCACTGATAGGGAC CGTCGGCCCGTAG	
21		S13NOTI-FW	CGAT <u>GC</u> GGCCCGCGTCAGTGCATGACACAACCG	
22		S13SACI-RV	GCTA <u>GAGCT</u> CTGTAAAGTCGCCAGAGAAC	40
23		M13-REV	AACAGCTATGACCATGATTACGC	
24		S13CL FW3	CGATAGTGTGCAATAACAGG	

25 HRCHECK II S13-
 FW GTCGAGTCCTGTAGGTTCATC
 26 HRCHECK II S13-RV CTCCGAAGGAGTCTCTCAGTG
 27 T7 AATACGACTCACTATAG
 28 HXGPRT/BGLII-FW CGATAGATCTAAAATGGCGTCAAACCCATTG
 29 HXGPRT/PSTI-RV CGATCTGCAGTTACTTCTCGAACTTTTGCG

10

【0119】

Tub YFP/TR-sagCAT (9332 bp) の構築。

【0120】

プラスミド p tub YFP/TR-sagCAT を以下のように段階的に構築した。まず、プライマー-SAG3FW (#1, 配列番号5) 及びTUB5RV (#2, 配列番号6) を使用して p tub YFP/YFP-sagCAT 構築物 (Llopis, J.ら, PNAS 97(8):4363-4368 (2000)) から Toxoplasma gondii チューブリンA (tub) プロモーターを増幅することにより構築物 p tub CAT/GFP を作製した。PCR産物とプラスミド pdhfrCAT/GFP (Strikepen, B.ら, Molecular and Biochemical Parasitology 92:325-338 (1998)) を HindIII と BglII で消化し、相互にライゲーションした。こうして dhfr プロモーターを tub プロモーターで置換した p tub CAT/GFP を得た。得られたプラスミドは Bluescript pKS+ (登録商標) (Stratagene, La Jolla, CA) をベースとし、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をコードする配列と緑色蛍光蛋白質をコードする配列の融合体から BglII 部位により分離された - チューブリンプロモーターを含む。

【0121】

p tub YFP/TR 構築物を得るために、CATをコードする配列を黄色蛍光蛋白質 (YFP) で置換し、GFPをコードする配列を tetリプレッサー コーディング配列 (tetR) で置換した。YFP遺伝子は p tub YFP/YFP-sagCAT 構築物から BglII と AvrII で切り出し、p tub CAT/GFP 構築物の BglII-AvrII 部位間にライゲーションし、CATをコードする配列に置換した。tetR コーディング配列はプライマー-TETAVR5-FW (#3, 配列番号7) 及び TETPST3-RV (#4, 配列番号8) を使用して大腸菌Tn10 (Hilleen, W. and Berens, C., Annals. Rev. Microbiology. 48:345-369 (1994)) から PCR 増幅し、AvrII と PstI で消化し、GFPコーディング配列を tetR コーディング配列で置換することにより構築物にライゲーションした。得られたプラスミドを p tub YFP/TR と命名した。

【0122】

最後に、CAT選択カセットを tub プロモーターの上流に挿入し、p tub YFP/TR-sagCAT プラスミドを得た。これはプライマー-T3 (#5, 配列番号9) 及び SAG1/1634RV (#6, 配列番号10) を使用して上記 p tub YFP/YFP-sagCAT 構築物から CAT カセットを増幅することにより実施し、HindIII で消化し、p tub YFP/TR 構築物のユニーク HindIII 部位にライゲーションした。

【0123】

Tub YFP/TR-sagCAT の構築とその完全配列を図1に示す。

【実施例2】

【0124】

20

30

40

50

Toxoplasma gondiiのリボソーム蛋白質遺伝子S13の転写開始部位の決定

リボソーム蛋白質遺伝子S13の転写開始部位を決定するために、ベロ細胞で増殖させたToxoplasma gondii RH HXGprtタキゾイトからRNAを単離した。GeneRacer(登録商標)キット(Invitrogen)を使用して全RNAから遺伝子特異的全長cDNAを得た。このキットを使用してRNAオリゴを全長mRNAの両末端にライゲーションした。オリゴdTによる逆転写を実施した後に、RNAオリゴと結合するGeneRacerプライマーを遺伝子特異的プライマーと併用してPCR增幅し、産物を得た。その後、転写開始部位(STS)を決定することができた。これはプライマーREV13A(#7, 配列番号11)及びREV13B(#8, 配列番号12)を使用してリボソーム蛋白質遺伝子S13について実施した。プライマー#7をGeneRacerプライマーと併用して産物を得た後にプライマー#8をネステッドPCRに使用した。PCR産物は2個の弱いバンドと1個の強いバンドの3個のバンドを示した。最高産物量を示すバンドを単離し、STSを決定し、0位とした。図3A及び3Bには開始コドンに対するSTSの位置関係も示す。

10

【実施例3】

【0125】

S13/LacZ構築物

tetリプレッサーによる誘導発現を試験するために、單一tetO部位の存在下又は不在下でS13プロモーターの制御下にlacZ遺伝子から数種のレポーター構築物を作製した。まず、プラスミドS13/lacZ(最終構築物の構成と配列については図2参照)を作製した後、このプラスミドを使用して以下のようにtetO部位の配列を挿入又は置換した。

20

【0126】

プライマー-S13PROMFUS FW(#9, 配列番号13)及びS13PROMFUS RV(#10, 配列番号14)を使用してToxoplasma gondii RH/HXGprt株のゲノムDNAからS13のプロモーター領域をPCR増幅した。プライマー-LACZ-AVRII FW(#11, 配列番号15)及びLACZ-PS TI RV(#12, 配列番号16)を使用してBL21細菌のゲノムDNAからlacZコーディング配列をPCR増幅した。次に、S13 PCR産物を HindIIIとXbaIで消化し、lacZ PCR産物をAvrIIとPstIで消化した。プラスミドptubYFP/YFP-sagCATを使用してptubYFP部分とCAT選択カセットをS13プロモーター部分で置換した。残りのYFP遺伝子をlacZ遺伝子で置換し、S13/lacZプラスミドを得た。S13/lacZプラスミドを使用して部位特異的突然変異誘発により單一tetオペレーター(tetO)部位の配列(5'-TCCCTATCAGTGATAGAGATC-3')を挿入又は置換した。これはQuick Change(登録商標)部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)を使用して実施した。tetOは決定したSTSの近傍に挿入又は置換した。プライマー-S13INSTETO+3 FW(#13, 配列番号17)及びS13INSTETO+3 RV(#14, 配列番号18)を使用し、STSを0として+3位にtetO部位を挿入した。プライマー-S13SUBTETO-23 FW(#15, 配列番号19)及びS13SUBTETO-23 RV(#16, 配列番号20)を使用し、STSに対して-43位と-23位の間にtetO部位を挿入した。これらの2種の構築物S13insteto+3/lacZ及びS13subteto-23/lacZとS13/lacZ構築物をToxoplasma gondii株RH HXGprt、REP1/2(Meissner, M.ら, Nucleic Acids Research 29(22), E115(2001))及びtubYFP/TRでtetR及び(無水)テトラサイクリンの不在下又は存在下にCPRGアッセイ(Seeger, F.ら, Gene 169:39-45(1996))により試験した。

30

【0127】

40

50

S 1 3 / 1 a c Z 構築物を図 2 に示し、S 1 3 / 1 a c Z 構築物における t e t オペレーターの置換又は挿入部位を図 3 A に示す。

【0128】

L 9 / L Z 構築物

r p - L 9 プロモーターへの t e t O 插入 / 置換を図 3 B に示す。

【実施例 4】

【0129】

p T u b - Y F P - T R - s a g C A T を導入した安定なトランスフェクタントトキソプラズマ寄生虫の選択。

【0130】

Roos, D. S. ら ("Methods in Microbial Pathogenesis" In Methods in Cell Biology (1994), D. G. Russell, editor) により記載されているようにトキソプラズマ寄生虫のエレクトロポレーションを実施した。 10

【0131】

Kim, K. ら (Science 262 (5135) : 911 - 4 (1993)) に従って安定なトランスフェクタントの選択を実施した。

【0132】

再び Roos, D. S. ら (1994, 前出) に従って S 1 3 / L Z, S 1 3 i + 3 / 1 a c Z 及び S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z 構築物のエレクトロポレーションを実施した。 20

【0133】

実施例 4 の結果

t u b - Y F P - T R 株にエレクトロポレーションした場合に单一 t e t オペレーターを含む S 1 3 プロモーターにより誘導される L a c Z 発現の測定。

【0134】

以下の構築物を試験した：

a) S 1 3 / L Z : これは S 1 3 リボソーム蛋白質遺伝子プロモーターの制御下に L a c Z 遺伝子を一過的にトランスフェクトした t u b - Y F P - T R トランスフェクタントトキソプラズマ株である。この構築物には t e t オペレーター部位が存在しない。 30

【0135】

b) S 1 3 i + 3 / 1 a c Z : これは S 1 3 リボソーム蛋白質遺伝子プロモーターの制御下に L a c Z 遺伝子を一過的にトランスフェクトした t u b - Y F P - T R トランスフェクタントトキソプラズマ株であり、S T S に対して + 3 位に t e t オペレーター部位を挿入した (図 3 A 参照)。

【0136】

c) S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z : これは S 1 3 リボソーム蛋白質遺伝子プロモーターの制御下に L a c Z 遺伝子を一過的にトランスフェクトした t u b - Y F P - T R トランスフェクタントトキソプラズマ株であり、S T S に対して - 2 3 位に t e t オペレーター部位を挿入した (図 3 A 参照)。

【0137】

r p - L 9 プロモーターに t e t O を挿入 / 置換した同様の構築物を図 3 B に示す。 40

【0138】

図 4 から明らかなように、t u b - Y F P - T R は予想通り、無水テトラサイクリンとテトラサイクリンの存在下及び不在下のいずれでも同一レベルの L a c Z を産生する。

【0139】

構築物 S 1 3 i + 3 / 1 a c Z のトランスフェクションの結果、無水テトラサイクリンとテトラサイクリンの不在下の L a c Z 産生量は無水テトラサイクリンとテトラサイクリンの存在下の L a c Z 産生量の 2 分の 1 になる。これはこの株における L a c Z 転写の誘導性を明白に示すものである。

【0140】

構築物 S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z のトランスフェクションの結果、無水テトラサイクリンとテトラサイクリンの不在下の L a c Z 産生量は無水テトラサイクリンとテトラサイクリンの存在下の L a c Z 産生量の約 1 / 3 になる。これもこの株における L a c Z 転写の誘導性を明白に示すものである。

【 0 1 4 1 】

これらの結果は更に S T S に対して t e t オペレーター部位を配置する部位がさほど重要ではないことを立証している。更に、挿入と置換のどちらでも t e t オペレーター部位を導入できることも立証している。

【 0 1 4 2 】

単一 t e t オペレーター又は二重 t e t オペレーターを含む S 1 3 プロモーターにより誘導される L a c Z 遺伝子を含む構築物をエレクトロポレーションした一過的トランスフェクタントの C P R G アッセイ。10

【 0 1 4 3 】

本アッセイでは以下の構築物を比較した：

- a) 上記 S 1 3 / L Z
- b) 上記 S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z (I) (= S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z)
- c) S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z (I I) : これは第 1 の t e t オペレーターのすぐ下流に付加 t e t オペレーター部位をクローニングした以外は S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z と同一である。この構築物は S 1 3 s - 2 3 / 1 a c Z (I) と同様の方法を使用して構築した。

【 0 1 4 4 】

図 5 から明らかなように、上記合成 t e t リプレッサー遺伝子 (M e i s s n e r) と本発明の融合 t e t リプレッサー遺伝子 (t u b - Y F P - T R) はテトラサイクリンの不在下で L a c Z の転写を阻害することが可能である。更に注目すべき点として、隣接する 2 個の t e t オペレーター部位を使用すると、単一 t e t オペレーターを使用した場合に比較して発現阻害は 3 ~ 4 倍良好になることも明らかである。20

【 0 1 4 5 】

上記合成 t e t リプレッサー遺伝子 (M e i s s n e r) を含む株と、本発明の融合 t e t リプレッサー遺伝子を含む株における L a c Z 発現を比較する一過的トランスフェクタントの C P R G アッセイ。30

【 0 1 4 6 】

驚くべきことに図 5 から明らかなように、本発明の融合 t e t リプレッサー蛋白質は上記のような合成 t e t リプレッサー蛋白質 (M e i s s n e r) で観察される阻害に比較して L a c Z の転写を著しく良好に阻害する。また、驚くべきことに、本発明の融合 t e t リプレッサー遺伝子では上記合成 t e t リプレッサー遺伝子 (M e i s s n e r) で観察される誘導に比較して著しく良好な L a c Z 転写の誘導が観察される。

【 実施例 5 】

【 0 1 4 7 】

相同組換えとヒットエンドラン突然変異誘発法を使用したリボソーム蛋白質 S 1 3 遺伝子座への t e t オペレーター要素の挿入。40

【 0 1 4 8 】

特定遺伝子座、この場合にはリボソーム蛋白質 S 1 3 遺伝子座 (S 1 3) のゲノムに t e t オペレーター部位を組込むためには相同組換えが必要である。相同組換えには、非相同組換えではなく相同組換えを得るために組込み部位の上流と下流に大きい配列部分 (この場合には ~ 1 2 0 0 b p) が必要である。 D o n a l d r a (M o l . B i o c h e m . P a r a s . 9 1 : 2 9 5 - 3 0 5 (1 9 9 8)) により記載されているように、ヒポキサンチン - キサンチン - グアニンホスホリボシルトランスクレオチド (H X G P R T) 遺伝子を選択マーカーとして使用して 2 段階で配列エレメントを特定遺伝子座に組むことが可能である。

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

50

詳細に説明すると、H X G P R T カセットに続く組込み部位の近傍に S 1 3 遺伝子座の部分を含むトランスフェクトプラスミドは相同ゲノムDNA S 1 3 遺伝子座と1回相同組換えし、I又は11型偽二倍体を形成する(図6)。これは文献(Donaldら, 1998, 前出)に記載されているようにミコフェノール酸とキサンチンによるH X G P R T の正の選択下に実施される。次に、6-チオキサンチンでH X G P R T に対して2回目の相同組換えを選択し、その結果、偽二倍体が減少し、S 1 3 遺伝子座に組込まれたt e t オペレーター部位の存在下又は不在下でタキゾイトが形成される(~1:1比)。この方法をヒットエンドラン突然変異誘発と言う。

【0150】

この方法を実施するために、まずD H F R プロモーターの制御下にH X G P R T 選択力セットを含むプラスミドを作製した。Toxoplasma gondii RHタキゾイトからRNAを単離した。このRNAを使用し、SUPERSCRIPT(登録商標) II RNaseH-Reverse Transcriptase(Gibco BRL)と標準分子生物学手順(Sambrook & Russell: "Molecular cloning: a laboratory manual"(2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN: 0879695773)を使用してcDNAを作製した。H X G P R T コーディング配列はプライマー-H X G P R T / B G L I I - FW(配列番号28)及びH X G P R T / P S T I - RV(配列番号29)を使用してT. gondii RHタキゾイトのcDNAから増幅し、スプライス変異体-Iをその後の使用に選択した(Donaldら, J. Biol. Chem. 271: 14010-14019(1996))。PCR産物とプラスミドp dhfrCAT/GFP(Striepen, B.ら, Mol. Biochem. Paras. 92: 325-338(1998))の両者をBglIIとPstIで消化した後に、CAT/GFPコーディング配列をH X G P R T コーディング配列で置換し、p miniH X G P R Tと呼ぶdhfrH X G P R T構築物を得た。

【0151】

次に、プライマー-S 1 3 NOT I - FW(配列番号21)及びS 1 3 SAC I - RV(配列番号22)を使用してt e t オペレーター組込み部位(STSに対して-43/-23)の上流(~1200bp)と下流(~1200bp)の両者の領域を含むDNA部分をT. gondii RHタキゾイトのゲノムDNAからPCR増幅した。このPCR産物とp miniH X G P R Tの両者をNotIとSacIで消化した後にPCR産物をH X G P R T カセットの下流にライゲーションした。最後に、実施例3に記載したような部位特異的突然変異誘発を使用してプライマー-S 1 3 S U B T E T O - 2 3 F W(配列番号19)及びプライマー-S 1 3 S U B T E T O - 2 3 R V(配列番号20)を使用して置換によりt e t オペレーターを挿入し、p S 1 3 s - 2 3 / p miniH X G P R Tを形成した。

【0152】

環状p S 1 3 s - 2 3 / p miniH X G P R T プラスミドを従来記載されているように(実施例4)RH H X G P R T タキゾイトにエレクトロポレーションした。ベロ細胞単層に感染後に、Donaldら(1998, 前出)により記載されているようにミコフェノール酸/キサンチン選択を開始した。

【0153】

Kim, K.ら(Science 262(5135): 911-4(1993))に従って安定なトランスフェクタントを作製した後に、数個のクローン寄生虫株を採取した。これらのクローンの各々からゲノムDNAを単離した。プライマー-M 1 3 - R E V(配列番号23)、S 1 3 C L FW3(配列番号24)、H R C H E C K I I 5 S 1 3 - FW(配列番号25)、H R C H E C K I I S 1 3 - RV(配列番号26)、及びT 7(配列番号27)を使用してこれらのゲノムDNAサンプルでPCR分析を実施し、これらのトランスフェクタントに偽二倍体形態が存在するか否かを確認した。4個のクローン(c 4, c 5, c 6及びc 9)を詳細に分析し、RH H X G P R T 株とベロ細胞のゲ

10

20

30

40

50

ノムDNAを陰性対照として使用した。各種プライマー組み合わせ(図6)を使用してこれらのサンプルのゲノムDNAをPCR増幅し、これらを配列番号23及び24のプライマーの組み合わせ等の意味で23/24、25/26、23/26、及び25/27と記載する。結果を図7に示す。

【0154】

プライマー組み合わせ23/24は各種クローンにおけるプラスミドの有無を示す。プライマーM13-R E V(配列番号23)はトランスフェクトしなかった寄生虫(RH H X G P R T)には不在のベクター部分とアニールする。トランスフェクトした全クローンは正しいサイズ(2.8kb)のバンドを示し、安定な全トランスフェクタントがエレクトロポレーション後にプラスミドを取込んでおり、選択中に維持していることが分かった。次に、プライマー組み合わせ25/26はクローンにおける偽二倍体形態の有無を示す。ゲノムではどちらのプライマーもベクターに存在するS13部分の上流(プライマーH R C H E C K I I 5 S13-F W(配列番号25))又は下流(プライマーH R C H E C K I I S13-R V(配列番号26))に位置する。偽二倍体が存在しないならば、「野生型」S13状態はPCR増幅され、その結果、クローンc4と野生型寄生虫RH H X G P R Tで観察できるような~2.6kbの産物が得られる。これはクローンc4が偽二倍体を含まない安定なトランスフェクタントであることを示し、非相同組換えが生じなかったことを示唆している。クローンc5、c6及びc9には2.6kb PCR産物が存在しないのでこれらのクローンは偽二倍体形態を含むと思われる。更に、クローンc5及びc9には偽二倍体が存在する場合に予想されるような約10kbの産物を観察することができる。クローンc6には10kb産物を検出できなかった。プライマー組み合わせ23/26とプライマー組み合わせ25/27を使用してPCRを実施した処、p13s-23/pminiH X G P R Tベクターの両側にS13遺伝子座が存在することが判明した。プライマーM13-R E V(配列番号23)はベクター配列内に位置し、プライマーH R C H E C K I I S13-R V(配列番号26)はベクターの相同S13部分の下流のゲノムに位置する。プライマーT7(配列番号27)はベクター配列内に位置し、プライマーH R C H E C K I I 5 S13-F W(配列番号25)はベクターの相同S13部分の上流のゲノムに位置する。野生型状態では、プライマー組み合わせ23/27はDNAとアニールしないので、PCR産物を増幅することができない。偽二倍体の場合には、プライマー組み合わせ23/26により4.6kbの産物が得られ、組み合わせ25/27により2.6kbのPCR産物が得られる。図7に示すデータから明らかなように、実際に陽性クローンはどちらの組み合わせでも正しいバンドを示すが、陰性サンプルでは産物は観察されなかった。

【0155】

従って、このPCR分析はヒットエンドラン突然変異誘発法により例えばS13遺伝子座への相同組換えに成功したかどうかを確認するために使用される。

【図面の簡単な説明】

【0156】

【図1A-1】Tub Y F P / T R - s a g C A T構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-2】Tub Y F P / T R - s a g C A T構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-3】Tub Y F P / T R - s a g C A T構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-4】Tub Y F P / T R - s a g C A T構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-5】Tub Y F P / T R - s a g C A T構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-6】Tub Y F P / T R - s a g C A T構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

10

20

30

40

50

【図1A-7】Tub Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-8】Tub Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1A-9】Tub Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図1Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図1B】Tub Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図1BはTub Y F P / T R - s a g C A T 構築物の該当特徴及び領域を示す。

【図1C】Tub Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図1CはTub Y F P / T R - s a g C A T 構築物のマップである。

【図2A-1】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-2】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-3】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-4】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-5】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-6】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-7】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-8】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2A-9】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2Aは完全配列を示し、該当領域を配列の下に示し、制限酵素認識部位を配列の上に示す。

【図2B】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2BはS13 / l a c Z 構築物の該当特徴及び領域を示す。

【図2C】S13 / l a c Z 構築物を示す。図2CはS13 / l a c Z 構築物のマップである。

【図3A】図3Aはr p - S13 プロモーターにおけるt e t O 挿入 / 置換を示す。リボソーム蛋白質S13 - プロモーターの部分配列を示し、S T Sに対する+3 挿入部位と-23 置換部位も示す。コーディング領域の最初から3個のアミノ酸も示す。

【図3B】図3Bはr p - L9 プロモーターにおけるt e t O 挿入 / 置換を示す。

【図4】抗生物質の不在下、無水テトラサイクリン(A t c) 1 μg / ml の存在下又はテトラサイクリン(T c) 1 μg / ml の存在下に構築物S13 / L Z、S13 i + 3 / l a c Z 及びS13 s - 23 / I a c Z をエレクトロポレーションしたt u b Y F P / T R 安定トランスフェクタントによるL a c Z 発現レベルの測定。ODはL a c Z 発現レベルの指標である。横軸の表示はタキゾイト 1.25×10^6 個(初期作製量の50%)を使用したこと示す。

【図5】構築物S13 / L Z、S13 s - 23 / l a c Z (I) 及びS13 s - 23 / l a c Z (II) をエレクトロポレーションした各種株(R H, R E P, t u b Y F P / T R)におけるL a c Z 発現レベルの測定。R Hはt e t リプレッサー遺伝子をもたない株を表す。R E Pは合成t e t リプレッサー遺伝子(M e i s s n e r)をもつ株を表す。T Y Tは融合t e t リプレッサー遺伝子(t u b - Y F P - T R)をもつ株を表す。これらの比較実験では等量の細胞を使用した。図に指定するようにテトラサイクリンの不在下又は存在下で実験を行った。

【図6】第1段階のヒットエンドラン突然変異誘発後のI及びII型偽二倍体形態の形成

10

20

30

40

50

【図7】偽二倍体形態の有無を試験するための各種クローンのゲノムDNAでのPCR。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> AKZO Nobel N.V.
<120> live attenuated parasite vaccine
<130> 2002-017-EP
<150> EP 02078953
<151> 2002-09-20
<160> 29
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 4834
<212> DNA
<213> Toxoplasma gondii

<400> 1
cctagttgtt ttcgcaacag tacaccgtcc tgagttagtc gagaacatca gagatgagca      60
cacgcaatacg cggtcgcaca agggtcatttgtccacatc gggatgcaca gagtggcacg      120
agtcgcacaa aaggcatac tagagacaag gagagactgc ggcctaaccga aattcgact      180
cagtttcttg acccattcgt tagggtcgtt ctcagctcc ttccaggattt ccgtcaagac      240
atctttgtta gcttcccgtt gcagacatga aaggcgtgt cacgcataaa gagccgattg      300
aaacgcagtc acagagatac gaagaaatca aagccgtgg aaagcgaacg gctggatgt      360
agctgagaaa gcaaattcac tggcggtgca aagagccaaat gaaatcaggg tcgcgttagag      420
gaactataaa acgtgaaaaa cgtgcattcc gagtctcgca aaggtgcgc tgcgtccac      480
atttgagaga aggttgcgag gcaactataa gggcaggggg gaggataaaa tccgatagac      540
ccagttcttg gtctccaga acggggacag gaccggacgc ctgcacagggtt ggatcacaac      600
tccagaggca aagccgccac ggaggaacgg aatccatgac cgagtggaaat tataacgaag      660
aggtgtttgtt cgtcgaaatgtt gtcgcacatc aaaaaaaaaa aatgttttag acgctcgact      720
gtgcacttcgc ggggggggggg gtcgcacatc gacgactgtt ctcagttttt cggaggtaac      780
tggaaaaacg gtcgcacatc tggagccatc cgtggggccg caggggggcag aacagatgtc      840
tcagaagaaa gtcgcacatc acagaagaaa aacgagaaaa gtgcgtggcg actcatgcag      900
agtggcgccgca cgactctgtt tccgcacatc gcttaccatc gctggggccgaa ggtaaaggaa      960
agaagtcaag acgcggaccc tgggggggtt ggacagcatg atgcacatc gatgtatgtt      1020
cttttgcacatc gcaaggatgtt agactcgacgc ggcacatccg gacgaccatc tgcgttttat      1080
gcttcgcacatc taggcaatat atctgcgtt gaggggccatc tttctggaga gttgcgtttt      1140
ccctgtcgatc gcctcatccat ttcacatccat gtttgcgtt tccaggccgacg ccttcgtact      1200

```

accggcccaac gggcttcattt cttcgattc catttgagat agccgttagaa gcagaggaag 1260
 agccgtcaga acgcttgccg cggcagaaaa acacttaaag ggcgtcacaa gattgatata 1320
 ggcaagagga atggacgtca acaggctgat tcataagtga cgctcccagt aagtggcgga 1380
 cagccatgaa aatgagcggc cgagtttgc aaaaacagaga aagaggctg catcctggcg 1440
 aagagccgcc ggacaccctg cttcttttc acagttcgta ggtgccaaga ccaggaccaa 1500
 attatcgccc ttcttagcaa acctttagcc gagttaccgg agaggttagc cgaaaaagaa 1560
 togaaacgaa gacgccattt tttgtctcca ttgcacacgg acggaccgt a gctgtctct 1620
 cagcatatct tacgacgttt tgccgtgtt atcgctaaca caccacaaag agaaatggtt 1680
 tatcgaaaaa ctgttagcc ggatggtaaa gagatgcaga aggca gtcg cagaatttcg 1740
 gtttgcgtca gttgtggcgt gctggcacac tcacgtttt ccagcgtcac atgctgcctg 1800
 attcacgcag aaactgcatg tgcgtcggt gtctcgccctg cctcaggatg cccttgtcgg 1860
 cogatagtga ggaaggaaaa acggctccag caaaatgttg gttctattcg gcgagtgcgg 1920
 gtattcccttc cacaaggctg agacaccgtc gagtttttc cttccggact gaacctccgga 1980
 aaagtcaactt tgcaccgttag attccacgtg ctccagcgcg gctgtcaatt ttgcacactg 2040
 cgccaaacggc ttgccaadaa gaccaggctc ggcgcggccgg cttttcacat tcccgacggc 2100
 ttatatacgg aaggcttgc caggcgtatt ctggccgcgt ggggtcgaaa gaaagtgcgg 2160
 aaagagcatg ctgtcaagt gcatgcggcc atgttaggtt ctaggacccc tgtaaattt 2220
 ccaggggtgcg gggcaactaa gtggcctctc ttgcgtcggt ctccggactg ttctctgggt 2280
 tggcctcgct tcgccccaga cacttgcga cgctcgtcg ggagtctgag cccgttgat 2340
 tttttcgct gtcttttgcg cggttcccggt ttccctcgta ctgcgcactc tccctctcc 2400
 cgctccgtcg ccaccatgaa gtctgttat gctgtgaga ctatcaccat ccctgcggga 2460
 ggtaagtttc tcgacactcg agaggggtgaa ctgcggagaa gacgaatgaa acattggccc 2520
 gcttgatctt tgagggagag ttggcagatt ctgcggctcc acagccctcg tttttttcc 2580
 tcccgatgt gtttagatgtg tcccgacccc gagggaaagcg atcgacacgc tggaaaggaa 2640
 cgccccatga gcccggaaatgtt tttggaaattc aggccccgat ggcggaaatgt gcaagtgtct 2700
 tggacccacatg tgaggaagcc gaacagcagc atttacaga tcttcgcacat tgaggagggg 2760
 ggcggatctg ggaggtgaag aggccggaa ccgtgttcca cttggctttt ctccgcattc 2820
 gctgtgtctg ctctgcgtca aaaatccgca tgctttgttg tcattcaaag aggtcatcg 2880
 ggcgcattgt tctttgttccatccaaacagtcg accccggccaga gaatacggc 2940

10

20

30

tgttctgtcc	ggtgactggc	gatggggaaa	tgggggaaac	tgtgtcgta	gcgagtgaag	3000
gcgtttttta	gtgaaatttc	tacattgtgc	aagcacacag	aagggtgtcc	gtgctaata	3060
ctggAACAGT	agattatgtat	taggttagtgg	aacagggaga	gcgtctgttg	tacatcactg	3120
tctgcactcg	tttgtactac	aacgaagttg	ttgtatgcgt	gacttgggtg	tcgattgcat	3180
agacatagcg	tggaaaagta	gaagacaggg	ttgtatgcga	ggctctgtgt	gcacctgttt	3240
catgtggaca	agaccaccgg	gcatatgctg	gctgttgctt	caacacgtg	ccgaaacatg	3300
tcacggcggt	ggggggaaa	ggagtcgttg	tagaaaccat	agagagagtt	gaggtagctc	3360
ttgtatgtctc	gcaaaaatgg	gactggcacc	tgttgtctgt	gtcttcgatt	aacacgagcg	3420
ccgccactgc	gtttgtatgc	cgctactgg	gcagcgtcgt	gtacgtacag	ctcgaatagc	3480
gtaatgtgt	gttttgtac	tcttctgtt	tgagtttcat	caaagaggc	cagccacaaa	3540
atgggagcag	ggggatattt	gagggcata	gataagtgc	gcctgtgtgc	atacttctag	3600
aatagacagg	aattcgagag	cgaagctgtc	tgaacagaga	tctgcagg	ttcggtttgac	3660
tgtgttaggca	ggtttctgt	gcgacgggag	tcgcaatgca	gagtgcgt	ttggattgg	3720
tgtttcaaga	tgtttgcata	cctctgagag	caatcgctt	ttgtccctgtt	ttgcgtgtct	3780
ctcggctgt	tgccttctga	aagaaaatgt	tgcatoegtt	tgccgttttc	tgctgcagtc	3840
acgggtggatg	tgaagtcgcg	ggtggtgact	gtgaagggc	agtaggcgaa	atcacgcgtg	3900
cattccgc	cctccctgtc	gacatccaga	agaccaagtc	tggaaaccga	ctgaaggtcg	3960
agatgtggta	tggAACCTG	acagacctca	gctgcac	cacgcgtgtc	tctcacatca	4020
agaacatgtt	cactgggtgt	atgaagaagt	tccagtacaa	gatgcgtt	gtgtatgcac	4080
attttccccat	caacgtgaac	atcagcggca	acggaactgt	cgtcgaaatc	cgcaacttct	4140
tgggcgagga	gcgtgtgcgg	atcgtaaga	tgcattcggg	agttaaatgc	gagaaggcca	4200
caaacgtcaa	ggatgaaatc	gcgcgtactg	gaactgacgt	cgagctcg	tctcgatcag	4260
gttagaggctc	cgaggaactg	aaaagggcg	tgggtgtcg	gtatgcgcgc	atctaata	4320
agttttggag	gtgcggag	agcaaggaag	cgtatagatg	tggcattt	tgaatgtca	4380
tctatgttgg	tgtatgttgc	tgtatgcctg	attgcacgt	gccccacaacc	acctccaggt	4440
tggaaagaaga	gagaaactga	taacggtgga	ccccgagago	gggattac	ggaactctcg	4500
gacggtcgtt	gtataactcat	ctcacgtggg	cgagggggag	gtggtttgc	cttcgatgtt	4560
gccacagatt	tggaggtgag	gtgtcttcat	atcctgcatg	tgtgtctgca	ccagcagata	4620
tgttaactgc	caggtgagac	acgttgcga	gccacaggt	tttttgtt	tctgcattgc	4680
attaacatgg	tttgttattct	tctgttctgt	atgcatttct	tcttcagcgg	ctctcatcca	4740

10

20

30

40

tcaatcgact ttggtcagga gaaaggatat ccgtaaattt ttggatggca tctacgtgtc 4800
 agagaccagc actgtcgaac aggacgcgta aatg 4834

<210> 2
 <211> 4338
 <212> DNA
 <213> Toxoplasma gondii

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (565)..(566)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (625)..(626)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (639)..(640)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 2
 atcgcacatgac ctgatcacgc acggaaagaa acgaatagtc gccatttcaa gtgagatccg 60

tgtgaacagg tcagatcacc gaatcgacg atatatgcac tgaaggcagc ggagccagct 120

gtaaaacaaag aactggacag cagctaccgt agctgttagac ggacgcgact tcgagagcgt 180

ccacgtcaaa cctcaccgat ctcgcctca taaagaggca tgtgggctgg gagatacagg 240

ggtgaagaag gagagacaat ttgcgttaagg aggcgaagct ttgcatttcc aggtgcgatt 300

ggagtgcggc ccacaggaga cgcgaactcc tcaaaaacgg acacggagaa gccctgtgca 360

gagacaacgg aaagaatgtc ctgacgagag agttgcaaaa gaatgttgaa caattaaagc 420

aatgatgcag actcgaagat ctaacgcctc gcaggtctca acggttgctg tgatgcggc 480

tttacacagt ccttaagttt agtgcatttgcg aggctttgca gctcaaggca acgctgtaaa 540

cagcgtgtt atgaatcggt tgccnntatt gaggcgtctg cgtctggctg gtccatcaag 600

ccaaaagacg cttgtaaaca ggatnntcca ttogaatgnn gacagacagt ttggcaactg 660

tcatcacacg tgacgttaaa aggcaccgtt aagcgcattga caaggaaagg tcacccgcga 720

tttacacaca ccaggtgcgg tagctgtcga tgaatgcgaa ttccagagtt tttctctccg 780

acactacata agctgttaat gtcatttctg tcattcggtt accgtgttta ctacggggaa 840

tcgagaaaacg gaatatcaag aacacaggct gtcaaaaagac accgcgaaac ctgcgtgcgg 900

aatctaacgg ttgcctctgg ccatttatgt gtttctgcgc tgcgtgcaga 960

10

20

30

cacagcctga	gtccgcagcg	aggtaaatac	gaagaaaaac	ctgacgagct	ctgtcagatc	1020
tgtacaagcg	acagaagcg	attgacagag	gagagtgcgc	gacggtgacg	agagttagag	1080
tcgactacga	agttagagga	caccagggtg	gcaaatgtgc	caatacgcag	cttcaaagg	1140
tcgagatcg	caatcgaaac	tcacttcact	cgttaaacaa	tcgagcgtt	gctgcagg	1200
ttgtttgggg	cacccgcct	ttgcctccc	acccatcgga	ttagccccgc	agtactccac	1260
cagcaaaaca	gcatcgaggc	cgtatgcctc	gaagaagtct	ccaacctgca	aaagaaaaggc	1320
accacgtcag	agcaaggaaa	tcaagactca	accaggtgt	cagacaccgc	ataccgtcgc	1380
caggaacccc	ggtcttaggac	aacttgcta	gtgctgctca	aaaggtggaa	cggagaaggc	1440
gagacagcag	actggcggtg	ccagttcaaa	tcaccactgc	ctgaagcg	gggaccgaga	1500
cagtttgcga	tgttggaaatt	cctgtgacgc	acacactttg	gaacttgcct	gaataatcag	1560
aacttigtcg	ggccgaagtc	gtttttgttc	tcgtacgaag	acgaggagag	gaggcatatg	1620
cagggagtc	ggaaccatcg	acggatggtc	gaaggaaaga	aaagagagct	gccgcggg	1680
agcgggacgg	gaaagaagcg	gcagccttgc	caagaacg	gggtgtactg	ccaccgagg	1740
aggcgggcag	ctttctgcag	acgaacgcag	aacggagcag	ttttcttcc	ctttcgact	1800
cggcttcgg	cccagcagg	tgtcgcg	cgcgcttcc	ggacgcttct	gcgtgtggaa	1860
gaagcggccg	gacaggcggg	atgcgttga	agggaaatga	gtctgcctgt	ctgaaatcgc	1920
gtgaggcaac	tgaatggtcg	gacgtgcgag	gcgtcggtcc	ggatggacaa	caaaagcgac	1980
gcgtcgagaa	gaggcaagaa	agggcaagct	ggcg	ccacgcaact	ggcctgctgc	2040
gtcccttgc	gctgccc	aaa	agaagtccag	cagctgatgc	tgcccaagag	2100
tccgcagctg	ctgtcg	cggtt	ctgtaaaaaa	ctcttggacg	tgccgcgt	2160
catcttgc	gccc	aaagca	aggcattgat	cgaccagta	gcttgcggaa	2220
taaaccctgc	cgcaaccgc	gctgtcg	cgaa	aaacatttcc	atcagcagtc	2280
ctccactgag	atgcacaca	atgaaa	agag	aatcgctgc	agtttccagc	2340
gaaaagacg	gagccgcg	gaggc	gcccc	cgacccgaa	gccccgc	2400
ggcaatggag	caaaaaatt	cctgcctaga	ggagaatcgc	cattcctgg	cacggta	2460
gcatacagaa	tccctccca	tcgtgggt	ct	gatggaaaag	agaaaaggac	2520
tgtggagcc	cggtgcgc	tcggcttcc	cg	ttggtcaa	tgcagaagcg	2580
gactagagcc	gaaccaccgg	cgactcca	aa	aggggcct	tctactccat	2640
cgcacatggtaa	aactgagttc	tctaatccat	ggcacac	ctc	gggggtgt	2700
cgtgaaatat	cttaaatagt	cgagcgctc	agagtac	aa	gctgcaatgc	2760

10

20

30

ctcggacaac accgggtggac taggcagcgc atcaaggaga caccggccag aggcccctt	2820
actccagaac atgcgaagga tgtcaactgtt gatgcaaaat cagggtactg accatcaagt	2880
gaacagtttc tagagtatcc acgtggctc aaaaagtaaa gtatggcccc acatcaaacc	2940
gagacyagcc tgtcttcgtt agaaacgctc gtgccatga cgtcagtgc tgacacgctgc	3000
agacacgacc caaagtagct gatacggtga ggaatgagca tgctgcccgt tcaaaatcg	3060
cagtcggc tacagcagtg ttttatgtac atccctgtt tcttttatt caagaaaccc	3120
aggtaaacatg tgcttgaagg gcggacttgg gtagaatggc cctcgaacgt tggtgccgag	3180
gggttcggtg cagcattcca tcctggctg taatgtgtct tgctgtatcc ctctgcgggc	3240
ctgcagtcgg aactgccttc atagtccttc aacgcaacct gcatacgctt accaggaatt	3300
tccgtgtctt tcccttgggtt gggaaagcgat ggtttgcagg agatgcagct gtgcaacact	3360
gtaaaggctg gtttcagcaa acgggactct cccctcggtc actcccaggg agtgtcgcc	3420
aggtgacggc ctgggtctgcg gtcacagaag gatgtccctt cgaagatgca gtccatgaaa	3480
cttcgttcc tagtgcactgg gtggagagga gtgaacccac agctctaggg acggatgcga	3540
cactctcaag cattccatcc gagctacctg agcctgaaac gccgcggaaac agcttctcat	3600
ggggcaccccg gaaaaggtaac tgacgagaga atgcttctc agaattgatc cttcgccttc	3660
tgtgagaaac actgtcacga ggactgcaat ctttcaggt gatattttc tgtacagctg	3720
tgcagcggtt acgctttga ccggagagta cccgtgtatgt gacccgcggg ttgggttagag	3780
ccttagtccag ctgtctgtca tcttcgttac gggagttagg aagccgtaaac aactaatatg	3840
tgcacatcgccgg ttttcgggt gtgcgcgtgg gcaggtctta tgcaagggtt cggcttcccc	3900
ctgggtctgg aaagctgacg atcaacaaca gagacgcage cgactatctt caagacaatc	3960
catggtggtat tcataattgc atcgccac tcatggaact gcagctggag aatgaatttg	4020
atatcattgc ggaggtaaac cacgttagct agcttcgggt gacagtcgat atgtttcgca	4080
atgatttctt acagcgtctt tcctacgttt ttgcttgcct tcgacatcag gcccacgggg	4140
gaggccctcggtt cgggcagttt ggagcaatca tgcttgcgtt cgctcgggag attgtgcgac	4200
agcgaccggaa actgcgaccc cctctcggtt gaggcgtttt tctgaccgta gacgcaagga	4260
aggtcgagag gaagaaattt ggtctcgga aggcgagaaa gaaggaacag tacagcaaacc	4320
ggtaggggtgc gtaggtca	4338

```

<210> 3
<211> 3639
<212> DNA
<213> Toxoplasma gondii

```

10

20

30

40

<400> 3
 cctcgagat attgtcagtgcatgacacaa ccgcggaaaag ccggcagccg cggttaatacg 60
 gggacgagga aaacgactga gcgtcacaac agaaggcagcc gagtaaacgg cgaaggaaat 120
 ggaaaggacc caagtaaaat ttcttgaaga atttcagcgc aacaactctg cgggttcttg 180
 cgaatagagg aatttcactt cctcatcgtc tgatttatgc tttcatcatc tgccgctcaa 240
 cagccgaata aacggtttcc ggtcgcttcc ttaaactcta cttcagtagt tgaaactctt 300
 ttgcttcacg agccttcgtc tcageccotca ccgtccctgag ttctgtctt gttgagggaa 360
 gctcccgctg aaaaaacagg actttgttg cagattttca tgtgtactgg aaagtgagat 420
 gtgacttggg gaagtccgct ttaaaaatttc cattgttttc tcaaaaatgaa aagtctaaaa 480
 aatcgaagtg cgtgccccgc gaggaaattcc cctctgcaga tttgtttgc atttatatgt 540
 cgtttttacg gagaaaagtc ccaagctgct gtccttctc taactagatg ttgaacgcta 600
 gcacatatgc accagatgct tctgaagttat acctaaacgc accttggaa caactgtgct 660
 cccattcata aaactcatac aagtccacaa gcatgccata cccgtgagac ataacaacgg 720
 aagcttagact actccccctt gttattgcac actatcgaaa aggattccta ggtttctatc 780
 ctctgccttt tcctggggca cactgcagag aaactaccgt ggcgcgtacc tcccgacgtg 840
 cgaggcgata gcaaaaacgct tttgaaggaa aaagtcgaga aatcgacgac tgcgtcttt 900
 gaatccgaga gagggatcca acccacccgag ttctctgcatt gtgcagcatc tgcaagaacg 960
 tgataatgca tgaactcgat catcgccctt tctgtgtgc tgcattttcg aaaaagaaaag 1020
 gcgttttctg cgccggagact cgccggagg caagacgaga ctttctcctc ttccaaactg 1080
 cgagccacgg gggcgcatgc aatttgaaca tcacgcaaaa tcccaaaaacg ggtgggggtgg 1140
 agccgcaaaac tttttggca tgcagcggtt agcctgagct gcccgtgggg cttttgtcgc 1200
 gagcgtgggg tgcgcgaga gagcaacgcg ggcgtacgcg gcccacgggt cttatggaa 1260
 gcctcgccatt tcctcgacgg gtttccccctt caattcttctt ctttctctg ctttctcctc 1320
 aggtggcttc gtcacccggtt tttctctcg ctttcgtgct cccgtgtgtg tccggagtgc 1380
 cgccgacagat cgagggcggtt ctccgcctcc accttgcggg tcccaatttc gattttctc 1440
 cgtcaccatg gggcgcatgt acggtcctgg aaagggcattt tctgcacgcg ctctccccctg 1500
 ggcgcgaaaag ccccgacat ggctgaaaat caagccgtcg gacgtcgaaag agcacattgc 1560
 caagcttgca aagaagggcc agacccctc ccaggtactt tccggcggaa gaagggagaa 1620
 aaacgacgga gttgcggcgg ctgcggctcg gggacaacgc gggaaagtgc aaggaaaaat 1680
 acgcgttctc cagggtcatcg gggaaaacgc ctgcgcatac ccagccccctc gacttccgc 1740

10

20

30

40

agttgtttt cgca	1800
tctccctccc tctg	1860
gtcgctgc ctcacagccg	1920
cgcggggatg ggctga	1980
gtgacttgct cgagga	2040
cgttccccc cgcaaa	2100
ggaacaacgc gttgttgt	2160
tggatccga gcggtccgaa	2220
cactgaacgg ttgc	2280
tgaggacac atgtttttg tgaccgtggc	2340
cgtccaatg cggc	2400
aggcaattt ttccggaggtc	2460
cgtctgtttt tccattctcc acgttcttct	2520
cttacagatc ggcgtcacac	2580
tggcaacaag atccctccgta	2640
ctagttcaa tcttctcgag	2700
gctcaagaag gtctggag	2760
gcctggatac ggtgtgaggg tagcgcctt	2820
ttggagaagg aatgacgccc	2880
tctttgagaa agaacgtttt tcgcgtttct	2940
cctagatcag tcgactcg	3000
ctcaactgcaa cactgtctcc	3060
agctctctgc cgtcgccctc	3120
tccagcaaag tggagttttt gtatgcgtgc	3180
acgttgcgtct ctctctccc aagtgtatgc	3240
aacggcgctcg ctgtcccttc	3300
ctgtcagccg tccaagtgcc	3360
gegegtggaa ggcactgttc	3420
ccaagtgcgt ttccgaggta	3480
tttttcagg tcttgcccc	3540

10

20

30

40

tgagcgtgcg aaagcacttg gagagaaaca ggaaggacaa ggacgccaag ttccgtctga 3600
 ttcttgttga gtctogaatt caccgcttg ctcgctaca 3639

<210> 4
 <211> 2748
 <212> DNA
 <213> Toxoplasma gondii

<400> 4
 ctgccgccttc cttaacctctt ggaaggggttt gaagctttt cgcaactgaaa cgcgagagac 60
 acgaatgagc tgaccacttt tcctgcattc gctggccctg taccggccgc attctctact 120
 tcgtacacctt tcactgtact cacacccgaa aacttcagaa gtcgggcttt gtcgaggcg 180
 actcaggcgca gaggagaagg tgaacatgcc ttccccaaatt ttgcggcag tttgcctcgg 240
 gttgctctct tcccccaacctt agatgaaatg aaaccactcg atcagccatg tatttcccg 300
 aaaaggttgg ctaccaagcc cacatttggta aagcaactctg gaagatgcgg cgccacggaa 360
 gcaaccctcg accgcacccgc tgcgcgggg tctcgacgtc gtccgcgtta acatgtatgtc 420
 ccggccagagc ttccactgtt ctgacgagta catggatgca ataagcaagt cgttccact 480
 cgtacacgaa tgtccagcac cagcaagctg catcaactca atcgcttggta agccaaacgc 540
 ttcttttgc tgctttctgt ttttgcgtcg agactgaccg agcacgaaac ttacacgaaa 600
 cgccaaagctc taatcgccta catcccactc cttttcaga aatggcaggg aagctacact 660
 cttgttaacg tctcttaggtt taaagggttt gtgcaccgag ccgatcacgt tacggacacg 720
 ggctcggggt tcactacgtt acaaggaata aacaactaac gcacaatcct gtttacattc 780
 gggccccacag catataaccc ctccggaggc ttgtattcca gctatcgaaa aaaaagcaat 840
 tcatgttaat tccctccaaat agccccgagc gyatgtcatc tacaagtggc agccttggta 900
 gggacccttc ttgggtatgc ccggacagat ggcgcgttgc gatotttaac ctccgcgtaa 960
 agataggtgt ctgctgttagc ggtgcgtttt tttgtgttgc atgcgttgc caagctggcc 1020
 gggacaaggc ggttgcggcc atggatggat ggcaaaacca ctgtgttgc ggcagcagcc 1080
 ctcccccttgc ggctccctttt gtggggcactg ggcgttgc cagcacaacg tagggccctt 1140
 gtccagcatg gacgaaaaagc agtgggggag actcccagag gaaagcggtt ccacgtcaaag 1200
 gggaaacagg ggatttttgtt caccggaggc tggatgttca cttttgttgc gttgttgc 1260
 gacacaggatc tcatccctgt tttgttcaag atggcgatcga ccggcaacgt aaggggattc 1320
 tccgcactgc attgtctctt tgagggagaa aaggccggccg tgaaaacatg ctgttcttca 1380
 ccagttggca gattgaagca gtctacggga agatgcacgg tttaatcatt gttgttgc 1440
 gtctgcgttgc tgacttccgttcc gtattggaggc acgcgttgc tgcgttgcgttgc tgaaaatcgta 1500

10

20

30

40

ctgtctggat ctctttgagt gaagaacacg cggcaggccg cagtttttt gcagggcctt 1560
 ggtaccaa at gttgtttac atat tgcct tgcgttttc ttgcattgc ttttagat 1620
 gctggagac tgtaaatca acaaccgctc ggagatattg tgcggccc agcaatgctc 1680
 tggttccact cccgtcgta gcaggaaacg catgggggc tttgtggct tctgtgtta 1740
 tgccgtctgc agacttgcaaa aagagaaaat ttcgtcaagg atggtgtctt ccaggcggag 1800
 ctcaatgagt tccttcctc cacactgtcc gaggatgggt actcgggagt tgaagtccgt 1860
 gtgactcccc tccgcacaga gatcatcatc cgccacca ggactaggaa agtgcctggc 1920
 gacaaggaa ggcgtatccg cgaattgacg tcggtcgttc agaagcgatt cggcttcggc 1980
 cccgactcgg ttgagcttcc cgccgagcgt gtggagaacc gtggctgtc cgccatggca 2040
 caggcagaat cgttgcggta caagcttcta aaggggcttg cagtcagacg cgccctgctat 2100
 ggtgtctcc gccacatcat ggagtccgga gctaaaggtg agtgcgtaca aagtgccatg 2160
 tattgtatga ggtaacttga atttagagtg tgaacaaaaa gcattagtcg actgtcacac 2220
 gtatcttcgc cggactttt tctttcagg ttgcgggtc gtcgtgtccg gtaaacttcg 2280
 cgctcagcgt gccaagagca tgaagttcaa ggatggttac ctgatctcta ctggagagcc 2340
 ctcgaagatg ttgcgtcgacc aagcaatccg ctccgtgcaaa cttcgacaag taagtttcaa 2400
 attattaagc ctcagttacg tagtaaaggc caattgtgt aggagctagt atgtacagag 2460
 gcagtgtatg tgggtttttt ttgcagggttgc ttcttgggtt tagagtcaag atcatgctgc 2520
 cgcatgaccc ggagggcaaa cgtggccccc cgaacccgct gcccggatact attatcgta 2580
 tggatcccaa gccagagatc cccgttggtc agcctgagga gatggacgag ggagtgcgtc 2640
 gtccaatgtatgatgattt cgtgcgtgac tggatgttta tgggaggagg gtgtccacat 2700
 gtgcgtgacc gtggagcgc cgttaacga aattcgcatg ctcccttcg 2748

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer: SAG3-FW

<400> 5
 cgataagctt cgaatctctg aacggatgtg t

31

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

20

30

40

```

<220>
<223> primer: TUB5-RV

<400> 6
cgagatctgg gaattcaaga aaaaatgcac acg 33

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: TETAVR5-FW 10
<400> 7
cgatcctagg atgtcttagat tagataaaag 30

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: TETPST3-RV

<400> 8
cgtctgcagt taagaccac tttcacattt aag 33
20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: T3

<400> 9
attaacccttc actaaaggga a 21

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial 30

<220>
<223> primer: SAG1/1634-RV

<400> 10
cgataagct tcgggggggc aagaatttg t 31

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> primer: REV 13A

<400> 11
gcgccccatg gtgacggaga aaaatcg                                27

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: REV 13B (nested primer)                           10

<400> 12
ggaaaccgca aggtgggagc ggagaac                                27

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13PROMFUS FW

<400> 13
gcataagctt cctcgccagag attgtcagtg                                30
                                         20

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13PROMFUS RV

<400> 14
gcattctaga ggcagacatg ccctttccag g                                31
                                         30

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: LACZ-AVRII FW

<400> 15
cgatcctagg atgaccatga ttacggattc act                                33

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial
                                         40

```

```

<220>
<223> primer: LACZ-PSTI RV

<400> 16
cgatctgcag ttattttga caccagacca a 31

<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13INSTETO+3FW 10

<400> 17
ggttctcccc tcaatcccta tcagtgtat agatctctct tcctttctat 50

<210> 18
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13INSTETO+3RV

<400> 18
agagaaagga agagagatct ctatcactga tagggattga ggggagaacc 50
20

<210> 19
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13SUBTETO-23FW

<400> 19
ctacgcggcc gacggtccct atcagtgtata gagatcttcc tcgacgggtt c 51

<210> 20
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial 30

<220>
<223> primer: S13SUBTETO-23RV

<400> 20
gaacccgtcg aggaagatct ctatcactga tagggaccgt cggccgcgt a 51

<210> 21
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> primer: S13NOTI-FW

<400> 21
cgatgcggcc gcgtcagtgc atgacacaac cg 32

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13SACI-RV 10

<400> 22
gctagagctc ctgtaagtgc ccagagaagg ac 32

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: M13-REV

<400> 23
aacagctatg accatgatta cgc 23
20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: S13CL FW3

<400> 24
cgatagtgtg caataacagg 20

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial 30

<220>
<223> primer: HRCHECK II 5 S13-FW

<400> 25
gtcgagtcct gtaggttcat c 21

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

```

<220>
<223> primer: HRCHECK II S13-RV

<400> 26
ctccgaagga gtctctcagt g 21

<210> 27
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: T7 10

<400> 27
aatacgactc actatacg 17

<210> 28
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: HXGPRT/BGLII-FW

<400> 28
cgatagatct aaaatggcgt ccaaaccat tg 32
20

<210> 29
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer: HXGPRT/PSTI-RV

<400> 29
cgatctgcag ttacttctcg aactttttgc g 31

【 図 1 A - 1 】

Figure 1 A

【 図 1 A - 3 】

【図1A-2】

【 义 1 A - 4 】

【 図 1 A - 5 】

4381 gtctctgtgt tacttggaa tgagcagtc ttccaggatcg gtcggactat attgcgtgc
>.....pTUB1.....>

4441 octtagccac gtttcaccag cgtccgatgc aggctcaacct agccgatacc tgcggccgtt
>.....pTUB1.....>

4501 catatatgg trtgcttattac atctgtggcc cgtaaagaca caaggagatg cgccgtgggg
>.....pTUB1.....>

4561 caacgggtt gtgagcacca ttttgatct gtcacgggtt aaaaaacatt tattcgaact
>.....pTUB1.....>

4621 ttgtacgagc gcagtcagta gaatgtcaacc agccgtatca actacggctgc aattcasgag
>.....pTUB1.....>

4681 gacaggagaaca gggaaaaaaa gcccgaagg ttgcgggtt taggatgta cgagacggtt
>.....pTUB1.....>

4741 aaccggccgc ttggctatgt ttggccatcg tttagccaca accggatcaeg ggaaaaacaa
>.....pTUB1.....>

4801 agttaaatag ttatgttggc gagattggcc ttgtctaatct tcagatcgga cgaacagtca
>.....pTUB1.....>

4861 ttctggccca ctgtacttgc ttgttgtatgtt gtaatccaa cttagtgcgg tgctcggtt
>.....pTUB1.....>

4921 caatcaagtt gctttttctt ctccctttca gacacggtaa gaacgcttat gaacaogat
>.....pTUB1.....>

4981 acatcgatag tttttcgtag atgcggaga ccasgtgtc caagggtgc tcccccatcg
>.....pTUB1.....>

5041 actgggaaat caagaaaaac ctgcgtgtat cccaaacgta ctctgggtt ggtrgcaacc
>.....pTUB1.....>

5101 gaatgttcat actgttcaaa agccgatgtaa cagcgcccccc acatcccgq tctgggtgtt
>.....pTUB1.....>

5161 caagaagcgc tgaagaagaaa agtggccaaa cccttcggccat ttgccttgg agggccggc
>.....pTUB1.....>

5221 tggatgttac ttctgtgttgc ctgtatcaccc ggctccatata gctgttttgtt gtttgcgtgt
>.....pTUB1.....>

5281 ctggggcaaca tgatgtatgtc gtgcggatata tagccactat tttagacatt tatttacaca
>.....pTUB1.....>

5341 ttttttttttcatgtatgttcat ttttttcgtt ctgtggccatgtt ggttgggtggca

【図1A-7】

【 図 1 A - 6 】

>.....ptUB1.....>
5401 tgagactcgc ttagatgtat gtgggtgtt caatcacgtc ggtatgtctgg cttatccgt
>.....ptUB1.....>

5461 agttttttgt gggttttgaca atggaaacgt tttcagact actatttcac gtggtaacgg
>.....ptUB1.....>

5521 tatggccac taaaaaaaac agaaaaaaac ctgtttcgac aaacsatacg aaacctgttt
>.....ptUB1.....>

5581 tcgtcatagt aactcagcgc cccctgtccc ccccccaacg gtgagatgc agacaatcc
>.....ptUB1.....>

5641 ctctaccacac gcttttgttg cgtctgttcc aaattttccg cgctcgcgaa aggcatcagc
>.....ptUB1.....>

5701 aacaacatc tgagaggagg cagggtttgttgg gggctggccg gtgcaggaaat ggtttcttc
>.....ptUB1.....>

5761 gaaaaaggcc tctgttgcaga aggttgtggc ttgtaaaaaa tatccggaggat agcaaaggact
>.....ptUB1.....>

5821 tggttcagtgc tctccctttt gaagacccgcg ggcggcagggt cactgaagag taactccaaa
>.....ptUB1.....>

5881 tcacccgcgtt gagacttttgtt tttttccgtt atcccttoga agatgtgtttt ttcgtttaaat
>.....ptUB1.....>

5941 tgcgtcacaga ccacaaaaaa cgaaccatcg aagacatcga ctgcgtccgc gtgcatacg
>.....ptUB1.....>

6001 atggatgacc cacatctgtt ggacgcctcg cagacatcgatc tgcccccgt tcgtgaaatt
>.....ptUB1.....>

6061 ctctgcatca goggagtgat caggaatcat cgtctcaggc ggtatgacgtt goggagcagg
>.....ptUB1.....>

6121 cccggctcgcg gggggcgtca gatgccaaag ggtactactca ggaacgttgc gctcatacgca
>.....ptUB1.....>

6181 gaacagggtt ggtgcctgcgat tgggtgtggg ttgggtatccat tgggtggacc ggtggagatg
>.....ptUB1.....>

6241 cggccgcacg aaggggatgtt gtcagaaaca tttttttgtt tctctgtgaa ctttttagatg
>.....ptUB1.....>

6301 tgttaaaaacggcggaaattt aacccatcgatc cccctcgatgg ggttttcttc ttgtaaattcg
>.....ptUB1.....>

【図1A-8】

【 図 1 A - 9 】

8341 cccttaacta rataaggccgco gacacctaa tgtagcacatt ttgcagatog ataaatctcgcc
>.....DHPR.....>

8401 accgtggat cogccccatg cagttaaaacc gcacccatca agtgtaaacc ttgtttaggt
>.....DHPR.....>

8461 ogataaaaatg ctacccaaacc cccacccaa tggggccctg aggggtttctg cggccacgggt
>.....DHPR.....>

8521 ggccctacgg acttgcgtat ggctgtctt ggcacatcat gccaggctatg ggcgtataaaa
>.....DHPR.....>

8581 atgtggacac agtgggttga caagtgtttt ggcaggctatc agtggccatgg cgggtgggggg
>.....DHPR.....>
NotI

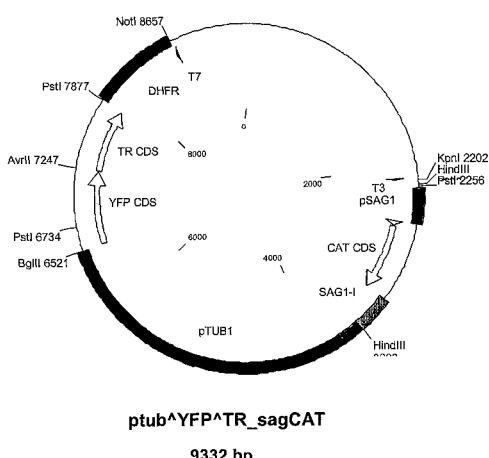
8641 gatccactag tcttagggcc cgccacccgc ggtggagctc caattggccc tatatgtggat
>.....DHPR.....>> <<...T7...<

8701 cgtattacgc gggctactgtt ggcgtcggtt tacaacgtcg tgactggaa aaccctggcg
.T7...<<

8761 ttacccaaact taatgcctt ggcacacate ccccttttcgca cagctggcgat aatagcgaaag
8821 agggccgcac egatcgccct tcccaacagt tgccgcgcgt gaatggcgaa tgggcgcgc
8881 cctgttagccg cgcattaaage ggggggggtg tgggtttat ggcgcggatg acggctacac
8941 ttggccagccg octagccccc gctccctttcg cttttttccc ttcccttttcg ccacacgttcg
9001 cgggttttccg cggtaacatg cttaatccggg ggctccctt agggttccga tttagtgcgtt
9061 tacggccatc cgacccaaaa aaacttgatt aggggtatgg ttcaactgtat gggccatog
9121 cctgtatagac gggtttttcgcc cttttttat gggatcccaat gttttttat aatgggttcc
9181 tggttccaaac tggaaacaacs ctcaacccctt ttcgttgcata ttctttttgtt ttaataggaa
9241 ttttgcgtat ttccggccat tggttaaaaaa atggatgtat gttttttttttttaataggaa
9301 attttaaacca aatattaaccc cttaacattt ag

【 図 1 C 】

Figure 1 C



【 図 1 B 】

TubYFP/TR-sagCAT

分子特徵：

型	始点	終点	名称	摘要
遺伝子	2172	2192	T3	シーケンシング用 T3 プライマー
領域	2271	2580	pSAG1	プロモーターを含む SAG1 5' 領域
領域	2581	2583	SAG1 ATG-I	最初の ATG
遺伝子	2581	2634	SAG1 CDS	SAG1 コーディング配列
領域	2632	2634	SAG1 ATG-II	2 番目の ATG
遺伝子	2638	3294	CAT CDS	クロラムフェニコールアセチルトランスクレーバーゼコーディング配列
領域	3295	3607	SAG1-I	SAG1 3' 非翻訳領域
領域	3614	3747	SAG1-II	tub プロモーターに転写開始させるために使用される 3' 非翻訳領域の反復部分
領域	3748	3799	ベクター	未知ベクターの部分
領域	3800	6520	BTUB1	プロモーターを含む TUB1 5' 領域
遺伝子	6530	7246	YFP CDS	黄色蛍光蛋白質コードイング配列
領域	6530	6532	YFP ATG-I	最初の ATG
遺伝子	7253	7876	TR CDS	Tet リプレッサー コーディング配列
領域	7253	7255	TR ATG-I	最初の ATG
領域	7886	8656	DHFR	DHFR3' 非翻訳領域
遺伝子	8710	8690	T7	シーケンシング用 T7 プライマー

【 図 2 A - 1 】

Figure 2 A

【 図 2 A - 2 】

901 ctctttgtatc cgagaggaggg atccaaacccgg cggatgttc tgcatgtgcgacatcttgc
>.....'7' DT-7-.....>

961 gaaacgtata atgcatgtatcgccatccatgttgcgtt gtgcatgtatc ttccgtaaaa
>.....'7' DT-7-.....>

1021 ccaaggccgt ttcgtcgccg agactcgccg ggaggaaaga cggacttttc tcccttttcca
>.....'7' DT-7-.....>

1081 sactgcgagc cacggggggcc catgtcaattt gaacatccacg caaaatcccc aaacgggtgg
>.....'7' DT-7-.....>

1141 ggtggagcccg caaactttttt tggatgtatcg cgttgatgtatcg gacgtcggtt gggggcttt
>.....'7' DT-7-.....>

1201 gtcgcgagccg tgggggtcgccg cgagagagccg acggccgtt acgcggcccgaa cgggttcttct
>.....'7' DT-7-.....>

1261 gggaaaccttc gatattttttt gacgggtttt ccataattt ctctttaattt ctatgttgtt
>.....'7' DT-7-.....>.....e.....>

1321 ttccttaggtg gctttagtcgaa cgggttttttccatcgatgttc gtgttcgtt gtgtgtccgg
>.....e.....>

1381 agtgccgcgaa cagatcgagg gggtttttccg ctccacacccgtt ggggttccca atttggatt
>.....e.....>

1441 ttcttcgttca ccatggggccatgtatcggtt cctggaaaagg gcatgttcgtc ctcttaggtat
>.....e.....>>
 >>.....cds.....>>
 >>.....>

1501 accatgatttta cggatccatcg ggcgcgtcggtt ttacaacatcg stgactgtggaa aacccttggc
>.....'LacZ.....>

1561 gttacccaaat ttaatcgccgtt tgccatgtatcgatcccccatttgcgatgtggcc taatagcgaa
>.....'LacZ.....>

1621 gaggccgcga cccatcgccgtt ccgttccaaacag ttgcgcgcggcc bgaatggcgaa atggggcttt
>.....'LacZ.....>

1681 gcctgggttttcccgccaccaggaa agccgtgtccg gaaatgtggcc tggagtgcgaa tttttcttgcg
>.....'LacZ.....>

1741 gccgtatgttccgtgtccgttccaaatcggttccgtatcgatgttccgtatcgatgttccgtatcg
>.....'LacZ.....>

1801 accaaatcgatgttccgtatcgatgttccgtatcgatgttccgtatcgatgttccgtatcgatgttccgtatcg
>.....'LacZ.....>

【図2A-4】

【図2A-3】

【 図 2 A - 5 】

3901 attgaccctta acgcctgggt gcaaaggcgg aaggccgggg gcccattacca gggccaaaga
 >.....'LacZ'.....>

 3961 gcggttgtgc agtgcacggc agatacaactt gctgtatggg tgctgttacac gacogctcac
 >.....'LacZ'.....>

 4021 gctgttcggcgc atcaggggaa accttttattt atccggcggaa aaaccttacccg gattgtatgg
 >.....'LacZ'.....>

 4081 agtgttcaaa tggcgattac cttgtatggt gaaatggcgca gcatataccg gcatccgggg
 >.....'LacZ'.....>

 4141 cggatggcgc tgaaatgcga gctggcgacg gtacgacagg gggtaaaactg gtcgttggat
 >.....'LacZ'.....>

 4201 gggccgcgaag aaaactatcc gcacccgcctt actgcgcgcctt gtttgaccc ctggatctt
 >.....'LacZ'.....>

 4261 ccattgttagt acatgtatcac ccggatggc ttccggcgacg aaaaacgttcc ggcgttgggg
 >.....'LacZ'.....>

 4321 acggcgccat tgaatttatgg cccacacccg tggccgcgcg acttccaggta caaacatccgc
 >.....'LacZ'.....>

 4381 cgcgtacgtc aacagcaact gatggaaacc agccatgcgc abtcgtgcgc cggggaaagg
 >.....'LacZ'.....>

 4441 ggcacatggc tgaataatcga cggtttccat atggggatgg tgggcgacga ctccctgggg
 >.....'LacZ'.....>

 4501 ccgtcgatgt cggggaaatt ccacgtggc ggcggctcgat accatttaca gttgttctgg
 >.....'LacZ'.....>

 PstI

 4561 tgtccaaaat aactgcggcc cacagaaggct gcccgttctt ctttttcctt tttttccggaa
 >.....'LacZ'.....>>.....DHFR.....>

 4621 gggatccagg agagtgcctt gggtcgagaa gagctgcacca ggggggttgcac gggcccccttgg
 >.....'DHFR'.....>

 4681 tgtccctttat cgaagaaaaag ggatgcactt tcatgtggca ttccacacag tctccacccgg
 >.....'DHFR'.....>

 4741 cccgttgttttcc ttttttgtcaa tcggaaacggc acggatgtcc ggggtggccca gatgtggcg
 >.....'DHFR'.....>

 4801 tatccaaactcg tgaatggctt atcggttctgt atgcgcctggat agtgctggac tttttgtgtc
 >.....'DHFR'.....>

【 図 2 A - 6 】

【 図 2 A - 8 】

【 図 2 A - 7 】

【 図 2 A - 9 】

```

7861 attatgttgtaa taaccgttatt accgccttgg agtgagctgta tacccgttcg cgcaggccgaa
>.....pKS.....>.....>

7921 cgaccgagcg caagcgactca gtggcggagg aaggggaaaga ggcgcggaaata cgcggaaacccg
>.....pKS.....>.....>

7981 ctctcccccg gggtttggccg atttattaaat ggatgttgcga cgacagggtt ccggacttggaa
>.....pKS.....>.....>

8041 aaggggcg tgagcgcaac gcaattaatg ttagttgtgt cactccatgg gcaccccccgg
>.....pKS.....>.....>

8101 cttagtaccat tatgttccgg gctgtatgtgt tgggtggat tggtagggaa taacaattttc
>.....pKS.....>.....>

8161 acacaggaaaa cagctatgac catgattttac ccaaggccgc atttaacccct cactaaagggg
>.....pKS.....>>.....T3 .....
```

【 図 2 B 】

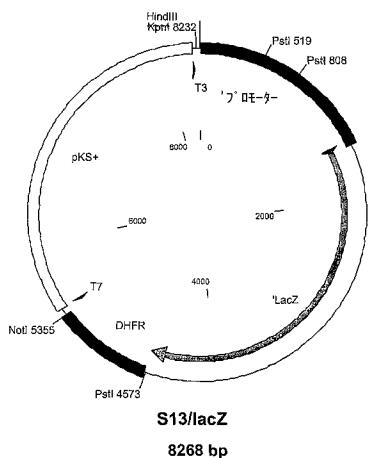
分子： S13/lacZ, 8268bp DNA 環狀

分子特徵：

型	始点	終点	名称	摘要
領域	1	1294	'プロモーター	プロモーター領域
領域	1295	1492	e	エクソン 1
領域	1453	1455	atg	ATG 開始コドン
遺伝子	1453	1492	cds	遺伝子
遺伝子	1495	4578	'LacZ	大腸菌 BL21 由來 LacZ 遺伝子
領域	4582	5354	DHFR	DHFR 3' 非翻訳領域
遺伝子	5408	5388	T7	シーケンシング用 T7 プライマー
領域	5408	8202	pKS+	pKS+ベクター
遺伝子	8202	8222	T3	シーケンシング用 T3 プライマー

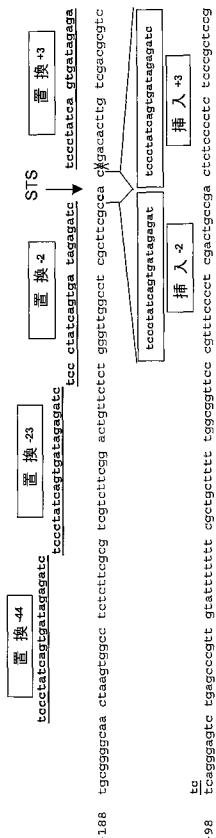
【 図 2 C 】

Figure 2 C



【図3B】

Figure 3 B



【 図 3 A 】

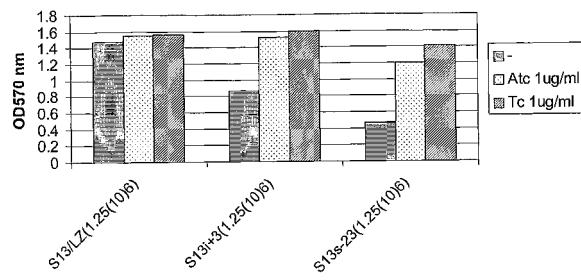
Figure 3A

8 tcggccat gaagtcgtg targctgtg agactatcac cattcccgcg ggaggctacgg ttggatgtgaa gtccgggggtg tggtactgtgaa
 N K S V Y A C E T I T I P A G V T D V K S R V V T V

【 図 4 】

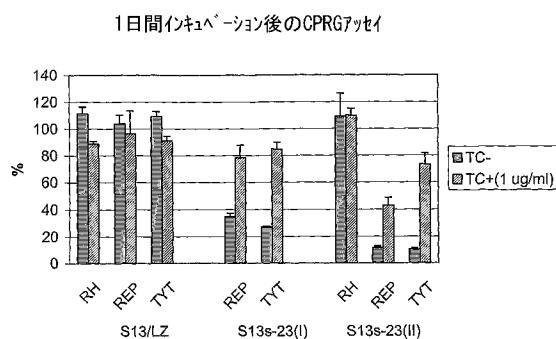
Figure 4

1日間インキュベーション後のTubYFP/TR(総溶解液の50%)

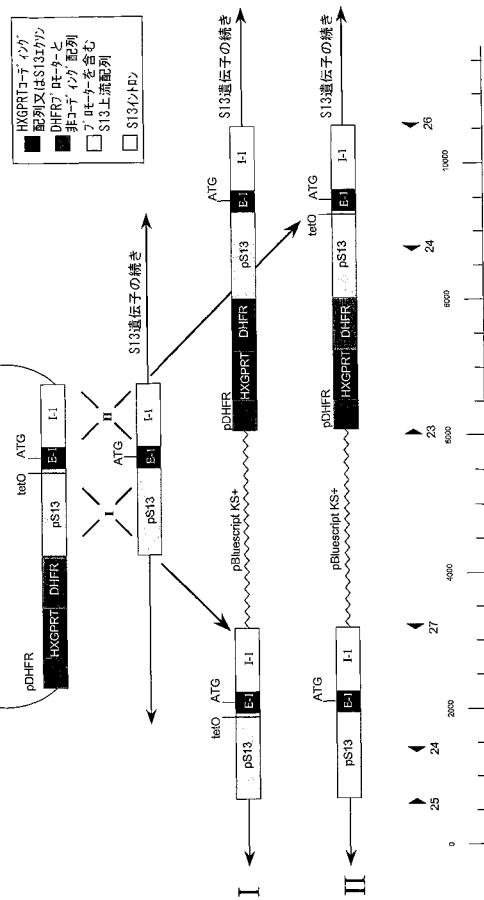


【図5】

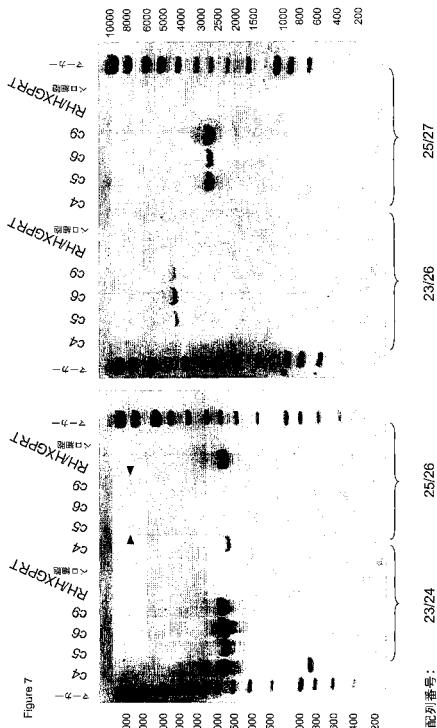
Figure 5



【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/10696
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/45 C12N15/63		
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) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 37185 A (HU SHI XUE ;UNIV TEXAS (US); XU HONG JI (US); ZHOU YUNLI (US); LOG) 27 August 1998 (1998-08-27) page 3, paragraph 5; claims 20-28	18
Y	YAN SHAFENG ET AL: "A low-background inducible promoter system in Leishmania donovani" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 119, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 217-223, XP002275471 ISSN: 0166-6851 the whole document	19,20
Y	YAN SHAFENG ET AL: "A low-background inducible promoter system in Leishmania donovani" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 119, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 217-223, XP002275471 ISSN: 0166-6851 the whole document	19,20
A	WO 00 66154 A (ZUTHER ELLEN ;LYONS RUSSELL (GB); ROBERTS CRAIG (GB); ROBERTS FION) 9 November 2000 (2000-11-09) the whole document	1-20
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 30 March 2004	Date of mailing of the international search report 16/04/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schwachtgen, J-L	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/EP 03/10696	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 942 403 A (REED STEVEN G ET AL) 24 August 1999 (1999-08-24) the whole document -----	1-20
A	WALLER R F ET AL: "NUCLEAR-ENCODED PROTEINS TARGET TO THE PLASTID IN TOXOPLASMA GONDII AND PLASMODIUM FALCIPARUM" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 95, no. 21, 13 October 1998 (1998-10-13), pages 12352-12357, XP001036851 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/10696

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9837185	A	27-08-1998	WO	9837185 A2		27-08-1998
WO 0066154	A	09-11-2000	AU	767117 B2		30-10-2003
			AU	4676000 A		17-11-2000
			CA	2377131 A1		09-11-2000
			EP	1150709 A2		07-11-2001
			WO	0066154 A2		09-11-2000
US 5942403	A	24-08-1999	US	5756662 A		26-05-1998
			AT	220797 T		15-08-2002
			AU	5362696 A		08-10-1996
			BR	9607531 A		06-01-1998
			CA	2215104 A1		26-09-1996
			DE	69622385 D1		22-08-2002
			DE	69622385 T2		06-03-2003
			DK	815450 T3		28-10-2002
			EP	0815450 A2		07-01-1998
			ES	2180754 T3		16-02-2003
			JP	11502923 T		09-03-1999
			PT	815450 T		31-12-2002
			WO	9629605 A2		26-09-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/015 (2006.01)	A 6 1 K 39/012	
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/015	
A 6 1 P 33/14 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/14	
	A 6 1 P 33/06	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フアン・ポツペル・ニコール, フランシスカ・ヨハンナ
オランダ国、エヌ・エル- 6 5 1 1 · エム・ゲー・ネイメーヘン、ファン・ウエルデレンシユトラート・ 1 0 5 · ア-

(72)発明者 フエルメーレン, アーノルドウス・ニコラース
オランダ国、エヌ・エル- 5 4 3 1 · ハー・ハー・クイク、コーフーンデルフエルド・ 3 4

(72)発明者 シュハーブ, テオドルス・コーネリス
オランダ国、エヌ・エル- 5 2 1 1 · セー・エー・スヘルトゲンボシユ、ファン・デ・ドワース・デ・ ウイルボイツシングル・ 5 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 DA02 FA02 GA11 HA01
4C085 AA03 BA02 BA03 BA04 BA05 BA06 CC05 DD61 EE01