

(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. Cl.	F I	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・ベー
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月17日 (2005.5.17)		オランダ国、6824・ベー・エム・アー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/010696		ネム、フエルペルウエヒ・76
(87) 国際公開番号	W02004/026903	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	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	欧州特許庁 (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 (Trypanosomata) 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 (Piroplasma) 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、クリプトスポリジウム (Cryptosporidiidae) 科又はサルコシスティス (Sarcocystidae) 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、クリプトスポリジウム (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 (Babesiidae) 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り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】

tetR 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 L9、S3、プラスチド - S9 又は S13、好ましくはトキソプラズマ・ゴンジイ (Toxoplasma gondii) の L9、S3、プラスチド - S9 又は S13 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ア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ア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 k D 未満であり且つ 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】

40

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、肝臓及び骨髓を冒し、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。

【0005】

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*Triatoma*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。

【0008】

アピコンプレックス門には例えばアイメリア科の寄生虫が存在する。多種多様のアイメリ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。これらのアイメリア種はいずれも家禽の кокшиジウム症に關与している。従って、アイメリ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。

【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。

【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がある。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кокши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。

【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、例えば蚊に伝播されるマラリアの原因として知

10

20

30

40

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. falci parum*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。

【 0 0 2 2 】

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。

【 0 0 2 3 】

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 1 0 0 % 未満の場合には使用が危険であるという点である。

【 0 0 2 4 】

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

【 0 0 2 5 】

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 】

【 0 0 2 6 】

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。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 7 】

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。

【 0 0 2 8 】

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免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。

40

【 0 0 2 9 】

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。

【 0 0 3 0 】

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。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

50

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み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リ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雄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., Hollmann, M., Schaffer, U., Mol. Gen. Genet. 251: 381-387 (1996), Saebøe-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、単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

40

【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。

【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/組織嚢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 *de novo* 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ア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孢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孢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。アイメリア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

スモ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Crabb, B. S. ら, (Mol. Biochem. Parasitol. 90: 131 - 144 (1997))とWu, Y. ら, (Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 1130 - 1134 (1996)), 及びProc. Natl. Acad. Sci., 92: 973 - 977 (1995))により記載されている。

【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Shkap V. ら, Vet. Parasitol. 65: 11 - 20 (1996)とHulliger, L. J. Protozool. 12: 649 - 655 (1965) 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Levy, M. G. and Ristic, M. Science 207: 1218 - 1220 (1980) 参照。

【0044】

S. suis hominis や S. neurona 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denovo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Murphy, A. J. and Mansfield, L. S. J. Parasitol. 85: 979 - 981 (1999) 及びEllison, S. P. ら, Vet. Parasitol. 95: 251 - 261 (2001) 参照。

【0045】

キネトプラスト (Kinetoplastida) 目に関しては、Trypanosoma brucei (Wirtz, E. and Clayton, C., Science 268: 1179 - 1183 (1995) 及びBiebinger, S. ら, Mol. & Biochem. Parasitol. 85: 99 - 112 (1997))、Trypanosoma congolense (Inoue N. ら, Mol. & Biochem. Parasitol. 120: 309 - 313 (2002)) 及びLeishmania donovani (Yan, S. ら, Mol. & Biochem. Parasitol. 112: 61 - 69 (2001)) 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。キネトプラスト目の本発明の生きた弱毒寄生虫を構築す

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、組換え用マーカー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。リーシュマニアと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(>100~500kb)ポリシストロンクラスターとして構成されるため、リーシュマニアと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. ら, 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と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と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、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. ら, 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. ら, 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tetプロモーター/tetオペレーター複合体(tetRシステムとも言う)である。

【0054】

tetR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。tetR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のにも成功している(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(tetR)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エレメントの組込みの2段階を実施する必要がある。

【0057】

tetリプレッサー遺伝子はtet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tetリプレッサー蛋白質を合成する。tet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、tetリプレッサー蛋白質はtet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tet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。例えばアイメリア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(

40

50

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。

10

【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る(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。

20

【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る。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。

30

【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 Clayon, 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。

40

【0063】

単一tetオペレーター(tetO)部位の配列は5'-TCCCTATCAGTGATAGAGATC-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ましい。

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る。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. METH ODS 13 (2) : 123 - 133 (1997))。

20

【0069】

ア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 - 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スプロゾイ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 - チミジル酸シンターゼ(dhfr - ts)コーディング配列、又はピューロマイシン - 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る。

【0074】

この態様の好ましい1形態はコクシジウム(Coccidia)、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、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidiidae*) 科又はサルコシステイス (*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、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) 属、トキソプラズマ (*Toxoplasma*) 属、サルコシステイス (*Sarcocystis*) 属又はネオスポラ (*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 (*Babesiidae*) 科又はタイレリア (*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 】

この態様の更に別のより好ましい形態では、生きた弱毒寄生虫はトリパノソーマ (*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 1 3、好ましくは *Toxoplasma gondii* の L 9、S 3、プラスチド - S 9 又は S 1 3 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 】

10

20

30

【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

【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

20

30

【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

【 0 0 9 1 】

スモールサブユニットリボソーム蛋白質番号 3 (S 3) 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。

【 0 0 9 2 】

【 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。

【 0 0 9 3 】

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アーを含有する寄生虫感染防除用ワクチンに関する。

【 0 0 9 4 】

医薬的に許容可能なキャリア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る。より複雑な形態では、キャリアーは例えば当分野で周知の緩衝液（例えば P B S ）とすることができる。

30

【 0 0 9 5 】

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 C a r b o p o l （登録商標）（ホモポリマー）である。

【 0 0 9 6 】

ワクチンは更に所謂「ピークル」を加えることができる。ピークルは蛋白質が共有結合せずに接着する化合物である。このようなピークルは例えば脂質小胞、I S C O M （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、リボ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。ワクチンピーク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

【 0 0 9 7 】

抗原をピークルに部分的に埋込んだこのようなピークルの特殊形が所謂 I S C O M （ E P 1 0 9 . 9 4 2 , E P 1 8 0 . 5 6 4 , E P 2 4 2 . 3 8 0 ）である。

【 0 0 9 8 】

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 S p a n （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化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ア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するであろう。これはM e i s s n e r M r a (N u c l e i c A c i d s R e s . 2 9 (2 2) : E 1 1 5 (2 0 0 1))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り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り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 < 60 k Dでなければならない、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G P I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。

10

【 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 】

20

「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す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。

30

【 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 】

40

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 - 100 ~ + 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。

50

【実施例 1】

【0117】

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。

【0118】

【表 5】

配列番号:	#	名称	配列 5' → 3'	
5	1	SAG3-FW	CGATAAGCTTCGAATCTCTGAACGGATGTGT	10
6	2	TUB5-RV	CGAGATCTGGGAATTCAAGAAAAATGCCAACG	
7	3	TETAVR5-FW	CGATCCTAGGATGTCTAGATTAGATAAAAG	
8	4	TETPST3-RV	CGTCTGCAGTTAAGACCCACTTTCACATTTAAG	
9	5	T3	ATTAACCCCTCACTAAAGGGAA	
10	6	SAG1/1634-RV	CGATAAGCTTTCGGGGGGCAAGAATTGTGT	
11	7	REV 13A	GCGCCCCATGGTGACGGAGAAAAATCG	
12	8	REV 13B (ネステッド プライマー)	GGGAACCGCAAGGTGGGAGCGGAGAAC	20
13	9	S13PROMFUS FW	GCATAAGCTTCCTCGCAGAGATTGTCAGTG	
14	10	S13PROMFUS RV	GCATTCTAGAGGCAGACATGCCCTTTCCAGG	
15	11	LACZ-AVR II FW	CGATCCTAGGATGACCATGATTACGGATTCACT	
16	12	LACZ-PST I RV	CGATCTGCAGTTATTTTGGACACCAGACCAA	
17	13	S13INSTETO+3FW	GGTTCTCCCTCAATCCCTATCAGTGATAGAGATCTC TCTTCCTTTCTCT	
18	14	S13INSTETO+3RV	AGAGAAAGGAAGAGAGATCTCTATCACTGATAGGGAT TGAGGGGAGAACC	30
19	15	S13SUBTETO-23FW	CTACGCGGCCGACGGTCCCTATCAGTGATAGAGATCT TCCTCGACGGGTTC	
20	16	S13SUBTETO-23RV	GAACCCGTCGAGGAAGATCTCTATCACTGATAGGGAC CGTCGGCCGCGTAG	
21		S13NOTI-FW	CGATGCGGCCGCGTCAGTGCATGACACAACCG	
22		S13SACI-RV	GCTAGAGCTCCTGTAAGTCGCCAGAGAAGCAC	40
23		M13-REV	AACAGCTATGACCATGATTACGC	
24		S13CL FW3	CGATAGTGTGCAATAACAGG	

25	HRCHECK II 5 S13- FW	GTCGAGTCCTGTAGGTTTCATC
26	HRCHECK II S13-RV	CTCCGAAGGAGTCTCTCAGTG
27	T7	AATACGACTCACTATAG
28	HXGPRT/BGLII-FW	CGATAGATCTAAAATGGCGTCCAAACCCATTG
29	HXGPRT/PSTI-RV	CGATCTGCAGTTACTTCTCGAACTTTTTCGCG

10

【0119】

TubYFP/TR-sagCAT(9332bp)の構築。

【0120】

プラスミドptubYFP/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ptubYFP/YFP-sagCAT構築物(Llopis, J.ら, PNAS 97(8):4363-4368(2000))からToxoplasma gondiiチュープリンA(tub)プロモーターを増幅することにより構築物ptubCAT/GFPを作製した。PCR産物とプラスミドpdhfrCAT/GFP(Striepen, 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ptubCAT/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 - チュープリンプロモーターを含む。

20

【0121】

ptubYFP/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ptubYFP/YFP-sagCAT構築物からBglIIとAvrIIで切り出し、ptubCAT/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(Hillen, W. and Berens, C., Annu. Rev. Microbiol. 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ptubYFP/TRと命名した。

30

【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、ptubYFP/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ptubYFP/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、ptubYFP/TR構築物のユニークHindIII部位にライゲーションした。

40

【0123】

TubYFP/TR-sagCATの構築とその完全配列を図1に示す。

【実施例2】

【0124】

50

Toxoplasma gondii のリボソーム蛋白質遺伝子 S 1 3 の転写開始部位の決定

リボソーム蛋白質遺伝子 S 1 3 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 HXGPR T 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 増幅し、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 REV 13 A (# 7 , 配列番号 11) 及び REV 13 B (# 8 , 配列番号 12) を使用してリボソーム蛋白質遺伝子 S 1 3 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 3 A 及び 3 B 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】

S 1 3 / L Z 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、単一 tet O 部位の存在下又は不在下で S 1 3 プロモーターの制御下に lac Z 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 S 1 3 / lac Z (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 tet O 部位の配列を挿入又は置換した。

20

【0126】

プライマー S 1 3 PROMFUS FW (# 9 , 配列番号 13) 及び S 1 3 PROMFUS RV (# 10 , 配列番号 14) を使用して *Toxoplasma gondii* RH / HXGPR T 株のゲノム DNA から S 1 3 のプロモーター領域を PCR 増幅した。プライマー LACZ - AVR II FW (# 11 , 配列番号 15) 及び LACZ - PSTI RV (# 12 , 配列番号 16) を使用して BL 21 細菌のゲノム DNA から lac Z コーディング配列を PCR 増幅した。次に、S 1 3 PCR 産物を Hind III と Xba I で消化し、lac Z PCR 産物を Avr II と Pst I 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 S 1 3 プロモーター部分で置換した。残りの YFP 遺伝子を lac Z 遺伝子で置換し、S 1 3 / lac Z プラスミドを得た。S 1 3 / lac Z プラスミドを使用して部位特異的突然変異誘発により単一 tet オペレーター (tet O) 部位の配列 (5' - TCCCTATCAGTGATAGAGATC - 3') を挿入又は置換した。これは QuickChange (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。tet O は決定した STS の近傍に挿入又は置換した。プライマー S 1 3 INSTETO + 3 FW (# 13 , 配列番号 17) 及び S 1 3 INSTETO + 3 RV (# 14 , 配列番号 18) を使用し、STS を 0 として + 3 位に tet O 部位を挿入した。プライマー S 1 3 SUBTETO - 23 FW (# 15 , 配列番号 19) 及び S 1 3 SUBTETO - 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 tet O 部位を挿入した。これらの 2 種の構築物 S 1 3 insteto + 3 / lac Z 及び S 1 3 subteto - 23 / lac Z と S 1 3 / lac Z 構築物を *Toxoplasma gondii* 株 RH HXGPR T、REP 1 / 2 (Meissner, M. ら, Nucleic Acids Research 29 (22), E115 (2001)) 及び tubYFP / TR で tet R 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 (Seeber, F. ら, Gene 169 : 39 - 45 (1996)) により試験した。

30

40

【0127】

50

S 1 3 / l a c Z 構築物を図 2 に示し、S 1 3 / l 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。

【 0 1 2 8 】

L 9 / L Z 構築物

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

【実施例 4】

【 0 1 2 9 】

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。

【 0 1 3 0 】

R o o s , D . S . ら (“ M e t h o d s i n M i c r o b i a l P a t h o g e n e s i s ” I n M e t h o d s i n C e l l B i o l o g y (1 9 9 4) , D . G . R u s s e l l , e d i t o r) 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。

【 0 1 3 1 】

K i m , K . ら (S c i e n c e 2 6 2 (5 1 3 5) : 9 1 1 - 4 (1 9 9 3)) 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。

【 0 1 3 2 】

再び R o o s , D . S . ら (1 9 9 4 , 前出) に従って S 1 3 / L Z 、 S 1 3 i + 3 / l a c Z 及び S 1 3 s - 2 3 / l a c Z 構築物のエレクトロポレーションを実施した。

【 0 1 3 3 】

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単一 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。

【 0 1 3 4 】

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。

【 0 1 3 5 】

b) S 1 3 i + 3 / l 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) 。

【 0 1 3 6 】

c) S 1 3 s - 2 3 / l 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) 。

【 0 1 3 7 】

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。

【 0 1 3 8 】

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。

【 0 1 3 9 】

構築物 S 1 3 i + 3 / l 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。

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

50

構築物 S 1 3 s - 2 3 / l 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 / l a c Z (I) (= S 1 3 s - 2 3 / l a c Z)

c) S 1 3 s - 2 3 / l 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 / l a c Z と同一である。この構築物は S 1 3 s - 2 3 / l a c Z (I) と同様の方法を使用して構築した。

20

【 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。

【 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 オペレーターエレメントの挿入。

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 ら (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フェラーゼ (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込むことが可能である。

【 0 1 4 9 】

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1 1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の正の選択下を実施される。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tet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DHFRプロモーターの制御下にH X G P R T選択カ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 Rnase H-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/BGLII-FW(配列番号28)及びH X G P R T/PSTI-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pdhfrCAT/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、pminiH 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 3NOTI-FW(配列番号21)及びS 1 3SACI-RV(配列番号22)を使用してtet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pminiH 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 3SUBTETO-23FW(配列番号19)及びプライマーS 1 3SUBTETO-23RV(配列番号20)を使用して置換によりtetオペレーターを挿入し、pS 1 3s-23/pminiH X G P R Tを形成した。

【0152】

環状pS 1 3s-23/pminiH 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M13-REV(配列番号23)、S 1 3CLFW3(配列番号24)、HRCHECKII 5 S 1 3-FW(配列番号25)、HRCHECKII S 1 3-RV(配列番号26)、及びT7(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(c4, c5, c6及びc9)を詳細に分析し、RH H X G P R T株とベロ細胞のゲ

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-REV(配列番号23)はトランスフェクトしなかった寄生虫(RH HXGPR 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(2.8 kb)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HRCHECK II S13-FW(配列番号25))又は下流(プライマーHRCHECK II S13-RV(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 HXGPR Tで観察できるような~2.6 kb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2.6 kb 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10 kbの産物を観察することができる。クローンc6には10 kb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/pmniHXGPR 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-REV(配列番号23)はベクター配列内に位置し、プライマーHRCHECK II S13-RV(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HRCHECK II S13-FW(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4.6 kbの産物が得られ、組み合わせ25/27により2.6 kb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】TubYFP/TR-sagCAT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】TubYFP/TR-sagCAT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】TubYFP/TR-sagCAT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】TubYFP/TR-sagCAT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】TubYFP/TR-sagCAT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】TubYFP/TR-sagCAT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 1 A - 7】T u b Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図 1 A 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 1 A - 8】T u b Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図 1 A 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 1 A - 9】T u b Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図 1 A 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 1 B】T u b Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図 1 B は T u b 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 1 C】T u b Y F P / T R - s a g C A T 構築物を示す。図 1 C は T u b Y F P / T R - s a g C A T 構築物のマップである。

【図 2 A - 1】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 2】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 3】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 4】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 5】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 6】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 7】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 8】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 A - 9】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 A 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 2 B】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 B は S 1 3 / l a c Z 構築物の該当特徴及び領域を示す。

【図 2 C】S 1 3 / l a c Z 構築物を示す。図 2 C は S 1 3 / l a c Z 構築物のマップである。

【図 3 A】図 3 A は r p - S 1 3 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 S 1 3 - 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 - 2 3 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 3 B】図 3 B は r p - L 9 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) $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の存在下又はテトラサイクリン (T c) $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の存在下に構築物 S 1 3 / L Z、S 1 3 i + 3 / l a c Z 及び S 1 3 s - 2 3 / 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。O D 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 %) を使用したことを示す。

【図 5】構築物 S 1 3 / L Z、S 1 3 s - 2 3 / l a c Z (I) 及び S 1 3 s - 2 3 / l a c Z (I I) 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 I I 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 10
<160> 29
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 4834
<212> DNA
<213> Toxoplasma gondii
<400> 1
cctagtgtgtg ttgcgaacag tacaccgtcc tgagtgtgtc gagaacatca gagatgtgca 60
cacgcaatag cggtcgcga agggtgcatt tgtccacatc gggatgcaca gagggtgcacg 120
agtcgcacaa aagcagatac tagagacaag gagagagtgc ggcctaacca gaattcgact 180 20
cagtttcttg acccattcgt tagggtcggt ctacgcctcc ttcaggattt ccgtcaagac 240
atctttgtcta gcttcccgtc gcagacatga aaggcagtgt cagcataaa gagccgattg 300
aaacgcagtc acagagatac gaagaaatca aagcccggtg aaagcgaacg gctgggatgt 360
agctgagaaa gcaaatcac tggcgggtgca aagagccaat gaaatcaggg tcgcgtagag 420
gaactataaa acgtgaaaaa cgtgccttcc gactctcgca aaggtgcgca tcgatccac 480
atttgagaga aggttgcgag gcagtaataa gggcagggga gaggataaaa tccgatagac 540
ccagttcttg gtctcccgag acggggacag gaccggacgc ctgcaagggt ggatcacaac 600
tccagaggca aagccgccac ggaggaacgg aatccatgac cgagtggat tataacgaag 660 30
aggtgtttgt cgtcggaatg gtgccaagac aaaaaaaaaa aaatgttttag acgctcgact 720
gtgcactagc gggggggcgg gtgcaaaagg gacgagtgtg ctcagtgggt cggaggtaac 780
tgaaaaaacg gtgcaaaata tggagcctta cgtggagcgg cagggggcag aacagatgtc 840
tcagaagaaa gtccgagaga acagaagaaa aacgagaaaa gtgatggcg actcatgcag 900
agtggcgcga cgagtctgtc tctcagacga gcttaccagt gctggcgga ggtaaaggaa 960
agaagtcaag acgcgacct tgaggggggt ggacagcatg atgaatcgct gatgtatgta 1020
ctttagaagc gcaggagtta agagtcgagc ggcattggcag gacgaccagt tgcctttat 1080
gcttcgcaga taggcaatat atctgctgct gagggcctca tttctggaga gttgcgttgt 1140 40
ccctgtcgtc gcctcatcct ttatctcgt gtttgtctct tccagggcag cctctgact 1200

accgccaac gggcttcctt ctccggtatc cttttgagat agccgtagaa gcagaggaag 1260
 agccgtcaga acgcttgccg cggcagaaaa acacttaaag ggcgtcacaa gattgatata 1320
 ggcaagagga atggacgtca acaggctgat tcataagtga cgctcccagt aagtggcgga 1380
 cagccatgaa aatgagcggc cgagtttgca gaaacagaga aagaggtctg catcctggcg 1440
 aagagccgcc ggacaccctg cttctctttc acagttcgta ggtgccaaga ccaggaccaa 1500
 attatcgccc ttcttagcaa accttgagcc gagttaccgg agaggttagc cgaaaaagaa 1560
 tcgaaacgaa gacgccattt ttgtctcca ttgcacacgg acggaccgta gcttgctctt 1620
 cagcatatct tacgacgttt tgcggctggt atcgctaaca caccacaaag agaaatggtt 1680
 tatcgaaaaa cttgttagcc ggatggtaaa gagatgcaga aggcagtccg cagtaattcg 1740
 gttttcgtea gttgtggcgt gctggcacac tcacgttttt ccagcgtcac atgctgcctg 1800
 attcacgcag aaactgcatt tgcgtgcgt gtctgcctg cctcaggatg ccttgcctg 1860
 ccgatagtga ggaaggaaaa acggctccag caaaatgttg gttctattcg gcgagtgcg 1920
 gtattccttc cacaaggctg agacaccgtc gagtgttttc cttccggact gaaccocgga 1980
 aaagtcactt tgcaccgtag attccacgtg ctccagcgcg gctgtcaatt ttogacactg 2040
 cgcgaaacggc ttgccaacaa gaccaggctc gcgcgcccg cttttcacat tcccgacggc 2100
 ttatatacgg aaggctttgc caggcgtatt ctggcccggt ggggtcgaaa gaaagtcgaa 2160
 aaagagcatg cttgtcaagt gcatgcggcc atgtagggtg ctaggacccc tgttaaattt 2220
 ccagggtgcg gggcaactaa gtggcctctc ttgcgctcgt cttcggactg ttctctgggt 2280
 tggcctcgtc tcgccacaga cacttgctga cgcgtctcag ggagtctgag cccgttgat 2340
 ttttttcgct gtcttttttg cggttccggt ttcccctcga ctgocgaact tcccctctcc 2400
 cgctccgtcg ccaccatgaa gtctgtttat gcctgtgaga ctatcaccat ccctgcggga 2460
 ggtaagtttc tcgacctacg agagggtgaa ctgcggagaa gacgaatgaa acattgcccc 2520
 gcttgatctt tgaggagag ttgccagatt ctgcggctcc acagccctcg ttttttttcc 2580
 tcccgcatgt gttagatgtg tcccgacccc gagggagcgc atcgacacgc tgggaaggaa 2640
 cgcccgatga gcggaaaagt tttggaattc aggccccgat gcgcaaagtg gcaagtgtct 2700
 tggacccac tcaggaagcc gaacagcagc attttacaga tcttcgccac tgaggagggg 2760
 ggccggtctg ggaggtgaag aggcgcggaa ccgtgttcca cttggctttt ctccgattc 2820
 gctgtgtctg ctctgcgtca aaaatccgca tgccttggtg tcattcaaag aggtcatctg 2880
 ggccgcttgt tctttgttct gccgcatcca caacagtctg acccgccaga gaatacggtc 2940

10

20

30

tgttctgtcc ggtgactggc gatggggaaa tgggggaaac tgtgtcgtca gcgagtgaag 3000
 gcgtttttta gtggaatttc tacattgtgc aagcacacag aagggtgtccc gtgctaatat 3060
 ctggaacagt agattatgat taggtagtgg aacagggaga gcgtctgttg tacatcactg 3120
 tctgcactcg tttgtactac aacgaagtgg ttgatgcgt gacttgggtg tcgattgcat 3180
 agacatagcg tggaaaagta gaagacaggg ttgtatgcga ggctctgtgt gcacctgttt 3240
 catgtggaca agaccaccgg gcatatgctg gctgttgctt caacacgctg cggaaacatg 3300
 tcacggcggt gcgggggaaa ggagtctgtg tagaaacat agagagagtt gaggtagctc 3360
 ttgatgtctc gcaaaaatgg gactggcacc tgttgtctgt gtcttcgatt aacacgagcg 3420
 ccgccactgc gtttgatgct cgctaactgg gcagcgctgt gtacgtacag ctcgaaatagc 3480
 gtaatttgtg tttttgtac tctttctgtt tgagtttcat caaagagggc cagccacaaa 3540
 atgggagcag ggggatattg gagggcatat gataagtgcc gcctgtgtgc atacttctag 3600
 aatagacagg aattcgagag cgaagctgtc tgaacagaga tctgcaggtt ctggtttgac 3660
 tgtgtaggca ggtttctgta gcgacgggag tgcgaatgca gagtgcgct tggatttgg 3720
 tgtttcaaga tgtttgcac cctctgagag caatcgctt ttgtctgtt ttgcgtgtct 3780
 ctcggtgtg tgccttctga aagaaaatgt tgcacgctt tgcggtttt tgcgtcagtc 3840
 acggtggatg tgaagtcgcg ggtggtgact gtgaaggcca agtaggcgaa atcacgcgtg 3900
 cattccgcc cctccctgtc gacatccaga agaccaagtc tggaaaccga ctgaaggctg 3960
 agatgtggta tggaaactgc acagacctca gctgcacccg cacgctgtgc tctcacatca 4020
 agaacatggt cactggtgtg atgaagaagt tccagtacaa gatgcgcttc gtgtatgcac 4080
 attttcccat caacgtgaac atcagcggca acggaactgt cgtcgaaatc cgcaacttct 4140
 tgggcgagga gcgtgtgcgg atcgtcaaga tgcttcggg agttaagtgc gagaaggcca 4200
 caaacgtcaa ggatgaaatc gcgctcactg gaactgacgt cgagctcgtc tctcgatcag 4260
 gtagaggctc cgaggaaactg aaaagggcg tgggtgtgccc gtatgcgcgc atctaatatg 4320
 agttttggag gtgcggaggc agcaaggaa cgtatagatg tgggcattta tgaatgtgca 4380
 tctatgttgg tgtaattctg tgtatgcctg attgcgacgt gccacaacc acctccaggt 4440
 tggagaaga gagaaactga taacggtgga ccccgagagc gggattaccg ggaactctcg 4500
 gacggtcgtt gtatactcat ctacgtggg cgagggggag gtggtttgtc cttcgatgtt 4560
 gccacagatt tggaggtgag gtgtcttcat atcctgcatg tgtgtctgca ccagcagata 4620
 tgtaactgc caggtagagc acgttgtcga gccacaggt tttttgtgta tctgcattgc 4680
 attaacatgg tttgtattct tctgttctgt atgcttctct 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

10

<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
 atcgcatgac ctgatcacgc acggaaagaa acgaatagtc gccatttgaa gtgagatccg 60
 tgtgaacagg tcgatcaccc gaatcggacg atatatgcac tgaaggcagc ggagccagct 120
 gtaaacaag aactggacag cagctaccgt agctgtagac ggacgcgact tcgagagcgt 180
 ccacgtcaaa cctcacccgat ctgcacctca taaagaggca tgtgggctgg gagatacagg 240
 ggtgaagaag gagagacaat ttgcgtaagg aggcgaagct ttcgatttcc aggtgcgatt 300
 ggagtcgccc ccacaggaga cgcgaactcc tcaaaaacgg acacggagaa gccctgtgca 360
 gagacaacgg aaagaatgtc ctgacgagag agttgcaaaa gaatgttgaa caattaaagc 420
 aatgatgcag actcgaagat ctaacgcctc gcaggtctca acggttgctg tgatcgcccc 480
 ttacacagt cottaagttg agtgcagtag aggccttgca gctcaaggca acgctgtaaa 540
 cagcagtggt atgaatcggg tgccnntatt gaggcgtctg cgtctggctg gtccatcaag 600
 ccaaaagacg cttgtaaaaca ggatnntcca ttogaatgmn gacagacagt ttggcaactg 660
 tcatcacacg tgacgttaaa aggcaccgtt aagcgcatga caaggaaagg tcacccgcga 720
 ttacacaca ccagggtgcg tagctgtcga tgaatgcgaa ttccagagtt tttctctccg 780
 acactacata agctgtaaat gctcattctg tcattcgttg accgtgttta ctacggggaa 840
 tcgagaaacg gaatatcaag aacacaggct gtcaaaagac accgcgaaac ctgcttgccg 900
 aatctaacgg ttgcctctgg ccatttatgt gtttctcgcc tgtgccttgt tcgctgcaga 960

20

30

cacagcctga gtccgcagcg aggtaaatac gaagaaaaac ctgacgagct ctgtcagatc 1020
 tgtacaagcg acagaagcgg attgacagag gagagtgcgc gacggtgacg agagtgaagag 1080
 tcgactacga agttagagga caccaggggtg gcgaatgtgc caatacgcag cttgaaaggg 1140
 tcgagatcga caatcgaaac tcacttcact cgttaaaaca tcgagcggtt gctgcagggt 1200
 ttgtttgggg caccgccctt ttgccttccc acccatcgga ttcagccgcg agtactccac 1260
 cagcaaaaaca gcatcgaggc cgtatgcctc gaagaagtct ccaacctgca aaagaaaggc 1320
 accacgtcag agcaaggaaa tcaagactca accaggtgta cagacaccgc ataccgtcgc 1380
 caggaacccc ggtctaggac aactttgcta gtgtgtctca aaaggtggaa cggagaaggc 1440
 gagacagcag actggcgggtg ccagttcaaa tcaccactgc ctgaagcgcg gggaccgaga 1500
 cagtttgoga tgttggaatt cctgtgacgc acacactttg gaacttgctt gaataatcag 1560
 aactttgtcg ggccgaagtc gttttgttc tcgtacgaag acgaggagag gaggcatatg 1620
 cagggagtca ggaaccatcg acggatggtc gaaggaaaga aaagagagct gccgccggga 1680
 agcgggacgg gaaagaagcg gcagccttgc caagaacgtc ggggtgtactg ccaccgaggg 1740
 aggcgggcag ctttctgcag acgaacgcag aacggagcag ttttcttcg ctcttcgact 1800
 cggcttcggt cccagcaggt tgtcgcgcgt cggcgcttcc ggacgcttct gcgtgtggaa 1860
 gaagcggccg gacaggcggg atcggtttga agggaaatga gtctgcctgt ctgaaatcgc 1920
 gtgaggcaac tgaatggctg gacgtgcgag gcgtcggctc ggatggacaa caaaagcgac 1980
 gcgtcgagaa gaggcaagaa agggcaagct ggcgcgacag ccacgcaact ggctgctgc 2040
 gtcccttgca gctgccgaaa agaagtccag cagctgatgc tgcccaagag tggcccaccc 2100
 tccgcagctg ctgtcgcgtt tcgcgacctt ctgtaaaaaa ctcttgagcg tgcggccgtg 2160
 catcttgctt gcggaaagca aggcattgat cgaccagtac gcttgcgga cggagcaggc 2220
 taaacctgc cggcaaccgc gctgtcgcg aaacatttcc atcagcagtc tcgcgttgac 2280
 ctccactgag atgcacacaa gtgaaaagag aatcgtctgc agtttccagc gatagcgcgc 2340
 gaaagaagcg gagccgcgga gaggcgcccc cggacccgaa gcgggcccga gagcgcgaga 2400
 ggcaatggag caaaaaaatt cctgcctaga ggagaatcgc cattcctggt caccgtcact 2460
 gcatacagaa tccctccca tcgtgggtct gatgaaaaag agaaaaggac accattgtgg 2520
 tgtggagccg cggtgccgtc tcggctttcc cgttgggtcaa tgcagaagcg cgtccccagt 2580
 gactagagcc gaaccaccgg cgactccaat aaaggggcct tctactccat tcaggggtgt 2640
 cgcattggtaa aactgagttc tctaattcat ggcacacctc ggaaaaaac tactcacagt 2700
 cgtggaatat cttaaatagt cgagcgctcc agagtaccaa gctgcaatgc ccagctgcct 2760

10

20

30

ctcggaacaac accggtggac taggcagcgc atcaaggaga cccccccag aggcggcctt 2820
 actccagaac atgcgaagga tgtcactggt gatgcaaaat cagggtactg accatcaagt 2880
 gaacagtttc tagagtatcc acgtggctcc aaaaagtaaa gatatggccc acatcaaacc 2940
 gagacyagcc tgtcttcggt agaaacgctc gtgccgatga cgtcagtgca tgcacgctgc 3000
 agacacgacc caaagtagct gatacgggta ggaatgagca tgctgccgat tcaaaatcgt 3060
 cagtcgcggc tacagcagtg ttttatgtac atcctcgttt tctttttatt caagaaaccc 3120
 aggtaacatg tgcttgaagg gcgacttgg gtagaatggc cctcgaaagt tggcgccgag 3180
 gggttcgggtg cagccttcca tcctgggctg taatgtgtct tgcgtatatt ctctgcgggc 3240
 ctgcagtcgg aactgccttc atagtccctc aacgcaacct gcatagcttt accaggaatt 3300
 tccgtgtcct tcccttggtt ggggaagcgt ggtttgcagg agatgcagct gtgcaacact 3360
 gtaaaggctg gtttcagcaa acgggactct cccctcggtc actcccaggg agtgtcggcc 3420
 aggtgacggc ctggtctgcg gtcacagaag gatgtccttt cgaagatgca gtccatgaaa 3480
 ctctccttcc tagtgactgg gtggagagga gtgaaccac agctctaggg acggatgcca 3540
 cactctcaag cattccatcc gagctacctg agcctggaac gccgcggaac agcttctcat 3600
 ggggcacccc gaaaaggtag tgacgagaga atgctttctc agaattgac ctctgccttc 3660
 tgtgagaaac actgtcacga ggactgcaat cttttcagggt gtatcttttc tgtacagctg 3720
 tgcagcgttc acgcttttga cgggagagta cccgtgatgt gacttgcggg ttgggtagag 3780
 cctagtcag ctgtctgtca tcttctgaac gggagttagg aagccgtaac aactaatatg 3840
 tgcacgcggg tttctccggt gtgcgcgtgg gcaggtotta tgcaagggtt cggcttcccc 3900
 ctgggtctgg aaagctgacg atcaacaaca gagacgcagc cgactatctt caagacaatc 3960
 catgggtgat tcataattgc atcgccccac tcattggaact gcagctggag aatgaatttg 4020
 atatcattgc ggaggtaaac cacgttagct agcttcgggt gacagtcgat atgtttcgca 4080
 atgatttctt acagcgtctt tcctacgttt ttgcttgctt tcgacatcag gccacgggg 4140
 gaggcctcgg cgggcagctc ggagcaatca tgcttgctgt cgctcgggag attgtgcgac 4200
 agcgaccgga actgcgaccc cctcttcggc gagcagggtt tctgacgta gacgcaagga 4260
 aggtcgagag gaagaaattt ggtcttcgga aggcgagaaa gaaggacag tacagcaaac 4320
 ggtaggggtgc gtaggtca 4338

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

10

20

30

40

<400> 3
 cctcgcagag attgtcagtg catgacacaa ccgcgaaaag ccggcagccg cggtaatacg 60
 gggacgagga aaacgactga gcgtcacaaac agaagcagcc gagtaaacgg cgaaggaaat 120
 ggaaaggacc caagtaaaat ttcttgaaga atttcagcgc aacaactctg cgggttcttg 180
 cgaatagagg aatttcactt cctcatcgtc tgatttatgc ttcatcatc tgccgctcaa 240
 cagccgaata aacggttctc ggctcgttcc ttaaaactcta cttcagtagt tgaaactctt 300
 ttgcttcacg agccttcgtc tcagccctca ccgtcctgag ttctgtcttt gttgaggaaa 360
 gctcccgctg aaaaaacagg actttgtttg cagattttca tgtgtactgg aaagtgagat 420
 gtgacttggg gaagtccgct ttaaaatttc catgttttc tcaaaatgaa agtctaaaa 480
 aatcgaagtg cgtgccccgc gaggaattcc cctctgcaga ttgttttgc atttatatgt 540
 cgtttttacg gagaaaagtc ccaagctgct gctccttctc taactagatg ttgaacgcta 600
 gcacatatgc accagatgct tctgaagtat acctaaacgc accttgggaa caactgtgct 660
 cccattcata aaactcatac aagtcaccaa gcctgccata cccgtgagac ataacaacgg 720
 aagctagact actccccct gttattgcac actatcgaaa aggattccta ggtttctatc 780
 ctctgccttt tcctggggca cactgcagag aaactaccgt gcgcgctacc tcccgacgtg 840
 cgaggcgata gcaaaacgct tttgaaggaa aaagtcgaga aatcgacgac tgcgtctctt 900
 gaatccgaga gagggatcca acccaccgag ttctctgcat gtgcagcatc tgcaagaacg 960
 tgataatgca tgaactcgat catcgctta tctgtgtgca tgcattttcg aaaaagaaag 1020
 gcgttttctg cgcgggagact cgcgcggagg caagacgaga ctttctctc ttccaaactg 1080
 cgagccacgg gggcgcatgc aatttgaaca tcacgcaaaa tcccaaaacg ggtggggtg 1140
 agccgcaaac ttttttgga tgcagcgttg agcctgagct gcggtggggg cttttgtcgc 1200
 gagcgtgggg tgccgcgaga gagcaacgcg gcgctacgcg gccgacgggt cttctgggaa 1260
 gcctcgcatt tcctcgacgg gttctccct caattctctt cctttctctg cgtcttctc 1320
 aggtggcttc gtcaccggtt tttctctctg cgttcgtgct ccgctgtgtg tccggagtgc 1380
 cgcgacagat cgaggcggtt ctccgctccc accttgcggg tcccaatttc gatttttctc 1440
 cgtcaccatg gggcgcatgt acggtcctgg aaaggcagtg tctgccagcg ctctccctg 1500
 gcgcagaaag ccccgacat ggctgaaaat caagccgtcg gacgtcgaag agcacattgc 1560
 caagcttgca aagaagggcc agacccctc ccaggtactt tcggcgggaa gaaggagaa 1620
 aaacgacgga gttgccggcg ctgcggtctg gggaacaacg gggaagtgc caggaaaaat 1680
 acgcgttctc caggtcatcg ggggaaaacg ctgcggaatc ccagccctc gactctccgc 1740

10

20

30

40

agttgttttt cgcagtcctt togcctcctg accgttcagc ggagatgggg acgagaatcc 1800
 tctccctccc tctgctgagt ttcccgct ctctcgtgtc tcaaaaaagg ctgcagaaat 1860
 gctcgtttgc ctcacagccg gacctctctg ttgaccaaag cgcctcgtcg ggatttcttg 1920
 cgcggggatg ggctgaagca acgaaacggg atggacgttt gtcggtttcc ccgctgtcgt 1980
 gtgacttgct cgaggaaaca aagaacggga acgagcggga ggaagccggg ggaaaatttg 2040
 cgttcctccc cgcaaacct atccgcaaaa atgcctcgtt tcgcgaactg tggacggggg 2100
 ggaacaacgc gttgtgttgt ttgtgcatac ctgactgaca cggctcgtcg cgtgggtggc 2160
 tgggatccga gcggtccgaa gacagtctct cggaaattcg cgagcggacc tactgttgtt 2220
 cactgaacgg ttctcttctc ctgtgaaatc aacatggttt cttgtgcagt ttaccgaaag 2280
 tgaggacgac atgttttttg tgaccgtggc gcggccgttc cgcgtcggcg gcaaacggga 2340
 cgatccaatg cggcgaaacc gggggagagt cattgcacac gatgaagtcg cgaacgacca 2400
 aggcaatttt ttccggaggtc aaatcacatc ttccgagaag tatgaatgca tgtggaaggt 2460
 cgtctgtttt tccattctcc acgttcttct tgcctttggc tgcttgtgtc tctctggcga 2520
 cttacagatc ggcgtcacac tgagagactc cttcggagtg ccgcagggtta aatccgtcac 2580
 tggcaacaag atcctccgta tctcaagct ccaaggtagg ttacgcgtt aagggaaaca 2640
 ctagtttcaa tcttctcgag aacactggag gggcgagat cggggcgag ctcctccag 2700
 gctcaagaag gtctgggagt gaaaaacgaa cgcaaatgca tggacgttgt atatatgtat 2760
 gcctggatac ggtgtgaggg tagcgctttt ggcagagca agtgtgaagt ttgcgtctgt 2820
 ttggagaagg aatgacgccg cgtcgtcgcg agggcgcttct ctgccttccc ggttctctgt 2880
 tctttgagaa agaacgtttt tcgcgtttct ccgcagttag aggttccctt cgaagaggca 2940
 cctagatcag tcgactcgtt cttgaggagg ctggccttcg tcagtgtgtc tgctgcttct 3000
 ctactgcaa cactgtctcc cttgaagaga tttagcgag atgctgattt tctggcgctc 3060
 agctctctgc cgtcgccctc tccaacatgt caagaagcac gttgcttgtc tccctctttg 3120
 tccagcaaag tggagttttt gtatgcgtgc aatctatgca atcgagagct tgctgaagcg 3180
 acgttgctct cctctctccc aagtgtatgc tctccgcgtt tcttcgtctg gttaaaaga 3240
 aacggcgctg ctgtcctttc cttcgtggcg aactcggat tgtttctcaa atccgatcta 3300
 ctgtcagccg tccaagtgc tgtctgacct ctttcctcga ctcccgcatg cacatttaga 3360
 gcgctggaa gcgactgttc aagtcctcct ctcatctgtt tctctagggt ctgaagagcg 3420
 ccaagtgcgt ttccgaggtc ctccagacc ggccgacca gtgttctccc gactgttctt 3480
 ttttttcagg tcttgcccc gagctgcctg aggacttgta ctacttgatc aagaaagccg 3540

10

20

30

40

tgagcgtgcg aaagcacttg gagagaaaca ggaaggacaa ggacgccaag ttccgtctga 3600
 ttcttggtga gtctogaatt caccgtcttg ctgcgtaca 3639

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

<400> 4
 ctgccgcttc cttaacctct ggaaggggtt gaagcttttt cgcaactgaaa cgcgagagac 60
 acgaatgagc tgaccacttt tctgcattc gctggccctg taccggccgc attctctact 120
 tcgtacacct tcaactgtact cacacccgaa aacttcagaa gtcgggcttt gctgcaggcg 180
 actcagggca gaggagaagg tgaacatgcc ttccccaatt ttgcccgcag tttgcctcgg 240
 gttgctctct tccccaacct agatgaaatg aaaccactcg atcagccatg tatttccgc 300
 aaaagggttg ctaccaagcc cacatttggg aagcactctg gaagatgcgg cgccacggaa 360
 gcaaccctcg accgcaccgc tgtcggggg tctcgacgtc gtccgcgtta acatgatgtc 420
 ccgccagagc ttccactggt ctgacgagta catggatgca ataagcaagt cgtctccact 480
 cgtacacgaa tgtccagcac cagcaagctg catcacttca atcgcttggg agcccaacgc 540
 ttcttttgtc tgctttctgt ttttgcgtcg agactgaccg agcacgaagc ttacacgaaa 600
 cgcgaagctc taatgccta catccactc cttcttcaga aatggcaggg aagctacact 660
 cttgttaacg tctctaggtt taaaggggtt gtgcaccgag ccgatcacgt tacggacacg 720
 ggctcggggg tcaactacgtt acaaggaata aacaactaac gcacaatcct gggttacattc 780
 gggccacag catataacct ctccggaggc ttgtattcca gctatcgaaa aaaaagcaat 840
 tcgatgtaat tccctccaat agcccgagc gyatgtcatc tacaagtggc agccttggtg 900
 gggaccctc ttgggtatgc ccggacagat gcgcagtgat gatctttaac ctccgcgtaa 960
 agataggtgt ctgctgtagc ggtgcgcttt tttgtgttgc atgcatgcat caagctggcc 1020
 gggacaaggc ggttgccccg atggatggat ggcaaaaacca ctgtgctgca ggcagcagcc 1080
 ctccctcgga ggctcctctt gtggggcacc gcgcagtcac cagcacaacg tagcggcctt 1140
 gtccagcatg gacgaaaagc agtgggggag actccagag gaaagcgttg ccatgcaaag 1200
 gggaaacagg ggatttttgt caccagagc tgtttgtcca cttttgtgag gtggttaattt 1260
 gacacagttc tcatccctgt tttgtccaag atggcgtcga ccggcaacgt aaggggattc 1320
 tccgactgc attgctctct tgaggagaa aaggccgcg tgaaaacatg ctgttctcca 1380
 ccagttggca gattgaagca gtctacggga agatgcacgg tttaatcatt gttgaatttc 1440
 gtctgcagtc tgactcttcc gtattggagc acgcgatgct tcgttcgctg tgaaatcgta 1500

10

20

30

40

ctgtctggat ctctttgagt gaagaacacg cggcaggccg cagttttttt gcagggcctt 1560
 ggtaccaaatt gcttgtttac atatttgcct tgcgagttc ttttgcattg ttttagatat 1620
 gcgtggagac tgttaaata acaaccgctc ggagatattg tgcgcggccc agcaatgctc 1680
 tgggttccact cccgtcgtga gcagggaaac catgggtggc ttttgtggct tctgtgtgta 1740
 tgcggtctgc agacttgcaa aaagagaaag ttctgcaagg atgggtgtct ccaggcggag 1800
 ctcaatgagt tctctctctg cacactgtcc gaggatgggt actcgggagt tgaagtccgt 1860
 gtgactccca tccgcacaga gatcatcatc cgcgccacca ggactagggg agtgcctcgc 1920
 gacaagggaa ggcttatccg cgaattgacg tccgtcgttc agaagcgatt cggcttcgcg 1980
 cccgactcgg ttgagctctt cgcgcagcgt gtggagaacc gtggctctgt cgcctatggc 2040
 caggcagaat cgttgcgtga caagcttcta aaggggcttg cagtcagacg cgcctgctat 2100
 ggtgtcctcc gccacatcat ggagtccgga gctaaagggt agtgcctgca aagtgccatg 2160
 tattgtatga ggtaacttga atttagagtg tgaacaaaaa gcattagtcg actgtcacac 2220
 gtatcttcgc cggacttttt tcttttcagg ttgcgaggtc gtctgtgtcc gtaaaacttcg 2280
 cgtcagcgt gccaaagca tgaagttcaa ggatgggtac ctgactctta ctggagagcc 2340
 ctggaagatg ttctgtgacc aagcaatccg ctccgtgcaa ctccgacaag taagtttcaa 2400
 attattaagc ctcaagttac tagtaaaagg caatttgtgt aggagctagt atgtacagag 2460
 gcagtgtatg tgtgtttttt ttgcagggtg ttcttgggtg tagagtcaag atcatgctgc 2520
 cgcatacccc ggagggcaaa cgtggccccc cgaacccgct gccggatact attatcgtga 2580
 tggatcccaa gccagagatc cccgttgtgc agcctgagga gatggacgag ggagtgcctg 2640
 gtccaatgta atgagtgatt cgtgcgtgac tgttgattta tgggaggagg gtgtccacat 2700
 gtgcgtgacc gtggagcagc cgtttaacga aattcgcatt ctcccttcg 2748

10

20

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

30

<220>
 <223> primer: SAG3-FW

<400> 5
 cgataagctt cgaatctctg aacggatgtg t 31

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

40

<220>
 <223> primer: TUB5-RV

 <400> 6
 cgagatctgg gaattcaaga aaaaatgcc aacg 33

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

 <220>
 <223> primer: TETAVR5-FW 10

 <400> 7
 cgatcctagg atgtctagat tagataaaag 30

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

 <220>
 <223> primer: TETPST3-RV

 <400> 8
 cgtctgcagt taagaccac ttccacattt aag 33

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

 <220>
 <223> primer: T3

 <400> 9
 attaacccctc actaaaggga a 21

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

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

 <400> 10
 cgataagctt tcgggggggc aagaattgtg t 31

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

<220>
 <223> primer: REV 13A

<400> 11
 gcgccccatg gtgacggaga aaaatcg 27

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

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

10

<400> 12
 gggaaccgca aggtgggagc ggagaac 27

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

<220>
 <223> primer: S13PROMFUS FW

<400> 13
 gcataagctt cctcgagag attgtcagtg 30

20

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

<220>
 <223> primer: S13PROMFUS RV

<400> 14
 gcattctaga ggcagacatg ccctttccag g 31

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

30

<220>
 <223> primer: LACZ-AVR11 FW

<400> 15
 cgatcctagg atgacatga ttacggattc act 33

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

40

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

 <400> 16
 cgatctgcag ttatctttga caccagacca a 31

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

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

 <400> 17
 gggtctcccc tcaatcccta tcagtcatag agatctctct tcctttctct 50

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

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

 <400> 18
 agagaaagga agagagatct ctatcactga tagggattga ggggagaacc 50

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

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

 <400> 19
 ctacggggcc gacggtcctt atcagtata gagatcttcc tcgacgggtt c 51

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

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

 <400> 20
 gaaccggtcg aggaagatct ctatcactga tagggaccgt cggccgcgta g 51

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

<220>
 <223> primer: S13NOTI-FW

 <400> 21
 cgatgcggcc gcgtcagtcg atgacacaac cg 32

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

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

 <400> 22
 gctagagctc ctgtaagtcg ccagagaagc 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 30
 <213> Artificial

 <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 actatag 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

```

1  gtggcacttt  toggggaaat  gtgcgggaa  cccctatttg  tttatttttc  taaatacatt
61  caaatatgta  tcogtccatg  agacaataac  ccgtataaat  gottcaataa  tattgaaaaa
121  ggaagagtat  gagtattcaa  catttcctgt  togcocctat  tocttttttt  goggcatttt
181  gccttctctg  ttttgctcac  ccagaaacgc  tggtgaaagt  aaaagatgct  gaagatcagt
241  tgggtgcaog  agtgggttac  atogaactgg  atctcaacag  cggtaagatc  cttgagagtt
301  ttogccocga  agaagctttt  ccaatgatga  gcaactttta  agttctgcta  tgtggcgccg
361  tattatcccg  taitgacgoc  gggcaagagc  aactcggtcg  ccgcatacac  tattctcaga
421  atgacttggt  tgagtactca  ccagtcacag  aaaaacatct  tacggatggc  atgacagtaa
481  gagaattatg  cagtgtgcgc  ataacatgta  gtgataaac  tgcggccaac  ttacttttga
541  caacgatcgg  aggacogaag  gagetaacog  ctttttttga  caacatgggg  gatcatgtaa
601  ctgcgccttga  togttggaaa  ccggagctga  atgaagccat  aocaaacgac  gagcgtgaca
661  ccaogatgoc  tgtagcaatg  gcaacaacgt  tgcgcaaac  attaatcggc  gaactactta
721  ctctagcttc  ccggcaacaa  ttaatagact  ggtatggagg  ggtataagtt  gcaggaccac
781  ttctgccttc  ggccttcccg  gctggctgtg  ttatgtctga  taatcttggg  gcoggtgagc
841  gtgggtctcg  cggatnatt  gcagcatcgg  gacagatgg  taagccctcc  cgtatcttag
901  ttatctacac  gaogggaggt  caggcaacta  tggatgaacg  aaatagacag  atcgtctgga
961  taggtgcttc  actgattaag  cattggtaac  tgcacagcca  agtttactca  tatatacttt
1021  agattgattt  aaaacttcat  ttttaattta  aaagatctca  ggtgaagatc  ctttttgata
1081  atctctgac  caaaatccct  taacgtgagt  ttctgttcca  ctgagcgtca  gaccccgtag
1141  aaaagatcaa  aggatctctt  tgagatccct  tttttctgag  cgtaatctgc  tgcgtgcaaa

```

【 図 1 A - 3 】

```

2401  tgagacgcgt  gttctgcgcg  acaatgtgca  cctgtaggaa  gctgtagtca  ctgctgatcc
>.....pSAG1.....>
2461  tcaatgttct  cggcaaggcg  cgaacacggg  agtacagttt  ttgtggcgag  agcccttggt
>.....pSAG1.....>
2521  cagctttccg  ttctctccgg  ttgtgtcaac  tgtgtcattg  tctgttaaac  acacgggtgt
>.....pSAG1.....>
2581  atgtcgggtt  cgtgcaccca  ctccattatt  tcttctggtt  ttttgacgag  tatgcatgag
>>>
>>.....SAG1 CDS.....>>>
2641  aaaaaaatca  ctggatatac  caacgttgat  ataccacat  ggcacgttaa  agaacatttt
>.....CAT CDS.....>
2701  gaggcatttc  agtcagttgc  tcaatgtacc  tataacgaga  ccgttcagct  ggtatattacg
>.....CAT CDS.....>
2761  gcctttttta  agacgttaaa  gaaaaatgag  cacaagtttt  atccggcctt  tattcacatt
>.....CAT CDS.....>
2821  ctgcccgcgc  tgatgaatgc  tcattccgaa  ttccgtatgg  caatgaaaga  cggtagcgtg
>.....CAT CDS.....>
2881  gtgatatggg  ataggtttca  ccttctttac  acggttttcc  atgagcaaac  tgaacagttt
>.....CAT CDS.....>
2941  tcctgcctct  ggaatgaata  ccacagcatg  ttccggcagt  ttctacacat  atattcgcaa
>.....CAT CDS.....>
3001  gatgtggcgt  gttacgttga  aaactcggcc  tatttcccta  aagggtttat  tgaagaatag
>.....CAT CDS.....>
3061  tttttcgtct  cagccaatcc  ctgggtgagt  ttccacagtt  ttgatttaaa  cgtggccaat
>.....CAT CDS.....>
3121  atggacaact  tcttgcgcc  cgttttccac  atgggcaaat  attatacgca  aggcagcaag
>.....CAT CDS.....>
3181  gtgctgatgc  cgtggcgat  tcaagttcat  catgcggttt  gtgatggctt  ccattcgccc
>.....CAT CDS.....>
3241  agaattgcta  atgaattaca  acagtactgc  gatgagtgcc  agggcggggc  ktaaktrac
>.....CAT CDS.....>>>
3301  accgttgtgc  tcaattctca  aatgcacaaa  ggaacacac  ttctgtcagc  atgtgcocca
>.....SAG1-I.....>

```

【 図 1 A - 2 】

```

1201  caaaaaaac  accgctacca  ggggtggttt  gtttcgggga  tcaagageta  ccaactcttt
1261  ttccgaaggt  aactggttcc  agcagagcgc  agataccaaa  tactgtccct  ctagtgtagc
1321  cgtagttagg  ccaccacttc  aagaactctg  tagcacccgc  tacatacctc  gctctgttaa
1381  tctgtttacc  agtggctgct  gccagtggcg  ataagtctgt  tcttaaccgg  ttggaactaa
1441  gacgatagtt  accggataag  ggcagcgggt  cgggtgtaac  ggggggttcg  tgcacacagc
1501  ccagcttgga  gogaacgacc  tacaccgaac  tgagatacct  acagcgtgag  ctatgagaaa
1561  gcgcacagct  tccogaagg  agaaggcgg  acaggtatcc  ggtaacgcgc  agggctcgaa
1621  caggagagcg  cagcaggggg  cttccagggg  gaaacgctgt  gtatctttat  agtctctctg
1681  ggtttcgcca  cctctgactt  gagctcgat  ttttgtatgt  ctgtccaggg  gggcgaggcc
1741  tatggaaaaa  ccgcagcaac  gggccctttt  tacggttctc  ggccttttgc  tggccttttg
1801  ctccatgttt  ctttctcg  ttatccctgt  attctgtgta  taaccttatt  accgcctttg
1861  agtgagctga  tacgcctgc  ccgacgcgaa  ccagcagcgc  cagcagctga  gtgacgcagg
1921  aagcgaaga  gcgcacca  ccgaacccgc  ctctcccg  ggttggtgc  attcattaat
1981  gtagctggca  ccagaggttt  ccgactgga  aagcggcgag  tgagcgcaac  gcaattaatg
2041  tgagttagct  cactcattag  gaaccccg  ctttaccatt  tatgtctcgc  gctcgtatgt
2101  tctgtggaat  tctgagcgga  taacaatttc  acacaggaaa  cagctatgac  catgattacg
KpnI
2161  caaagcgcgc  aattaaccc  cactaaagg  aacaaagct  gggtaaccgg  cccccctcg
>>.....T3.....>>
HindIII PetI
2221  aggtcgacgg  tatcgataag  cttgatctgc  aattcctgca  gcccccagga  ccggtgttct
>>..pSAG1..>
2281  aaccacaaac  cttgagacgc  gtgttccaac  cagccaccc  gacacgcgtg  ttccaaaccc
>>.....pSAG1.....>
2341  gcaacctgag  ccggtgttcc  tawccacgca  ccttgagacg  cgtgttctaa  ccacgcaccc
>>.....pSAG1.....>

```

【 図 1 A - 4 】

```

3361  ttataaagaa  actgagttgt  tccgtgtggg  ctgcagggtg  tcacatccac  aaaaacccgc
>.....SAG1-I.....>
3421  ccactctaaa  taggagtttt  tgcagcaag  cagcgaagt  ttatgactgg  gtcgaattct
>.....SAG1-I.....>
3481  ctgaacggat  gtgtggcgga  cctggctgat  gttgatccgc  gtgcacacac  gcgcacatg
>.....SAG1-I.....>
3541  ggtcaatata  caagacagct  atcagttgtt  ttatgcaac  cgttaaacac  aattcttggc
>.....SAG1-I.....>
HindIII
3601  ccccgcaag  ctctgaattc  ctgaacggat  gtgtggcgga  cctggctgat  gttgatccgc
>>>
>>.....SAG1-II.....>
3661  gtgcacacac  gcgcacatg  ggtcaatata  caagacagct  atcagttgtt  ttatgcaac
>.....SAG1-II.....>
3721  cgggttaaac  aattcttggc  ccccgagggg  ggtacacata  gttctagagc  ggcctcgagg
>.....SAG1-II.....>
>>.....^ h-.....>
3781  tgaacggat  cgaatagcta  gagcttccgc  atcattctgt  gaagcatccc  ctgaactggc
>.....^ h-.....>
>>.....pTUB1.....>
3841  tgagttctac  aagacacgtg  cgaagcgtg  tgagtagtgc  gacaggcagc  gtgactcatg
>.....pTUB1.....>
3901  ttgttggaac  gtacgagct  ctgggttaac  ccgatattca  cttaactggc  ccgtctgttt
>.....pTUB1.....>
3961  gtcattagat  actgaatcag  gtaacgatac  atgagcagca  tctcgtgttt  ccaggcgcat
>.....pTUB1.....>
4021  gtcctgtccc  ggttgcacac  caaggacccg  tgggtctatc  ttgggtctct  ccgtactggg
>.....pTUB1.....>
4081  tggtagaggt  gaaactgtcg  accgtgatgc  agctccctgt  cttagagcac  ggaacgaagt
>.....pTUB1.....>
4141  aatagctgog  tctgcatgaa  caaggcgctc  tgaggccgcg  tctgatacga  aaggtttctg
>.....pTUB1.....>
4201  ggctactgaa  catagttctc  ccagtgccgg  ggcatactcc  agtggccttt  cagcaaacct
>.....pTUB1.....>
4261  cgtgaccagg  ccatacaaaa  gcgggtccac  gogagttaaa  toctctcaga  gaaagccccc
>.....pTUB1.....>
4321  atagtgcacc  atactactgc  ggcacatctt  gctgaagctc  gtggcgtgtc  gatcagctaa
>.....pTUB1.....>

```

【 図 1 A - 5 】

```

4381 gtctctgtgt taacttgaaag tgagcagctc ttccagttcg gtccagtcatt attgcatcgc
>.....pTUB1.....>

4441 cctagccacc gtttcaccag cgtccgatgc aggtccaccc agccgataacc tctgacogtt
>.....pTUB1.....>

4501 catatatgag ttgtattacc atctgtcgcc cytaacgaca caaggagatg cggctggaag
>.....pTUB1.....>

4561 caacgggttt gtgagcacca ttttgactct gtcacggagt aaaaaacatt tattogaact
>.....pTUB1.....>

4621 ttgtacagagc gcagtcagta gaagtcaccc aocgctatca actacogtgc aattacagag
>.....pTUB1.....>

4681 gacagggaca gggaaaaaaa gccgaagagg ttgcgggtgt taggagatga cgaagcgttt
>.....pTUB1.....>

4741 aaacggccgc tggctattgt tcgggcacog ttgagccaca agcgatcaag gtgaatacaa
>.....pTUB1.....>

4801 agttaaatag ttatctgtga gogattgcc ttgtgaatct tcagatcgga cgaacagtca
>.....pTUB1.....>

4861 ttctggccca ctgtacttga tctgtctgat gtaaatcaca ctacogtgc ttgtcggtag
>.....pTUB1.....>

4921 caatcaagtt gctctttct ctctttcta gacacgttaa gaaogcttat gaacacogcat
>.....pTUB1.....>

4981 acaogcatag tttttgttag aatgcagcga ccagatgtcg caaggtctgc tcccccatcg
>.....pTUB1.....>

5041 actggagaaat caagaaaaac ctgctgtgat cccaaaogta ctctgtggtt ggtgcaacca
>.....pTUB1.....>

5101 gaagtttcat actgatcaaa agccagtgaa cagctggggg acattgcagg ttctgtgctt
>.....pTUB1.....>

5161 caagaagcgc tgaagaagaa agtgccgaaa cctctggcag ttgccttga agaggcgccg
>.....pTUB1.....>

5221 tgcattgaac ttctgaagtg cgtagtaacc ggctcctaatt gctgttttgt gtttgcctgt
>.....pTUB1.....>

5281 ctgggcagca gtagaatgct gtgccgaat tagccactat tttagacatt tatttaacaa
>.....pTUB1.....>

5341 tttttttct gatgaacttg gcttattcat ttttcaagt cttgcacgtg ggtggtggca

```

【 図 1 A - 7 】

```

6361 ccttttctt ctcttgcga gtctctaga gaacacgac ttgttcgctg tccctgacga
>.....pTUB1.....>

6421 cgcacccgc gcagaagaca tccacaaac ggtgttacac aatcaccttg tctgaagtc
>.....pTUB1.....>

6481 ttgggaaaa ctactcgttg gcatttttc ttgaattccc agatctaaaa tggtagacaa
>.....pTUB1.....>>>
>> YFP CDS.>
>>>

6541 gggcgaggag ctgttcaacg ggtgtgtgcc catctgtgtc gagctggacy gcgaagtaaa
>.....YFP CDS.....>

6601 cggccacaag ttacogtctg ccggcgaggg cgaaggcgat gccacotacg gcaagctgac
>.....YFP CDS.....>

6661 cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gccctgtccc tggccacccc tctgtaacc
>.....YFP CDS.....>
PstI
6721 ctctggctac ggcctgcagt gcttgcggc ctaccccgac caactgaagc agcagcaact
>.....YFP CDS.....>

6781 ctccaagtc gccatgccc aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga
>.....YFP CDS.....>

6841 cggcaactac aagaccogcg ccagagtgaa gttcgagggc gacacccctg ygaacogcat
>.....YFP CDS.....>

6901 cgaagctgaag ggcactgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta
>.....YFP CDS.....>

6961 caactacaac agccacaacg tctatactat ggcgcacaag cagaagaacg gcatacaagt
>.....YFP CDS.....>

7021 gaacttcaag atccgcacca acatcgagga ccgcaogctg cagctgcggc accactacca
>.....YFP CDS.....>

7081 gcagaacacc cccatcgggc acggcccggt gctgtgtccc gacaacact acctgagcta
>.....YFP CDS.....>

7141 ccagtccgcc ctgagcaaaag accccaaga gaagcogcat caactggttc tctgtgagtt
>.....YFP CDS.....>
AvrII
7201 cgtgacccgc gcgggatca ctctcgcat ggaagcagtg tacaagccta gtaggtctag
>.....YFP CDS.....>>
>>.....>
>>>

7261 attagataaa agtaaaagta ttaacagcgc attagagctg cttaatgagg tcggaatoga
>.....TR CDS.....>

```

【 図 1 A - 6 】

```

>.....pTUB1.....>

5401 tgagactcgc tttagatgat gtgggtgttg caatcacgct ggaatgcogg ctattttctg
>.....pTUB1.....>

5461 agttttttgt ggttttgaca atgggaacga ttacagact actatttccac gtggtacoggt
>.....pTUB1.....>

5521 tatgagccac taaaaaaacg aagaaaaacg ctgtttgcag aaacaatagc aaactgtttt
>.....pTUB1.....>

5581 tctcatagt aactcagcgc ccccttgccc cccccacga gtgagatgca agacaatct
>.....pTUB1.....>

5641 ctctacaca gctttgtgtg cgtctgttcc aaattttcag cgtctcgcaa aggcatacgc
>.....pTUB1.....>

5701 aacaacatta tgagaggagc caggtttgtg gggctggcgg gtgcaagaa gtgttctctc
>.....pTUB1.....>

5761 gaaaaagccc tctgtcgaga aggtctgtgc gtttgaaaa tatccagaggt agcaaaagct
>.....pTUB1.....>

5821 tgtttcagtg ctccctttt gaagactcgc ggcggcagtg cactgaagag taactccaaa
>.....pTUB1.....>

5881 tcacccoggt gagacttgtt tttttcgtt atcttcaga agagtgtgtt ttctttaat
>.....pTUB1.....>

5941 tcttcacaga ccacgaaaaa cgaacatcg aagacatca ctgctcgcgc gtgcactcgg
>.....pTUB1.....>

6001 atggatgacc cacatctgtt gcagccgtcg cagacatgca tgtcccgctg tctgaaatt
>.....pTUB1.....>

6061 ctctgcatca gggagtgat caggaatcat cgtctacagc ggaatcagtt gcggagcagg
>.....pTUB1.....>

6121 ccggctcgcg gggcgactca gatgcggaag gcgttaactca ggaacgttgc gctcatgca
>.....pTUB1.....>

6181 gaacaggggt ggtgcctgca ttgggtcgcg ttggtgaccc tggttggacc ggtgagagtg
>.....pTUB1.....>

6241 cgcgcgcacg aaggggatgt gtcagaacaa tttgtttgt tctctgtgaa ctbttagatg
>.....pTUB1.....>

6301 tgttaaaggc ggcgaatttt agcagagagt cctccttgtt ggattctctc ttgaatttcg
>.....pTUB1.....>

```

【 図 1 A - 8 】

```

7321 aggtttaaca accogtaaac tgcocagaa gttaggtgta gagacgcta cattgtattg
>.....TR CDS.....>

7381 gcatgtaaaa aataagcggg ctttgcoga cgccttagcc attagatgt tagataggca
>.....TR CDS.....>

7441 ccaactcac ttttgccct tagaagggga aagctggcaa gattttttac gtaataacgc
>.....TR CDS.....>

7501 taaaagtgtt agatgtgctt tactaagta tgcgatgga gcaaaagtae atttaggtac
>.....TR CDS.....>

7561 accgcctaca gaaaaacagt atgaactct cgaatacga ttacgttttt tatgcaaca
>.....TR CDS.....>

7621 aggtttttca ctagagaatg cattatatgc actcagcgt gtggggcatt ttaatttagg
>.....TR CDS.....>

7681 ttgcgtattg gaagatcaag agcatcaagt cgttaagaa gaaagggaaa caactactac
>.....TR CDS.....>

7741 tgatagtatg ccgcatttat taacagaagc tatogaatta ttgatcacc aaggtgcaga
>.....TR CDS.....>

7801 gccagccttc ttattcgccc ttgaattgat catatcgga ttagaacaa aacttaattg
>.....TR CDS.....>
PstI
7861 tgaagtgagg cttaactgca agccacaga agctgcccgt ctctgtttt cctctctttt
>.....TR CDS.....>>
>>.....DHFR.....>

7921 cgggggacac agggagagtg cctcggttcg gagagagctg acgagggggt gccagagacc
>.....DHFR.....>

7981 cctgtgtcct ttatcgaaga aaaggatga ctctcatct ggaatttacc acagtctac
>.....DHFR.....>

8041 ctgccttgtt ttcttttttg tcaatcagaa cgaagcgag ttgcgggtga ccgagatgtg
>.....DHFR.....>

8101 cgtgtatoca ctctggaatg cgttatcgtt ctgtatgccc ctagagtctt ggaactgtgc
>.....DHFR.....>

8161 tctctgcccc cgaacagaga caacttctt tctatgact tgcagatgg tgcagcgcaa
>.....DHFR.....>

8221 acgacggaga gaaagagca cctctcagt ttccctacga tctgtctgca gtttgcactc
>.....DHFR.....>

8281 ttacacogca acgattggcg atactctctt gttgacttgt taggtccga ccacgaagct
>.....DHFR.....>

```

【図 1 A - 9】

```

8341 cccctaaacta rataagccgc gacacctaag tgtacacat ttgcagatcg ataactgcg
>.....DHFR.....>

8401 accgctgaat cgtccagat cagtaaaacc gcacaccta agtataaacc ttgttttaggt
>.....DHFR.....>

8461 cgataaaatg ctacaaaccc ccaccacaaa toagccttg agcgtttctg cgcacgogtt
>.....DHFR.....>

8521 ggcctacgtg acttgcgat gctgcctct ggcatttcac gccagtcagt gcgcataaaa
>.....DHFR.....>

8581 atgtggacac agtcggttga caagtgttct ggcagcctac agtgacacgc cgttgagggg
>.....DHFR.....>
NotI
8641 gatccactag totagagcgg ccgcacacgc ggtggagctc caattcgccc tatagttagt
>.....DHFR.....>
<<...T7...>>

8701 cgtattacgc ggcgtcactg ggcgtgttct tacaacgtcg tgaotgggaa aacctggcg
<<...T7...>>

8761 ttacccaact taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag

8821 agggccgcac cgatgcctct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggacgcgc

8881 cctgtagcgg cgcattaaag cggcggggtg tgggtggtac ggcagagcgt accgctacac

8941 ttgccagcgc cctagagccc gctcctttcg cttctttccc ttcctttctc gccacgttcg

9001 ccggcctttc cgttaacgt ctaaatcggg ggcctccctt aggggttcga tttagtgctt

9061 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt agggtagtg ttacgttagt gggccatcgc

9121 cctgatagac ggttttttgc ccttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggaactc

9181 tgttccaaac tggaaacaca ctcaacccca totcggtcta ttcttttgat ttataaggga

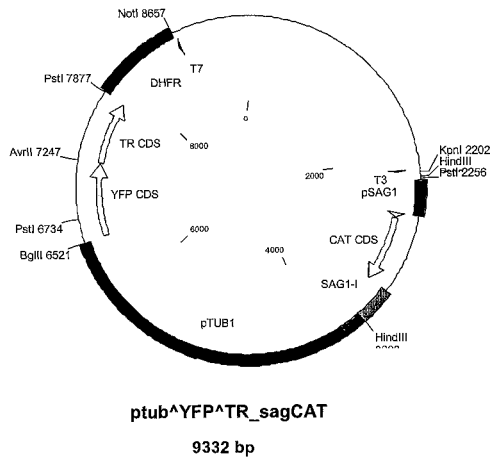
9241 ttttgcgat ttggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga

9301 attttaacaa aatatlaacg cttacaattt ag

```

【図 1 C】

Figure 1 C



【図 1 B】

TubYFP/TR-sagCAT

分子特徴：

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フェラ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	pTUB1	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ディング配列
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

```

1 agcttctcgtg ccagagattgt cagtgcattga cacaaccgcg aaaacgcggc agccgcgcta
>.....'J' DE-5.....>

61 atacggggac gaggaaaaag actgagcgtc acaacagaag cagccgagta aacggcgaaag
>.....'J' DE-5.....>

121 gaaatggaaa ggacccaagt aaaattttct gaagaatttc agcgcaacaa cctcgcgggt
>.....'J' DE-5.....>

181 tcttgcgaat agaggaattt cacttctca tctgtctgatt tatgttttca tcatctgcg
>.....'J' DE-5.....>

241 ctcaacagcc gaataaacgg ttotgggtcg cttccttaaa cttcatttca gtatgtgaaa
>.....'J' DE-5.....>

301 cttcttttgc tcaagagcct tctgtctcag cctcaccgtc ctgagttctg tctttgttga
>.....'J' DE-5.....>

361 ggaaagctcc cgtgaaaaa acaggacttt gtttcagat ttctatgtgt actggaaagt
>.....'J' DE-5.....>

421 gagatgtgac ttggggaagt ccgctttaa atttccattg tttttcctaa atgaaaagtc
>.....'J' DE-5.....>

481 taaaaaactg aagtgcgtgc ccggcgagga attccctct gcagattttg ttgcaattta
>.....'J' DE-5.....>

541 tatgtgtttt ttacggagaa aagtcacca cgtcgtctcc ttctctaact agatgttgaa
>.....'J' DE-5.....>

601 cgttagcaca tatgacccg atgtctctga agtatccta aacgcacott gggaaacaat
>.....'J' DE-5.....>

661 gtgtcccatc tcaataaact cataaagtc accaagcatg ccaataccgt gagacataac
>.....'J' DE-5.....>

721 aacggaaagt agactactcc cccctgttat tgcacactat cgaaaaggat tctatggttt
>.....'J' DE-5.....>

781 ctatccctcg ccttttctg gggcacactg ccaggaactc accgtgcgcg ctacctcccg
>.....'J' DE-5.....>

841 acgtgcgagg cgatagcaaa acgcttttga aggaaaaagt cgagaaatcg acgactcgct
>.....'J' DE-5.....>

```

【図 2 A - 2】

```
901 ctcttgaatc cgagagaggg atccaaaccca cagagttctc tgcattgtca gcattctgcaa
>.....'J' DE-J-.....>

961 gaaegtgaata atgcattgaac togtatcatcg cttattctgt gtgcattgat ttctgaaaaa
>.....'J' DE-J-.....>

1021 gaaaggcgtt ttctgcgcgg agactgcgcg ggaggcaaga cgagacttct tctcttccca
>.....'J' DE-J-.....>

1081 aactgcgcgc caagggggcg catgcaattt gaacatcacg caaaatccca aaacgggtgg
>.....'J' DE-J-.....>

1141 ggtggagccg caaaattttt tggcatgcag cgttgcgcgt gagctgcgtt gggggctttt
>.....'J' DE-J-.....>

1201 gtgcgcgcgc tgggggtgcg cgagagagca acgggcgcgt acgggcgcga cgggtctctt
>.....'J' DE-J-.....>

1261 ggggaagctc gcatttcttc gaagggttct cctctcaatt ctcttctttt ctctgcgtct
>.....'J' DE-J-.....>
>>.....E.....>

1321 tctcagggtg gcttctgcac cgggtttttt cctgcgcgtt gtgctcgcgt gtgtgtccgg
>.....E.....>

1381 agtgcgcgca cagatcgagg gogttctcgc ctcccaactt cgggttccca atttcgattt
>.....E.....>

1441 ttctccgtca ccatggggcg catgtacggt cctggaagg gcattgtctg ctctaggatg
>.....E.....>
>>>.....Cds.....>
>>>>.....>

1501 accatgatta cggatttact ggcgcgttgt ttacaacgtc gtgactggga aaacccgtgc
>.....'LacZ'.....>

1561 gtacccaac ttaatgcctt tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa
>.....'LacZ'.....>

1621 gaggcccgca cagatcgccc ttcccaacag ttgcgcgcgc tgaatggcga atggcgcttt
>.....'LacZ'.....>

1681 gcttggttct cggcaccaga agcgtgtgcg gaaagctggc tggagtgcga tottctgtag
>.....'LacZ'.....>

1741 gccgatactg tctgtctccc ctcaaacctg cagatgcacg gttacgatgc gccatctaac
>.....'LacZ'.....>

1801 accaagctga cctatcccat taaggctcat ccgcgctttg ttcccaacga gaatccgacg
>.....'LacZ'.....>
```

【図 2 A - 4】

```
2881 gaatcaggcc acggcgctaa tccagacgcg ctgtatcgct ggatcaaatc tgtcgatcct
>.....'LacZ'.....>

2941 tccgcgcggg tgcagatga agggcgcgga gcgcagacca cggccacaga tattatttgc
>.....'LacZ'.....>

3001 ccgatgtacg cgcgcgtgga tgaagaccag ccttcccgcg ctgtgcgcga atggctccatc
>.....'LacZ'.....>

3061 aaaaaatggc ttgcgttacc tggagagacg cgcgcgcgtg tcttttgcga ataagccac
>.....'LacZ'.....>

3121 gcgatgggta acagtcttgg cgggttctgt aaatactggc aggcgtttcg tcatatccc
>.....'LacZ'.....>

3181 cgtttacagg ggggtctcgt ctgggactgg gtggatcagt cgtgattaa atatgatgaa
>.....'LacZ'.....>

3241 aacgcgaacc cgtggtcgcc ttaaggcggt gatthtggcg ataagccgaa cgtatcgccg
>.....'LacZ'.....>

3301 ttctgtatga aoggtcttgt ctttgcgcag cgcgcgcgcg atccagcgct gacggaagca
>.....'LacZ'.....>

3361 aaacaccagc agcagttttt ccagttcctt ttatccggcg aaacctatga agtgaccagc
>.....'LacZ'.....>

3421 gaatacctgt tccgtcatag cgataacgag ctccgtcact ggaatgggtgc gctggatggt
>.....'LacZ'.....>

3481 aagcgcgtcg caagcgggta agtgctctct gatgtgcctc caaagggtaa acagtgtgatt
>.....'LacZ'.....>

3541 gaactgcctg aactacgcga gccggagagc gccgggcaac totggtctac agtacgcgta
>.....'LacZ'.....>

3601 gtgcgaacga acgcgcgcgc atggtcagaa gccgggcaca tcaagccctg gcagcagtg
>.....'LacZ'.....>

3661 cgtctggcgg aaaaactcag tgtgacgctc ccgcgcgcgt cccagcccat ccgcgcctg
>.....'LacZ'.....>

3721 accaccagcg aaatggattt ttgcctagag ctgggtaata agcgttggca atttaacgcg
>.....'LacZ'.....>

3781 cagtacggct ttctttcaca gatgtgattt ggcgataaaa aacaaatgct gacgcgcgtg
>.....'LacZ'.....>

3841 cgcgatccgt tcaacgcgtc accgctggat aaagacattg gogtaagtga agcgaaccgc
>.....'LacZ'.....>
```

【図 2 A - 3】

```
1861 ggttgttact cgtccacatt taatgttgat gaaagctggc tacaggaggg ccagaacgga
>.....'LacZ'.....>

1921 attatttttg atggcggtta ctcggcggtt catctgtggt gcaacggggc ctgggtcggt
>.....'LacZ'.....>

1981 tacggccagg acagctggtt gcgcgtgaa ttgaactga gcgcattttt acgcgcggga
>.....'LacZ'.....>

2041 gaaaacgcgc tcgcggtgat ggtgctgcgc tggagtgaag gcagttatct ggaagatcag
>.....'LacZ'.....>

2101 gatatgtggc ggtgagcgcg cattttcgtt gacgtctcgt tgcgtcataa cccgactaca
>.....'LacZ'.....>

2161 caaatcagcg atttccatgt tgcacatcgc cttaatgatg atttcagcgg cgcgtgactg
>.....'LacZ'.....>

2221 gaggctgaag ttcatgctg cggcgagttg cgtgactacc tacgggtaac agttttctta
>.....'LacZ'.....>

2281 tggcagggtg aaacgcaggt cgcgcgcgcg accgcgcctt tcggcggtga aattatcgat
>.....'LacZ'.....>

2341 gagcgtgggt gttatgcgca tgcgctcaca ctacgtctga acgtgaaaa ccggaactg
>.....'LacZ'.....>

2401 tggagcgccg aaatcccgaa tctctatcgt cgggtggtt aactgcacac cgcgcgcgcg
>.....'LacZ'.....>

2461 acgctgattg aagcagaagc ctgcgatgct ggtttccgcg aggtgcggat tgaataatgt
>.....'LacZ'.....>

2521 ctgctgctgc tgaacggcaa gccgttctgt attcggcgcg ttaacgcgta cagatcatat
>.....'LacZ'.....>

2581 cctctgcatg gtcaggctat ggtgagcag acgaggtgct agsatatcct gctgatgaag
>.....'LacZ'.....>

2641 cagaacaact ttaacgcgtt gcgctgttct cattatcga accatccgct gtgtatcacg
>.....'LacZ'.....>

2701 ctgtgcgacc gctacggcct gtatgtggtg gatgaagca atattgaac ccacggcatg
>.....'LacZ'.....>

2761 gtgcacaatg atcgtctgac cgtatgcgcg cgtctggctac cgcgcgatgag cgaacgcgta
>.....'LacZ'.....>

2821 acgcgaatgg tgcagcgcca tctaatcac ccagagtgtga tcatctggtc gctggggaaat
>.....'LacZ'.....>
```

【図 2 A - 5】

```
3901 attgacctta acgcctgggt cgaacgctgg aaggcgcgcg gccattacca ggcgaagca
>.....'LacZ'.....>

3961 gcggtgttgc agtgcaacgc agatacactt gctgatcgcg tgcgtattac gacgcgtcac
>.....'LacZ'.....>

4021 gcgtggcagc atcaggggaa aacattattt atcagcgcga aaacctacgg gattgatggt
>.....'LacZ'.....>

4081 agcggtcaaa tggcgattac cgttgatggt gaagtggcga gcgatacacc gcataccggc
>.....'LacZ'.....>

4141 cggattggcc tgaactgcca gctggcgag gtgacagagc gggtaactgt gctcggatta
>.....'LacZ'.....>

4201 gggcgcaagg aaaactatcc cgaacgctt actgcgcctt gttttgacgg ctgggatctg
>.....'LacZ'.....>

4261 ccattgtcag acatgtatcc cccgtaactt ttcccgagcg aaaaoggtct gcgctgcggg
>.....'LacZ'.....>

4321 acgcgcgaat tgaattatgg cccacaccag tggcgcgcg acttcagttt caacatcagc
>.....'LacZ'.....>

4381 cgcctacgtc aacagcaact gatggaacc agccatgcgc atctgtctga cgcggaagaa
>.....'LacZ'.....>

4441 ggcacatggc tgaatatcga cggtttccat atggggattg gttggcagca ctccggagc
>.....'LacZ'.....>

4501 ccgtcagttt cggcggaatt ccagctgagc gcgcgtcgtt accattacca gttggtctgg
>.....'LacZ'.....>

PstI
-----
4561 tgtcaaaaaa aactgcagcc cacaagaagt gccgctctct cgttttcttc tcttttggga
>.....'LacZ'.....>
>>.....DHFR.....>

4621 gggatcaggg agagtgcctc ggttcggaga gagctgacga ggggtgcca gagacccttg
>.....'LacZ'.....>
>>.....DHFR.....>

4681 tgccttttat cgaagaaaag ggtgactct toatgtggca ttccacacag tctcactcgt
>.....'LacZ'.....>
>>.....DHFR.....>

4741 ccttggtttc tttttgtcaa tcaagacgaa agcaggttgc ggttgacgca gatgtcgtg
>.....'LacZ'.....>
>>.....DHFR.....>

4801 tatccactcg tgaatggtt atcgttctgt atgcgcgtag agtgcaggac tgtgtctgtc
>.....'LacZ'.....>
>>.....DHFR.....>
```

【図 2 A - 6】

```
4861  tgcccacgac agcagacaac ttctcttcta tgcacttgca ggaagggtgca ggcgaacga
>...DHFR.....>

4921  cggagagaaa ggaagacccct ctcagtttcc ctacgagtgt ctgtcagttt cgactcttca
>...DHFR.....>

4981  ccgogaacga ttggcgatac gtctctgttg aottgttagg ctccgaccac gaagctccct
>...DHFR.....>

5041  taactarata agcccgacga cctaagtgtt caccatttgc agatcgataa tctgcgacog
>...DHFR.....>

5101  ctgaatccgt ccagatcagt aaaacggcac caoctaagtg taaacctgtt ttaggctgat
>...DHFR.....>

5161  aaaatgctac caacccccc acacaatcga gccctgagcg ttcttgcgca cgcgttgccc
>...DHFR.....>

5221  tgcgtgacct gctgagtcct gcccttgccc attcatgcca gtccagtggc ataaaaatgt
>...DHFR.....>

5281  ggacacagtc ggttgacaag tgtcttgcca ggtacacagt acaccgcgtt ggagggggat
>...DHFR.....>

                    NotI
                    -----
5341  ccactagttc tagagcgccc gccacgcggg tggagctcca attgccccta tagtgagtcg
>...DHFR.....>>>                <<...T7...<

5401  tattacgcgc gctcactggc cgtctgttta caacgtcgtg actgggaaaa cctggcggtt
<.T7...<<                >>...pKS+.....>

5461  acccaactta atcgcccttg agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag
>...pKS+.....>

5521  gcccgacccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagctcga atggcggaat ggaacgcgcc
>...pKS+.....>

5581  tgtagcggcg catthaagcgc ggcgggtgtg gtggttaacg ccagcgtgac cgtacacatt
>...pKS+.....>

5641  gccagcgccc tagcgccccc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cactgtcgcc
>...pKS+.....>

5701  ggcctttccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttcggatt tagtgcttta
>...pKS+.....>

5761  cggcacctcg acccccaaaa acttgattag ggtgatggtt cactgtagtg gccatcgccc
>...pKS+.....>
```

【図 2 A - 8】

```
6841  ttattgctga taaactcgga gccggtgagc gttgggtctcg cggatcatt gcagcactgg
>...pKS+.....>

6901  ggcagatagg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gaacggggagt caggcaacta
>...pKS+.....>

6961  ttggtgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cactggtaac
>...pKS+.....>

7021  tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaaacttcat tttaattta
>...pKS+.....>

7081  aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaactcct taacgtgagt
>...pKS+.....>

7141  tttcgttcca ctgagcgtca gcccccgtag aaaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt
>...pKS+.....>

7201  tttttctcgc cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaacccc accgctacca gcggtggttt
>...pKS+.....>

7261  gtttcgggga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc
>...pKS+.....>

7321  agataccaaa tactgtcctt ctagttagc cgtagttagg ccaccaacttc aagaactctg
>...pKS+.....>

7381  tagcacgcgc tacatacttc gctctgtcaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg
>...pKS+.....>

7441  ataagtcgtg tcttaacggg ttggaactca gacgatagtt accggataag gcgcagcggt
>...pKS+.....>

7501  cgggctgaac ggggggttgc tgcacacagc ccagcttgga gogaacgacc tacacogaac
>...pKS+.....>

7561  tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgcacgcgt tccgaagggt agaaggcggt
>...pKS+.....>

7621  acaggatatcc ggtgaacggc agggctggaa caggagagcg cagcagggag cttccagggg
>...pKS+.....>

7681  gaaacgcctg gtatctttat agtctgtgct ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat
>...pKS+.....>

7741  tttttgtgat ctcttcaggg gggcgagacc tatggaaaaa cgcagcgaac ggggcctttt
>...pKS+.....>

7801  taccgttctt ggccttttgc tggccttttg ctccactggt ctttctgctg ttatcccttg
>...pKS+.....>
```

【図 2 A - 7】

```
5821  tgatagacgg tttttcgccc tttagcgttg gagtccacgt tctttaatat tggactcttg
>...pKS+.....>

5881  ttccaaactg gaacaacact caacctatc tcggtctatt cttttgattt ataaggagatt
>...pKS+.....>

5941  ttgcgcattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat
>...pKS+.....>

6001  tttaacaaaa tattaacgct tacaatttag gtggcacttt tcggggaaat gbgcgggaa
>...pKS+.....>

6061  cccctatttg tttatttttc taatacatt caaatatgta tcgcgtcatg agacaataac
>...pKS+.....>

6121  cctgataaat gottcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg
>...pKS+.....>

6181  tcgcctctat tccctttttt cgggcatttt gccctcctgt ttttgcctac ccagaaagcg
>...pKS+.....>

6241  tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcaag agtgggttac atcgaactgg
>...pKS+.....>

6301  atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttgcgccgga agaacgtttt ccaatgatga
>...pKS+.....>

6361  gcacttttaa agttctgcta tgtggcgagg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc
>...pKS+.....>

6421  aactcggctg ccgcatacac tatctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtacacg
>...pKS+.....>

6481  aaaagcatct taaggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtctgcc ataaccatga
>...pKS+.....>

6541  gtgataaacg tgccggccaac ttactcttga caacgatcgg aggacggaag gagtaacgg
>...pKS+.....>

6601  cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga
>...pKS+.....>

6661  atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgac tgtagcaatg gcaacaaagt
>...pKS+.....>

6721  tgccaaaaact attaacctggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact
>...pKS+.....>

6781  ggatggagcg ggataaagtt gcaggacaac ttctgccttc gccctcccg cctggctggt
>...pKS+.....>
```

【図 2 A - 9】

```
7861  attctgtgga taacccgtatt accgcctttg agtgagctga taaccctcgc cgcagccgaa
>...pKS+.....>

7921  cgaccgagcg cagcgagtca gtagcgaggg aagogggaaga gcgccaata cgcacaacgc
>...pKS+.....>

7981  ctctcccgcc gogttggcgc attcattaat gcagctggca cgacaggttt ccgactgga
>...pKS+.....>

8041  aagcggcgag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcacccacgg
>...pKS+.....>

8101  ctttaacttt tatgtctcgc gctcgtatgt tgtgtgggaat tgtgcgggga taacaatttc
>...pKS+.....>

8161  acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcgcgc aattaacct cactaaaggg
>...pKS+.....>>>                >>...T3.....>

                    KpnI              HindIII
                    -----              -----
8221  aacaaaagct gggatccggg cccccctcgc aggtgacagg tatcgata
>>
```

【図 2 B】

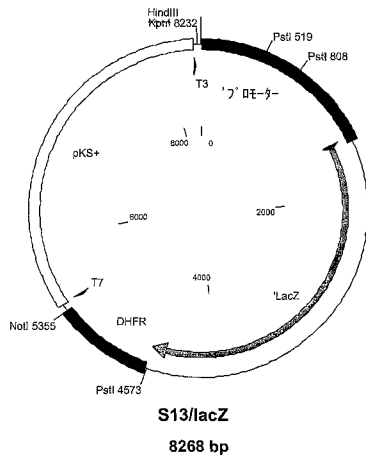
分子： S13/lacZ, 8268bp DNA 環状

分子特徴：

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 由来 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

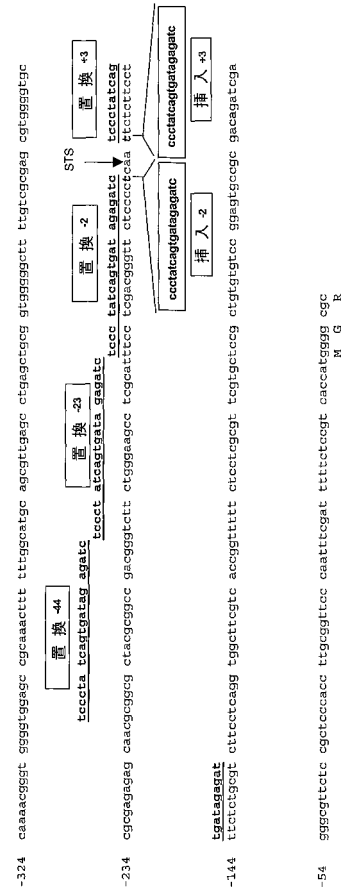
【 図 2 C 】

Figure 2 C



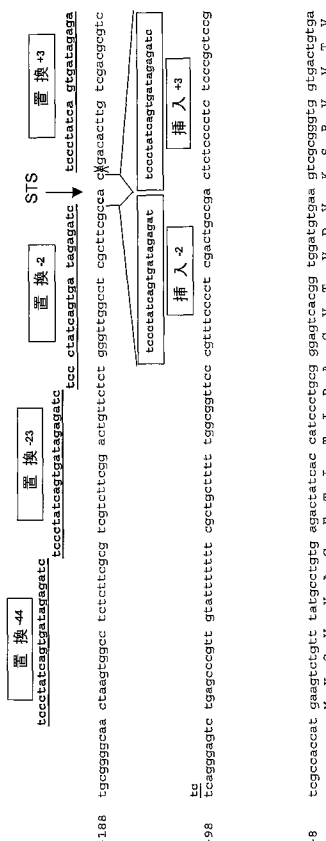
【 図 3 A 】

Figure 3 A



【 図 3 B 】

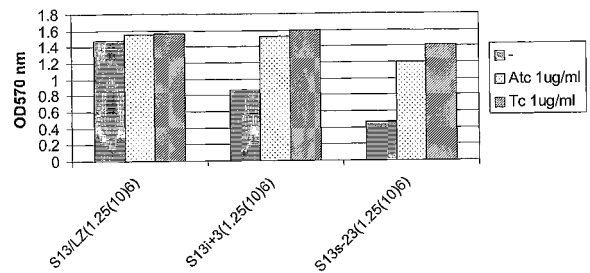
Figure 3 B



【 図 4 】

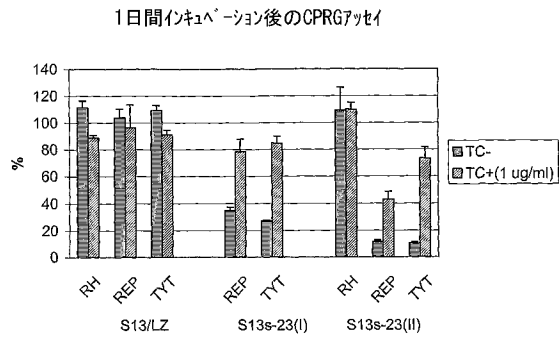
Figure 4

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 】

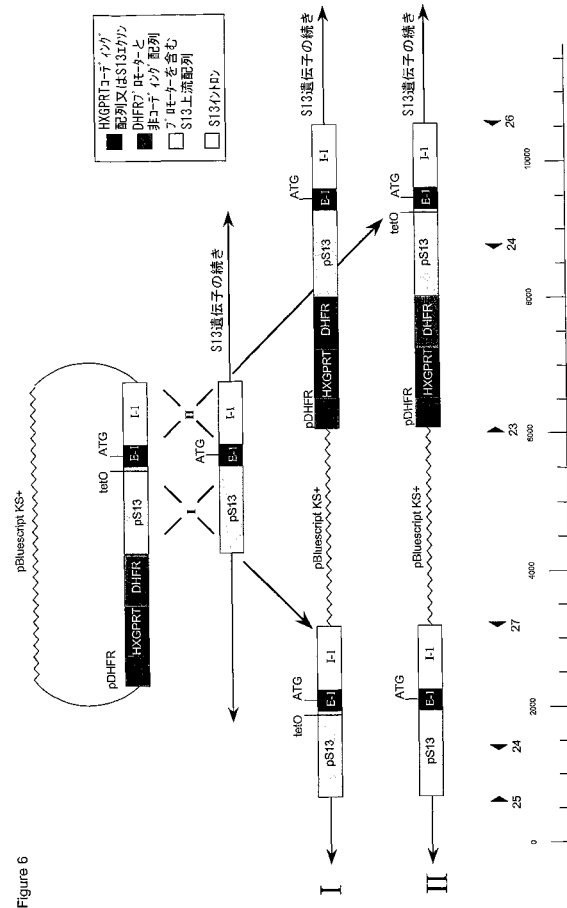


Figure 6

【 図 7 】

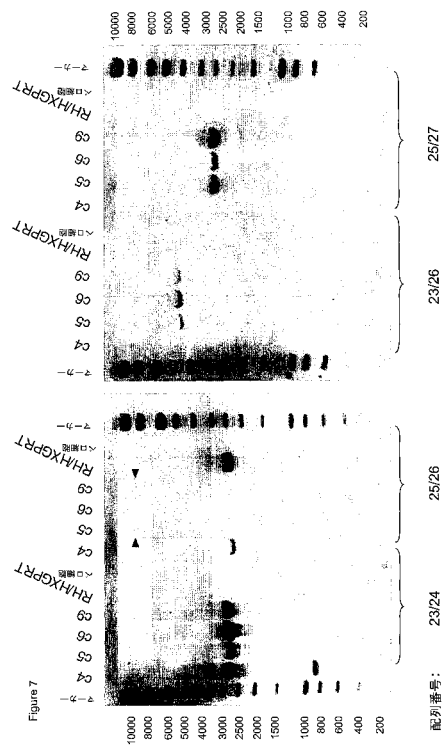


Figure 7

【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)	18
Y	page 3, paragraph 5; claims 20-28	19,20
Y	YAN SHAOFENG 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 March 2004		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、フアン・ウエルデレンシュトラ
ート・1 0 5・アー

(72) 発明者 フェルメーレン, 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、コーフーンデルフェルド・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、フアン・デ・ドゥース・
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