

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-223105

(P2015-223105A)

(43) 公開日 平成27年12月14日(2015. 12. 14)

(51) Int. Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06	Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/11 (2006.01)	C 1 2 N	1/11		4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q	1/66		

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2014-109262 (P2014-109262)
 (22) 出願日 平成26年5月27日 (2014. 5. 27)

(71) 出願人 504300088
 国立大学法人帯広畜産大学
 北海道帯広市稲田町西2線11番地
 (71) 出願人 504258527
 国立大学法人 鹿児島大学
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 原虫の増殖を抑制しかつ潜伏感染への移行を阻止し得る抗原虫薬をスクリーニングするための方法の提供。

【解決手段】 ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ1の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ2の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれた組換えトキソプラズマ株を用いる、抗原虫薬のスクリーニング方法。このスクリーニング方法では、プロモータ1の活性値を原虫の数と潜伏感染へ移行の程度を掛け合わせた値に相当する指標、プロモータ2の活性値を原虫全体の増殖の程度の指標として候補物質の抗原虫作用を評価することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれた組換えトキソプラズマ株を用いる、抗原虫薬のスクリーニング方法。

【請求項 2】

前記プロモータ 1 の活性値及び前記プロモータ 2 の活性値を指標として候補物質を選択する、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

前記プロモータ 1 の活性値と前記プロモータ 2 の活性値の比（プロモータ 1 / プロモータ 2）を指標として候補物質を選択する、請求項 2 記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

細胞に前記組換えトキソプラズマ株を感染させる手順と、
前記細胞に候補物質を処理する手順と、
前記プロモータ 1 の活性値及び前記プロモータ 2 の活性値を測定する手順と、
前記プロモータ 1 の活性値及び / 又は前記プロモータ 2 の活性値の測定値がより小さい候補物質を抗原虫薬として選択する手順を含む、
請求項 2 記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

前記プロモータ 1 の活性値と前記プロモータ 2 の活性値の比（プロモータ 1 / プロモータ 2）を算出する手順と、
該比の算出値がより小さい候補物質を抗原虫薬として選択する手順を含む、
請求項 4 記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

前記プロモータ 1 が B A G 1 プロモータであり、前記プロモータ 2 が T U B A 1 プロモータである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれた組換えトキソプラズマ株。

【請求項 8】

ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれたトキソプラズマ形質転換用ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株に関する。より詳しくは、原虫の増殖を抑制しかつ潜伏感染への移行を阻止し得る抗原虫薬をスクリーニングするための方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

トキソプラズマは、アピコンプレックス門に属する寄生性の原虫である。幅広い哺乳類や鳥類での感染が報告されており、ヒトにおいても世界的に数割程度の人口が感染している。ヒトにおいて临床上問題となってきたのは、先天性トキソプラズマ症と眼トキソプラズマ症である。先天性トキソプラズマ症は、妊娠の数ヶ月前あるいは妊娠中に母親が初めてトキソプラズマに感染する結果起こり、流産や胎児の水頭症、頭蓋内石灰化、神経系の発達障害等を引き起こす。眼トキソプラズマ症は、H I V 感染や臓器移植後の医原性免疫不全などによって免疫力が低下した患者に発症し、視野の異常や視力障害を引き起こす。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

トキソプラズマは、食肉生産家畜やげっ歯類を中間宿主とし、猫科動物を終宿主とする。ヒトへの感染は、感染動物由来の食肉の生食や、ネコの糞中のオーシスト（虫卵）の経口摂取によって生じる。食肉中の潜伏感染状態の虫は食肉検査で検出することが非常に難しい。また、日本で認可されている食肉生産家畜用のワクチンは存在しない。

【 0 0 0 4 】

従来の抗原虫薬は、中間宿主体内でヒトへの感染源となる潜伏感染状態の原虫（ブラディゾイト）を誘導してしまうことから、家畜におけるトキソプラズマ症の薬剤治療は適当ではない。また、現在ヒトに用いられる薬剤（サルファ剤）は、活発に増殖を繰り返す増殖期の原虫（タキゾイト）を標的としており、原虫の潜伏感染状態を排除できず、再発を防止できない。このため、原虫の潜伏感染への移行を止めながら原虫の増殖を止める新しい薬剤が必要とされている。

10

【 0 0 0 5 】

本発明に関連して、非特許文献 1 には、タキゾイト期（増殖期）に特異的に活性を示す S A G 1 プロモータの制御下に赤色蛍光タンパク遺伝子が組み込まれた組換えトキソプラズマ株が記載されている。また、非特許文献 2 には、脳内局所環境における原虫再活性化のメカニズム解明を目的として、S A G 1 プロモータ支配下に赤色蛍光蛋白遺伝子をつないだ発現ユニット、ブラディゾイト期（潜伏期）に特異的に活性を示す B A G 1 プロモータ支配下に緑色蛍光蛋白遺伝子をつないだ発現ユニットの双方を導入した組換えトキソプラズマ株が報告されている。なお、これらの文献には、タキゾイト期及びブラディゾイト期の両方において活性を示すプロモータを利用することは記載されていない。

20

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 "Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue." Takashima Y, et al, Int. J. Parasitol., 2008, 38(5):601 7.

【 非特許文献 2 】 「免疫不全に伴う脳内潜伏トキソプラズマ原虫再活性化の事前予想と再活性化原発局所における宿主遺伝子発現レベルの網羅的解析」（2007年度報告書）、高島 康弘、厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 エイズ対策研究。

30

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、原虫の増殖を抑制しかつ潜伏感染への移行を阻止し得る抗原虫薬をスクリーニングするための方法を提供することを主な目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

上記課題解決のため、本発明は、以下の [1] ~ [1 0] を提供する。

[1] ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれた組換えトキソプラズマ株を用いる、抗原虫薬のスクリーニング方法。

40

[2] 前記プロモータ 1 の活性値及び前記プロモータ 2 の活性値を指標として候補物質を選択する、[1] 記載のスクリーニング方法。

[3] 前記プロモータ 1 の活性値と前記プロモータ 2 の活性値の比（プロモータ 1 / プロモータ 2）指標として候補物質を選択する、[2] 記載のスクリーニング方法。

[4] 細胞に前記組換えトキソプラズマ株を感染させる手順と、前記細胞に候補物質を処理する手順と、前記プロモータ 1 の活性値及び前記プロモータ 2 の活性値を測定する手順と、前記プロモータ 1 の活性値及び / 又は前記プロモータ 2 の活性値の測定値がより小さい候補物質を抗原虫薬として選択する手順を含む、[2] 記載のスクリーニング方法。

[5] 前記プロモータ 1 の活性値と前記プロモータ 2 の活性値の比（プロモータ 1 / プロ

50

モータ 2) を算出する手順と、該比の算出値がより小さい候補物質を抗原虫薬として選択する手順を含む、[4] 記載のスクリーニング方法。

[6] 前記プロモータ 1 が B A G 1 プロモータであり、前記プロモータ 2 が T U B A 1 プロモータである、[1] ~ [5] のいずれかに記載のスクリーニング方法。

[7] 前記レポーター遺伝子がルシフェラーゼである、[1] ~ [6] のいずれかに記載のスクリーニング方法。

[8] 前記プロモータ 1 の制御下に組み込まれたレポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼであり、前記プロモータ 2 の制御下に組み込まれたレポーター遺伝子及びウミシイタケルシフェラーゼである、[7] 記載のスクリーニング方法。

【 0 0 0 9 】

[9] ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれた組換えトキソプラズマ株。

[1 0] ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれたトキソプラズマ形質転換用ベクター。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明により、原虫の増殖を抑制しかつ潜伏感染への移行を阻止し得る抗原虫薬をスクリーニングするための方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】形質転換用プラスミド (p D U A L U C I) の構成を説明する図である。

【図 2】 P L K / D L U C 1 C 9 株を用いて *i n v i t r o* で被験物質の抗原虫作用を評価した結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【 0 0 1 3 】

1. 組換えトキソプラズマ株

本発明に係る組換えトキソプラズマ株は、ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の制御下、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の制御下、にレポーター遺伝子が発現可能に組み込まれていることを特徴する。以下、プロモータ 1 の制御下に組み込まれたレポーター遺伝子を「レポーター遺伝子 1」と、プロモータ 2 の制御下に組み込まれたレポーター遺伝子を「レポーター遺伝子 2」と称する。

【 0 0 1 4 】

この組換えトキソプラズマ株において、ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するプロモータ 1 の活性値は、ブラディゾイトの数 (すなわち原虫の潜伏感染へ移行の程度) の指標とすることができる。そして、プロモータ 1 の活性値は、その制御下で発現するレポーター遺伝子 1 の活性値として取得することが可能である。

【 0 0 1 5 】

また、このブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータ 2 の活性値は、虫体の総数 (すなわち増殖期の虫体及び潜伏感染に移行した虫体の両方を含む原虫全体の増殖の程度) の指標とすることができる。そして、プロモータ 2 の活性値は、その制御下で発現するレポーター遺伝子 2 の活性値として取得することが可能である。

【 0 0 1 6 】

従って、本発明に係るトキソプラズマ株では、プロモータ 1 の活性値を指標として原虫

10

20

30

40

50

の潜伏感染へ移行の程度を、プロモータ 2 の活性値を指標として原虫全体の増殖の程度を評価することができる。

【 0 0 1 7 】

プロモータ 1 としては、ブラディゾイトにおいて特異的に活性化するものであれば特に限定されないが、例えば、B A G 1 (Bradizoite specific antigen 1) プロモータが好適に用いられる。

【 0 0 1 8 】

また、プロモータ 2 としては、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータであれば特に限定されないが、T U B A 1 (alpha tubulin 1) プロモータが好適に用いられる。なお、G R A 1 (dense granule protein 1) プロモータは、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化することが知られているが、プロモータ活性の高さ及びこれによるレポーター遺伝子の活性の検出の容易さの観点から、T U B A 1 がより好ましい(比較例 1 参照)。プロモータ 2 としては、この他、A C T 1 (actin 1)、R P L 3 2 (ribosomal protein L32) など利用できる可能性がある。

【 0 0 1 9 】

プロモータ 1 の制御下に組み込まれるレポーター遺伝子 1 及びプロモータ 2 の制御下に組み込まれるレポーター遺伝子 2 としては、ルシフェラーゼが好ましい。この他、蛍光タンパク質や、色調を変化させるルシフェラーゼの派生物なども利用できる。高感度な検出が可能であることから、ルシフェラーゼが好ましい。

【 0 0 2 0 】

レポーター遺伝子 1 及びレポーター遺伝子 2 には、異なる活性を示すものを用いる。例えば、ルシフェラーゼの場合、異なる基質特異性を有し、当該基質との反応により異なる条件下でそれぞれ異なる励起波長の光を生じさせる酵素を用いることが望ましい。具体的には、例えば、レポーター遺伝子 1 としてホタルルシフェラーゼを、レポーター遺伝子 2 としてウミシイタケルシフェラーゼを用いることが好ましい。この他、レポーター遺伝子 1 及びレポーター遺伝子 2 として、蛍光タンパク質を用いる場合には、レポーターとして異なる励起波長に応じて、異なる蛍光波長を生じさせる酵素を用いることが好ましい。具体的には、例えば、レポーター遺伝子 1 として G F P、レポーター遺伝子 2 として R F P を用いることが好ましい。

【 0 0 2 1 】

組換えトキソプラズマ株は、従来公知の遺伝子工学的手法を用いて作成できる。まず、プロモータ 1 の制御下及びプロモータ 2 の制御下にレポーター遺伝子 1 及びレポーター遺伝子 2 がそれぞれ発現可能に組み込まれたトキソプラズマ形質転換用ベクターを作成する。ベクターには、汎用の遺伝子導入用プラスミドを用いることができる。プロモータ 1、プロモータ 2、レポーター遺伝子 1 及びレポーター遺伝子 2 の塩基配列をコードする核酸断片を、必要に応じて制限酵素切断配列を付加したプライマーを用いて P C R により増幅する。増幅後の核酸断片とプラスミドを制限酵素処理し、必要に応じて精製を行った後、ライゲーション反応を行って形質転換用ベクターを得る。そして、形質転換用ベクターを用いて、宿主のトキソプラズマ株を形質転換することによって、組換えトキソプラズマ株を得る。形質転換は、例えばエレクトロポレーション法などの公知の手法によりベクターを原虫細胞内に導入することにより行えばよい。

【 0 0 2 2 】

2. 抗原虫薬のスクリーニング方法

上述の通り、本発明に係る組換えトキソプラズマ株では、プロモータ 1 の活性値を指標として原虫の潜伏感染へ移行の程度を、プロモータ 2 の活性値を指標として原虫全体の増殖の程度を評価することができる。従って、この組換えトキソプラズマ株は、所望の抗原虫作用を示す抗原虫薬をスクリーニングするために利用できる。

【 0 0 2 3 】

本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法は、以下の手順(1)~(4)を含む。

(1) 細胞に前記組換えトキソプラズマ株を感染させる手順。

10

20

30

40

50

(2) 前記細胞に候補物質を処理する手順。

(3) 前記プロモータ1の活性値及び前記プロモータ2の活性値を測定する手順。

(4) 前記プロモータ1の活性値及び/又は前記プロモータ2の活性値の測定値がより小さい候補物質を抗原虫薬として選択する手順。

また、本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法は、上記(4)の手順に替えて又はこれに加えて以下の(5)、(6)の手順を含んでもよい。

(5) 前記プロモータ1の活性値と前記プロモータ2の活性値の比(プロモータ1/プロモータ2)を算出する手順。

(6) 該比の算出値がより小さい候補物質を抗原虫薬として選択する手順。

【0024】

10

手順(1)

まず、細胞に本発明に係る組換えトキソプラズマ株を感染させる。細胞を用いる場合、プレートやディッシュなどに細胞を培養し、培養液に原虫の懸濁液を添加する。

【0025】

手順(2)

次に、抗原虫薬作用の評価対象とする候補物質を細胞に処理する。細胞を用いる場合、細胞の培養液に候補物質あるいはその溶液又は懸濁液を添加する。

【0026】

手順(3)

プロモータ1の活性値及びプロモータ2の活性値を測定する。例えば、上述したホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼをレポーター遺伝子1及びレポーター遺伝子2として用いる場合、細胞のライセートを調製し、市販のルシフェラーゼアッセイキットを用いてライセート中のホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定することにより、プロモータ1の活性値及びプロモータ2の活性値を得ることができる。

20

【0027】

手順(4)~手順(6)

プロモータ1の活性値は、原虫の数と原虫の潜伏感染へ移行の程度を掛け合わせた値の指標となる。また、プロモータ2の活性値は、原虫全体の増殖の程度の指標となる。このため、得られたプロモータ1の活性値及びプロモータ2の活性値に基づけば、候補物質の抗原虫作用を例えば以下の通り評価することができる。

30

【0028】

<プロモータ1の活性値が大きく、プロモータ2の活性値が小さい場合>

プロモータ2の活性値が小さいため、候補物質は、原虫の増殖を効果的に抑制できていると評価できる。しかし、プロモータ1の活性値が大きいため、潜伏感染への移行を引き起こしてしまっているといえる。

【0029】

<プロモータ1の活性値が小さく、プロモータ2の活性値も小さい場合>

プロモータ2の活性値が小さいため、候補物質は、原虫の増殖を効果的に抑制できていると評価できる。さらに、プロモータ1の活性値も小さいため、潜伏感染への移行も効果的に阻止できていると評価できる。このように、プロモータ1の活性値を上げることなく、プロモータ2の活性値を下げることで候補物質は、潜伏感染を誘導することなく、原虫の増殖を抑制できるという点で優れた抗原虫薬となり得る。

40

【0030】

上記2つの場合は、評価の典型例であるが、本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法では、プロモータ1の活性値の大小により原虫の潜伏感染へ移行の阻止作用を、プロモータ2の活性値の大小により原虫増殖の抑制作用を評価することができるため、所望の抗原虫作用を示す候補物質を探索するために利用できる。

【0031】

評価の指標としては、プロモータ1の活性値とプロモータ2の活性値の比(プロモータ

50

1 / プロモータ 2) を用いることもできる。プロモータ 1 の活性値は、ブラディゾイトの数 (すなわち原虫の潜伏感染へ移行の程度) の指標である。そして、プロモータ 2 の活性値は、虫体の総数 (すなわち増殖期の虫体及び潜伏感染に移行した虫体の両方を含む原虫全体の増殖の程度) の指標である。従って、上記比に基づけば、虫体総数に占めるブラディゾイト数の割合を評価できる。

【 0 0 3 2 】

比 (プロモータ 1 / プロモータ 2) を指標とすれば、例えば原虫の増殖抑制作用が同程度の候補物質であっても、当該比がより小さい候補物質を選択することで、潜伏感染への移行を誘導するリスクがより小さい抗原虫薬を得ることができる。

【 0 0 3 3 】

本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法は、実施例に記載されるように、マルチウェルプレートを用いた多検体処理が可能であり、10の2乗のオーダーの原虫を用いた小スケール解析が可能である。従って、本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法は、所望の抗原虫作用を示す抗原虫薬をハイスループットで探索するために有用である。

【 0 0 3 4 】

さらに、本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法は、原虫の潜伏感染へ移行の程度を原虫全体の増殖の程度との比 (プロモータ 1 / プロモータ 2) で評価することができる。従来の抗原虫薬は、活発に増殖を繰り返す増殖期の原虫 (タキゾイト) を標的としており潜伏感染状態を引き起こしてしまう。本発明に係る抗原虫薬のスクリーニング方法によれば、ブラディゾイトの数を虫体の総数で補正することで、原虫の増殖抑制作用が同程度であっても潜伏感染への移行を誘導するリスクがより小さい候補物質を選択でき、原虫の潜伏感染への移行を阻止しながら増殖を抑制できる新規な薬剤を得ることが可能である。

【 0 0 3 5 】

3 . 原虫の感染機序の解析

本発明に係る組換えトキソプラズマ株では、プロモータ 1 の活性値を指標として原虫の潜伏感染へ移行の程度を、プロモータ 2 の活性値を指標として原虫全体の増殖の程度を評価することができる。従って、この組換えトキソプラズマ株は、トキソプラズマの潜伏感染メカニズムを解析するためにも利用できる。

【実施例】

【 0 0 3 6 】

< 実施例 1 : P L K / D L U C 1 C 9 株の作成 >

ブラディゾイトにおいて特異的に活性化する B A G 1 プロモータの下流、及び、ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化する T U B A 1 プロモータの下流、にそれぞれホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼが発現可能に組み込まれた組換えトキソプラズマ株 (P L K / D L U C 1 C 9 株) を以下の手順により作成した。

【 0 0 3 7 】

(1) 形質転換用ベクターの作成

B A G 1 プロモータの制御下にホタルルシフェラーゼを、T U B A 1 プロモータの制御下にウミシイタケルシフェラーゼを挿入した形質転換用プラスミド (p D U A L U C I 、 図 1 参照) を作製した。

【 0 0 3 8 】

図 1 中、「 H X G P R T c a s s e t t e 」は、外来 D N A 配列を挿入された原虫を選択するための薬剤耐性を与える遺伝子を発現する塩基配列 (配列番号 1) を示す。「 B A G 1 5 ' U T R 」は、B A G 1 遺伝子の 5 ' 側非翻訳領域の塩基配列 (配列番号 2) を示し、B A G 1 プロモータの塩基配列を含む。「 F i r e f l y L U C 」は、ホタルルシフェラーゼの塩基配列 (配列番号 3) を示す。「 G R A 2 3 ' U T R 」は、G R A 2 遺伝子の 3 ' 側非翻訳領域の塩基配列 (配列番号 4) を示す。「 R e n i l l a L U C 」は、ウミシイタケルシフェラーゼの塩基配列 (配列番号 5) を示す。「 T U B A 1 5 ' U T R 」は、T U B A 1 遺伝子の 5 ' 側非翻訳領域の塩基配列 (配列番号 6) を示し、T U B A 1 プロモータの塩基配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

プラスミドの作製は、以下の手順で行った。

(1 - 1) プラスミド「pMini.HT.TUBA1 RenilaLuc Gra2」の作製

TUBA1 5' UTRを、プライマー1及びプライマー2を用いて、トキソプラズマRH株のゲノムから増幅した。また、ウミシイタケルシフェラーゼの塩基配列を、プライマー3及びプライマー4を用いて、市販のプラスミド(pRL TK、Promega)から増幅した。2つの増幅産物を制限酵素処理し、プラスミドpMini.3xFlag.ht (Sugi T. et al. Eukaryot Cell. 2010, 9, 667-670) に挿入し、pMini.HT.TUBA1 RenilaLuc Gra2を得た。

【 0 0 4 0 】

プライマー1 : 5' AAGCGGCCGCAACGACACAAGGAG 3' (配列番号7、下線はNotIサイト)

プライマー2 : 5' GTTTCACCTGCACTCCCATTTTGTGCAAAAAGGGAATTC 3' (配列番号8、下線はEcoRIサイト)

プライマー3 : 5' GAATTCCTTTTTGACAAAATGACTTCGAAAGTTTATG 3' (配列番号9、下線はEcoRIサイト)

プライマー4 : 5' AGATCITATTGTTTCATTTTTGAGA 3' (配列番号10、下線はBglIIサイト)

【 0 0 4 1 】

(1 - 2) プラスミド「pBAG1 FireflyLuc Gra2」の作製

ホタルルシフェラーゼの塩基配列を、プライマー5及びプライマー6を用いて、市販のプラスミド(pGL4.10、Promega)から増幅した。増幅産物を制限酵素処理し、市販のキット(InFusion cloning system、Takara clontech)を用いて、pBAG cassette plasmid (Masatani et al. unpublished data) のBAG1 5' UTR及びGRA2 3' UTRの間に挿入し、pBAG1 FireflyLuc Gra2を得た。

【 0 0 4 2 】

プライマー5 : 5' GCCACCAAGCTTGATATGGAAGATGCCAAAAAC 3' (配列番号11)

プライマー6 : 5' CTGCAGGAATTCGATTTACACGGCGATCTTGCC 3' (配列番号12)

【 0 0 4 3 】

(1 - 3) プラスミド「pDUALUCI」の作製

BAG1 5' UTR及びホタルルシフェラーゼの塩基配列を、制限酵素を用いてpBAG1 FireflyLuc Gra2から切り出した。また、ホタルルシフェラーゼの塩基配列及びGRA2 3' UTRを、プライマー7及びプライマー8を用いて、pBAG1 FireflyLuc Gra2から増幅し、制限酵素処理した。制限酵素処理により得られた2つの断片をpMini.HT.TUBA1 RenilaLuc Gra2に挿入し、pDUALUCIを得た。

【 0 0 4 4 】

プライマー7 : 5' GCCACCAAGCTTGATATGGAAGATGCCAAAAAC 3' (配列番号13)

プライマー8 : 5' AAGGGCCCTGGCGAAATCAACGCAC 3' (配列番号14、下線はApaIサイト)

)

【 0 0 4 5 】

(2) 形質転換

文献 (Karasov, A.O., et al, Int. J. Parasitol. 2005, 35, 285-291) に記載の方法に従って、pDUALUCIをPLK/hxgprt株にトランスフェクトし、形質転換株を選択した。簡単に説明すると、NotIで直線化したpDUALUCI 20 µgを、バッファーに懸濁した原虫(1.0 × 10⁶個)にエレクトロポレーションにより導入した。トランスフェクト後の原虫をMPA (50 µg/ml) 及びキサンチン (50 µg/ml) の存在下で24時間後から選択を開始し2週間程度薬剤選択を行った。選択された原虫を限界希釈によってクローン化して、強いルシフェラーゼ活性を発するクローンをPLK/DLUC1C9株として得た。

【 0 0 4 6 】

< 実施例2 : PLK/DLUC1C9株を用いた抗原虫薬のスクリーニング >

PLK/DLUC1C9株を用いて、原虫の増殖を抑制しかつ潜伏感染への移行を阻止

10

20

30

40

50

する作用を有する低分子化合物をスクリーニングした。

【0047】

宿主細胞（Vero細胞）を96ウェルプレートで単層培養した。PLK/DLUC1 C9株原虫を1000個/ウェルで播種した。2時間培養後、培養液（1%FCS, DMEM）を、DMSOに溶解させた被験物質を含む培養液に交換した。原虫播種2日後に、市販のキット（Dual Glo Luciferase Assay System、Promega）を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

【0048】

6種類の化合物について測定を行った結果を図2に示す。図中、横軸はウミシイタケルシフェラーゼの相対蛍光値（TUBA1プロモータの活性値）を示し、原虫の増殖の指標となる。また、縦軸はホタルルシフェラーゼの相対蛍光値（BAG1プロモータの活性値）を示し、原虫の潜伏感染移行の指標となる。図中、「pH8.1」は、既知の潜伏感染誘導条件であるアルカリ条件（pH8.1）で細胞を処理した結果を示す。また、「control」は、被験物質による処理を行っていない対照群の結果を示す。

10

【0049】

化合物1は、250nM及び125nMの処理では、感染期虫体の増殖を抑制するものの、潜伏感染への移行を強く誘導した。また、500nMの処理でも、感染期虫体の増殖抑制効果は高まるものの、やはり潜伏感染への移行を引き起こした。化合物3も同様の性状を示した。

【0050】

化合物2は、250nM及び125nMの処理では、感染期虫体の増殖を抑制するものの、潜伏感染への移行を強く誘導した。一方、500nMの処理では、潜伏感染への移行を阻止しながら、感染期虫体の増殖も顕著に抑制した。

20

【0051】

化合物4は、潜伏感染への移行を阻止しながら感染期虫体の増殖を抑制し、用量依存的な増殖抑制効果を示した。化合物6も同様の性状を示した。

【0052】

化合物5は、感染期虫体の増殖を抑制できたが、潜伏感染への移行も引き起こした。

【0053】

以上の結果から、原虫の増殖を抑制しかつ潜伏感染への移行を阻止する作用に優れる化合物として化合物4及び化合物6を選択できた。

30

【0054】

<比較例1：プロモータの比較検討>

ブラディゾイト及びタキゾイトにおいて活性化するプロモータとして、TUBA1プロモータに替えてGRA1プロモータを用いた以外は実施例1と同様にして組換えトキソプラズマ株を作成した。形質転換用プラスミドの作成に用いた、GRA1プロモータの塩基配列を含むGRA1遺伝子の5'側非翻訳領域の塩基配列を配列番号15に示す。

【0055】

作成した組換えトキソプラズマ株を、実施例2と同様にして宿主細胞に感染させ、2日後に市販のキットを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

40

【0056】

結果、TUBA1プロモータに比べてGRA1プロモータではウミシイタケルシフェラーゼの活性値が弱く、ブラディゾイト及びタキゾイトに共通して活性化するプロモータには、TUBA1プロモータを用いることが好ましいことが分かった。

【0057】

<参考例1：スクリーニング系の感度評価>

実施例2のスクリーニング系における虫体数の検出感度限界を決定した。

【0058】

宿主細胞（Vero細胞、 1.8×10^6 ）をディッシュ（6cm）で単層培養した。PLK/DLUC1 C9株原虫を播種し、2時間培養した。PBSで3回洗浄して未感染

50

の原虫を取り除いた後、培養液（1%FCS, DMEM）を、維持用（急性感染期型虫体用）培養液（1%FCS, DMEM）又は潜伏感染誘導培養液（1%FCS, 25mM HEPES, DMEM, pH8.1）に交換した。

【0059】

維持用培地を入れたディッシュは37°CのCO₂培養器に入れ5%CO₂で培養を行った。潜伏感染誘導培養液を入れたディッシュは37°Cの湿潤箱に入れ、大気分圧と同じCO₂条件で培養を行った。2日後に培地を交換し、4日目に原虫を細胞から回収した。血球計算盤を用いて原虫数の計測し、希釈列を作成した。希釈後の所定数の虫体をそれぞれ溶解し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

【0060】

感染期虫体および潜伏期虫体それぞれの原虫数と得られたルシフェラーゼ活性を表1に示す。

【0061】

【表1】

Table. 1 Detection range of Luciferase reporter activity

Condition	Cell number	Firefly Luciferase	Renilla luciferase
Tachyzoite	1.4E+05	2.7E+02 (±4.5E+00)	2.0E+06 (±3.3E+04)
	1.2E+04	N/D	2.1E+05 (±6.1E+03)
	1.1E+03	N/D	2.0E+04 (±7.3E+02)
	1.0E+02	N/D	1.8E+03 (±8.0E+01)
Bradyzoite	1.4E+05	8.1E+05 (±2.4E+04)	3.5E+06 (±4.4E+04)
	1.3E+04	8.2E+04 (±3.7E+03)	3.8E+05 (±1.3E+04)
	1.2E+03	7.8E+03 (±2.1E+02)	3.8E+04 (±1.9E+03)
	1.1E+02	7.3E+02 (±4.1E+01)	3.5E+03 (±1.5E+02)

N/D : not determined (signals are lower than the background * 2)

【0062】

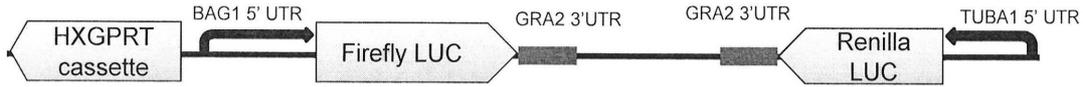
原虫の増殖の指標となるウミシイタケルシフェラーゼの活性値（TUBA1プロモータの活性値）は、10¹の原虫数でも十分な感度で検出が可能であった。また、原虫の潜伏感染移行の指標となるホタルルシフェラーゼの活性値（BAG1プロモータの活性値）も、10¹の原虫数で十分な感度で検出できた。このことから、本スクリーニング系が高い感度を有し、ハイスループットスクリーニングに適した感度を有することが確認された。

【配列表フリーテキスト】

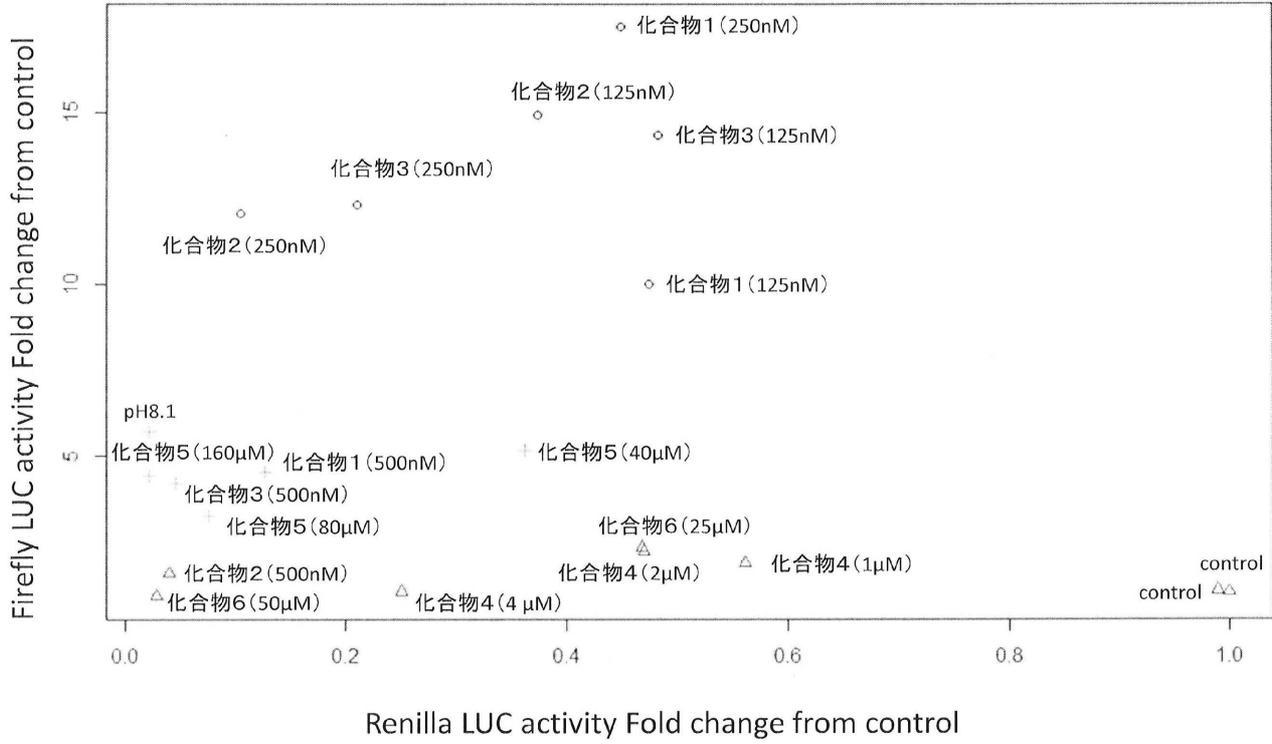
【0063】

配列番号1：HXGPR T c a s s e t t eの塩基配列
 配列番号2：BAG1遺伝子の5'側非翻訳領域の塩基配列
 配列番号3：ホタルルシフェラーゼの塩基配列
 配列番号4：GRA2遺伝子の3'側非翻訳領域の塩基配列
 配列番号5：ウミシイタケルシフェラーゼの塩基配列
 配列番号6：TUBA1遺伝子の5'側非翻訳領域の塩基配列
 配列番号7：プライマー1の塩基配列
 配列番号8：プライマー2の塩基配列
 配列番号9：プライマー3の塩基配列
 配列番号10：プライマー4の塩基配列
 配列番号11：プライマー5の塩基配列
 配列番号12：プライマー6の塩基配列
 配列番号13：プライマー7の塩基配列
 配列番号14：プライマー8の塩基配列
 配列番号15：GRA1遺伝子の5'側非翻訳領域の塩基配列

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

2015223105000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(74)代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(72)発明者 加藤 健太郎

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

(72)発明者 杉 達紀

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

(72)発明者 正谷 達膳

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA07 BA80 CA04 DA02 EA04 GA11 HA08

4B063 QA01 QQ08 QR77 QS05 QX02

4B065 AA86X AA90Y AB04 AC14 BA02 CA44