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

特許第3976685号

(P3976685)

(45)発行日　平成19年9月19日(2007.9.19)　(24)登録日　平成19年6月29日(2007.6.29)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	A
A61P 31/00	(2006.01)	A61P	31/00	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C12R 1/42	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 17　(全 44 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-588737 (P2002-588737)
(86)(22)出願日　平成13年11月23日 (2001.11.23)
(65)公表番号　特表2004-532634 (P2004-532634A)
(43)公表日　平成16年10月28日 (2004.10.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/044185
(87)国際公開番号　WO2002/083890
(87)国際公開日　平成14年10月24日 (2002.10.24)
審査請求日　平成16年11月19日 (2004.11.19)
(31)優先権主張番号　60/252,516
(32)優先日　平成12年11月22日 (2000.11.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　301033248
ユニバーシティ　オブ　メリーランド,　ボルチモア
アメリカ合衆国　２１２０１　メリーランド州　ボルチモア,　ウエスト　ロンバード　ストリート,　５２０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】タンパク質分泌のためのＣｌｙＡ溶血素の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細菌細胞において遺伝子を発現させるための方法であって、以下：

内因性輸送系を含む形質転換されていない細菌細胞の集団に発現ベクターを提供する工程であって、該発現ベクターが、目的のタンパク質に遺伝子的に融合された輸送タンパク質コード配列を含む発現カセットを含む、工程；

該発現カセットを発現させる工程であって、その結果、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質が、産生され、そして培養培地中に輸送され、該輸送タンパク質コード配列が、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ　ｃｌｙＡ遺伝子、Ｓ．ｐａｒａｔｙｐｈｉ　ｃｌｙＡ遺伝子、またはＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｈｌｙＥ遺伝子からなる群より選択される、工程、

を包含する、方法。

【請求項２】

請求項１に記載の方法であって、前記細菌細胞がＳ．Ｔｙｐｈｉ細胞である、方法。

【請求項３】

請求項１に記載の方法であって、前記細菌細胞が、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ細胞である、方法。

【請求項４】

請求項１に記載の方法であって、前記輸送タンパク質コード配列が、配列番号２のアミノ酸配列をコードする、方法。

【請求項５】
請求項１に記載の方法であって、前記輸送タンパク質コード配列が、第１８０位、第１８５位、第１８７位、および第１９３位でのアミノ酸置換からなる群より選択されるアミノ酸置換を生じる１つ以上の変異を有する配列番号２のアミノ酸配列をコードし、該変異が、該輸送タンパク質の溶血活性を減弱し、タンパク質輸送機能を維持する、方法。
【請求項６】
請求項１に記載の方法であって、前記目的のタンパク質が、抗原である、方法。
【請求項７】
宿主の免疫応答を誘発するための組成物であって、以下：
細菌細胞の集団であって、該細菌細胞は、該宿主に提供される内因性輸送系を含み、そして発現ベクターで形質転換されており、該発現ベクターは、目的のタンパク質コード配列に遺伝子的に融合された輸送タンパク質コード配列を含む発現カセットを含む、細菌細胞の集団、
を含み；
該発現カセットは、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質を発現し、該タンパク質は、該宿主中に輸送され；
該融合タンパク質に対する該被験体からの免疫応答が誘発され、ここで該融合タンパク質コード配列は、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ ｃｌｙＡ遺伝子、Ｓ．ｐａｒａｔｙｐｈｉ ｃｌｙＡ遺伝子、またはＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｈｌｙＥ遺伝子からなる群より選択される
組成物。
【請求項８】
請求項７に記載の組成物であって、前記細菌細胞がＳ．Ｔｙｐｈｉ細胞である、組成物。
【請求項９】
請求項７に記載の組成物であって、前記細菌細胞が、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ細胞である、組成物。
【請求項１０】
請求項７に記載の組成物であって、前記輸送タンパク質コード配列が、配列番号２のアミノ酸配列をコードする、組成物。
【請求項１１】
請求項７に記載の組成物であって、前記輸送タンパク質コード配列が、第１８０位、第１８５位、第１８７位、および第１９３位でのアミノ酸置換からなる群より選択されるアミノ酸置換を生じる１つ以上の変異を有する配列番号２のアミノ酸配列をコードし、該変異が、該輸送タンパク質の溶血活性を減弱し、タンパク質輸送機能を維持する、組成物。
【請求項１２】
請求項７に記載の組成物であって、前記目的のタンパク質が、抗原である、組成物。
【請求項１３】
目的のタンパク質を発現するための系であって、以下：
発現カセットを含む発現ベクターであって、該発現カセットが、目的のタンパク質のコード配列に遺伝子的に融合された輸送タンパク質コード配列を含む、発現ベクター；
該発現ベクターで形質転換される、内因性輸送系を含む宿主細胞；および
形質転換された宿主細胞のための培養環境であって、該発現カセットが、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質を発現し、該融合タンパク質が、該形質転換された宿主細胞の外に輸送され、該輸送タンパク質コード配列が、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ ｃｌｙＡ遺伝子、Ｓ．ｐａｒａｔｙｐｈｉ ｃｌｙＡ遺伝子、またはＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｈｌｙＥ遺伝子からなる群より選択される、培養環境、
を備える、系。
【請求項１４】
請求項１３に記載の系であって、前記宿主細胞がＳ．Ｔｙｐｈｉ細胞である、系。

【請求項１５】
請求項１３に記載の系であって、前記宿主細胞が、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ細胞である、系。
【請求項１６】
請求項１３に記載の系であって、前記輸送タンパク質コード配列が、配列番号２のアミノ酸配列をコードする、系。
【請求項１７】
請求項１３に記載の系であって、輸送タンパク質コード配列が、第１８０位、第１８５位、第１８７位、および第１９３位のアミノ酸置換からなる群より選択されるアミノ酸置換を生じる１つ以上の変異を有する配列番号２のアミノ酸配列をコードし、該変異が、該輸送タンパク質の溶血活性を減弱し、タンパク質輸送機能を維持する、系。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（政府援助）
本明細書中に規定したタンパク質輸送系は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈより、助成金５ Ｒ０１ ＡＩ２９４７１、Ｒ０１ ＡＩ４０２９７、およびＲｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｎｔｒａｃｔ Ｎ０１ ＡＩ４５２５１（Ｍ．Ｍ．Ｌｅｖｉｎｅ、Ｐｒｉｎｃｉｐａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒ）からの援助を通じて開発された。
【０００２】
（関連出願）
本出願は、米国仮特許出願第６０／２５２，５１６号（２０００年１１月２２日出願）（これは、本明細書中にその全体が参考として援用される）に対する優先権を主張する。
【０００３】
（発明の背景）
（発明の分野）
以下の開示は、タンパク質輸送系の使用に関する。この開示された系は、組換えタンパク質の産生に有用な、効果的な方法および組成物を提供する。
【０００４】
（関連分野の説明）
タンパク質発現系は、長い間、目的の組換えタンパク質の収率を増加するための試みにおいて、高コピー数の発現プラスミドまたは発現ベクターを用いてきた。高コピー数の発現プラスミドおよびそれらがコードする目的のタンパク質は、発現プラスミドを含む宿主の適合性に負の効果を与え得る。多コピープラスミドを保有する原核生物宿主細胞に与えられる顕著な負荷は、以下の２つのプロセスによって引き起こされる、代謝的カスケードの蓄積的な結果である：１）発現プラスミドの複製および維持ならびに２）目的の遺伝子を含む、プラスミドにコードされた種々の機能の転写および翻訳。そのような機構は、プラスミド保有細菌が、プラスミドを含まない細菌よりも遅く増殖するという観察を説明し得る。この負荷はまた、コピー数が増加するに従い増殖速度が減少するという観察も説明し得る。
【０００５】
目的の遺伝子が発現される場合、組換え宿主細胞の増殖速度は、減少する。増殖速度の減少は、宿主細胞の細胞質中に存在する、組換え産生されたタンパク質を分解し得る、種々の細胞性プロテアーゼの誘導を引き起こし得る。従って、減少した増殖速度は、代謝的負荷の不可避な結果であり、これはまた、多くの生理学的な摂動の累積的な結果である。増殖速度のこの減少が、選択の非存在下で内在するプラスミドの損失に対する選択圧を産生するので、発現ベクターを保有する宿主細胞からの発現プラスミドの有意な損失は、宿主細胞の形質転換後に起こり得る。
【０００６】
減少した増殖速度を有する宿主細胞は、その宿主細胞から必要とされない代謝的負荷を取

り除くために自発的に発現プラスミドを排出し得、そしてプラスミドを含まない細胞に、プラスミドを保有する宿主細胞の集団よりも速く増殖させ得る。そのような宿主細胞の集団内でのタンパク質発現の変化は、タンパク質産生を減少させることが予想される。

【０００７】

従って、発現ベクターからのタンパク質発現を最適化しながら、一方で、その発現ベクターによって産生された宿主細胞に対する代謝的負荷を最小化する、タンパク質発現系を調製することが所望される。

【０００８】

（発明の要旨）

開示物は、宿主細胞外への融合タンパク質の輸送を促進する輸送タンパク質の使用に関する。１つの開示された実施形態は、形質転換されていない細菌宿主細胞の集団に発現ベクターを提供する工程であって、ここで、この発現ベクターが、目的のタンパク質のコード配列に遺伝子的に融合された輸送タンパク質コード配列を含む発現カセットを含む、工程、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質が、産生され、そして培養培地中に輸送（ｅｘｐｏｒｔ）もしくは輸送（ｔｒａｎｓｐｏｒｔ）されるように、発現カセットを発現させる工程、を包含する、細菌細胞中で遺伝子を発現させるための方法を提供する。

【０００９】

別の開示された実施形態は、目的のタンパク質のコード配列に遺伝子的に融合された輸送タンパク質コード配列を含む発現カセットを含む発現ベクターで形質転換された細菌宿主細胞の集団を、動物に提供する工程、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質が、産生され、そしてその動物中に輸送（ｅｘｐｏｒｔ）または輸送（ｔｒａｎｓｐｏｒｔ）されるように、発現カセットを発現させる工程、および融合タンパク質に対する免疫応答をその動物から誘発する工程、を包含する、動物から免疫応答を誘発するための方法に関する。

【００１０】

別の開示された実施形態は、発現カセットを有する発現ベクターであって、発現カセットが、目的のタンパク質のコード配列に遺伝子的に融合された輸送タンパク質コード配列を含む、発現ベクター、この発現ベクターで形質転換される宿主細胞、および形質転換された宿主細胞のための培養環境であって、この発現カセットが、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質を発現し、その融合タンパク質が、その形質転換された宿主細胞の外に輸送される、培養環境、を備える目的のタンパク質を発現させるための系に関する。

【００１１】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

以下の開示は、細菌性宿主から組換えタンパク質を効率良く産生するためのタンパク質輸送系を提供する。好ましい実施形態において、このタンパク質輸送系は、このタンパク質輸送系ベクターが導入される宿主細菌に内因性のタンパク質輸送機構を利用する。

【００１２】

タンパク質輸送系は多くの有用な適用を有する。この系は、細菌宿主細胞内部で目的の組換えタンパク質を効率的に産生し、そしてその細菌宿主細胞からその目的の組換えタンパク質を輸送するために用いられ得る。例えば、この開示された系は、バイオリアクターにおいて目的の組換えタンパク質を効率良く産生するために用いられ得る。

【００１３】

このタンパク質輸送系はまた、動物の抗原性物質に提供するために用いられ得、それに対して、免疫応答がマウントされ得る。例えば、１つの実施形態において、弱毒化された細菌（例えばＳａｌｍｏｎｅｌｌａ）が、このタンパク質輸送系の成分で形質転換される。次いで、この組換えＳａｌｍｏｎｅｌｌａが、動物において免疫応答の生成を促進し得る、生きたベクター免疫原成分として用いられ得る。このタンパク質輸送系は、目的の種々の抗原と共に用いられ得る。特定の実施形態は、腸チフスおよび他の疾患に対する免疫原

性組成物を含む。最小限の細菌の溶解で、組換え細菌から輸送される抗原を発現する免疫原性組成物もまた、開示される。

【００１４】

（Ａ．ＨｌｙＥファミリータンパク質輸送系）

以下の開示は、タンパク質発現を促進するためのタンパク質輸送系におけるＨｌｙＥファミリーのメンバーの使用に関する。ＨｌｙＥファミリーのメンバーは、それらの細菌宿主からの、組換え産生されたタンパク質の輸送を促進するために用いられ得る。組換え的に産生されたタンパク質を輸送する発現系は、増加したタンパク産生を促進すると考えられる。この開示のタンパク質輸送系はまた、動物にワクチン接種するための免疫原性組成物を調製するためにもまた用いられ得る。

【００１５】

発現ベクターを含む組換え生物の増殖速度が、目的の遺伝子の発現のレベルが増殖するにつれて減少することが、観察された。増殖の減少は、発現された組換えタンパク質を分解し得る種々の細胞性プロテアーゼの誘導を引き起こし得る。従って、減少した増殖速度は、代謝的負荷の不可避な結果であり、これらはまた、多くの生理学的な摂動の累積的な結果である。例えば、生理学的摂動は、宿主細菌内部での目的のタンパク質の発現および蓄積により生じる。この蓄積は、宿主細菌の生存力に有害であり得、したがって負の選択圧であり得る。

【００１６】

上述のような代謝的負荷が、選択の非存在下で内在する発現ベクターの損失に対する選択圧を生じるので、宿主細菌からの発現ベクターの有意な損失は、その宿主細菌が目的の遺伝子を含む発現ベクターによって形質転換された後に、生じ得る。自発的なプラスミドの損失は、宿主細菌から任意の代謝的負荷を取り除き、そしてプラスミドを含まない細胞を、プラスミドを保有する宿主細胞の集団よりも速く増殖させ得る。発現ベクターを含まず、従って目的のタンパク質を発現しない細菌細胞の過剰増殖は、全体のタンパク質産生レベルを減少させる。従って、目的の所定のタンパク質の高レベルの合成を指向する発現ベクターを維持するように遺伝子的に拘束されていない宿主細菌は、有意に少ないタンパク質を産生し得る。

【００１７】

組換え発現された目的のタンパク質を輸送するための好ましい実施形態は、発現ベクターを有する宿主細菌中の内因性輸送系を利用することを包含する。内因性輸送系の利用は、それが外因性輸送系を供給するための外来性のタンパク質をコードする大量の異種ＤＮＡの必要性を回避するので、部分的に有利である。しかし、外因性輸送系を利用するタンパク質輸送系もまた、本開示に包含される。

【００１８】

魅力的な内因性輸送系候補は、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ血液型亜型Ｔｙｐｈｉ（本明細書中以降「Ｓ．Ｔｙｐｈｉ」）の染色体中の細胞溶解酵素Ａ（ＣｙｔｏｌｙｓｉｎＡ）（ｃｌｙＡ）によりコードされる潜在性の溶血素（ＨｌｙＥファミリーのタンパク質のメンバー）である。このＨｌｙＥファミリーは、単一のタンパク質（ＨｌｙＥ）ならびにＥ．ｃｏｌｉ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｆｌｅｘｎｅｒｉ、およびＳ．Ｔｙｐｈｉならびに他の細菌由来のその近縁のホモログからからなる。そのＥ．ｃｏｌｉタンパク質は、ＣｌｙＡ、ＨｌｙＥ、およびサイレント溶血素Ａ（ＳｈｅＡ）とも呼ばれる、機能的に十分に特徴づけられた、孔形成する、染色体にコードされた溶血素である。これは、３０３アミノ酸残基（３４ｋＤａ）からなる。その転写は、ＳｌｙＡ（いくつかの腸内細菌中に見出される調製因子）によって正に制御される。ＨｌｙＥは、脂質二重層中に、２．５～３．０ｎｍの直径を有する、安定で、穏やかなカチオン選択性の膜貫通孔を形成する。このタンパク質は、コレステロールと結合し、そして膜がコレステロールを含む場合、膜における孔形成が、刺激される。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨｌｙＥの結晶構造が、２．０Åの解像度で解析され、そして低解像度でのこのトキシンの脂質会合形態の可視化が、電子顕微鏡によって達成された。この構造は、数１００Å長の精巧な螺旋状の束を示す。それは、

脂質存在下で、オリゴマーとなり、膜貫通孔を形成する。

【００１９】

（Ｂ、細胞溶解素Ａ（ＣｌｙＡ）タンパク質輸送系）

本開示の好ましい実施形態は、タンパク質輸送系における、ＣｌｙＡタンパク質（ＨｌｙＥファミリーのメンバー）の使用に関する。約１ｋｂのｃｌｙＡ遺伝子を、タンパク質輸送系における使用のために、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ　ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡよりクローニングした。このＣｌｙ　Ａタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉおよび Ｓ．Ｔｙｐｈｉの両方より輸送され、そしてｃｌｙＡオープンリーディングフレームの３’末端に遺伝子的に融合されたパッセンジャータンパク質を輸送し得る。本明細書中に示されるパッセンジャータンパク質はまた、目的のタンパク質とも呼ばれる。これらの融合タンパク質の適切な折りたたみは、これらのドメインの固有の生物学的活性が観察されるように生じることが実証される。

【００２０】

Ｓ．Ｔｙｐｈｉ由来の細胞溶解素Ａ（ＣｌｙＡ）は、最初に、Ｗａｌｌａｃｅら（彼らはまた、Ｅ．ｃｏｌｉ由来の相同性溶血素についての結晶構造も報告している（Ｗａｌｌａｃｅ，Ａ．Ｊ．、Ｔ．Ｊ．Ｓｔｉｌｌｍａｎ、Ａ．Ａｔｋｉｎｓ、Ｓ．Ｊ．Ｊａｍｉｅｓｏｎ、Ｐ．Ａ．Ｂｕｌｌｏｕｇｈ、Ｊ．Ｇｒｅｅｎ、およびＰ．Ｊ．Ａｒｔｙｍｉｕｋ、２０００．Ｅ．ｃｏｌｉ　ｈｅｍｏｌｙｓｉｎ　Ｅ（ＨｌｙＥ，ＣｌｙＡ，ＳｈｅＡ）：Ｘ－ｒａｙ　ｃｒｙｓｔａｌ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｔｏｘｉｎ　ａｎｄ　ｏｂｓｅｒｂａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐｏｒｅｓ　ｂｙ　ｅｌｅｃｔｉｏｎ　ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ．Ｃｅｌｌ　１００：２６５－２７６によって記載された。この溶血素は、以前に記載され、そしてＣｌｙＡ、ＨｌｙＥまたはＳｈｅＡと様々で呼ばれている。本明細書では、混同を回避するために、Ｅ．ｃｏｌｉの溶血素を、ＨｌｙＥと称し、そしてこれは、ｈｌｙＥによってコードされる。また、明確さのために、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ溶血素を、本明細書中においてＣｌｙＡと示し、これは、ｃｌｙＡによってコードされる。

【００２１】

例示の目的のために、ＨｌｙＥファミリーメンバーのタンパク質の構造を、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質ＨｌｙＥを参照として議論する。ＨｌｙＥは、疎水性の２７残基の膜貫通領域を有するねじれた棒状の分子である。この領域は、この折りたたまれた分子の一端を有し、そして標的の膜内に孔を形成することが提唱されている。この孔の形成は、最終的には、標的細胞の溶解を導く。高度な電子顕微鏡での研究において、Ｗａｌｌａｃｅらは、ＨｌｙＥが、脂質小胞に挿し、８分子のＨｌｙＥモノマーから構成される孔を形成することを示した。

【００２２】

ＨｌｙＥによって促進される孔形成が解明されたが、ＨｌｙＥおよびＨｌｙＥホモログが細菌外に輸送される機構は、不明確のままである。さらに、溶血素が集合的に孔となるために標的の膜へと挿入する様式もまた、十分には理解されていない。Ｄｅｌ　Ｃａｓｔｉｌｌｏらは、中期対数増殖期にわたってピークとなりそして定常期の開始時に消滅する、溶血素活性の増殖期依存分泌を記載した（ｄｅｌ　Ｃａｓｔｉｌｌｏ，Ｆ．Ｊ．、Ｓ．Ｃ．Ｌｅａｌ、Ｆ．Ｍｏｒｅｎｏ、およびＩ．ｄｅｌ　Ｃａｓｔｉｌｌｏ．１９９７．Ｔｈｅ　Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　Ｋ－１２　ｓｈｅＡ　ｇｅｎｅ　ｅｎｃｏｄｅｓ　ａ　３４－ｋＤａ　ｓｅｃｒｅｔｅｄ　ｈａｅｍｏｌｙｓｉｎ．Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２５：１０７－１１５．）。Ｌｕｄｗｉｇおよび共同研究者は、この潜在性の溶血素の分泌に、ペリプラズムに閉じ込められたタンパク質の洩れが付随するが、細胞質のタンパク質の損失が付随しないことを報告をし、ＨｌｙＥを放出するための完全な細胞溶解に対して議論した（Ｌｕｄｗｉｇ，Ａ．、Ｓ．Ｂａｕｅｒ、Ｒ．Ｂｅｎｚ、Ｂ．Ｂｅｒｇｍａｎｎ、およびＷ．Ｇｏｅｂｅｌ．１９９９．Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＳｌｙＡ－ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ｅｘｐｒｅｓｉｏｎ，ｓｕｂｃｅｌｌｕｌａｒ　ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｐｏｒｅ－ｆｏｒｍｉｎｇ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｏｆ

ａ３４ｋＤａ ｈａｅｍｏｌｙｓｉｎ（ＣｌｙＡ） ｆｒｏｍ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ－１２．Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ．３１：５５７－５６７）。

【００２３】

さらに、ｈｌｙＥによってコードされる配列と比較した場合、分泌されたＨｌｙＥのＮ末端配列決定は、ＨｌｙＥが、輸送の間に、Ｎ末端がプロセッシングをされないことを明らかにした。Ｏｓｃａｒｓｓｏｎらは、ＨｌｙＥが、コレステロールに結合すること、および標的膜中のコレステロールの存在が、孔形成および溶解を刺激することを報告した（Ｏｓｃａｒｓｓｏｎ，Ｊ．、Ｙ．Ｍｉｚｕｎｏｅ、Ｌ．Ｌｉ、Ｘ．Ｌａｉ、Ａ．Ｗｉｅｓｌａｎｄｅｒ、およびＢ．Ｅ．Ｕｈｌｉｎ．１９９９．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ ｃｙｔｏｌｙｔｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ ＣｌｙＡ（ＳｈｅＡ） ｆｒｏｍ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ．Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３２：１２２６－１２３８）。約10^3分子のＨｌｙＥが、標的の赤血球の溶解のために必要とされると推定され、これは、細胞溶解検出の前のＨｌｙＥの有意な蓄積を示唆する。ＨｌｙＥは、３．０～９．０の間のｐＨ値の範囲内で非常に安定であり、そしてトリプシンおよびペプシンを含むプロテアーゼによる切断に対して耐性である（Ａｔｋｉｎｓ，Ａ．、Ｎ．Ｒ．Ｗｙｂｏｒｎ、Ａ．Ｊ．Ｗａｌｌａｃｅ、Ｔ．Ｊ．Ｓｔｉｌｌｍａｎ、Ｌ．Ｋ．Ｂｌａｃｋ、Ａ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｉｎｇ、Ｍ．Ｈｉｓａｋａｄｏ、Ｐ．Ｊ．Ａｒｔｙｍｉｕｋ、およびＪ．Ｇｒｅｅｎ．２０００．Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐｓ ｏｆ ａ ｎｏｖｅｌ ｂｅｃｔｅｒｉａｌ ｔｏｘｉｎ，ｈｅｍｏｌｙｓｉｎ Ｅ．Ｔｈｅ ｒｏｌｅ ｏｆ $\underline{\alpha}_G$．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：４１１５０－４１１５５）。

【００２４】

この開示された研究中に用いられるＣｌｙＡタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号１および配列番号２として提供する。他のＨｌｙＥファミリーメンバーもまた、当業者に入手可能かつ公知である。例えば、細胞溶解素Ａの別のＳ．Ｔｙｐｈｉ ｃｌｙＡ遺伝子は、ＧＥＮＢＡＮＫ登録番号ＡＪ３１３０３４の下で入手可能であり；細胞溶解素ＡのＳａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ ｃｌｙＡ遺伝子配列は、ＧＥＮＢＡＮＫ登録番号ＡＪ３１３０３３の下で入手可能であり；Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ短縮型ＨｌｙＥ（ｈｌｙＥ）遺伝子の完全なコード配列は、ＧＥＮＢＡＮＫ登録番号ＡＦ２００９５５の下で入手可能であり；そしてＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｃｌｙＡ遺伝子配列は、ＧＥＮＢＡＮＫ登録番号ＡＪ００１８２９の下で入手可能である。

【００２５】

ＨｌｙＥファミリーのタンパク質は、代表的に、標的細胞中で溶血を引き起こす。溶血素的に活性または不活性なＨｌｙＥファミリーメンバーは、両方とも、開示された教示により用いられ得る。例えば、ｃｌｙＡ遺伝子の変異は、溶血素の活性を減少または排除し得ることが、知られている。例えば、溶血素活性の損失は、ｃｌｙＡが、アミノ酸置換が第１８０位、第１８５位、第１８７位および第１９３位に生じるように変異された場合に、報告された。詳細には、Ｇ１８０Ｖ、Ｖ１８５Ｓ、Ａ１８７Ｓ、およびＩ１９３Ｓは、変異ｃｌｙＡ遺伝子から発現されたＣｌｙＡタンパク質の溶血素的活性の損失を生じる。

【００２６】

本開示は、タンパク質輸送系を生じる、ＨｌｙＥファミリーのタンパク質の輸送特性を利用する。例えば、ＨｙｌＡファミリーの任意のメンバーおよび目的のタンパク質を含む融合タンパク質が、開示される。さらに詳細には、ＣｌｙＡおよび目的のタンパク質を含む融合タンパク質が、開示される。以下に議論されるように、ＣｌｙＡ含有融合タンパク質が、細菌宿主細胞から周囲の培地へと輸送される。輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質成分を含む発現系のこの特徴は、目的のタンパク質の産生および輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質の輸送を促進する。

【００２７】

（輸送タンパク質発現ベクター）

本明細書中に記載されるタンパク質輸送系は、輸送タンパク質および目的のタンパク質を

含む広範な融合タンパク質を発現および輸送させるために用いられ得る。この輸送タンパク質は、ＨｌｙＥファミリーのタンパク質より選択される。１つの実施形態において、この目的のタンパク質は、目的の遺伝子によってコードされる。この目的の遺伝子は、タンパク質輸送系を含む細菌に対して異種であり得るか、またはその細菌に対して内因性である遺伝子であり得る。代表的には、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質構築物は、発現カセット中に存在し、それは次いで発現ベクター中に存在する。これらのユニットの各々が、以下に議論される。

【００２８】

（発現ベクター）

タンパク質輸送系は、目的のタンパク質の組換え産生を容易にするために、発現ベクターを利用する。代表的には、その発現ベクターは、複製起点ならびにその宿主細胞における発現ベクターの維持を制御および調節する他の構造的特徴を含む。定義により、用語「発現ベクター」とは、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質発現カセットを含む、発現カセットの挿入または組み込みによって操作された、当該分野において公知のプラスミド、ウイルス、または他のビヒクルをいう。発現ベクター系の例として、Ｇａｌｅｎら、Ｉｍｍｕｎ．６７：６４２４－６４３３（１９９９）ならびに米国特許出願第０９／２０４，１１７号、１９９８年１２月２日出願および同第０９／４５３，３１３号、１９９９年１２月２日出願、（これらは、本明細書中にその全体が、参考として援用される）に記載されるような、プラスミドに、２つの独立したレベルでの安定性を与える発現ベクターが、教示される。

【００２９】

（輸送タンパク質－融合タンパク質発現カセット）

本明細書中に記載されるタンパク質輸送系は、輸送タンパク質および目的のタンパク質を含む広範な融合タンパク質を発現および輸送させるために用いられ得る。この目的のタンパク質は、目的の遺伝子でもある、その目的のタンパク質のコード配列によってコードされている。この目的の遺伝子は、タンパク質輸送系を含む細菌に対して異種であり得るか、またはその細菌に対して内因性の遺伝子であり得る。目的のタンパク質は、単一のアミノ酸から輸送タンパク質分子の数倍のサイズのタンパク質の範囲であり得る。さらに好ましくは、目的のタンパク質は、１０アミノ酸から輸送タンパク質の２倍のサイズの範囲であり得る。この目的のタンパク質のサイズが、細菌外に完全に輸送される輸送タンパク質の能力を干渉しない程度であることが好ましい。例示的な目的のタンパク質は、質量として０ｋＤａから少なくとも５０ｋＤａである。より大きな質量（従って、より長いタンパク質）もまた目的のタンパク質として用いられ得る。例えば、目的のタンパク質は、５５ｋＤａ、６０ｋＤａ、６５ｋＤａ、７０ｋＤａ、７５ｋＤａ、８０ｋＤａ、８５ｋＤａ、９０ｋＤａ、９５ｋＤａ、１００ｋＤａ、またはそれ以上の質量を有し得る。

【００３０】

あるいは、目的のタンパク質は、１～１０００アミノ酸、またはそれ以上からなる。例えば、目的のタンパク質は、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、またはそれ以上のアミノ酸を有し得る。

【００３１】

代表的には、発現される目的の遺伝子は、発現カセット中に存在する。発現カセットは、代表的に、目的の遺伝子を転写させ得るのに適した構造的特徴（例えば、プロモーター、終結因子など）を有する。

【００３２】

輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列（「輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質コード配列」としても公知）は、発現制御配列に作動可能に連結され得、発現カセットを形成し得る。用語「作動可能に連結された」とは、そのように記載された成分が、それらの意図する様式でそれらを

機能させ得る関係にある、近位をいう。コード配列に作動可能に連結された発現制御配列は、そのコード配列の発現が発現制御配列に適合する条件下で達成されるように連結されている。本明細書中に使用される場合、用語「発現制御配列」とは、それが作動可能に連結された核酸配列の発現を調節する核酸配列をいう。発現制御配列が、核酸配列の転写、および（適する場合に）翻訳を制御および調節する場合、その発現制御配列は、核酸配列に作動可能に連結されている。従って、発現制御配列は、適切なプロモーター、転写終結因子、最適化されたリボソーム結合配列、タンパク質コード遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ＡＴＧ）、ｍＲＮＡの適切な翻訳を可能とするためのこの遺伝子の正しいリーディングフレーム、および終止コドンを含み得る。用語「制御配列」は、その存在が発現に影響し得る成分を最低限含むことが意図され、そしてその存在が有利となる（例えば、リーダー配列）さらなる成分も含み得る。発現制御配列は、プロモーターを含み得る。

【００３３】

「プロモーター」とは、転写を指向するのに十分な最小限の配列である。また、本発明中には、細胞型特異性、組織特異性、または外来性のシグナルもしくは薬剤による誘導性について制御可能なプロモーター依存性遺伝子発現を与えるのに十分であるこれらのプロモーターエレメントも含まれ；そのようなエレメントは、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質コード配列の５’領域に配置されても、３’領域に配置されてもよい。構成性プロモーターおよび誘導性プロモーターの両方は、開示された方法に有用である。輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質コード配列の発現は、多くのプロモーターによって推進され得る。輸送タンパク質の内因性プロモーターが、発現カセットの転写調節のために用いられ得るが、好ましくは、このプロモーターは、異種の調節配列である。誘導可能な内因性プロモーターの例は、発現カセットの転写を推進するために用いられ得るｏｍｐＣプロモーターである。

【００３４】

本発明において有用なプロモーターは、構成性および誘導性の両方の天然プロモーターおよび操作されたプロモーターである。好ましい誘導性プロモーターは、１）インデューサーの非存在下で低発現を提供し；２）インデューサーの存在下で高発現を提供し；３）宿主細胞の通常の生理を干渉しない誘導機構を用い；そして４）他の遺伝子の発現に対する効果をほとんど有さないか、または全く有さないべきである。誘導性プロモーターの例は、化学的手段によって誘導されるものを含む。当業者は、構成性および誘導性の、他のプロモーターを知っている。

【００３５】

選択された特定のプロモーターは、有効量の輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質の産生を生じるのに十分な発現を引き起こし得る。有効量の輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質は、発現の目標に依存して変化し得る。本開示のベクター構築物において用いられたプロモーターは、所望の場合、それらの制御特性に影響するように改変され得る。

【００３６】

輸送タンパク質および目的のタンパク質を含む、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質は、さらに、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質の一部として発現されるように発現カセット中に操作された精製タグを含み得る。このタグは、記載の方法によって産生された、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質および／または目的のタンパク質の精製を促進するために選択される。例えば、多数のヒスチジン残基は、タンパク質精製を促進するために、目的のタンパク質のＣ末端部分またはＮ末端部分へと操作され得る。タグの導入が、目的のタンパク質の不適切は折りたたみを最小限にすることが好ましい。

【００３７】

ポリヒスチジンタグに加えて、タンパク質精製を促進するために用いられ得る多くの他のタンパク質タグが存在する。例えば、マルトース結合タンパク質タグ、ｃ－ｍｙｃエピトープタグ、緑色蛍光タンパク質タグ、ルシフェラーゼタグ、β－ガラクトシダーゼタグ、

ポリヒスチジンタグ、または記載の系に用いられ得る任意の他の適切なタンパク質発現タグのような抗原タグ。

【００３８】

輸送タンパク質および目的のタンパク質を含む、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質は、さらに、発現および輸送されたタンパク質の使用を促進するためのさらなる特徴を含む。例えば、プロテアーゼ認識部位は、適用可能な場合に上記のタグを含む、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質の種々の成分の間で操作され得、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質の成分の分離を促進する。例えば、プロテアーゼ認識部位は、発現カセット中の輸送タンパク質の配列と目的のタンパク質の配列との間に導入され得る。また、プロテアーゼ認識部位は、配列カセット中のタグの配列と目的のタンパク質の配列との間に導入され得る。これらのプロテアーゼ認識部位は、目的のタンパク質からの輸送タンパク質の分離を促進する。

【００３９】

必要に応じて、選択マーカーが、発現カセットに結合され得る。本明細書中に使用される場合、用語「マーカー」とは、マーカーを含む宿主細胞の選択（またはそれについてのスクリーニング）を可能とする形質または表現型をコードする遺伝子をいう。マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子であり得、それによって適切な抗生物質が、形質転換されていない細胞の中から形質転換宿主細胞について選択するために用いられ得るか、またはマーカー遺伝子は、いくつかの他の薬物耐性遺伝子であり得る。適切な選択マーカーの例としては、アデノシンジアミナーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素、ハイグロマイシン－Ｂ－ホスホトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ、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、グリホスフェートおよびグルフォシネート耐性ならびにアミノグリコシド３’－Ｏ－ホスホトランスフェラーゼＩＩ（カナマイシン、ネオマイシン、およびＧ４１８耐性）。当業者は、この開示された教示で用いられ得る他の適切なマーカーを知る。

【００４０】

発現ベクターの例を、図１に示す。図１Ａに、ｐＳＥＣ８４発現ベクターを示す。ｐＳＥＣ８４ベクターのヌクレオチド配列が、配列番号１に見出され得る。ｃｌｙＡ遺伝子によってコードされたＣｌｙＡのアミノ酸配列が、配列番号２に見出される。

【００４１】

図１Ａ～図１Ｄに示す各々のベクターは、プロモーター（P_{ampC}－Ｅ．ｃｏｌｉ由来の、改変され、浸透圧的に制御されるｏｍｐＣプロモーター）、輸送タンパク質（ｃｌｙＡ）、複製起点、転写終止因子（Ｔ１）、受動性分割機能（ｐａｓｓｉｖｅ ｐａｒｔｉｔｉｏｎｉｎｇ ｆｕｎｃｔｉｏｎ、ｐａｒ）、カナマイシン耐性（ａｐｈ）、分離後死滅系（ｐｏｓｔ－ｓｅｇｒｅｇａｔｉｏｎａｌ ｋｉｌｌｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ、ｈｏｋ－ｓｏｋ）、および活性分割系（ｐａｒＡ）を含む。これらのベクター成分が、単に、この開示された系の１つの実施形態の例示であることが注意されるべきである。

【００４２】

図１Ｂは、ｐＳＥＣ８４ｂｌａ発現ベクターを例示する。この発現ベクターは、ｐＳＥＣ８４ベクターと同じ特徴を有し、そしてさらに輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質構築物を含む。詳細には、β－ラクタマーゼをコードするｂｌａ遺伝子を、親のベクターの第１４２６位の、Ｎｈｅ Ｉ部位で、ｐＳＥＣ８４ベクターにクローニングした。他の融合構築物を、図１Ｃ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）および図１Ｄ（ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖ）に示す。

【００４３】

（目的の遺伝子）

本明細書中に開示されるタンパク質輸送系が、目的の種々の遺伝子と共に用いられ得る。１つの実施形態において、目的の遺伝子は、所望のタンパク質をコードする。組換え細菌発現に従う任意のタンパク質が、この開示された輸送系と共に用いられ得る。目的の遺伝子は、例えば、酵素、酵素インヒビター、ホルモン、リンホカイン、プラスミノーゲン活性化因子のような哺乳動物のポリペプチド、または目的の任意の他のタンパク質のような

任意のポリペプチドをコードし得る。目的の遺伝子は、目的の、真核生物遺伝子、原核生物遺伝子、植物遺伝子、またはウイルス遺伝子をコードし得る。

【００４４】

この開示された系の１つの利点は、宿主細菌に対して毒性のタンパク質を現在発現させ得る方法を提供することである。例えば、特定のタンパク質の組換え発現は、その発現タンパク質が宿主細胞から輸送されない場合、悪化されるか、または不可能である。本明細書に開示される方法を用いて、当業者は、これまで発現不可能または低発現のタンパク質を発現し得、そして使用可能な量の所望のタンパク質を産生し得た。

【００４５】

別の実施形態において、目的の遺伝子は、免疫学的抗原コード遺伝子であり、そして目的のタンパク質は、ウイルス性病原体、細菌性病原体、および寄生生物性病原体のような、任意の病原体由来のタンパク質またはその抗原フラグメントであり得る、抗原である。あるいは、目的の遺伝子は、ウイルス性病原体、細菌性病原体、寄生生物性病原体、または目的の別の抗原由来の抗原またはそれらの部分をコードする、組換えＤＮＡ法を用いて構築された合成遺伝子であり得る。これらの病原は、ヒト、家畜動物、または野生動物宿主において感染性であり得る。

【００４６】

ウイルス病原体が誘導される、特定のウイルス性病原体の例としては、オルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）；レトロウイルス（例えば、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ））およびシミアン免疫欠損ウイルス（ＳＩＶ）、疱疹ウイルス（例えば、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）または単純疱疹ウイルス）；レンチウイルス（例えば、ヒト免疫欠損ウイルス）；ラブドウイルス（例えば、狂犬病）；ピコルナウイルス（例えば、ポリオウイルス）；ポックスウイルス（例えば、痘疹）；ロタウイルスおよびパルボウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４７】

ウイルス性病原体由来の免疫原性抗原の例としては、ヒト免疫欠損ウイルス抗原Ｎｅｆ、ｐ２４、ｇｐ１２０、ｇｐ４１、Ｔａｔ、Ｒｅｖ、およびＰｏｌが挙げられる。抗原のさらなる例としては、Ｔ細胞およびＢ細胞のエピトープであるｐ１２０、Ｂ型肝炎表面抗原、ロタウイルス抗原（例えば、ＶＰ４、ＶＰ６、およびＶＰ７）、インフルゼンザウイルス抗原（例えば、ヘマグルチニンまたは核タンパク質）、および単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼが挙げられる。これらのウイルス抗原の各々についての核酸配列およびアミノ酸配列は、当該分野において周知であり、そして容易に入手可能である。

【００４８】

細菌性病原体（そこから細菌性抗原が、誘導され得る）としては、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ種、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ種、Ｓｈｉｇｅｌｌａ種、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ種、Ｌｉｓｔｅｒｉａ種、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ種、Ｖｉｂｒｉｏ種、およびＢｏｒｅｌｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４９】

細菌性病原体の免疫原性抗原の例としては、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ形態１抗原、Ｖ．ｃｈｏｌｅｒａｅ Ｉｎａｂａ株５６９ＢのＯ抗原、腸毒素産生性Ｅ．ｃｏｌｉの免疫原性抗原（例えば、ＣＦＡ／Ｉ采状抗原および非耐熱性毒素の非毒性Ｂサブユニット）、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓのペルタクチン（ｐｅｒｔａｃｔｉｎ）、Ｂ型肝炎のアデニル酸シクラーゼ－溶血素、ならびにＣｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉの破傷風毒素のフラグメントＣが挙げられるが、これらに限定されない。

【００５０】

寄生生物病原体の免疫原性抗原（そこから寄生生物抗原が、誘導され得る）の例としては、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ種、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍｅ種、Ｇｉａｒｄｉａ種、Ｂｏｏｐｈ

ｉｌｕｓ種、Ｂａｂｅｓｉａ種、Ｅｎｔａｍｏｅｂａ種、Ｅｉｍｅｒｉａ種、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ種、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍｅ種、Ｂｒｕｇｉａ種、Ｆａｓｃｉｄａ種、Ｄｉｒｏｆｉｌａｒｉａ種、Ｗｕｃｈｅｒｅｒｉａ種、およびＯｎｃｈｏｃｅｒｅａ種が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５１】

寄生生物病原体の免疫原性抗原の例としては、のＰｌａｓｍｏｄｉｕｍ種の周線虫（ｃｉｒｃｕｍｓｐｏｒｏｚｏｉｔｅ）抗原（例えば、Ｐ．ｂｅｒｇｅｒｉｉの周線虫抗原またはＰ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍの周線虫抗原）；Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ種メロゾイド表面抗原；Ｅｎｔａｍｏｅｂａ　ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａのガラクトース特異性レクチン、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ種のｇｐ６３、Ｂｒｕｇｉａ　ｍａｌａｙｉのパラミオシン、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｍａｎｓｏｎｒのトリオースホスフェートイソメラーゼ；Ｔｒｉｃｈｏｓｔｒｏｎｇｙｌｕｓ　ｃｏｌｕｂｒｉｆｏｒｍｉｓの分泌グロブリン様タンパク質；Ｆｒａｓｃｉｏｌａ　ｈｅｐａｔｉｃａ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｂｏｖｉｓ、およびＳ．ｊａｐｏｎｉｃｕｍのグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ；ならびにＳｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｂｏｖｉｓおよびＳ．ｊａｐｏｎｉｃｕｍのＫＬＨが挙げられるが、これらに限定されない。

【００５２】

別の実施形態において、目的の遺伝子は、治療的薬剤（例えば、腫瘍特異的抗原、移植抗原、または自己免疫抗原、あるいはそれらの部分（これらに限定されない））をコードし得る。あるいは、目的の遺伝子は、例えば、腫瘍特異的抗原、移植抗原、または自己免疫抗原、あるいはそれらの部分をコードする、合成遺伝子をコードし得る。

【００５３】

腫瘍特異的抗原の例としては、前立腺特異的抗原（ＴＡＧ－７２およびＣＥＡ）、ＭＡＧＥ－１、ならびにチロシナーゼが挙げられる。最近、腫瘍抗原を発現する非悪性細胞による免疫が、ワクチン型の効果を提供し、かつその動物が、同じ抗原を提示する悪性腫瘍細胞を除去する免疫応答をマウントするのを補助することがマウスにおいて示された。

【００５４】

移植抗原の例としては、Ｔ細胞のＣＤ３レセプターが挙げられる。ＣＤ３レセプターに対する抗体を用いた処置が、循環しているＴ細胞を即時に除去することおよびほとんどの拒絶反応のエピソードを取り消すことが示された。

【００５５】

自己免疫抗原の例としては、ＩＡＳβ鎖が挙げられる。ＩＡＳβ鎖由来の１８アミノ酸ペプチドを用いたマウスのワクチン接種が、マウスに対する実験的自己免疫脳脊髄炎の防御および処置を提供することを実証した。

【００５６】

あるいは、目的の遺伝子は、免疫調節分子をコードし得る。これらの免疫調節分子としては、増殖因子（例えば、Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ）およびサイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２またはＩＦＮ－γ）が挙げられるが、これらに限定されない。最近、腫瘍組織へのサイトカインの局在化送達が、全身性のサイトカイン毒性を産生することなく、潜在的な全身系免疫および増強された腫瘍抗原の提示を刺激することが示された。

【００５７】

（安定化されたプラスミドに基づく発現系）

細菌性発現系は、代表的に、意図的に、目的のタンパク質を産生するために細菌性宿主細胞のタンパク質合成機構を利用（ｈａｒｎｅｓｓ）および利用（ｅｘｐｌｏｉｔ）するために発現ベクターを用いる。タンパク質発現レベルは、しばしば、宿主細胞に伴って、高コピー数のプラスミドまたは高コピー数の発現ベクターを用いることによって増加し得る。しかし、上述のように、細菌性宿主細胞への高コピー数の発現ベクターの導入は、宿主細胞への特定の代謝的ストレスを配置し、そのストレスは、宿主細胞の発現ベクターの排出を引き起こし、それによってタンパク発現レベルを減少させ得る。

【００５８】
高コピー数の発現ベクターが導入される宿主細胞の適合性に対してこのベクターが頻繁に与える効果は、発現ベクターの操作においてしばしば見落とされる。多コピープラスミドを保有する宿主細胞に配置された負荷は、代謝的カスケードの蓄積した結果である。このカスケードは、発現ベクターの複製および維持によって引き起こされる（Ａ．Ｆｉｅｃｈｔｅｒ（編）、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｂｅｒｌｉｎ（１９９３）、ｐ．２９－７７．中のＢａｉｌｅｙ，Ｊ．Ｅ．，Ｈｏｓｔ－ｖｅｃｔｏｒ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｇｌｉｃｋ，Ｂ．Ｒ．、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｄｖ．１３：２４７－２６１（１９９５）、およびＳｍｉｔｈ ＆ Ｂｉｄｏｃｈｋａ．Ｃａｎ．Ｊ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４４：３５１－３５５（１９９８）を参照のこと）。このカスケードはまた、目的のタンパク質を含む、種々の発現ベクターにコードされる機能の転写および翻訳によっても引き起こされる。上記のような機構は、プラスミド保有細菌が、プラスミドを含まない細菌よりも、より遅く増殖するという観察を説明する。これらの機構はまた、増殖速度が、コピー数が増加するにつれて減少することも説明する。

【００５９】
発現ベクターを含む組換え生物の増殖速度が、目的の遺伝子の発現が増加するにつれて、減少することが観察された。増殖の減少は、発現された目的の組換えタンパク質を分解する種々の細胞性プロテアーゼの誘導をひき起こし得る。減少した増殖速度は、従って、代謝的負荷の不可避な結果であり、それらはまた、多くの生理学的摂動の蓄積した結果である。例えば、生理学的摂動は、宿主細菌内部での、目的のタンパク質の発現および蓄積により生じる。この蓄積は、宿主生物の生存力に有害であり得、従って負の選択圧であり得る。

【００６０】
上で議論されたような代謝的負荷が、選択の非存在下で存在する発現ベクターの損失に対する選択圧を生じるので、宿主細胞からの発現ベクターの有意な損失が、宿主細胞が目的の遺伝子を含む発現ベクターで形質転換された後に、生じ得る。自発的なプラスミド損失は、宿主細胞から任意の代謝的負荷を取り除き、そしてプラスミドを含まない宿主細胞を、プラスミドを保有する宿主細胞の集団よりも速く増殖させ得る。目的のタンパク質を含まず、従ってその発現をしない宿主細胞の過剰増殖は、全体のタンパク質生成レベルを減少させる。従って、所定の目的のタンパク質の高レベルでの合成を指向する発現ベクターを維持するように遺伝子的に制限されていない宿主細胞は、非常に少ないタンパク質を産生し得る。

【００６１】
この代謝的ストレスを減少させ得るような多くの手段が存在する。多コピー発現ベクターからの目的のタンパク質の制御された発現は、宿主細胞中での目的のタンパク質の高レベルの合成のための１つの解決法を表す。この解決法は、開示された方法を実施するために用い得る１つの実施形態である。誘導プロモーターの使用は、例えば、発現ベクター由来の発現を制御し得る、１つの方法である。そのような誘導プロモーターが、本開示の発現カセットの項で議論される。

【００６２】
本明細書中に開示される方法の別の実施形態は、増殖した細胞集団にわたる、１つ以上のタンパク質の高レベルでの安定な発現を可能とするように操作されたプラスミドに基づく発現系に関する。好ましくは、安定な発現ベクターは、宿主細胞が複製するのに伴い、発現ベクターを永続させるものである。２つの独立したレベルでプラスミドに安定性を与える発現ベクターが、Ｇａｌｅｎら、Ｉｍｍｕｎ．６７：６４２４－６４３３（１９９９）および米国特許出願第０９／２０４，１１７号、１９９８年１２月２日出願および同第０９／４５３，３１３号、１９９９年１２月２日出願（これらの両方は、本明細書中に、その全体が参考として援用される）に、最近、記載された。

【００６３】
この実施形態において、分割機能が、発現ベクター中に組み込まれ得、所定の細菌または宿主細胞が増殖し、続いて分裂するのに伴い、そのプラスミド固有の特性を増強させ得る。娘細胞が、発現ベクターの１つの複製も有さないというまれな場合において、潜在的な分離後死滅系が、活性化され、そして細胞溶解を通じて、増殖集団から、この細菌または宿主細胞が取り除かれる。
【００６４】
（Ｃ．細菌性宿主細胞）
多くの種の細胞が本明細書中に開示される教示による使用に適する。好ましくは、適切な細菌種は、タンパク質輸送を可能とし、その輸送の結果、目的の遺伝子が適切に転写され、その結果、目的のタンパク質が翻訳され、そして細菌の外へ輸送され得る。本発明の１つの実施形態において、細菌が、動物に投与され、次いで、目的のタンパク質が、細菌中から動物中に輸送される。侵襲性細菌および非侵襲性の細菌が、用いられ得る。侵襲性の細菌の例としては、Ｓｈｉｇｅｌｌａ種、Ｌｉｓｔｅｒｉａ種、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ種、および腸侵襲性Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉが挙げられる。好ましい実施形態は、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ種を用いる。
【００６５】
以下の開示に用いられる特定のＳａｌｍｏｎｅｌｌａ株は、必要不可欠ではない。本発明において用いられ得るＳａｌｍｏｎｅｌｌａ株の例としては、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ（ＡＴＣＣ番号７２５１）およびＳ．Ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ（ＡＴＣＣ番号１３３１１）が挙げられる。好ましくは、弱毒化されたＳａｌｍｏｎｅｌｌａ株が、本発明において、用いられ、そしてその株は、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ　ａｒｏＡａｒｏＤ（Ｈｏｎｅら、Ｖａｃｃ．、９：８１０－８１６（１９９１）およびＳ．Ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ　ａｒｏＡ　変異体（Ｍａｓｔｒｏｅｎｉら、Ｍｉｃｒｏ．Ｐａｔｈｏｌ．、１３：４７７－４９１（１９９２））を含む。あるいは、新規の弱毒化Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ株が、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ種に関する上の記載のように、１つ以上の弱毒化変異体の導入によって構築され得る。
【００６６】
（Ｄ．バイオリアクター）
本明細書中に記載されたタンパク質輸送系は、細菌の増殖および所望の産生物または目的のタンパク質の収集または使用を促進するバイオリアクターおよび類似のデバイスを伴う使用に適する。古典的には、先行技術のバイオリアクターにによる生物分子の収集には以下の５つの段階が存在する：前処理、固／液分離、濃縮、精製、および処方。各々の段階には利用可能な、広範な操作が存在し得る。各々の段階についてのこれらの範囲の操作は、以下の通りである：前処置：細胞破壊、安定化、滅菌、パストリゼーション、および凝集；固／液分離：ろ過、沈殿、および遠心分離；濃縮：膜、沈降、エバポレーション、抽出、および凍結濃縮；精製：沈降、抽出、ダイアフィルトレーション、吸着、およびクロマトグラフィー；ならびに処方：乾燥、小球化、押出、顆粒化および錠剤化。
【００６７】
細菌が所望の生成物を細胞外に輸送しないバイオリアクターにおいては、実施者は、細菌をスケールアップし、細胞を誘導して所望の産生物を産生させ、次いでその細胞を溶解して成分を放出させる必要がある。代表的には、この破壊は、細菌が増殖したのと同じ培地中で実施される。実施者は、ホモジナイザーまたはビーズ粉砕機（ｂｅａｄ　ｍｉｌｌ）を用いて細胞を機械的に破壊し得る。非機械的破壊に関して、実施者は、熱ショック（これは、タンパク質を破壊し得る）、界面活性剤、溶媒、壊死剤（ｓｅｑｕｅｓｔｒａｎｔ）、および酵素を用い得る（Ｋｒｉｊｇｓｍａｎ、“Ｒｅｌｅａｓｅｓ　ｏｆ　Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ”、ｐｐ．２７－４２、ｉｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｒｅｃｏｖｅｒｙ　ｉｎ　Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、編集者Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈ－Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ　Ｌｔｄ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌａｎｄ、１９９２）。
【００６８】

細胞が破壊された後、実施者は、流体から固体粒子を分離する（固／液分離）。所望の産生物は、通常液体であり、実施者は、次いで、濃縮をする必要がある。次いで、実施者は、濃縮された液体から所望の産生物を抽出する。

【００６９】

所望とされない固体または液体のいずれかからの所望の産生物の分離に影響する因子は、サイズ、拡散係数、イオン電荷、溶解性、および濃度である。サイズ依存分離のために、実施者は、マイクロフィルター、クロスフィルターおよびファイバーフィルター、限外ろ過、スクリーン／ストレナー、ならびにゲルクロマトグラフィーを用い得る。拡散依存分離のために、実施者は逆浸透および透析を用い得る。イオン交換クロマトグラフィーが、イオン電荷依存分離のために用いられ得る。溶解性に基づいて所望の産生物を分離するために、実施者は、溶媒抽出を用い得る。濃度依存分離のために、実施者は、超遠心、遠心分離、および重力沈降を用い得る。（Ｋｒｉｊｇｓｍａｎ、“Ｄｏｗｎｓｔｒｅａｍ Ｐｒｏｓｃｅｓｓｉｎｇ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ”、ｐｐ．２－１２、ｉｎ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｒｅｃｏｖｅｒｙ ｉｎ Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、編集者Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈ－Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ Ｌｔｄ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌａｎｄ、１９９２）

開示された系を用いる１つの利点は、組換え細菌宿主細胞の集団が、開示されたタンパク質輸送系を含む発現ベクターを用いて形質転換され得ること、ならびに細菌宿主細胞の集団が、培養物中で維持されそして使用され、細菌宿主細胞を収集および溶解することを必要とせずに、タンパク質を産生し得ることである。細菌宿主細胞の培養、および組換え発現した目的のタンパク質を含む培養培地の収集が、任意の型のバイオリアクターで実施され得る。

【００７０】

種々の型のバイオリアクターが存在するが、そのデバイスのファミリーは、２つの主なカテゴリー（「フリーフロート」バイオリアクターおよび「ベッド」バイオリアクター）に分類される。「フリーフロート」バイオリアクターにおいては、細菌は、培体中で自由に移動する。「フリーフロート」バイオリアクターの例は、古典的な撹拌槽バイオリアクター、バブルカラム、エアリフト型ループ、多目的タワーバイオリアクター、侵液体（ｌｉｑｕｉｄ ｉｍｐｅｌｌｅｄ）ループバイオリアクター、およびポンプ型タワーループバイオリアクターがある。「ベッド」型バイオリアクターの例は、充填ベッドバイオリアクターである。「ベッド」型バイオリアクターにおいては、細菌が、ビーズ、膜、または固体の担体に固定される。ハイブリッド型のバイオリアクターが、流動層バイオリアクターを用いて生成され得、このリアクターにおいて、細菌が、培地中を移動し得るビーズまたは他の担体に付着しているが移動可能である（Ｍｉｊｎｂｅｅｋ、“Ｔｈｅ Ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎａｌ Ｓｔｉｒｒｅｒ Ｔａｎｋ Ｒｅａｃｔｏｒ”ｐｐ．３９－７４；Ｍｉｊｎｂｅｅｋ、“Ｂｕｂｂｌｅ Ｃｏｌｕｍｎ、Ａｉｒｌｉｆｔ Ｒｅａｃｔｏｒｓ、ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｒｅａｃｔｏｒ Ｄｅｓｉｇｎｓ”ｐｐ．７５－１１４；Ｇｅｒａａｔｓ、“Ａｎ Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ”ｐｐ１１５－１２４；全て“Ｏｐｅｒａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｄｅｓ ｏｆ Ｂｉｏ ｒｅａｃｔｏｒｓ”中（出版者Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈ－Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ Ｌｔｄ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌａｎｄ、１９９２））。

【００７１】

所望の目的のタンパク質が、細胞から培地中へと輸送されるので、本明細書中に記載された、「ベッド」バイオリアクターを用いるタンパク質輸送系は、前処理および固／液分離を回避する。実施者は、所望の産生物の単離を試みる前に、層から培地を取り除くだけでよい。「フリーフロート」バイオリアクターについて、実施者は、液体／細菌混合物を遠心分離して、細菌をペレット化し得る。次いで、実施者は、ペレット化した細菌から、所望の目的のタンパク質を取り除くことが出来る。次に、実施者は、培地から、所望の目的のタンパク質を単離する。開示された系のさらなる利益は、その培地が、細胞が破壊された培地中に存在するよりも、より少ない、所望でないタンパク質を含むことである；破壊

された全ての細胞内成分は、本発明中の培地中には全く存在しない。従って、所望の目的のタンパク質の精製は、より容易である。さらにまた、輸送タンパク質：：目的のタンパク質の融合タンパク質中にタグおよびプロテアーゼ切断部位を有することにより、目的のタンパク質の単離および精製をさらに容易となる。

【００７２】

バイオリアクターの１つの例は、Ｌｏｍｍｉら（１９９７年６月３日）に対する米国特許第５，６３５，３６８号“Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ ｗｉｔｈ ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ ｌａｃｔｉｃ ａｃｉｄ ｂａｃｔｅｒｉａ ａｎｄ ｔｈｅ ｕｓｅ ｔｈｅｒｅｏｆ”（これは、本明細書中に、その全体が参考として援用される）において教示される装置である。Ｌｏｍｍｉの装置は、細菌が実質的に非圧縮性の担体の表面に固定されることで特徴付けられる、固定化された細菌を備えるバイオリアクターに関する。バイオリアクターの別の例は、Ｃｈａｎｇら（１９９０年３月２０日）に対する、米国特許第４，９１０，１３９号、“Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓｌｙ ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ ｃｉｔｒｉｃ ａｃｉｄ ｂｙ ｄｕａｌ ｈｏｌｌｏｗ ｆｉｂｅｒ ｍｅｍｂｒａｎｅ ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ”（これは、本明細書中に、その全体が参考として援用される）に見出される。本発明は、固定化された細菌を増殖し、連続的にクエン酸を産生することに関する。

【００７３】

さらなるバイオリアクター装置が、Ｐｌｉｔｔらに対する米国特許第５，５８５，２６６号「Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ ｃｅｌｌ ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ」（１９９６年１２月１７日）（これは、本明細書中に、その全体が参考として援用される）中に開示される。開示されるＰｌｉｔｔのデバイスは、細胞が、共通の繊維織物からなる細胞支持シートを含む固定化マトリックス内にか、またはその上に収容される、固定化細胞バイオリアクターに関する。米国特許第４，６６５，０２７号および同第５，５１２，４８０号（それらの両方は、本明細書中に、その全体が参考として援用される）は、他のバイオリアクター実施形態を開示する。

【００７４】

（Ｅ．ワクチン）

本明細書中に記載されるタンパク質輸送系は、ワクチン産生において有用性を有する。例えば、サブユニットワクチンの産生は、その系が、組換えタンパク質収集を容易にし、かつ組換え宿主細胞が増殖する増殖培地由来の混入タンパク質の存在を減少させるような、タンパク質輸送系を用いて達成され得る。組換え宿主細胞はまた、免疫原性組成物を産生するためにも用いられ得、ここで、その組換え宿主細胞は、被験体に提供され、そして被験体の免疫系は、組換え宿主細胞から輸送されたタンパク質に対する免疫応答を生成する。

【００７５】

本明細書中に記載されるタンパク質輸送系は、任意の抗原を用いて使用され得、それらに由来するワクチンを調製し得、この抗原は、上記の目的のタンパク質である。ワクチン調製は、一般的に、Ｎｅｗ Ｔｒｅｎｄｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｖａｃｃｉｎｅｓ、Ｖｏｌｌｅｒら編、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｒｋ Ｐｒｅｓｓ、Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ、Ｍｄ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１９７８に記載される。リポソーム中へのカプセル化は、例えば、Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ 米国特許第４，２３５，８７７号によって記載される。高分子へのタンパク質の結合体化は、例えば、Ｌｉｋｈｉｔｅ、米国特許第４，３７２，９４５号およびＡｒｍｏｒら、同第４，４７４，７５７号によって開示される。

【００７６】

各々のワクチン用量における抗原の量は、代表的なワクチンにおける有意で有害な副作用を伴うことなく、免疫保護応答を誘導する量として、選択される。そのような量は、どの特異的抗原が用いられるか、およびどの送達技術（単なる例としては、精製されたタンパク質または生きた細菌）が用いられるかに依存して変化する。一般的に、精製したタンパク質を含む用量は、１～１０００μｇ（好ましくは、２～２００μｇ）の総抗原を含むこ

とが予想される。一般的に、目的のタンパク質を送達する生きた細菌を含む用量は、１～１０００μｇの目的の総抗原を含むことが期待される。特定のワクチンのための最適量は、被験体おける抗体力価および他の応答の観察を含む、標準的な研究によって確認され得る。最初のワクチン接種の後、被験体（動物またはヒト）は、例えば、１ヶ月後および６ヶ月後に、１回以上の追加免疫（ｂｏｏｓｔｅｒ）用量を受け得る。

【００７７】

タンパク質輸送系はまた、調製物の効力を高めるために、生きた細菌のベクターワクチンと共に用いられ得る。例えば、「Ａｖｉｒｕｌｅｎｔ　ｍｉｃｒｏｂｅｓ　ａｎｄ　ｕｓｅｓ　ｔｈｅｒｅｆｏｒ：Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉ」との発明の名称のＣｕｒｔｉｓｓらに対する米国特許第５，３８７，７４４号（これは、本明細書中に参考として援用される）は、Ｓ．Ｔｙｐｈｉに対する生きた細菌のベクターワクチンを提供する。さらに詳細には、Ｃｕｒｔｉｓｓの特許は、Ｓ．Ｔｙｐｈｉの無毒性誘導体を含む脊椎動物または非脊椎動物の免疫のための免疫原性組成物を提供する。これらの誘導体は、ｃｙａ遺伝子および／またはｃｒｐ遺伝子および／またはｃｄｔ遺伝子の変異を有する。

【００７８】

Ｃｕｒｔｉｓｓらによって教示された無毒性誘導体を、本明細書中に記載されたタンパク質輸送系で形質転換して、得られる組換え生物を、Ｓ．Ｔｙｐｈｉに対する免疫原性組成物、およびその記載された系のタンパク質輸送タンパク質に結合された他の任意の抗原（単数または複数）として作用させ得る。

【００７９】

（Ｆ．さらなる有用性）

薬学的産業に有用である治療的タンパク質および抗原に加えて、目的の遺伝子は、単なる例として、食品産業、栄養補助剤産業、動物飼料産業、バイオメディエーション（ｂｉｏｍｅｄｉａｔｉｏｎ）産業、廃棄物廃棄産業、廃棄物処理産業におそらく有用である、酵素、ポリペプチド、タンパク質、またはアミノ酸をコードし得る。これらの産業に関して、目的の遺伝子によってコードされた目的のタンパク質は、目的のタンパク質にその機能を作用させるために、バイオリアクターの培地から単離されることを、必要としなくてもよい。目的のタンパク質は、所望の反応のための触媒であり得るか、または所望の反応の前駆体成分として作用し得る。

【００８０】

以下の実施例は、例示のみのために提供され、決して本発明の範囲を限定することが意図されない。

【００８１】

（実施例）

（実施例１）

（Ｓ．Ｔｙｐｈｉ　ｃｌｙＡのクローニングおよび変異誘発）

ｃｌｙＡの同定を、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｈｌｙＥ由来ＤＮＡ配列（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ５７４３０）を用いてＳａｎｇｅｒ　Ｃｅｎｔｒｅ（Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｔｒｕｓｔ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｃａｍｐｕｓ、Ｈｉｎｘｔｏｎ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＣＢ　１０　１ＳＡ、ＵＫ）（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／Ｐｒｏｊｅｃｔｓ／Ｓ_ｔｙｐｈｉ／ｂｌａｓｔ_ｓｅｒｖｅｒ．ｓｈｔｍｌを参照のこと）より入手可能な、最近完了されたＳ．Ｔｙｐｈｉゲノム配列のＢＬＡＳＴＮ分析によって行った。

【００８２】

このｃｌｙＡオープンリーディングフレームを、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨｌｙＥに８９．４％同一である３３．８ｋＤａの分子量を有する３０４残基タンパク質をコードすると予想される、９１２ｂｐの配列として同定した。ｃｌｙＡは、９１５ｂｐのＥ．ｃｏｌｉ　ｈｌｙＥオープンリーディングフレームに８５．３％同一であるが、上流の転写制御領域は、関連性が低く、その塩基は、２５０ｂｐの領域内で３３．６％のみが同一である。

【００８３】

この分析に基づき、プライマーを、最適化されたリボソーム結合部位が、ＡＴＧ開始コド

ンの５’近位に操作された、プロモーターを含まないＣｌｙＡをコードする遺伝子カセットのＰＣＲ増幅のために設計した。このプライマー配列を、表１に列挙する。

【００８４】

（表１）

（プラスミドカセットの構築および配列分析に用いられるプライマー）

【００８５】

【表１】

プライマー番号	配列[a]	作製されたカセット	テンプレート
1	5'**GGATCC**AAAATA*AGGAGG*AAAAAAAAA*ATG*ACTAGTATTTTTGCAGAACAAACTGTAGAGGTAGTTAAAAGCGCGATCGAAACCGCAGATGGGGCATTAGATC-3' (SEQ ID NO: 3)	*clyA-tetA*	CVD 908-*htrA*
2	5'**CCTAGG**TTATCA**GCTAGC**GACGTCAGGAACCTCGAAAAGCGTCTTCTTACCATGACGTTGTTGGTATTCATTACAGGTGTTAATCATTTTCTTTGCAGCTC-3'(SEQ ID NO: 4)	〃	〃
3	5'CACGGTAAGAAGACGCTTTTCGAGGTTCCTGACGTC**GCTAGC**TGATAA**CCTAGG**TCATGTTAGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGT-3'(SEQ ID NO: 5)	〃	pBR322
4	5'**AGATCT**ACTAGTGTCGAC**GCTAGC**TATCAGGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCG-3'(SEQ ID NO: 6)	〃	〃
5	5'**ACTAGT**CACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA-3' (SEQ ID NO: 7)	*bla-tetA*	pGEM-T
6	5'CATTAAAGGTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGA**GCTAGC****CTAGG**TCATTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG-3' (SEQ ID NO: 8)	〃	〃
7	5'CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGA**CCTAGGCTAGC**TCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAACCTTTAATG-3'(SEQ ID NO: 9)	〃	pBR322
8	5'GCGC**ACTAGT**AAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTTCCCATATTACACGCCATG-3' (SEQ ID NO: 10)	*sacB-tetA*	pIB279
9	5'TAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGA**CCCGGG**TCACTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCTTGTTCAAGGATGCTGTCTTTGAC-3' (SEQ ID NO: 11)	〃	〃
10	5'TCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTA-3' (SEQ ID NO: 12)	〃	pBR322
11	5'GCGC**AGATCT**TAATCATCCAC*AGGAGG*C**GCTAGC***ATG*AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTG-3' (SEQ ID NO: 13)	*gfpuv-tetA*	pGEN84
12	5'GTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGCGC**TCTAGAACTAGT**TCATTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 14)	〃	〃

適切な制限部位を、下線を付した太字で示す；リボソーム結合部位および開始コドンをイタリック体で示す。

【００８６】

回収を容易にするために、オーバーラップＰＣＲ（ｏｖｅｒｌａｐｐｉｎｇ　ＰＣＲ）技術を用いて、プライマーを含まない２２５２塩基対ｃｌｙＡ－ｔｅｔＡ遺伝子カセットを作製した。これは、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ由来の染色体テンプレートＤＮＡと共にプライマー１およびプライマー２を用い、かつｐＢＲ３２２由来テンプレートと共にプライマー３およびプライマー４を用いて、先に記載したようなオーバーラップＰＣＲ技術によって合成し、そしてＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５へと形質転換されたｐＧＥＭ－Ｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）中で回収した。

【００８７】

組換えクローンを、ヒツジ赤血球を含む固体寒天培地上でスクリーニングした。詳細には、溶血素活性についてのスクリーニングを、適切な抗生物質選択物および５％のヒツジ血漿を含む、新しく調製した１×ＬＢ寒天培地上で実施した。次いで、プレートを、３７℃で、２４時間インキュベートし、赤血球（ＲＢＣ）溶血のゾーンを検出した。複数のコロニーを、どれが溶血素の明確なハロ（ｈａｌｏ）を産生するか即座に同定した。この観察は、ｃｌｙＡが、細菌外への移動に補助タンパク質を必要とする場合、これらのタンパク質が、Ｓ．ＴｙｐｈｉおよびＥ．ｃｏｌｉの両方について明らかに共通することを示唆した。陽性の単離体（ｐＧＥＭ－ＴｃｌｙＡと名付けた）を、さらなる使用のために選択した。

【００８８】

ＣｌｙＡの種々の領域の機能的役割を、ＣｌｙＡに融合された抗原をコードする組換え融合タンパク質の適切な操作についての情報を提供するために試験した。詳細には、細菌外への溶血素の輸送におけるアミノ末端、カルボキシル末端、またはその両方によって果たされる役割を、試験した。

【００８９】

これを果たすために、トランスポゾンＴｎｐｈｏＡを用いて、ｃｌｙＡをランダムに変異させた。この「ＴｎｐｈｏＡ」の「ｐｈｏＡ」は、アルカリホスファターゼをコードする（ＭａｎｏｉｌおよびＢｅｃｈｗｉｔｈ、ＰＮＡＳ　Ｖｏｌ８２、ｐｐ　８１２９－８１３３、１９８５を参照のこと）。ＴｎｐｈｏＡのトランスポゾンは、所定の標的タンパク質上に、ＰｈｏＡのＮ末端のインフレーム融合物のランダムな形成を可能とする。ＴｎｐｈｏＡ変異誘発を、ＤＨ５αへの機能的Ｓ．Ｔｙｐｈｉ　ＣｌｙＡ溶血素を発現する、ｐＧＥＭ－ＴｃｌｙＡのエレクトロポレーションを行ってＤＨ５α（ｐＧＥＭ－ＴｃｌｙＡ）を生成した後に、実施した。次いで、交差画線接合（ｃｒｏｓｓ　ｓｔｒｅａｋ　ｍａｔｉｎｇ）を、ＤＨ５α（ｐＧＥＭ－ＴｃｌｙＡ）およびＴｎｐｈｏＡのドナー株ＳＭ１０（ｐＲＴ７３３）の間で実施し、そしてテトラシクリン、カルベニシリン、およびカナマイシンを各々１０μｇ／ｍｌ、５０μｇ／ｍｌ、および１０μｇ／ｍｌ補充した２×ＬＢ５０（２×ＬＢ５０＋Ｔ１０Ｃ５０Ｋ１０）上でトランス接合体（ｔｒａｎｓｃｏｎｊｕｇａｎｔ）選択をした。次いで、細菌を、プラスミド精製のためにブロス（ｂｒｏｔｈ）培養中にプールし、そして増殖させ、そして精製したプラスミドを、２００μｇ／ｍｌのアルカリホスファターゼ基質５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－ホスフェート（ＢＣＩＰ；Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を補充した２×ＬＢ５０＋Ｔ１０Ｃ５０Ｋ１０上でのPho^+形質転換株の選択のために、ｐｈｏＡΔ２０変異体Ｅ．ｃｏｌｉ株ＣＣ１１８へと再び形質転換した。ペリプラズムへとＮ末端が分泌されるか、表面に露出されるか、または全体が細胞外に輸送される、標的のタンパク質融合物を、色素生産性基質ＢＣＩＰを用いて加水分解の濃青色のハロを検出することによって、容易にスクリーニングし得る；Ｃ末端が分泌されるタンパク質は、この方法を用いて検出されない。

【００９０】

ＴｎｐｈｏＡ変異誘発を用いて、もはや溶血活性を示さない６２１個の$PhoA^+$コロニーのうち４つのコロニーを同定した。１つの単離物の配列決定によって、ＣｌｙＡの残基１７９（Ａｌａ）の後のインフレームでのＰｈｏＡの挿入を確認した。この挿入は、提唱された疎水膜貫通領域でＣｌｙＡを切断し、そして残った１２５カルボキシル末端残基を除去する。従って、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ　ＣｌｙＡのカルボキシル末端が、Ｅ．ｃｏｌｉの細

胞質の輸送に（およびおそらくＳ．Ｔｙｐｈｉ由来の輸送にも）必要とされないこと、および輸送されるタンパク質融合物を潜在的にコードする異種遺伝子の遺伝的融合が、ｃｌｙＡの３’末端で実施されるであろうことを結論付けた。

【００９１】

（実施例２）

（ＣｌｙＡに対する試験抗原のカルボキシル末端融合物の構築）

ＣｌｙＡのカルボキシル末端で融合されたパッセンジャータンパク質を輸送する能力を試験するために、アンピシリンおよびカルベニシリンの両方に対する耐性を与えるＲＴＥＭ－１　β－ラクタマーゼタンパク質をコードするｂｌａ遺伝子を、実験に選択した。

【００９２】

このタンパク質融合物を、ｐＳＥＣ８４のｃｌｙＡ　３’末端のタンデム終止コドン隣接するＮｈｅＩ部位へとインフレームで挿入されたＳｐｅＩカセットの遺伝子融合物として操作した。最初に、２３残基のシグナル配列を有さない、成熟２６８アミノ酸β－ラクタマーゼをコードする８０７ｂｐのＳｐｅＩ－ＮｈｅＩフラグメントを、ＰＣＲによってｐＢＲ３２２誘導体から合成した。次いで、精製したフラグメントを、ｃｌｙＡの操作されたカルボキシル末端のＮｈｅＩ部位へとインフレームで挿入し、推定６２．９ｋＤａの融合タンパク質をコードする１７４２ｂｐのｃｌｙＡ－ｂｌａ遺伝子融合物を作製した。所望のプラスミド構築物は、５μｇ／ｍｌのカルベニシリンの存在下で増殖した培養物由来の単離されたコロニー中に容易に回収されたが、５０μｇ／ｍｌのカルベニシリンを用いた選択後に回収したプラスミドは、不安定かつ遺伝子的に再構成されているようであった。

【００９３】

（ｂｌａ－ｔｅｔＡ融合物）

上記のｃｌｙＡ－ｂｌａ構築物のプラスミド安定性および遺伝子再構成に関する問題に起因して、ｂｌａ－ｔｅｔＡ融合物を、ｐＧＥＭ－Ｔテンプレートと共にプライマー５およびプライマー６を用い、かつｐＢＲ３２２由来テンプレートと共にプライマー７およびプライマー４を用いるオーバーラップＰＣＲによって２１１１ｂｐのＳｐｅｌカセットとして合成した；ＮｈｅＩ部位で切断されたｐＳＥＣ８４へのこのカセットの挿入により、ｐＳＥＣ８４ｂｌａ（図１Ｂを参照のこと）を得た。

【００９４】

ＣＶＤ９０８－ｈｔｒＡの導入の後、コロニーを、溶血素活性の保持についてスクリーニングし、次いで、２×ＬＡ５０＋ＤＨＢ＋Ｔ１０中の１００μｇ／ｍｌの濃度の色素生産性基質ニトロセフィン（ｎｉｔｒｏｃｅｆｉｎ）を用いて、β－ラクタマーゼ活性についてスクリーニングし；プレートを、３０℃で、少なくとも１６時間インキュベートし、そしてニトロセフィンの切断を示すコロニー周辺の赤色ハロの存在について試験した。赤色ハロが、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｂｌａ）周辺で観察され、これは、ニトロセフィンの切断を示し、酵素的に活性なβ－ラクタマーゼの存在を確認した。３４ｋＤａから６３ｋＤａへのＣｌｙＡの分子量のおよその倍加は、両方のドメインが、明らかに、各々のドメインの予想される生物学的活性を維持するように正しく折りたたまれた、２ドメインの融合タンパク質を生じることが結論づけられた。

【００９５】

（ｓａｃＢ－ｔｅｔＡ融合物）

Ｓ．Ｔｙｐｈｉの外に異種抗原を輸送するための融合パートナーとしてのＣｌｙＡの多能性を調査するために、ＣｌｙＡが、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ由来のｓａｃＢによってコードされた、潜在的に致死性のレバンスクラーゼを輸送する効率を検査した。スクロースの存在下で増殖する腸内細菌（Ｓ．Ｔｙｐｈｉを含む）の細胞質内で発現された場合、ｓａｃＢ遺伝子の発現は、致死的である。ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡへの導入のための、８３．９ｋＤａの予測された分子量を有するＣｌｙＡ－ＳａｃＢタンパク質融合物の構築を試みた。この融合物を、２９アミノ酸シグナル配列を有さない、成熟４４５残基５０．０ｋＤａレバンスクラーゼをコードするｓａｃＢ－ｔｅｔＡ　ＳｐｅＩカセット

として操作し、そしてｐＳＥＣ８４中のＣｌｙＡの操作されたカルボキシル末端ＮｈｅＩ部位へとインフレームで挿入した。所望の構築物を保有するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡを、テトラシクリンを用いて選択し、そしてスクロースの存在下で生存についてスクリーニングした。ＣｌｙＡ－ＳａｃＢが、細胞質外に輸送されなかった場合、単離物は、全く回収されないが、表面で発現されるか、または細胞から周辺の培地中に十分に輸送されるかのいずれかの融合物に関しては、酵素的に活性なＳａｃＢ部分は、スクロースを切断してグルコースを放出し、そのグルコースが直ちに細菌内に輸送されそして代謝されることが、予想される。

【００９６】

ｓａｃＢ－ｔｅｔＡカセットを、ｐＩＢ２７９テンプレートと共にプライマー８およびプライマー９ならびに上記のようにプライマー１０およびプライマー４を用いて合成して、２６５３ｂｐ　ＳｐｅＩカセットを産生し、これを、ｐＳＥＣ８４へと挿入してｐＳＥＣ８４ｓａｃＢのｃｌｙＡ：：ｓａｃＢ融合物を産生した（図１Ｃを参照のこと）。ＣＶＤ９０８－ｈｔｒＡへの導入の後、コロニーを再び、溶血素活性の保持についてスクリーニングし、次いで、ＤＨＢならびに唯一の糖質源としてスクロース（８％もしくは１６％ｗ／ｖ）または８％スクロースおよび８％アラビノースのいずれかを補充したＭａｃＣｏｎｋｅｙ寒天基礎培地（Ｄｉｆｃｏ）上の平板培養によって、レバンスクラーゼ活性について試験した。プレートを、３０℃で、１６～２４時間インキュベートし、単離されたｃｆｕｓを回収し、その糖質の発酵を決定し；室温でのさらに数日間のさらなるインキュベーションを、コロニー上の多糖様のドームの形成を観察するために必要とした。

【００９７】

図２Ｂおよび図２Ｄに示すように、唯一の炭化水素源として８％スクロースまたは１６％スクロースのいずれかを含む指示培地上で増殖する場合（ここで、ＭａｃＣｏｎｋｅｙ寒天基礎培地上で増殖した）、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）の増殖は、良好であった。実際、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡについては観察されなかった多糖様のドームが、単離したＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）コロニー上に形成するのが観察され（図２Ａおよび図２Ｃ）、そしてその多糖様ドームは、スクロースの濃度が増加するにつれて強められた。この多糖様物質が、スクロースの加水分離によって遊離したフルクトースのレバンスクラーゼ触媒性重合によって形成されたレバンであると仮定して、本発明者らは、レバンスクラーゼを阻害することが公知である８％　Ｌ－アラビノースの導入によって、この重合をブロックすることを試みた。図２Ｆに示すように、ドームは、もはや観測されず、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡおよびＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）のコロニーは、その時同様に見えた。

【００９８】

ＣｌｙＡ－ＳａｃＢタンパク質融合物が、実際に、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）の外に輸送される場合、遊離のグルコースを遊離するためのＳａｃＢドメインによるスクロースの切断は、これらの株が、スクロースの存在下でブロス培養物として増殖する場合に、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡと比較して、代謝的な利点を提供するはずである。この加水分解を検査するために、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４）またはＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）のいずれかの１００ｍｌのブロス培養物を、１０％スクロースを添加した２×ＬＢ５０＋ＤＨＢ＋Ｋ１０を含む、１ｌのバッフルフラスコ中に設定し、そして増殖を、１０％グルコースの存在下で増殖した陽性コントロールとしてのＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４）培養物と比較した。図３に示すように、スクロースの存在下でのＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）が、グルコースまたはスクロースのいずれかを用いて増殖したＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４）よりも速く増殖することを観察した。観察を、生存数によって確認した。ＣｌｙＡ－Ｂｌａについて上記の観察された結果と組みあわせた場合、このデータは、ＣｌｙＡが、融合ドメインの生物学的活性が保存される適切に折りたたまれた細菌融合タンパク質の細胞外への輸送のための、用途の広い融合パートナーであることを強く示唆する。

【００９９】
（ｃｌｙＡ：：ｇｆｐｕｖ融合）
ＣｌｙＡの輸送特性をさらに定義するためおよび対数増殖中のＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの上清中のＣｌｙＡ融合産生物の存在を詳細に証明するために、ｃｌｙＡの遺伝子的融合物を、構築した。この融合物において、ｃｌｙＡを、蛍光レポーター緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰｕｖ）に融合して、ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖのｃｌｙＡ：：ｇｆｐｕｖカセット（図１Ｄを参照のこと）を作製した。このｃｌｙＡは、ｐＳＥＣ８４ｂｌａおよびｐＳＥＣ８４ｓａｃＢの両方について同系であった。さらに、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖ）は、溶血性を維持したが、細胞質に発現したＧＦＰｕｖと比較した場合、蛍光が減少した。ＧＦＰポリクローナル抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）を用いて、培養物上清へのＣｌｙＡ－ＧＦＰｕｖの輸送を、図４に示すようなウエスタンイムノブロット分析を用いて検査した。図４は、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（レーン１～３）またはＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖ）（レーン４～８）のいずれか由来の細菌細胞画分を分析する、１セットのウエスタンイムノブロットを例示する。細胞の画分を、以下のようにローディングした：上清、レーン１およびレーン４；細胞質画分、レーン２およレーン６；ペリプラズム画分、レーン５；不溶性画分、レーン７；細胞全体画分、レーン３およびレーン８；ならびに５０ｎｇ　ＧＦＰｕｖ、レーン９。同一のサンプルを有するメンブランを、ＧＦＰｕｖ特異的抗体（パネルＡ）またはＥ．ｃｏｌｉ　ＧｒｏＥＬ特異的抗体（パネルＢ）でプロービングした。この図において観察され得るように、有意な量の推定６１ｋＤａタンパク質融合物が、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖ）由来の０．５ｍｌのＴＣＡ沈降した上清（レーン４）中に検出され；約４５ｋＤａの無関係な相互作用種もまた、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの細胞質（レーン２）中ならびにＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖ）の細胞質画分、不溶性画分、および細胞全体画分において検出され；興味深いことに、レーン５は、非常に少ないＣＬｙＡ－ＧＦＰｕｖが、ペリプラズム空間より回収されることを示唆する。
【０１００】
（結論）
本研究の結果は、Ｓ．Ｔｙｐｈｉ由来の潜在性溶血素ＣｌｙＡを用いて、弱毒化ワクチン株ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡから周辺の培地への異種抗原ドメインの輸送を促進させ得るという結論を明白に支持する。さらに、本研究は、ＣｌｙＡを用いて、細菌から周辺の培地への融合タンパク質の輸送を促進させ得ることを実証する。上に例示されるように、ＣｌｙＡのカルボキシル末端に融合された適切に折りたたまれた目的のタンパク質を輸送する能力が、アンピシリンおよびカルベニシリンの両方に対する耐性を与えるＲＴＥＭ－１　β－ラクタマーゼタンパク質をコードするｂｌａ遺伝子を用いて示された。ｐＢＲ３２２のｂｌａ遺伝子は、８６１ｂｐ長であり、かつペリプラズム空間へのラクタマーゼのＮ末端分泌を指向する２３アミノ酸シグナル配列を有する３１．５ｋＤａのタンパク質をコードする。上記の研究は、機能的ＣｌｙＡ－β－ラクタマーゼタンパク質融合物をコードする遺伝子融合物の好首尾な操作を示し、このタンパク質融合物は、溶血活性および色素原性β－ラクタマーゼ基質ニトロセフィンを切断して、切断されていないニトロセフィンの黄色の背景に対して赤色環を産生する能力の両方を保持した。
【０１０１】
興味深いことに、５０μｇ／ｍｌのカルベニシリンまたはアンピシリンのいずれかを補充した栄養豊富な培地中で形質転換株を増殖させている場合、そのような発現ベクターについて選択するための試みは、成功せず、そして大幅に再構成したプラスミドのみが、制限マッピングによって判断した場合に回収された。細胞質で発現したβ－ラクタマーゼが、約５μｇ／ｍｌのアンピシリンに対する耐性を与えながら、一方で適切に発現したペリプラズムのβ－ラクタマーゼが、４０００μｇ／ｍｌを超えるアンピシリンに対する耐性を与えることが、結局、実証された。しかし、β－ラクタマーゼタンパク質融合物の表面ディスプレイが、約１００μｇ／ｍｌのアンピシリンに対する耐性を与えることが示された

。実際、Ｃｈｅｒｖａｕｘらは、Ｅ．ｃｏｌｉからのβ－ラクタマーゼ融合物のＨｌｙＡ媒介分泌は、約５μｇ／ｍｌのアンピシリンに対する低レベルの耐性を再び与えることを報告している。彼らは、融合物表面のインタクトのβ－ラクタマーゼドメインの比活性が、改変されていないβ－ラクタマーゼの比活性と同様であるままであったけれども、高レベルのアンピシリンに対する耐性が観察されなかったことを実証し、そして彼らは、β－ラクタム抗生物質に対する細菌の耐性が、死滅させる標的に近いペリプラズム空間内のβ－ラクタマーゼの十分な濃度を必要とすると結論付けた。そのような観察に基づき、適切に折りたたまれたＣｌｙＡ－β－ラクタマーゼタンパク質融合物が、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｂｌａ）内で合成され、そして輸送されて、アンピシリンまたはカルベニシリンに対する耐性を与えることなく、溶血性表現型、および色素原性セファロスポリンニトロセフィンのβ－ラクタマーゼ媒介加水分解を与えると結論付けられた。

【０１０２】

ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡからの異種抗原ドメインのＣｌｙＡ媒介輸送の性質をさらに明白に規定するためおよび恐らくペリプラズム性中間体の関与を除外するために、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ由来の潜在的に致命的なレバンスクラーゼをコードする、ｓａｃＢの融合物を、研究した。レバンスクラーゼは、スクロースの加水分解を触媒して遊離のグルコースおよびフルクトースを産生し、次いでフルクトースの、レバンと呼ばれる長鎖ポリマーへの重合を触媒する、５０ｋＤＡの単一ポリペプチドの外酵素である。スクロースを含む培地で増殖したＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ由来のレバンスクラーゼの分泌は、室温での長期インキュベーションの後で、粘性レバンの印象的なドームによって覆われた単離されたコロニーの増殖を生じる。

【０１０３】

ｓａｃＢによってコードされたレバンスクラーゼの細胞質およびペリプラズムでの発現が、スクロースの存在下で増殖する種々の細菌にとって致命的であることは、十分に確立されている。レバンスクラーゼが、スクロース存在下で増殖したＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓの細胞質内で致命的となること、およびフルクトースポリメラーゼ活性の不活性化が、スクロース誘導性の致死の回避に必須であることが、シグナルペプチド変異体を用いて最近示された。従って、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの細胞質空間およびペリプラズム空間の両方からのＣｌｙＡ－ＳａｃＢ融合物の輸送の失敗が、融合タンパク質の顕著な細胞内蓄積を生じ、その蓄積が、スクロース存在下で増殖するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）に対する致死を生じるべきであることが、結論付けられた。

【０１０４】

しかし、図２Ｂに示すように、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）が、８％スクロースの存在下で増殖するだけでなく、その糖を発酵することが観察され、同一条件下で増殖するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４）についての表現型が観察されなかった。スクロースの濃度を、８％から１６％スクロースへと増加するにつれて、スクロースの発酵もまた、レバン様物質の印象的なドームの蓄積を伴って増加し、そのドームは、レバンスクラーゼインヒビターアラビノースの存在下で消失した。レバンスクラーゼ活性の類似の観察が、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｙｒｉｎｇａｅの氷核形成（ｉｃｅ　ｎｕｃｌｅａｔｉｏｎ）タンパク質のカルボキシル末端に融合されそしてＥ．ｃｏｌｉ内に発現された、表面発現レバンスクラーゼドメインに関して、Ｊｕｎｇらによって報告された。これらの結果を考慮して、ブロス培養実験（ここで、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）が、スクロースまたは純粋なグルコースの存在下のいずれかで増殖したＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４）より速く増殖することが観察された）において、操作したＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ）は炭素原としてスクロースを利用する能力を有することが、結論付けられた。上記のＣｌｙＡ－β－ラクタマーゼタンパク質融合物を用いる場合に、適切に折りたたまれたＣｌｙＡ－ＳａｃＢタンパク質融合物が、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ内で合成され、そして輸送されて、予想される溶血性表現型、およびプラスミドを含まない宿主株によって用いられない代替の炭化水素源の細胞外異化を可能とするレバンスクラーゼ活性の両方を与えることが、再び結

論付けられた。

【０１０５】

（実施例３）

（ＣｌｙＡ－ＳａｃＢ融合物のバイオリアクタータンパク質の発現）

バイオリアクターを、米国特許第５，６３５，３６８号（これは、本明細書中に、その全体が参考として援用される）の教示に従い調製する。簡単には、顆粒状に誘導したセルロースを、米国特許第４，３３５，１１７号に従い、以下のように製造する：２５パーツの繊維状セルロースを、２５パーツの二酸化チタンと混合し、そしてその混合物を、ツインスクリューエクストルーダー（ｔｗｉｎ－ｓｃｒｅｗ　ｅｘｔｒｕｄｅｒ）を用いて５０パーツの高衝撃（ｈｉｇｈ－ｉｍｐａｃｔ）ポリスチレンとともに混合する。この押出し形成物を水冷し、そして０．３５～０．８５ｍｍの粒径にふるいをかける。ふるいをかけた顆粒状集塊化セルロース粒子を誘導して、上記米国特許に記載のようなＤＥＡＥセルロースを形成する。

【０１０６】

次に、１０（１０）ｇの顆粒状ＤＥＡＥセルロースを蒸留水中のスラリーに薄め、そして時折撹拌しながら５時間浸す。次いで、この水和したキャリアを、蒸留水でデカンテーションし、そして内径１５ｍｍのガラスカラム中に移し、これは、ここで、１４５ｍｍの高さを有する層を形成する。

【０１０７】

ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢで形質転換した細菌（実施例２を参照のこと）を、３０℃で４８時間培養する。５０（５０）ｍｌの細胞懸濁液を、２５ｍｌ／時間の流速で、キャリア層を通してポンピングする。続いて、さらなる量の培養培地を、キャリア層を通してポンピングする。このカラムの流出を収集し、そして組換え発現したＣｌｙＡ－ＳａｃＢ融合タンパク質（配列番号１９によってコードされる）を、流出から単離および精製する。ＳａｃＢの切断によって、レバン生成のために豊富な商業的な量のレバンスクラーゼを提供し得る。

【０１０８】

（実施例４）

（変性条件下でのＨｉｓタグタンパク質精製）

細菌培養物を、ポリヒスチジンタグコード配列に融合される、プロテアーゼ認識部位をコードするコード配列に融合される、ｓａｃＢ遺伝子に融合した弱毒化ＣｌｙＡタンパク質についてのコード配列を含む発現カセットを含有する発現ベクターを用いて形質転換する。この細菌培養物を、実施例３に記載するように、バイオリアクターへと移す。

【０１０９】

この培養物を、培養培地中に輸送される組換え融合タンパク質の発現を促進する条件下に置く。この培養培地を収集し、そしてタンパク質を変性するのに十分に高い濃度での尿素含有緩衝液で平衡化したＮｉカラム（ＨＩＳＴＲＡＰ；Ｐｈａｒｍａｃｉａ）にアプライする。次いで、カラムを、洗浄および溶出する。溶出物を、ゲル電気泳動によって分析して、精製したタンパク質の存在を決定する。

【０１１０】

精製したタンパク質を含有する画分を、酵素消化緩衝液に対して透析する。次いで透析したサンプルをプールし、そして適切な酵素により触媒されるタンパク質溶解に供する。タンパク質溶解されたサンプルを、精製して、削除されたポリヒスチジンタグを排除し、単離、精製されたタンパク質を残す。

【０１１１】

（実施例５）

（Ｆｒａｇ　Ｃを発現する無毒化ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの構築およびそれに応答する免疫応答の惹起）

ＣｌｙＡ－Ｆｒａｇ　Ｃ融合タンパク質を、実施例１で議論した工程に従って、ＣＶＤ９０８－ｈｔｒＡ中で産生する。本発明者らの試みは、本明細書中に開示される発現ベク

ターから発現される、ＣｌｙＡへと挿入された破傷風毒素のフラグメントＣをコードする、コドン最適化されたｔｏｘＣオープンリーディングフレームを発現させることである。フラグメントＣの輸送を、ｃｌｙＡの３’末端へのｔｏｘＣのインフレームでの遺伝子融合を介して達成し、そして１４２６ｂｐP_{ampC}－ｃｌｙＡ　ＥｃｏＲＩ－ＮｈｅＩカセットとしてｏｒｉＥ１レプリコンｐＳＥＣ８４に保有させる。ｔｏｘＣコードフラグメントＣを、従来の技術の構築物から順方向プライマー

【０１１２】

【化１】

5' -

GCGCACTAGTAAAAACCTTGATTGTTGGGTCGACAACGAAGAAGACATCGATGTTATCCTGAAAAAGTCTACCATTCTGAA

CTTGGACATCAAC- 3' -

（配列番号１５）

および逆方向プライマー

【０１１３】

【化２】

5' -

AACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGCTAGCCTAGGTCATTAGTCGTTGGTCCAACCTTCAT

CGGTCGGAACGAAGTA- 3'

（配列番号１６）

を用いて再操作し、所望のＰＣＲ産物（１４２４ｂｐ）を産生する。次いで、このｔｏｘＣカセットを、ＮｈｅＩで消化したｐＳＥＣ８４へとサブクローニングしてｐＳＥＣ８４ｔｏｘＣを構築する。意図するｃｌｙＡ－ｔｏｘＣ融合結合部のＤＮＡ配列を、ｃｌｙＡの３’末端の操作されたＮｈｅＩ部位の１７２塩基上流にハイブリダイズする配列決定プライマー５’－ＣＧＡＴＧＣＧＧＣＡＡＡＡＴＴＧＡＡＡＴＴＡＧＣＣＡＣＴＧＡ－３’（配列番号１７）を用いて確認する。構築物を、溶血活性の保持についてスクリーニングし、そしてウエスタンイムノブロット分析によって、上清へのＣｌｙＡ－Ｆｒａｇ　Ｃの輸送を確認する。

【０１１４】

１０匹の６週齢のＢａｌｂ／ｃマウスの群を、ＣｌｙＡ－Ｆｒａｇ　Ｃ融合タンパク質を発現する１．０×10^{10} ｃｆｕのＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ株で、鼻腔内的に免疫する。マウスから、それらの免疫の前および３０日後に採血し、そして血清を、使用するまで－２０℃で保存する。血清中に存在する、ＣｌｙＡおよびＦｒａｇ　Ｃ抗原に対する抗体を、ＥＬＩＳＡによって決定する。結果は、ＣｌｙＡ－Ｆｒａｇ　Ｃ融合タンパク質を発現するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ株での免疫が、ＣｌｙＡ－Ｆｒａｇ　Ｃ融合タンパク質を発現しない９０８－ｈｔｒＡ株で得られるものよりも有意により高い、Ｆｒａｇ　Ｃ抗原に対する抗体レベルを誘発することを示す。この結果は、ＣｌｙＡを有する融合タンパク質としてのＦｒａｇ　Ｃ抗原の発現が、この抗原に対する免疫応答を増強することを実証する。破傷風毒素に対する保護免疫は、別な方法では致死用量の天然の破傷風毒素を用いて免疫したマウスをチャレンジすることによって確認される。

【０１１５】

上記の開示が、詳細にかつ本発明の特定の実施形態に関連して本発明を記載するが、種々の変化および改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなく本明細書中でなされ得ることは、当業者に明らかである。

【０１１６】

【表２】

参考文献

[0118] **Atkins, A., N. R. Wyborn, A. J. Wallace, T. J. Stillman, L. K. Black, A. B. Fielding, M. Hisakado, P. J. Artymiuk, and J. Green.** 2000. Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of α_6. J. Biol. Chem. 275:41150-41155.

[0119] **Bailey, J. E.,** Host-vector interactions in *Escherichia coli*, p. 29-77. In A. Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin (1993).

[0120] **Balbas, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores, and F. Bolivar.** 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. Gene 50:3-40.

[0121] **Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest, and B. I. Eisenstein.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. Mol. Microbiol. 5:1447-1457.

[0122] **Boe, L., K. Gerdes, and S. Molin.** 1987. Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. J. Bacteriol. 169:4646-4650.

[0123] **Borchert, T. V. and V. Nagarajan.** 1991. Effect of signal sequence alterations on the export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 173:276-282.

[0124] **Bramucci, M. G. and V. Nagarajan.** 1996. Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. Appl. Environ. Microbiol. 62:3948-3953.

[0125] **Chervaux, C., N. Sauvonnet, A. Le Clainche, B. Kenny, A. L. Hunt, J. K. Broome-Smith, and I. B. Holland.** 1995. Secretion of active β-lactamase to the medium mediated by the *Escherichia coli* haemolysin transport pathway. Mol. Gen. Genet. 249:237-245.

[0126] **Corchero, J. L. and A. Villaverde.** 1998. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. Biotechnol. Bioeng. 58:625-632.

[0127] **Cserjan-Puschmann, M., W. Kramer, E. Duerrschmid, G. Streidner, and K. Bayer.** 1999. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:43-50.

[0128] **Datta, N. and P. Kontomichalou.** 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious *R* factors in Enterobacteriaceae. Nature 208:239-241.

[0129] **Dedonder, R.** 1966. Levansucrase from *Bacillus subtilis*, p. 500-505. In E. F. Neufeld and V. Ginsburg (eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York.

[0130] **del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno, and I. del Castillo.** 1997. The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. Mol. Microbiol. 25:107-115.

[0131] **Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier, and G. Rapoport.** 1984. Characterization of the precursor form of the exocellular levansucrase from *Bacillus subtilis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **119**:795-800.

[0132] **Galen, J. E., O. G. Gomez-Duarte, G. Losonsky, J. L. Halpern, C. S. Lauderbaugh, S. Kaintuck, M. K. Reymann, and M. M. Levine.** 1997. A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens. Vaccine **15**:700-708.

[0133] **Galen, J. E. and M. M. Levine.** 2001. Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? Trends in Microbiology 9:372-376.

[0134] **Galen, J. E., J. Nair, J. Y. Wang, S. S. Wasserman, M. K. Tanner, M. Sztein, and M. M. Levine.** 1999. Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. Infect. Immun. **67**:6424-6433.

[0135] **Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, and C. I. Kado.** 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **164**:918-921.

[0136] **Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch.** 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **153**:1424-1431.

[0137] **Glick, B. R.**, Biotechnol. Adv. 13:247-261 (1995).

[0138] **Han, Y. W.** 1990. Microbial levan. Advances in Applied Microbiology **35**:171-194.

[0139] **Harcum and Bentley.** 1993. Biotechnol. Bioeng. **42**:675-685.

[0140] **Hone, D. M., A. M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan, and M. M. Levine.** 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. Vaccine 9:810-816.

[0141] **Jung, H., J. Lebeault, and J. Pan.** 1998. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. Nat. Biotechnol. **16**:576-580.

[0142] **Lattemann, C. T., J. Maurer, E. Gerland, and T. F. Meyer.** 2000. Autodisplay: functional display of active β-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. J. Bacteriol. **182**:3726-3733.

[0143] **Le Coq, D., P. Ratet, M. Steinmetz, and P. Gay.** 1984. A genetic approach to levansucrase secretion in *Bacillus subtilis*, p. 141-152. In A. T. Ganesan and J. A. Hoch (eds.), Genetics and biotechnology of bacilli. Academic Press, New York.

[0144] **LeBrun, E. and R. van Rapenbusch.** 1980. The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 A resolution. J. Biol. Chem. **255**:12034-12036.

[0145] **Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, and W. Goebel.** 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. Mol. Microbiol. **31**:557-567.

[0146] **Matthew, M. and R. W. Hedges.** 1976. Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β-lactamases: correlation with plasmid compatibility. J. Bacteriol. **125**:713-718.

[0147] **McDermott, P. J., P. Gowland, and P. C. Gowland.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322. Lett. Appl. Microbiol. **17**:139-143.

[0148] **Orr, N., J. E. Galen, and M. M. Levine.** 1999. Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM_{197}, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-*htrA*. Infect. Immun. **67**:4290-4294.

[0149] **Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander, and B. E. Uhlin.** 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **32**:1226-1238.

[0150] **Oscarsson, J., Y. Mizunoe, B. E. Uhlin, and D. J. Haydon.** 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. Mol. Microbiol. **20**:191-199.

[0151] **Pecota, D. C., C. S. Kim, K. Wu, K. Gerdes, and T. K. Wood.** 1997. Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. Appl. Environ. Microbiol. **63**:1917-1924.

[0152] **Pluckthun, A. and J. R. Knowles.** 1987. The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of β-lactamase. J. Biol. Chem. **262**:3951-3957.

[0153] **Ried, J. and A. Collmer.** 1987. An *npl-sacB-sacR* cartridge for constructing directed,unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. Gene **57**:239-246.

[0154] **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. AnonymousMolecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

[0155] **Sambrook, J. and D. W. Russell.** 2001. Expression of cloned genes in *Escherichia coli*, p. 15.35AnonymousMolecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

[0156] **Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol. Rev. 57:138-163.

[0157] **Smith & Bidochka.** Can. J. Microbiol. 44:351-355 (1998).

[0158] **Steinmetz, M., D. Le Coq, H. B. Djemia, and P. Gay.** 1983. Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. Mol. Gen. Genet. **191**:138-144.

[0159] **Summers, D. K.** 1998. Timing, self-control and sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. Mol. Microbiol. **29**:1137-1145.

[0160] **Sutcliffe, J. G.** 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3737-3741.

[0161] **Tacket, C. O., M. Sztein, G. Losonsky, S. S. Wasserman, J. P. Nataro, R. Edelman, D. Pickard, G. Dougan, S. Chatfield, and M. M. Levine.** 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune responses in humans. Infect. Immun. 65:452-456.

[0162] **Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green, and P. J. Artymiuk.** 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. Cell 100:265-276.

[0163] **Wang, J. Y., F. Noriega, J. E. Galen, E. M. Barry, and M. M. Levine.** 2000. Constititive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain CVD 909. Infect. Immun. 68:4647-4652.

[0164] **Wang, J. Y., M. F. Pasetti, F. Noriega, R. J. Anderson, S. S. Wasserman, J. E. Galen, M. Sztein, and M. M. Levine.** 2001. Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated D*guaBA Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. Infect. Immun. 69:4734-4741.

[0165] **Wu, K. and T. K. Wood.** 1994. Evaluation of the *hok/sok* killer locus for enhanced plasmid stability. Biotechnol. Bioeng. 44:912-921.

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、本発明の発現ベクターの例を提供する。図１Ａは、ｐＳＥＣ８４発現ベクターを例示する。図１Ｂは、ｐＳＥＣ８４ｂｌａ発現ベクターを例示する。図１Ｃは、ｐＳＥＣ８４ｓａｃＢ（配列番号１８）を例示する。図１Ｄは、ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖを例示する。

【図２】　図２は、固体増殖培地中のスクロースの代謝を生じるＣｌｙＡ－ＳａｃＢタンパク質融合物の輸送を例示する。これらの株を、８％スクロース（２Ａおよび２Ｂ）、１６％スクロース（２Ｃおよび２Ｄ）、または８％スクロースおよび８％Ｌ－アラビノース（２Ｅおよび２Ｆ）のいずれかを含む培地上で増殖させた。図２Ａ、図２Ｃ、および図２Ｅは、ＣｌｙＡを発現するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの増殖を示す。図２Ｂ、図２Ｄ、および図２Ｆは、ＣｌｙＡ－ＳａｃＢを発現するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの増殖を示す。

【図３】　図３は、ＤＨＢおよび１０％スクロースまたは１０％グルコースのいずれかを補充した２×ＬＢ５０ブロス中で増殖させた、ＣｌｙＡ（ｐＳＥＣ８４）またはＣｌｙＡ－ＳａｃＢ（ｐＳＥＣ８４ＳａｃＢ）のいずれかを発現するＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡの増殖を例示する。

【図４】　図４は、ＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（１～３レーン）またはＣＶＤ　９０８－ｈｔｒＡ（ｐＳＥＣ８４ｇｆｐｕｖ）（４～８レーン）のいずれかからの細菌細胞画分のウエスタンイムノブロット分析を例示する。細胞画分を以下のようにロードした：上清（１および４レーン）；細胞質（２および６レーン）；ペリプラズム（５レーン）；不溶物（７レーン）；細胞全体（３および８レーン）；および５０ｎｇのＧＦＰｕｖ（９レーン）。同一のサンプルを有する膜を、ＧＦＰｕｖ（パネルＡ）またはＥ．ｃｏｌｉ　ＧｒｏＥＬ（パネルＢ）に特異的な抗体でプローブ化した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> James E. Galen
University of Maryland

<120> USE OF CLY A HEMOLYSIN FOR EXCRETION OF PROTEINS

<130> UOFMD.007VPC

<150> 60/252,516
<151> 2000-11-22

<160> 19

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 6271
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pSEC84 Expression Plasmid

<400> 1
gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60
gcgaggcatc cggttgaaat aggggtaaac agacattcag aaatgaatga cggtaataaa 120
taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgcgag tgaaggtttt gttttgacat 180
tcagtgctgt caaatactta agaataagtt attgatttta accttgaatt attattgctt 240
gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataatcttaa aaagttccct tgcatttaca 300
ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtatc atattcgtgt 360
tggattattc tgcatttttg gggagaatgg acttgccgac tgattaatga gggttaatca 420
gtatgcagtg gcataaaaaa gcaaataaag gcatataaca gatcgatctt aaacatccac 480
aggaggatgg gatccaaaat aaggaggaaa aaaaaatgac tagtattttt gcagaacaaa 540
ctgtagaggt agttaaaagc gcgatcgaaa ccgcagatgg ggcattagat ctttataaca 600
aatacctcga ccaggtcatc ccctggaaga cctttgatga aaccataaaa gagttaagcc 660
gttttaaaca ggagtactcg caggaagctt ctgttttagt tggtgatatt aaagttttgc 720
ttatggacag ccaggacaag tattttgaag cgacacaaac tgtttatgaa tggtgtggtg 780
tcgtgacgca attactctca gcgtatattt tactatttga tgaatataat gagaaaaaag 840
catcagccca gaaagacatt ctcattagga tattagatga tggtgtcaag aaactgaatg 900
aagcgcaaaa atctctcctg acaagttcac aaagtttcaa caacgcttcc ggaaaactgc 960
tggcattaga tagccagtta actaatgatt tttcggaaaa aagtagttat ttccagtcac 1020
aggtggatag aattcgtaag gaagcttatg ccggtgctgc agccggcata gtcgccggtc 1080
cgtttggatt aattatttcc tattctattg ctgcgggcgt gattgaaggg aaattgattc 1140
cagaattgaa taacaggcta aaaacagtgc aaaatttctt tactagctta tcagctacag 1200
tgaaacaagc gaataaagat atcgatgcgg caaaattgaa attagccact gaaatagcag 1260
caattgggga gataaaaacg gaaaccgaaa caaccagatt ctacgttgat tatgatgatt 1320
taatgctttc tttattaaaa ggagctgcaa agaaaatgat taacacctgt aatgaatacc 1380
aacaacgtca tggtaagaag acgcttttcg aggttcctga cgtcgctagc tgataaccta 1440
gggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1500
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1560
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc 1620
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 1680
tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg 1740
tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga 1800

gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 1860
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta 1920
cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 1980
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg 2040
caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 2100
ggggtctgac gctcagtaga tctaaaacac taggcccaag agtttgtaga aacgcaaaaa 2160
ggccatccgt caggatggcc ttctgcttaa tttgatgcct ggcagtttat ggcgggcgtc 2220
ctgcccgcca ccctccgggc cgttgcttcg caacgttcaa atccgctccc ggcggatttg 2280
tcctactcag gagagcgttc accgacaaac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg 2340
actgagcctt tcgttttatt tgatgcctgg cagttcccta ctctcgcatg gggagacccc 2400
acactaccat cggcgctacg gcgtttcact tctgagttcg gcatggggtc aggtgggacc 2460
accgcgctac tgccgccagg caaattctgt tttatcagac cgcttctgcg ttctgattta 2520
atctgtatca ggctgaaaat cttctctcat ccgccaaaac agccaagctg gatctggcaa 2580
atcgctgaat attccttttg tctccgacca tcaggcacct gagtcgctgt ctttttcgtg 2640
acattcagtt cgctgcgctc acggctctgg cagtgaatgg gggtaaatgg cactacaggc 2700
gccttttatg gattcatgca aggaaactac ccataatacа agaaaagccc gtcacgggct 2760
tctcagggcg ttttatggcg ggtctgctat gtggtgctat ctgacttttt gctgttcagc 2820
agttcctgcc ctctgatttt ccagtctgac cacttcggat tatcccgtga caggtcattc 2880
agactggcta atgcacccag taaggcagcg gtatcatcaa caggcttacc cgtcttactg 2940
tcaaccggat ctaaaacact agcccaacct ttcatagaag gcggcggtgg aatcgaaatc 3000
tcgtgatggc aggttgggcg tcgcttggtc ggtcatttcg aaccccagag tcccgctcag 3060
aagaactcgt caagaaggcg atagaaggcg atgcgctgcg aatcgggagc ggcgataccg 3120
taaagcacga ggaagcggtc agcccattcg ccgccaagct cttcagcaat atcacgggta 3180
gccaacgcta tgtcctgata gcggtccgcc acacccagcc ggccacagtc gatgaatcca 3240
gaaaagcggc cattttccac catgatattc ggcaagcagg catcgccatg ggtcacgacg 3300
agatcctcgc cgtcgggcat gcgcgccttg agcctggcga acagttcggc tggcgcgagc 3360
ccctgatgct cttcgtccag atcatcctga tcgacaagac cggcttccat ccgagtacgt 3420
gctcgctcga tgcgatgttt cgcttggtgg tcgaatgggc aggtagccgg atcaagcgta 3480
tgcagccgcc gcattgcatc agccatgatg gatactttct cggcaggagc aaggtgagat 3540
gacaggagat cctgccccgg cacttcgccc aatagcagcc agtcccttcc cgcttcagtg 3600
acaacgtcga gcacagctgc gcaaggaacg cccgtcgtgg ccagccacga tagccgcgct 3660
gcctcgtcct gcagttcatt cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa aagaaccggg 3720
cgcccctgcg ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt ctgttgtgcc 3780
cagtcatagc cgaatagcct ctccacccaa gcggccggag aacctgcgtg caatccatct 3840
tgttcaatca tgcgaaacga tcctcatcct gtctcttgat cagatcttga tcccctgcgc 3900
catcagatcc ttggcggcaa gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt cccaacctta 3960
ccagagggcg ccccagctgg caattccggt tcgctgctag acaacatcag caaggagaaa 4020
ggggctaccg gcgaaccagc agccccttta taaaggcgct tcagtagtca gaccagcatc 4080
agtcctgaaa aggcgggcct gcgcccgcct ccaggttgct acttaccgga ttcgtaagcc 4140
atgaaagccg ccacctcccc gtgtccgtct ctgtaacgaa tctcgcacag cgattttcgt 4200
gtcagataag tgaatatcaa cagtgtgaga cacacgatca acacacacca gacaagggaa 4260
cttcgtggta gtttcatggc cttcttctcc ttgcgcaaag cgcggtaaga ggctatcctg 4320
atgtggacta gacataggga tgcctcgtgg tggttaatga aaattaactt actacggggc 4380
tatcttcttt ctgccacaca acacggcaac aaaccacctt cacgtcatga ggcagaaagc 4440
ctcaagcgcc gggcacatca tagcccatat acctgcacgc tgaccacact cactttccct 4500
gaaaataatc cgctcattca gaccgttcac gggaaatccg tgtgattgtt gccgcatcac 4560
gctgcctccc ggagtttgtc tcgagcactt ttgttacccg ccaaacaaaa cccaaaaaca 4620
acccataccc aacccaataa aacaccaaaa caagacaaat aatcattgat tgatggttga 4680
aatggggtaa acttgacaaa caaacccact taaaacccaa aacataccca aacacacacc 4740
aaaaaaacac cataaggagt tttataaatg ttggtattca ttgatgacgg ttcaacaaac 4800
atcaaactac agtggcagga aagcgacgga acaattaaac agcacattag cccgaacagc 4860
ttcaaacgcg agtgggcagt ctcttttggt gataaaaagg tctttaacta cacactgaac 4920
ggcgaacagt attcatttga tccaatcagc ccggatgctg tagtcacaac caatatcgca 4980
tggcaataca gcgacgttaa tgtcgttgca gtgcatcacg ccttactgac cagtggtctg 5040
ccggtaagcg aagtggatat tgtttgcaca cttcctctga cagagtatta cgacagaaat 5100
aaccaaccca atacggaaaa tattgagcgt aagaaagcaa acttccggaa aaaaattaca 5160
ttaaatggcg gggatacatt cacaataaaa gatgtaaaag tcatgcctga atctataccg 5220

```
gcaggttatg aagttctaca agaactggat gagttagatt ctttattaat tatagatctc 5280
gggggcacca cattagatat ttctcaggta atggggaaat tatcgggat cagtaaaata 5340
tacggagact catctcttgg tgtctctctg gttacatctg cagtaaaaga tgccctttct 5400
cttgcgagaa caaaaggaag tagctatctt gctgacgata taatcattca cagaaaagat 5460
aataactatc tgaagcaacg aattaatgat gagaacaaaa tatcaatagt caccgaagca 5520
atgaatgaag cacttcgtaa acttgagcaa cgtgtattaa atacgctcaa tgaatttttct 5580
ggttatactc atgttatggt tataggcggt ggcgcagaat taatatgcga tgcagtaaaa 5640
aaacacacac agattcgtga tgaacgtttt ttcaaaacca ataactctca atatgattta 5700
gttaacggta tgtatctcat aggtaattaa tgatggacaa gcgcagaacc attgccttca 5760
aactaaatcc agatgtaaat caaacagata aaattgtttg tgatacactg gacagtatcc 5820
cgcaagggga acgaagccgc cttaaccggg ccgcactgac ggcaggtctg gccttataca 5880
gacaagatcc ccggacccct ttcctttttat gtgagctgct gacgaaagaa accacatttt 5940
cagatatcgt gaatatattg agatcgctat ttccaaaaga gatggccgat tttaattctt 6000
caatagtcac tcaatcctct tcacaacaag agcaaaaaag tgatgaagag accaaaaaaa 6060
atgcgatgaa gctaataaat taattcaatt attattgagt tcccttttatc cactatcagg 6120
ctggataaag ggaactcaat caagttattt tcttaccagt cattacataa tcgttattat 6180
gaaataatcg tttgcactgt ctctgttatt caggcaattt caataaaggc acttgctcac 6240
gctctgtcat tttctgaaac tcttcatgct g                                  6271
```

<210> 2
<211> 305
<212> PRT
<213> Salmonella Typhi

<400> 2

```
Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala
 1               5                  10                  15
Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp
            20                  25                  30
Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser
        35                  40                  45
Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp
    50                  55                  60
Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr
65                  70                  75                  80
Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala
                85                  90                  95
Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln
            100                 105                 110
Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn
        115                 120                 125
Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala
    130                 135                 140
Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser
145                 150                 155                 160
Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu
                165                 170                 175
Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu
            180                 185                 190
Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile
        195                 200                 205
Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser
    210                 215                 220
Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys
225                 230                 235                 240
Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu
                245                 250                 255
```

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser
260 265 270
Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr
275 280 285
Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala
290 295 300
Ser
305

<210> 3
<211> 102
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 3
ggatccaaaa taaggaggaa aaaaaaatga ctagtatttt tgcagaacaa actgtagagg 60
tagttaaaag cgcgatcgaa accgcagatg gggcattaga tc 102

<210> 4
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 4
cctaggttat cagctagcga cgtcaggaac ctcgaaaagc gtcttcttac catgacgttg 60
ttggtattca ttacaggtgt taatcatttt ctttgcagct c 101

<210> 5
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 5
cacggtaaga agacgctttt cgaggttcct gacgtcgcta gctgataacc taggtcatgt 60
tagacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagt 97

<210> 6
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 6
agatctacta gtgtcgacgc tagctatcag gtcgaggtgg cccggctcca tgcaccgcga 60
cgcaacgcg 69

<210> 7
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 7
actagtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga 60

<210> 8
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 8
cattaaaggt tatcgatgat aagctgtcaa acatgagcta gcctaggtca ttaccaatgc 60
ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc g 101

<210> 9
<211> 101
<212> DNA
<213> Artifical sequence

<400> 9
cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta atgacctagg 60
ctagctcatg tttgacagct tatcatcgat aaccttaat g 101

<210> 10
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 10
gcgcactagt aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat 60
tacacgccat g 71

<210> 11
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 11
taaactaccg cattaaagct tatcgatgat aagctgtcaa acatgacccg ggtcactatt 60
tgttaactgt taattgtcct tgttcaagga tgctgtcttt gac 103

<210> 12
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 12
tcatgtttga cagcttatca tcgataagct ttaatgcggt agttta 46

<210> 13
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 13
gcgcagatct taatcatcca caggaggcgc tagcatgagt aaaggagaag aacttttcac 60
tggagttgtc ccaattcttg 80

<210> 14
<211> 110
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning primer

<400> 14
gtgataaact accgcattaa agcttatcga tgataagctg tcaaacatga gcgctctaga 60
actagttcat tatttgtaga gctcatccat gccatgtgta atcccagcag 110

<210> 15
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning Primer

<400> 15
gcgcactagt aaaaaccttg attgttgggt cgacaacgaa gaagacatcg atgttatcct 60
gaaaaagtct accattctga acttggacat caac 94

<210> 16
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning Primer

<400> 16

aactaccgca ttaaagctta tcgatgataa gctgtcaaac atgagctagc ctaggtcatt 60
agtcgttggt ccaaccttca tcggtcggaa cgaagta 97

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cloning Primer

<400> 17
cgatgcggca aaattgaaat tagccactga 30

<210> 18
<211> 8908
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pSEC84sacB vector

<400> 18
gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60
gcgaggcatc cggttgaaat aggggtaaac agacattcag aaatgaatga cggtaataaa 120
taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgcgag tgaaggtttt gttttgacat 180
tcagtgctgt caaatactta agaataagtt attgatttta accttgaatt attattgctt 240
gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataatcttaa aaagttccct tgcatttaca 300
ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtatc atattcgtgt 360
tggattattc tgcatttttg gggagaatgg acttgccgac tgattaatga gggttaatca 420
gtatgcagtg gcataaaaaa gcaaataaag gcatataaca gatcgatctt aaacatccac 480
aggaggatgg gatccaaaat aaggaggaaa aaaaaatgac tagtattttt gcagaacaaa 540
ctgtagaggt agttaaaagc gcgatcgaaa ccgcagatgg ggcattagat ctttataaca 600
aatacctcga ccaggtcatc ccctggaaga cctttgatga aaccataaaa gagttaagcc 660
gttttaaaca ggagtactcg caggaagctt ctgttttagt tggtgatatt aaagttttgc 720
ttatggacag ccaggacaag tattttgaag cgacacaaac tgtttatgaa tggtgtggtg 780
tcgtgacgca attactctca gcgtatattt tactatttga tgaatataat gagaaaaaag 840
catcagccca gaaagacatt ctcattagga tattagatga tggtgtcaag aaactgaatg 900
aagcgcaaaa atctctcctg acaagttcac aaagtttcaa caacgcttcc ggaaaactgc 960
tggcattaga tagccagtta actaatgatt tttcggaaaa aagtagttat ttccagtcac 1020
aggtggatag aattcgtaag gaagcttatg ccggtgctgc agccggcata gtcgccggtc 1080
cgtttggatt aattatttcc tattctattg ctgcgggcgt gattgaaggg aaattgattc 1140
cagaattgaa taacaggcta aaaacagtgc aaaatttctt tactagctta tcagctacag 1200
tgaaacaagc gaataaagat atcgatgcgg caaaattgaa attagccact gaaatagcag 1260
caattgggga gataaaaacg gaaaccgaaa caaccagatt ctacgttgat tatgatgatt 1320
taatgctttc tttattaaaa ggagctgcaa agaaaatgat taacacctgt aatgaatacc 1380
aacaacgtca tggtaagaag acgcttttcg aggttcctga cgtcgctagt aaagaaacga 1440
accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat tacacgccat gatatgctgc 1500
aaatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat atcaagttcc tgaattcgat tcgtccacaa 1560
ttaaaaatat ctcttctgca aaaggcctgg acgtttggga cagctggcca ttacaaaacg 1620
ctgacggcac tgtcgcaaac tatcacggct accacatcgt ctttgcatta gccggagatc 1680
ctaaaaatgc ggatgacaca tcgatttaca tgttctatca aaaagtcggc gaaacttcta 1740
ttgacagctg gaaaaacgct ggccgcgtct ttaaagacag cgacaaattc gatgcaaatg 1800
attctatcct aaaagaccaa acacaagaat ggtcaggttc agccacattt acatctgacg 1860
gaaaaatccg tttattctac actgatttct ccggtaaaca ttacggcaaa caaacactga 1920
caactgcaca agttaacgta tcagcatcag acagctcttt gaacatcaac ggtgtagagg 1980
attataaatc aatctttgac ggtgacggaa aaacgtatca aaatgtacag cagttcatcg 2040

atgaaggcaa ctacagctca ggcgacaacc atacgctgag agatcctcac tacgtagaag 2100
ataaaggcca caaatactta gtatttgaag caaacactgg aactgaagat ggctaccaag 2160
gcgaagaatc tttatttaac aaagcatact atggcaaaag cacatcattc ttccgtcaag 2220
aaagtcaaaa actttctgcaa agcgataaaa aacgcacggc tgagttagca aacggcgctc 2280
tcggtatgat tgagctaaac gatgattaca cactgaaaaa agtgatgaaa ccgctgattg 2340
catctaacac agtaacagat gaaattgaac gcgcgaacgt ctttaaaatg aacggcaaat 2400
ggtacctgtt cactgactcc cgcggatcaa aaatgacgat tgacggcatt acgtctaacg 2460
atatttacat gcttggttat gtttctaatt ctttaactgg cccatacaag ccgctgaaca 2520
aaactggcct tgtgttaaaa atggatcttg atcctaacga tgtaaccttt acttactcac 2580
acttcgctgt acctcaagcg aaaggaaaca atgtcgtgat tacaagctat atgacaaaca 2640
gaggattcta cgcagacaaa caatcaacgt ttgcgccaag cttcctgctg aacatcaaag 2700
gcaagaaaac atctgttgtc aaagacagca tccttgaaca aggacaatta acagttaaca 2760
aatagtgacc cgggtcatgt ttgacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagttta 2820
tcacagttaa attgctaacg cagtcaggca ccgtgtatga aatctaacaa tgcgctcatc 2880
gtcatcctcg gcaccgtcac cctggatgct gtaggcatag gcttggttat gccggtactg 2940
ccgggcctct tgcgggatat cgtccattcc gacagcatcg ccagtcacta tggcgtgctg 3000
ctagcgctat atgcgttgat gcaatttcta tgcgcacccg ttctcggagc actgtccgac 3060
cgctttggcc gccgcccagt cctgctcgct tcgctacttg gagccactat cgactacgcg 3120
atcatggcga ccacacccgt cctgtggatc ctctacgccg gacgcatcgt ggccggcatc 3180
accggcgcca caggtgcggt tgctggcgcc tatatcgccg acatcaccga tggggaagat 3240
cgggctcgcc acttcgggct catgagcgct tgtttcggcg tgggtatggt ggcaggcccc 3300
gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac cattccttgc ggcggcggtg 3360
ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttcctaatgc aggagtcgca taagggagag 3420
cgtcgaccga tgcccttgag agccttcaac ccagtcagct ccttccggtg ggcgcggggc 3480
atgactatcg tcgccgcact tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt aggacaggtg 3540
ccggcagcgc tctgggtcat tttcggcgag gaccgctttc gctggagcgc gacgatgatc 3600
ggcctgtcgc ttgcggtatt cggaatcttg cacgccctcg ctcaagcctt cgtcactggt 3660
cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag gccattatcg ccggcatggc ggccgacgcg 3720
ctgggctacg tcttgctggc gttcgcgacg cgaggctgga tggccttccc cattatgatt 3780
cttctcgctt ccggcggcat cgggatgccc gcgttgcagg ccatgctgtc caggcaggta 3840
gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga tcgctcgcgg ctcttaccag cctaacttcg 3900
atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt tatgccgcct cggcgagcac atggaacggg 3960
ttggcatgga ttgtaggcgc cgccctatac cttgtctgcc tccccgcgtt gcgtcgcggt 4020
gcatggagcc gggccacctc gacctgatag ctagcgtcga cactagctga taacctaggg 4080
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 4140
ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 4200
actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 4260
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 4320
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 4380
gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 4440
caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 4500
agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 4560
tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 4620
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 4680
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 4740
gtctgacgct cagtagatct aaaacactag gcccaagagt ttgtagaaac gcaaaaaggc 4800
catccgtcag gatggccttc tgcttaattt gatgcctggc agtttatggc gggcgtcctg 4860
cccgccaccc tccgggccgt tgcttcgcaa cgttcaaatc cgctcccggc ggatttgtcc 4920
tactcaggag agcgttcacc gacaaacaac agataaaacg aaaggcccag tctttcgact 4980
gagcctttcg ttttatttga tgcctggcag ttccctactc tcgcatgggg agaccccaca 5040
ctaccatcgg cgctacggcg tttcacttct gagttcggca tggggtcagg tgggaccacc 5100
gcgctactgc cgccaggcaa attctgtttt atcagaccgc ttctgcgttc tgatttaatc 5160
tgtatcaggc tgaaaatctt ctctcatccg ccaaaacagc caagctggat ctggcaaatc 5220
gctgaatatt ccttttgtct ccgaccatca ggcacctgag tcgctgtctt tttcgtgaca 5280
ttcagttcgc tgcgctcacg gctctggcag tgaatgggggg taaatggcac tacaggcgcc 5340
ttttatggat tcatgcaagg aaactaccca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct 5400
cagggcgttt tatggcgggt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgct gttcagcagt 5460

tcctgccctc tgattttcca gtctgaccac ttcggattat cccgtgacag gtcattcaga 5520
ctggctaatg cacccagtaa ggcagcggta tcatcaacag gcttacccgt cttactgtca 5580
accggatcta aaacactagc ccaacctttc atagaaggcg gcggtggaat cgaaatctcg 5640
tgatggcagg ttgggcgtcg cttggtcggt catttcgaac cccagagtcc cgctcagaag 5700
aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa 5760
agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg ccaagctctt cagcaatatc acgggtagcc 5820
aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa 5880
aagcggccat tttccaccat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga 5940
tcctcgccgt cgggcatgcg cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc 6000
tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct 6060
cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc 6120
agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac 6180
aggagatcct gccccggcac ttcgcccaat agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca 6240
acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc 6300
tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac aggtcggtct tgacaaaaag aaccgggcgc 6360
ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag 6420
tcatagccga atagcctctc cacccaagcg gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt 6480
tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat 6540
cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca 6600
gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg ctgctagaca acatcagcaa ggagaaaggg 6660
gctaccggcg aaccagcagc ccctttataa aggcgcttca gtagtcagac cagcatcagt 6720
cctgaaaagg cgggcctgcg cccgcctcca ggttgctact taccggattc gtaagccatg 6780
aaagccgcca cctccctgtg tccgtctctg taacgaatct cgcacagcga ttttcgtgtc 6840
agataagtga atatcaacag tgtgagacac acgatcaaca cacaccagac aagggaactt 6900
cgtggtagtt tcatggcctt cttctccttg cgcaaagcgc ggtaagaggc tatcctgatg 6960
tggactagac atagggatgc ctcgtggtgg ttaatgaaaa ttaacttact acggggctat 7020
cttctttctg ccacacaaca cggcaacaaa ccaccttcac gtcatgaggc agaaagcctc 7080
aagcgccggg cacatcatag cccatatacc tgcacgctga ccacactcac tttccctgaa 7140
aataatccgc tcattcagac cgttcacggg aaatccgtgt gattgttgcc gcatcacgct 7200
gcctcccgga gtttgtctcg agcacttttg ttacccgcca aacaaaaccc aaaaacaacc 7260
catacccaac ccaataaaac accaaaacaa gacaaataat cattgattga tggttgaaat 7320
ggggtaaact tgacaaacaa acccacttaa aacccaaaac atacccaaac acacaccaaa 7380
aaaacaccat aaggagtttt ataaatgttg gtattcattg atgacggttc aacaaacatc 7440
aaactacagt ggcaggaaag cgacggaaca attaaacagc acattagccc gaacagcttc 7500
aaacgcgagt gggcagtctc ttttggtgat aaaaaggtct ttaactacac actgaacggc 7560
gaacagtatt catttgatcc aatcagcccg gatgctgtag tcacaaccaa tatcgcatgg 7620
caatacagcg acgttaatgt cgttgcagtg catcacgcct tactgaccag tggtctgccg 7680
gtaagcgaag tggatattgt ttgcacactt cctctgacag agtattacga cagaaataac 7740
caacccaata cggaaaatat tgagcgtaag aaagcaaact tccggaaaaa aattacatta 7800
aatggcgggg atacattcac aataaaagat gtaaaagtca tgcctgaatc tataccggca 7860
ggttatgaag ttctacaaga actggatgag ttagatttct tattaattat agatctcggg 7920
ggcaccacat tagatatttc tcaggtaatg gggaaattat cggggatcag taaaatatac 7980
ggagactcat ctcttggtgt ctctctggtt acatctgcag taaaagatgc cctttctctt 8040
gcgagaacaa aaggaagtag ctatcttgct gacgatataa tcattcacag aaaagataat 8100
aactatctga agcaacgaat taatgatgag aacaaaatat caatagtcac cgaagcaatg 8160
aatgaagcac ttcgtaaact tgagcaacgt gtattaaata cgctcaatga attttctggt 8220
tatactcatg ttatggttat aggcggtggc gcagaattaa tatgcgatgc agtaaaaaaa 8280
cacacacaga ttcgtgatga acgtttttc aaaaccaata actctcaata tgatttagtt 8340
aacggtatgt atctcatagg taattaatga tggacaagcg cagaaccatt gccttcaaac 8400
taaatccaga tgtaaatcaa acagataaaa ttgtttgtga tacactggac agtatcccgc 8460
aaggggaacg aagccgcctt aaccgggccg cactgacggc aggtctggcc ttatacagac 8520
aagatccccg gacccctttc cttttatgtg agctgctgac gaaagaaacc acattttcag 8580
atatcgtgaa tatattgaga tcgctatttc caaaagagat ggccgatttt aattcttcaa 8640
tagtcactca atcctcttca caacaagagc aaaaaagtga tgaagagacc aaaaaaaatg 8700
cgatgaagct aataaattaa ttcaattatt attgagttcc ctttatccac tatcaggctg 8760
gataaaggga actcaatcaa gttatttttct taccagtcat tacataatcg ttattatgaa 8820
ataatcgttt gcactgtctc tgttattcag gcaatttcaa taaaggcact tgctcacgct 8880

ctgtcatttt ctgaaactct tcatgctg 8908

<210> 19
<211> 2253
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ClyA::SacB fusion gene

<221> CDS
<222> (0)...(2253)

<400> 19

```
atg act agt att ttt gca gaa caa act gta gag gta gtt aaa agc gcg   48
Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala
 1               5                  10                  15

atc gaa acc gca gat ggg gca tta gat ctt tat aac aaa tac ctc gac   96
Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp
            20                  25                  30

cag gtc atc ccc tgg aag acc ttt gat gaa acc ata aaa gag tta agc   144
Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser
        35                  40                  45

cgt ttt aaa cag gag tac tcg cag gaa gct tct gtt tta gtt ggt gat   192
Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp
    50                  55                  60

att aaa gtt ttg ctt atg gac agc cag gac aag tat ttt gaa gcg aca   240
Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr
65                  70                  75                  80

caa act gtt tat gaa tgg tgt ggt gtc gtg acg caa tta ctc tca gcg   288
Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala
                85                  90                  95

tat att tta cta ttt gat gaa tat aat gag aaa aaa gca tca gcc cag   336
Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln
            100                 105                 110

aaa gac att ctc att agg ata tta gat gat ggt gtc aag aaa ctg aat   384
Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn
        115                 120                 125

gaa gcg caa aaa tct ctc ctg aca agt tca caa agt ttc aac aac gct   432
Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala
    130                 135                 140

tcc gga aaa ctg ctg gca tta gat agc cag tta act aat gat ttt tcg   480
Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser
145                 150                 155                 160

gaa aaa agt agt tat ttc cag tca cag gtg gat aga att cgt aag gaa   528
Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu
                165                 170                 175
```

```
gct tat gcc ggt gct gca gcc ggc ata gtc gcc ggt ccg ttt gga tta   576
Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu
            180                 185                 190

att att tcc tat tct att gct gcg ggc gtg att gaa ggg aaa ttg att   624
Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile
        195                 200                 205

cca gaa ttg aat aac agg cta aaa aca gtg caa aat ttc ttt act agc   672
Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser
    210                 215                 220

tta tca gct aca gtg aaa caa gcg aat aaa gat atc gat gcg gca aaa   720
Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys
225                 230                 235                 240

ttg aaa tta gcc act gaa ata gca gca att ggg gag ata aaa acg gaa   768
Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu
                245                 250                 255

acc gaa aca acc aga ttc tac gtt gat tat gat gat tta atg ctt tct   816
Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser
            260                 265                 270

tta tta aaa gga gct gca aag aaa atg att aac acc tgt aat gaa tac   864
Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr
        275                 280                 285

caa caa cgt cat ggt aag aag acg ctt ttc gag gtt cct gac gtc gct   912
Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala
    290                 295                 300

agt aaa gaa acg aac caa aag cca tat aag gaa aca tac ggc att tcc   960
Ser Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser
305                 310                 315                 320

cat att aca cgc cat gat atg ctg caa atc cct gaa cag caa aaa aat  1008
His Ile Thr Arg His Asp Met Leu Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn
                325                 330                 335

gaa aaa tat caa gtt cct gaa ttc gat tcg tcc aca att aaa aat atc  1056
Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile
            340                 345                 350

tct tct gca aaa ggc ctg gac gtt tgg gac agc tgg cca tta caa aac  1104
Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn
        355                 360                 365

gct gac ggc act gtc gca aac tat cac ggc tac cac atc gtc ttt gca  1152
Ala Asp Gly Thr Val Ala Asn Tyr His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala
    370                 375                 380

tta gcc gga gat cct aaa aat gcg gat gac aca tcg att tac atg ttc  1200
Leu Ala Gly Asp Pro Lys Asn Ala Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe
385                 390                 395                 400
```

```
tat caa aaa gtc ggc gaa act tct att gac agc tgg aaa aac gct ggc   1248
Tyr Gln Lys Val Gly Glu Thr Ser Ile Asp Ser Trp Lys Asn Ala Gly
                405                 410                 415

cgc gtc ttt aaa gac agc gac aaa ttc gat gca aat gat tct atc cta   1296
Arg Val Phe Lys Asp Ser Asp Lys Phe Asp Ala Asn Asp Ser Ile Leu
            420                 425                 430

aaa gac caa aca caa gaa tgg tca ggt tca gcc aca ttt aca tct gac   1344
Lys Asp Gln Thr Gln Glu Trp Ser Gly Ser Ala Thr Phe Thr Ser Asp
        435                 440                 445

gga aaa atc cgt tta ttc tac act gat ttc tcc ggt aaa cat tac ggc   1392
Gly Lys Ile Arg Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Ser Gly Lys His Tyr Gly
    450                 455                 460

aaa caa aca ctg aca act gca caa gtt aac gta tca gca tca gac agc   1440
Lys Gln Thr Leu Thr Thr Ala Gln Val Asn Val Ser Ala Ser Asp Ser
465                 470                 475                 480

tct ttg aac atc aac ggt gta gag gat tat aaa tca atc ttt gac ggt   1488
Ser Leu Asn Ile Asn Gly Val Glu Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly
                485                 490                 495

gac gga aaa acg tat caa aat gta cag cag ttc atc gat gaa ggc aac   1536
Asp Gly Lys Thr Tyr Gln Asn Val Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn
            500                 505                 510

tac agc tca ggc gac aac cat acg ctg aga gat cct cac tac gta gaa   1584
Tyr Ser Ser Gly Asp Asn His Thr Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu
        515                 520                 525

gat aaa ggc cac aaa tac tta gta ttt gaa gca aac act gga act gaa   1632
Asp Lys Gly His Lys Tyr Leu Val Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu
    530                 535                 540

gat ggc tac caa ggc gaa gaa tct tta ttt aac aaa gca tac tat ggc   1680
Asp Gly Tyr Gln Gly Glu Glu Ser Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly
545                 550                 555                 560

aaa agc aca tca ttc ttc cgt caa gaa agt caa aaa ctt ctg caa agc   1728
Lys Ser Thr Ser Phe Phe Arg Gln Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser
                565                 570                 575

gat aaa aaa cgc acg gct gag tta gca aac ggc gct ctc ggt atg att   1776
Asp Lys Lys Arg Thr Ala Glu Leu Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile
            580                 585                 590

gag cta aac gat gat tac aca ctg aaa aaa gtg atg aaa ccg ctg att   1824
Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Thr Leu Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile
        595                 600                 605

gca tct aac aca gta aca gat gaa att gaa cgc gcg aac gtc ttt aaa   1872
Ala Ser Asn Thr Val Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys
    610                 615                 620

atg aac ggc aaa tgg tac ctg ttc act gac tcc cgc gga tca aaa atg   1920
```

```
Met Asn Gly Lys Trp Tyr Leu Phe Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met
625                 630                 635                 640

acg att gac ggc att acg tct aac gat att tac atg ctt ggt tat gtt   1968
Thr Ile Asp Gly Ile Thr Ser Asn Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val
                645                 650                 655

tct aat tct tta act ggc cca tac aag ccg ctg aac aaa act ggc ctt   2016
Ser Asn Ser Leu Thr Gly Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu
            660                 665                 670

gtg tta aaa atg gat ctt gat cct aac gat gta acc ttt act tac tca   2064
Val Leu Lys Met Asp Leu Asp Pro Asn Asp Val Thr Phe Thr Tyr Ser
        675                 680                 685

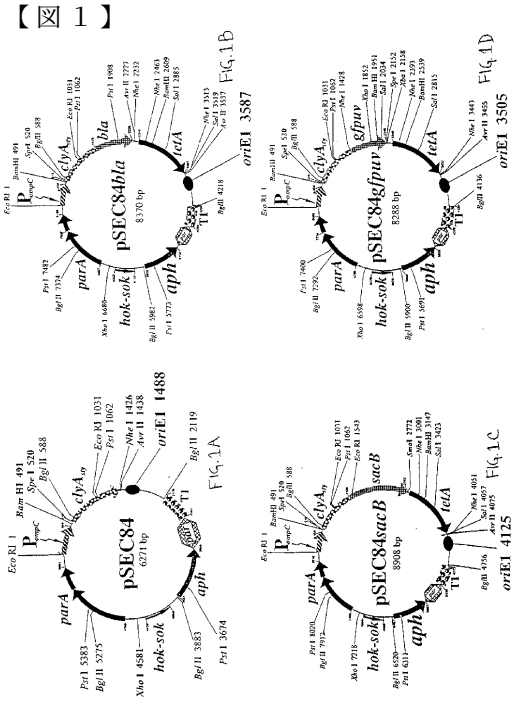
cac ttc gct gta cct caa gcg aaa gga aac aat gtc gtg att aca agc   2112
His Phe Ala Val Pro Gln Ala Lys Gly Asn Asn Val Val Ile Thr Ser
    690                 695                 700

tat atg aca aac aga gga ttc tac gca gac aaa caa tca acg ttt gcg   2160
Tyr Met Thr Asn Arg Gly Phe Tyr Ala Asp Lys Gln Ser Thr Phe Ala
705                 710                 715                 720

cca agc ttc ctg ctg aac atc aaa ggc aag aaa aca tct gtt gtc aaa   2208
Pro Ser Phe Leu Leu Asn Ile Lys Gly Lys Lys Thr Ser Val Val Lys
                725                 730                 735

gac agc atc ctt gaa caa gga caa tta aca gtt aac aaa tag tga       2253
Asp Ser Ile Leu Glu Gln Gly Gln Leu Thr Val Asn Lys  *   *
            740                 745
```

【図１】



【図２】

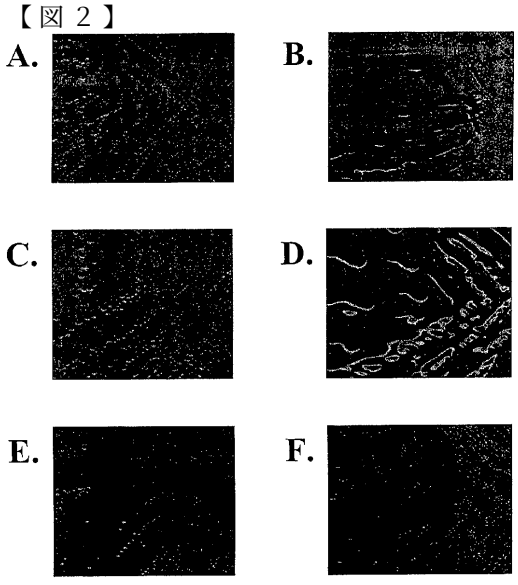


FIG. 2

【図３】

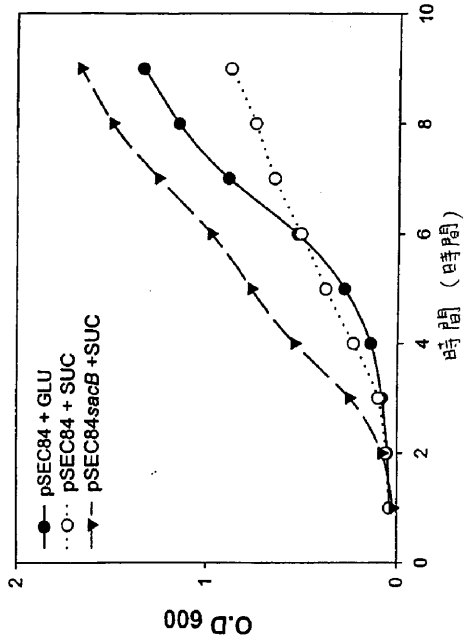


FIG.3

【図４】

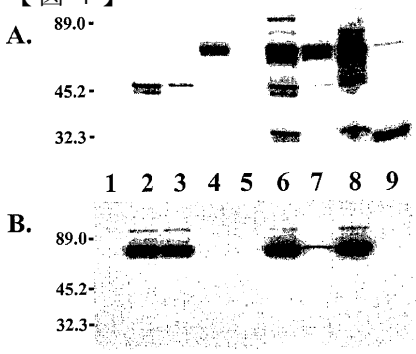


FIG.4

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C12R 1:42

(72)発明者 ギャレン, ジェイムズ イー.
アメリカ合衆国 メリーランド ２１１１７, オウイングス ミルス, チンズ コート ４２

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 特表平９－５０１３０８（ＪＰ, Ａ）
Behring.Inst.Mitt., No.98, pp.103-113 (1997)
Infect.Immun., vol.63(10), pp.4202-4205 (1995)
Cell, vol.100, pp.265-276 (2000)
Nature Biotech., vol.14, pp.765-769 (1996)
Infect.Immun., vol.65(7), pp.2941-2949 (1997)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)