

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4374190号
(P4374190)

(45) 発行日 平成21年12月2日(2009. 12. 2)

(24) 登録日 平成21年9月11日(2009. 9. 11)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 5 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2002-562384 (P2002-562384)	(73) 特許権者	305060279
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日(2002. 2. 8)		グラクソスミスクライン バイオロジカル
(65) 公表番号	特表2004-527235 (P2004-527235A)		ズ ソシエテ アノニム
(43) 公表日	平成16年9月9日(2004. 9. 9)		ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/001361		ル リュ ドランスティテュ 8 9
(87) 国際公開番号	W02002/062378	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成14年8月15日(2002. 8. 15)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成17年2月2日(2005. 2. 2)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	0103171.5		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成13年2月8日(2001. 2. 8)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイパーブレヴィングな細菌株及びそのワクチン製造のための使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TolQ、TolR及びTolAよりなる群から選択される1種以上のTol遺伝子の発現を下方調節することにより遺伝的に改変された、ハイパーブレヴィングな不定型インフルエンザ(Haemophilus influenzae)細菌。

【請求項 2】

(a) TolQ、TolR及びTolAよりなる群から選択される1種以上のTol遺伝子の発現を下方調節すること、及び(b) ompP5の突然変異によりペプチドグリカン結合活性を弱めること、によって遺伝的に改変された、ハイパーブレヴィングな不定型インフルエンザ(Haemophilus influenzae)細菌。

【請求項 3】

(a) tolQ及びtolR遺伝子の発現を下方調節すること、及び(b) ompP5の突然変異によってペプチドグリカン結合活性を弱めることにより遺伝的に改変された、請求項2に記載のハイパーブレヴィングな不定型インフルエンザ(Haemophilus influenzae)細菌。

【請求項 4】

(a) tolR及びtolA遺伝子の発現を下方調節すること、及び(b) ompP5の突然変異によりペプチドグリカン結合活性を弱めることにより遺伝的に改変された、請求項2に記載のハイパーブレヴィングな不定型インフルエンザ(Haemophilus influenzae)細菌。

【請求項 5】

以下の群：(a) 免疫優性可変抗原又は非防御抗原の発現を下方調節する方法、(b) 防御

OMP抗原の発現を上方調節する方法、(c) LPSのリピドA部分を毒性にするのに関与する遺伝子を下方調節する方法、(d) LPSのリピドA部分の毒性を低下させるのに関与する遺伝子を上方調節する方法、及び(e) ヒト構造と構造的に類似性を有し、かつヒトにおいて自己免疫応答を誘導することができる抗原の合成を下方調節する方法、から選択される1つ以上の方法によりさらに遺伝子操作された、請求項1~4のいずれか1項に記載のハイパーブレピングな不定型インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)細菌。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グラム陰性菌ワクチン組成物、その製造、及びそのような組成物の医薬における使用の分野に関する。より具体的には、本発明は、改良された外膜小胞放出特性を有する新規な遺伝子操作されたグラム陰性菌株、及びこれらの小胞を含むワクチン組成物に関する。

10

【発明の背景】

【0002】

グラム陰性菌は、膜構造物である2つの連続的な層により外部の培地から分離される。これらの構造物は、細胞質膜及び外膜(OM)と呼ばれ、構造的にも機能的にも異なっている。外膜は病原性細菌とそのそれぞれの宿主との相互作用に重要な役割を果たしている。従って、その表面に曝露された細菌性分子は宿主の免疫応答にとって重要な標的であり、そのため外膜成分は、ワクチン、診断薬及び治療薬を提供する上で魅力的な候補となる。

20

【0003】

全細胞細菌ワクチン(殺傷又は弱毒化されたもの)は、その天然の微小環境において複数の抗原を提供するという利点を有する。この手法を取り巻く欠点は、エンドトキシン断片及びペプチドグリカン断片などの細菌成分により誘導される副作用である。一方、外膜から精製された成分を含む非細胞性サブユニットワクチンは、限られた防御しか提供せず、宿主の免疫系に対して適切に抗原を提示しない。

【0004】

タンパク質、リン脂質及びリポ多糖は、全てのグラム陰性菌の外膜に見出される3つの主要な構成要素である。これらの分子は非対称的に分布している：膜リン脂質(大部分は内側の単分子層に)、リポオリゴ糖(もっぱら外側の単分子層に)並びにタンパク質(内側及び外側単分子層性リポタンパク質、膜内在性タンパク質又はポリトピック型膜タンパク質)。ヒトの健康に影響を与える多くの細菌病原体に関して、リポ多糖及び外膜タンパク質は、免疫原性であり、免疫化により対応する疾患に対する防御を与えやすいことが示された。

30

【0005】

グラム陰性菌の外膜(OM)は動的であり、環境条件に応じて著しい形態変化を起こしうる。これらの現象の中でも外膜小胞または「ブレブ」の形成は、多数のグラム陰性菌において研究されかつ報じられている(Zhou, Lら, 1998. FEMS Microbiol. Lett. 163: 223~228)。これらの中で、ブレブを産生すると報じられている細菌病原体としては、全てを網羅するものでないが、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、ライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*)、マルタ熱菌(*Brucella melitensis*)、ヒツジブルセラ症菌(*Brucella ovis*)、オウム病クラミジア(*Chlamydia psittaci*)、トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及び腸炎エルシニア菌(*Yersinia enterocolitica*)が挙げられる。OMブレブの産生を引き起こす生化学的機構は完全には理解されていないが、これらの外膜小胞は、外膜タンパク質調製物をその天然の立体構造状態で単離するための強力な方法論を示すことから広範囲にわたり研究されている。そのような状況下で、ナイセリア菌(*Neisseria*)、モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)、インフルエンザ

40

50

菌 (*Haemophilus influenzae*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及びクラミジア属菌 (*Chlamydia*) に対するワクチンを開発する上で外膜調製物の使用は特に興味深い。さらに、外膜ブレブは、種内変異体に対する拡張された防御をもたらすであろう複合タンパク質性及び非タンパク質性抗原を、組み合わせる。

【0006】

ブレブワクチンを作製する供給源となりうる細菌種の例は、次の通りである。

【0007】

ナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*)

ナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*; あるいは髄膜炎菌) は、ヒト上気道からしばしば単離されるグラム陰性菌である。これは時折、菌血症及び髄膜炎などの侵襲性細菌性疾患を引き起こす。髄膜炎菌性疾患の発生率は地理的、季節的及び年次の差異を示す (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (補遺), S18-S24, 1989)。温帯地方における多くの疾患は血清型Bの株に起因し、1~10人/100,000人/年・総人口の発生率で変化し、時にはより高い値に達することもある (Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T.ら, Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavéz, G., Aguilar, E.ら, Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990)。2つの高リスク群である幼児及び十代の若者における年齢特異的発生率はより高いレベルに達する。

10

【0008】

血清型Aの髄膜炎菌が中心となる流行は、多くは中央アフリカにおいて発生し、時には最大1000人/100,000人/年のレベルにまで達することがある (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (補遺), S18-S24, 1989)。髄膜炎菌性疾患のほとんど全ての症例は、おおよそ血清型A、B、C、W-135及びYの髄膜炎菌により引き起こされる。4血清型を含むA、C、W-135、Y型莢膜多糖ワクチンが入手可能である (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982)。

20

【0009】

多糖ワクチンは、現在、それらを担体タンパク質に化学的に結合させることにより改良されている (Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K.ら, JAMA 275: 1499-1503, 1996)。B型莢膜多糖は免疫原性ではなく、宿主成分と構造的に類似しているため、血清型Bのワクチンは利用可能ではない (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L.ら, J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Maekelae, P.M. Lancet ii.: 355-357, 1983)。

30

【0010】

長年、髄膜炎菌外膜に基づくワクチンの開発に研究の重点がおかれてきた (de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C.ら, Lancet 340:1074~1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A., Gronnesby, J.K.ら 338:1093~1096, 1991)。そのようなワクチンは年長児 (> 4歳) 及び思春期の若者の57%~85%に有効であることが実証されている。これらの効能試験のほとんどは、野生型ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) B株から得られるOMV (外膜小胞、ブレブからLPSを除去したもの) ワクチンを用いて実施された。

【0011】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) 血清型B (menB) は、工業規模の製造が可能になるような量の外膜ブレブを排出する。天然menB株から得られるその複合成分外膜タンパク質ワクチンは十代の若者をmenB疾患から保護するのに有効であることがわかっており、南米諸国では承認されている。外膜小胞を製造する別の方法は、細菌細胞を界面活性剤で抽出する方法によるものである (EP 11243)。

40

【0012】

これらのワクチン中にはPorA、PorB、Rmp、Opc、Opa、FrpBなどの多数の細菌外膜成分が存在するので、観察された保護に対するこれらの成分の寄与はなお、さらに明確にする必要がある。TbpB、NspAなどの他の細菌外膜成分は、防御免疫の誘導に関連する可能性があることが (動物抗体またはヒト抗体を用いて) 明らかにされている (Martin, D., Cadieux

50

, N., Hamel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med. 185:1173~1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, p.ら, Inf. Immun. 63:884~890, 1995)。防御免疫の機構は、抗体が媒介する殺菌活性及びオプソニン食作用に関わりうる。

【0013】

モラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)

モラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)(ブランハメラ・カタラーリス(Branhamella catarrhalis)とも呼ぶ)は、しばしばヒト上気道から単離されるグラム陰性菌である。これは複数の病理の原因であり、その病理の主なものゝ乳幼児と小児の中耳炎及び高齢者の肺炎である。これはまた、副鼻腔炎、院内感染及び、それより頻度は少ないが、侵襲性疾患の原因にもなる。

10

【0014】

試験したほとんどの成人において、殺菌抗体が同定された(Chapman, AJら、(1985) J. Infect. Dis. 151:878)。モラクセラ・カタラーリス(M. catarrhalis)の株はその血清殺菌活性に抵抗する能力において差異を示す。一般的には、罹患個体からの単離物は、単純にコロニー化されたものよりも耐性が高い(Hol, Cら、(1993) Lancet 341:1281, Jordan, KLら、(1990) Am. J. Med. 88 (suppl. 5A):28S)。従って、血清耐性は細菌のビルレンス因子であると考えられる。中耳炎から回復している小児の血清においては、オプソニン化活性が観察されている。

【0015】

ヒトにおけるこれらの異なる免疫応答により標的とされる抗原は、84 kDaのタンパク質であってその発現が鉄により調節され、肺炎患者の血清により認識されるOMP B1(Sethi, S,ら、(1995) Infect. Immun. 63:1516)、UspA1及びUspA2(Chen D.ら、(1999) Infect. Immun. 67:1310)以外には同定されていない。

20

【0016】

モラクセラ・カタラーリス(M. catarrhalis)表面に存在する別の数種の膜タンパク質が、防御免疫誘導における潜在的関連について生化学的方法を用いて特性解析されている(レビューはMurphy, TF (1996) Microbiol. Rev. 60:267を参照)。マウス肺炎モデルにおいて、それらのいくつか(UspA, CopB)に対して生ずる抗体の存在は、肺感染の急速なクリアランスに有利にはたらく。別のポリペプチド(OMP CD)はモラクセラ・カタラーリス(M. catarrhalis)株の間で高度に保存され、かつこの細菌に対して効能のあることが動物モデルで実証されている緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)のポーリンと相同性を示す。

30

【0017】

モラクセラ・カタラーリス(M. catarrhalis)は外膜小胞(ブレブ)を産生する。これらのブレブは、様々な方法によって単離され又は抽出されている。これらの方法のうち、界面活性剤抽出(Bartos L.C.及びMurphy T.M. 1988. J. Infect. Dis. 158:761-765; Murphy T.M. 及びLoeb M.R. 1989 Microbial Pathog. 6:159~174; Unhanand M., Maciver, I., Ramilo O., Arencibia-Mireles O., Argyle J.C., McCracken G.H.Jr., Hansen E.J. 1992. J. Infect. Dis. 165:644~650; Maciver I., Unhanand M., McCracken G.H. 及びHansen E.J. 1993. J. Infect. Dis. 168:469-472)又はゴーストの生成(Lubitz W.ら、1999. J. Biotechnol. 73: 261-273; Eko F.O.ら、1999. Vaccine 17: 1643-1649)は周知である。そのようなブレブ調製物の保護能力は、モラクセラ・カタラーリス(M. catarrhalis)の肺クリアランスに対するマウスモデルで試験されている。ブレブワクチンを用いた能動免疫又は抗ブレブ抗体の受動移入は、このモデルにおいて有効な保護を誘導することが示されている(Maciver I., Unhanand M., McCracken G.H.Jr., Hansen, E.J. 1993. J. Infect. Dis. 168:469~472)。

40

【0018】

インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)

インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)は非運動性グラム陰性菌である。ヒトはその唯一の自然宿主である。インフルエンザ菌(H. influenzae)単離体は通常、その多糖莢膜によって分類される。「a」から「f」まで名付けられた6種の異なる莢膜型が同定され

50

ている。これら6血清型の1つに対して生ずるいずれの抗血清と凝集しない単離体は、不定型(nontypeable)として分類され、莢膜を発現しない。

【0019】

インフルエンザ菌(*H. influenzae*)b型(Hib)は、細菌性髄膜炎及び全身疾患の主な原因である点で、他の型と明らかに異なる。インフルエンザ菌(*H. influenzae*)の不定型株(NTHi)は、全身疾患を患う患者の血液から時折、単離されるだけである。NTHiは肺炎、慢性気管支炎の悪化、副鼻腔炎及び中耳炎の共通の原因である。NTHi株はクローン分析により同定されるとおり高い変異性を示すが、Hib株は全体としてより均一である。

【0020】

インフルエンザ菌(*H. influenzae*)の様々なタンパク質が、病因に関係することが示されているか、又は動物モデルにおいてワクチン接種により保護をもたらすことが示されている。

10

【0021】

ヒト鼻咽頭上皮細胞へのNTHiの接着が報告されている(Read RC.ら、1991. *J. Infect. Dis.* 163:549)。線毛及びピリ線毛(Brinton CC.ら 1989. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:S54; Kar S.ら 1990. *Infect. Immun.* 58:903; Gildorf JR.ら 1992. *Infect. Immun.* 60:374; St. Geme JWら 1991. *Infect. Immun.* 59:3366; St. Geme JWら 1993. *Infect. Immun.* 61:2233)のほかに、多くのアドヘシンがNTHiにおいて同定されている。それらのうち、HMW1及びHMW2と呼ばれる2つの表面露出した高分子量タンパク質が、上皮細胞へのNTHiの接着を媒介することが示された(St. Geme JW.ら 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2875)。高分子量タンパク質の別のファミリーが、HMW1/HMW2ファミリーに属するタンパク質を欠くNTHi株で同定された。NTHi 115-kDa Hiaタンパク質(Barenkamp SJ., St Geme S.W. 1996. *Mol. Microbiol.* 印刷中)は、インフルエンザ菌(*H. influenzae*)b型株により発現されるHsfアドヘシンに高度に類似している(St. Geme JW.ら、1996. *J. Bact.* 178:6281)。別のタンパク質であるHapタンパク質は、IgA1セリンプロテアーゼに類似性を示し、接着及び細胞侵入の双方に関与することが示された(St. Geme JW.ら、1994. *Mol Microbiol.* 14:217)。

20

【0022】

5つの主な外膜タンパク質(OMP)が同定され、番号付けられている。インフルエンザ菌(*H. influenzae*)b型株を用いた初期の研究により、P1及びP2 OMPに特異的な抗体が、後のチャレンジから幼齢ラットを保護することが示された(Loeb MR.ら 1987. *Infect. Immun.* 55:2612; Musson RS. Jr.ら 1983. *J. Clin. Invest.* 72:677)。P2は、この内在性OMPの表面に曝露されたループ構造内に存在する可変領域に対する殺菌抗体及びオプソニン抗体を誘導し得ることが見出された(Haase EM.ら 1994 *Infect. Immun.* 62:3712; Troelstra A.ら 1994 *Infect. Immun.* 62:779)。リポタンパク質P4も、殺菌抗体を誘導し得る(Green BA.ら 1991. *Infect. Immun.* 59:3191)。

30

【0023】

OMP P6は、外膜の1~5%を構成するリポタンパク質に結合した保存されたペプチドグリカンである(Nelson MB.ら 1991. *Infect. Immun.* 59:2658)。後に、PCP(P6交叉反応性タンパク質)と呼ばれるほぼ同じ分子量のリポタンパク質が認められた(Deich RM.ら、1990. *Infect. Immun.* 58:3388)。保存されたりポタンパク質P4、P6及びPCPの混合物は、チンチラ中耳炎モデルで測定した時には保護を示さなかった(Green BA.ら、1993. *Infect. Immun.* 61:1950)。P6単独ではチンチラモデルにおいて保護を誘導するようである(Demaria TF.ら 1996. *Infect. Immun.* 64:5187)。

40

【0024】

フィンブリントタンパク質(Miyamoto N., Bakaletz, LO. 1996. *Microb. Pathog.* 21:343)も、OMP P5と相同性を有し、それ自身は内在性大腸菌(*Escherichia coli*)OmpAと配列相同性を有することが記載されている(Miyamoto N., Bakaletz, LO. 1996. *Microb. Pathog.* 21:343; Munson RS. Jr.ら、1993. *Infect. Immun.* 61:1017)。NTHiは線毛により粘液に接着するようである。

50

【0025】

NTHiは、淋菌(gonococci)及び髄膜炎菌(meningococci)における観察と一致して、鉄制限下で増殖させるとTbpA及びTbpBからなる二重ヒトトランスフェリン受容体を発現する。抗TbpB抗体は、幼齢ラットを保護した(Loosmore SM.ら 1996. Mol. Microbiol. 19:575)。NTHiについては、ヘモグロビン／ハプトグロビン受容体も記載されている(Maciver I.ら 1996. Infect. Immun. 64:3703)。ヘム：ヘモペキシンに対する受容体も同定されている(Cope LD.ら 1994. Mol. Microbiol. 13:868)。NTHiの間では、ラクトフェリン受容体も存在するが、未だに特性決定されていない(Schryvers AB.ら 1989. J. Med. Microbiol. 29:121)。NTHiの間では、ナイセリア菌のFrpBタンパク質に類似するタンパク質は記載されていない。

10

【0026】

80kDa OMP、すなわちD15表面抗原は、マウスチャレンジモデルにおいてNTHiに対する保護をもたらす(Flack FS.ら 1995. Gene 156:97)。42kDa外膜リポタンパク質であるLPDはインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)間で保存されており、殺菌抗体を誘導する(Akkoyunlu M.ら 1996. Infect. Immun. 64:4586)。マイナーな98 kDa OMP(Kimura A.ら 1985. Infect. Immun. 47:253)は、防御抗原であることが見出された。このOMPは明白にFe制限誘導性OMP又は高分子量アドヘシンの一つであると考えられ、これはその後特性解析された。インフルエンザ菌は、IgA1プロテアーゼ活性をもたらす(Mulks MH., Shoberg RJ. 1994. Meth. Enzymol. 235:543)。NTHiのIgA1プロテアーゼは高度の抗原変異性を有する(Lomholt H., van Alphen L., Kilian, M. 1993. Infect. Immun. 61:4575)。

20

【0027】

NTHiの別のOMPであるOMP26は26 kDaのタンパク質であり、ラットモデルにおいて肺クリアランスを増強することが示された(Kyd, J.M., Cripps, A.W. 1998. Infect. Immun. 66:2272)。NTHi HtrAタンパク質も、防御抗原であることが示された。実際、このタンパク質は中耳炎に対してチンチラを保護し、インフルエンザ菌b型菌血症に対して幼齢ラットを保護した(Loosmore S.M.ら 1998. Infect. Immun. 66:899)。

【0028】

外膜小胞(又はブレブ)は、ゴーストの生成(Lubitz W.ら、1999. J. Biotechnol. 73:261-273; Eko F.O.ら、1999. Vaccine 17: 1643-1649)と同様に、インフルエンザ菌(*H. influenzae*)から単離されている(Loeb M.R., Zachary A.L., Smith D.H. 1981. J. Bacteriol. 145:569~604; Stull T.L., Mack K., Haas J.E., Smit J., Smith A.L. 1985. Anal. Biochem. 150:471~480)。小胞は、血液脳関門透過の誘導(Wiwpelwey B., Hansen E.J., Scheld W.M. 1989 Infect. Immun. 57:2559~2560)、髄膜炎の誘発(Mustafa M.M., Ramilo O., Syrogiannopoulos G.A., Olsen K.D., McCracken G.H.Jr., Hansen, E.J. 1989. J. Infect. Dis. 159:917~922)及びDNA取込み(Concino M.F., Goodgal S.H. 1982 J. Bacteriol. 152:441~450)に関連している。これらの小胞は鼻粘膜上皮と結合して吸収されることが可能であり(Harada T., Shimizu T., Nishimoto K., Sakakura Y. 1989. Acta Otorhinolarygol. 246:218~221)、ブレブ中にアドヘシンおよび／または定着因子が存在しうることを示す。外膜小胞に存在するタンパク質に対する免疫応答は、様々なインフルエンザ菌(*H. influenzae*)疾患の患者に観察されている(Sakakura Y., Harada T., Hamaguchi Y., Jin C. S. 1988. Acta Otorhinolarygol. Suppl. (Stockh.) 454:222~226; Harada T., Sakakura Y., Miyoshi Y. 1986. Rhinology 24:61~66)。

30

40

【0029】

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

シュードモナス属は、グラム陰性で極鞭毛をもち、好氣的に増殖して孢子を形成しない、真直ぐの桿菌及び若干曲がった桿菌から構成される。それらの代謝における要求性が少ないので、シュードモナス種は偏在し、土壌、大気、下水中及び植物中に広く分布する。緑膿菌(*P. aeruginosa*)、類鼻疽菌(*P. pseudomallei*)、鼻疽菌(*P. mallei*)、シュードモナス・マルトフィリア(*P. maltophilia*)及びシュードモナス・セパシア(*P. cepacia*)などのシュードモナス属の多数の種はまた、ヒトに対して病原性であることもわかっている。

50

列挙した中で、緑膿菌(*P. aeruginosa*)は、免疫無防備状態にある宿主の日和見感染に関連しており入院患者の高い罹患率の原因となるため、重要なヒトの病原体と考えられる。緑膿菌(*P. aeruginosa*)による院内感染は、長期治療中の、免疫抑制剤、副腎皮質ステロイド、代謝拮抗剤、抗生物質又は放射線療法を受けている患者が主に罹患する。

【0030】

シュードモナス属、及び特に緑膿菌(*P. aeruginosa*)は、これらの細菌の病原性に寄与する様々な毒素(溶血素、フィブリノリシン、エステラーゼ、コアグラーゼ、ホスホリパーゼ、エンドトキシン及びエキソトキシンなど)を産生する。さらに、これらの生物は、複数の薬物排出ポンプの存在により、抗生物質に対する高度の固有の耐性を有する。この後者の特徴はしばしば、疾患の予後を悪化させる。

10

【0031】

抗細菌化学療法剤の無制御な使用に起因して、緑膿菌により引き起こされる院内感染の頻度は最近30年に渡ってかなり増加した。米国では、例えば、緑膿菌の院内感染の経済的負荷は、年間45億米ドルであると見積もられている。従って、緑膿菌に対する能動又は受動免疫のためのワクチンの開発が積極的に必要とされている(レビューについては、Stanislavskyら、1997. *FEMS Microbiol. Lett.* 21: 243-277を参照)。

【0032】

緑膿菌の種々の細胞関連抗原及び分泌抗原がワクチン開発の対象とされてきた。シュードモナス属の抗原のうち、主にアルギナートからなる細胞外粘液であるムコイド物質は、サイズ及び免疫原性の点で不均一であることが見出された。高分子量アルギナート成分(30~300 kDa)は保存されたエピトープを含むが、低分子量アルギナート成分(10~30 kDa)はユニークなエピトープに加えて保存されたエピトープを有するようである。表面結合タンパク質のうち、III型分泌-輸送装置の一部であるPcrVも、ワクチン接種の興味深い標的であることが示された(Sawaら、1999. *Nature Medicine* 5: 392-398)。

20

【0033】

O-抗原(LPSのO-特異的多糖)又はH-抗原(鞭毛抗原)などの表面提示抗原は、その高い免疫原性のために血清型分類に用いられてきた。O-特異的多糖の反復ユニットの化学構造が明らかにされ、これらのデータにより、緑膿菌の31個の化学型の同定が可能になった。緑膿菌の全血清型の間で保存されたエピトープは、コアオリゴ糖及びLPSのリピドA領域中に位置し、これらのエピトープを含む免疫原は異なる緑膿菌免疫型に対してマウスにおいて交叉防御免疫を誘導する。LPSの外側コアは、動物の気道及び目の上皮細胞への緑膿菌の結合のためのリガンドであった。しかし、異なる血清型間ではこの外側コア領域中に異質性が存在する。内側コア中のエピトープは高度に保存されており、表面に接近しやすく、O-特異的多糖によりマスクされないことが証明された。

30

【0034】

OMタンパク質の保護特性を試験するために、20~100 kDaの範囲の分子量をもつ緑膿菌(*P. aeruginosa*) OMタンパク質を含有するワクチンを前臨床および臨床試験において使用した。このワクチンは、動物モデルにおいて緑膿菌(*P. aeruginosa*)チャレンジに対して有効であり、そしてヒトボランティアにおいて高レベルの特異的抗体を誘導した。抗緑膿菌(*P. aeruginosa*)抗体を含有するヒトボランティアから得た血漿は受動保護を与え、緑膿菌(*P. aeruginosa*)感染の重篤な病状の患者の87%の回復を助けた。さらに最近、グルタチオン-Sトランスフェラーゼと融合した緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来の一部分の外膜タンパク質OprF(アミノ酸190~342)及びOprI(アミノ酸21~83)を含有するハイブリッドタンパク質が、50%致死用量の975倍の緑膿菌(*P. aeruginosa*)からマウスを保護することが示された(Knappら 1999. *Vaccine*. 17:1663~1669)。

40

【0035】

しかしながら、ブレブの精製は技術的に困難である。ほとんどのグラム陰性株におけるブレブ産生は、ワクチンの工業生産のための生成物の収率が低くなり、しばしば非常に不均一な生成物をもたらす。本発明は、性質の均一なブレブをより高い収率で、より容易に生成することができる、特異的に改変された「ハイパーブレビング」株を提供することに

50

より、この問題を解決するものである。そのようなブレブは、より容易に濾過滅菌することもできる。

【0036】

さらに、その細菌がより多くのブレブを天然で生成する場合には、デオキシコレートなどの界面活性剤(より大量のブレブの抽出のために)を使用することなくブレブを作製して回収することができる点で、ブレブ精製に関連する重要な工程上の利点がある。これは、クロマトグラフィー精製及び超遠心などの界面活性剤を除去する通常の製法工程を省略することができることを意味する。

【発明の開示】

【0037】

第1の態様において、本発明は、1個以上のtol遺伝子の発現の下方調節；タンパク質のペプチドグリカン結合活性を弱めるようなペプチドグリカン結合部位を含む該タンパク質をコードする1個以上の遺伝子の突然変異からなる群より選択される一方又は両方のプロセスにより遺伝子工学的に改変されたハイパーブレビングなグラム陰性細菌を提供する。

【0038】

「ハイパーブレビング」とは、細菌が、未改変細菌のブレブの量の2倍以上(より好ましくは、3、4、5、又は10倍以上)を天然で放出することを意味する。

【0039】

「下方調節」とは、目的の遺伝子の発現を低下させる(少なくとも2倍、より好ましくは5倍以上)か、又は完全に消失させることを意味する。これは、該遺伝子をゲノムから欠失させること、該遺伝子のコード配列中に停止コドンを導入すること、該遺伝子のプロモーター配列を欠失させること、又は該遺伝子のプロモーター配列をより弱いプロモーターに置換することなどの方法により容易に行うことができる。該遺伝子がオペロン中にある場合(多くのtol遺伝子がそうであるように)、標的遺伝子の下方調節が、下方調節が意図されていないオペロン中の他の遺伝子の発現に影響しないことを確実にするように注意を払わねばならない。

【0040】

特定のtol遺伝子を、本明細書に記載のtol遺伝子との相同性(好ましくは、20、30、40、50、60、70、80、90%以上の同一性)、又は大腸菌のものとの相同性により、種々のグラム陰性細菌において同定することができる。好ましくは、1、2、3、4又は5個のtol遺伝子を、本発明の細菌において下方調節する。より好ましくは、tol遺伝子対：tolQ及びtolR、又はtolR及びtolAを、細菌中で下方調節する(好ましくは、欠失又は破壊的停止コドンの導入による)。

【0041】

タンパク質のペプチドグリカン結合活性を弱めるようなペプチドグリカン結合部位を含む該タンパク質をコードする1個以上の遺伝子の「突然変異」とは、そのような遺伝子上記のように「下方調節」することを意味する。あるいは、そのような遺伝子は防御抗原をコードし得るため、ペプチドグリカン結合部位(図1及び2に示されるような、グラム陰性細菌株間で保存されており、かつ同定可能である約16~22アミノ酸のペプチド、又は該配列と40、50、60、70、80、90%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列)をコードする遺伝子部分の内部又は5'側に停止コドンを導入してもよい。

【0042】

しばしば、そのような遺伝子は内在性膜タンパク質であり、従って、停止コドンは該タンパク質の外膜結合部分をコードする遺伝子部分の3'側、及びペプチドグリカン結合部位の5'側であるのが好ましい。OmpA相同体タンパク質については、そのような停止コドンを、保存されたF残基をコードするコドンの3'側に置くべきであることが理解されている(図1及び2、並びに図3に模式的に示される)。外膜中の末端切断型タンパク質の適切な折り畳みを確実にするために、この保存されたF残基は保持すべきである。この保存されたF残基を保持するOmpA相同体(及びそれをコードする遺伝子)のC末端トランケート(その同一性は、OmpA相同体と、図1及び2の配列比較との比較により容易に決定することができる)は

10

20

30

40

50

、本発明のさらなる態様である。

【0043】

ペプチドグリカン結合部位をコードする領域の3'側の遺伝子領域を保持する場合(例えば、それが保護的エピトープ[例えば、インフルエンザ菌由来のP5の場合]をコードする場合)、そのタンパク質のペプチドグリカン結合活性を所望のレベルにまで弱めるように(少なくとも2倍低下、好ましくは完全に除去するように)、1、2、3、4、5またはそれ以上の点突然変異により、又はペプチドグリカン結合部位からのアミノ酸(好ましくは、ペプチドグリカン結合部位の1、2、3、4、5、7、10もしくは15アミノ酸又はその全体)の欠失により、ペプチドグリカン結合部位を遺伝子操作することができる。

【0044】

本発明の目的のために、「ペプチドグリカン結合部位」は、図1及び2上に示したペプチドグリカン結合部位(囲み領域又は線を引いた領域)とアラインさせることができるペプチドグリカン結合タンパク質の領域を意味する。

【0045】

当業者であれば、細菌ゲノム上での上記の下方調節及び突然変異事象を、相同組換えを用いて実行することができる(実施例及び本明細書に参照により組み入れられるWO 01/09350に記載されるように)。この技術のためには、変化領域のいずれかの側の少なくとも50～100ヌクレオチド(好ましくは周辺500)の情報を知るべきである。

【0046】

minB遺伝子座の突然変異(例えば、ノックアウト)を担持する細菌は、該細菌も本発明の上記のいずれか又は両方の方法により改変されていない限り、本発明の範囲に入ることは意図されない。

【0047】

ハイパーブレビングなグラム陰性細菌は、ナイセリア(*Neisseria*)科(例えば、ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)、ナイセリア・ラクタミカ(*Neisseria lactamica*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)、チフス菌(*Salmonella typhi*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、赤痢菌属菌(*Shigella* spp.)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*(特に、不定型))、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及びモラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)に由来する任意の細菌からなる群より選択することができる。

【0048】

ナイセリア菌

一実施形態において、ハイパーブレビングなグラム陰性細菌は、以下の遺伝子のいずれか又は双方の発現を下方調節することにより遺伝的に改変されたナイセリア菌(好ましくは、ナイセリア・メニンギチジス)株である：exbB (tolQと相同)[配列番号1]及びexbD (tolRと相同)[配列番号3]。exbB及びexbDの上流領域を、それぞれ配列番号5及び6に提供するが、これは該遺伝子の発現を下方調節するための相同組換えベクターを設計するのに有用である(例えば、プロモーターを欠失させるか、又はそれをより弱いプロモーターもしくは代謝物制御されるプロモーター[例えば、大腸菌のphoEプロモーター]に置換することによる)。

【0049】

さらなる実施形態において、ハイパーブレビングなナイセリア菌(好ましくは、ナイセリア・メニンギチジス)株を、コードされたタンパク質のペプチドグリカン結合活性を弱めるように、rmpM [配列番号7又は9]の突然変異により、遺伝的に改変した(単独又は上記の下方調節事象と組合せて)。該タンパク質のペプチドグリカン結合部位(アミノ酸配列NQALSERRAYVVANNLVS Nを有する-配列番号8も参照)を図1に示す。該遺伝子の上流領域を配列番号10に提供するが、これは該遺伝子の下方調節に有用である。好ましくは、この遺伝子を実施例1に記載の方法で突然変異させる。トランケートを作製する場合、図1及び2に示された保存されたF残基をコードするコドンの下流に停止コドンを導入するのが好ましい

10

20

30

40

50

。

【0050】

そのような改変株から調製された小胞は、1個以上の以下の改良点を有する：減少した粒子径(0.22 μ mの孔径を通過する滅菌濾過を可能にする)、増加したバッチ均質性、及び優れた収率。ブレブの形態に対するその種の変化は、上記のように外膜をペプチドグリカン層及び／又は細胞質膜に連結させるのに関与する遺伝子进行操作することにより得られる。改良された天然ブレブの放出は、デオキシコレートなどの界面活性剤を使用することなく工業規模でブレブを単離することができるという利点を有する。

【0051】

インフルエンザ菌

一実施形態において、ハイパーブレビングなグラム陰性細菌は、1個以上の以下の遺伝子の発現を下方調節することにより遺伝的に改変されたインフルエンザ菌(好ましくは不定型)株である：tolQ [配列番号11]、tolR [配列番号13]、tolA [配列番号15]及びtolB [配列番号17]。これらの遺伝子は単一のオペロン中に存在し、従って、配列番号19に提供される上流領域は該オペロン上の全ての遺伝子の発現を下方調節するための相同組換えベクターの設計に有用である(例えば、プロモーターを欠失させるか、又はそれをより弱いプロモーターもしくは代謝物制御されるプロモーター[例えば、大腸菌のphoEプロモーター]に置換することによる)。好ましい実施形態は、tolQ及びR遺伝子の双方、又はtolR及びA遺伝子の双方を欠失させる(好ましくは、それぞれ実施例4及び5に記載のようにして)が、該オペロン上の他の遺伝子(特に、tolB)の発現は維持することを含む。

【0052】

さらなる実施形態において、ハイパーブレビングなインフルエンザ菌(好ましくは不定型)株を、コードされるタンパク質のペプチドグリカン結合活性を弱めるように、ompP5 [配列番号20]、ompP6 [配列番号22又は24]及びpcp [配列番号26]からなる群より選択される1個以上の遺伝子の突然変異により、遺伝的に改変した(単独で又は上記の下方調節事象と組合せて)。該タンパク質のペプチドグリカン結合部位を図1に示す。好ましくは、該遺伝子を実施例6に記載の方法と同様の方法で突然変異させる。P5又はP6からトランケートを作製する場合、図1に示された保存されたF残基をコードするコドンの下流に停止コドンを導入するのが好ましい。

【0053】

P5については、ペプチドグリカン結合部位をコードする領域の3'側の遺伝子領域を、有利に保持することができる(同時にそれは保護的エピトープをコードする)。そのような場合、タンパク質のペプチドグリカン結合活性を所望のレベルにまで低下させるが(好ましくは完全に除去)、保護的エピトープは保持するように、ペプチドグリカン結合部位を、1、2、3、4、5又はそれ以上の点突然変異により、又はペプチドグリカン結合部位からのアミノ酸の欠失(好ましくは、ペプチドグリカン結合部位の1、2、3、4、5、7、10もしくは15アミノ酸又はその全体)により、遺伝子操作することができる。

【0054】

好ましい細菌は、下方調節されたtolQ&R及び突然変異したP5、又は下方調節されたtolR&A及び突然変異したP5表現型を有する。

【0055】

P5遺伝子は大腸菌のOmpA遺伝子と相同であることがわかっており、P6遺伝子は大腸菌のPal遺伝子と相同であることがわかっている(P5とOmpAタンパク質は51%同一であり、P6とPalタンパク質は62%同一である)。pcp遺伝子(lppとも呼ばれる)は、大腸菌Lppにも大腸菌Palにも類似していないリボタンパク質をコードするが、ペプチドグリカン結合部位を含む(図1)。

【0056】

そのような改変株から調製された小胞は、1個以上の以下の改良点を有する：減少した粒子径(0.22 μ mの孔径を通過する滅菌濾過を可能にする)、増加したバッチ均質性、及び優れた収率。ブレブの形態に対するその種の変化は、上記のように外膜をペプチドグリカ

ン層及び／又は細胞質膜に連結させるのに関与する遺伝子を操作することにより得られる。改良された天然ブレブの放出は、デオキシコレートなどの界面活性剤を使用することなく工業規模でブレブを単離することができるという利点を有する。

【0057】

モラクセラ・カタラーリス

一実施形態において、ハイパーブレビングなグラム陰性細菌は、1個以上の以下の遺伝子の発現を下方調節することにより遺伝的に改変されたモラクセラ・カタラーリス株である：tolQ [配列番号28]、tolR [配列番号30]、tolX [配列番号32]、tolB [配列番号34]及びtolA [配列番号36]。tolQRXB遺伝子は単一のオペロン中に存在し、従って、配列番号28の上流に提供される上流領域は該オペロン上の全ての遺伝子の発現を下方調節するための相同組換えベクターの設計に有用である(例えば、プロモーターを欠失させるか、又はそれをより弱いプロモーターもしくは代謝物制御されるプロモーター[例えば、大腸菌のphoEプロモーター]に置換することによる)。tolA遺伝子と同様に、配列番号36の上流の上流配列も提供する。好ましい実施形態は、tolQ及びR遺伝子の双方、又はtolR及びX遺伝子の双方を欠失(好ましくは、実施例2に記載のような)させるが、該オペロン上の他の遺伝子(特に、tolB)の発現を維持することを含む。

【0058】

さらなる実施形態において、ハイパーブレビングなモラクセラ・カタラーリス株を、コードされるタンパク質のペプチドグリカン結合活性を弱めるように、ompCD [配列番号38]、xompA [配列番号40; WO 00/71724]、pal1 [配列番号42]、及びpal2 [配列番号44]からなる群より選択される1個以上の遺伝子の突然変異により、遺伝的に改変した(単独で又は上記の下方調節事象と組合せて)。該タンパク質のペプチドグリカン結合部位を図2に示す。好ましくは、実施例3に記載の方法と同様の方法で該遺伝子を突然変異させる。OMPDC、XOMPA又はPal1もしくはPal2からトランケートを作製する場合、図2に示される保存されたF残基をコードするコドンの下流に停止コドンを導入するのが好ましい。

【0059】

好ましい細菌は、下方調節されたtolQ&R及び突然変異したompCD、又は下方調節されたtolR&X及び突然変異したompCD表現型を有する。

【0060】

OMPDC遺伝子は大腸菌のOmpA遺伝子と相同であることがわかっている。OmpCDによりコードされるタンパク質は、OmpAと比較して、そのN末端ドメインにおいてあまり保存されていない。しかしながら、それはプロリン、アラニン及びバリンに富む「ヒンジ」領域を含み、そのC末端ドメインはOmpAのC末端ドメインと有意に類似している(147アミノ酸オーバーラップにおいて25%同一)。Palに関連するリポタンパク質をコードする2個の遺伝子も同定した(Pal1及びPal2はそれぞれ、大腸菌のPalと39%及び28%同一である)。これらのリポタンパク質、並びにOmpCDのC末端ドメインは、推定PgASを含む(図2)。推定PgASを含むタンパク質をコードする4つ目の遺伝子(xOmpA)を、モラクセラ・カタラーリスにおいて同定した。このタンパク質のN末端ドメインは、いかなる公知のタンパク質とも有意な類似性を示さない。しかしながら、そのC末端ドメインはOmpAのC末端ドメインと類似している(165アミノ酸オーバーラップにおいて25%同一)(図2)。

【0061】

そのような改変株から調製された小胞は、1個以上の以下の改良点を有する：減少した粒子径(0.22 μm の孔径を通過する滅菌濾過を可能にする)、増加したバッチ均質性、及び優れた収率。ブレブの形態に対するその種の変化は、上記のように外膜をペプチドグリカン層及び／又は細胞質膜に連結させるのに関与する遺伝子を操作することにより得られる。改良された天然ブレブの放出は、デオキシコレートなどの界面活性剤を使用することなく工業規模でブレブを単離することができるという利点を有する。

【0062】

本発明の細菌及びブレブにおけるさらなる改良

ハイパーブレビングなグラム陰性細菌を、以下の群より選択される1個以上の方法によ

りさらに遺伝子操作することができる：(a) 免疫優性可変抗原又は非防御抗原の発現を下方調節する方法、(b) 防御OMP抗原の発現を上方調節する方法、(c) LPSのリピドA部分を毒性にするのに関与する遺伝子を下方調節する方法、(d) LPSのリピドA部分の毒性を低下させるのに関与する遺伝子を上方調節する方法、及び(e) ヒト構造物と構造的に類似性を有し、ヒトにおいて自己免疫応答を誘導することができる抗原の合成を下方調節する方法。

【0063】

本発明のそのようなブレブワクチンは、いくつかの(好ましくは、保存された)防御抗原又はエピトープに対する免疫応答に焦点を当てるように設計し、すなわち複合成分ワクチンに製剤化する。そのような抗原が内在性OMPである場合、ブレブワクチンの外膜小胞はその適切な折り畳みを確実にするであろう。本発明は、免疫優性可変OMP並びに非防御OMPを欠失させること、可変領域の欠失により保存されたOMPを作製すること、防御OMPの発現を上方調節すること、及び防御OMPの発現のための制御機構を消失させること(鉄制限など)により、OMP(ブレブ)ワクチンのOMP及びLPS組成物を最適化する方法を提供する。さらに、本発明は、脂質部分を改変するか、又はホスホリル組成物を変更するが、そのアジュバント活性を保持させるか、又はそれをマスキングすることにより、リピドAの毒性の低下を提供する。これらの新しい改良方法の各々はブレブワクチンを個々に改良するが、1個以上のこれらの方法の組合せは、特に小児への使用に好適な、免疫防御性があり非毒性である最適に遺伝子操作されたブレブワクチンを製造するように、協働して働く。

【0064】

(a) 免疫優性可変抗原又は非防御抗原の発現を下方調節する方法

多くの表面抗原は菌株間で可変性があり、その結果、密接に関連する限られたセットの菌株に対してだけ防御性がある。本発明の一態様は、可変性表面タンパク質をコードする遺伝子の発現の低下又は好ましくは欠失を含むものであり、このことによって、菌株が産生するブレブであって、ワクチンとして投与すると、保存された(外膜に保持された)タンパク質がワクチン被接種者の免疫系に強い影響を及ぼすせいで様々な菌株に対する強い交叉反応性を有するブレブが、生成される。そのような可変性抗原の例としては、ナイセリア菌(*Neisseria*)については、抗原性変化を起こすピリ線毛(PilC)、PorA、Opa、TbpB、Fr pB；インフルエンザ菌(*H. influenzae*)については、P2、P5、ピリン、IgA1-プロテアーゼ；及びモラクセラ菌(*Moraxella*)については、CopB、OMP106が挙げられる。

【0065】

下方調節又はスイッチオフされうる他の種類の遺伝子は、in vivoで細菌によって容易にスイッチオン(発現)またはスイッチオフされうる遺伝子である。そのような遺伝子によりコードされる外膜タンパク質は細菌上に常に存在するわけではないので、ブレブ調製物中のそのようなタンパク質の存在も上記の理由によりワクチンの有効性の障害となりうる。下方調節又は欠失するための好ましい例は、ナイセリア菌(*Neisseria*) Opcタンパク質である。Opc含有ブレブワクチンにより誘導される抗Opc免疫は、感染生物が容易にOpc⁻になりうるので、限られた防御能力しか有しない。そのようなタンパク質の他の例は、インフルエンザ菌(*H. influenzae*) HgpAおよびHgpBである。

【0066】

方法a)においては、これらの可変性又は非防御性遺伝子の発現を下方調節するか、又は最終的にスイッチオフする。これは、ブレブの外表面に低量でしか存在しない、より望ましい抗原に免疫系を集中させるという、驚くべき利点を有する。

【0067】

菌株はこのようにして様々な手法によって遺伝子操作することができる。それらの手法としては、遺伝子のコード領域またはプロモーター領域を破壊するトランスポゾン挿入、又は同様な結果を達成する点突然変異もしくは欠失が挙げられる。相同組換えも、染色体から遺伝子を欠失させるために利用することができる(この場合、配列Xが目的の遺伝子のコード配列の部分(好ましくは全て)を含む)。相同組換えは、さらに、強力なプロモーターを弱い(又は非)プロモーターに交換するために利用することもできる。これらの技術は

全てWO 01/09350 (8/2/01にWIPOにより公開されたものであり、参照により本明細書に組み入れられる)に記載されている。

【0068】

(b) 防御OMP抗原の発現を下方調節する方法

これは、そのような防御OMPのコピーをゲノム中に挿入すること(好ましくは、相同組換えによる)、又は天然のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより天然の遺伝子の発現を上方調節すること、又は目的の遺伝子上流に強力なプロモーターを挿入すること(これも相同組換えによる)により行うことができる。そのような方法は、WO 01/09350 (8/2/01にWIPOにより公開されたものであり、参照により本明細書に組み入れられる)に記載された技術を用いて達成することができる。

10

【0069】

そのような方法は特に、外膜タンパク質及びリポタンパク質などの免疫学的に適切なブレブ成分(好ましくは、通常ブレブ中に低濃度で存在する、保存されたOMP)の産生を増強するのに有用である。

【0070】

(c) LPSのリピドA部分を毒性にするのに関与する遺伝子を下方調節する方法

ブレブワクチンの毒性は、ワクチンにおけるブレブの使用の最大の問題の1つである。本発明のさらなる態様は、ブレブ中に存在するLPSを遺伝学的に無毒化する方法に関する。リピドAは細胞活性化の原因となるLPSの主要成分である。この経路に関わる遺伝子の突然変異の多くは本質的な表現型を生じる。しかし、致死的な改変ステップの原因となる遺伝子の突然変異は、温度感受性(htrB)もしくは許容性(msdB)表現型を生じる。これらの遺伝子の発現減少(もしくは無発現)をもたらす突然変異はリピドAの毒性活性を改変する。実際、非ラウロイル化(htrB突然変異体)[また、第2のアシル鎖をととも欠くLPSをもたらすことにより定義される]又は非ミリストイル化(msbB突然変異体)[また、一本の第2のアシル鎖のみを欠くLPSをもたらすことにより定義される]リピドAは、野生型リピドAより毒性が低い。リピドA 4'-キナーゼをコードする遺伝子(lpxK)の突然変異体もリピドAの毒性活性を減少させる。

20

【0071】

従って、方法c)は、1以上の上記のオープンリーディングフレーム又はプロモーターの一部(もしくは好ましくは全体)の欠失を伴う。あるいは、プロモーターを、より弱いプロモーターに置換してもよい。好ましくは、相同組換え技術を用いてこの方法を実施する。好ましくは、WO 01/09350(8/2/01にWIPOにより発行され、参照により本明細書に組み入れられる)に記載された方法を用いる。この目的にはさらに、B群ナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)、モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)、及びインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のhtrB及びmsbB遺伝子の配列が提供される。

30

【0072】

(d) LPSのリピドA部分の毒性を低下させるのに関与する遺伝子を上方調節する方法

ポリキシニンB耐性(その耐性はリピドAの4'リン酸へのアミノアラビノースの付加と関連付けられている)に関与する遺伝子/遺伝子座に突然変異を導入することによって、LPS毒性活性を改変することもできる。これらの遺伝子/遺伝子座は、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼをコードするpmrE、又はアミノアラビノースの合成と輸送に関与する可能性がある多くの腸内細菌に共通した抗菌ペプチド耐性遺伝子の領域であってもよい。この領域に存在する遺伝子pmrFはドリコールリン酸マノシルトランスフェラーゼをコードする(Gun J.S., Kheng, B.L., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I. 1998. *Mol. Microbiol.* 27:1171~1182)。

40

【0073】

リン酸リレー2成分調節系であるPhoP-PhoQ調節系の突然変異(例えば、PhoP構成表現型、PhoP^c)、又は低Mg⁺⁺環境もしくは培養条件(PhoP-PhoQ調節系を活性化する)は、4'-リン酸へのアミノアラビノースの付加及び2-ヒドロキシミリスチン酸によるミリスチン酸の置

50

換(ミリスチン酸のヒドロキシル化)をもたらす。この改変されたりピドAは、ヒト内皮細胞によるE-セレクトイン発現及びヒト単球からのTNF- α 分泌を刺激する能力の低下を示す。

【0074】

方法d)は、これらの遺伝子の、WO 01/09350(8/2/01にWIPOにより公開されたものであり、参照により本明細書に組み入れられる)に記載された戦略を用いる上方調節を伴う。

【0075】

(e) ヒト構造物と構造的に類似性を有し、かつヒトにおいて自己免疫応答を誘導することができる抗原の合成を下方調節する方法

莢膜で覆われたグラム陰性菌からの細菌外膜ブレブの単離は、しばしば、莢膜多糖の同時精製をもたらす。ある事例では、この「夾雑」物質は、他のブレブ成分によりもたらされる免疫応答を多糖が増強しうるのので有用でありうる。しかし、他の事例では、細菌ブレブ調製物中の夾雑多糖物質の存在はブレブのワクチンにおける使用に有害でありうる。例えば、少なくとも、ナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*)の場合には、血清型B莢膜多糖はヒトにおいて防御免疫を与えず、かつ有害な自己免疫応答を誘導しやすいことが示されている。従って、本発明の方法e)は、莢膜多糖を含まないブレブを産生する菌株の創出である。そして、そのブレブはヒトに使用するのに適している。特に好ましいそのようなブレブ調製物の例は、莢膜多糖を含有しないナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*)血清型B由来のものである。

【0076】

これは、WO 01/09350(8/2/01にWIPOにより公開されたものであり、参照により本明細書に組み入れられる)に記載されたように、莢膜生合成及び／又は輸送に必要な遺伝子が損なわれた改変ブレブ産生菌株を用いて達成できる。好ましい方法は、多糖生合成及び輸送に必要なナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)cps遺伝子のいくつか又は全ての欠失である。この目的で、置換プラスミドpMF121(Froshら、1990, *Mol. Microbiol.* 4:1215~1218に記載)を用いて、cpsCAD(+galE)遺伝子クラスターを欠失する突然変異を送達してもよい。あるいは、siaD遺伝子を欠失するか、又はその発現を下方調節してもよい(髄膜炎菌siaD遺伝子は、莢膜多糖とLOS合成に必要な酵素である α -2,3-シアリルトランスフェラーゼをコードする)。そのような突然変異はまた、細菌LPSの糖部上の宿主類似構造も除去する。

【0077】

方法a)-e)の組合せ

上記方法の1つ以上を用いて、本発明の改良されたブレブ調製物を作製するための改変株を製造することができることは理解されるであろう。ブレブワクチンを製造するためには、好ましくは、そのような方法の1つを用い、より好ましくは、前記方法の2つ以上(2、3、4又は5つ)を用いる。追加的方法の各々をブレブワクチンの製造に用いる場合、各改良は最適化された遺伝子操作ブレブ調製物を作製するために用いる他の方法と連携して働く。

【0078】

好ましい髄膜炎菌(特に、B群ナイセリア・メニンギチジス)のブレブ調製は、方法b)、c)及びe)の使用(必要に応じて、方法a)と組み合わせる)を含む。そのようなブレブ調製物は安全であり(宿主構造物に類似した構造物がない)、非毒性であり、かつ宿主の免疫応答が高いレベルの防御的(及び好ましくは保存された)抗原上に集中するように構成される。上記の要素は全て、最適化されたブレブワクチンを提供するために一緒になって働く。

【0079】

モラクセラ・カタラーリス(*M. catarrhalis*)、不定型インフルエンザ菌(*H. influenzae*)、及び非血清型B髄膜炎菌株(例えば、血清型A、C、Y又はW)と同様に、好ましいブレブ調製物は、必要に応じて方法a)と組合せた、方法b)及びc)の使用を含む。

【0080】

好ましいナイセリア菌ブレブ調製物

淋菌(*gonococcus*)及び髄膜炎菌(特にB群ナイセリア・メニンギチジス)を含むナイセリ

10

20

30

40

50

ア菌株に対して実施するときには、方法b)による上方調節のために次の1以上の遺伝子(防御抗原をコードする)が好ましい：NspA(WO 96/29412)、Hsf様(WO 99/31132)、Hap(PCT/EP99/02766)、PorA、PorB、OMP85(WO 00/23595)、PilQ(PCT/EP99/03603)、PldA(PCT/EP99/06718)、FrpB(WO 96/31618)、TbpA(US 5,912,336)、TbpB、FrpA/FrpC(WO 92/01460)、LbpA/LbpB(PCT/EP98/05117)、FhaB(WO 98/02547)、HasR(PCT/EP99/05989)、lipo02(PCT/EP99/08315)、Tbp2(WO 99/57280)、MltA(WO 99/57280)、及びctrA(PCT/EP00/00135)。これらはまた、他のグラム陰性菌中に異種として導入する遺伝子としても好ましい。

【0081】

方法a)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：PorA、PorB、PilC、TbpA、TbpB、LbpA、LbpB、Opa、及びOpc(最も好ましくはPorA)。

10

【0082】

方法c)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：htrB、msbB及びlpxK(最も好ましくは、LPS分子から一本の第2のアシル鎖のみを除いたmsbB)。

【0083】

方法d)による上方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：pmrA、pmrB、pmrE、及びpmrF。

【0084】

方法e)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：galE、siaA、siaB、siaC、siaD、ctrA、ctrB、ctrC、及びctrD(これらの遺伝子は8/2/01にWIPOにより公開されたものであり参照により本明細書に組み入れられるWO 01/09350に、記載されている)。

20

【0085】

好ましい緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)ブレブ調製物

方法b)による上方調節には1以上の次の遺伝子(防御抗原をコードする)が好ましい：PcrV、OprF、OprI。これらはまた、他のグラム陰性菌中に異種として導入する遺伝子としても好ましい。

【0086】

モラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)ブレブ調製物

方法b)による上方調節には1以上の次の遺伝子(防御抗原をコードする)が好ましい：OMP106(WO 97/41731およびWO 96/34960)、HasR(PCT/EP99/03824)、PilQ(PCT/EP99/03823)、OMP85(PCT/EP00/01468)、lipo06(GB 9917977.2)、lipo10(GB 9918208.1)、lipo11(GB 9918302.2)、lipo18(GB 9918038.2)、P6(PCT/EP99/03038)、ompCD、CopB(Helminn ME,ら(1993) Infect. Immun. 61:2003~2010)、D15(PCT/EP99/03822)、OmplA1(PCT/EP99/06781)、Hly3(PCT/EP99/03257)、LbpA及びLbpB(WO 98/55606)、TbpA及びTbpB(WO 97/13785及びWO 97/32980)、OmpE、UspA1及びUspA2(WO 93/03761)、FhaB(WO 99/58685)並びにOmp21。これらはまた、他のグラム陰性菌中に異種として導入する遺伝子としても好ましい。

30

【0087】

方法a)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：CopB、OMP106、OmpB1、TbpA、TbpB、LbpA、及びLbpB。

【0088】

方法c)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：htrB、msbB及びlpxK(最も好ましくは、msbB)。

40

【0089】

方法d)による上方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：pmrA、pmrB、pmrE、及びpmrF。

【0090】

好ましいインフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)ブレブ調製物

方法b)による上方調節には1以上の次の遺伝子(防御抗原をコードする)が好ましい：D15(WO 94/12641)、P6(EP 281673)、TbpA、TbpB、P2、P5(WO 94/26304)、OMP26(WO 97/01638)、HMW1、HMW2、HMW3、HMW4、Hia、Hsf、Hap、Hin47、Iomp1457(GB 0025493.8)、Yt

50

fN (GB 0025488.8)、VifG (GB 0026002.6)、Iomp1681 (GB 0025998.6)、OstA (GB 0025486.2)及びHif (ピリンを上方調節するためには、このオペロン中の全ての遺伝子を上方調節しなければならない)。これらはまた、他のグラム陰性菌中に異種として導入する遺伝子としても好ましい。

【0091】

方法a)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：P2、P5、Hif、IgA1-プロテアーゼ、HgpA、HgpB、HMW1、HMW2、Hxu、TbpA、及びTbpB。

【0092】

方法c)による下方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：htrB、msbB及びlpxK(最も好ましくは、msbB)。

10

【0093】

方法d)による上方調節には1以上の次の遺伝子が好ましい：pmrA、pmrB、pmrE、及びpmrF。

【0094】

本発明の膜小胞(ブレブ)の調製物

上述したいずれかの改変菌株からのブレブ調製物の製造は、細菌から天然に放出されたブレブを回収するか、又は当業者が精通する方法(例えば、EP 301992、US 5,597,572、EP 11243又はUS 4,271,147に開示された方法)のいずれかによって達成することができる。

【0095】

本発明の細菌から得られた膜小胞の調製物は、本発明のさらなる態様である。好ましくは、膜小胞の調製物は0.22 μ mの膜を通して濾過することができる。

20

【0096】

本発明の細菌由来の膜小胞を0.22 μ mの膜に通過させることによって得られる膜小胞の滅菌(好ましくは、均質な)調製物も想定される。

【0097】

ワクチン製剤

本発明の細菌又は本発明のブレブ調製物を、製薬上許容し得る希釈剤又は担体と共に含むワクチンは、本発明のさらなる態様である。そのようなワクチンは、ヒト身体又は動物体の治療方法において有利に用いることができる。

【0098】

ワクチン調製物は、「ワクチン設計 (Vaccine Design)」(「サブユニットとアジュバント手法 (The subunit and adjuvant approach)」(Powell M. F. & Newman M. J.編)(1995) Plenum Press New York)に一般的に記載されている。

30

【0099】

本発明のワクチン調製物を、アジュバント化することができる。適当なアジュバントとしては、水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)又はリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩が挙げられるが、カルシウム(特に炭酸カルシウム)、鉄もしくは亜鉛の塩であってもよく、又はアシル化チロシンの不溶性懸濁物、又はアシル化糖類、陽イオンもしくは陰イオンとして誘導体化した多糖類、又はポリホスファゼン類であってもよい。

【0100】

使用しうる好適なTh1アジュバント系としては、モノホスホリルリピドA、特に3-デ-0-アシル化モノホスホリルリピドA、及びモノホスホリルリピドA、好ましくは3-デ-0-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)と、アルミニウム塩との組合せが挙げられる。増強した系では、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導体との組合せ、特にW0 94/00153に開示されたQS21と3D-MPL、又はW096/33739に開示されたQS21をコレステロールによってクエンチングしたより低い反応原性組成物を含む。QS21 3D-MPL及びトコフェロールを水中油型エマルジョンとして含む特に強力なアジュバント製剤は、W095/17210に記載されており、これは好ましい製剤である。

40

【0101】

ワクチンはサポニン、より好ましくはQS21を含有してもよい。ワクチンはまた、水中油

50

型エマルジョン及びトコフェロールを含有してもよい。非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチド（WO 96/02555）も、TH1応答の選択的誘導物質であり、本発明における使用に適している。

【0102】

本発明のワクチン調製物を用いて、全身又は粘膜経路によって前記ワクチンを投与することによって、感染に感受性のある哺乳動物を保護又は治療することができる。これらの投与としては、筋内、腹腔内、皮内もしくは皮下経路による注射；又は経口／消化管、呼吸器、尿生殖路への粘膜投与によるものが挙げられる。従って、本発明の一態様は、個体に対して有効量（起源となる細菌に対して個体を免疫防御することができる量）の本発明の細菌又は本発明のプレブ調製物を投与することを含む、細菌感染に対して個体を保護する方法である。

10

【0103】

それぞれのワクチン用量中の抗原量は、典型的なワクチン被接種者に免疫防御応答を誘導し、かつ重大な有害副作用を伴わない量として選択される。そのような量は、特定の免疫原を用い、それをどのように提供するかに応じて変わるであろう。一般的には、各用量は1~100 µg、好ましくは5~50 µg、最も典型的には5~25 µgの範囲のタンパク質抗原を含むことが期待される。

【0104】

特定のワクチンのための最適量は、被験体における適当な免疫応答の観察を含む標準的な試験により確認することができる。初回のワクチン接種後、被験体に十分な間隔を空けて1回又は数回の追加免疫を受けさせてもよい。

20

【0105】

本発明の膜小胞の調製物を含むワクチン組成物の調製方法はまた、(a) 本発明の細菌の増殖に好適な栄養培地を含む培養器に接種すること；(b) 該細菌を培養すること；(c) 培地から膜小胞を回収すること；及び(d) 該膜小胞と製薬上許容し得る希釈剤又は担体とを混合すること、を含む方法をも含む。前記小胞は界面活性剤（例えば、デオキシコレート）抽出により回収することができるが、そのような工程（及びそれとともに行うクロマトグラフィー及び超遠心工程）を経ることなく回収するのが好ましい。

【0106】

好ましくは、工程(c)又は工程(d)の後、調製物を滅菌濾過する（0.22 µmの膜を通過させる）。

30

【0107】

ハイパープレビングな細菌又は本発明の製造方法であって、以下の方法：(a) 1個以上のTol遺伝子の発現を下方調節するようにグラム陰性細菌株を遺伝子操作すること；及び(b) タンパク質のペプチドグリカン結合活性を弱めるためにペプチドグリカン結合部位を含むタンパク質をコードする1個以上の遺伝子を突然変異させること、のいずれか又は双方により、該グラム陰性細菌株を遺伝的に改変することを含む前記方法も、提供される。

【0108】

本発明のヌクレオチド配列

本発明のさらなる態様は、本発明の方法（下方調節／突然変異）に用いることができるヌクレオチド配列（添付の配列表を参照）の提供に関する。

40

【0109】

本発明の他の態様は、高度にストリンジェントな条件下で、本発明のヌクレオチド配列（例えば、配列番号1、3、5、6、7、9、10、11、13、15、17、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、もしくは44）又はそれらの相補鎖の少なくとも30ヌクレオチド部分とハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド配列である。好ましくは、単離された配列は、もしそれが適当なベクターの一部であれば、染色体配列との相同組換えを実施するのに十分な長さであり、すなわち少なくとも30ヌクレオチド（好ましくは少なくとも40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、又は500ヌクレオチド）であるはずである。さらに好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは、提供される実際の配列又は

50

それらの相補鎖の少なくとも30ヌクレオチド(好ましくは、少なくとも40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、又は500ヌクレオチド)を含むはずである。

【0110】

本明細書にて用いられる高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、例えば、次が挙げられる：6×SSC、5×Denhardt、0.5% SDS、及び100 µg/mL断片化変性サケ精子DNAにて、一夜65℃にてハイブリダイズさせ、2×SSC、0.1% SDSで室温にてほぼ10分間かけて1回洗浄し、次いで65℃にてほぼ15分間かけて1回洗浄し、次いで0.2×SSC、0.1% SDSで室温にて少なくとも3～5分間少なくとも1回洗浄する。

【0111】

さらなる態様は、上記のようにグラム陰性細菌染色体遺伝子を下方調節又は突然変異させる目的で該遺伝子内において遺伝子操作事象(トランスポゾン挿入、又は部位特異的突然変異もしくは欠失などがあるが、好ましくは相同組換え事象)を実施する上での、本発明の単離されたポリヌクレオチド配列の使用である。好ましくは、組換え事象を起こす菌株は、本発明の配列を取得した菌株と同じ菌株である。しかし、A、B、C、Y及びW群髄膜炎菌並びに淋菌ゲノムは十分に類似しているので、これらのいずれの菌株由来の配列も、他の菌株においてそのような事象を実施するベクターを設計する上で適している。これはまた、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)と不定型インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)についても同様である。

【0112】

引用された文献は参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【実施例】

【0113】

以下の実施例は、別に詳細に説明する箇所を除いて、当業者に周知であり、日常的である標準的な技術を用いて行う。この実施例は例示的なものであって、本発明を限定するものではない。

【0114】

実施例1

機能的RmpM遺伝子を欠損するナイセリア・メニンギチジス株の構築

この実験の目的は、末端切断されたRmpタンパク質を発現するナイセリア・メニンギチジス血清型B株を構築することであった。ナイセリア・メニンギチジスのRmpは、大腸菌のOmpA及び緑膿菌(*P. aeruginosa*)のOprFと相同である。このタンパク質は外膜にアンカーされたN末端ドメイン、及びペプチドグリカン結合部位を含むC末端ドメインを含む。RmpのC末端ドメインを、ナイセリア・メニンギチジス血清型B cps-株における相同組換えにより欠失させた。該タンパク質の発現されたN末端部分は、依然として外膜の安定性に貢献するが、ペプチドグリカン結合部位の不在が細菌を取り巻く膜を弛緩させる。この改変されたナイセリア菌から得た外膜小胞を分析した：産生量、サイズ、均質性。rmp遺伝子に対応するDNA領域(729 bp)を、ナイセリア・メニンギチジス血清型A株Z2491のゲノムDNA配列を含むSangerデータベース中で発見した(配列番号9)。類似の配列がナイセリア・メニンギチジス血清型B株MC58中に存在する(配列番号7)。これは、men A配列と99.3%の同一性を示す。該遺伝子の完全配列をカバーするDNA断片を、HindIII及びEcoRI制限部位(下線部)を含むオリゴヌクレオチドRMP-H-5(5'-GCC CAC AAG CTT ATG ACC AAA CAG CTG AAA TT-3') & RMP-E-3(5'-CCG GAA TTC TTA GTG TTG GTG ATG ATT GT-3')を用いて、ナイセリア・メニンギチジス血清型BのゲノムDNAからPCR増幅した。このPCR断片をHigh Pure Kit (Roche, Mannheim, Germany)を用いて洗浄し、pGemTベクター(Promega, USA)中に直接クローニングした。内部のフェニルアラニン残基の後に33 bpの欠失及び停止コドンを導入するために、このプラスミドをサークルPCR突然変異誘発(Jones & Winistofer (1992), Biotechniques 12: 528-534)にかけた。サークルPCRは、BamHI制限部位(下線部)を含むオリゴヌクレオチドRMP-CIRC-3-B (5'-GGC GGA TCC TTA GAA CAG GGT TTT GGC AG-3') & RMP CIRC-5-B (5'-CGG GGA TCC CAA GAC AAC CTG AAA GTA TT-3')を用いて行った。取込み配列及びBamHI制限部位(下線部)を含むオリゴヌクレオチドCM/BAM/5/2 (5'-CGC GGA TC

10

20

30

40

50

C GCC GTC TGA AAC CTG TGA CGG AAG ATC AC-3') & CM/BAM/3/2 (5'-CGC GGA TCC TTC AG A CGG CCC AGG CGT TTA AGG GCA C-3')を用いて、cmR遺伝子をpGPS2プラスミドから増幅した。この断片を、BamHIで制限処理したサークルPCRプラスミド中に挿入した。この組換えプラスミドを用いてナイセリア・メニンギチジス血清型B cps-株を形質転換した。二重交叉事象から得られた組換えナイセリア・メニンギチジスを、プライマーRMP SCR 5 (5'-CAT GAT AGA CTA TCA GGA AAC-3')及びRMP SCR 3 (5'-CAG TAC CTG GTACAA AAT CC-3')を用いてPCRスクリーニングにより選択した。これらのプライマーは、対照株(rmpについてのWT)から970 bpの断片及び組換えナイセリア菌から1800 bpの断片を増幅する。図4は、臭化エチジウムの存在下で1%アガロースゲル上で分析された10個の組換えコロニーから得られたPCR増幅物を示す。組換え体を、5 µg/mlクロラムフェニコールを含むGC培地上で増殖させ、Rmp発現及びOMV産生について分析した。

10

【0115】

rmpM突然変異体から産生されたmenB OMVの特性評価

OMVの産生量、サイズ及び多分散性に対するrmpM突然変異の効果、親であるH44/76 Cp s-(莢膜多糖なし)から抽出された(デオキシコレートを用いて)OMVと、RmpM突然変異誘導体から抽出された対応するOMVとを比較することにより分析した。結果は以下の通りである：

400 mlフラスコ培養で増殖させた異なるナイセリア・メニンギチジスH44/76誘導株を用いて観察されたOMV産生量

20

株 Nm B1390 cps(-) porA(+) PilQ atg : 2.7 mg

株 Nm B1391 cps(-) porA(-) PilQ atg : 9.1 mg

株 B1405 cps(-) porA(-) RmpM (-) : 20 mg

【0116】

以下に示すように、rmpMの欠失は、そのような株から調製したOMVの産生量を有意に増加させる(少なくとも因子2)。野生型及びrmpM突然変異体ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)H44/46誘導株から単離されたOMVのサイズを、供給業者(Malvern Instruments GmbH, Herrenberg Germany: www.malvern.co.uk)により推奨されるようにMalvern Zetasizer 4000分析装置を用いて光子相関分光測定(PCS)により評価した。結果を以下にまとめる：

30

サンプル	Z 平均直径 (nm)	多分散性
CPS (-) 07/2000 7.8mg/ml	136	0.31
CPS (-) 09/2000 5.7mg/ml	166	0.42
CPS (-) rmpM (-) B1405 6.7mg/ml	202	0.53

40

【0117】

これらのデータは、CPS(-) 07/2000のサイズがCPS(-) 09/2000のサイズより小さく、またCPS(-)サンプルのサイズがCPS(-) rmpM(-)ブレブのサイズより小さいことを支持している。要するに、これらのデータは、RmpMのペプチドグリカン結合ドメインをコードするドメインの欠失がブレブ産生の増強並びにOMVの形態及びサイズ分布の変化をもたらすことを支持している。これらの特徴を、WO 01/09350 (8/2/01にWIPOにより公開されたものであり、参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載のようにワクチンの製造に有利に用いることができた。

50

【0118】

実施例2. モラクセラ・カタラーリスにおけるtolQR遺伝子の欠失

この実験の目的は、ハイパーブレヴィングなモラクセラ菌株を取得するためにモラクセラ・カタラーリスからtolQR遺伝子を欠失させることであった。

【0119】

その目的のために、大腸菌クローニング技術を用いて変異誘発プラスミドを構築した。主な工程を図5に示す。簡単に述べると、QIAGENゲノムDNA抽出キット(Qiagen GmbH)を用いてモラクセラ・カタラーリスATCC 43617株からゲノムDNAを抽出した。この材料を用いて、tolQ遺伝子の開始コドン(ATG)の501ヌクレオチド上流からtolR停止コドン(TAA)の500ヌクレオチド下流までをカバーする2151ヌクレオチドのDNA断片を、プライマーA(5'-GCTC TAGAGCTTCAGCAGTCACGGGCAAATCATGATTA - 3')及びB(5'- CGGAGCTCTGCTCAAGGTCTGAGACATGAT TAGAATAT - 3')を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。このPCR産物を、製造業者の指示に従ってpGEM-Tクローニングベクター(Promega)中に導入した。次いで、得られたプラスミドをサークルPCR突然変異誘発(Jones及びWinistofer, (1992), Biotechniques 12: 528-534)にかけて、tolQR遺伝子(2つのプライマー間に含まれる領域を含まない完全なベクターの増幅物からなる)を欠失させた。tolQの開始コドン(ATG)の31ヌクレオチド下流及びtolRの停止コドン(TAA)の48 bp上流に、それぞれハイブリダイズするプライマーC(5'-CGGGATCCCAGCGAGATTAGGCTAATGGATTTCGTTCA - 3')及びD(5'- CGGGATCCAATGTTGGTATC ACCCAAGTGAGTTTGCTT - 3')を用いて、サークルPCRを行った(図5を参照)。両プライマーはBamHI制限部位(下線部)を含む。次いで、得られたPCR断片をPCR Clean Up Kit (Boehringer)を用いて精製し、BamHIで消化し、連結したところ、BamHI制限部位により分離された532ヌクレオチドの5'フランキング配列及び548ヌクレオチドの3'フランキング配列を担持するプラスミドが得られた。次いで、カナマイシン耐性カセットをBamHI部位に導入して、宿主細菌中で組換え体を選択できるようにした。2つの異なるカセットをサブクローニングして2つの異なるプラスミドを得たが、すなわち、その一方はプラスミドpUC4K (Amersham Pharmacia Biotech)からサブクローニングされたTn903に由来するカナマイシン耐性遺伝子(KanR)であり、他方はTn5及びsacB遺伝子(Blomfieldら、(1991), Molecular Microbiology, 5: 1447-1457)に由来するカナマイシン耐性遺伝子を担持するpIB279を起源とするsacB-neoカセットであった。sacBはスクロースの存在下で細菌にとって有害な対抗選択マーカーであり、該カセットをさらに排除することを可能にする。両カセットを、利用可能なBamHI制限部位を用いてサブクローニングした。得られたクローンの配列を、Big Dye Cycle Sequencingキット(Perkin Elmer)及びABI 373A/PRISM DNA配列決定装置を用いて確認した。あるいは、pKNG101自殺ベクターを用いて、ベクターのマルチクローニング部位中にフランキング領域をサブクローニングした後、突然変異を導入することができる(Kanigaら、(1991), Gene 109: 137-141)。

【0120】

Tn903由来のカナマイシン耐性マーカーを担持するプラスミドを用いて、ノルウェーのオスロ市でヒト鼻咽頭から単離されたモラクセラ・カタラーリス株14を形質転換した。この形質転換技術は、該株の天然のDNA取込み能力に基づくものである。約10個の細菌コロニーを25 µgのDNA(20 µlのPBS中)と混合し、36°Cにて3時間インキュベートした。次いで、組換えモラクセラ・カタラーリスのクローンを20 µg/mlカナマイシンを含むMuller-Hintonプレート上で選択し、二重組換え事象から得られる突然変異体をプライマーE(5'- ATC GGCCTGGCTGTGTGTGGC - 3')、F (5'- ACCGAATTGGATTGAGGTCAC - 3')、G (5'- GCGATTACGGC CTGGTATGAG - 3')及びH (5'- TTGTGCAATGTAACATCAGAG - 3')を用いてPCRによりスクリーニングした。サーマル増幅の後、約10 µlアリコートの反応物をアガロースゲル電気泳動(Tris-ホウ酸-EDTA (TBE)バッファー中、1%アガロース)により分析した。ゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色の後、UV照射によりDNA断片を可視化した。DNA分子サイズ標準(Smartladder, Eurogentec)を試験サンプルと平行に電気泳動し、これを用いてPCR産物のサイズを評価した。図6に示すように、いくつかの形質転換体が期待されたサイズのPCR産物を産生し、tolQRモラクセラ・カタラーリス突然変異株であると同定された。配列決定によ

り、カセットの正確な組込みを確認した。これらのクローンを外膜小胞産生について試験することができる。

【0121】

実施例3. モラクセラ・カタラーリス由来ompCDの突然変異

この実験の目的は、ハイパーブレピングなモラクセラ菌株を取得するために、ペプチドグリカン結合3'コード領域を含まない末端切断遺伝子中でモラクセラ・カタラーリス由来ompCD遺伝子を突然変異させることであった。この実験では、該タンパク質の膜貫通ドメインの末端にあるフェニルアラニンの後ろに停止コドンを導入した。

【0122】

その目的のために、大腸菌クローニング技術を用いて変異誘発プラスミドを構築した。主な工程を図7に示す。簡単に述べると、QIAGENゲノムDNA抽出キット(Qiagen GmbH)を用いてモラクセラ・カタラーリスATCC 43617株からゲノムDNAを抽出した。この材料を用いて、重要なフェニルアラニン残基の500ヌクレオチド上流及び下流をカバーする1000ヌクレオチドのDNA断片を、プライマー1(5'- CCTCTAGACGCTTATTATAACATAAATCAGTCTAACTG - 3')及び2 (5'- AAGGTACCAGCAGAAGTAGCCAATGGGCAAAACATTGC - 3')を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。このPCR産物を、製造業者の指示に従ってpGEM-Tクローニングベクター(Promega)中に導入した。次いで、得られたプラスミドをサークルPCR突然変異誘発(Jones及びWinistofer, (1992), Biotechniques 12: 528-534)にかけて、停止コドン及びBamHI制限部位を導入した。フェニルアラニンをコードするTTCコドンの62ヌクレオチド上流及び39ヌクレオチド下流にハイブリダイズするプライマー3:

(5' - CCGGATCCTTAACGGTATTGTGGTTTGATGATTGATTT - 3')

及び4(5' - AAGGATCCGCGCAAATGCGTGAATTCCCAAATGCAACT - 3')を用いて、サークルPCRを行った(図7)。両プライマーはBamHI制限部位(下線部)を含み、プライマー3は停止コドン(太字)をも含む。次いで、得られたPCR断片をPCR Clean Up Kit (Boehringer)を用いて精製し、BamHIにより消化し、連結したところ、BamHI部位により分離された438ヌクレオチドの5'フランキング配列及び540ヌクレオチドの3'フランキング配列を担持するプラスミドが得られた。その後、カナマイシン耐性カセットをBamHIに導入して、宿主細菌中で組換え体を選択できるようにした。2つの異なるカセットをサブクローニングして2つの異なるプラスミドを得たが、すなわち、その一方はプラスミドpUC4K (Amersham Pharmacia Biotech)からサブクローニングされたTn903由来のカナマイシン耐性遺伝子(KanR)であり、他方はTn5及びsacB遺伝子(Blomfieldら、(1991), Molecular Microbiology, 5: 1447-1457)由来カナマイシン耐性遺伝子を担持するpIB179を起源とするSacB-neoカセットであった。sacBはスクロースの存在下で細菌にとって有害な対抗選択マーカーであり、該カセットをさらに排除することを可能にする。両カセットを利用可能なBamHI制限部位を用いてサブクローニングした。得られたクローンの配列を、Big Dye Sequencingキット(Perkin Elmer)及びABI 373A/PRISM DNA配列決定装置を用いて確認した。あるいは、pKNG101自殺ベクターを用いて、ベクターのマルチクローニング部位中にフランキング領域をサブクローニングした後、突然変異を導入することができる(Kanigaら、(1991), Gene 109: 137-141)。

【0123】

Tn903由来カナマイシン耐性マーカーを担持するプラスミドを用いて、モラクセラ・カタラーリスを形質転換することができる。組換えモラクセラ・カタラーリスクローンを、20 µg/mlのカナマイシンを含むMuller-Hintonプレート上で選択することができ、二重組換え事象から得られる突然変異体をPCRによりスクリーニングすることができる。次いで、これらのクローンを、外膜小胞産生について試験することができる。

【0124】

実施例4. 不定型インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)におけるtolQR遺伝子の欠失

この実験の目的は、ハイパーブレピング株を取得するために、不定型インフルエンザ菌

10

20

30

40

50

(*Haemophilus influenzae*) (NTHI) から *tolQR* 遺伝子を欠失させることであった。

【0125】

その目的のために、大腸菌クローニング技術を用いて変異誘発プラスミドを構築した。主要な工程を図5に示す。簡単に述べると、QIAGENゲノムDNA抽出キット(Qiagen GmbH)を用いて、不定型インフルエンザ菌3224A株からゲノムDNAを抽出した。この材料を用いて、プライマーZR1-EcoRI (5'- CCGGAATTCAAAGTGC GG TAGATTTAGTCGTAGTAATTGATTTACTTATG - 3') 及びZR2-XbaI (5'- CTAGTCTAGAACGTTGCTGTTCTTGCTG - 3')を用いて *tolQ* 遺伝子コドンの206ヌクレオチド上流から *tolR* 停止コドンの364ヌクレオチド下流までをカバーする1746ヌクレオチドのDNA断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。このPCR産物を、製造業者の指示に従ってpGEM-Tクローニングベクター(Promega)中に導入した。次いで、得られたプラスミドをサークルPCR突然変異誘発(Jones及びWinistofer, (1992), *Biotechniques* 12: 528-534)にかけて、*tolQR* 遺伝子(2つのプライマー間に含まれる領域を含まない完全なベクターの増幅物からなる)を欠失させた。*tolQ* の開始コドンの312ヌクレオチド下流及び *tolR* の停止コドンの144 bp上流に、それぞれハイブリダイズするプライマーZR1-BamHI (5'- CGCGGATCCCGCTTCAGGTGCATCTGG - 3') 及びZR2-BamHI (5'- CGCGGATCCAGACAGGAATTGATAAGG - 3')を用いて、サークルPCRを行った(図5)。両プライマーはBamHI制限部位(下線部)を含む。次いで、得られたPCR断片をPCR Clean Up Kit (Boehringer)を用いて精製し、BamHIにより消化し、連結したところ、BamHI部位により分離された517ヌクレオチドの5'フランキング配列及び507ヌクレオチドの3'フランキング領域を担持するプラスミドが得られた。その後、カナマイシン耐性カセットをBamHIに導入して、宿主細菌中で組換え体を選択できるようにした。2つの異なるカセットをサブクローニングして2つの異なるプラスミドを得たが、すなわち、その一方はプラスミドpUC4K (Amersham Pharmacia Biotech)からサブクローニングされたTn903由来のカナマイシン耐性遺伝子(KanR)であり、他方はTn5及び *sacB* 遺伝子(Blomfieldら、(1991), *Molecular Microbiology*, 5: 1447-1457)由来カナマイシン耐性遺伝子を担持するpIB279を起源とする *sacB*-neoカセットであった。*sacB* はスクロースの存在下で細菌にとって有害な対抗選択マーカーであり、該カセットをさらに排除することを可能にする。両カセットを利用可能なBamHI制限部位を用いてサブクローニングした。得られたクローンの配列を、Big Dye Sequencingキット(Perkin Elmer)及びABI 373A/PRISM DNA配列決定装置を用いて確認した。あるいは、pKNG101自殺ベクターを用いて、ベクターのマルチクローニング部位中にフランキング領域をサブクローニングした後、突然変異を導入することができる(Kanigaら、(1991), *Gene* 109: 137-141)。

【0126】

Tn903由来カナマイシン耐性マーカーを担持するプラスミドを用いて、不定型インフルエンザ菌3224A株を形質転換した。形質転換は、*Methods in Enzymology, Bacterial genetic systems*, (編) J. H. Miller, Academic Press Inc., vol. 204, p. 334に従う塩化カルシウム処理によって得られたコンピテントNTHI細胞を用いて実現させた。組換え不定型インフルエンザ菌のクローンを、15 µg/mlのカナマイシンを含むGCプレート上で選択し、二重組換え事象から得られる突然変異体をプライマーNTHI-Fo-ZR1 (5'- CCTTACTAGAGGAACAACAAC - 3')、NTHI-RE-ZR2 (5'- GCCTCTCAGCTTGCTTCTG - 3')、ZR1-EcoRI (5'- CCGGAATTCAAAGTGC GG TAGATTTAGTCGTAGTAATTGATTTACTTATG - 3') 及びZR2-XbaI (5'- CTAGTCTAGAACGTTGCTGTTCTTGCTG - 3')を用いてPCRによりスクリーニングした。サーマル増幅の後、約10 µlアリコートの反応物を、アガロースゲル電気泳動(Tris-ホウ酸-EDTA (TBE) バッファー中、1%アガロース)により分析した。ゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色の後、UV照射によりDNA断片を可視化した。DNA分子サイズ標準(Smartladder, Eurogentec)を試験サンプルと平行に電気泳動し、これを用いてPCR産物のサイズを評価した。いくつかの形質転換体が期待されたサイズのPCR産物を産生し、これを抗生物質耐性カセットを担持する不定型インフルエンザ菌突然変異株であると同定した。

【0127】

実施例5. 不定型インフルエンザ菌における *tolRA* 遺伝子の欠失

10

20

30

40

50

この実験の目的は、ハイパーブレヴィング株を取得するために不定型インフルエンザ菌(NTHI)からtolRA遺伝子を欠失させることであった。

【0128】

その目的のために、大腸菌クローニング技術を用いて変異誘発プラスミドを構築した。主要な工程を図5に示す。簡単に述べると、QIAGENゲノムDNA抽出キット(Qiagen GmbH)を用いて、不定型インフルエンザ菌3224A株からゲノムDNAを抽出した。この材料を用いて、プライマーZR5-EcoRI (5'-CCGGAATTCAAAGTGC GG TAGATTTAGTCGTAATTCGCTGAGGCC - 3')及びZR6-XbaI (5'-CTAGTCTAGATTATCGAATATCAAAGTCAATAATG - 3')を用いてtolR遺伝子コドンの244ヌクレオチド上流からtolA停止コドンまでをカバーする1797ヌクレオチドのDNA断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。このPCR産物を、製造業者の指示に従ってpGEM-Tクローニングベクター(Promega)中に導入した。次いで、得られたプラスミドをサークルPCR突然変異誘発(Jones及びWinistofer, (1992), Biotechniques 12: 528-534)にかけて、tolRA遺伝子(2つのプライマー間に含まれる領域を含まない完全なベクターの増幅物からなる)を欠失させた。tolRの開始コドンの257ヌクレオチド下流及びtolAの停止コドンの500ヌクレオチド上流にそれぞれハイブリダイズするプライマーZR5-BamHI (5'-CGCGGATCCTTCTCTGTTTAAACCTTCTTG - 3')及びZR6-BamHI (5'-CGCGGATCCAAGCAAAGGCTGAAGCGG - 3')を用いて、サークルPCRを行った(図5を参照)。両プライマーはBamHI制限部位(下線部)を含む。次いで、得られたPCR断片をPCR Clean Up Kit (Boehringer)を用いて精製し、BamHIにより消化し、連結したところ、BamHI部位により分離された502ヌクレオチドの5'フランキング配列及び500ヌクレオチドの3'フランキング配列を担持するプラスミドが得られた。その後、カナマイシン耐性カセットをBamHIに導入して、宿主細菌中で組換え体を選択できるようにした。2つの異なるカセットをサブクローニングして2つの異なるプラスミドを得たが、すなわち、その一方はプラスミドpUC4K (Amersham Pharmacia Biotech)からサブクローニングされたTn903由来のカナマイシン耐性遺伝子(KanR)であり、他方はTn5及びsacB遺伝子(Blomfieldら、(1991), Molecular Microbiology, 5: 1447-1457)由来カナマイシン耐性遺伝子を担持するpIB279を起源とするsacB-neoカセットであった。sacBはスクロースの存在下で細菌にとって有害な対抗選択マーカーであり、該カセットをさらに排除することを可能にする。両カセットを利用可能なBamHI制限部位を用いてサブクローニングした。得られたクローンの配列を、Big Dye Sequencingキット(Perkin Elmer)及びABI 373A/PRISM DNA配列決定装置を用いて確認した。あるいは、pKNG101自殺ベクターを用いて、ベクターのマルチクローニング部位中にフランキング領域をサブクローニングした後、突然変異を導入することができる(Kanigaら、(1991), Gene 109: 137-141)。

【0129】

Tn903由来カナマイシン耐性マーカーを担持するプラスミドを用いて、不定型インフルエンザ菌3224A株を形質転換した。形質転換は、Methods in Enzymology, Bacterial genetic systems, (編) J. H. Miller, Academic Press Inc., vol. 204, p. 334に従う塩化カルシウム処理によって得られたコンピテントNTHI細胞を用いて実現させた。組換え不定型インフルエンザ菌のクローンを、15 µg/mlのカナマイシンを含むGCプレート上で選択し、二重組換え事象から得られる突然変異体をプライマーNTHI-F0-ZR5 (5'-CGCTGAGGCCTTGATTGC - 3')、NTHI-RE-ZR6 (5'-GTACAATCGCGAATACGCTCAC - 3')、ZR5-EcoRI (5'-CCGGAA TTCAAAGTGC GG TAGATTTAGTCGTAATTCGCTGAGGCC - 3')及びZR6-XbaI (5'-CTAGTCTAGATTATCGAATATCAAAGTCAATAATG - 3')を用いてPCRによりスクリーニングした。サーマル増幅の後、約10 µlアリコートの反応物を、アガロースゲル電気泳動(Tris-ホウ酸-EDTA (TBE) バッファー中、1%アガロース)により分析した。ゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色の後、UV照射によりDNA断片を可視化した。DNA分子サイズ標準(Smartladder, Eurogentec)を試験サンプルと平行に電気泳動し、これを用いてPCR産物のサイズを評価した。いくつかの形質転換体が期待されたサイズのPCR産物を産生し、これを抗生物質耐性カセットを担持する不定型インフルエンザ菌突然変異株であると同定した。

【0130】

実施例6. 不定型インフルエンザ菌におけるP5遺伝子の突然変異

10

20

30

40

50

この実験の目的は、ハイパーブレビングなNTHI株を取得するために、ペプチドグリカン結合3'コード領域を含まない末端切断遺伝子に、インフルエンザ菌(NTHI)由来P5遺伝子を突然変異させることであった。この実験では、該タンパク質の膜貫通ドメインの末端にあるフェニルアラニンの後ろに停止コドンを導入した。

【0131】

その目的のために、大腸菌クローニング技術を用いて突然変異プラスミドを構築した。主要な工程を図7に示す。簡単に述べると、QIAGENゲノムDNA抽出キット(Qiagen GmbH)を用いて、不定型インフルエンザ菌3224A株からゲノムDNAを抽出した。この材料を用いて、プライマーP5-01 bis (5'- GATGAATTCAAAGTGC GG TAGATTTAGTCGTAGTAATTAATAACTTA - 3')及びP5-02 (5'- CTAGTCTAGAAGGTTTCCATAATGTTTCCTA - 3')を用いて重要なフェニルアラニン残基をコードするTTTコドンの上流及び下流の1047ヌクレオチドのDNA断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。このPCR産物を、製造業者の指示に従ってpGEM-Tクローニングベクター(Promega)中に導入した。次いで、得られたプラスミドをサークルPCR突然変異誘発(Jones及びWinistofer, (1992), Biotechniques 12: 528-534)にかけて、停止コドン及びBamHI制限部位を導入した。フェニルアラニンをコードするTTTコドンに正確にハイブリダイズするプライマーP5-03:

(5' - CGCGGATCCCTAAAAAGTTACATCAGAATTTAAGC - 3')

及びP5-04 (5' - CGCGGATCCGCATTTGGTAAAGCAAACCTT - 3')を用いてサークルPCRを行った。両プライマーはBamHI制限部位(下線部)を含み、プライマー3は停止コドン(太字)をも含む。次いで、得られたPCR断片をPCR Clean Up Kit (Boehringer)を用いて精製し、BamHIにより消化し、連結したところ、BamHI部位により分離された518ヌクレオチドの5'フランキンゲン配列及び538ヌクレオチドの3'フランキンゲン配列を担持するプラスミドが得られた。その後、カナマイシン耐性カセットをBamHIに導入して、宿主細菌中で組換え体を選択できるようにした。2つの異なるカセットをサブクローニングして2つの異なるプラスミドを得たが、すなわち、その一方はプラスミドpUC4K (Amersham Pharmacia Biotech)からサブクローニングされたTn903由来のカナマイシン耐性遺伝子(KanR)であり、他方はTn5及びsacB遺伝子(Blomfieldら、(1991), Molecular Microbiology, 5: 1447-1457)由来カナマイシン耐性遺伝子を担持するpIB279を起源とするsacB-neoカセットであった。sacBはスクロースの存在下で細菌にとって有害な対抗選択マーカーであり、該カセットをさらに排除することを可能にする。両カセットを利用可能なBamHI制限部位を用いてサブクローニングした。得られたクローンの配列を、Big Dye Sequencingキット(Perkin Elmer)及びABI 373A/PRISM DNA配列決定装置を用いて確認した。あるいは、pKNG101自殺ベクターを用いて、ベクターのマルチクローニング部位中にフランキンゲン領域をサブクローニングした後、突然変異を導入することができる(Kanigaら、(1991), Gene 109: 137-141)。

【0132】

Tn903由来カナマイシン耐性マーカーを担持するプラスミドを用いて、不定型インフルエンザ菌3224A株を形質転換した。形質転換は、Methods in Enzymology, Bacterial genetic systems, (編) J. H. Miller, Academic Press Inc., vol. 204, p. 334に従う塩化カルシウム処理によって得られたコンピテントNTHI細胞を用いて実現させた。組換え不定型インフルエンザ菌のクローンを、15 µg/mlのカナマイシンを含むGCプレート上で選択し、二重組換え事象から得られる突然変異体をプライマーP5-01 bis (5'- GATGAATTCAAAGTGC GG TAGATTTAGTCGTAGTAATTAATAACTTA - 3')及びP5-02 (5'- CTAGTCTAGAAGGTTTCCATAATGTTTCCTA - 3')を用いてPCRによりスクリーニングした。サーマル増幅の後、約10 µlアリコートの反応物を、アガロースゲル電気泳動(Tris-ホウ酸-EDTA (TBE)バッファー中、1%アガロース)により分析した。ゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色の後、UV照射によりDNA断片を可視化した。DNA分子サイズ標準(Smartladder, Eurogentec)を試験サンプルと平行に電気泳動し、これを用いてPCR産物のサイズを評価した。いくつかの形質転換体が期待されたサイズのPCR産物を産生し、これを抗生物質耐性カセットを担持する不定型インフル

エンザ菌突然変異株であると同定した。
【0133】

配列番号 1

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来exbBのコード領域の
ヌクレオチド配列

ナイセリア・メニンギチジスB株のExbBのアクセッション番号及び配列 (DNA&タンパク質)

```
>NMB1729
ATGAATTTGAAATTAGTGTTTGAATCGGGCGGATCCCGTCCTGATGGTGTGTTGTGTTG
ATGCTGTTGATGAGTATCGTAACGTGGTGTGTTGGTTGTCTTGCCTGCATCAAGCTGTAT
CGGGCGCGCAAGGGAATGCCGCCGTCAAACGGCATATGCGCGATACTTTGTGCTGAAC
GACGCGGTGCAAAAAGTGCAGCGCCGTGATGCGCCTTTGTCCAACTGGCGCAAGAGGCA
TTGCAGTCTTACCGCACTACCGCGAAACGAAGCGTCCGAAGTGGCGCAGGCTTTGCCG
TTGAACGAGTATTTGGTCAATCAAATCCGCAACAGTATGGCGCAGATTATGCGCCGGTTT
GATTACGGGATGACCGCGCTTGCCTCCATCGGCGCGACCGCGCGCTTATCGGGCTGTTT
GGCAGCGTTTGGGGGATTACACGCGCTGATCAATATCGGGCAAAGCGGGCAGATGAGT
ATTGCGGCGGTTGCCGCGCCGATTGGCGAGGCACTGGTGGCGACGGCGCGCGGTTTGTTC
GTGGCGATTCCGCGCGGTGTGGCATACTTCTCAATCGCGGCACAAAAATACTGACC
CAGGATTGGATGCGATGGCGCAGATTGACGCTCCGCTGCTTAATCAAAGGATAGC
```

10

配列番号 2

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来ExbBのアミノ酸配列

```
>NMB1729
MNLKLVFESGDPVLIGVFVLMMLMSIVTWCLVVLRCIKLYRARKGNAAVKRHRDITLSIN
DAVEKVRVADAPLSKLAQELQSYRNYRRNEASELAQALPLNEXLVIQIRNMAQIMRRF
DYGMTALASIGATAPFIFGLPGTVWGIYHALINIGQSGQMSIAAVAGPIGEALVATAAGLF
VAIPAVLAYNFLNRGTKILTDQDLAMAHDLHVRLLNQKDS
```

20

配列番号 3

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来exbDのコード領域の
ヌクレオチド配列

ナイセリア・メニンギチジスB株のExbDのアクセッション番号及び配列 (DNA&タンパク質)

```
>NMB1728
ATGGCATTGGTTCGATGAATTCGGGCGACGATTCTCCGATGTCCGACATCAACGTTACG
CCGTGGTGGACGTGATGCTGGTGTGCTGATTGTGTTATGATTACTATGCCGTGCTG
ACGCATTCCATCCCTTTGGAAGTCCGACCGCGCTCCGAGCAGACAAACAGCAGGACAAA
CAGCCTAAAGACCCCTGCGCTGACGATTGATGCGAACGCGCGCTATTATGTCCGCGGG
GATTCTGCAAGCAAGTGGAAATCGGGGAAGTGGAAAGCCGTCTGAAGGCCCAAGGAG
CAGAATGAAACGTTGATTGTGGCGATTGCGGCAGACAGGCGGTGGAATACGATTATGTA
AACAAAGCTTTAGAACCGCCCGTCCAGGCAGGAATCACCAAAATCGGTTTTGTAACCGAA
ACCAAGGCGCAA
```

30

配列番号 4

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来ExbDのアミノ酸配列

```
>NMB1728
MAFGSMNSGDDSPMSDINVTPLVDVMLVLLIVFMITMPVLTHSIPLELPTASEQTNKQDK
QPKDPLRLTIDANGGYVGGDSASKVEIGEVESRLKAAKEQNENVIVAIAADKAVEYDYV
NKALEAARQAGITKIGFVETKAQ
```

配列番号 5

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来exbB遺伝子から上流の
DNA領域(1000 bp)のヌクレオチド配列

40

ナイセリア・メニンギチジスB MC58株のExbBの上流1 kbのDNA配列

```
5'-CATAATGATTCCAACACTGAAAAACCAATCAAACATCCAAGCTGCCGCAAACCGCTGCG
ExbB <- GTA 5'
```

```
GCAACCGCCTAATTCAATTCAAACCTTGACGGGGAAGTTAACTCCGTCCAGGCATTGGCT
TGAAAAATGCCCGTTTGGCGCCGCTTGCCTGCCGCAATTGTCCAACCGGAAAAACCACTG
CTTTTCACGATTTTAAACGGAATCAACATGACCGCCCGGAGAAACCAAAACGCTCAAAACA
ACCGTACCCCTGCTCGTCAATCTCCATAGAAAGCGTGGGATAAGCCGGGCGCGGAATGCTG
```

CCGTTGGCGCGTAAAGGATTGCCTTTGCTGCTGCCGGCTCCTTCCCCGTGTTCCGCTTTG
ACACCGCCGCTACCTTTACCGCTGCCTTCTCCGCGCCCGTTCCGCTCCTCTTGGTACCA
GTTCCCTTATCTTCCCCATTGCCCTGCTGCTGCTGCTTGGCAGAAGCATTGCCGGGA
TGTTCGGCAGGTTTTCAGACGGCTTCTCAGCCGGTTTTCGCGCGGTTTCGGGACAGGC
TTCGCTTCCGGCTTAGGCTCTGCTTTCGGTTTCTTCCGGTTTCGGCTTTCTTTCAGGT
TTCGGCTCTTCCCTAGGCTGCTGAATATCCGATCCGCTTTTTCGTAACCAACCGGCTTC
AAAACCGGCTTGGGCGGCTCGACAGGTTTGGGCGGCTCGGGCACGGGTTGCGGTTCCGGC
GCAGCAGGCGCGCTGCACCTTCCGGGGCGCGTCCCTCCGCGCAAAATCGCCCAAAATCG
ACAAATTCAATAACATTGCTGACTTATCAAGGCGAGCTTGTGCGCTGCCAGAGCAAT
GCCACCATGCGCAAAATGCAGCAGTGCAGCGGAAACACGACTGCGGGGTTAAATTCGT
TCTTTATCCATAATTCGGGCATAATAATAGCAACAATTCCTATTGCAACCTATTTTAC
AATTTTGGTCATATGAATGTCTGTCCGTTACAGGCAAA-3'

配列番号 6

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来exbD遺伝子から上流の
DNA領域(1000 bp)のヌクレオチド配列

ナイセリア・メニンギチジスB MC58株のExbDの上流1 kbのDNA配列

5'-CATAATCAGCTATCCTTTTGATTAGCAGGCGGACGTGCAAAATCGTGCGCCATCGCATC
ExbD < GTA -5'
CAAATCCTGGGTCAGTATTTTGTGCGCGGATTGAGGAAGTTGTATGCCAACACCGCGCG
AATCGCCACGAAACAAACCGCGCGCGTCCGCCACAGTGCCTCGCCAATCGGGCCGGCAAC
CGCCGCAATACCTCATCTGCCCGCTTGGCCGATATTGATCAGGGCGTGGTAATCCCCCA
AACCGTGCCGAACAGCCGATAAACGGCGCGTCCGCCGATGGAGGCAAGCGCGGTCTAT
CCCGTAATCAACCGCGCGCATAATCTGCCCATACTGTTGCGGATTGTAATGACCAATA
CTCGTTCAACGGCAAGCCTGCGCCAGTTGCGACGCTTCGTTTCGGCGGTAGTTGCGGTA
AGACTGCAATGCCTCTTTCGCCAGTTTGGACAAAGGCGCATCGACGGCGCGCACTTTTTC
GACCGCGTCGTTGAGCGCAAAAGTATCGCGCATATGCCGTTTGACGGCGGCTTCCCTTT
GCGCGCCCGATACAGCTTGATGAGCGCAAGACAACCAACACCGTACGATACTCAT
CAACAGCATCAACACAAACACCAATCAGGACGGGATCGCCGATTCAACACTAATTT
CAAATTCATAATGATTCCAACACTGAAAAACCAATCAACATCCAAGTCCCGCAACCC
GCTGCGGCAACCGCTTAATTCATTCAACTTGACGGGGACTTTAAACTCCGTCCAGGCA
TTGGCTTGAAATGCGCTTTTGGCGCGCTTTCGTCGCCGATTGTCAACCGGGGAAAA
CCACTGCTTTTACGATTTTAAAGGACTCAACATGACCGCCCGAGAAACCAAAACGCTC
AAAACAAACGTACCTGCTCGTCTTCTCATTAGAAAGCGTGGGATAAGCCGGCGCGGA
ATGCTGCCGTTGGCGCGTAAAGGATTGCCTTTGCTGCTGCCGGC-3'

配列番号 7

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来rmpMのコード領域の
ヌクレオチド配列

ナイセリア・メニンギチジス MC58株(血清型B)のRmpM (ナイセリア・メニンギチジスにおいて
OMP4とも呼ばれる)のアクセション番号: (DNA&タンパク質配列)

>NMB0382
ATGACCAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGCTCGCTTCCGGCACTGCT
GTTGCGGGCGAGGCGTCCGTTAGGGTTACACCGTAAGCGGCCAGTCGAACGAAATCGTA
CGCAACAATATGGCGAATGCTGGAAAAACGCTACTTTGATAAAGCAAGCCAAAGTCCG
GTAGAATGCGGCGATGCGTTGCTGCCCCGAACCGGAGCCAGAACCAGAACCCGCAACC
GCGCTTGTGCTGCTTGTGGAGCAGGCTCCGCAATATGTTGATGAAACCATTTCCCTGTCT
GCCAAAACCTGTTTCGTTTCGATAAGGATTGATGCGCGCCGAGCTCAAGACAACCTG
AAAGTATTGGCGCAACGCTGAGTCGAACCAATGTCCAATCTGTCCGCGTCGAAGGCCAT
ACCGACTTTATGGGTTCTGACAAATACAATCAGGCCCTGTCCGAACGCGCGCATACGTA
GTGGCAACCAACCTGTCAGCAACGCGCTACCTGTTTCTAGAATTTCTGCTGTGCGCTG
GGCGAATCTCAAGCGCAATGACTCAAGTTTGTGAAGCGAAGTTGCCAACTGGGTGCG
AAAGTCTCTAAAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCATGTATCGAACCCTGACCGCGT
GTGGATGTGAAATCCGCGAGCATCGTAACCGCTCAGGTTGTGCCGCGACACAATCATCAC
CAACACTAA

配列番号 8

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来RmpMのアミノ酸配列

>NMB0382
MTKQLKLSALFVALLASCTAVAGEASVQGYTVSGQSNEIVRNNYGECWKNAFYFDKASQGR
VECGDAVAAPPEPEPEPAPVVPVVEQAPQYVDEIISLSAKTLFGFDKDSLRAEAQDNL
KVLQAQLSTNVQSVRVEGHTDFMGSDKYNQALSERRAYVVANNLVSNQVPSRISAVGL
GESQAQMTQVCEAEVAKLGAKVSKAKKREALIACIEPDRRDVVKIRSIVTRQVVPANH

QH

配列番号 9

ナイセリア・メニンギチジス(血清型A) Z2491株のrmpM遺伝子に対応する
DNA領域(729 bp)のヌクレオチド配列

ATGACCAAACAGCTGAAATTAAGCGCATTATTCGTTGCATTGCTCGCTTCCGGCACTGCTGTGCGGGCGAGGCGTCCGT
TCAGGGTTACACCGTAAGCGGCCAGTCGAACGAAATTGTACGCAACAATATGGCGAATGCTGGAAAAACGCCTACTTTG
ATAAAGCAAGCCAAAGGTCGCGTAGAATGCGGCGATGCGGTTGCTGCCCCGAACCCGAGCCAGAACCCGAACCCGCACCC
GCGCCTGTGCTGCTGTGAGCAGGCTCCGCAATATGTTGATGAAACCATTTCCCTGTCTGCCAAAACCTGTTCCGTTT
CGATAAGGATTCAATTGCGCGCCGAAGCTCAAGACAACCTGAAAGTATTGGCGCAACGCTGGGTCAAACCAATATCCAAT
CTGTCCGCGTCGAAGGCCATACCGACTTTATGGGTTCTGACAAATACAATCAGGCCCTGTCCGAACGCGCGCATACGTA
GTGGCAAAACACCTGGTCAGCAACGCGCTACCTGTTTCTAGAAATTTCTGCTGTGCGCTTGGGCGAATCTCAAGCGCAAT
GACTCAAGTTTGTGAAGCCGAAGTTGCCAAACTGGGTGCGAAAGTCTCTAAAGCCAAAAACGTGAGGCTCTGATTGCAT
GTATCGAACCTGACCGCGCGTGGATGTGAAAATCCGCGCATCGTAACCCGTCAGGTTGTGCCGCGACACAATCATCAC
CAACACTAA

10

配列番号 10

ナイセリア・メニンギチジス(血清型B)-MC58株由来rmpM遺伝子から上流の
DNA領域(1000 bp)のヌクレオチド配列

20

ナイセリア・メニンギチジスB MC58株のRmpMの上流 1 kbのDNA配列

AAAATGCCCCGCGATGCTGCTGCCCGCATTGAATGCAATTCATAAGTAATCAGCGGAA
ACCTCGCCAAATCTTCAATACGGAGGGGTTTCTGCATTGAGCAAGGGGTGGTTCGTTG
GTACGATAACCGCATGAGTCCAGTCATAGCAGGGAAGTTTCCAGTTCGGGATGGTTCGT
CTATCCGTTCCGTAACAATCGCCAAGTCCGCTCGCCTGAGGTAACCATACGTCGCGATGG
CGGCAGGGCTCCCTGTTTGTATGGTCAGGTTGACTTTCGGATAGCGTTTCAAAAATCGG
CAACAATCAAGGGTAGGGCATAGCGTGCCTGAGTATGCGTTCGTGGCAACCGTCAGCGAAC
CGCTGTCTGTCCGCTAAACTCGCTGCGGATATTTTAAATGTTCTGAACATCGCGCAAAA
TACGTTCCGCAATATCCAAAACACCTTGCCCGGCTGCGAGACCGAAACACGCGCTTGC
CGCTGCGGATAAAAATCTGAATGCCGATTTCTTCTCCAGCAATTTGATTTGTTGGAGA
TGCCGGGTTGCGAAGTAAACAAGGCTTCGCGCGCTTCGGAACGTTTCAAGGTTGTGCTGGT
AAACTTCTAAGGCGTATTTCAATTTGTTGTAATTTCAATGGCGGGTTCGTTGTTGGTCTGTGT
CGGGTGGCTGAACATTGTTTATAATTTATCATATTTTCTTCCCGGTACGGTATGGGGCTT
TGCCGTTGTGTTGTTGTTTGTGCAACCGCAATCGTGCGATATGGAATAATCCCCCT
AAAGTAATGACACGGAATTGATTTTTCGGCATGATAGACTATCAGGAAACAGGCTGTTT
ACGTTTGTGTTTTCAGGCGTTGAGTATTGACAGTCCGCCCCCTGCTTCTTATAGTGAGAC
TGAAATATCCGATTTGCCGCGATGTTTCTACAGCGGCTGTATGTTGGCAATTCAGCAGT
TGCTTCTGTATCTGCTGTACAAATTTAATGAGGGAATAAATGA ATG-3'
RmpM

30

ヌクレオチド配列:

TolQ: 以下の相補鎖(5168..5854)	配列番号 11	—	インフルエンザ菌 HiRD株
TolR: 以下の相補鎖(4677..5096)	配列番号 13	—	インフルエンザ菌 HiRD株
TolA: 以下の相補鎖(3543..4661)	配列番号 15	—	インフルエンザ菌 HiRD株
TolB: 以下の相補鎖(2218..3501)	配列番号 17	—	インフルエンザ菌 HiRD株

40

2221	tttagttaag	tatggagacc	aagctggaaa	tttaacttga	ccatcacttc	ctggaaggct	gagttttttta
2281	cgccttaaag	cgaccatctg	cggaaaccaa	ttgtagcacc	tttcctaagc	cctgtgtaga	
2341	actataaata	atcataattc	catttggaga	gaggcttggg	ctttcgcta	gaaaagatgt	
2401	actaagtacc	tctgaaacgc	ccgttgtgag	atcttgttta	actacattat	tgttaccatt	
2461	aatcatcaca	agtgtttttc	catctgcact	aatttgtgcg	ctaccgogac	caccactgc	
2521	tgttgcacta	ccaccgcttg	catccattcg	ataaacttgt	ggcgaaccac	ttctatcgga	
2581	tgtaaaataa	attgaatttc	cgtctggcga	ccacgctggg	tcagtattat	taccgcacc	
2641	actcgtcaat	tgagtaggtg	taccgccatt	tgctcccata	acgtaaatat	tcagaacacc	
2701	atcacgagaa	gaagcaaaag	ctaaacgaga	accatctggc	gaaaaggctg	gtgcgccatt	

2761 atgcccttga aaagatgcca ctacttttacg tgcgccagaa tttaaatcct gtacaacaag
 2821 ttgtgatttt ttattttcaa acgatacata agccaaacgc tggcgcgtctg gagaccaagc
 2881 tggagacata attggttggg cactacgatt gacgataaat tgattatagc catcataatc
 2941 tgctacacga acttcataag gttgcgaacc gccatttttt tgcacaacat aagcgatagc
 3001 agttctaaag gcaccacgga tcgcagttaa tttttcaaaa acttcacgc tcacagtatg
 3061 cgcgccatag cgtaaccatt tatttggttac tgtatagcta ttttgcatc atacagtccc
 3121 tggcgtagct gatgcacca cgtatcaat taattgataa gtaatactat aaccattacc
 3181 cgatggaacc acttgcccaa ttacaattgc gtcaattcca atattcgacc aagcctcagg
 3241 atttacctct gcagctgaag ttgggcgttg aggcatttga gaaacgcga taggattaaa
 3301 cttaccactg ttacgtaaat catctgcaac aattttacta atatcttctg gtgcagaacc
 3361 aacaaatggc acgacagcaa taggacgcgc accatcaacc ccttcatcaa tgacaatgcg
 3421 tacttcatcg ccagcgaatg cattgcttcc aacagcaagt acaatcgcg atacgctcac
 3481 taaacgtttt aataatttca ttttggttacc tttaaaattt aacaataaat ttttctaaag
 3541 aattatcgaa tatcaaagtc aataattggt gatttatatt tttcataaat ttcattctgat
 3601 ggcgtagctg gaactttttt cgttctagcc accgcactta atgcagctga acaaatatca
 3661 tcagagcctg aaattttttg ataccccaag attgtgccat ctgcacctaa ttgaatttta
 3721 atacgacaaa cctttcctgc aaaatttggg tcttttaaga aacgcagttg aatctctttc
 3781 ttaattacac ctgcgtattg atccccaacc ttaccaccat cgccagagcc aagtgcagca
 3841 ccgctacctt gagttccacc tttatttgtg tttcccccct tagatgcact accgccacca
 3901 atatctccgc catttaagaa atcatctagg cttgottgat ctgctttacg tttcgcttcc
 3961 gtagcagctt tagcttctgc atcagctttt gcttttgcct ctgctgccgc tttcgctttt
 4021 gcctccgctt cagcctttgc tttagcttca gcaacggctt ttgccttagc ttcggcttct
 4081 agtttccgct tagcttccgc ctcttgtttt gctttttgag cagcaatttc tctgcttctc
 4141 gcttttagcct cttcttcagc ttgttttggc gcggcagcta aacggttagc ctctgcatct
 4201 gcttttaatt ttgcagcttc agccgcttgt ttagccttag cctcttcagc ttgcttctgt
 4261 ttttccaacg cttcttgacg agcttgcctt tgttgttttt ttatttcttg ctgacgttgc
 4321 tgttcttgcct gacgttttaa ctcttcttgt cgttgaactt cttgttgatg cttaatctct
 4381 tcttgattag gctcaggttg ttttcttccc acaacagggt ctgggcgttt ttgtttatcc
 4441 gcttgccctt tttttgttg ttgaatacgc ccccatctct gagcagccgt accagtatca
 4501 acaatcactg cccctattac atctcttca ccttctccac caccataat ttcaacagtg
 4561 tgataaagtg agcttaaaat caataagcca aacaagataa agtgcaaaaag gatagaaata
 4621 gcaaaaagcat tgattccttt cttttgtcga ttattttgca cgtgttacct acttagctaa
 4681 atgggatttg tcattaaacc tacagattta atgcctgcaa gatgaagtaa attcaatgcc
 4741 ttaatcactt cttcataagg tacttcttta gctccgccta ctaaaaatag cgtattatta
 4801 tccttatcaa attcctgtct agataattga gtaaccattt cttctgttaa accttcttga
 4861 cgttctccgc caatagaaat cgcatttttt ccaatgcctg ccacttcaag aatgacgggt
 4921 actttatctt cattagaaac ctcttgctt tgacagaaat caggcaattc aactgaacg
 4981 ctttgactaa taataggggc ggttgccata aaaatttaaca ctaaaactaa agcacatct
 5041 aaaaaaggca caatattaat ttcagattta attgctttac gctgacgacg agccatatat
 5101 tctcttaaaa ttttaactta tttttaccgc actttttctt caaagtgcgg tcaattttcc
 5161 ctatatttta gtgaggggct ttaccaaaagg cttgacggtg taaaatcgct gtaaattcat
 5221 caataaaatt accgtaatct tgttcaatgg cattcactcg taagcttaaa cgggtataag
 5281 ccattactgc aggaattgcg gcaataaacc caatcgagc ggcaatcaag gcctcagcga
 5341 tacctggcgc taccatctgt aacgttgcct gttttgcacc acttaatgcc ataaaagcgt
 5401 gcatgatacc ccaaacagtg ccgaataaac caatataagg gctaacagat gccactgttg
 5461 ctaaaaatgg aactcggttt tccaaacttt caatctcacg gttcatcgca agattcatcg
 5521 cgcgcattgt gcctttaata atcgcttcag gtgcatctgg atttacttgt tttaaacgtg
 5581 aaaattcttt aaatcccacg caaaaaattt gttcgcgtgc cgttaatcca tcgcgacgat
 5641 tagatagccc ttcataaaag ttattttaa atcttctctga ccagaaacga tcttcaaacg
 5701 tacgcgcttc ttttaaggca ttcgttaaaa tacgactacg ttgaatgata attgccaag
 5761 atatgattga gaaagaaatc aaaatcacia ttaccagttg cacaacaata cttgctttta
 5821 gaaaaagatc taaaaaattc aattctgcag tcattgcata

10

20

30

40

配列番号 12 ToIQアミノ酸配列 — インフルエンザ菌 HiRD株

MTAELNFLDLFLKASIVVQLVIVILISFSIISWAIHQSRILT
 NALKEARTFEDRFWSGEDLNKLYEGLSNRRDGLTGSEQIFCVGFKEFSRLKQVNPDP
 EAIKGTMRAMNLMNREIESLENRVPLATVASVSPYIGLFGTVWGMHAFMALSGA
 KQATLQMVAPGIAEALIAIGLFAAIPAVMAYNRLSLRVNAIEQDYGNFIDEFTTIL
 HRQAFGKAPH

配列番号 1 4 TolR アミノ酸配列 — インフルエンザ菌 HiRD 株

MARRQRKAIKSEINIVPFLDVLLVLVLFMATAPIISQSVQVEL
PDSVQSQEVSNEDKVPVILEVAGIGKYAISIGGERQEGLTEEMVTQLSRQEFDKDNNT
LFLVGGAKEVPYEEVIKALNLLHLAGIKSVGLMTNPI

配列番号 1 6 TolA アミノ酸配列 — インフルエンザ菌 HiRD 株

MQNNRQKKGINAFAISILLHFILFGLLILSSLYHTVEIMGGGEG
EGDVIGAVIVDTGTAAQEWGRIQQQKKGQADKQKRPEPVVEEKPPEPNQEEIKHQQEV
QRQEELKRQQEQQRQQEIKKQQEQARQEAEKQKQAEAEAKAKQAAEAALKADAEAKR
LAAAAKQAEAEAKAKAAEIAAQKAKQEAEAKAKLEAEAKAKAVAEAKAKAEAEAKAKA
AAEAKAKADAEAKAATEAKRKADQASLDDFLNGGDIGGGSASKGGNTNKGGTQSGSAA
LGSGDGGKVGDQYAGVIKKEIQRRFLKDPNFAGKVCRIKIQLRDGTILGYQKISGSD
DICSAAALSAVARTKKVPAAPSDEIYEKYKSPIDFDIR

10

配列番号 1 8 TolB アミノ酸配列 — インフルエンザ菌 HiRD 株

MKLLKRLVSVFAIVLAVGSNAFAGDEVRIVIDEGVDGARPIAVV
PFVGSAPEDISKIVADDLRNSGKFNPIAVSQMPQRPTSAAEVNPEAWSNIGIDAIVIG
QVVPSTNGYSITYQLIDTVGASGTPGTVMQNSYTVTNKWLRVGAHTVSDEVFEKLT
IRGAFRTRIAYVVQKNGGSQPYEVRVADYDGYNQFIVNRSAPIMSPAWSPDGQRLAY
VSFENKKSQLVVQDLNSGARKVVASFQGHNGAPAFSPDGSRLAFASSRDGVLNIVVMG
ANGGTPTQLTSGAGNNTPEAWSPDGNLSLFTSDRSGSPQVYRMDASGGSATAVGGGRGS
AQISADGKTLVMINGNNNVVKQDLTTGVSEVLSTSLGESPSLSPNGIMIYSSTQGL
GKVLQVLVSADGRFKASLPGSDGQVKFPAWSPYLTK

20

配列番号 1 9

インフルエンザ菌 HiRD 株由来 TolQRAB オペロンから上流の
DNA 領域 (1000 bp) のヌクレオチド配列

30

上流プロモーター配列 (1000 ヌクレオチド): 相補配列 (太字の atg)

tgatgaaacg	cgcctttaac	ttctttggga	aacgccactg	gtttcatctt	gcctagatca	5881
acacaggcta	ccttaacagt	agcctttgat	aacatcaggg	tgttgcgcat	cagtctctgt	5941
tcaaaaagga	ttgtagcccc	ttttacttct	gaaacctctg	tttccaccat	aagtaaataca	6001
tccaattttg	ctgccacgca	ataatcaatg	gcgagcgttt	tgacaacaaa	tgcgagttgt	6061
tgttcctcta	gtaagggttg	ttgcgtaaaa	tttaatgtac	gcaaataatc	tggtcttctgt	6121
cgttcaaaaa	aatgcaaata	gcgagcgtga	tacactacgc	cacctgcac	agtatcttca	6181
taatacacac	gaacaggaaa	agaaaagcca	ttatccaaca	tattctcacc	caattgggtcg	6241
caataaacgg	tgtattctag	aaccagtttt	tgggataagc	aagctatcta	tgaaaaactc	6301
aataagattt	tattcatttt	aaaacatcta	aaatttttac	cgcactttta	gcctgactag	6361
caaaagataa	ggtaatgaca	aatcattttt	aacctttctc	attgagtaaa	atctattcaa	6421
aacataaacg	ttcttttaaa	atagcctcta	tgtaatctta	agccaccagt	atttttattc	6481
ttgatattta	gcggtttctat	gcgacaatct	ttgcgggttat	ttacttttaa	aatatgtttt	6541
actagatgga	ttacgaaaat	caaattgcc	atattttctc	actaaatggc	gaattaagcc	6601
						6661

40

aaaatatcaa aggtttttcgt cctcgagctg aacaacttga aatggcatat gctgtaggta 6721
 aagcaattca aaataaatct tcccttggtta ttgaagctgg aacgggtaca ggaaaaacct 6781
 ttgcatatct cgcacctgct ttagtttttg gtaaaaaaac

配列番号 2 0

不定型インフルエンザ菌由来P5のコード領域のヌクレオチド配列

ATGAAAAAACTGCAATCGCATTAGTAGTTGCTGGTTTAGCAGCAGCTTCAGT
 AGCTCAAGCAGCTCCACAAGAAAACTTTCTACGCTGGCGTTAAAGCTGGTC
 AAGCATCTTTTCACGATGGACTTCGTGCTCTAGCTCGTGAAAAGAATGTTGGT
 TATCACCGTAATTCTTTCACTTATGCTGATTCGGTGGTTATCAAATTTTAAA
 TCAAATAAATAGTTAGTTAGCGGTGAATTAGGTTACGACGATTTTCGGTCTGTG
 CCAAAGGTCGTGAAAAGGTAGAACTGTTGCTAAACACACTAACCACGGTGCG
 CATTTAAGCTTANAAGGTAGCTATGAAGTGTAGAAGCTTTAGATGTTTATGG
 TAAAGCAGGTGTTGCTTTAGTTTCGTTCTGACTATAAATTGTACAATAAAAAATA
 GTAGTACTCTTAAAGACCTAGGCGAACATCACAGAGCACGTGCCTCTGGTTTA
 TTTGCAGTAGGTGCAGAAATATGCAGTATTACCAGAATTAGCAGTTCGTTTAGA
 ATACCAATGGCTAACTCGCGTAGGTAAATACCGCCCTCAAGATAAACCAAATA
 CCGCAATTAACATAACCCCTTGGATTGGTTCTATCAACGCAGGTATTTCTTAC
 CGCTTTGGTCAAGGCGAAGCACCAGTTGTTGCAGCACCTGAAATGGTAAGCAA
 AACTTTCAGCTTAAATTCTGATGTAACTTTTCGATTTGGTAAAGCAAACCTTAA
 AACCTCAAGCGCAAGCAACATTAGACAGCGTCTATGGCGAAATTTACAAGTT
 AAAAGTGCAAAAGTAGCGGTTGCTGGTTACACTGACCGTATTGGTTCTGACGC
 GTTCAACGTAAAACTTTCTCAAGAACGTGCAGATTACAGTAGCTAACTACTTTG
 TTGCTAAAGGTGTTGCTGCAGACGCAATCTCTGCAACTGGTTACGGTGAAGCA
 AACCAGTAACCTGGCGCACTTGTGACCAAGTTAAAGGTCGTAAAGCACTTAT
 CGCTTGCTCTTCTCCAGACCGTCGTGTAGAAATCGCGGTAAACGGTACTAAA

10

20

配列番号 2 1

不定型インフルエンザ菌由来P5のアミノ酸配列

MKKTALVAVAGLAAASVAQAAPQENTFYAGVKAGQASFHDGLRALAREKNVG
 YHRNSFTYGVFGGYQILNQNGLLAVELGYDDFGRAGREKGRTVAKHTNHGA
 HSLXGSYEVLEGLDVYKAGVALVRSYKLYNKNSSTLKDLGEHHRARASGL
 FAVGAEYAVLPELAVRLEYQWLTRVGKYPQDKPNTAINYNPWIGSINAGISY
 RFGQGEAPVVAAPPEMVSKTFSLSNDVTFAFGKANLKPQAQATLDSVYGEISQV
 KSAKVAVAGYTDRIQSDAFNVKLSQERADSVANYFVAKGVAADAI SATGYGEA
 NPVTGATCDQVKGRKALIACLAPDRRVEIAVNGTK

30

配列番号 2 2

インフルエンザ菌HiRD株由来P6のコード領域のヌクレオチド配列

atgaacaaatttggttaaattcattattagttgcagggttctgtagctgcattagcagcttgtagttcatct
 aacaacgatgc
 tgcaggcaatgggtgctgctcaaacttttggcggttactctgttgctgatcttcaacaacggttacaatac
 cgttttatttcg
 gttttgataaatatgacattactgggtgaatacgttcaaactcttagacgcgcacgctgcatatttaaag
 caacgccagct
 gctaaagtattagtagaaggtaaacactgatgaacgtggtacaccagaatacaacatcgcataggccaa
 cgtcgtgcaga
 tgcagttaaagggttatttagctggtaaagggtgttgatgctggttaaattaggcacagtatcttacgggtga
 agaaaaacctg
 cagtattagggtcatgatgaagctgcatattctaaaaaccgtcgtgcagtggttagcgtac

40

配列番号 2 3

インフルエンザ菌HiRD株由来P6のアミノ酸配列

MNKFVKSLLVAGSVAALAACSSSNNDAAAGNGAAQTFGGYSVADLQQRYN TVYF

GFDKYDITGEYVQILDAAHAYLNATPAAKVLVEGNTDERGTPEYNIALGQRRRA
DAVKGYLAGKGVDAKGLGTVSYGEEKPAVLGHDEAAYSKNRRRAVLAY

配列番号 2 4

不定型インフルエンザ菌由来P6のコード領域のヌクレオチド配列

>p6nthipatient.SEQ

ATGAACAAATTTGTTAAATCATTATTAGTTGCAGGTTCTGTAGCTGCATTAGCG
GCTTGTAGTTCCTCTAACAACGATGCTGCAGGCAATGGTGTCTCAAACCTTTT
GGCGGATACTCTGTTGCTGATCTTCAACAACGTTACAACACCGTATATTTTGGT
TTTGATAAATACGACATCACCGGTGAATACGTTCAAATCTTAGATGCGCACGCA
GCATATTTAAATGCAACGCCAGCTGCTAAAGTATTAGTAGAAGGTAATACTGAT
GAACGTGGTACACCAGAAATACAACATCGCATTAGGACAACGTCGTGCAGATGCA
GTTAAAGGTTATTTAGCAGGTAAAGGTGTTGATGCTGGTAAATTAGGCACAGTA
TCTTACGGTGAAGAAAAACCTGCAGTATTAGGTCACGATGAAGCTGCATATTCT
AAAAACCGTCGTGCAGTGTAGCGTACTAA

10

配列番号 2 5

不定型インフルエンザ菌由来P6のアミノ酸配列

>p6nthipatient.PRO

MNKFVKSLLVAGSVAALAACSSSNDAAGNGAAQTGGYSVADLQQRYNTRYVFG
FDKYDITGEYVQILDAAHAYLNATPAAKVLVEGNTDERGTPEYNIALGQRRADA
VKGYLAGKGVDAKGLGTVSYGEEKPAVLGHDEAAYSKNRRRAVLAY.

20

配列番号 2 6

インフルエンザ菌HiRD株由来pcpのコード領域のヌクレオチド配列

PCP bird

ATGAAAAAACAAATATGGCATTAGCACTGTTAGTTGCTTTTGTAGTGAACCTGG
TTGTGCAAATACTGATATTTTCAGCGGTGATGTTTATAGCGCATCTCAAGCAA
AGGAAGCGCGTTCAATTACTTATGGTACGATTGTTTCTGTACGCCCTGTTAA
ATTCAAGCTGATAATCAAGGTGTAGTTGGTACGCTTGGTGGTGGAGCTTTAGG
TGGTATTGCTGGTAGTACAATTGGCGGTGGTTCGTGGTCAAGCTATTGCAGCAG
TAGTTGGTGAATTGGCGGTGCAATAGCTGGAAGTAAATCGAAGAAAAAATG
AGTCAAGTAAACGGTGTGTAATTGTAATTAAGAAAGATGATGGTCAAGAGAT
CGTTGTTGTTCAAAGGCTGACAGCAGTTTTTGTAGCTTGGTCCGCCGAGTTTCG
TATTTGTTGGTGGCGGCTCAAGCTTAAATGTTTCTGTGCTA

30

配列番号 2 7

インフルエンザ菌HiRD株由来pcpのアミノ酸配列

MKKTNMLALLVAFSVTGCANTDIFSGDVYSASQAKEARSITYGTIVSVRPVK
IQADNQGTVVGTGGGALGGIAGSTIGGGRGQAIAAVGAIGGAIAGSKIEEKM
SQVNGAELVIKKDDGQEIIVVQKADSSFCSLVAEFVFGGSSSLNVSVL

40

To1Q: 以下の22100~22789

To1R: 以下の22815~23250

To1B: 以下の24097~25359

To1X: 以下の23253~24080

配列番号 2 8 — モラクセラ・カタラーリス

配列番号 3 0 — モラクセラ・カタラーリス

配列番号 3 4 — モラクセラ・カタラーリス

配列番号 3 2 — モラクセラ・カタラーリス

また、配列21051～25650は本発明のさらなるヌクレオチド配列であり、特に、ToIQ遺伝子開始コドンの上流1000 bpの領域である。

MCA1C0024 Length: 33248 Type: N Check: 1253 ..

21051 GGGTGATAGC GCACCTCAAC AGGATAGCTA CGACCCTCGA CAATATACAC
21101 AGGTGCAGGT TTGCCATTTCG CTGCAAAATA GTCAGAAAAC CTTTGGGTGT
21151 CTAAAGTGGC GGAGGTGATG ATAACTTTTA GATCAGGGCG TTTGGGTAAA
21201 AGACGCTTTA AATAGCCCAT GATAAAATCA ATATTTAAGC TACGCTCATG
21251 TGCTTCATCA ATGATGATGG TATCATAATT TGCCAAAAC TTATCAGAGC
21301 CCAATTCAGC AAGTAAATC CCATCTGTCA TCAGCTTGAC AATAGAGTGC
21351 TTGCCACCTT CTTCCGTGAA GCGAATCTTA AACTCACC GCTGACCAAG
21401 TGGCTCGCCA AGCTCTTCAG CGATACGCAT CGCTACCGAG CGTGCAGCCA
21451 ATCGGCGTGG CTGTGTGTGG CCAATTGAC CTGTGATGCC ACGCCCTGCC
21501 ATCATAGCAA GCTTAGGCAG TTGCGTGGTT TTGCCAGAAC CCGTCTCACC
21551 TGCGATAATC ACCACTTGAT GATCACGGAT CGCTTGAAAT AGCGTATCGG
21601 CTTCAGCAGT CACGGGCAAA TCATGATTAA GTTTTCTGA TAGATTTTTT
21651 GGTATGCTAT CCATACGATT GCGGACCTGT TCGGCAGATC GCTCATAGAT
21701 AGCATCATAG CGTATTTTGC ACTTAGTTTT TAGATCGCCT GTGGTAGAAT
21751 TCATTTTCTG TTTTAGTTTA TTAAATAAT GTCTGTCTTT GGCAAGGACT
21801 GGTAAATTAT CGGTAGAATG CATATTTTAA AATGATAGTT ATCTTATAAA
21851 GGGTATGAAA AAGCATCAAT TTAAGTACAT TGATACATCA GATTTTATTT
21901 TATTCATGGG TCTATATGAG GGCTTGGACG CATGAATAAA CCATGTATTG
21951 TAAATAAAAT CATCAAAACC TGCAATTTTC TATTTAAATG GCGATTTTAG
22001 GGCGATAGAC AAGCGATGAC TTTTGGCCA TCTGTCGCAA ATTTATTAAC
22051 TTATGCTATA ATGCCAAGTA TCTTTTTTTG CCTATTGTGA TTGTCAATTG
22101 TGAACGAATC CATTAGCCTA ATCTCGCTGG TCATTGAAGC AAGCGTTGTT
22151 GTTAAATTGG TCATGGCGAT ACTGCTTTTG CTGTCTACAA TCAGTTGGGT
22201 ACTGATTTTT CATCTGGGTA CCAAATTGG CGGTATTGCC AAGTTTGATA
22251 AGCGATTTGA GCGATGGTTT TGGACTGATG ATATCGATCA TCAGCTGTCT
22301 GTTGTGCAAG CAGAATCAGA GCGTGCAGGG CTTGAGCTGA TTTTTTATAC
22351 AGGTTTTTAT GATCAAAATC ACCAAGACCA AGATTCTTCA CTAAGTGATG
22401 ATAAAAAGT GCAATCGTT GAGCGTCGCT TGCGTATGGC ATTAGGCAGT
22451 GAGCAGGTGC ATCTTGAAAA AGGATTATCA ACGCTTGCAA CGATTGGTTC
22501 TGTTTCACCT TATATCGGAC TATTTGGTAC AGTATGGGGC ATTATGAATG

10

20

30

40

22551 CATTATATTGG CTTGGGTCAA GCCGAATCGG TTGGTCTTGC AACCGTTGCA
22601 CCGAGCATTG CTGAGGCATT GATTGCAACA GCACTTGGTT TATTGCGGC
22651 CATTCCTGCG ACGATGGCAT ATAATCACTT TGCCACCAA TCCAATACAC
22701 TGTATGAAAA TCGTAGCCTA TTTTGTGAAG GCTTAATAAG TGCATTGGTG
22751 ACAAATCTGG CAAAAAAGAA CACCGCATCA ACTTTATAGA GCATACTATT
22801 TTATAGAGCA TATTATGGTA ACTTCCAATC GATTGCTCG TCGCCAAAGA
22851 CCGCTAAATA GTGACATGAA TGTTGTGCCT TACATTGATG TGATGTTGGT
22901 GCTTTTGGTG ATATTTATCG TAACAGCACC AATGCTTGCT ACAGGTATTG
22951 AGGTATCACT GCCAAAAGAG CAGACCAAAC CCATCACACA AGCTGACAAG
23001 CTGCCTGTCA TTGTCAGCAT TCAGGCAGAT GGCAATCTGT ATGTCAGCCA
23051 TAAAAATGCC ATCGATGTGC CAATCACGCC TGACAAGCTA GATACCTGCTG
23101 TACGCCAGAT GCACCAAGAC AATACCGATT TACAAGTGAT GGTCAATGCC
23151 GATGCAGATA ATGCCTACAG CCGAATTATG CAGATTATGG CATTGATTCA
23201 AAATGTTGGT ATCACCCTAAG TGAGTTTGCT TAGCGAATCT GTTCAATAAT
23251 GCATGATAAT TCATAAGGCA AATCAATCGA TCGGTTTATC CGATAATCAT
23301 CCAACAGTCA ATTTTGATAA ATCTGCGCTA ATTTTACCAA TTTTAGCCAG
23351 TGTTTTATTA CATAACGTCA TCATCATAGC GGTAGCAGCA CCACTGATTA
23401 CACCGCCTAC TAAGCCTAAT ACTACTATTC AGACCGCTTT GGTAGGTCAA
23451 GAGGCTTTTA ATCGTGCCAA GACGGCCTTG AGCAATCATC ATGCCAATCA
23501 AAACAAGCCA ACTGCCACCA ACACCTCAAG TACCATCACT GCCAATGATA
23551 ATGATAATGC ATTTATGCAA GCTCAAAATC AGCATCGTTA TCACCCACAG
23601 GTTTCTACTT CTGCCACCAC GACCCAAGCG TATCATCCAC CACCCAATC
23651 AGCACCTTTT GAATCAAATT CACCAAATAT ACAAATCAA CCAACAAACG
23701 CTCACGCCAA GCTGGCTGAA TATTCTAATC ATGTCTCAGA CCTTGAGCAG
23751 TCAAATCATA CCGAGTCTAC GCCAAGCCGA GCACAAATCA ATGCCGCCAT
23801 CACCTCGGTC AAACATCGTA TTGAAGCCAT TTGGCAACGC TATCCTAAGC
23851 AGCCCAATCA AACCATCACC TTTCAGGTTA ATATGAATCA ACAAGGCGAT
23901 GTGACCTCAA TCCAATTCGG TGGTGGCCAT CCTGATTTGC GTGAATCTGT
23951 AGAAGCGGCG GTATATGCTG CCGCACCATT TTATGAACTT GGCGGTATGC
24001 GTGACAGTAT CCGCCTGCAG TTCACCACAG AGCAGCTAAT TATGGATAAT
24051 AACCAAACAA CCAATGAGCC TAATCACTAA TCGCCATGGA GTTTTTATGA
24101 AATCACCCAT TACCAAAGTT TGCCTTGCTC TGACCATAAG CTTTCTGCTG
24151 GCTTTGACGC ACACTTATGC TGATGATGAA TTGATTGTGA TTAGCGAACA

10

20

30

40

24201 AGTTGCTCCG AGTCAATACC CCGTGGCAGT CATGCCTTTT TCAGAAGCTC
24251 ATCAAATGAG TCATTATCTA AGCCTGGCAG GTCTTGGTAC TACTCACCAA
24301 AACCTGCCAC AGCACACTCA GACGAATAGC GACATTCTGA ATAATCTGAC
24351 CGCATGGCGT AACCGAGGAT TTGAATATAT TATTTTGGCA CAGTCGCATC
24401 AAATTTTGGG AAATAAGCTT GCAATTAACT ATGAAATTAT TGATACTGCC
24451 AATGGTTTGG TAAGCGTCAA GCATACCCAA ATTAGCGATA ACCACCCCTGC
24501 TTCTATCCAA GCTGCCATATC GTCAAATCAG CGATACAATC TATCAAATCA
24551 TCACAGGCCA GCCATCAGAT TTGATGGGTA AAATCGCCTA TGTGGAAGAA
24601 AGCGGATCGC CACAAAATAA AATCTCATCT CTTAAATTGA TTGATCCAAG
24651 CGGTACGCTT ATCCGTACGC TAGATACCGT CAATGGATCA ATTATAACGC
24701 CGACATTTTC CCCCAGTGGC TTGAGTATTG CTTATAGTGT ACAAACAAAA
24751 AATAATCTGC CCATCATTTA TATTGTGTCT GTATCAGGTG GCACACCAAA
24801 GCTCGTCACG CCATTTTGGG GTCATAATTT GGCACCAAGT TTTTCACCAG
24851 ATGGTAGCAG TATCTTATTT TCAGGTAGCC ACGAGAATAA TAACCCGAAC
24901 ATTTATCGTC TTAATTTACA TACCAATCAC TTAGATACGC TCACTACATT
24951 CAACGGTGCT GAGAATGCAC CAAATTATTT GGCAGATGCG TCAGGATTTA
25001 TTTTACTGCT TGATAAAGGT ACACGCCGCC AAAGCCTATA TCGCTATGAT
25051 TTTGGCACGA CGCATAGCAC CCAAATCGCC TCTTATGCCA CCAATCCACG
25101 CTTAAGCCCA GATGGATCAA AGCTTGATATA TTTATCAGGT GGACAAATCA
25151 TCATCGCCAA TACCAAGGC CGTATCCAAC AAAGTTTATG GGTGTTAGGC
25201 ACTGATGTAT CAGCCAGCTT TTCACCATCA GGCACACGGA TTATATATAC
25251 ATCCAACCAA GGCAATAAAA ACCAGCTGAT GATCCGTTTC CTATCAAGTA
25301 ATGCCATACG CACCATCCCA ACATCAGGCA CGGTGCGTGA TCCGATTTGG
25351 TCAAAATAAT GCCAATGAGT ATCCCAACTA AGGCGACAGT CGGCTATACC
25401 CAAAGGCGGT TATTTATGGT CAGTATGACA GTTGGCCTGA TCAGCTTGAG
25451 TGGGTGTCAG CACATTCAAG TGACCAAAAG CCAATACCG ATCATCATCC
25501 ATAGCCATAC AAAATCGCCA TCTCAGCCTA AACCTACACC AACTGACGCC
25551 GTGCCTACCA AAAACCGCCC AATCTCCCCA CCAACACAAA AGTCCAATAC
25601 GATATTTATT TTGGAAGATT GGTTTTAGGC AGTTTGGTA GATTCAAAT

10

20

30

40

配列番号 29 モラクセラ・カタラーリス由来TolQのアミノ酸配列

!!AA_SEQUENCE 1.0

TRANSLATE of: contig24.txt check: 1253 from: 22100 to: 22786
generated symbols 1 to: 229.

MCA1c0024

tolQ-Mcat.pep Length: 229 December 22, 1999 09:12 Type: P Check:
2526 ..

```

1  MNESISLISL VIEASVVVKL VMAILLLLST ISWVLIFHLG TKIGGIKFD
51  KRFERWFWD DIDHQLSVVQ AESERAGLEL IFYTGFDQN HQDQDSSLSD
101 DKKVQIVERR LRMALGSEQV HLEKGLSTLA TIGSVSPYIG LFGTVWGIMN
151 AFIGLGQAES VGLATVAPSI AEALIALALG LFAAIPATMA YNHFATKSNT
201 LYENRSLFCE GLISALVTNL AKKNTASTL

```

10

配列番号 3 1 モラクセラ・カタラーリス由来TolRのアミノ酸配列
!!AA_SEQUENCE 1.0
TRANSLATE of: contig24.txt check: 1253 from: 22815 to: 23246
generated symbols 1 to: 144.

MCA1c0024

tolR-Mcat.pep Length: 144 December 22, 1999 09:13 Type: P Check:
507 ..

20

```

1  MVTSNRFARR QRPLNSDMNV VPYIDVMLVL LVIFIVTAPM LATGIEVSLP
51  KEQTKPITQA DKLPVIVSIQ ADGNLYVSHK NAIDVPITPD KLDTLRQMH
101 QDNTDLQVMV NADADNAYS R IMQIMALIQN VGITQVSLLS ESQ

```

配列番号 3 3 モラクセラ・カタラーリス由来TolXのアミノ酸配列

```

MIIHKAQSMRLSDNHPTVNFDKSALILPILASVLLHTVIIIIAVALITPPTKPNNTTIQTALVGQEAF
NRAKTALSNHH
ANQNKPTATNTSSTITANDNDNAFMQAQNOHRYHPQVSTSTTTQAYHPPNSAPFESNSPNIQNQPTN
AHAKLAEYSNH
VSDLEQSNHTESTPSRAQINAAITSVKHRIEAIWQRYPKQPNQTITFQVNMNQGDVTSIQFGGGHPDL
RESVEAAVYAA
APFYELGGMRDSIRLQFTTEQLIMDNNQTTNEPNH

```

30

配列番号 3 5 モラクセラ・カタラーリス由来TolBのアミノ酸配列

!!AA_SEQUENCE 1.0
TRANSLATE of: contig24.txt check: 1253 from: 24097 to: 25356
generated symbols 1 to: 420.

40

MCA1c0024

tolB-Mcat.pep Length: 420 December 22, 1999 09:08 Type: P Check:
3135 ..

```

1  MKSPITKVCL ALTISFSAAL THTYADDELI VISEQVAPSQ YPVAVMPFSE
51  AHQMSHYLSL AGLGTTHQNL PQHTQTNSDI LNNLTAWRNR GFHEYIILAQS

```

101 HQILGNKLAI NYEIIDTANG LVSVKHTQIS DNHPASIQAA YRQISDTIYQ
151 IITGQPSDLM GKIAYVEESG SPQNKISSLK LIDPSGQLIR TLDTVNGSII
201 TPTFSPDGLS IAYSVQTKNN LPIIYIVSVS GGTPKLVTPF WGHNLAPSFS
251 PDGSSILFSG SHENNNPNIIY RLNLHTNHLD TLTTFNGAEN APNYLADASG
301 FIYTADKGTR RQSLYRYDFG TTHSTQIASY ATNPRLSPDG SKLVYLSGGQ
351 IIIANTKGRI QQSFRVLGTD VSASFSPSGT RIIYTSNQGN KNQLMIRSLS
401 SNAIRTIPTS GTVRDPIWSK

10

配列番号 36

モラクセラ・カタラーリス由来tolAのコード領域のヌクレオチド配列

TolAは以下の配列中のヌクレオチド27473～28852である。
また、配列26451～28900は本発明のさらなるヌクレオチド配列であり、特に、
TolA遺伝子開始コドンの上流1000 bpの領域である。

!!NA_SEQUENCE 1.0

20

MCA1C0028 Length: 49617 Type: N Check: 3684 ..

26451 GGCGACTGGC GGATTGTGGA GTATCGCTGT ACTGTGTACT CATTGCACCC
26501 ATGGCATCAA ACATACACGA TTGCGTCCAA TGCTCACTTT CACCGCCGCC
26551 TGCCAGTACG ATATCAGCCT TACCAAGTTG AATCAGCTCC ATGGCATGAC
26601 CGACACAGTG GCTTGAAGTG GCACAGGCAG AAGATAGCGA GTAAGACAAG
26651 CCCTTGATTT TTAGCCCCGT CGCTAAGGCC GCGGATACCG AGCTTGCCAT
26701 GATTTTGGGA ACTGCCATTG CACCTACGCC ACGCAAGCCT TTTTCACGCA
26751 TGGCATCCGC AGCTGCCACC ACATCCGCAG TAGAAGCACC GCCCGATGCT
26801 GCAACCACCG AAACCCTAGG ATTGTCAGTG ATGGTGTCAA TGCTAAGCCC
26851 TGCCTTTTTG ATTGCTGATA AAGCACTGAT ATATGCATAA AGGCTGGCGT
26901 TGCTCATAAA GCGCTTTAAT TTACGATCAA TGCCTGTGGT GTCCAAGTCA
26951 TCATGATCTA TACTACCTGC CACGCATGAT TTAAATCCCA AATCGGCATA
27001 TTCTTGCTTA AAGCGAATGC CTGAACGCCC ATTTTCTAAG GCCTCCTTGA
27051 CGGTATCTAA ATCATTACCC AAGCAAGAAA CAATGCCTGC ACCTGTGATG
27101 ACAACTCGTT TCATAATTTC ATCCTAAAAA GTTTACAGTT GTAATCTTGC
27151 TATTGTAACA AATTATTCCA AACTTAGGG AAATTTTCCC AAAATTTTCA
27201 TAAAAATAGG TGAAAATGAC TAAAGATAGA CAAGGGTTTA CCAAATATTT
27251 AGTTATTCAT CAATTGGCGA CGGTATTTAT GAACATTTAA TAACATTTAT
27301 GTTGTATATT ATCACTAGGC GTAGTTTAGT TTTTGTGATA ATCTTTAGAA

30

40

27351 GATAATTTTT ATGACAATTT CATACAATTA ATGAGGTTGG ACATACGATA
27401 GATAAAAGTA AATTGACTTT TTGTATTTTA TGTCAAACC TGAATCTTAA
27451 TACCAAATC ATGGAGTAAC TGATGACAAA ATCAACTCAA AAAACCACCA
27501 AACAAACACA ACACAGCCAT GATGATCAAG TCAAAGAGCT GGCTCAAGAA
27551 GTCGCTGAAT ATGATGATGT TGAAATTGTT GCTGAAGTAG ATATCGACAA
27601 TCAAGCTGTC TCTGATGTTT TGATTATTCG TGATACGGAT ACCAAAGCTG
27651 ACCAAGCAGA TCACACTGAT GACGCATCTA AAGCAGATGA TGAGACTGTG
27701 GTAGATGGCG TTAAACAAAA AGCTCAAGAG GCTAAAGAAG ATTTTGAAAA
27751 TAAAGCACAA GATCTTCAAG ATAAAGCTAC TGAGAAGCTT GAAGTCGCCA
27801 AAGAAGCTAC CCAAGACAAG GTAGAGAAAA CTCAAAGTTT AGTTGAGGAT
27851 ATCAAGGATA AAGCCCAATC TTTGCAAGAA GATGCTGCCG ATACAGTTGA
27901 AGCGTTAAAA CAAGCGGCCA GTGATAAGGT TGAGACTACC AAAGCTGAAG
27951 CTCAATCACT AAAAGATGAT GCTACTCAA CATTGAATC AGCCAAACAA
28001 GCGGTTGAAG GCAAAGTAGA AGCCATCAA GAGCAAGTCT TAGATCAGGT
28051 TGAATCCCTA AAAGACGATA CCGATCAAGA TAATACTGAT CAAGATCAAG
28101 AAAACAGAC CCTAAAAGAT AAGGCGGTGC AAGCTGCCAC CGCTGCTAAA
28151 CGCAAAGTTG AAGATGTGGT AGATGATGTC AAACACACCA CCGAATCTTT
28201 CAAAAATACC GCAAGCGAAA AAATAGATGA GATTAAGCAA GCTGCTGTTG
28251 ACAAACAGA AGAGGTCAA TCTCAGCTTA GCCAAAAAGC TGATGCCCTA
28301 AAATCTTCTG GCGAAGAACT CAAGCAAACA GCTCAAACGG CTGCTAATGA
28351 TGCCATTACA GAGGCTCAAG CTGCCGTAGT AAGTGGTTCG GTTGCTGCCG
28401 CTGATTCGGC ACAATCAACC GCTCAAAGTG CAAAAGATA GCTCAATCAG
28451 CTCTTTGAAC AAGGTAAGTC CGCTTTGGAT GAAAAAGTTC AAGAATTGGG
28501 CGAGTAATAT GGTGCAACTG AGAAAAATTAA TGCAGTCAGC GAATATGTAG
28551 ATCTGGCTAC CCAAGTCATT AAAGAAGAAG CACAAGCACT ACAAACCAAT
28601 GCCCAAGAAT CTCTACAAGC TGCCAAAGCG GCTGGCGAAG AGTATGACGC
28651 TACCCACGAA GATAAGGGTT TGACCACTAA ACTTGGTACA GTGGGTGCCT
28701 ATTTGTCTGG CATGTATGGC ATTAGCCAAA ATAAAAATAA CCATTACCAA
28751 GGCGTTGACT TGCATCGTGA AAGTTTTGAT AAAGATGCAT TTCATGCCCA
28801 AAGCAGTTTT TTTGCAGGGA CAAATATTTG GTGCCAAAGC AGTTGCAGCT
28851 AAGAATGTGG CAGCTAAAGT TGTTCCTCAA TCTAAATTTG AAGCCATCGG

10

20

30

40

配列番号 37 モラクセラ・カタラーリス由来TolAのアミノ酸配列

!!AA_SEQUENCE 1.0

TRANSLATE of: contig28.txt check: 3684 from: 27473 to: 28849
generated symbols 1 to: 459.

MCA1c0028

tolA-Mcat.pep Length: 459 December 22, 1999 09:05 Type: P Check: 8307 ..

1 MTKSTQKTKT QTOHSHDDQV KELAQEVAEY DDVEIVAEDV IDNQAVSDVL
51 IIRDITDKAD QADHTDDASK ADDETVDGV KQKAQEAKED FENKAQDLQD
101 KATEKLEVAK EATQDKVEKT QSLVEDIKDK AQSLOEDAAD TVEALKQAAS
151 DKVETTKAEA QSLKDDATQT FESAKQAVEG KVEAIKEQVL DQVDSLKDDT
201 DQDNTDQDQE KQTLKDKAVQ AATAAKRKVE DVVDDVKHTT ESFKNTASEK
251 IDEIKQAAVD KTEEVKSQLS QKADALKSSG EELKQTAQTA ANDAITEAQA
301 AVVSGSVAAA DSAQSTAQSA KDKLNQLFEQ GKSALDEKVQ ELGE*YGATE
351 KINAVSEYVD LATQVIKEEA QALQTNQES LQAACAAGEE YDATHEDKGL
401 TTKLGTGAY LSGMYGISQN KNNHYQGVDL HRESFDKDAF HAQSSFFAGT
451 NIWCQSSCS

10

20

配列番号 38

モラクセラ・カタラーリス由来OmpCDのコード領域のヌクレオチド配列

Omp CD Mcat DNA

ACCESSION L10755

atgaaatttaataaaaatcgctcttgcggtcatcgagccgttgcagctccagttgcagctccagttgct
gctcaagctgg
tgtgacagtcagccactactacttggctatcattacactgacgaagcccacaatgatcaacgcaaaat
cttacgcactg
gcaagaagctagagctagatgctactaatgcacctgcaccagctaattggcgggtgctgcactggacagt
agctatggact
ggtgctgcgattggtatcgaacttacgccatcaactcagttccaagttgaatatggtatctctaacctg
gatgcaaaatc
ttcagacaaatctgcacatcgctttgatgctgagcaagaaccatcagcggtaactttttgattggtac
tgagcagttca
ggggtacaaatccaaacaaataaattcaagccctatgtcttgggttggtgcaggtcaatctaaaattaaag
taaattgaatt
gatgggtatatacagcagaagtagccaatgggcaaacattgcaaaagatcaagctgtaaaagcaggtcaa
gaagttgctga
gtctaaagacaccatcggtaacctaggtcttgggtgctcgctacttagtcaatgatgcccttgcacttgc
tggtgaagccc
gtgctatccataattttgataacaaatgggtgggaaggcttggcgttggctgggttagaggtaactttgg
gtggctggttg
gcacctgcagtagcaccagtagcaccagtggcagaacctgttgcctgaaccagttggtgctccagcacctgtg
atccttcctaa

30

40

accagaacctgagcctgtcattgaggaagcaccagctgtaattgaagatattgttgttgattcagacgg
agatgggtgtgc
ctgatcatctggatgcctgcccaggaactccagtaaacactgttgttgatccacgcggttgcccagtac
aggtttaatttg
gtagaagagcttcgccaagagttgegtgtattctttgattatgataaatcaatcatcaaaccacaatac
cgtgaagaagt
tgctaagggttgctgcgcaaatgcgtgaattcccaaactgcaaccattgaagggtcacgcacacg
cgattcagcac
gctcaagtgcacgctacaaccagcgtctatctgaagctcgtgctaattgctgttaaataatgctatcta
acgaatttggt
atcgctccaaaccgcctaaatgcagttgggttatggctttgatcgctcctatcgctccaaatactactgct
gaaggtaaagc
gatgaaccgctcgtgtagaagcagtaatcactggtagcaaaacaacgactgttgatcaaaccaaagatat
gattgttcaat
aa

10

配列番号 3 9

モラクセラ・カタラーリス由来OmpCDのアミノ酸配列

ペプチド

MKFNKIALAVIAAVAAPVAAPVAAQAGVTVSPLLLGYHYTDEAHNDQRKILRTGKKLELDATNAPAPAN
GGVALDSELWT
GAAIGIELTPSTQFQVEYGISNRDAKSSDKSAHRFDAEQETISGNFLIGTEQFSGYNPTNKFPPYVLVG
AGQSKIKNVNAI
DGYTAEVANGQNIQAKDQAVKAGQEVAKESKDTIGNLGLGARYLVNDALALRGEARAIHNFNKNWWEGLAL
AGLEVTILGGRL
APAVPVAPVAEPVAEPVAPVILPKPEPEPVIEEAPAVIEDIVVDSGDGVPDHLDACPGTPVNTTVV
DPRGCPVQVNL
VEELRQELRVFFDYDKSIIKPQYREEVAKVAAQMREFPNATATIEGHASRDSARSSARYNQRLSEARAN
AVKSMLSNEFG
IAPNRLNAVGYGFDRPIAPNTTAEKGAMNRRVEAVITGSKTTTVDQTKDMIVQ

20

配列番号 4 0

モラクセラ・カタラーリス由来xOmpAのコード領域のヌクレオチド配列

xompa

!!NA_SEQUENCE 1.0
MCA1C0035

30

mcalc0035.seq Length: 2461 December 2, 1999 11:22 Type: N Check:
9214 ..

1 ATGTGTTTGC ATTGATTGAT AAATACACGC TTAGTCTAGC AGATTTTTGG
51 TAAATGCTT AGCCTTTGTA CGATTTTATG GCTAATTTTA ATAACAAGTG
101 AATAAAAACT ACCAACTTTT TGGTAAATTT GATTTTAAAGT ATAAGTGGTT
151 CATGTAATTT ATATGCCAAA AAGTATGTGC ATAAATCAA TCAAATGGTT
201 TATCTGTCAA TTTGATGAGT GGGTATTGAG GGTTTTGTCT TCATGATTAA
251 AATCATTGAG AATTAATTAC TATCATAATT ACTATAATAT TACAGATATG
301 TAAATAAAAA ACCATTCATC ATTTACTTTT GTAATTGCTT AATTTTTTTT
351 GAGCGAATAA AAGGCGGTTT TGTATTATCAA TTGTTGCCAG CGCTTTTAAG
401 TTGCCATAAA ATCAGTCACA ATAGAGTTAT AAAACAAGTG GCTTCAAGCA
451 ACTGTTTGTT TTTCTTAAGG ACGGCATCGG CATTTTGCTG ATGGATAATG

40

501 AAATTTAAAT TTAAATGAC CTATGGAGTG ACTTATGAGC TTAATTAATA
551 AATTAAATGA ACGCATTACG CCGCATGTCT TAACTTCGAT TAAAAATCAA
601 GATGGCGATA ATGCTGATAA ATCTAATTTG TTAACCGCAT TTTATACCAT
651 TTTTGAGGA CGCTTGAGTA ATGAAGATGT GTATCAGCGT GCCAATGCTT
701 TGCCTGATAA TGAGCTTGAG CATGGGCATC ATCTGCTCAA TGTGCTTTT
751 AGTGATGTTT CAACTGGTGA AGATCAGATT GCTTCTTTGA GTAATCAATT
801 AGCCGATGAA TATCATGTTT CGCCAGTAAC GGCACGCACC GCAATCGCAA
851 CGGCAGCACC TTTGGCTTTG GCACGCATTA ACATTAAAGA GCAAGCAGGT
901 GTATTGTCTG TACCGTCTTT TATTCGTACT CAATTGGCTA AAGAAGAAAA
951 CCGTTTGCCA ACTTGGGCGC ATACTTTATT GCCAGCAGGG CTATTTGCAA
1001 CCGCTGCCAC AACCACCGCC GAGCCTGTAA CGACAGCCTC TGCTGTTGTG
1051 AAAGAGCCTG TCAAACCAAG TGTGTGACA GAACCAGTTC ATCCAGCTGC
1101 GGCTACCACC CCAGTCAAAA CACCAACTGC CCGGCATTAC GAAAACAAAG
1151 AAAAAAGTCC TTTTCTAAAA ACGATTCTAC CGATTATTGG ATTGATTATT
1201 TTTGCAGGCT TGGCATGGCT TTTGTTAAGA GCATGTCAAG ACAAACCAAC
1251 ACCTGTTGCG GCACCTGTTG CGACAGATAC AGCACCTGTG GTAGCGGATA
1301 ATGCTGTACA GGCAGACCCA ACACAAACAG GTGTTGCCCA AGCACCTGCA
1351 ACGCTTAGCT TGTCTGTTGA TGAAACGGGT CAAGCGTTGT ACTCGCACCG
1401 TGCTCAGGTT GGTAGTGAAG AGCTTGCAGG TCATATCCGT GCAGCTATTG
1451 CTCAAGTCTT TGGCGTACAA GATTTAACCA TTCAAAATAC CAATGTACAT
1501 ACCGCTACGA TGCCAGCGGC AGAATACTTA CCAGCAATTT TGGGTTTGAT
1551 GAAAGGTGTA CCAAATTCAA GCGTTGTGAT TCATGATCAT ACGGTACGCT
1601 TTAATGCAAC CACGCCAGAA GATGTAGCAA AACTGGTAGA GGGTGC'TAAA
1651 AATATTCTAC CCGCTGATTT TACTGTAGAA GCAGAACCTG AACTTGATAT
1701 TAATACTGCG GTTGCCGATA GTATTGAAAC AGCGCGTGT GCTATTGTTG
1751 CTTTGGGTGA TACGGTTGAA GAAAAATGAGA TGGATATTTT AATCAATGCA
1801 TTAAATACCC AAATCATTAA CTTTGCTTTA GACTCAACCG AAATTCCCCA
1851 AGAAAATAAA GAAATCTTGG ATTTGGCTGC CGAAAAATTA AAGGCAGTGC
1901 CTGAAACAAC TTTGCGTATC ATTGGTCATA CAGACACTCA AGGCACGCAT
1951 GAGTATAATC AAGATTATC AGAATCTCGT GCTGCTGCTG TTAAAGAGTA
2001 TTTGGTATCA AAAGGTGTTG CTGCTGAACG TTTGAACACT CAAGGTGCAA
2051 GTTTTGATTA TCCAGTTGCA TCAAATGCTA CCGAACAAGG TCGCTTCCAA
2101 AACCSTCGTA TTGAGTTTGT ACTTTTCCAA GAAGGTGAAG CAATTACTCA

10

20

30

40

2151 AGTCGGTCAT GCTGAAGATG CACCAACACC TGTTCACAA AACTGATCAT
 2201 TTTGTTATTG GTTATGAGTT TTAGATTGGG CCAAATGAAT GATAATATAC
 2251 CAATCTTACA AGTACTTTTA ATAACCAAAA CCAACCGTAA TCAACCCAAG
 2301 AACCAAATTA CCCATCGGTC ATTTGGTTCCT TGGGTAGTTT TTATTGGCTC
 2351 TCAATATATG ATGTAGACCA ATTTGACCCA AAATAGATCA GAGTTTGGGT
 2401 CTTGGATTG CGACCATATC GTATAACTGA CATATCTTGA ACACAAAAAA
 2451 GCATAAAATG A

10

配列番号 4 1

モラクセラ・カタラーリス由来xompAのアミノ酸配列(図2にも示されている)

xompa

!!AA_SEQUENCE 1.0

TRANSLATE of: omp854.seq check: 9214 from: 1 to: 2461
 generated symbols 1 to: 820.

20

MCA1C0035

omp854.pep Length: 553 December 2, 1999 11:35 Type: P Check: 5451
 ..

1 MSLINKLNER ITPHVLTSIK NQDGDNADKS NLLTAFYTIF AGRLSNEDVY
 51 QRANALPDNE LEHGHLLNV AFSDVSTGED QIASLSNQLA DEYHVSPTA
 101 RTAIATAAPL ALARINIKEQ AGVLSVPSFI RTQLAKEENR LPTWAHTLLP
 151 AGLFATAATT TAEPVTTASA VVKEPVKPSV VTEPVHPAAA TTPVKTPPTAR
 201 HYENKEKSPF LKTILPIIGL IIFAGLAWLL LRACQDKPTP VAAPVATDTA
 251 PVVADNAVQA DPTQTGVAQA PATLSLSVDE TGQALYSHRA QVGSEELAGH
 301 IRAAIAQVFG VQDLTIQNTN VHTATMPAAE YLPAILGLMK GVPNSSVVIH
 351 DHTVRFNATT PEDVAKLVEG AKNILPADFT VEAPELDIN TAVADSIETA
 401 RVAIVALGDT VEENEMDILI NALNTQIINF ALDSTEIPQE NKEILDIAAE
 451 KLKAVPETTL RIIGHTDTQG THEYNQDLSE SRAAAVKEYL VSKGVAAERL
 501 NTQGASFDYP VASNATEQGR FQNRRIEFVL FQEGEAITQV GHAEADPTPV
 551 AQN

30

40

配列番号 4 2

モラクセラ・カタラーリス由来P6様(又はPAL-1)のコード領域のヌクレオチド配列

P6-like) Pal mcat DNA

ATGATGTTACATATTCAAATGCGCGCGCTGCCGCCGCTTTATCGGTACTAACTTTTATG
 ACAGGCTGTGCCAATAAATCAACAAGTCAAGTTATGGTTGCTCCTAATGCACCCACAGGT
 TACACTGGGGTTATCTATACTGGTGTGACCTTTGGTAGATAATGATGAGACCGTTAAG

GCTCTGGCAAGCAAGCTACCCAGTTTGGTTTATTTTGACTTTGATTCTGATGAGATTAAA
 CCGCAAGCTGCTGCCATCTTAGACGAACAAGCACAAATTTTAAACCACCAATCAAACAGCT
 CGTGTTTTGGTTGCAGGTACATACCGATGAGCGTGGTAGTCGTGAGTATAATATGTCACTG
 GGGGAACGCCGTGCGGTGGCGGTACGCAACTATTTGCTTGGTAAAGGCATTAATCAAGCC
 AGCGTTGAGATTATCAGTTTGGTGAAGAAGCGCCCTATCGCATTTGGCACAAATGAAGAA
 GCATGGTCACAAATCGTCGTGCTGAACTGTCTTATTAA

配列番号 4 3

モラクセラ・カタラーリス由来P6様(又はPAL-1)のアミノ酸配列
 (P6-様)Pal Mcatペプチド

MMLHIQIAAAAAALSVLTFMTGCANKSTSQVMVAPNAPTGYTGVIIYTGVAPLVDNDETvk
 ALASKLPSLVYDFDSDSEIKPQAAAILDEQAQFLTTNQTARVLVAGHTDERGSREYNMSL
 GERRAVAVRNYLLGKGINQASVEIISFGEERPIAFGTNEEAWSQNRRAELSY

10

配列番号 4 4

モラクセラ・カタラーリス由来PAL-2のコード領域のヌクレオチド配列

!!NA_SEQUENCE 1.0

Definition : MCat Lipo4 2nd Pal-like lipoprotein BASB113 SBBMCA012
 Accession : BASB113

Lipo4_MCat.seq Length: 675 April 28, 1999 09:31 Type: N Check:

LIP004_MCAT Length: 675 February 7, 2001 17:42 Type: N Check:
 4424 ..

20

1 ATGAAAATTA AAGCATTGGG TGTGTGCTG TTGGCATCAA GTATGGCTTT
 51 GGCAGGTTGT GCAAATACAG GCACAACTGG CAATGGCACA GGATTGTGGT
 101 GTGCTAATGT CAATAAGGCG GTGATTGGGG CTGTGGCAGG TGCACCTGGC
 151 GGTACTGCCA TTTCAAAAGC AACTGGTGGC GAAAAAACAG GTCGTGATGC
 201 CATTTTGGGG GCGGCAGTTG GTGCAGCAGC AGGGGCGTAT ATGGAGCGTC
 251 AAGCAAAGCA GATTGAGCAA CAAATGCAAG GAACGGGCGT GACTGTAACC
 301 CACGATACCG ACACGGGTAA TATTAATCTA ACTATGCCAG GTAATATTAC
 351 TTTTGCTCAT GATGACGATA CTTTAAACAG TGCATTTTTG GGTGCTTTAA
 401 ACCAGCTGGC TAATACGATG AATCAGTATC ATGAAACAAC GATTGTCATT
 451 GTAGGACATA CAGACTCAAC GGGTCAAGCG GCTTATAATC AAGAGCTGTC
 501 TGAGCGTCTGA GCGGATTCTAG TGCCTTATTA CTTGATTAAT CAAGGCGTTG
 551 ATCCATATCG TATTCAGACA GTGGGGTATG GTATGCGACA ACCGATTGCA
 601 TCGAATGCAA CCGAAGCAGG TCGTGCTCAA AATCGCCGTG TTGAGCTGAT
 651 GATTTTAGCA CCGCAGGGTA TGTA

30

40

配列番号 4 5

モラクセラ・カタラーリス由来PAL-2のアミノ酸配列(図2を参照)

Pal2

!!AA_SEQUENCE 1.0

Definition : M Cat Lipo4 2nd Pal-like lipoprotein BASB113 SBBMCA012
Accession : BASB113

Lipo4_MCat.pep Length: 224 April 28, 1999 09:21 Type: P Check:

LIP004_MCAT Length: 224 December 20, 1999 12:28 Type: P Check:
4279 ..

1 MKIKALGVVL LASSMALAGC ANTGTTGNGT GFGGANVNKA VIGAVAGALG
51 GTAISKATGG EKTGRDAILG AAVGAAAGAY MERQAKQIEQ QMQGTGVTVT
101 HDTDTGNINL TMPGNITFAH DDDTLNSAFL GRLNQLANTM NQYHETTIVI
151 VGHTDSTGQA AYNQELSERR ADSVRYYLIN QGVDPYRIQT VGYGMRQPIA
201 SNATEAGRAQ NRRVELMILA PQGM

10

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1-1】ペプチドグリカン結合タンパク質のマルチプルアラインメントである。ECは大腸菌、HIはインフルエンザ菌、NGは淋菌である。↑はC末端トランケート中で保存されているはずのOmpA相同体の保存F残基の位置を示す。下線__はペプチドグリカン結合部位の保存された完全長を示す。

20

【図1-2】ペプチドグリカン結合タンパク質のマルチプルアラインメントである。ECは大腸菌、HIはインフルエンザ菌、NGは淋菌である。↑はC末端トランケート中で保存されているはずのOmpA相同体の保存F残基の位置を示す。下線__はペプチドグリカン結合部位の保存された完全長を示す。

【図2-1】ペプチドグリカン結合タンパク質のマルチプルアラインメントである。ECは大腸菌、MCはモラクセラ・カタラーリス、NGは淋菌である。↑はC末端トランケート中で保存されているはずのOmpA相同体の保存F残基の位置を示す。下線__はペプチドグリカン結合部位の保存された完全長を示す。

【図2-2】ペプチドグリカン結合タンパク質のマルチプルアラインメントである。ECは大腸菌、MCはモラクセラ・カタラーリス、NGは淋菌である。↑はC末端トランケート中で保存されているはずのOmpA相同体の保存F残基の位置を示す。下線__はペプチドグリカン結合部位の保存された完全長を示す。

30

【図3】モラクセラ・カタラーリスのompCDの仮定的構造図を示す。C末端トランケート中で保存されているはずのOmpA相同体のF残基の位置並びにペプチドグリカン結合部位の位置を示す。

【図4】実施例1に記載されるrmp遺伝子座での二重交叉から得られた組換えナイセリア属菌のPCRスクリーニングを示す。

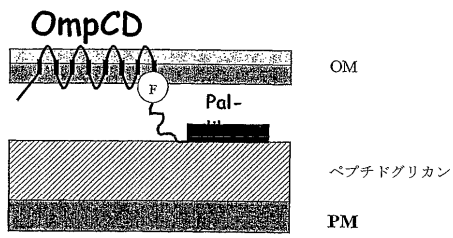
【図5】モラクセラ・カタラーリス及びNTHIにおけるtol遺伝子の欠失のための変異誘発プラスミドを構築するのに用いる戦略の模式図を示す。

40

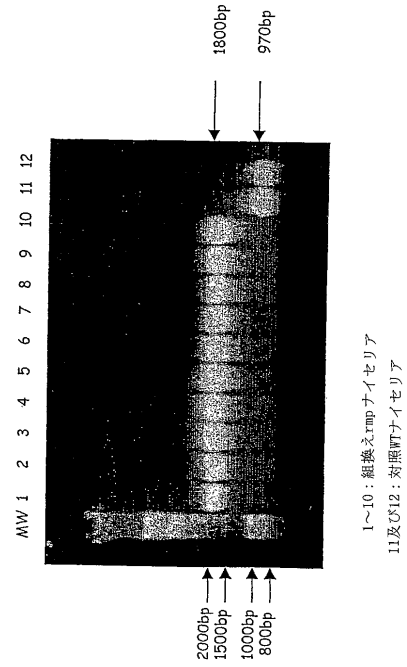
【図6】A:モラクセラ・カタラーリスの期待される二重組換えtolQRの模式図を示す。B:プライマーE、F、G及びHを用いる組換えtolQRモラクセラ・カタラーリスのPCR分析を示す。

【図7】それぞれモラクセラ・カタラーリス及びNTHIのompCD配列及びP5配列中に停止コドンを導入するのに用いる変異誘発プラスミドの構築を示す。

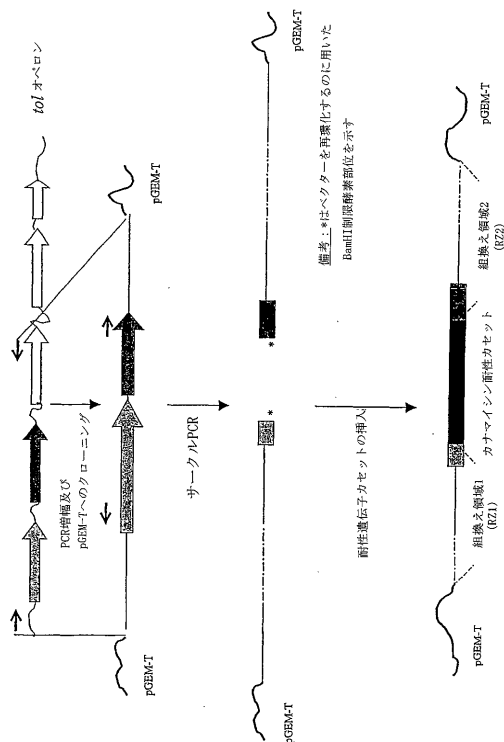
【図 3】



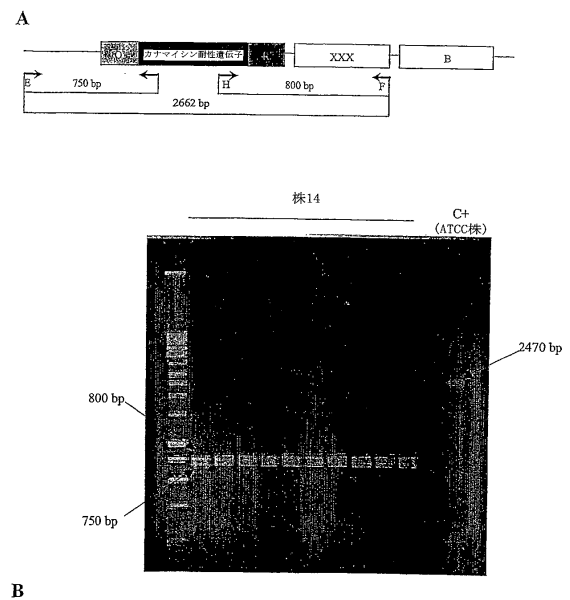
【図 4】



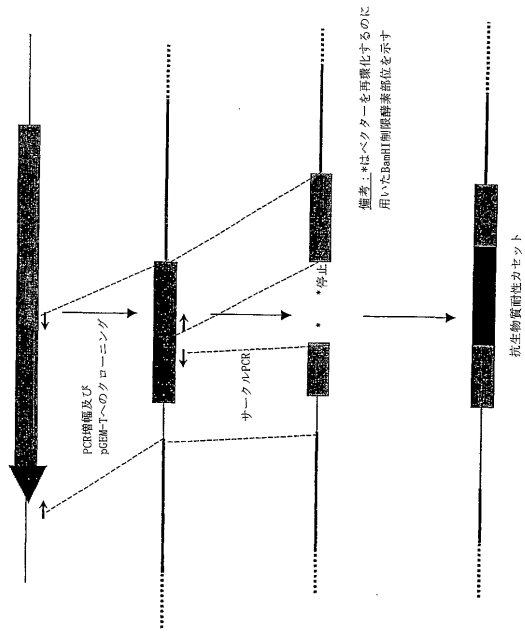
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

- (72)発明者 ベルセット, フランソワザビエル, ジャック
ベルギー国 ビー-1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72)発明者 ドノエル, フィリップ
ベルギー国 ビー-1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72)発明者 ネイト, セシル, アンヌ
ベルギー国 ビー-1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72)発明者 プールマン, ジャン
ベルギー国 ビー-1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72)発明者 ソンナール, ジョエル
ベルギー国 ビー-1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第9 9 / 0 5 9 6 2 5 (WO, A 1)
国際公開第0 1 / 0 0 9 3 5 0 (WO, A 1)
Infect. Immun., 1 9 9 9 年, Vol.67, No.1, p.187-192
Gene, 1 9 9 6 年, Vol.178, p.75-81
Mol. Microbiol., 2 0 0 1 年 2 月, Vol.39, No.4, p.850-862
J. Bacteriol., 1 9 9 7 年, Vol.179, No.3, 805-812
Infect. Immunol., 1 9 8 9 年, Vol.57, No.7, 2066-2071
J. Infect. Dis., 2 0 0 1 年 1 月 1 日, Vol.183, No.1, 89-96
FEMS Microbiol. Lett., 1 9 9 8 年, Vol.163, No.2, 223-228
Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology (2001), 3(1), 113-122
Journal of Bacteriology (1998), 180(18), 4872-4878
Journal of Bacteriology (2000), 182(17), 4764-4772

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/20-1/21

PubMed

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)