

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4592284号
(P4592284)

(45) 発行日 平成22年12月1日 (2010. 12. 1)

(24) 登録日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)

(51) Int. Cl.

F 1

C O 7 K 16/12 (2006. 01)

C O 7 K 16/12

A 6 1 K 39/095 (2006. 01)

A 6 1 K 39/095

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04

C O 7 K 14/22 (2006. 01)

C O 7 K 14/22 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願2003-515553 (P2003-515553)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月26日 (2002. 7. 26)
 (65) 公表番号 特表2005-503785 (P2005-503785A)
 (43) 公表日 平成17年2月10日 (2005. 2. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2002/003396
 (87) 国際公開番号 W02003/010194
 (87) 国際公開日 平成15年2月6日 (2003. 2. 6)
 審査請求日 平成17年6月1日 (2005. 6. 1)
 (31) 優先権主張番号 0118401.9
 (32) 優先日 平成13年7月27日 (2001. 7. 27)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0121591.2
 (32) 優先日 平成13年9月6日 (2001. 9. 6)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 592243793
 カイロン ソチエタ ア レスボンサビリ
 タ リミタータ
 イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
 ア フィオレンティーナ 1
 (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
 (72) 発明者 アリコ, マリア
 イタリア国 イー53100 シエナ,
 ビア フィオレンティーナ, 1, カイ
 ロン エセビーアー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 髄膜炎菌付着因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上皮細胞への *Neisseria* 細胞の付着を予防するための組成物であって、
 配列番号 32 によりコードされるペプチドの残基 1077～1176 内のエピトープに
 対して特異的なポリクローナル抗体
 を含み、

該上皮細胞は、結膜細胞、Chang 上皮細胞、A-549 上皮細胞、および HeLa
 上皮細胞からなる群より選択される、組成物。

【請求項 2】

Neisseria 感染を予防することにおいて使用するための、請求項 1 に記載の組成
 物。

【請求項 3】

髄膜炎または菌血症の処置において使用するための、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 *Neisseria* 感染が、高ビルレント系統である ET-5、ET-37 およびク
 ラスター A4 由来の *N. meningitidis* の感染である、請求項 2 に記載の組成
 物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書中に引用される全ての文献は、その全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、生化学の分野に関し、より具体的には、*Neisseria*属の病原性細菌(例えば、*N. meningitidis*および*N. gonorrhoeae*)の生化学に関する。

【背景技術】

【0003】

国際特許出願WO99/24578、WO99/36544、WO99/57280およびWO00/22430は、*Neisseria meningitidis*および*Neisseria gonorrhoeae*由来のタンパク質を開示する。血清群Bの*N. meningitidis*の完全ゲノム配列は、公開されており[Tettelinら(2000) *Science* 287:1809-1815]、ワクチン抗原を同定するために分析にかけられている[Pizzaら(2000) *Science* 287:1816-1820]。このタンパク質の発現に対するアプローチは、WO01/64922に開示される。血清群Aの*N. meningitidis*の完全ゲノム配列もまた、公知である[Parkhillら(2000) *Nature* 404:502-506]。

【0004】

しかし、配列データのみでは、この病原体についての全てを表さない。本発明の目的としては、以下が挙げられる：(a) *Neisseria*生化学に介入する方法を提供すること；(b) 既知の*Neisseria*タンパク質についての新たな用途を提供すること；(c) 既知の*Neisseria*タンパク質の代替形態および改良形態(例えば、酵素的に不活性な形態の、既知のタンパク質または既知のタンパク質のタンパク質分解性産物)を提供すること；ならびに(d) *Neisseria*の付着を研究および調節するために有用な物質を提供すること。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(本明細書中で使用される命名法)

「ORF40」は、WO99/36544の実施例1に開示される。血清群AおよびBの*N. meningitidis*由来の配列が、開示される(この中で、配列番号1~6)。他の形態のタンパク質は、WO99/31132およびWO99/58683に開示され、GenBankにおいてもまた、見出され得る(gi登録番号：11352902、7228562、14578015、12958107、7228586、7228572、7228594、7228588、14578013、7228568、7228546、7228548、7228592、14578009、7228558、7228600、7228596、7228542、7228574、7228552、7228554、14578023、14578021、11354080、7228584および7228590を参照のこと)。

【0006】

「App」(付着および貫通タンパク質)は、WO99/24578の実施例77に「ORF1」として開示される。血清群AおよびBの*N. meningitidis*由来の配列ならびに*N. gonorrhoeae*由来の配列が開示される(この中で、配列番号647~654)。他の形態のタンパク質は、WO99/55873に開示され、GenBankにおいてもまた、見出され得る(gi登録番号：11280386、7227246、11071865、6977941、11071863、11280387、7379205を参照のこと)。

【0007】

血清群Bの*N. meningitidis*由来の「NadA」(*Neisseria*の付着因子A)は、タンパク質「961」として、WO99/57280(配列番号294

10

20

30

40

50

3および2944)中に、そして「NMB1994」としてTettelinらによって(GenBank登録番号:11352904および7227256もまた参照のこと)、および本明細書中の図9において開示される。

【0008】

これらのタンパク質は、好ましくは、融合タンパク質以外として(例えば、GST、MBP、hisタグまたは同様のものを伴わずに)発現される。

【0009】

本発明に従う使用に好ましいタンパク質は、血清群BのN. meningitidis MC58株、2996株または394/98株(New Zealand株)のタンパク質である。しかし、本発明は、一般的には、株によって限定されないことが理解される一特定のタンパク質(例えば、「ORF40」、「App」など)に対する言及は、任意の株由来のタンパク質を含むととられ得る。従って、一般的には、任意の特定のタンパク質に対する言及は、上記に開示された配列のうちの1つと配列同一性を共有するタンパク質を含む。「配列同一性」の程度は、好ましくは、50%より高い(例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれ以上)。これは、変異体および対立遺伝子改変体を含む。本発明の状況下において、配列同一性は、好ましくは、MPSRCHプログラム(Oxford Molecular)中で実行されるようなSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって決定される。このプログラムは、以下のパラメータを用いるアフィニギャップ検索を使用する: gap open penalty=12およびgap extension penalty=1。典型的には、2つのタンパク質間の50%以上の同一性は、機能的に等価であることを示すと考えられる。

【0010】

WO99/24578、WO99/36544およびWO99/57280中で使用される命名法はまた、本明細書中においても使用される(例えば、WO99/24578およびWO99/36544において使用されるような、「ORF4」、「ORF40」、「ORF40-1」など;WO99/57280において使用されるような、「m919」、「g919」および「a919」など)。

【0011】

(分泌されたApp)

GSTまたはhisタグ融合パートナーを伴わずにE. coli中で発現される場合、Appは、約160kDaの前駆体として外膜に露出し、ここでAppは、プロセシングされ、培養物中に分泌されることが見出されている。

【0012】

従って、本発明は、プロセシングされたAppタンパク質を精製するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する:非-Neisseria宿主細胞中でAppタンパク質をコードする遺伝子を発現させる工程;および培養培地からプロセシングされたAppタンパク質を精製する工程。

【0013】

本発明はまた、このプロセスによって得られ得る精製されたタンパク質を提供する。

【0014】

Appタンパク質は、好ましくは、N末端にその野生型42残基シグナルペプチドを含む(すなわち、いかなるN末端融合パートナーも使用されない)。C末端融合パートナーを含まないこともまた、好ましい。

【0015】

培養培地からタンパク質を精製するために、この培養物は、遠心分離され得、そしてこのタンパク質は、上清から回収され得る。

【0016】

非-Neisseria宿主細胞は、好ましくは細菌であり、最も好ましくは、E. coliである。

【0017】

細菌発現技術は、当該分野において公知である。細菌性プロモーターは、細菌性RNAポリメラーゼに結合し得、かつmRNA中にコード配列（例えば、構造遺伝子）の下流（3'側）転写を開始し得る任意のDNA配列である。プロモーターは、コード配列の5'側末端に近位に通常配置される転写開始領域を有する。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。細菌性プロモーターは、オペレーターと呼ばれる第2ドメインもまた有し得、この第2ドメインは、RNA合成が開始する、隣接RNAポリメラーゼ結合部位と重なり得る。このオペレーターは、遺伝子レプレッサータンパク質がオペレータに結合し得、その結果、特定の遺伝子の転写を阻害するので、負に調節された（誘導性）転写を可能にする。構成的な発現が、オペレーターのような負の調節エレメントの非存在化で生じ得る。さらに、正の調節が、遺伝子アクチベータータンパク質結合配列（これは、存在する場合、RNAポリメラーゼ結合配列に対して通常近位（5'側）である）によって達成され得る。遺伝子アクチベータータンパク質の例は、異化代謝産物アクチベータータンパク質（CAP）であり、これは、*Escherichia coli*（*E. coli*）中のlacオペロンの開始転写を助ける[Raibaudら（1984）*Annu. Rev. Genet.* 18:173]。従って、調節された発現は、正または負のいずれかであり得、よって、転写を増強するか減弱するかのいずれかであり得る。

10

【0018】

代謝経路酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、ガラクトース、ラクトース（lac）[Changら（1977）*Nature* 198:1056] およびマルトースのような糖代謝酵素に由来するプロモーター配列が挙げられる。さらなる例としては、トリプトファン（trp）[Goeddelら（1980）*Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelvertonら（1981）*Nucl. Acids Res.* 9:731; 米国特許第4,738,921号; EP-A-0036776およびEP-A-0121775]のような生合成酵素に由来するプロモーター配列が挙げられる。このg-ラオタマーゼ（laotamase）（bla）プロモーター系[Weissmann（1981）「The cloning of interferon and other mistakes」*Interferon 3*（I. Gresser編）]、バクテリオファージλ PL[Shimatakeら（1981）*Nature* 292:128] およびT5 [米国特許第4,689,406号] プロモーター系もまた、有用なプロモーター配列を提供する。

20

30

【0019】

さらに、天然に存在しない合成プロモーターもまた、細菌性プロモーターとして機能する。例えば、ある細菌性プロモーターまたはバクテリオファージプロモーターの転写活性化配列は、別の細菌性プロモーターまたはバクテリオファージプロモーターのオペロン配列と連結され得、合成ハイブリッドプロモーター[米国特許第4,551,433号]を作製する。例えば、このtacプロモーターは、trpプロモーターとlacオペロン配列の両方から構成されるハイブリッドtrp-lacプロモーターであり、これは、lacレプレッサーによって調節される[Amannら（1983）*Gene* 25:167; de Boerら（1983）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21]。さらに、細菌性プロモーターは、細菌性RNAポリメラーゼに結合を有して転写を開始する能力を有する非細菌起源の天然に存在するプロモーターを含み得る。非細菌起源の天然に存在するプロモーターはまた、適合性RNAポリメラーゼと結合され、原核生物において、いくつかの遺伝子の高レベル発現を生じ得る。このバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ/プロモーター系は、結合されたプロモーター系の1つの例である[Studierら（1986）*J. Mol. Biol.* 189:113; Taborら（1985）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1074]。さらに、ハイブリッドプロモーターはまた、バクテリオファージプロモーターおよび*E. coli*オペレーター領域から構成され得る（EPO-A-0 267 851）。

40

【0020】

50

機能性プロモーター配列に加えて、有効なリボソーム結合部位もまた、原核生物における外来遺伝子の発現のために有用である。E. coliにおいて、このリボソーム結合部位は、シャイン・ダルガーノ (SD) 配列と呼ばれ、開始コドン (ATG) およびその開始コドンの3~11ヌクレオチド上流に配置される3~9ヌクレオチド長の配列を含む [Shineら (1975) Nature 254:34]。このSD配列は、E. coli 16S rRNAのSD配列と3'側末端との間の塩基の対形成によって、mRNAのリボソームへの結合を促進すると考えられる [Steitzら (1979) 「Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA.」Biological Regulation and Development: Gene Expression (R. F. Goldberger編)]。弱いリボソーム結合部位を用いて真核生物遺伝子および原核生物遺伝子を発現させる [Sambrookら (1989) 「Expression of cloned genes in Escherichia coli.」Molecular Cloning: A Laboratory Manual]。

【0021】

プロモーター配列は、DNA分子と直接連結され得、この場合、N末端の第1アミノ酸は、常にメチオニンであり、このメチオニンは、ATG開始コドンによってコードされる。所望の場合、N末端のメチオニンは、臭化シアンと共にインビトロでインキュベーションするかまたは細菌性メチオニンN末端ペプチダーゼと共にインビボもしくはインビトロでインキュベーションするかによってタンパク質から切断され得る (EP-A-0219237)。

【0022】

通常、細菌によって認識される転写終止配列は、翻訳終止コドンの3'側に配置される調節領域であり、従って、コード配列に隣接するプロモーターと一緒になる。mRNAの転写を指示するこれらの配列は、DNAによってコードされるポリペプチドへと翻訳され得る。転写終止配列は、転写の終止を助けるステムループ構造 (stem loop structure) を形成し得る約50ヌクレオチドのDNA配列を頻繁に含む。例としては、強力なプロモーターを有する遺伝子 (例えば、E. coli中のtrp遺伝子およびタンパク質の生合成遺伝子) に由来する転写終止配列が挙げられる。

【0023】

通常、プロモーター、シグナル配列 (所望の場合)、目的のコード配列、および転写終止配列を含む上記の要素は、発現構築物中に一緒に配置される。発現構築物は、しばしば、レプリコン (例えば、細菌のような宿主中に安定に維持され得る染色体外エレメント (例えば、プラスミド)) 中に維持される。このレプリコンは、複製系を有し、そのため、レプリコンが発現のためかまたはクローニングおよび増幅のためのいずれかで原核生物宿主中に維持されることが可能である。さらに、レプリコンは、高コピー数または低コピー数のいずれかのプラスミドであり得る。高コピー数のプラスミドは、一般的には約5~約200、通常は約10~約150の範囲のコピー数を有する。高コピー数のプラスミドを含む宿主は、好ましくは、少なくとも約10、およびより好ましくは少なくとも約20のプラスミドを含む。高コピー数または低コピー数いずれかのベクターが、宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存して選択され得る。

【0024】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターと共に細菌性ゲノム中に組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターの組み込みを可能にする細菌性染色体と相同である少なくとも1つの配列を含む。組み込みは、ベクター中の相同DNAと細菌性染色体との間の組換えから生じるようである。例えば、種々のBacillus株由来のDNAによって構築される組み込みベクターは、Bacillus染色体 (EP-A-0127328) 中に組み込む。組み込みベクターはまた、バクテリオファージまたはトランスポゾン配列から構成され得る。

【0025】

通常、染色体外型発現構築物および組み込み型発現構築物は、選択マーカールを含み得、形質転換された細菌株の選択を可能にする。選択マーカールは、細菌宿主中で発現され得、そしてアンピリシン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン（ネオマイシン）、およびテトラサイクリンのような薬物に対する耐性を細菌に付与する遺伝子を含み得る [Daviesら (1978) *Anne. Rev. Microbiol.* 32: 469]。選択マーカールはまた、ヒスチジン、トリプトファンおよびロイシンの生合成経路における遺伝子のような生合成遺伝子も含み得る。

【0026】

あるいは、上記の要素のいくつかは、形質転換ベクター中に共に配置され得る。形質転換ベクターは、通常、上記のような、レプリコン中に維持されるかまたは組み込みベクター中で顕在化されるかのいずれかである選択マーカールを含む。

10

【0027】

染色体外レプリコンまたは組み込みベクターのいずれかである、発現ベクターおよび形質転換ベクターは、多くの細菌への形質転換のために開発されている。例えば、発現ベクターは、とりわけ以下の細菌について開発されている: *Bacillus subtilis* [Palvaら (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582; EP-A-0 036 259 および EP-A-0 063 953; WO 84/04541]、*Escherichia coli* [Shimatakeら (1981) *Nature* 292: 128; Amannら (1985) *Gene* 40: 183; Studierら (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; EP-A 20 -0 036 776、EP-A-0 136 829 および EP-A-0 136 907]、*Streptococcus cremoris* [Powellら (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655]; *Streptococcus lividans* [Powellら (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655]、*Streptomyces lividans* [米国特許第 4, 745, 056 号]。

20

【0028】

外来性 DNA を細菌宿主中に導入する方法は、当該分野で周知であり、通常 $CaCl_2$ または他の薬剤（例えば、二価の陽イオンおよび DMSO）で処理された細菌の形質転換を含む。DNA はまた、エレクトロポレーションによって細菌細胞に導入され得る。形質転換手順は、通常、形質転換される細菌種によって変化する。例えば、[Massonら (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 273; Palvaら (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582; EP-A -0 036 259 および EP-A-0 063 953; WO 84/04541、*Bacillus*]、[Millerら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 856; Wangら (1990) *J. Bacteriol.* 172: 949、*Campylobacter*]、[Cohenら (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110; Dowerら (1988) *Nucleic Acid Res.* 16: 6127; Kushner (1978) 「An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (H. W. Boyer および S. Nicosia 編); Mandelら (1970) *J. Mol. Biol.* 53: 159; Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949: 318; *Escherichia*]、[Chassyら (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 173 *Lactobacillus*]; [Fiedlerら (1988) *Anal. Biochem.* 170: 38、*Pseudomonas*]; [Augustinら (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 203、*Staphylococcus*]、[Baranyら

30

40

50

(1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) 「Transformation of Streptococcus lactis by electroporation」: Streptococcal Genetics (J. Ferretti および R. Curtiss III 編); Perry ら (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell ら (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti ら (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412、Streptococcus」を参照のこと。

【0029】

(付着性タンパク質)

国際特許出願WO01/64922の実施例22は、NadAタンパク質を発現するE. coli が、ヒト上皮細胞に付着し得ることを開示する。この付着活性は、さらに研究されており、この付着活性は、App およびORF40についても見出されている。

【0030】

本発明は、Neisseria細胞の、上皮細胞への接着を防ぐための方法を提供する。

【0031】

この章における「Neisseria細胞」に対する言及は、任意の種のNeisseria属細菌(N. gonorrhoeae およびN. lactamicaを含む)を含む。しかし、好ましくは、この種は、N. meningitidisである。このN. meningitidisは、任意の血清群(血清群A、C、W135およびYを含む)由来であり得る。しかし、最も好ましくは、これは、N. meningitidis血清群Bである。

【0032】

この章における「上皮細胞」に対する言及は、哺乳動物の上皮に見出されるかまたはその上皮由来の任意の細胞を含む。この細胞は、インビトロ(例えば、細胞培養物中)またはインビボに存在し得る。好ましい上皮細胞は、鼻咽頭由来である。この細胞は、最も好ましくは、ヒト細胞である。

【0033】

(Neisseria-上皮相互作用のブロック)

本発明は、上皮細胞へのNeisseria細胞の付着を防止するための方法を提供し、ここで、上皮細胞に結合する1つ以上のApp、ORF40および/またはNadAの能力がブロックされる。

【0034】

結合する能力は、種々の方法によりブロックされ得るが、最も簡便には、App、ORF40および/またはNadAに特異的な抗体が用いられる。本発明はまた、App、ORF40またはNadAに特異的である抗体を提供する。この抗体は、好ましくは、App、ORF40および/またはNadAに対して、少なくとも 10^{-7} M、例えば、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M以上強いアフィニティーを有する。

【0035】

本発明に従う使用のための抗体は、ポリクローナルであり得るが、好ましくは、モノクローナルである。用語「抗体」は、完全抗体(例えば、IgG、IgAなど)、抗原結合部位(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂など)を保持する完全抗体の誘導体、単鎖抗体(例えば、sFv)、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、ヒト化抗体、一価抗体、ヒトモノクローナル抗体[例えば、Green (1999) J Immunol Methods 231:11-23; Kipriyanov および Little (1999) Mol Biotechnol 12:173-201など]などを含むことが理解される。ヒト化抗体は、完全にヒトであることが好適であり得る[例えば、Fletcher (2001) Nature Biotechnology 19:395-96]。

【0036】

抗体を用いることの代替として、App、ORF40またはNadAと、上皮細胞に対するそのレセプターとの間の相互作用のアンタゴニストが用いられ得る。さらなる代替物として、可溶性形態の上皮細胞レセプターが、デコイ (decoy) として用いられ得る。これらは、レセプターの膜貫通領域、および、必要に応じて、細胞質領域を除去することにより生成され得る [例えば、EP-B2-0139417、EP-A-0609580など]。

【0037】

本発明の抗体、アンタゴニストおよび可溶性レセプターは、上皮細胞に対するNeisseria細胞の付着を防止するための医薬として用いられ得る。

【0038】

(Neisseria遺伝子の発現の阻害)

本発明は、上皮細胞に対するNeisseria細胞の付着を防止するための方法を提供し、ここで、1つ以上のApp、ORF40および／またはNadAからのタンパク質発現が阻害される。この阻害は、転写および／または翻訳のレベルであり得る。

【0039】

遺伝子の発現を阻害するための好ましい技術は、アンチセンスである [例えば、Pidcock (1998) Curr Opin Microbiol 1:502-8; Nielsen (2001) Expert Opin Investig Drugs 10:331-41; GoodおよびNielsen (1998) Nature Biotechnol 16:355-358; Rahmanら (1991) Antisense Res Dev 1:319-327; Methods in Enzymology 第313巻および第314巻; Manual of Antisense Methodology (HartmannおよびEndres編); Antisense Therapeutics (Agrawal編) など]。抗菌性アンチセンス技術は、例えば、国際特許出願公開WO99/02673およびWO99/13893に開示される。

【0040】

本発明はまた、App、ORF40またはNadAをコードする核酸由来のx以上のヌクレオチドのフラグメントを含む核酸を提供し、ここで、xは、少なくとも8個 (例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30以上) である。この核酸は、代表的に、一本鎖である。

【0041】

核酸は、好ましくは、式5'- (N)_a - (X) - (N)_b - 3'であり、ここで、0 ≤ a ≤ 15、0 ≤ b ≤ 15であり、Nは、任意のヌクレオチドであり、そしてXは、App、ORF40またはNadAをコードする核酸のフラグメントである。Xは、好ましくは、少なくとも8個 (例えば、8個、10個、12個、14個、16個、18個、20個、25個、30個以上) のヌクレオチドを含む。aおよびbの値は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15であり得る。核酸の-(N)_a-および-(N)_b-における、個々のヌクレオチドNの各々は、同じであっても、異なってもよい。核酸の長さ (すなわち、a+b+Xの長さ) は、好ましくは、100未満 (例えば、90、80、70、60、50、40、30など) である。

【0042】

用語「核酸」とは、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、DNAおよびRNAのアナログ (例えば、修飾した骨格 (糖および／またはリン酸における修飾 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミダイトなど) を有する) を含むもの)、ならびにペプチド核酸 (PNA)、ならびにプリン塩基およびピリミジン塩基、または天然のヌクレオチド塩基、化学的に修飾されたヌクレオチド塩基もしくは生化学的に修飾されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化されたヌクレオチド塩基などを含む任意の他のポリマーもまた含む。本発明に従う核酸は、多くの方法で (例えば、化学合成により、ゲノムまたはcDNAライブラリーから、生物自体からなど) 調製され得、そ

10

20

30

40

50

して種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブなど）をとり得る。

【0043】

本発明のアンチセンス核酸は、上皮細胞に対する*Neisseria*細胞の付着を防止するための医薬として用いられ得る。

【0044】

(*Neisseria* 遺伝子のノックアウト)

本発明は、上皮細胞に対する*Neisseria*細胞の付着を防止するための方法を提供し、ここで、1つ以上のApp、ORF40および／またはNadAは、ノックアウトである。

【0045】

本発明はまた、1つ以上のApp、ORF40および／またはNadAがノックアウトされている*Neisseria*細菌を提供する。

【0046】

ノックアウト細菌を作製するための技術は周知であり、そしてノックアウト*Neisseria*は報告されている[例えば、Moera (2001) *Infect. Immun.* 69:3762-3771; Seifert (1997) *Gene* 188:215-220; Zhuら (2000) *J. Bacteriol.*, 182:439-447など]。

【0047】

ノックアウト変異は、遺伝子のコード領域に位置づけられ得るか、またはその転写制御領域内（例えば、プロモーター内）にあり得る。

【0048】

ノックアウト変異は、App、ORF40および／またはNadAをコードするmRNAのレベルを、野生型細菌により産生される1%未満、好ましくは、0.5%未満、より好ましくは、0.1%未満、および最も好ましくは、0%まで低下させる。

【0049】

本発明のノックアウト変異体は、*Neisseria*感染を予防するための免疫原性組成物（例えば、ワクチン）として用いられ得る。このようなワクチンは、生存性が弱められた細菌としての変異体を含み得る。

【0050】

(*Neisseria* 遺伝子の変異誘発)

本発明は、上皮細胞に対する*Neisseria*細胞の付着を防止するための方法を提供し、ここで、1つ以上のApp、ORF40および／またはNadAが、その活性を阻害する変異を有する。

【0051】

本発明はまた、変異タンパク質を提供し、ここで、変異タンパク質は、App、ORF40および／またはNadAのアミノ酸配列、またはそのフラグメントを含むが、このアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸は変異される（例えば、Appについて以下を参照のこと）。

【0052】

変異されたアミノ酸は、好ましくは、上皮細胞に対する直接的もしくは間接的な付着の原因であるApp、ORF40および／またはNadAの活性の低下または排除を生じる。例えば、変異は、酵素活性を阻害し得るか、またはタンパク質における結合部位を除去し得る。

【0053】

本発明はまた、この変異タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0054】

本発明はまた、以下の工程を包含する、この核酸を産生する方法を提供する：(a) App、ORF40またはNadAをコードする供給源核酸を提供する工程、および(b) この供給源核酸に対して変異誘発（例えば、部位特異的変異誘発）を行って、変異タンパ

10

20

30

40

50

ク質をコードする核酸を提供する工程。

【0055】

変異としては、欠失、置換、および／または挿入（これらのいずれかは1つ以上のアミノ酸を含み得る）が挙げられ得る。代替として、変異は短縮を含み得る。

【0056】

ビルレンス因子の変異誘発は、*Neisseria* [例えば、Powerら（2000）*Microbiology* 146:967-979; Forestら（1999）*Mol Microbiol* 31:743-752; Cornelissenら（1998）*Mol Microbiol* 27:611-616; Leeら（1995）*Infect Immun* 63:2508-2515; Robertsonら（1993）*Mol Microbiol* 8:891-901など]を含む、多くの細菌 [例えば、WO93/13202に記載される変異誘発; RappuoliおよびPizza, *Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* (ISBN 0-12-053078-3)の第1章; Pizzaら（2001）*Vaccine* 19:2534-41; Alape-Gironら（2000）*Eur J Biochem* 267:5191-5197; Kittenら（2000）*Infect Immun* 68:4441-4451; Gubbaraら（2000）*Infect Immun* 68:3716-3719; Boulnoisら（1991）*Mol Microbiol* 5:2611-2616など]について十分に確立されている。

【0057】

変異誘発は、App、ORF40および／またはNadAをコードする核酸に対して特異的に標的化され得る。あるいは、変異誘発は、全体的または無作為（照射、化学変異誘発などによって）であり得、これらは、代表的には、引き続いて、変異が、App、ORF40および／またはNadAへと導入されているものについて細菌をスクリーニングされる。このようなスクリーニングは、ハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、サザンブロットまたはノーザンブロットなど）、プライマーベースの増幅（例えば、PCR）、配列決定、プロテオミクス、異常なSDS-PAGEゲル移動などによるものであり得る。

【0058】

本発明の変異タンパク質および核酸は、*Neisseria*感染を防止するための免疫原性組成物（例えば、ワクチン）として用いられ得る。

【0059】

（スクリーニング方法）

本発明はまた、上皮細胞に対する*Neisseria*細胞の結合を阻害するもの（アンタゴニスト）を同定するために化合物をスクリーニングするための方法を提供する。

【0060】

スクリーニングのための潜在的アンタゴニストとしては、有機低分子、ペプチド、ペプチド、ポリペプチド、脂質、金属、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリアミン、抗体、およびそれらの誘導体が挙げられる。有機低分子は、50ダルトンと約2,500ダルトンとの間、最も好ましくは、200～800ダルトンの範囲の分子量を有する。物質の複合体混合物（例えば、天然物を含む抽出物、化合物ライブラリーまたは混合型コンビナトリアル合成の生成物）もまた、潜在的アンタゴニストを含む。

【0061】

代表的には、App、ORF40および／またはNadAのタンパク質は、上皮細胞および試験化合物と共にインキュベートされ、次いで、この混合物は、タンパク質と上皮細胞との間の相互作用が阻害されているか否かを確かめるために試験される。

【0062】

阻害は、もちろん、標準（例えば、ネイティブのタンパク質／細胞相互作用）に対して決定される。好ましくは、この標準は、試験化合物の非存在下で測定されたコントロールの値である。標準は、本方法を行う前に決定され得るか、あるいは本方法が実施されてい

る間、または本方法が実施された後に決定され得ることが理解される。これはまた、絶対的な標準であり得る。

【0063】

タンパク質、細胞および化合物は、任意の順番で混合され得る。

【0064】

好ましいハイスループットスクリーニング法について、このアッセイについての全ての生化学的工工程は、例えば、試験管またはマイクロタイタープレート中の単一の溶液中で行われ、そして試験化合物は、初めに、単一の化合物濃度で分析される。ハイスループットスクリーニングの目的のために、実験条件は、スクリーニングされた全ての化合物の中から「ポジティブ（正）」の化合物として同定された試験化合物のある割合を達成するように調整される。

10

【0065】

用いられ得る他の方法としては、例えば、リバースツーハイブリッドスクリーニング（reverse two hybrid screening）[例えば、VidalおよびEndoh（1999）TIBTECH 17：374-381（ここで、Neisseriaレセプター相互作用の阻害は、転写を活性化することに失敗したとが報告されている）]が挙げられる。

【0066】

本方法はまた、単純に、1つ以上の試験化合物を、App、ORF40および／またはNadAと共にインキュベートし、そしてこれらが相互作用するか否かを決定する工程を包含する。次いで、タンパク質と相互作用する化合物は、タンパク質と上皮細胞との間の相互作用をブロックする、それらの能力について試験され得る。

20

【0067】

本発明はまた、これらの方法を用いて同定された化合物を提供する。これらは、Neisseria感染を処置または予防するために用いられ得る。化合物は、好ましくは、App、ORF40および／またはNadAに対して、少なくとも 10^{-7} M（例えば、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M以上強い）アフィニティーを有する。

【0068】

本発明はまた、（a）Appおよび／またはORF40（および、必要に応じて、NadA）を発現するE. coli細菌、ならびに（b）上皮細胞（例えば、ヒト上皮細胞）を含む組成物を提供する。

30

【0069】

（外膜小胞（OMV）における発現）

国際特許出願公報WO01/52885は、OMVワクチンに対するさらに規定された成分の添加が、それらの効力を有意に広げることを開示する。

【0070】

NmBからのOMVの調製は、当該分野で周知である。適切な調製物を得るための方法は、例えば、以下に開示される：Claassenら[Vaccine（1996）14：1001-1008]；Cartwrightら[Vaccine（1999）17：2612-2619]；Peetersら[Vaccine（1996）14：1009-1015]；Fuら[Biotechnology NY（1995）12：170-74]；Daviesら[J. Immunol. Meth.（1990）134：215-225]；Saundersら[Infect. Immun.（1999）67：113-119]；Draabickら[Vaccine（2000）18：160-172]；Morenoら[Infect. Immun.（1985）47：527-533]；Milagresら[Infect. Immun.（1994）62：4419-4424]；Naessら[Infect. Immun.（1998）66：959-965]；Rosenqvistら[Dev. Biol. Stand.（1998）92：323-333]；Hanebergら[Infect. Immun.（1998）66：1334-41]；Andersenら[Vaccine（1997）15：1225-3

40

50

4] ; B j u n e ら [L a n c e t (1 9 9 1) 3 3 8 : 1 0 9 3 - 9 6] など。

【0071】

異種 *Neisseria* 遺伝子を発現する *E. coli* から調製された OMV は、標準的な免疫源性試験において、精製した形態の抗原よりも、より良好な結果を与え得ることが本明細書中で見出されている。

【0072】

従って、本発明は、細胞が App、ORF40 または NadA のタンパク質をコードする遺伝子を発現することを特徴とする、非 *Neisseria* 宿主細胞から OMV を調製する方法を提供する。

【0073】

本発明はまた、(a) このプロセスにより得られ得る OMV、および (b) 非 *Neisseria* 宿主細胞 (この細胞は、App、ORF40 または NadA のタンパク質をコードする遺伝子を発現することを特徴とする) に由来する外膜小胞を提供する。

【0074】

非 *Neisseria* 宿主細胞は、好ましくは、細菌であり、そして、最も好ましくは、*E. coli* である。

【0075】

より一般的には、本発明は、非 *Neisseria* 宿主細胞から OMV を調製するための方法を提供し、この細胞が、以下のタンパク質の1つ以上をコードする遺伝子を発現することを特徴とする：

- (A) WO99/24578 からの配列番号 2 ~ 892 の偶数の配列番号；
- (B) WO99/36544 からの配列番号 2 ~ 80 の偶数の配列番号；
- (C) WO99/57280 からの配列番号 2 ~ 3020 の偶数の配列番号；
- (D) WO99/57280 からの配列番号 3040 ~ 3114 の偶数の配列番号；
- (E) WO99/57280 からの配列番号 3115 ~ 3241；
- (F) Tettelin ら [前出] からの 2160 個のタンパク質 (NMB0001 ~ NMB2160)；
- (G) (A) ~ (F) の1つ以上のアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (H) (A) ~ (F) の1つ以上のアミノ酸配列と配列同一性を共有するタンパク質；および
- (I) (A) ~ (F) の1つ以上のフラグメントを含むタンパク質。

【0076】

同様に、本発明はまた、(a) このプロセスにより得られ得る OMV および (b) 非 *Neisseria* 宿主細胞 (この細胞は、上記のタンパク質 (A) ~ (I) の1つ以上をコードする遺伝子を発現することを特徴とする) に由来する外膜小胞を提供する。

【0077】

(H) において言及される「配列同一性」の程度は、好ましくは、50% より大きく (例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99% 以上)、そしてこれは変異体および対立遺伝子改変体を含む。

【0078】

(I) で言及される「フラグメント」は、(A) ~ (F) の1つ以上に由来する少なくとも n 個の連続するアミノ酸を含むべきであり、そして、特定の配列に依存して、n は 7 以上 (例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100 以上) である。好ましくは、フラグメントは、(A) ~ (F) の1つ以上のエピトープを含む。好ましいフラグメントは、WO00/71574 および WO01/04316 に開示されるものである。

【0079】

(A) ~ (F) について好ましいタンパク質は、*N. meningitidis* 血清抗原型 B において見出される。

【0080】

(A p pの変異体)

W O 9 9 / 2 4 5 7 8 の配列番号 6 5 0 のアミノ酸 2 6 7 (本明細書中の配列番号 3 2) は、セリンである。A p p は、セリンプロテアーゼであると考えられており、そしてこのセリンは、その活性部位での触媒残基であると考えられる。標準的な配列整列技術が、任意の他の A p p 配列についてこの S e r - 2 6 7 に対応するアミノ酸 (例えば、W O 9 9 / 2 4 5 7 8 の配列番号 6 5 2 の中の S e r - 2 6 0、配列番号 6 5 4 の中の S e r - 2 6 7 など) を示す。

【0081】

本発明は、A p p のアミノ酸配列 (アミノ酸 S e r - 2 6 7、A s p - 1 5 8、および H i s - 1 1 5 (配列番号 3 2 に従って番号が付されている) の 1 つ以上が変異していることを除く) を含むタンパク質を提供する。変異は、欠失、挿入、または好ましくは、置換であり得る。置換は、好ましくは、19 個の他の天然に存在するアミノ酸のうちの 1 つとの置換であり、より好ましくは、グリシン、アラニン、チロシン、またはリジンとの置換である。

10

【0082】

A p p は、アミノ酸 1 0 6 3 と 1 1 7 1 (配列番号 3 2 に従い番号が付されている) との間の部位で切断されると考えられる。標準的な配列アラインメント技術により、任意の他の A p p 配列についてのこれら 2 つの残基に対応するアミノ酸が明らかにされることが認識されている。

【0083】

20

本発明は、A p p のアミノ酸配列 (アミノ酸 S e r - 1 0 6 4 および A r g - 1 1 7 1 (配列番号 3 2 に従って番号が付されている) の間の 1 つ以上のアミノ酸が変異していることを除く) を含むタンパク質を提供する。変異は、欠失、挿入、または好ましくは、置換であり得る。置換は、好ましくは、19 個の他の天然に存在するアミノ酸のうちの 1 つとの置換である。変異する残基は、好ましくは、S - 1 0 6 4、D - 1 0 6 5、K - 1 0 6 6、L - 1 0 6 7、G - 1 0 6 8、K - 1 0 6 9、A - 1 0 7 0、E - 1 0 7 1、A - 1 0 7 2、K - 1 0 7 3、K - 1 0 7 4、Q - 1 0 7 5、A - 1 0 7 6、E - 1 0 7 7、K - 1 0 7 8、D - 1 0 7 9、N - 1 0 8 0、A - 1 0 8 1、Q - 1 0 8 2、S 1 0 8 3、L - 1 0 8 4、D - 1 0 8 5、A - 1 0 8 6、L - 1 0 8 7、I - 1 0 8 8、A - 1 0 8 9、A - 1 0 9 0、G - 1 0 9 1、R - 1 0 9 2、D - 1 0 9 3、A - 1 0 9 4、V - 1 0 9 5、E - 1 0 9 6、K - 1 0 9 7、T - 1 0 9 8、E - 1 0 9 9、S - 1 1 0 0、V - 1 1 0 1、A - 1 1 0 2、E - 1 1 0 3、P - 1 1 0 4、A - 1 1 0 5、R - 1 1 0 6、Q - 1 1 0 7、A - 1 1 0 8、G - 1 1 0 9、G - 1 1 1 0、E - 1 1 1 1、N - 1 1 1 2、V - 1 1 1 3、G - 1 1 1 4、I - 1 1 1 5、M - 1 1 1 6、Q 1 1 1 7、A - 1 1 1 8、E - 1 1 1 9、E - 1 1 2 0、E - 1 1 2 1、K - 1 1 2 2、K - 1 1 2 3、R - 1 1 2 4、V - 1 1 2 5、Q - 1 1 2 6、A - 1 1 2 7、D - 1 1 2 8、K - 1 1 2 9、D - 1 1 3 0、T - 1 1 3 1、A - 1 1 3 2、L - 1 1 3 3、A - 1 1 3 4、K - 1 1 3 5、Q - 1 1 3 6、R - 1 1 3 7、E - 1 1 3 8、A - 1 1 3 9、E - 1 1 4 0、T - 1 1 4 1、R - 1 1 4 2、P - 1 1 4 3、A - 1 1 4 4、T - 1 1 4 5、T - 1 1 4 6、A - 1 1 4 7、F - 1 1 4 8、P - 1 1 4 9、R - 1 1 5 0、A - 1 1 5 1、R - 1 1 5 2、R - 1 1 5 3、A - 1 1 5 4、R - 1 1 5 5、R - 1 1 5 6、D - 1 1 5 7、L - 1 1 5 8、P - 1 1 5 9、Q - 1 1 6 0、L - 1 1 6 1、Q - 1 1 6 2、P - 1 1 6 3、Q - 1 1 6 4、P - 1 1 6 5、Q - 1 1 6 6、P - 1 1 6 7、Q - 1 1 6 8、P - 1 1 6 9、Q - 1 1 7 0、および／または R - 1 1 7 1 である。

30

40

【0084】

あるいは、A p p は、アミノ酸 9 5 6 および／またはアミノ酸 1 1 7 8 (配列番号 3 2 に従い番号が付されている) で切断されると考えられる。標準的な配列アラインメント技術により、任意の他の A p p 配列についてのこれら 2 つの残基に対応するアミノ酸が明らかにされることが認識されている。

【0085】

50

本発明は、A p pのアミノ酸配列（アミノ酸P h e－9 5 6、A s n－9 5 7、A l a－1 1 7 8、およびA s n－1 1 7 9（配列番号3 2に従って番号が付されている）の1つ以上が変異していることを除く）を含むタンパク質を提供する。変異は、欠失、挿入、または好ましくは、置換であり得る。置換は、好ましくは、1 9個の他の天然に存在するアミノ酸のうちの1つとの置換である。

【0 0 8 6】

本発明はまた、これらの変異タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0 0 8 7】

本発明はまた、この核酸を生成する方法を提供する。この方法は、（a）A p p、O R F 4 0、またはN a d Aをコードするソース核酸を提供する工程；および（b）このソース核酸に対して変異誘発（例えば、部位特異的変異誘発）を行い、変異タンパク質をコードする核酸を提供する工程を包含する。

【0 0 8 8】

本発明は、成熟A p pを提供する。

【0 0 8 9】

本発明はまた、プロセッシングを受けたA p pのアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。このプロセッシングを受けたA p pは、全長A p p中の自己タンパク質分解切断部位の下流のC末端ドメインを含まない。例えば、全長A p pとして配列番号3 2に基づき、本発明は、配列番号3 3～3 6を提供する。自己タンパク質分解の間に除去され得るC末端ドメインは、配列番号3 8および3 9である。

【0 0 9 0】

本発明はまた、プロセッシングを受けたA p pのアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。ここで、プロセッシングを受けたA p pのC末端は、P h e－9 5 6である（配列番号3 2に従って番号が付されている）。例えば、本発明は、配列番号3 3および3 5を提供する。他のA p p配列においてP h e－9 5 6に対応するアミノ酸は、標準的な配列アラインメント技術によって同定され得る。

【0 0 9 1】

本発明はまた、プロセッシングを受けたA p pのアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。ここで、プロセッシングを受けたA p pのC末端は、A l a－1 1 7 8である（配列番号3 2に従って番号が付されている）。例えば、本発明は、配列番号3 4および3 6を提供する。他のA p p配列においてA l a－1 1 7 8に対応するアミノ酸は、標準的な配列アラインメント技術によって同定され得る。

【0 0 9 2】

本発明はまた、プロセッシングを受けたA p pのアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。ここで、プロセッシングを受けたA p pは、配列番号3 7、3 8、および3 9を含まない。

【0 0 9 3】

本発明はまた、配列番号3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、および3 9からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。

【0 0 9 4】

本発明はまた、配列番号3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、および3 9の1つ以上に少なくともp %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。特定の配列に基づき、p の値は、好ましくは、5 0以上（例えば、6 0、7 0、8 0、9 0、9 5、9 9またはそれ以上）である。これらのタンパク質としては、ホモログ、オルソログ、対立遺伝子改変体、および機能的変異体が挙げられる。代表的に、2つのタンパク質の間の5 0 %以上の同一性は、機能的等価物であることを示すとみなされる。タンパク質間の同一性は、好ましくは、M P S R C Hプログラム（O x f o r d M o l e c u l a r）において、ギャップオープンペナルティー＝1 2、ギャップエクステンションペナルティー＝1のパラメータのアフィニティ検索を用いて実行される、S m i t h－W a t e r m a n相同性検索アルゴリズムによって決定される。

【0095】

本発明はさらに、配列番号33、34、35、36、37、38、および39の1つ以上のフラグメントを含むタンパク質を提供する。このフラグメントは、この配列由来の少なくともq個の連続するアミノ酸を含むべきであり、そして特定の配列に依存して、qは7以上（例えば、8、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100またはそれ以上）である。好ましくは、このフラグメントは、この配列由来の1つ以上のエピトープを含む。

【0096】

本発明はまた、本発明のこれらのタンパク質をコードする核酸を提供する。

【0097】

(NadAの対立遺伝子)

本発明は、配列番号1～14のうちの1つ以上のアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。

【0098】

本発明はまた、配列番号1～14のうちの1つ以上に少なくともx%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質を提供する。xの値は、少なくとも50%（例えば、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上）である。これらのタンパク質としては、ホモログ、オルソログ、対立遺伝子改変体、および機能的変異体が挙げられる。

【0099】

本発明により使用するためのNadAの好ましい対立遺伝子は、配列番号3（または配列番号6）である。

【0100】

本発明はまた、配列番号1～14のうちの1つ以上のフラグメントを含むタンパク質を提供する。これらは、配列番号1～14のうちの1つ以上由来の少なくともn個の連続するヌクレオチドを含むべきであり、ここで、nは6以上（例えば、7、8、9、10、11、12、14、15、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、またはそれ以上）である。このフラグメントは、配列番号1～14に共通の配列を含み得るか、または配列番号1～14に共通しない配列を含み得る。

【0101】

好ましいフラグメントは、配列番号1～14由来の1つ以上のエピトープを含む。他の好ましいフラグメントは、(a) 配列番号1～14のN末端リーダーペプチド、(b) k個のN末端アミノ酸残基を有さない配列番号1～14（kは1以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50など）である）、および(c) 1個のC末端アミノ酸残基を有さない配列番号1～14（lは1以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50など）である）である。好ましいフラグメントは、(b) または (c) の両方に含まれる（すなわち、C末端およびN末端の両方での短縮物）。

【0102】

分類(b)内の好ましいフラグメントは、N末端リーダーペプチドを欠く。従って、配列番号1、2、3、7、9、11、および13については、kの値は23であり；配列番号4、5、6、8、10、12については、kの値は25である。リーダーペプチドは、別のタンパク質によってか（すなわち、融合タンパク質を形成するため）または代替のN末端配列によって、別のタンパク質由来のリーダーペプチドと置換され得、効果的な発現がもたらされる。

【0103】

分類(c)内の好ましいフラグメントは、C末端膜アンカーを欠く。従って、lの値は、54である。このC末端欠失の小改変体が使用され得る（例えば、lは、45、46、

10

20

30

40

50

47、48、49、50、51、52、53、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66)。

【0104】

N末端配列MKHまたはMQHを有するタンパク質は、N末端配列MSMを有するタンパク質よりも好ましい。

【0105】

本発明のタンパク質は、7価配列(AA₁AA₂AA₃AA₄AA₅AA₆AA₇)を含み得る。ここで、AA₁はLeu、Ile、Val、またはMetであり；AA₂AA₃AA₄AA₅AA₆およびAA₇の各々は、独立して、任意のアミノ酸であり得；rは1以上の整数(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10など)である。rが2以上である場合、各AA₁AA₂AA₃AA₄AA₅AA₆およびAA₇の意味は、r個の7価反復の各々において同じであっても異なってもよい。この7価は、ロイシンジッパードメインを形成し得る。

10

【0106】

本発明のタンパク質は、多くの方法において(例えば、化学合成(少なくとも一部)によって、プロテアーゼを用いてより長いポリペプチドを消化することによって、RNAからの翻訳によって、細胞培養物から(例えば、組換え発現から)の精製によって、生物自体から(例えば、前立腺組織からの単離)の精製によって、細胞株供給源からの精製によって)調製され得る。

【0107】

本発明のタンパク質は、種々の形態(例えば、ネイティブ、融合、グリコシル化、非グリコシル化、リピド化、非リピド化など)において調製され得る。

20

【0108】

このタンパク質は、好ましくは、オリゴマー形態である。

【0109】

本発明のタンパク質は、固体支持体に結合または固定化され得る。

【0110】

本発明のタンパク質は、検出可能な標識(例えば、放射性標識、蛍光標識、またはビオチン標識)を含み得る。これは特に、免疫アッセイ技術において有用である。本発明のタンパク質は、好ましくは、単離された形態かまたは実質的に単離された形態である。

30

【0111】

一般的に、本発明のタンパク質は、天然で存在しない環境で提供される。例えば、それらは、それらの天然で存在する環境から分離される。特定の実施形態において、本発明のタンパク質は、コントロールと比較してタンパク質に関して濃縮された組成物中に存在する。このように、精製されたタンパク質が提供され、それ故に、精製は、そのタンパク質が、他の発現タンパク質を実質的に含まない組成物中に存在することを意味し、実質的に含まないは、その組成物の90%未満、通常60%未満、およびより通常50%未満が、他の発現タンパク質で構成されることを意味する。

【0112】

用語「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸ポリマーをいう。このポリマーは、直鎖状であっても分枝状であってもよく、改変アミノ酸を含み得、そして非アミノ酸によって割り込まれ得る。この用語はまた、天然で改変されたかまたは介入(例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、リピド化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは改変(例えば、標識要素との結合))によって改変されたアミノ酸ポリマーを包含する。例えば、1つ以上のアミノ酸のアナログ(例えば、非天然アミノ酸などを含む)および当該分野で公知の他の改変を含むタンパク質もまた、この定義の中に含まれる。タンパク質は、一本鎖または連結鎖として生じ得る。

40

【0113】

変異は、アミノ酸置換、付加、または欠失を含み得る。アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換または非必須アミノ酸を排除する置換(例えば、グリコシル化部位、リン酸化部位

50

、もしくはアセチル化部位を改変するため、または機能に必要とされない1つ以上のシステイン残基の置換または欠失によるミスフォールディングを最小限に抑えるため）であり得る。保存的アミノ酸置換は、全体的な電荷、疎水性／親水性、および／または置換されたアミノ酸の立体的な量を保存する置換である。改変体は、このポリペプチドの特定の領域（例えば、機能的ドメインおよび／または、ポリペプチドがポリペプチドファミリーのメンバーである場合、コンセンサス配列に関連する領域）の増強された生物学的活性を保持するかまたは有するように設計され得る。改変体の生成のためのアミノ酸変更の選択は、アミノ酸のアクセシビリティ（内側 対 外側）、改変対ポリペプチドの熱安定性、所望のジスルフィド架橋、所望の金属結合部位などに基づき得る。

【0114】

10

本発明はまた、上記のような本発明のタンパク質をコードする核酸を提供する。本発明はまた、この核酸由来の少なくともn個の連続するヌクレオチドのフラグメントを含む核酸を提供する。ここで、nは10以上（例えば、12、14、15、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500またはそれ以上）である。

【0115】

さらに、本発明は、好ましくは、「高ストリンジェンシー」条件下（例えば、0.1×SSC、0.5% SDS溶液中で65℃）で、本発明のタンパク質をコードする核酸にハイブリダイズし得る核酸を提供する。

【0116】

20

本発明の核酸は、ハイブリダイゼーション反応（例えば、ノザンプロットもしくはサザンプロット、または核酸マイクロアレイもしくは「遺伝子チップ」）において、および増幅反応（例えば、PCR、SDA、SSSR、LCR、TMA、NASBAなど）ならびに他の核酸技術において使用され得る。

【0117】

本発明の核酸は、多くの方法（例えば、全体または一部が化学合成によって、ヌクレアーゼ（例えば、制限酵素）を用いてより長いポリヌクレオチドを消化することによって、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、細菌自体から、などで）調製され得る。

【0118】

30

本発明の核酸は、種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プライマー、プローブ、標識化、非標識化など）をとり得る。

【0119】

本発明の核酸は、好ましくは、単離された形態または実質的に単離された形態である。

【0120】

本発明は、例えば、アンチセンスもしくはプロービングのために、またはプライマーとしての使用のために、上記の配列に相補的な配列を含む核酸を含む。

【0121】

用語「核酸」は、DNAおよびRNA、またそれらのアナログ（例えば、改変された骨格を有するアナログ）、またペプチド核酸（PNA）などを含む。

40

【0122】

本発明に従う核酸は、例えば、放射性標識または蛍光標識で標識され得る。これは特に、核酸が、核酸検出技術において使用される場合（例えば、核酸が、PCR、LCR、TMA、NASBAなどのような技術において使用するためのプライマーまたはプローブである場合）に有用である。

【0123】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列を含むベクター（例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター（例えば、核酸免疫に適したベクター））およびこのようなベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0124】

50

(免疫)

本発明は、(a) *Neisseria* NadAタンパク質および／または(b) NadAタンパク質をコードする核酸を含む免疫原性組成物を提供する。

【0125】

本発明はまた、哺乳動物において抗体応答を誘導する方法を提供する。この方法は、本発明の免疫原性組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する。この抗体応答は、好ましくは、防御抗体応答である。この防御抗体は、好ましくは、上皮細胞へのNadAおよび／またはAppの結合をブロックする。

【0126】

本発明はまた、*Neisseria*感染に対して哺乳動物を保護する方法を提供する。この方法は、本発明の免疫原性組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する。

10

【0127】

本発明はまた、医薬として使用するための*Neisseria* NadAタンパク質を提供する。

【0128】

本発明はまた、哺乳動物において*Neisseria*感染を防止するための医薬の製造におけるNadAタンパク質の使用を提供する。

【0129】

本発明はまた、哺乳動物において*Neisseria*感染を防止するための医薬の製造におけるNadAタンパク質をコードする核酸の使用を提供する。

20

【0130】

哺乳動物は、好ましくは、ヒトである。ヒトは、成人であり得、または好ましくは、子供であり得る。

【0131】

NadAタンパク質は、好ましくは、*N. meningitidis* NadAである。これは、好ましくは、配列番号1～14の1つ以上のアミノ酸配列、またはそれらに対する配列同一性を有するかもしくはそれらのフラグメントを含むアミノ酸配列を含む(上記を参照のこと)。NadAタンパク質は、好ましくは、オリゴマー形態(例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、またはそれ以上)である。配列番号1～14のうち、配列番号1～12が好ましい。なぜならば、これらのNadAタンパク質に対する抗体は、種々の超ビルレントな対立遺伝子に対して殺菌性であるからである。しかし、非超ビルレントNadA⁺株に対する免疫応答が所望される場合、配列番号13または14が好ましい。当然、NadA混合物もまた、可能であり、特に1つより多いNadA対立遺伝子を含む混合物が可能である。

30

【0132】

本発明の免疫原性組成物は、治療的(すなわち、既存の感染を処置するため)または予防的(すなわち、将来の感染を防ぐため)に使用され得る。

【0133】

本発明の使用および方法は、特に、*Neisseria meningitidis* (血清群A、BおよびCを含む)の感染に対する処置／防御のために有用である。本発明の使用および方法は、特に、ハイパービルレント(hyper virulent)系統であるET-5、ET-37およびクラスターA4由来の*N. meningitidis*の株に対して有用である。

40

【0134】

この使用および方法は、特に、髄膜炎(特に、細菌性髄膜炎)および菌血症を含むがこれらに限定されない疾患を予防／処置するために有用である。

【0135】

治療的処置の効力は、本発明の組成物の投与後に*Neisseria*感染をモニタリングすることによって試験され得る。予防的処置の効力は、この組成物の投与後にNadAに対する免疫応答をモニタリングすることによって試験され得る。

50

【0136】

本発明の組成物はさらに、哺乳動物に対して投与された場合に、N. meningitidisの系統IIIの株に対して防御的である免疫応答を誘発する抗原を含み得る。

【0137】

本発明の組成物は一般に、患者に対して直接的に投与される。直接的な送達は、非経口注射（例えば、皮下的、腹腔内、静脈内、筋内、または組織の間隙腔に）によってか、または直腸投与、経口投与、経膈投与、局所的投与、経皮投与、鼻腔内投与、眼内投与、経耳投与、または肺投与によって、達成され得る。

【0138】

本発明は、全身性免疫および／または粘膜性免疫を誘発するために使用され得る。

10

【0139】

投薬処置は、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュールであり得る。

【0140】

本発明の免疫原性組成物は、一般に、薬学的に受容可能なキャリアを含む。薬学的に受容可能なキャリアは、それ自体ではこの組成物を受容する患者に対して有害な抗体の産生を誘導せず、かつ過度な毒性を伴わずに投与され得る任意の物質であり得る。適切なキャリアは、タンパク質、ポリサッカリド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および不活性ウイルス粒子のような、大きく緩徐に代謝される高分子であり得る。このようなキャリアは、当業者に周知である。薬学的に受容可能なキャリアとしては、水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体が挙げられ得る。湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などのような補助物質もまた、このようなビヒクル中に存在し得る。リポソームは適切なキャリアである。薬学的なキャリアに関する全体的な考察は、Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 第20版, ISBN: 0683306472において利用可能である。

20

【0141】

Neisseriaの感染は身体の種々の領域に影響を及ぼす。そのため、本発明の組成物は、種々の形態で調製され得る。例えば、この組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして、注射可能なように調製され得る。注射前の液体ビヒクルにおける溶液または懸濁液に適切な固体形態もまた調製され得る。この組成物は、例えば、軟膏、クリーム、粉末として、局所的投与のために調製され得る。この組成物は、例えば、錠剤もしくはカプセル剤としてか、またはシロップ剤（必要に応じて、風味付けされる）として、経口投与のために調製される。この組成物は、微粉末または噴霧を使用して、吸入剤として、肺投与のために調製され得る。この組成物は、坐剤または腔坐薬として調製され得る。この組成物は、例えば、液滴剤として、鼻腔内投与、経耳投与または眼内投与のために調製され得る。

30

【0142】

この組成物は、好ましくは、無菌である。この組成物は、好ましくは、発熱物質を含まない。この組成物は、好ましくは、例えば、pH 6とpH 8との間に、一般的には、約pH 7に緩衝化される。

40

【0143】

免疫原性組成物は、免疫学的に有効な量の免疫原、および必要に応じて、任意の他の特定成分を含む。「免疫学的に有効な量」とは、単回用量または一連のもののなかの部分のいずれかにおいて、個体にその量を投与することが処置または予防のために有効であることを意味する。この量は、処置される個体の健康状態および身体状態、処置される個体の年齢、分類学的群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類、など）、その個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望される防御の程度、ワクチンの処方、医学的状态に関する処置医の評価、および他の関連の要因に依存して変動する。この量は、慣用的な試験を通して決定され得る比較的広い範囲内にあると予期される。投薬処置は、単回投与スケジュールであっても、複数回投与スケジュール（例えば、ブースター投与を含む）であってもよい。この

50

組成物は、他の免疫調節剤と組合せて投与され得る。

【0144】

この免疫原性組成物は、アジュバントを含み得る。組成物の効力を増強するための好ましいアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(A) アルミニウム化合物（例えば、オキシ水酸化物のような水酸化アルミニウム、またはヒドロキシホスフェートまたはオルトホスフェートのようなリン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど）、または異なるアルミニウム化合物の混合物であって、これらの化合物は任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、アモルファスなど）をとり、そして吸収性が好ましい；(B) MF59（5%スクアレン（Squalene）、0.5%Tween80、および0.5%Span85、これはマイクロフルイダイザーを使用して、サブミクロンの粒子に処方される）；(C) リポソーム；(D) ISCOM、これは、さらなる界面活性剤を欠き得る；(E) SAF、これは10%スクアレン、0.4%Tween80、5%ブルロニックブロックポリマーL121、およびth r-MDPを含み、サブミクロンのエマルジョンに微小流動化されるか、またはより大きな粒子サイズのエマルジョンを生成するためにボルテックスされるかのいずれかである；(F) Rib iTMアジュバントシステム（RAS）（Rib i Immunoch em）、これは、2%スクアレンと、0.2%Tween80と、モノホスホリルリピドA（MPL）、トレハロースジミコレート（dimycolate）（TDM）、および細胞壁骨格（CWS）からなる群由来の1つ以上の細菌細胞壁成分（好ましくは、MPL+CWS（DetoxTM））を含む；(G) サポニンアジュバント（例えば、QuilAまたはQS21（StimulonTMとしても公知））；(H) キトサン；(I) 完全フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA）；(J) サイトカイン、例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、EL-12など）、インターフェロン（例えば、インターフェロン-γ）、マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子など；(K) 微小粒子（すなわち、約100nm～約150μmの直径、より好ましくは、約200nm～約30μmの直径、そして最も好ましくは、約500nm～約10μmの直径の粒子）、これは、生分解性かつ無毒性の物質（例えば、ポリ（α-ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど）から形成される；(L) モノホスホリルリピドA（MPL）または3-O-デアシル化MPL（3dMPL）；(M) 3dMPLと、例えば、QS21および／または水中油エマルジョンとの組合せ；(N) CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド（すなわち、少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含む）であって、必要に応じて、5-メチルシトシンが、シトシンの代わりに使用される；(O) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル；(P) オクトキシノールと組合せたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤、または少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤（例えば、オクトキシノール）と組合せたポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤もしくはポリオキシエチレンアルキルエステル界面活性剤；(Q) 免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えば、CpGオリゴヌクレオチド）およびサポニン；(R) 免疫刺激物質および金属塩の粒子；(S) サポニンおよび水中油エマルジョン；(T) サポニン（例えば、QS21）+3dMPL+IL-12（必要に応じて、+ステロール）；(U) E. coli熱不安定性エンテロトキシン（「LT」）、またはその解毒された変異体（例えば、K63変異体またはR72変異体）；(V) コレラ毒素（「CT」）、またはその解毒された変異体；(W) 微小粒子（すなわち、約100nm～約150μmの直径、より好ましくは、約200nm～約30μmの直径、そして最も好ましくは、約500nm～約10μmの直径の粒子）、これは、生分解性かつ無毒性の物質（例えば、ポリ（α-ヒドロキシ酸）（例えば、ポリ（ラクチド-ε-グリコリド））、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど）から形成される；ならびに(X) この組成物の効力を増強するための免疫刺激剤として作用する他の物質。アルミニウム塩（リン酸アルミニウム、そして特に、ヒドロキシホスフェート、および／または水酸化物および特にオキシ水酸化物）およびMF59が、非経口的免

10

20

30

40

50

疫化のための好ましいアジュバントである。毒素変異体は、好ましい粘膜性アジュバントである。

【0145】

ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)などが挙げられる。

【0146】

本発明の組成物は、NadAの他に、抗原（例えば、N. meningitidisまたは他の生物に対する防御抗原）を含み得る（例えば、DTP抗原、Hib抗原など）。

10

【0147】

本発明の免疫原性組成物は、治療的（すなわち、既存の感染を処置するため）または予防的（すなわち、将来の感染を防ぐため）に使用され得る。治療的な免疫化は特に、免疫無防備状態の被験体においてCandida感染を処置するために有用である。

【0148】

本発明の免疫原性組成物においてタンパク質抗原を使用する代わりとして、この抗原をコードする核酸（好ましくは、DNA（例えば、プラスミド形態にある））が使用され得る。

【0149】

20

（ディスクレイマー）

本発明は、好ましくは、以下を排除する：（a）2002年7月26日より前、より好ましくは、2001年7月27日より前に、公的配列データベース（例えば、GenBankまたはGENESSEQ）において利用可能であったアミノ酸配列および核酸配列；（b）2002年7月26日より前、より好ましくは、2001年7月27日より前の出願日、または適用可能な場合には優先日、を有する特許出願に開示されたアミノ酸配列および核酸配列。特に、以下の特許出願における配列番号の実体が排除され得る：WO99/24578；WO99/36544；WO99/57280；WO00/22430；WO00/66741；WO00/66791；WO00/71574；WO00/71725；WO01/04316；WO01/31019；WO01/37863；WO01/38350；WO01/52885；WO01/64920；WO01/64922。

30

【0150】

（定義）

用語「含む」は、「含有する」および「構成される」を意味し、例えば、Xを「含む」組成物は、排他的にXからなり得るか、またはさらなる何かを含み得る（例えば、X+Y）。

【0151】

（本発明を実施するための態様）

（NadA相同性）

NadAは、（a）ビルレンスに關与する非ビリ線毛關連付着因子である腸病原性YersiniaのYadA [Cornelis (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1315-1352] および（b）血清耐性に關与するタンパク質でありかつ防御抗原であるMoraxella catarrhalisのUspA2 [Chenら (1999) Infect. Immun. 67:1310-1316] に対して相同性を示す。配列類似性は、主に、カルボキシル末端領域に密集している（最後の70アミノ酸において56～63%同一性）。この領域の外側では、同一性のレベルは23～25%に低下する。

40

【0152】

YadAおよびUspA2は、付着因子として同定された [Hoczyskら (2000) EMBO J 19:5989-5999]。両方のタンパク質は、外膜に固定され

50

た、非常に安定で解離の困難な高分子量オリゴマー（150～200 kDa）を形成する。NadAもまた、髄膜炎菌の外膜において非常に安定な高分子量の凝集体を形成することが見出された。

【0153】

NadAのアミノ酸配列が、分析された[Nielsenら(1997) Protein Engineering 10:1～6; LevinおよびGarner(1988) Biochim. Biophys. Acta 955:283～295; Bergerら(1995) PNAS USA 92:8259～8263; Boronerg-Bauerら(1998) Nucleic Acids Res. 26:2740～2746]。二次構造分析が、図11に示される。球状N末端および両親媒性C末端が示され、同様に、リーダーペプチド(LP)の位置および膜アンカーの位置もまた、示される。カルボキシル末端領域(アミノ酸310～362)は、推定両親媒性β構造(黒で示されるβ鎖)および末端芳香族アミノ酸を有し、これらは、外膜アンカードメインの代表的特徴である。アミノ末端領域(アミノ酸23～90)は、明確な二次構造を有さないが、このタンパク質の残りは、主にαヘリックスの性向(84.6%)を有する。この領域中で、残基90～146および残基183～288は、コイルドコイルを形成する高い確率を有する。さらに、残基122～143は、7個組反復の「a」位置に4つのロイシン残基を含み(L-x(6)-L-x(6)-L-x(6)-L)、これらのロイシン残基は、ロイシンジッパードメイン(…)を形成し得る。コイルドコイルおよびロイシンジッパー配列の両方が、ダイマー形成に関与すること、そして2つ以上のαヘリックスの会合を介してモノマーのオリゴマー形成を媒介し得ることが、公知である。

【0154】

NadAと、YadAと、UspA2との間の一次構造類似性がC末端にてクラスター形成され、従って、この3つのタンパク質間の全体的類似性は、二次構造レベルで保存されている。推定ロイシンジッパーが、NadAとUspA2との両方に存在する。NadA、YadAおよびUspA2は、4つの両親媒性β鎖および内部αヘリックス領域により形成されるカルボキシル末端膜アンカーを有し、コイルドコイルを形成する性向がある。YadAおよびUspA2において、これらのαヘリックスが、コイルドコイル領域を形成し、モノマーのオリゴマー形成を媒介することが、示されている[Hoiczkyら(2000) EMBO J 19:5989～5999; Copeら(1999) J. Bacteriol. 181:4026～4034]。

【0155】

NadAの成熟形態中にシステイン残基が存在しないことは、NadAホモログと共有される別の特徴である。

【0156】

(NadAのゲノム環境)

1086 bpのnadAコード領域は、その3'末端にターミネーター配列が隣接し、5'末端には(図12A)、このコード領域は、ATG開始コドンの8塩基対および47塩基対上流に、それぞれ、推定リボソーム結合部位(RBS; 5'-AAGG-3')および推定プロモーター領域を示す。

【0157】

このコード領域の130 bp上流は、テトラヌクレオチドTAAA(図12Aにおいて影付きの黒)の9回反復であり、その前に、-10領域および-35領域を含む第2推定プロモーターが存在する。このTAAA反復の存在が原因で、この遺伝子は、相変化を受け得る遺伝子の1つとして列挙されていたが、この反復は、コード領域中には存在しない[Tettelinら]。その相同遺伝子UspA2は、nadA中と同じ位置に位置するテトラヌクレオチド反復(AGAT)を有し、この反復は、種々の株において変動する[Copeら(1999) J. Bacteriol. 181:4026～4034]。

【0158】

nadA遺伝子およびその上流領域のG+C含量は、平均より低く(そのゲノムの残り

10

20

30

40

50

の平均51.5%に対して45%)、このことは、水平転移によりこの遺伝子が獲得されたことを示す。

【0159】

このNadA遺伝子およびその上流領域は、血清群Aの株Z2491の公開されたゲノム配列中には存在しない[Parkhikら(2000)Nature 404:502~506]。MenAゲノムにおいて、データベース中に相同性が存在しない16ヌクレオチドの短い配列が、このnadA遺伝子を置換し(図12B)、一方、その上流遺伝子および下流遺伝子(nmb1993およびnmb1995)は、十分に保存されている(91%同一性および97%同一性)。nadA領域にすぐ隣接し、Z2491血清群A株中には存在しない配列の分析によって、このセグメントにはTCAGAC直接反復が隣接することが示される。このことは、組換えの機構を示し得る。このA株において、上記16ヌクレオチドストレッチは、そのストレッチに隣接するTCAGAC反復の破壊された対を有する。

【0160】

(NadA遺伝子型の変動)

血清型Aと血清型Bとの間のnadA配列の差異を考慮して、175個の異なるN. meningitidis株が分析のために選択された。150個の単離株が、5つの疾患関連血清群(A、B、C、YおよびW-135)を示し、25株が、健常キャリアから単離された。この分析はまた、N. gorrhoeae、N. cinereaおよびN. lactamicaの各々株1つを含んだ。

【0161】

細菌は、Kellogg補充溶液(0.22M D-グルコース、0.03M L-グルタミン、0.001M硝酸鉄(III)および0.002Mコカルボキシラーゼ)(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo.)を補充した淋菌(GC)培地寒天(Difco)上で、空气中5%CO₂の加湿雰囲気下で、37℃にて一晩、以前に記載されたようにして増殖された[Knappら(1988)Antimicrob. Agents Chemother. 32:765~767; Robertsら(1977)J. Bacteriol. 131:557~563]。1つの細菌が、500μlのPBS中に溶解され、そして染色体DNAが、以前に記載されたようにして調製された[Tinsleyら(1996)PNAS USA 93:11109~11114]。

【0162】

この細菌は、PCRおよび/またはドットブロットハイブリダイゼーションによってスクリーニングされた。

【0163】

nadA遺伝子のPCR増幅は、nadAのコード領域から350nt上流および下流にマッピングされるプライマー(順方向プライマー:配列番号16;逆方向プライマー:配列番号17)と、Platinum HiFi Taq Polymerase(GIBCO)とを使用して、10ngの染色体DNAに対して実施された。PCR条件は、(95℃で30秒間の変性、60℃で30秒間のアニーリング、そして68℃で1分間の伸長)×30サイクルであった。PCR産物が、1%アガロースゲル上で分析され、そのサイズが、分子量マーカー1Kb Plus DNA Ladder(GIBCO)を使用して決定された。増幅されたフラグメントは、Qiaquickカラム(Qiagen)にて精製され、その後、その増幅されたフラグメントの両方の鎖をウォーキングするプライマーによって、自動環状配列決定された(Applied Biosystemsモデル377)。

【0164】

ドットブロットティングのために、使用されたプローブは、nadA遺伝子全体であり、これは、2996株から増幅され、そしてRoche DIG High-Prime DNA Labelling and Detection Kitを使用して、ジゴキ

シゲニンで標識された。各株の細胞懸濁物の10 μ lアリコートが、10分間沸騰され、そしてナイロン膜 (Boehringer) 上にスポットされた。この膜は、UV光に2分間曝露すること、および製造業者により報告されたような調製およびシグナル検出のための標準の手順によって、DNA架橋された。

【0165】

nadA遺伝子は、N. gonorrhoeae中には存在せず、共生種であるN. lactamicaおよびN. cinerea中にも存在しなかった。しかし、N. meningitidisにおいて、単離株のうちの47%が、nadA遺伝子の存在についてポジティブであった。

【0166】

PCR (図13) によって、NadA⁺株であるMC58 (レーン1)、90/18311株 (レーン2) および2996株 (レーン3) において、1800bp産物が生成された。PCRによって、NadA⁻株であるZ2491株およびNG3/88株 (レーン5) において、400bp産物が生成された。いくつかの株 (例えば、93/4286、C4678、2022、ISS1113) は、2500bpのPCR産物 (レーン4: L93/4286) を生じた。

【0167】

N. meningitidisの存在/非存在は、株の系統と相関性があった。侵襲性髄膜炎菌性疾患から単離された株は、多座酵素電気泳動 (MLEE) によって、少数の過剰毒性系統: 電気泳動型ET37、ET5、クラスターA4、系統III、亜群I、亜群III、および亜群IV-1へと分類された [Achtman (1995) Global epidemiology of meningococcal disease., Meningococcal disease (Cartwright編), John Wiley and Sons, Chichester, England. 159~175; Caugant (1998) APMIS 106: 505~25]。最近、配列ベースの分類である多座配列型決定 (MLST) が導入された。これにより、上記の株は、それぞれ、配列型ST11、ST32、ST8、ST41、ST1、ST5、ST4に分類される [Maidenら (1998) PNAS USA 95: 3140~3145]。健康キャリアから単離された株は、多くの異なるET型およびST型に当てはまる。

【0168】

nadA遺伝子は、過剰毒性系統ET-5、ET-37およびクラスターA4の53個の株のうちの51個 (96%) に存在したが、試験した系統IIIの株すべてに存在しなかった。25個のキャリア株のうちの7個が、ポジティブであった。試験した血清群Cの株のうちのほとんどが、たとえ過剰毒性系統に属さないとしても、ポジティブであった。同じことは、血清群Bの株について、血清型2aおよび2bとともに当てはまった。血清群Aについて、亜群IIIに属する1つの株がポジティブであったが、亜群IV-1に属する他の2つの株は、ネガティブであった。

【0169】

系統IIIは、ほんの最近、欧州および米国において導入されただけであり、ニュージーランドにおける多年にわたる地理的分離によって、この系統IIIが新規な遺伝子を獲得する能力が損なわれたようである。例えば、系統IIIをさらなる組換え事象から防ぐ周囲の染色体領域中に、変異が生じたかもしれない。可能な別の説明は、ET-5株、ET-47株およびクラスターA4株は、nadAがピークの適合を達成する必要があるが、系統IIIの単離株は、nadA挿入からいかなる有意な利益をも誘導し得ず、それによりネガティブ選択を受けるというものである。

【0170】

nadAは、3つの過剰毒性N. meningitidis系統においてこのように過剰に提示される。nadAは、過剰毒性株の部分集合に存在する外来遺伝子であるようである。

【0171】

(nadA対立遺伝子)

PCR産物が差次的にサイズ分類され(図13)、NadA⁺株のうちのほとんどは、3つの異なるサイズにグループ分けされ得たので、各サイズを示す36個の株について、遺伝子が配列決定された: 26個がポジティブ株であり、4株が長いPCR産物を有し、6株がNadA⁻株であった。

【0172】

このネガティブ株において、公開された血清群Aゲノム配列中に存在する配列と同一である、16bp配列が見出された。

【0173】

4つの長いPCR産物株の配列の分析によって、1コピーのIS1301による中断が示された。このIS1301は、終止コドンを含む162アミノ酸の後でこのタンパク質を中断する。この挿入部位は、4つの株すべてにおいて同一であったが、IS1301の方向が異なった。このことは、独立した事象を示す。IS1301についての標的コンセンサス(5'-AYTA G-3')が、A→G変異により生成されたヌクレオチド472位にて見出され、これには、TA重複が伴った。

【0174】

nadA⁺株において、遺伝子サイズは1086b~1215bpの範囲であり、結果的なコードされるタンパク質のアミノ酸配列の変動は、362アミノ酸~405アミノ酸であった。26個のNadA遺伝子のうちの22個を十分に規定された3つの対立遺伝子にクラスター形成することが可能であった(図9および図10;表I)。各対立遺伝子内のこのnadA遺伝子の配列は同一であり、対立遺伝子間の全体的同一性は、96%~99%の範囲である。この保存レベルは驚くべきものである。この保存レベルは、nadA遺伝子の弱い選択圧および/またはnadA遺伝子が非常に最近獲得されたことを示唆する。後者の可能性は、この領域におけるゲノムの低G+C含量と一致する(上記を参照のこと)。

【0175】

【表1】

対立遺伝子	下記株で見出された	配列番号
1	MC58, BZ83, BZ169, NM066, NM119, CU385, ISS832, ISS1071, ISS1104	1,4
2	90/18311, NGP165, PMC8, M986, ISS838および961-5945	2,5
3	C11, 973-1720, ISS759, F6124, 2996, 8047, NMB	3,6

図9Aに示される配列は、そのN末端アミノ酸はオープンリーディングフレーム中の最初のMetである(配列番号4~6)であるが、2番目のMet(配列番号4~6における残基3)は、より良好に位置するシャイン-ダルガーノモチーフを有する(図9B)ことを呈する。従って、この2番目のMetコドンから始まる配列が、好ましい(配列番号1~3)。

【0176】

対立遺伝子1は、362アミノ酸(配列番号1)のタンパク質をコードし、株MC58および配列決定されたET-5ポジティブ株すべてを包含する。対立遺伝子1に属する他の5つの株は、非常に最近の単離株であった。これらは、ET型に未だ分けられていないが、これらの株の血清型および血清型分類(B:15:P1.7およびB:4:P1.15)は、これらの株をET-5複合群(complex)に加入させることを示唆する。

【0177】

対立遺伝子2は、残基268(配列番号1に従う番号付け)の後での2アミノ酸付加、残基271の後での41アミノ酸付加、および122残基の後での7アミノ酸欠失(ロイシンジッパードメインの最初の7個組反復の欠失を生じる)から生じる、398アミノ酸(配列番号2)のタンパク質をコードする。固定された7残基の間隔にあるロイシン残基

は、一般的に、ロイシンジッパーを同定する。その反復中の1つのロイシンは、ほとんど Met、Val、または Ile によって、頻繁に置換されている。この場合、対立遺伝子 2 は、ロイシンジッパーモチーフを形成するために、上流または下流の Ile を使用し得る。

【0178】

対立遺伝子 3 は、405 アミノ酸（配列番号 3）のタンパク質をコードし、対立遺伝子 2 と同様に、残基 268 および残基 271 に 43 個の余分なアミノ酸を含むが、残基 122 の後に 7 アミノ酸欠失を有さないことによって対立遺伝子 2 とは異なる。対立遺伝子 3 は、血清群 A、血清群 B、および血清群 C の株において見出される。

【0179】

26 個のポジティブ株のうちの残りの 4 株（ISS1024、ISS759、973-1720、95330；表 1 において*で印を付けている）は、対立遺伝子 1～3 の微小改変体を含む：

血清群 C の ISS1024 株は、残基 229～235 に 1 つの 7 個組反復欠失を含む、対立遺伝子 2 の改変体を有する（配列番号 7/8）。この配列は、ものもと第 4 の対立遺伝子として分類されたが、対立遺伝子 2 の改変体として再分類されている。従って、対立遺伝子 2 は、すべての ET-37 株、クラスター A4 の 1 つの株およびさらなる 3 つの非 ET 型血清群 C 株において見出される；

血清群 C の ISS759 株および 973-1720 株の両方は、リーダーペプチド中に単一アミノ酸変異を含む対立遺伝子 3 の改変体を含み（配列番号 9/10）、この単一アミノ酸変異は、単一ヌクレオチド変異から生じる。対立遺伝子 3 の株すべてのうち、973-1720 のみが、過剰毒性株（クラスター A4）に属する；

血清群 B の株 95330 は、対立遺伝子 1 および対立遺伝子 2 の組換え体（キメラ）（配列番号 11/12）を含み、nadA が、対立遺伝子 2 の N 末端部分と対立遺伝子 1 の C 末端セグメントとの間の融合物である。推定組換え部位は、このタンパク質の残基 141 と残基 265 との間にほぼ位置する。

【0180】

すべての挿入および欠失は、コイルドコイル領域中で生じ、α-ヘリックスの 2 ターンまたは 6 ターンを示す、7 アミノ酸または 41 アミノ酸を含み、これにより、全体的構造を破壊することなく、このコイルドコイル領域の長さの変化が可能となる。さらに、ISS1024 における欠失は、ロイシンジッパードメインの最初の 7 個組反復の欠如をもたらすが、そのドメインを破壊はしない。なぜなら、固定された 7 残基間隔にあるロイシン残基は、ほとんど、Met、Val または Ile により置換され得るからである。この場合、対立遺伝子 2 は、ロイシンジッパーモチーフを形成するために、上流または下流の Ile を使用し得る（図 11）。

【0181】

これらの種々の NadA 配列および対立遺伝子のいずれも、本発明に従って使用され得る。

【0182】

配列分析が、推定プロモーター領域および推定ターミネーター領域（50 bp 上流、350 bp 下流）まで拡張されたとき、その 5' 領域にのみ、変化が見出された。3 つのイタリヤ株（ISS1071、ISS832 および ISS1104）は、一塩基変異について異なったが、961-5945 株において、7 塩基の差異（図 10 において*で示される）が存在した。変化はまた、TAAA テトラヌクレオチドが異なる株において 4 回～12 回反復される 5' 領域においても見出された（表 1）。反復の数は、各対立遺伝子においても変化した（表 1）。

【0183】

さらなる作業が、口腔咽頭スワブにより健常個体から単離されたキャリア株に対して、実施された。いくつかの株は、キャリアとして記載されているが、過剰毒性クラスターに属する。NadA は、上記のそのようなキャリア株すべてにおいて見出された（すなわち

10

20

30

40

50

、E T-5株において対立遺伝子1が見出され、E T-37株において対立遺伝子2が見出された)。

【0184】

NadAはまた、過剰毒性クラスターに属さない5つのキャリア株(NGE28、65/96、149/96、16269、16282)において見出された。これらの5つの株は、患者から単離された株においては見出されない配列(配列番号13および14)を共有した。この対立遺伝子は、「対立遺伝子C」(キャリア)と呼ばれる。

【0185】

対立遺伝子Cと対立遺伝子1~3とのアライメントが、図9Cに示される。そのタンパク質のコイルドコイルセグメント中での破壊が、明らかである。

10

【0186】

対立遺伝子1~3とは異なり、対立遺伝子Cタンパク質は、E. coliにおいて発現された場合に、高分子量凝集体を容易には形成しない。しかし、対立遺伝子1~3と同様に、対立遺伝子Cは、N. meningitidisの表面上に露出される。なぜなら、対立遺伝子Cは、対立遺伝子C自体に対して惹起される細菌抗体の標的であるからである。しかし、これらの抗体は、対立遺伝子1~3を保有する株に対して殺菌性ではない。同様に、対立遺伝子1~3に対して惹起される抗体は、対立遺伝子C株に対して殺菌性ではない。

【0187】

(細胞表面上のNadAオリゴマー)

20

W001/64922は、NadAがオリゴマー構造を形成することを報告する。より詳細にNadAオリゴマーを研究するために、N. meningitidisの全細胞溶解物が、ウェスタンブロットによりプロービングされた。

【0188】

細菌コロニー[MC58株(対立遺伝子1)、90/18311株(対立遺伝子2)、2996株(対立遺伝子3)、L93/4286株(IS1301挿入物)およびNG3/88株(nadA⁻)]が、0.3%グルコースを補充されたGCブロス中で定常期まで増殖された。異なる時間にサンプルが採取され、3000×gにて10分間の遠心分離によってペレットにされ、そしてPBS中に再懸濁され、そして細菌溶解するまで融解/凍結された。等量のタンパク質が、12.5%ポリアクリルアミドゲル上でのSDS-PAGEに供され、ニトロセルロース膜上にエレクトロトランスファーされた。

30

【0189】

抗NadAポリクローナル血清を調製するために、組換えNadAが発現され精製された。3つのnadA対立遺伝子(対立遺伝子1:アミノ酸24~362;対立遺伝子2:アミノ酸24~343;対立遺伝子3:アミノ酸24~350)をコードする配列が、染色体DNAに対するPCRにより増幅され、pET21b+ベクター(Novagen)中にクローニングされた。このプラスミドは、このタンパク質をC末端ヒスチジン融合物として発現するために、E. coli BL21(DE3)中に形質転換された。1mM IPTGをOD_{600nm} 0.3で添加し、その細菌をさらに3時間増殖させることによって、タンパク質発現が30℃で誘導された;発現がSDS-PAGEによって評価された。組換え融合タンパク質が、Ni²⁺結合体化キレート形成速流Sephrose 4B樹脂上でのアフィニティクロマトグラフィーによって精製された。20μgの精製タンパク質が、6週齢のCD1雌マウス(4匹/群~6匹/群)を免疫するために使用された。タンパク質が、最初の投与については完全フロイントアジュバント(CFA)とともに、そして2回目(21日目)および3回目(35日目)のブースター投与については不完全フロイントアジュバント(IFA)とともに、腹腔内投与された。出血サンプルが、49日目に採取され、そして血清学的分析のために使用された。

40

【0190】

これらのブロットは、MC58株(図14、レーン1)、90/18311(レーン2)および2996(レーン3)における高分子量反応性バンドを示した。このバンドは、

50

NG 3 / 8 8 株（レーン 5）にはなかった。サンプル緩衝液を 40 分煮沸してもこのパターンは変化しなかった。これらのタンパク質の種々のサイズは、対立遺伝子と一致していた。35～40 kDa のモノマータンパク質の予測されるサイズの範囲を考慮して、観察されるバンドの高い分子量は、NadA のオリゴマー形態の存在により説明され得る。この可能性は、IS 1301 挿入物（より短い 162 アミノ酸のタンパク質をコードし、そしてコイルドコイル領域の大部分を欠く）を含む株において、高分子量の反応性バンドが存在せず、そして、プロセッシングされたモノマータンパク質の推定分子量と一致する 14.5 kDa のバンド（図 14、レーン 4）で置き換えられているという事実により支持される。

【0191】

10

このオリゴマータンパク質は、機能的遺伝子を含む全ての株で見出されたが、発現レベルは株によって変化した（表 I）。さらに、NadA タンパク質の量は、増殖の間に同じ株内で変化した。

【0192】

多種多様な全体の NadA 発現レベルの代表として選択された 4 つの異なる株（MC 58、2996、C11、F6124）を、定常期まで増殖の間追跡した。図 15 は、試験された株（低い NadA 発現の 15A：MC 58；高い NadA 発現の 15B：2996）のうち 2 つの増殖を、OD₆₀₀ を示す曲線を用いて示す。OD₆₀₀ 増殖曲線の各点において取られたサンプルのウェスタンブロットは、NadA のバンドが、増殖の初めはほとんど見えず、増殖の間に、より強くなって、定常期には最大にまでなると示した。分析された全ての株は、同じ増殖期依存性の挙動を示した。

20

【0193】

高分子量 NadA はまた、外膜に固定された NadA と一致して、外膜ベシクルのウェスタンブロットにおいて見られた。

【0194】

同様に、対数期増殖の間の生存細菌に対する FACS 分析は、NadA が、細菌の表面に結合する抗体に利用可能であることを示した。多糖類カプセルを有する株（NMB 株）における FACS 強度は、同質遺伝子型非カプセル化変異株（M7）と比較して 1 log 減少したが、このタンパク質は、表面に露出されており、両方の株における結合に利用可能であった（図 16）。

30

【0195】

NadA は、表面に露出されたオリゴマーを形成し、これは、熱、SDS、および β-メルカプトエタノールによる還元に対して安定である。その成熟形態のシステイン残基の欠損のために、ジスルフィド結合形成は、この現象には関与し得ず；むしろこのことは、推定のコイルドコイル構造およびモノマー間の分子間相互作用を媒介し得るロイシンジッパーモチーフの存在と一致する [Lupas (1996) Trends Biochem. Sci. 21:375-382; O'Shea ら (1991) Science 254:539-544]。オリゴマーのサイズは、約 170 kDa であり、四量体構造を示唆する [WOO 1 / 64922]。しかし、剛直なコイルドコイル構造は、SDS PAGE で異常な移動度を有するようであり、従って 170 kDa の形態は、三量体であり得る。

40

【0196】

（保護免疫原性）

ポリクローナル抗 NadA 血清を、補体源として使用されるプールされたウサギ新生児血清（Cedar Lane）を用いて、以前に記載されたように殺菌活性について試験した [Pizzara (2000); Peeters ら (1999) Vaccine 17:2702-2712]。血清殺菌力価を、反応混合物中の細菌の 60 分のインキュベーション後の 1 ml あたりのコロニー形成単位（CFU）において、0 分の時点での 1 ml あたりのコントロール CFU と比較して 50 % の減少を生じる血清希釈として規定した。代表的には、補体の存在下でネガティブコントロール抗体と共にインキュベートされた細

50

菌は、60分のインキュベーションの間、CFU/mlにおける150～200%の増加を示した。

【0197】

結果は以下のとおりである：

【0198】

【表2】

株	NadA発現	対立遺伝子	殺菌性力価
2996	+++	3	32768
C11	+++	3	16384
F6124	+	3	4096
MC58	+	1	8192
BZ232	-	-	<4
NGH38	-	-	<4

示されるように、この血清は、nadA遺伝子を有する全ての株の補体媒介殺傷を誘導し、そしてこの遺伝子を有さない株に対しては不活性であった。しかし、殺菌力価は、株によって変化した。力価は、より多い量のタンパク質を発現する株に対してより高かった。この結果を、力価が増殖の初期および後期において決定された場合に確認した（図15）。

【0199】

殺菌活性における差異が、異なる対立遺伝子配列に起因したのか否かをチェックするために、免疫血清（3つのNadA型に対して惹起された）を産生させ、そして交差殺菌アッセイに使用した。この抗血清を用いて得られた結果は、上記に示される結果と同様であり、この殺菌活性は、対立遺伝子の多様性に影響されないが、抗原発現レベルに影響されることを示唆した。

【0200】

感染の間に菌血症から動物を保護する免疫血清の能力もまた、ラット新生児モデルを使用して試験した。使用された血清は、50μgの精製rNadA（対立遺伝子3）を用いてモルモットを免疫することにより得た。異系交配したWistarラット（5～7日齢）の免疫を、1回目の用量についてはCFAと共に、そしてさらなる3回の用量（28日、58日、84日）についてはIFAと共に皮下に実施した。血液サンプルを、105日目に採取し、そして動物保護アッセイに使用した。

【0201】

2つの異なるMenB株（8047および2996）を使用して2回実験を行った。各株を、連続的に新生児ラットにおいて3回継代した。実験1において、4匹のラット群を、（a）8047株からの細菌（ラット1匹あたり 7×10^3 CFU）および（b）熱不活化モルモット抗血清または抗カプセルコントロールmAb（SEAM3 [Van Der Leyら（1992）Infect. Immun. 60:3156]）の混合物100μlで腹腔内でチャレンジした。実験2において、6匹のラット群を、時間0の時点で、コントロールmAbまたはモルモット血清の種々の希釈物で処理した。2時間後、これらを2996細菌でチャレンジした（ラット一匹あたり 5.6×10^{-3} CFU）。両方の実験において、血液培養物を、防腐剤なしで約25Uのヘパリンを含有するシリンジおよび針で心臓を穿刺することにより、チャレンジ後18時間で得た。血液培養物中の細菌の数を、1、10、および100μlの血液をチョコレート寒天（chocolate agar）上に一晩プレーティングすることにより得た。幾何平均CFU/mlの計算のために、滅菌培養を用いた動物に、1 CFU/mlの値を割り当てた。

【0202】

結果は以下のとおりである：

【0203】

【表 3】

実験 ¹	処理	18時間の血液培養	
		ポジティブ/総数	CFU/ml (10 ³)
1	抗カプセル mAb (2μg/ ラット)	0/4	<0.001
	抗NadA 抗血清 (1:5 希釈)	0/4	<0.001
	PBS + 1% BSA	5/5	40.17
2	抗カプセル mAb (20μg/ラット)	1/6	0.003
	抗NadA 抗血清 (1:5 希釈)	1/6	0.002
	抗NadA 抗血清 (1:25 希釈)	3/6	0.035
	免疫前 NadA 血清	6/6	1.683

従って、抗NadA抗血清は、このアッセイにおいて高度に保護的である。

【0204】

従って、全体として、NadAは、良好なワクチン抗原であるといういくつかの特性を有する：(i) 表面に露出された分子であり、潜在的に細菌付着に参与する；(ii) 疾患関連株の少なくとも50%および3つの超毒性の系統のほとんど100%に存在する；(iii) 実験室動物において保護抗体および殺菌性抗体を誘発する；そして(iv) 各対立遺伝子は、交差殺菌性抗体を誘導する。

【0205】

(ORF40)

ORF40は、Hsfおよびその対立遺伝子改変体Hia（両方ともHaemophilus influenzaeの付着因子）に対して相同性を示す。Hia、HsfおよびORF40のサイズが異なることは、部分的に、Hsfにおける大きな繰り返しドメインの3つのコピーの存在により説明され、これは、Hiaに単一のコピーとして存在し、そしてORF40には部分的にしか存在しない（図7）。MenBにおいて、ORF40は、約200kDaのタンパク質（成熟タンパク質についての59kDaの推定分子量を参照のこと）として外膜に見出される。

【0206】

(App)

Appは、H. influenzaeの付着および浸透タンパク質Hapに対して相同性を示し（図8）、これは、自己タンパク質分解切断および細胞外放出を受ける、セリンプロテアーゼ活性を有する付着因子である [Hendrixsonら (1997) Mol Microbiol 26:505-518]。切断されない表面結合Hapは、上皮細胞への付着を媒介し、そして細菌凝集および集落形成を促進する。

【0207】

N. meningitidisにおいて、Appは、外膜へと輸送され、プロセッシングされ、そして分泌される。HapおよびAppは、両方とも自己輸送体ファミリーに属し、このファミリーは、独特の分泌機構により特徴付けられるグラム陰性細菌由来のタンパク質を含む。この系は、N. gonorrhoeaeのIgA1プロテアーゼについて最初に記載され、これは、このファミリーのプロトタイプと考えられる。自己輸送体ファミリーのタンパク質は、多くのグラム陰性病原体の毒性に参与していると示された [Henderson & Nataro (2001) Infect Immun 69:1231-1243]。これらは、以下の少なくとも3つの機能的ドメインを含む大きな前駆体タンパク質として合成される：代表的なN末端リーダー配列、内部ドメイン（パッセンジャードメイン）およびC末端ドメイン（転座ドメインまたはβドメイン）。リーダー配列は、タンパク質のペリプラズムへの輸送（sec依存性）を媒介する。続けて、この転座ドメインは、βバレル孔を形成する外膜に挿入されて、パッセンジャードメインの輸送を可能にする。一旦、細菌の表面にあると、このパッセンジャードメインは切断され得、そして周囲に放出される。切断は、パッセンジャードメイン自体におけるプロテアーゼ

10

20

30

40

50

活性により生じる自己タンパク質分解事象により起こり得る。自己輸送体のパッセンジャードメインは、広く分岐しており、それらの顕著な異なる役割を反映している。反対に、βドメインは、それらの保存された機能と一致する高度の保存性を示す。

【0208】

Appは、自己輸送体タンパク質の優勢ドメインおよび保存的セリンプロテアーゼモチーフ (GDSGSP) を保有する。このモチーフは、*Neisseria IgA1* プロテアーゼによるヒトIgAの切断、および*H. influenzae*のHapタンパク質の自己タンパク質切断を担うことが示された。Appは、髄膜炎菌の間で保存された抗原であること、感染および輸送の間に発現されること、B細胞およびT細胞を刺激すること、そして殺菌性抗体応答を誘導することが、示された [Hadiら (2001) *Mol. Microbiol.* 41:611-623; Van Ulsenら (2001) *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:53-64]。

10

【0209】

血清群Bの2996株において、Appは、1454個のアミノ酸および159,965Daの推定分子量を有する。図26は、このタンパク質の推定の構造的特徴を示す。3つのドメインが見られる：ドメイン1 (アミノ酸1~42) は、シグナルペプチドである；ドメイン2は、パッセンジャードメインであり、これは、機能的に活性なタンパク質である；ドメイン3は、βバレル構造を有するC末端転座ドメインである。

【0210】

パッセンジャードメインのN末端において、His-115、Asp-158およびSer-267は、Hap由来のセリンプロテアーゼ触媒の三組み (triad) His-98、Asp-140およびSer-243に対応する [Finkら (2001) *J Biol Chem* 276:39492-39500]。残基285~302は、推定ATP/GTP結合部位 (Pループ) であり、これは、外膜転座のためのエネルギー結合の機構を示唆する。パッセンジャードメインのC末端に向かって、2つのArgリッチ領域が存在する。第1の領域 (RRSRR) は、残基934~938であり、そして第2の領域 (RRARR) は、残基1149で始まる。これらのモチーフは、トリプシン様タンパク質分解切断部位 (例えば、ジフテリア毒素中の部位、ならびに*H. influenzae* Hap、*N. gonorrhoeae* IgA-プロテアーゼおよび*B. pertussis* FhaBの自己切断部位の上流の部位 (図26、枠1) の公知の標的の名残 (reminiscent) である。Argリッチ領域の下流は、モチーフ⁹⁵⁴NTL⁹⁵⁶および¹¹⁷⁶NSG¹¹⁷⁸であり、これらは、自己輸送体Ssp (*Serratia marcescens*)、Prn (*Bordetella bronchiseptica*)、Brka (*Bordetella pertussis*) [Joseら (1995) *Mol. Microbiol.* 18:378-380] およびHap (*H. influenzae*) (図26、枠2) における切断部位と同一であるかまたは類似する。共に、これらの配列モチーフは、2つのモチーフ⁹⁵⁴NTL⁹⁵⁶および¹¹⁷⁶NSG¹¹⁷⁸ならびにRR(A, S, R)₂RRパターンが、下流プロセッシング部位の正しい局在化のためのシグナルとして作用し得ることを示唆する。

20

30

【0211】

App配列の更なる分析は、プロリンリッチな領域 (ここでジペプチドモチーフPQは、残基1156で始まって4回繰り返されることを示す。公知のタンパク質配列に対する相同性についての検索は、*S. pneumoizie* PspAおよびPspCの表面タンパク質、および*B. pertussis*外膜タンパク質p69ペルタクチン (pertactin) のプロリンリッチ領域に対するいくつかの類似性を明らかにし、ここで(PQP)₅モチーフは、主要な免疫保護エпитープを含有するループに位置する。

40

【0212】

最後に、App (YRW) の最後の3つのアミノ酸は、Hapの最後の3つのアミノ酸と同一であり、これらは、外膜局在化およびタンパク質安定性に重要であると記載されている [Hendrixsonら、1997]。

50

【0213】

(融合パートナーを伴わないE. coliの発現)

ORF40、AppおよびNadAの全長遺伝子を、pET21b+ベクター中にクローン化し、そしてこのプラスミドで、T7プロモーターの制御下でこれらの遺伝子を発現させるために、E. coli BL21 (DE3) を形質転換した。

【0214】

発現は、このプロモーターをIPTGで活性化するか、または非誘導条件下で達成された。タンパク質の局在化および表面露出を、細胞分画実験 (SDS-PAGEおよびウェスタンブロット)、FACS分析および全細胞免疫ブロットによりアッセイした。図1～3に示されるように、これら三つのタンパク質は全て、E. coliの表面に転座されて

10

いる。
—ORF40は、モノマー形態で発現され、そしておそらくマルチマーも形成する (図1)。

—Appは、約160kDaの前駆体としてE. coli外膜に輸送され、プロセッシングされて培養上清に分泌される (図2)。

—NadAは、約180kDaの単一の高分子量バンドとして外膜の画分に存在することが見出される。これは、おそらくこのタンパク質のオリゴマー形態に対応する。このようなバンドは、E. coli発現細胞内NadAには存在しない (図3)。

【0215】

App発現を、より詳細に検討した。

20

【0216】

N. meningitidis 2996株のゲノムDNAを、以前に記載されたように調製した [Tinsley & Nassif (1996) PNAS USA 93: 11109-11114]。シグナルペプチド (アミノ酸1～42) をコードする配列および終止コドンを含むDNAを、PCRプライマー配列番号18および19を使用して増幅し、次いで、NheIおよびXhoIで消化し、そしてpET-21b発現ベクターのNheI/XhoI部位に挿入して、「pET-App-His」を得た (図27)。このプラスミドを、E. coli BL21 (DE3) に導入し、そしてC末端Hisタグ融合タンパク質の発現に使用し、このタンパク質を、精製して抗体を惹起するために使用した。全長app遺伝子を、PCRプライマー配列番号20および21を使用して同様の方法で増幅し、そしてクローン化してプラスミド「pET-App」を得た。

30

【0217】

プラスミドを、E. coli BL21 (DE3) に導入し、そして1mM IPTGを添加して発現を誘導した。この発現されたタンパク質を、ウェスタンブロットにより検出した (図28、レーン1)。このタンパク質がE. coliの表面に輸送されたことを確かめるために、FACS (図29) および免疫蛍光顕微鏡法 (図30) を使用した。FACS分析は、pET-App形質転換体 (全長遺伝子) においてポジティブな表面発現を示したが、App-His (シグナルペプチドなし) または空のベクターでは表面発現を示さなかった。免疫蛍光の結果は、FACSに一致した。従って、全長app遺伝子の発現は、E. coliの表面へのAppの輸送を生じたが、最初の42個のアミノ酸の欠失は、表面局在化をなくした。

40

【0218】

pET-App形質転換体由来の外膜タンパク質のウェスタンブロット分析は、約160kDaの特定の反応性バンドを明らかにした (図28、レーン1)。この分子量は、全長タンパク質の推定分子量に対応している。対応するバンドは、形質転換していないコントロール由来の外膜画分にはなかった (レーン3)。培養上清のウェスタンブロット分析は、pET-Appと共に約100kDaの分泌タンパク質を明らかにし (レーン2)、これは、形質転換していないコントロールには存在しなかった (レーン4)。時々、非常に弱いバンドもまた、pET-App形質転換体において約140kDaに検出された。

【0219】

50

従って、全長app遺伝子は、E. coliに導入された場合、Appタンパク質の発現を誘導し、このタンパク質は、外膜に輸送され、切断され、そして培養上清に放出される。

【0220】

(ネイティブ発現は、免疫応答の質に影響を及ぼし得る)

免疫応答の誘導に対するタンパク質コンホメーションの役割を評価するために、ORF40、AppまたはNadAを発現するE. coli由来の外膜小胞を単離し、これを使用してマウスを免疫した。殺細菌活性について血清を試験し、結果を、融合タンパク質により得られた結果と比較した。殺細菌応答(株2996)は、そのタンパク質がOMV中でそれらの「ネイティブな」形態で生成される場合に、5~10倍改善された：

10

【0221】

【表4】

抗原	殺菌力価 *	
	融合タンパク質	<i>E.coli</i> OMV
ORF40	256	2048
App	64	1024
NadA	32768	>65536

* 力価を、約50%の殺菌殺傷を得る血清希釈の逆数として表した

20

(App自己タンパク質分解性切断)

E. coli pET-App形質転換体は、100kDa産物を培養上清に分泌し、160kDa表面産物を示す。分泌App産物が自己タンパク質分解性プロセスから得られるか否かを試験するために、推定触媒性残基のうちの1つ(Ser-267)を、Alaと置換した。

【0222】

pET-AppS267A変異体を、QuickChangeキット(Stratagene)およびプライマー(配列番号22および23)を用いた部位特異的変位誘発によって得た。

【0223】

pET-AppS267A形質転換体由来する総タンパク質のSDS-PAGE分析(図31、レーン2)は、サイズがpET-App形質転換体(レーン1)に類似のタンパク質を示した。このタンパク質は、FACS分析により表面に露出されることが示された(図29)。培養上清のウェスタンブロット分析は、pET-App形質転換体(図32、レーン1)においてAppを示したが、pET-AppS267A形質転換体(レーン2)においては示さなかった。

30

【0224】

従って、Ser-267のAlaへの変異は、App前駆体(これは、細胞に結合したままである)のプロセッシングおよび分泌をなくす。これらのデータは、Appがセリンプロテアーゼ活性(これは、自己タンパク質分解性プロセッシングを担い、分泌Appドメインの上清中に放出する)を有することを示唆する。

40

【0225】

⁹⁵⁴NTL⁹⁵⁶での切断は、104190Daの推定分子量を有するフラグメントを放出する。¹¹⁷⁶NSG¹¹⁷⁸での切断は、128798Daフラグメントを与える。これら2つの推定フラグメントは、培養上清中で観察された、約140kDaおよび約100kDaの2つのバンドに適合しうる。切断は、第1に約140kDaフラグメントを与え、次いで、第2に100kDaフラグメントを与えるように生じうる。従って、Appのβドメインは、残基1177にて始まる。

【0226】

(付着因子としてのNadA、ORF40およびAppの機能)

国際特許出願WO01/64922の実施例22は、E. coliにおけるNadA発

50

現により、形質転換細菌がヒト上皮細胞に接着するようになることを開示する。この接着性の表現型は、NadAについて、AppおよびORF40についてもさらに研究された。

【0227】

非誘導性条件下または誘導性条件下で増殖させたE. coli BL21 (DE3) 細菌 (10^8 CFU) を、Changヒト上皮細胞単層 (10^5 細胞) に接種し、37℃で1時間または2時間インキュベートした。次いで、細胞を、ウサギ抗E. coli およびPE結合体二次抗体とともにインキュベートした。接着を、Chang細胞に結合する特異的蛍光強度として、FACSにより検出した。ポジティブコントロールは、hsfを発現するE. coli DH5 (DH5/pDC601) であり；ネガティブコントロールは、BL21 (DE3)/pET21bおよびDH5a/pT7-7であった。図4における結果は、組換えE. coli 株が、培養上皮細胞に接着する能力が、これら3つのタンパク質の発現と関連づけられることを示す。

10

【0228】

これら3つのタンパク質が宿主細胞との相互作用を促進しうることを確認するために、この組換えタンパク質自体を、上皮細胞への結合について研究した。 10^5 個のChangヒト上皮細胞 (Wong-Kilbourn誘導体、クローン1-5c-4、ヒト結膜) を、培地単独、または異なる濃度のORF40 ($150 \mu\text{g}/\text{ml}$)、App ($150 \mu\text{g}/\text{ml}$) もしくはNadA ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$)、あるいはネガティブコントロールとしてGNA2132 ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$) とともに、4℃にて30分間インキュベートした [Pizzara (2000) を参照のこと]。結合を、単一の組換えタンパク質に対するポリクローナル抗血清および二次PE結合体抗体を使用して、FACSにより検出した。このFACSシグナルシフト (図5) は、3つのタンパク質が、ヒト上皮細胞に結合しうる一方で、精製GNA2132 (ネガティブコントロール) は結合しないことを示す。

20

【0229】

図6Aは、結合が、用量依存性様式にて増加することを示す。NadAの結合は、約 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ にてプラトーに達する。GNA2132は、 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ においてですら結合できない (図6B)。図6におけるデータは、タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) に対してプロットされた平均蛍光強度 (MFI) 値である。

30

【0230】

FACSを使用すると、NadAの細胞への結合が、Hep-2細胞およびMOLT-4細胞でも認められたが、HeLa細胞、A549細胞、Hec-1B細胞、Hep-G2細胞、CHO細胞またはHUEC細胞では認められなかった。Chang細胞への接着は、その細胞をプロナーゼで処理することによって排除され得、このことは、NadAについてのヒトレセプターがタンパク質であることを示す。

【0231】

精製NadAタンパク質のChang結膜細胞への接着はまた、免疫蛍光顕微鏡を使用して、観察された。タンパク質 (そのC末端アンカードメインを欠く) を、種々の濃度でChang細胞とともに完全培養培地中で、37℃にて3時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、固定し、抗NadAマウスポリクローナル抗体および二次テキサスレッド結合体抗マウスIgG抗体で染色した後に、レーザー共焦点顕微鏡により分析した。0nMにおいては結合が見られなかった (図17A) が、結合は、170nM (17B) および280nM (17C) にて明らかであり、クラスタ化は、より高濃度で明らかであった。対照的に、NadAの結合は、280nMタンパク質においてですら、HeLa細胞で認められなかった (17D)。

40

【0232】

結合は、4℃ (図18B) より、37℃ではるかにより明らかであった (図18A)。37℃でのクラスタに比較して、4℃にて認められたドット様構造は、NadAモノマー間の外側からの相互作用 (lateral interaction) が温度依存性 (膜流

50

動性により影響を受ける)であることを示唆する。

【0233】

表面タンパク質とエンドサイトーシスされるタンパク質とを区別するために、サポニン界面活性剤を、染色手順の間に添加した。エンドソームのサイズを有する細胞内クラスターは、サポニンが使用される場合により明らかであった(矢印)が、より高い割合のタンパク質は、細胞表面に存在したままであった(図19)。

【0234】

免疫蛍光はまた、NadAが単球に結合することを明らかにした(図20A)。NadA単独(染色抗体なし; 20B)および免疫前血清で染色したNadAは、(20C)は、見えなかった。高倍率にて、小胞への取り込みの証拠(エンドソームまたはファゴソームのいずれか)が見られた。

10

【0235】

図21は、マウスマクロファージ(raw 264.7)がNadA(125nM、3時間、37℃; 細胞をDMEM中で培養した)を結合し、そしてNadAをエンドサイトーシス(endocytose)する(125nM、3時間、37℃; DMEM中で細胞培養)ことを示す。

【0236】

この細胞のIL- α の分泌によって測定する場合、インキュベーション前に、NadAを95℃で15分間加熱し、NadAの単球への結合活性を除去した(図22)。従って、NadA調製物の刺激活性は、熱不安定である。刺激活性はまた、抗CD14(図23)によるか、またはビーズ固定化抗CD14(図23)を用いた調製物からのNadAの除去によって、ブロックされた。

20

【0237】

免疫蛍光顕微鏡をまた用いて、E. coliが発現するNadAの結合を検出した。形質転換したE. coliは、強く結合し(図24A)、一方、非形質転換細菌は結合しなかった(図23B)。単球によって放出されたIL- α は、40:1の細菌:単球比で、形質転換E. coliを用いた場合、比形質転換細菌よりも1.5倍よりも高かった。

【0238】

形質転換したE. coliを、ガラスカバースリップに結合させ、固定しそして抗NadA(図25A)および抗E. coli抗体(図25B)を用いて二重染色した。両方が用いられた場合、抗NadAのパッチは可視的であり、NadAが細菌表面上で凝集体を形成する蛍光があり、これが抗体の他の表面抗原との相互作用を妨げることを示唆する。

30

【0239】

Appに注目し、組換えE. coli株を、Chang結膜上皮細胞(Wong-Kilbourne誘導体、クローン1-5c-4[ヒト結膜]、ATCC CCL 20.2)の単層とともにインキュベートし、そして接着を、FACSを用いて分析した。コンフルエントな単層から得た細胞を、12ウェル組織培養プレート中に、 10^5 細胞/ウェルで播種し、そして24時間インキュベートした。IPTG誘導後、細菌の培養物をPBS中で2回洗浄し、DMEM+1% FBS中に再懸濁し、 5×10^8 細菌/ml濃度とした。各々の株の1mlありコートに、Chang細胞の単層培養物を添加し、5% CO₂中で、37℃で3時間、インキュベートした。非接着性細菌を、PBSで3回洗浄することによって除去し、そして300 μ lの細胞培養液(Sigma)を、各々のマイクロタイターウェルに添加した。インキュベーションを、37℃で10分間継続した。細胞を収集し、次いでウサギポリクローナル抗E. coli抗血清(DAKO)とともに、4℃で1時間インキュベートした。細胞を、PBS+5% FBS中で2回洗浄し、R-フィコエリトリン-結合体化ウサギIgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories)とともに4℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞をPBS+5% FBS中で洗浄し、そして100 μ l PBS中に再懸濁した。FACS Caliburフローサイトメーター(Becton Dickinson)を用いて蛍光を測定した。各々の蛍光プロファイルにつき、10000細胞を分析した。図33

40

50

で報告される結果は、p E T - A p p 形質転換体が、C h a n g 細胞に付着し得、90.3%の蛍光シフトを与えることを示す。S 2 6 7 A 形質転換体もまた、付着し得る(91.0%)。非形質転換 E . c o l i は、C h a n g 細胞に付着し得なかった(F A C S プロットの底)。

【0240】

N a d A に関して、F A C S の結果は、免疫蛍光顕微鏡データと一致した。図34Aおよび図34Bに示されるように、単層とともにインキュベートしたp E T - A p p 形質転換体は、高いレベルの上皮細胞に対する接着および目に見える細菌-細菌凝集物を実証した。S 2 6 7 A 変異体について、接着および細菌凝集が増強された(図34Cおよび34D)。形質転換コントロールは、接着性を示さなかった(図34G)。最初の42アミノ酸の欠失もまた、接着性を喪失させた。

10

【0241】

C h a n g 上皮細胞と対照的に、H U V E C 内皮細胞をp E T - A p p 形質転換体もちいて試験した場合、接着性が見られなかった。敗血症および髄膜炎を発症させるために、N . m e n i n g i t i d i s は、ヒト内皮細胞との相互作用を必要とする。従って、A p p は、病理学的内皮レベルでのコロニー形成ではなく、ヒト呼吸器上に粘膜のレベルでのコロニー形成の第1工程に関与し得る。

【0242】

(A p p 結合活性の局在化および特異性)

A p p の結合領域を同定するために、A p p β と命名されたキメラタンパク質を使用した。このタンパク質は、N . g o n o r r h o e a e の I g A 1 プロテアーゼのリーダーペプチドに融合されたA p p のC末端ドメイン(アミノ酸1077~1454)からなる。淋菌のリーダー配列は、よく特徴づけられており、E . c o l i 中で機能するので、それを選択した。プラスミドp E T - A p p β は、配列番号26および27を使用したP C R により増幅された、1.1 k b p DNA フラグメントを含む。

20

【0243】

p E T - A p p β 構築物を、E . c o l i B L 2 1 (D E 3) に形質導入した。F A C S 局在化研究は、A p p β が、E . c o l i の表面に局在化されることを確認した。C h a n g 上皮細胞を使用したインビトロ接着アッセイは、免疫蛍光法によって接着を示した(図34Eおよび34F)。F A C S 分析は、p E T - A p p β 形質転換体が、まだ上皮細胞に接着し得るが、それがp E T - A p p 形質転換体より低いレベル(74.2%の移行)であることを示した。

30

【0244】

これらの結果は、A p p 結合ドメインが、そのC末端領域(残基1077と残基1176との間の100マーのフラグメント中)に位置することを示す。

【0245】

精製された組換えタンパク質もまた研究した。A p p - α - H i s は、ポリH i s タグに融合されたA p p のN末端部分(アミノ酸43~1084)からなる。プラスミドp E T - A p p α - H i s は、配列番号24および25を用いて、P C R により増幅されたN h e I / X h o I 3.1 k b p フラグメントを含む。F A C S 結合アッセイにより、精製された組換えA p p - α - H i s の結合活性を、A p p - H i s の結合活性と比較した。C h a n g 細胞を、漸増濃度のA p p 組換えタンパク質またはリボタンパク質N M B 2 1 3 2 - H i s (ネガティブコントロール)とともにインキュベートした。A p p - H i s (黒菱形)の結合は、用量依存的様式で増大し、そして約50 μ g / m l の濃度でプラトーに達したが、A p p α - H i s (黒四角)の結合は、非常に低かった(図35)。コントロールN M B 2 1 3 2 - H i s (黒三角)は、C h a n g 細胞に結合できなかった。

40

【0246】

A p p との相互作用に関連する分子の生化学的性質を探究するために、C h a n g 細胞を、結合実験の前に、プロナーゼまたはホスホリパーゼA 2 で処理した。1ウェルあたり10⁵細胞をマイクロプレート中に置き、F C S を含まないD M E M 中で、37℃、5%

50

CO₂で30分間、(a)プロナーゼ(250 μg/ml、500 μg/ml、もしくは1000 μg/ml)または(b)ホスホリパーゼA2(50 μg/ml、200 μg/ml、もしくは800 μg/ml)とともにインキュベートした。酵素のインキュベーションの後、等量の完全培地を、各ウェルに添加して反応を止めた。続いて、細胞を100 μg/mlのApp-Hisまたは培地単独と混合し、そして4℃で1時間インキュベートした。図36に示すように、プロナーゼ処理(左側カラム)は、Chang細胞へのApp-Hisタンパク質の結合を著明に低減し、一方、ホスホリパーゼA2での処理(右側カラム)は、この結合を低減しなかった。従って、Chang細胞上のAppのためのレセプターは、タンパク質性である。

【0247】

異なる細胞株に対する接着もまた試験した(図37)。培養細胞を異なる3つの濃度のApp-His(100 μg/ml、25 μg/mlおよび6.25 μg/ml)とともにインキュベートした後、Chang細胞およびHe p G2細胞への高いレベルの結合、A-549細胞への中程度のレベルの結合、およびHeLa細胞への最少のレベルの結合が見られた。He c-1-B上皮細胞株、He p-2上皮細胞株、16HBE14o上皮細胞株またはHUV EC内皮細胞への結合は見られなかった。

【0248】

(App ノックアウト)

Appに対する接着機能を示唆するE. coliでの研究の後、N. meningitidisの同系変異株を構築した。出発株はMC58であった。MC58のapp遺伝子を短縮し、そしてプラスミドpBSUDAppERM(これは、対立遺伝子交換のため、短縮app遺伝子およびermC遺伝子(エリスロマイシン耐性)を含む)を有する親株を形質転換することによって抗生物質カセットで置き換えた。簡潔に述べると、開始コドンを含む600bpの上流隣接領域および終始コドンを含む700bpの下流隣接領域を、配列番号28~31のプライマーを使用してMC58から増幅した。フラグメントを、標準的な技術を使用して、pBluescriptへとクローン化し、そしてE. coli DH5へと形質転換した。全てのサブクローン化を完了すると、本質的にコンピテン

たN. meningitidis MC58株を、GC寒天プレート上で一晩増殖したいくつかのコロニーを選択することによって形質転換し、そしてそれらを1 μgのプラスミドDNAを含む20 μlの10mM TrisHCl(pH8.5)と混合した。この混合物を、GC寒天プレート上にスポットし、5%CO₂、37℃で6時間インキュベートし、次いでPBS中に希釈し、そして5 μg/mlエリスロマイシンを含むGC寒天プレート上に広げた。MC58ゲノム中のapp遺伝子欠損をPCRによって確認した。App発現の欠損を、ウェスタンブロット分析によって確認した。

【0249】

野生MC58型および同系MC58Δapp変異株の接着を、Chang細胞上で評価した。野生型株と比較したノックアウト変異体の結合は、約1/10に(異なる実験において1/3~1/27の範囲である)減少した(図38)。He p2細胞株および16HBE14o細胞株を用いて、そしてHUV EC内皮細胞を用いて、app⁻変異体と親株との間での差異は、観察されなかった。このことは、Appがこれらの細胞に対する接着を媒介しないことを確認した。

【0250】

カプセル化の背景において、N. meningitidisの接着に寄与する非繊維毛付着因子は、以前に報告されたことはない。

【0251】

App発現を、N. meningitidis MC58において研究した。一晩増殖したプレートからのコロニーを、GCブロス中に希釈し、そして37℃にて、5%CO₂でインキュベートした。OD_{620nm}が0.5(中程度の対数期)および0.8(安定期)の時にサンプルを採取し、そしてウェスタンブロットによって分析した。見かけの分子量(約160kDaおよび約140kDa)を有する2つのバンドを、対数期細菌の全

10

20

30

40

50

細胞溶解物で検出したが（図39、レーン1）、安定期細菌は、約140kDaでの弱いバンドのみを示した（レーン3）。予測されたように、AppはΔApp変異体中で観察されなかった（レーン2および4）。

【0252】

マークされた比較において、野生型MC58の上清サンプルは、約140kDaのバンドおよびその量が、対数期よりも安定期において高いことを示した（図40、レーン3およびレーン1）。安定期のサンプルはまた、約100kDaで反応性のバンドを示した。

【0253】

本発明は、例示のみの方法によって上記され、そして本発明の範囲および精神内で維持したままで改変はなされ得ることが理解される。

【0254】

【表 5】

表 I — 26 の *N.meningitidis* 系統およびそれらの *nadA* 遺伝子の対立遺伝子の特徴

系統	血清型グループ 型: サブタイプ	クローングループ	<i>nadA</i> 対立遺伝子	(TAAA) リピート	NadA 発現
64/69	NG:15:P1.7,16	ET-5	1	4	+
BZ83	B:15	ET-5	1	5	+++
CU385	B:4:P1.15	ET-5	1	6	++
MC58	B:15:P1.7,16b	ET-5	1	9	+
BZ169	B:15:P1.16	ET-5	1	12	++
95330*	B:4:P1.15	ET-5	1	9	nd
ISS1104	B:15:P1.7,16	nd	1	4	+
ISS1071	B:15:P1.7,16	nd	1	5	+++
ISS832	B:15:P1.7	nd	1	5	++
NM119	B:4:P1.15	nd	1	6	nd
NM066	B:15:P1.7,16	nd	1	12	nd
90/18311	C:NT:P1.5	ET-37	2	9	++
NGP165	B:NT:P1.2	ET-37	2	9	++
FAM18	C:2a:P1.5,2	ET-37	2	9	nd
M986	B:2a:P1.5,2	ET-37	2	12	++
ISS1024*	C:2b:P1.5	nd	2	9	++
ISS838	C:2a:P1.5,2	nd	2	6	++
PMC8	C:	nd	2	10	++++
961-5945	B:2b:P1.21,16	A4	2	12	+++
ISS759*	C:2b:P1.2	nd	3	8	++++
F6124	A	サブグループ III	3	9	+
NMB	B:2b:P1.5,2	nd	3	12	++
8047	B:2b:P1.2	nd	3	12	+++
2996	B:2b:P1.5-1,2	nd	3	12	+++
C11	C:NT:P1.1	nd	3	12	+++
973-1720*	C:2b:P1.2	A4	3	12	+++

* は、その系統が、相対的対立遺伝子のマイナーな改変体を保有することを示す。

nd = 実施せず

【 0 2 5 5 】

【表 6 - 1】

表 II — NadA 発現について分析された *N.meningitidis* 系統の特徴

ST	ET	系統	年	血清型グループ:型:サブタイプ	国	疾患	NadA 遺伝子
74	ET5	MC58	1985	B:15:P1.7,16b	英国	ケース	+
32	ET5	H44/76	1976	B:15:P1.7,16	ノルウェー	ケース	+
32	ET5	BZ169	1985	B:15:P1.16	オランダ	ケース	+
32	ET5	30/00	2000	B:15:P1.7,16	ノルウェー	ケース	+
33	ET5	N44/89	1989	B:4,7:P1.19,15	ブラジル	ケース	+
34	ET5	BZ83	1984	B:15	オランダ	ケース	+
-	ET5	72/00	2000	B:15:P1.7,13	ノルウェー	ケース	+
-	ET5	39/99	1999	C:15:P1.7,16	ノルウェー	ケース	+
-	ET5	M4102	1996	B:ND	アメリカ合衆国	ケース	+
-	ET5	95330	1995	B:4:P1.15	カナダ	ケース	+
-	ET5	2201731	1993	NG:4:P1.15	アイスランド	キャリア	+
-	ET5	64/96	1996	NG:15:P1.7,16	ノルウェー	キャリア	+
-	ET5	CU385	1980	B:4:P1.15	キューバ	ケース	+
-	ET5	8680	1987	B	チリ	ケース	+
-	ET5	204/92	1992	B	キューバ	ケース	+
-	ET5	EG329	1985	B	ドイツ	ケース	+
-	ET5	NG080	1981	B	ノルウェー	ケース	+
-	ET5	NG144/82	1982	B	ノルウェー	ケース	+
-	ET5	NG PB24	1985	B	ノルウェー	ケース	+
-	ET5	196/87	1987	C	ノルウェー	ケース	+
-	ET5	Mk521/99	1999	B	象牙海岸	ケース	+
-	ET5	GR 4/00	2000	-	ギリシャ	ケース	+
11	ET37	FAM18	1983	C:2a:P1.5,2	アメリカ合衆国	ケース	+
11	ET37	L93/4286	1993	C	英国	ケース	+
-	ET37	NGP165	1974	B:NT:P1.2	ノルウェー	-	+
-	ET37	M986	1963	B:2a:P1.5,2	アメリカ合衆国	ケース	+
-	ET37	C4678	1998	C:2a:P1.5,2	ドイツ	ケース	+
-	ET37	95N477	1995	B:2a:P1.2	オーストラリア	ケース	-
-	ET37	BRAZ10	1976	C	ブラジル	ケース	+
-	ET37	F1576	1984	C	ガーナ	ケース	+

【 0 2 5 6 】

【表 6 - 2】

-	ET37	M597	1988	C	イスラエル	ケース	+
-	ET37	500	1984	C	イタリア	ケース	+
-	ET37	D1	1989	C	マリ	ケース	+
-	ET37	NG P20	1969	B	ノルウェー	ケース	+
-	ET37	MA-5756	1985	C	スペイン	ケース	+
-	ET37	38VI	1964	B	アメリカ合衆国	キャリア	+
-	ET37	N1/99	1999	C:2a	ノルウェー	ケース	+
-	ET37	N28/00	2000	W-135:2a	ノルウェー	ケース	+
66	A4	973-1720	1997	C:2b:P1.2	オーストラリア	ケース	+
153	A4	961-5945	1996	B:2b:P1.21,16	オーストラリア	ケース	+
-	A4	5/99	1999	B:2b:P1.5,2	ノルウェー	ケース	+
-	A4	312294	1995	C:2b:P1.5,2	英国	ケース	+
-	A4	96217	1996	B:2b:P1.5,10	カナダ	ケース	+
-	A4	G2136	1986	B	英国	ケース	+
-	A4	312 901	1996	C	英国	ケース	+
-	A4	AK22	1992	B	ギリシャ	ケース	+
-	A4	BZ10	1967	B	オランダ	ケース	+
-	A4	BZ163	1979	B	オランダ	ケース	+
-	A4	B6116/77	1977	B	アイスランド	ケース	+
-	A4	94/155	1994	C	ニュージーランド	ケース	+
-	A4	SB25	1990	C	南アフリカ	ケース	+
-	A4	N53/00	2000	C:2b:P1.5,2	ノルウェー	ケース	+
-	A4	N62/00	2000	C:2b:P1.5,2	ノルウェー	ケース	+
41	Lin.III	BZ198	1986	B:NT	オランダ	ケース	-
42	Lin.III	M198/254	1998	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-
158	Lin.III	972-0319	1997	B:NT:P1.4	オーストラリア	ケース	-
159	Lin.III	980-2543	1998	B:NT:P1.4	オーストラリア	ケース	-
1127	Lin.III	67/00	2000	B:4,7	ノルウェー	ケース	-
-	Lin.III	93/114	1993	C:4:P1.4	ベルギー	ケース	-
-	Lin.III	M198/172	1998	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-
-	Lin.III	347/97	1997	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-
-	Lin.III	386/98	1998	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-
-	Lin.III	389/98	1998	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-
-	Lin.III	392/98	1998	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-

10

20

30

40

【表 6 - 3】

-	Lin.III	394/98	1998	B:4:P1.4	ニュージーランド	ケース	-
-	Lin.III	400	1991	B	オーストリア	ケース	-
-	Lin.III	M40/94	1994	B	チリ	ケース	-
-	Lin.III	AK50	1992	B	ギリシャ	ケース	-
-	Lin.III	M-101/93	1993	B	アイスランド	ケース	-
-	Lin.III	931905	1993	B	オランダ	ケース	-
-	Lin.III	91/40	1991	B	ニュージーランド	ケース	-
-	Lin.III	50/94	1994	B	ノルウェー	ケース	-
-	Lin.III	N45/96	1996	B	ノルウェー	ケース	-
-	Lin.III	88/03415	1988	B	スコットランド	ケース	-
1	s I	BZ133	1977	B:NT	オランダ	ケース	-
5	s III	F6124	1988	A	チャド	ケース	+
4	s IV-1	205900	1990	A 4,21:P1.7:J	マリ	ケース	-
4	s IV-1	Z2491	1983	A	ガンビア	ケース	-
12	その他	NG3/88	1988	B:8(2):P1.1	ノルウェー	ケース	-
13	その他	NG6/88	1988	B:NT:P1.1	ノルウェー	ケース	-
14	その他	NGF26	1988	B:NT:P1.16	ノルウェー	キャリア	-
15	その他	NGE31	1988	B:NT	ノルウェー	キャリア	-
18	その他	528	1989	B: nd	ロシア	ケース	-
20	その他	1000	1988	B: NT:P1.5	ロシア	ケース	-
22	その他	A22	1986	W-135	ノルウェー	キャリア	-
26	その他	NGE28	1988	B:4	ノルウェー	キャリア	+
29	その他	860800	1986	Y	オランダ	ケース	-
31	その他	E32	1988	Z	ノルウェー	キャリア	-
35	その他	SWZ107	1986	B:4:P1.2	スイス	ケース	-
36	その他	NGH38	1988	B:NT:P1.3	ノルウェー	キャリア	-
38	その他	BZ232	1964	B:NT:P1.2	オランダ	ケース	-
39	その他	E26	1988	X	ノルウェー	キャリア	-
43	その他	NGH15	1988	B:8:P1.15	ノルウェー	キャリア	-
47	その他	NGH36	1988	B:8:P1.2	ノルウェー	キャリア	-
48	その他	BZ147	1963	B:NT	オランダ	ケース	-
49	その他	297-0	1987	B:4:P1.15	チリ	キャリア	-
540	その他	2996	1975	B:2b:P1.5-1,2	英国	ケース	+
1034	その他	96/1101	1996	C:14:P.1.1,7	ベルギー	ケース	-

10

20

30

40

【表 6 - 4】

-	その他	15	1990	B:14,19:P1.9,15	スロベニア	ケース	-
-	その他	M1090	1996	B:4	イスラエル	ケース	-
-	その他	M1096	1996	C:NT:P1.5	イスラエル	ケース	-
-	その他	B3937	1995	B:22:P1.16	ドイツ	ケース	+
-	その他	31	1993	B:4	フィンランド	ケース	-
-	その他	95074	1995	B:NT:P1.13	カナダ	ケース	+
-	その他	660/94	1994	B:4:P1.6	アルジェリア	ケース	-
-	その他	30/93	1993	B:14:P1.14	アルゼンチン	ケース	-
-	その他	24370	1996	B:ND	南アフリカ	ケース	-
-	その他	241175I	1993	NG:21:P1.16	アイスランド	キャリア	-
-	その他	171274I	1993	NG:15:-	アイスランド	キャリア	-
-	その他	65/96	1996	B:4:P1.14	ノルウェー	キャリア	+
-	その他	66/96	1996	B:17:P1.15	ノルウェー	キャリア	-
-	その他	149/96	1996	B:1,19:P1.5,2	ベルギー	キャリア	+
-	その他	16060	1991	B:4:P1.14	ベルギー	キャリア	-
-	その他	16489	1991	NG:21:P1.1	ノルウェー	キャリア	-
-	その他	16990	1991	NG:14:P1.5,2,6	ノルウェー	キャリア	-
-	その他	2022	1991	NG:4:P1.10	ノルウェー	キャリア	+
-	その他	M136	1968	B:11:P1.15	アメリカ合衆国	ケース	-
-	その他	860060	1988	X	オランダ	ケース	-
-	その他	NG H41	1986	B	ノルウェー	キャリア	-
-	その他	NG G40	1988	B	ノルウェー	キャリア	-
-	その他	NG4/88	1988	B	ノルウェー	ケース	-
-	その他	EG 327	1985	B	ドイツ民主共和国	ケース	-
-	その他	EG 328	1985	B	ドイツ民主共和国	ケース	-
-	その他	3906	1977	B	中国	ケース	-
-	その他	NG E30	1988	B	ノルウェー	キャリア	-
-	その他	71/94	1994	Y	ノルウェー	ケース	-
-	その他	DK24	1940	B	デンマーク	ケース	-
-	-	C11	1965	C:16:P1.7a,1	ドイツ	-	+
-	-	pmc8	-	C	-	-	+
-	-	NMB	1968	B:2b:P1.5,2	アメリカ合衆国	ケース	+
-	-	8047	1978	B:2b:P1.2	アメリカ合衆国	ケース	+
-	-	S3446	1972	B:14:P1.23,14	アメリカ合衆国	ケース	-

10

20

30

40

【表 6 - 5】

-	-	ISS 749	1996	B:14:P1.13	イタリア	ケース	-
-	-	ISS 759	1996	C:2b:P1.2	イタリア	ケース	+
-	-	ISS 832	1997	B:15:P1.7	イタリア	ケース	+
-	-	ISS 838	1997	C:2a:P1.5,2	イタリア	ケース	+
-	-	ISS1001	1999	B:14:P1.13	イタリア	ケース	-
-	-	ISS1024	2000	C:2b:P1.5	イタリア	ケース	+
-	-	ISS1026	2000	B:4:P1.13	イタリア	ケース	-
-	-	ISS1071	2000	B:15:P1.7,16	イタリア	ケース	+
-	-	ISS1102	2000	B:15:P1.4	イタリア	ケース	-
-	-	ISS1104	2000	B:15:P1.7,16	イタリア	ケース	+
-	-	ISS1106	2000	B:4:P1.4	イタリア	ケース	-
-	-	ISS1113	2000	C:2a:P1.5	イタリア	ケース	+
-	-	N1002/90	-	-	ブラジル	-	+
-	-	IMC2135	-	-	ブラジル	-	+
-	-	NM001	-	B:4:P1.4	英国	ケース	-
-	-	NM002	-	B:NT:P1.16	英国	ケース	-
-	-	NM004	-	B:NT:P1.14	英国	ケース	-
-	-	NM008	-	B:4:P1.4	英国	ケース	-
-	-	NM009/10	-	B:4:P1.3,6	英国	ケース	-
-	-	NM021	-	B:4:P1.16	英国	ケース	-
-	-	NM036	-	C:2a:P1.10	英国	ケース	+
-	-	NM037	-	B:2b:P1.10	英国	ケース	+
-	-	NM050	-	B:NT:P1.9	英国	ケース	-
-	-	NM058	-	B:NT:NST	英国	ケース	-
-	-	NM066	-	B:15:P1.7,16	英国	ケース	+
-	-	NM067	-	C:2a:NST	英国	ケース	+
-	-	NM069	-	B:15:P1.7,16	英国	ケース	+
-	-	NM081	-	C:2a:P1.5,2	英国	ケース	+
-	-	NM088	-	C:2a:P1.5,2	英国	ケース	+
-	-	NM092	-	B:4:P1.4	英国	ケース	-
-	-	NM106	-	B:NT:P1.4	英国	ケース	-
-	-	NM107/8	-	B:4:P1.4	英国	ケース	-
-	-	NM117	-	B:21:P1.9	英国	ケース	-
-	-	NM119	-	B:4:P1.15	英国	ケース	+

10

20

30

40

【表 6 - 6】

-	-	NM131	-	B	英国	ケース	-
-	-	NM145	-	C	英国	ケース	+
-	-	NM154	-	C:NT:P1.5,2	英国	ケース	+
-	-	NM156	-	B:15:P1.16	英国	ケース	+
-	-	NM167	-	B	英国	ケース	-
-	-	NM184	-	B:NT:P1.5,2	英国	ケース	-
-	-	NM186	-	B	英国	ケース	-
-	-	NM188	-	B	英国	ケース	+
-	-	NM200	-	B:4:P1.4	英国	ケース	-

10

【0 2 6 1】

【表 7】

表 3 配列表

配列番号	説明
1	9 6 1 のうちの対立遺伝子 1
2	9 6 1 のうちの対立遺伝子 2
3	9 6 1 のうちの対立遺伝子 3
4	9 6 1 のうちの対立遺伝子 1 (第一—A T G 開始)
5	9 6 1 のうちの対立遺伝子 2 (第一—A T G 開始)
6	9 6 1 のうちの対立遺伝子 3 (第一—A T G 開始)
7	I S S 1 0 2 4 系統における 9 6 1 のうちの改変体対立遺伝子 2
8	I S S 1 0 2 4 系統における 9 6 1 のうちの改変体対立遺伝子 2 (第一—A T G 開始)
9	9 7 3 ~ 1 7 2 0 系統および I S S 7 5 9 系統における 9 6 1 のうちの対立遺伝子 3
1 0	9 7 3 ~ 1 7 2 0 系統および I S S 7 5 9 系統における 9 6 1 のうちの対立遺伝子 3 (第一—A T G 開始)
1 1	9 6 1 対立遺伝子 1 / 2 キメラ (9 5 3 3 0 系統)
1 2	9 6 1 対立遺伝子 1 / 2 キメラ (9 5 3 3 0 系統) (第一—A T G 開始)
1 3	9 6 1 対立遺伝子 C
1 4	9 6 1 対立遺伝子 C (第一—A T G 開始)
1 5	配列番号 1 3 についてのコード配列
1 6 ~ 3 1	P C R プライマー
3 2	W O 9 9 / 2 4 5 7 8 からの配列番号 6 5 0
3 3 ~ 3 9	配列番号 3 2 のドメイン誘導体

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0262】

【図1】図1は、ORF40についての発現データを示す。

【図2】図2は、Appについての発現データを示す。

【図3】図3は、NadAについての発現データを示す。

【図4】図4は、ヒト細胞に対する接着に關与するタンパク質のFACS分析を示す。図4において、データは、左側から右側に、ORF40（黒三角）、App（黒丸）、NadA（黒菱形）、およびGNA2132（黒四角）についてである。

【図5】図5は、ヒト細胞に対する接着に關与するタンパク質のFACS分析を示す。図5において、データは、左側から右側に、ORF40（黒三角）、App（黒丸）、NadA（黒菱形）、およびGNA2132（黒四角）についてである。

10

【図6】図6は、ヒト細胞に対する接着に關与するタンパク質のFACS分析を示す。図6において、データは、左側から右側に、ORF40（黒三角）、App（黒丸）、NadA（黒菱形）、およびGNA2132（黒四角）についてである。

【図7】図7は、ORF40の相同性を示す。

【図8】図8は、Appの相同性を示す。

【図9A】図9は、NadA対立遺伝子のアラインメントを示す。

【図9B】図9は、NadA対立遺伝子のアラインメントを示す。

【図9C】図9は、NadA対立遺伝子のアラインメントを示す。

【図10】図10は、対立遺伝子1～3の關係を示す。

20

【図11】図11は、NadAについて推定される二次構造を示す。

【図12】図12は、NadAの上流および下流の配列に關する分析を示す。

【図13】図13は、N. meningitidisの異なる株におけるNadAの発現に關するPCR分析を示す。

【図14】図14は、N. meningitidisの異なる株におけるNadAの発現に關するイムノプロット分析を示す。

【図15】図15は、培養時間に伴うNadA発現の変化を示す。

【図16】図16は、同系カプセル化および非同系カプセル化されたN. meningitidis細胞のNadA FACSを示す。

【図17】図17は、Chang細胞（17A～17C）またはHeLa細胞（17D）に対する抗NadAを使用して得られた免疫蛍光の結果を示す。

30

【図18】図18は、（A）37℃または（B）4℃でのインキュベーション後に、Chang細胞に対する抗NadAを使用して得られた免疫蛍光の結果を示す。

【図19】図19は、サポニンで処理されたChang細胞についての免疫蛍光の結果を示す。

【図20】図20は、単球を使用して得られた免疫蛍光の結果を示す。

【図21】図21は、マクロファージを使用して得られた免疫蛍光の結果を示す。

【図22】図22は、NadA処理に応答した単球によるIL- α の分泌を示す。【図23】図23は、単球によるIL- α の分泌に対する抗CD14の効果を示す。

【図24】図24は、NadAを発現するように形質転換されたE. coliに対して抗NadAを使用して得られた免疫蛍光の結果を示す。

40

【図25】図25は、（A）抗NadA、（B）抗E. coliまたは（C）両方を使用して形質転換されたE. coliの染色を示す。

【図26】図26は、Appの特徴に關する模式図である。N末端のリーダーペプチド、パッセンジャードメインおよびC末端の β ドメインが示される。セリンプロテアーゼ活性部位、ATP/GTP結合部位、2つのアルギニンリッチ部位およびプロリンリッチ領域の位置が示される。ボックス1において切断部位を示す。ボックス2において、異なる自己輸送体の既知のタンパク質分解性部位の比較を示し、そしてコンセンサスな特徴を導き出す。矢印は、切断点を同定する；X=任意のアミノ酸；hyd=疎水性残基；（A，S）=アラニンまたはセリン。

50

【図27】図27は、Appを研究するために使用された構築物の模式図である。

【図28】図28は、E. coliにおける外膜および細胞外タンパク質のウェスタンブロットを示す。

【図29】図29は、E. coliにおける外膜および細胞外タンパク質のFACS分析を示す。

【図30】図30は、E. coliにおける外膜および細胞外タンパク質の免疫蛍光を示す。

【図31】図31は、SDS-PAGEによって分析された全E. coliタンパク質を示す。

【図32】図32は、App-hisに対するマウス抗血清を使用した、粗製沈殿された培養上清のイムノブロットを示す。

10

【図33】図33は、E. coliに対するウサギ抗血清を使用した、FACS接着データを示す。接着に対して陽性の細胞のパーセンテージが、蛍光プロファイルのそばに示される。

【図34】図34は、細菌性の接着および凝集を示す、免疫蛍光顕微鏡データを示す。

【図35】図35は、正味の蛍光強度平均(MFI)として表されたApp-His(黒菱形)、App α -His(黒四角)およびNMB2132(黒三角)の濃度依存性結合を示す。

【図36】図36は、酵素濃度の漸増を伴う、プロナーゼ(左手の柱)またはホスホリパーゼA2(右手の柱)とのプレインキュベーションのApp-His(100 μ g/ml)結合に対する効果を示す。プロナーゼを、0、250、500、1000 μ g/mlで試験した；ホスホリパーゼA2を、0、50、200、800 μ g/mlで試験した。

20

【図37】図37は、種々の異なる細胞に対する、100、25または6.25 μ g/mlでのApp-Hisタンパク質の細胞結合特異性の比較である。

【図38】図38は、野生型またはAppノックアウトのN. meningitidis MC58細菌の結合を示す。

【図39】図39は、0.5または0.8のOD_{620nm}で収集されたN. meningitidis MC58由来の全溶解産物のウェスタンブロット分析を示す。レーン1および3は、野生型MC58を示し、そしてレーン2および4は、Appノックアウトを示す。

30

【図40】図40は、図39と並行した上清のウェスタンブロット分析を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID 1 – allele 1 of *NadA*

MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATSDDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIGEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 VNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET
 5 NTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKADIKNARSARIDSLDKNVANLRKETR
 QGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVGNYEW

SEQ ID 2 – allele 2 of *NadA*

MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 VNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD
 10 EAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATT
 EKLDTRLASAEKSITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSS
 GSSAAYHVGNYEW

10

SEQ ID 3 – allele 3 of *NadA*

MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 VNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET
 15 NTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFVRI
 DGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAG
 VAVGTSSGSSAAYHVGNYEW

SEQ ID 4 – allele 1 of *NadA* (first-ATG start)

MSMKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATSDDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIGEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 KTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLD
 20 ETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKADIKNARSARIDSLDKNVANLRKE
 TRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVGNYEW

SEQ ID 5 – allele 2 of *NadA* (first-ATG start)

MSMKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 KTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD
 25 EAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNAT
 TTEKLDTRLASAEKSITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGT
 SSGSSAAYHVGNYEW

20

SEQ ID 6 – allele 3 of *NadA* (first-ATG start)

MSMKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 KTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLD
 30 ETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFV
 RIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAK
 35 AGVAVGTSSGSSAAYHVGNYEW

SEQ ID 7 – variant allele 2 of *NadA* in strain ISS1024

MKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 VNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD
 40 EAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRL
 ASAEKSITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYH
 VGNYEW

30

SEQ ID 8 – variant allele 2 of *NadA* (first-ATG start) in strain ISS1024

MSMKHFPKSVLTTAILATFCSGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKT
 KTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD
 45 EAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFVRIDGLNATTEKLDTRL
 LASAEKSITEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAA
 YHVGNYEW

SEQ ID 9 – variant allele 3 of *NadA* in strains 973-1720 and ISS759

MQHFPKSVLTAILATFCGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKT
 VNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFABETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET
 NTKADEAVKTANEAKQTAEBTKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFPVRI
 DGLNATTEKLDTRLASAESKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVICTGFRFTENFAAKAG
 VAVGTSSGSSAAYHVG VNYEW

SEQ ID 10 – variant allele 3 of *NadA* (first-ATG start) in strains 973-1720 and ISS759

MSMQHFPKSVLTAILATFCGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKT
 KTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFABETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDET
 ETNTKADEAVKTANEAKQTAEBTKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESDSKFPV
 RIDGLNATTEKLDTRLASAESKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVICTGFRFTENFAAK
 AGVAVGTSSGSSAAYHVG VNYEW

SEQ ID 11 – *NadA* allele 1/2 chimera (strain 95330)

MRKHFPSKVLTTAILATFCGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKT
 VNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFABETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD
 EAVKTANEAKQTAEBTKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQA
 ALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVICTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVG VNYEW

SEQ ID 12 – *NadA* allele 1/2 chimera (strain 95330) (first-ATG start)

MSMKHFPSKVLTTAILATFCGALAAATNDDVKKAAATVAIAAAYNNGQINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVVNLTKT
 KTVNENKQNVDAKVKAASEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFABETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKAD
 EAVKTANEAKQTAEBTKQNVDAKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQA
 QAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVICTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVG VNYEW

SEQ ID 13 – *NadA* allele C

MRKHFPSKVLTTAILAALSGSAMADNAPTADDEIAKAALVNSYNNTQDINGFTVGDITTYDIKNDKITKKEATEADVEADDFKGLGLKEVVAQHDQSLA
 DLTFETVNSEALVKTAAVVNDISADVKAANTAAIGENKAAIATKADKTELDKVSGKVTENETAIGKKANSADVTTKAEVYTKQESDNRFVKISDGI
 GNLTNTANGLETTLAAAEQSVADHGTRLASAESKSI TEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVI
 GTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVG VNYEW

SEQ ID 14 – *NadA* allele C (first-ATG start)

MSMKHFPSKVLTTAILAALSGSAMADNAPTADDEIAKAALVNSYNNTQDINGFTVGDITTYDIKNDKITKKEATEADVEADDFKGLGLKEVVAQHDQSLA
 LADLTFETVNSEALVKTAAVVNDISADVKAANTAAIGENKAAIATKADKTELDKVSGKVTENETAIGKKANSADVTTKAEVYTKQESDNRFVKISD
 GTGNLTNTANGLETTLAAAEQSVADHGTRLASAESKSI TEHGTRLNGLDRTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESASAVI
 IGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVG VNYEW

SEQ ID 15 – coding sequence for SEQ ID 13

ATGAACACTTTCCATCCAAAGTACTGACCCGACCCATCCTTGC CGCCCTCAGCGGCAGCGCAATGGCAGACAACGCCCCACCCTGACGAAAT
 GCCAAGCCGCCCTAGTTAACTCCTACAACAATACCCAGACATCAACGGATTACAGTCGGAGACACCATCTACGACATTAATAATGACAAGATT
 ACCAAAAAGAGCAACAGAACGCCGATGTTGAAGCTGACGACTTTAAAGCTCTGGGTCTGAAAGAAGTCGTGGCTCAACACGACCAAGCCTTGCC
 GACCTGACCGAAACCGTCAATGAAACAGCGAAGCATTTGTAATAACCGCCGCTTGTCAATGACATCAGTCCGATGTCAAAGCCACACAGCA
 GCTATCGGGGAAAACAAAGCTGCTATCGCTACAAAGCAGACAAAACCGAACTGGATAAAGTGTCCGGCAAGTAACCGAGAACGAGACTGCTATC
 GGTAAAAAGCAACAGTCGCCGACGTGTACACTAAAGCTGAGGTGTACACCAAAACAGAGTCTGACAAACAGATTGTCAAATTTAGTGACGGAATC
 GGTAATCTGAACACTACTGCCAATGGATTGGAGACACGCTTGGCCGCTGCCGAACAATCCGTTGCAGACCACGGTACCGCGCTTGGCTTCTGCCGAA
 AAATCCATTACCGAACACGGTACGCGCTGAAACGGTTTGGATAGAACAGTGTGACACCTGCGTAAAGAAACCCGCCAAGCCCTTCGAGAACAGCC
 GCGCTCTCCGCTGTGTTCCAACCTTACAACGTGGGTGCTTCAATGTAAACGGCTGCAGTCGGCGCTACAAATCCGAATCGGCAGTCGCCATCGGT
 ACCGCTTCCGCTTTACCGAAAACCTTTCGCCCAAAGCAGCGGTGGCAGTCGGCAGTTCGTCGGCTTCTTCGCCAGCCTACCATGTGCGCGTCAAT
 TACGAGTGGTAA

SEQ ID 16 – forward primer

GTCGACGTCCTCGATTACGAAG

SEQ ID 17 – reverse primer

CGAGGCGATTGTCAAACCGTTC

- SEQ ID 18 – forward primer**
cgcgatccgctagcGGACACACTTATTTTCGG
- SEQ ID 19 – reverse primer**
cccgtcgcagCCAGCGGTAGCCTAATTG
- 5 **SEQ ID 20 – forward primer**
cgcgatccgctagcAAAACAACCGACAAACGG
- SEQ ID 21 – reverse primer**
cccgtcgcagTTACCAGCGGTAGCCTAATTG
- 10 **SEQ ID 22 – mutagenesis primer**
CTCATTTCGGGACgctGGCTCACCAGTGTATCTATGATG
- SEQ ID 23 – mutagenesis primer**
CATCATAGATAAACATTTGGTGAGCCagcGTCGCCAAATGAG
- SEQ ID 24 – forward primer**
cgcgatccgctagcGGACACACTTATTTTCGG
- 15 **SEQ ID 25 – reverse primer**
cccgtcgcagCAGCGGTCAAGGCTT
- SEQ ID 26 – forward primer**
gggaattccatatgaaagccaaacgttttaaaattaagccatatccttatccatctttcttgccctatgcccttaagccatactcagaagcggcta
gcGACAACCGCAAGCCTTGACGCGCT
- 20 **SEQ ID 27 – reverse primer**
cccgtcgcagTTACCAGCGGTAGCCTAATTG
- SEQ ID 28 – knockout primer**
gctctagaggaggtgtcgaaacc
- 25 **SEQ ID 29 – knockout primer**
tcccccgggcggttgctcgtttgtcg
- SEQ ID 30 – knockout primer**
tcccccgggcggttcataaattagc
- SEQ ID 31 – knockout primer**
Cccgtcgcagcgaaccgtccgtgac
- 30 **SEQ ID 32 – SEQ ID 650 from WO99/24578**
MKTIDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYYRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMKAPMIDFSVV
SRNGVAALVCDQYIVSAHNGGYNNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAPVEMTSYMDGRKYTDQNNYP
DRVIRIGAGRQYWRSDDEPNRESSYHIASAYSWLVGGNTFAQNGSGGTVNLGSEKIKHSPYGFPLPTGGSPGDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQ
TGNPYIGKSNQFLVRKDMFYDEIFAGDTHSVFYEPQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVLSSETAREPVYHAAGGVNS
35 YRPNLNGENISFIDECKGELLTSTNINQAGGLYFQGDFTVSPENNETWQAGVHISEDSTVTKVNGVANDRLSKIGKTLHVQAKGENQGSIS
VGDTVILDQQADDKQKQAFSEIGLVSGRGTVQLWADNQPNPKLYPGRGRLDLNGHSLSPHRIQNTDEGAMIVNHNQKESVTITGNKDIA
TTGNMNSLDSKKEIAYNGWFGKEDTTKTNGRLNLVYQPAEDRTLTLSCGTNLNGNITQTNGLFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIVWD
NDWINRTFKAENFQIKGGQAVVSRNVAKVKGDWHLNSHAQAVFGVAPHQSHTICTRSDWTGLTNCVEKTTDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHL
NLTGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVCNAQATFNQATLNCNTSASGNASFNLSHDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSLADKA
40 VFHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDSEWTLPSGTELGNLNLNDNATITLNSAYRHDAAAGATGSATDAPRRRSRRSRLSVTPPTSVESRFTLT
VNGKLNQGTFRFMSELFQYRSDKLKLAESSEGTYYTLAVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFNLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGFEFLHN
PVKEQELSDKLGAFAKQAEKDNAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGINQABEEKRVQADKDTALAKQREAEETRPATTAFFRAR
RARRDLFQLQPPQPPQDLISRYANGLSEFSATLNSVFAVQDELDRVFAEDRRNAVWTSIGIRDTHYRSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGS
RVGILFSHNRTENTFDDGIGNSARLAHGAVFQGYGIDRFYIGISAGAGFSGSLSDGIGGKIRRRVLIHYGIQARYRAGFCGPGIEPHICATRYFVQ
45 KADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPYLSLSYTDASGNVTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAELKGFILSLHAAAAG
PQLEAQHSAGIKLGYRW

SEQ ID 33 – App domain derivative

MRTTDPKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYYRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTPKPMIDFSVV
 SRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNMYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAPVEMTSYMDGRKYIDQNNYP
 DRVRIGACRQYWRSDDEPNRESSYHIASAYSWLVGNTFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGFLLPTGGSGDSSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQ
 5 TGNPYIGKSNCFQVLRKDWFYDEIFAGDTHSVFYEPQNGKYSFNDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNS
 YRPLNNGENISFIDEGKGELILTSNINQAGAGLYFQGDFTVSPENNETWQAGVHISEDSTVTVKWVNGVANDRLSKIGKGTTLHVQAKGENQGSIS
 VGDGTVILDQADDKGGKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFNPDKLYFGFRGRLDLNGHLSLPHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTTITGNKDIA
 TTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKDDTTKTNGRLNLVYQPAEDRTLLSGGTNLNGNITQTNGKLFPSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIWD
 NDWINRTFKAENFQIKGGQAVVSRNVAKVKGDWHLNSHAQAVFGVAPHQSHITCTRSDWTGLTNCVEKITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHL
 10 NLTLGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSADKA
 VPHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDEWTLPSGTTELGNLNDNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSLSVTPPTSVESRF

SEQ ID 34 – App domain derivative

MRTTDPKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYYRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTPKPMIDFSVV
 SRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNMYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAPVEMTSYMDGRKYIDQNNYP
 15 DRVRIGACRQYWRSDDEPNRESSYHIASAYSWLVGNTFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGFLLPTGGSGDSSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQ
 TGNPYIGKSNCFQVLRKDWFYDEIFAGDTHSVFYEPQNGKYSFNDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNS
 YRPLNNGENISFIDEGKGELILTSNINQAGAGLYFQGDFTVSPENNETWQAGVHISEDSTVTVKWVNGVANDRLSKIGKGTTLHVQAKGENQGSIS
 VGDGTVILDQADDKGGKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFNPDKLYFGFRGRLDLNGHLSLPHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTTITGNKDIA
 TTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKDDTTKTNGRLNLVYQPAEDRTLLSGGTNLNGNITQTNGKLFPSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIWD
 20 NDWINRTFKAENFQIKGGQAVVSRNVAKVKGDWHLNSHAQAVFGVAPHQSHITCTRSDWTGLTNCVEKITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHL
 NLTLGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSADKA
 VPHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDEWTLPSGTTELGNLNDNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSLSVTPPTSVESRFNLT
 VNGKLNQGTFRFMSSELPYRSDKLLAESSEGYTTLAVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFTLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGEPRLHN
 PVKEQELSDKLGKAEAKKQAEKDQAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGMQAEBEKKRVQADKDTALAKQREAEETRPATTAFFRAR
 25 RARRDLPLQLPQPQPQQRDLISRYA

SEQ ID 35 – App domain derivative

GHTYFGINYQYYRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTPKPMIDFSVSRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNVDFGAEGRNPDQHRFTY
 KIVKRNMYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAPVEMTSYMDGRKYIDQNNYPDRVRIGACRQYWRSDDEPNRESSYHIASAYSWLVGNTFA
 30 QNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGFLLPTGGSGDSSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQGTGNPYIGKSNCFQVLRKDWFYDEIFAGDTHSVFYEPQNGKY
 SFNDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPLNNGENISFIDEGKGELILTSNINQAGAGLYFQGDFTV
 SPENNETWQAGVHISEDSTVTVKWVNGVANDRLSKIGKGTTLHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQADDKGGKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFN
 PDKLYFGFRGRLDLNGHLSLPHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTTITGNKDIAATTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKDDTTKTNGRLNLVYQPAED
 RTLLSGGTNLNGNITQTNGKLFPSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAVVSRNVAKVKGDWHLNSHAQAV
 FGVAPHQSHITCTRSDWTGLTNCVEKITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHLNLTLGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATF
 35 NQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSADKAVPHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDEWTLPSGTTELGNLND
 NATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSLSVTPPTSVESRF

SEQ ID 36 – App domain derivative

GHTYFGINYQYYRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTPKPMIDFSVSRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNVDFGAEGRNPDQHRFTY
 KIVKRNMYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAPVEMTSYMDGRKYIDQNNYPDRVRIGACRQYWRSDDEPNRESSYHIASAYSWLVGNTFA
 40 QNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGFLLPTGGSGDSSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQGTGNPYIGKSNCFQVLRKDWFYDEIFAGDTHSVFYEPQNGKY
 SFNDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPLNNGENISFIDEGKGELILTSNINQAGAGLYFQGDFTV
 SPENNETWQAGVHISEDSTVTVKWVNGVANDRLSKIGKGTTLHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQADDKGGKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFN
 PDKLYFGFRGRLDLNGHLSLPHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTTITGNKDIAATTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKDDTTKTNGRLNLVYQPAED
 RTLLSGGTNLNGNITQTNGKLFPSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAVVSRNVAKVKGDWHLNSHAQAV
 45 FGVAPHQSHITCTRSDWTGLTNCVEKITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHLNLTLGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATF
 NQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSADKAVPHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDEWTLPSGTTELGNLND
 NATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSLSVTPPTSVESRFNLTVNGKLNQGTFRFMSSELPYRSDKLLAESSEGYTTLAVNNT
 GNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFTLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGEPRLHNPVKEQELSDKLGKAEAKKQAEKDQAQSLDALIAAGRDAVEK
 TESAEPARQAGGENVGMQAEBEKKRVQADKDTALAKQREAEETRPATTAFFRARARRDLPLQLPQPQPQQRDLISRYA

SEQ ID 37 – App domain derivative

NLTFTVNGKLNQGTFRFMSSELPYRSDKLLAESSEGYTTLAVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFTLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGEP
 RLHNPVKEQELSDKLGKAEAKKQAEKDQAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGMQAEBEKKRVQADKDTALAKQREAEETRPATTAFF
 PRARRARRDLPLQLPQPQPQQRDLISRYA

SEQ ID 38 – App domain derivative

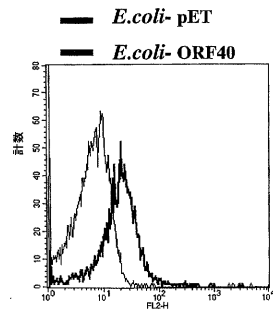
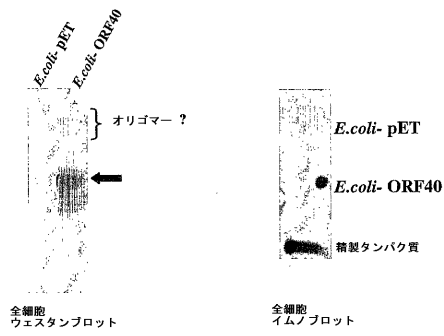
NSGLSEFATSLNSVFAVQDELDRVFAEDRRNAVWTSIGIRDTKHYSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGSGRVGLFSHNRTENTFDDGIGNSARLA
 HGAVFGQYIGIRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRVLHYGIQARYRAGFGGFLPHIGATRYPVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIK
 ADYSFKPAQHISITPYLSLYTDAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAAGPQLEAQSAGIKLCYRW

SEQ ID 39 – App domain derivative

NLTFTVNGKLNQGTFRFMSSELPYRSDKLLAESSEGYTTLAVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFTLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGEP
 RLHNPVKEQELSDKLGKAEAKKQAEKDQAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGMQAEBEKKRVQADKDTALAKQREAEETRPATTAFF
 PRARRARRDLPLQLPQPQPQQRDLISRYANSGLSEFATSLNSVFAVQDELDRVFAEDRRNAVWTSIGIRDTKHYSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKN
 LGSGRVGLFSHNRTENTFDDGIGNSARLAHGAVFGQYIGIRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRVLHYGIQARYRAGFGGFLPHIGATR
 YPVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPYLSLYTDAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAA
 15 AAKGPQLEAQSAGIKLCYRW

【図 1】

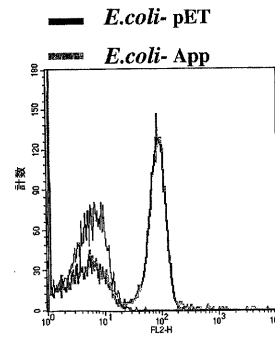
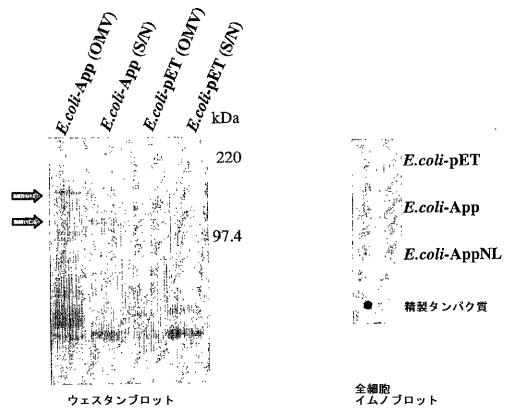
FIGURE 1



FACS

【図 2】

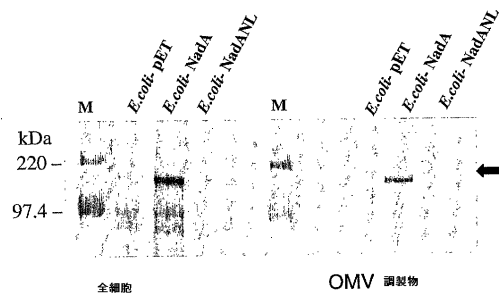
FIGURE 2



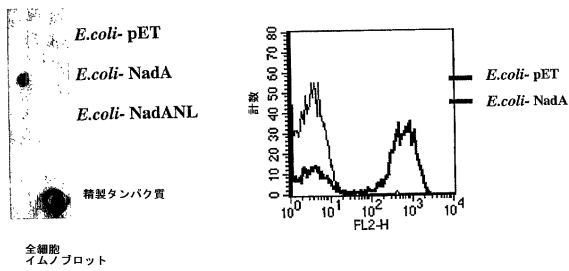
FACS

【図 3】

FIGURE 3

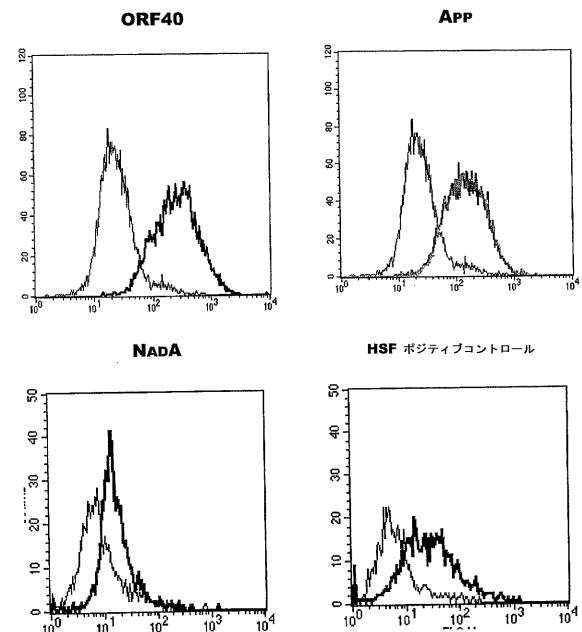


SDS-PAGE



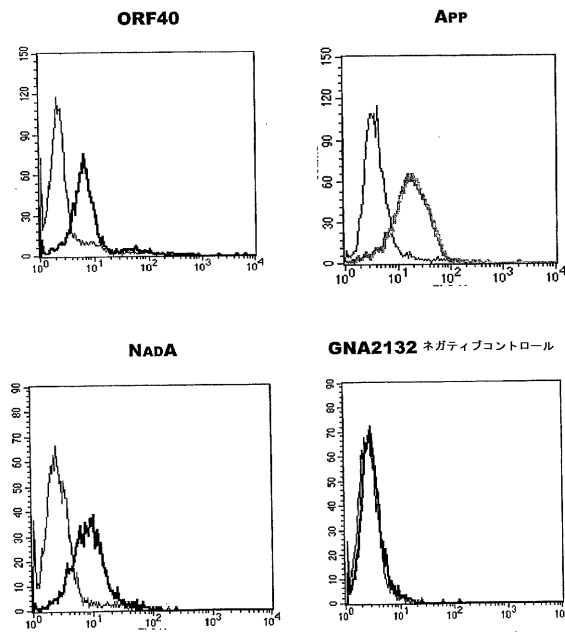
【図 4】

FIGURE 4



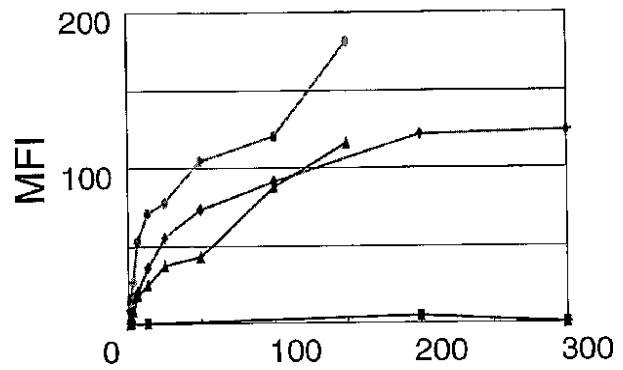
【図 5】

FIGURE 5



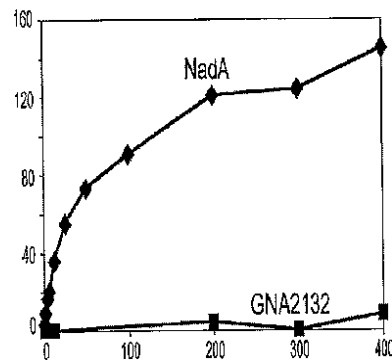
【図 6 A】

FIGURE 6A



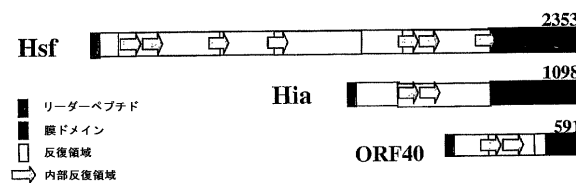
【図 6 B】

FIGURE 6B



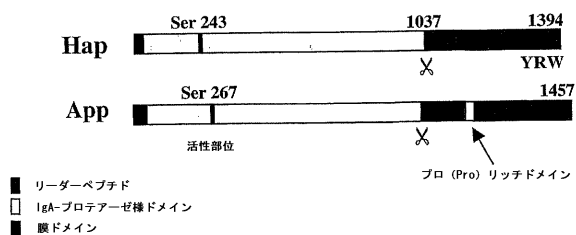
【図 7】

FIGURE 7



【図 8】

FIGURE 8



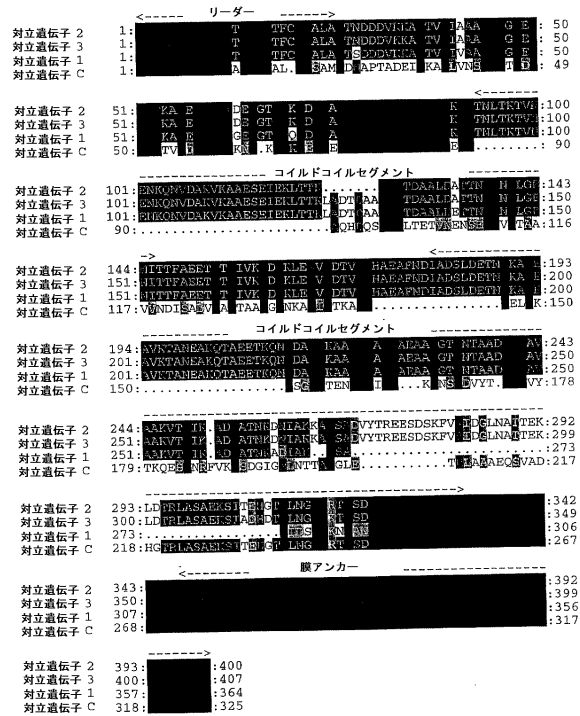
【図 9 A】

FIGURE 9A

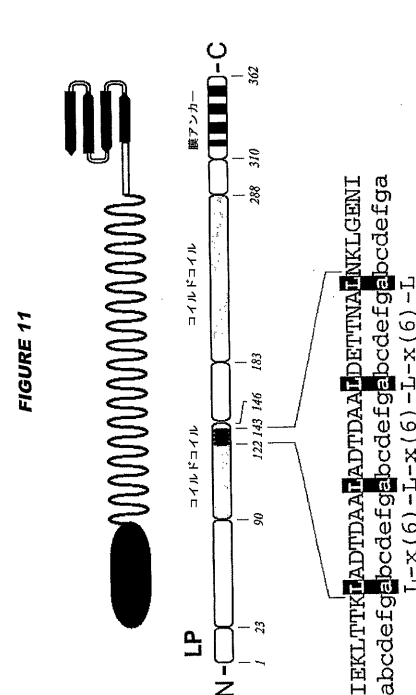
対立遺伝子 1	1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAAATVAIAAYNNGQEI: 50
対立遺伝子 2	1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDVKKAAATVAIAAYNNGQEI: 50
対立遺伝子 3	1:MSMKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATNDVKKAAATVAIAAYNNGQEI: 50
対立遺伝子 1	51:NGFKAGETIYDIDEDGTITTKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVN:100
対立遺伝子 2	51:NGFKAGETIYDIDEDGTITTKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVN:100
対立遺伝子 3	51:NGFKAGETIYDIDEDGTITTKKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVN:100
対立遺伝子 1	101:ENKQNVDAKVAEAESEIEKLITTLADTDAAALADTDAAALDATTNALNKLGE:150
対立遺伝子 2	101:ENKQNVDAKVAEAESEIEKLITTR.....LADTDAAALDATTNALNKLGE:143
対立遺伝子 3	101:ENKQNVDAKVAEAESEIEKLITTLADTDAAALADTDAAALDATTNALNKLGE:150
対立遺伝子 1	151:NITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE:200
対立遺伝子 2	144:NITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE:193
対立遺伝子 3	151:NITTFAEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADE:200
対立遺伝子 1	201:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVAEAESEIEKLITTLADTDAAALADTDAAALDATTNALNKLGE:250
対立遺伝子 2	194:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVAEAESEIEKLITTR.....LADTDAAALDATTNALNKLGE:243
対立遺伝子 3	201:AVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVAEAESEIEKLITTLADTDAAALADTDAAALDATTNALNKLGE:250
対立遺伝子 1	251:AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSAADVVTREESDSKFFVRIDGLNATTEKL:293
対立遺伝子 2	244:AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSAADVVTREESDSKFFVRIDGLNATTEKL:293
対立遺伝子 3	251:AAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSAADVVTREESDSKFFVRIDGLNATTEKL:300
対立遺伝子 1	273:.....RISLDAVAVLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYN:307
対立遺伝子 2	294:DTRLASAEKSTPETHSTRINGLSTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYN:343
対立遺伝子 3	301:DTRLASAEKSTPETHSTRINGLSTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYN:350
対立遺伝子 1	308:VGRFNVTAAGVGYKSESVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAVH:357
対立遺伝子 2	344:VGRFNVTAAGVGYKSESVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAVH:393
対立遺伝子 3	351:VGRFNVTAAGVGYKSESVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAVH:400
対立遺伝子 1	358:VGVNYEW:364
対立遺伝子 2	394:VGVNYEW:400
対立遺伝子 3	401:VGVNYEW:407

【図 9 C】

FIGURE 9C



【図 1 1】



A

FIGURE 12B

MC58

DR

NadA

$(TAA)_n$

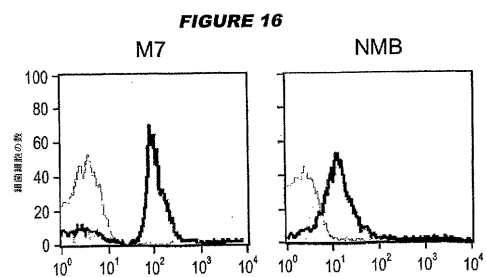
DR

Z2491

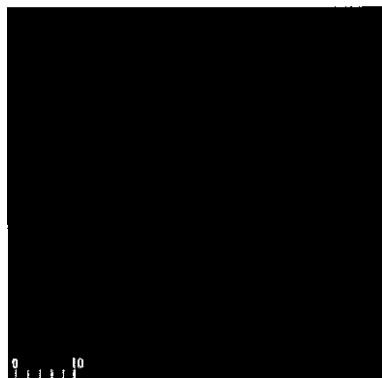
16 bp

TTTCCATTCCAAAACGC

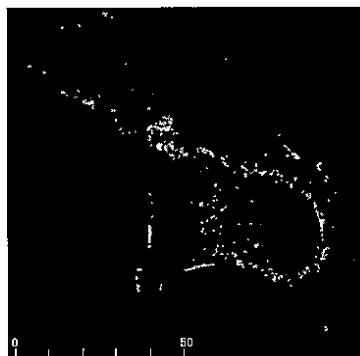
【図 16】



【図 17 A】

FIGURE 17A

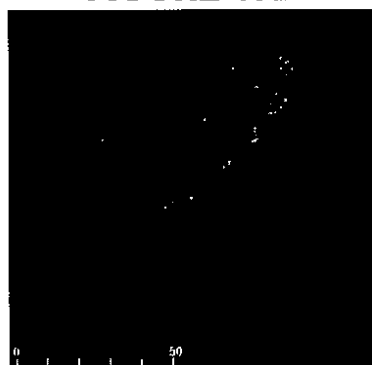
【図 17 B】

FIGURE 17B

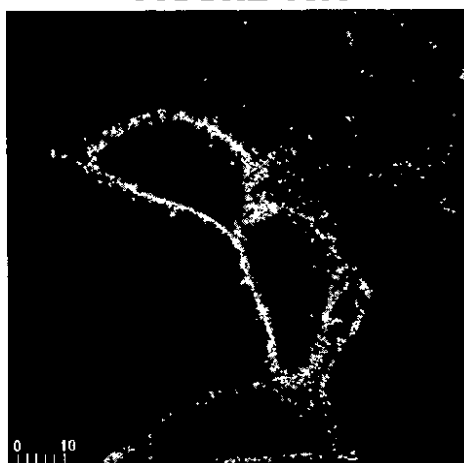
【図 17 C】

FIGURE 17C

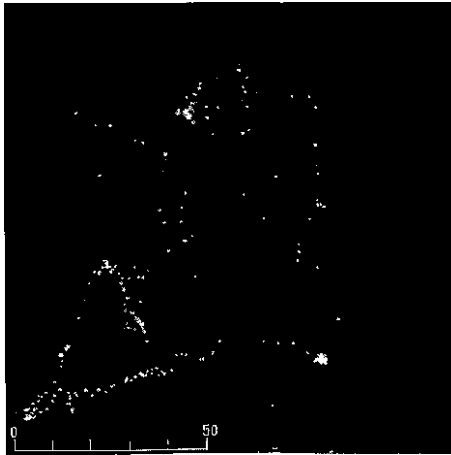
【図 17 D】

FIGURE 17D

【図 18 A】

FIGURE 18A

【図 18 B】

FIGURE 18B

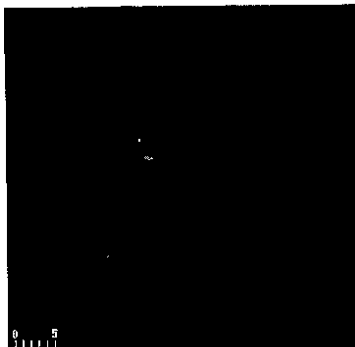
【図 19】

FIGURE 19

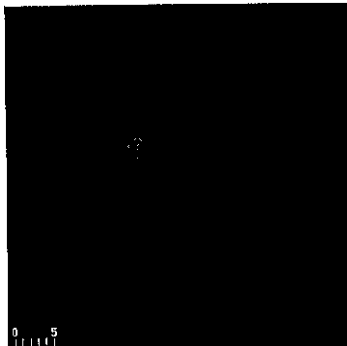
【図 20 A】

FIGURE 20A

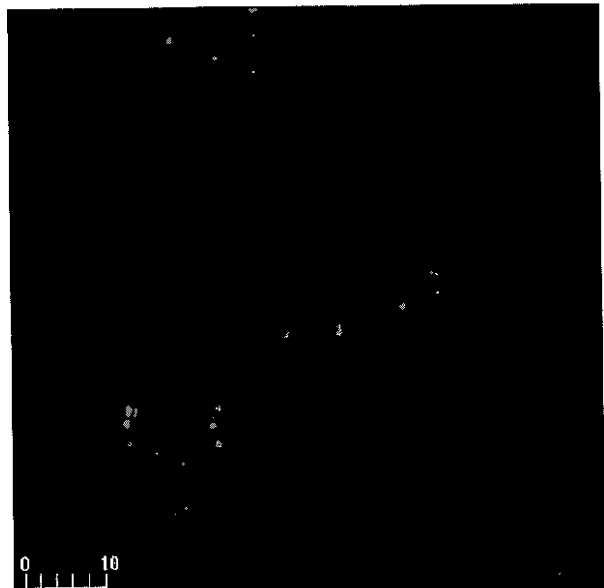
【図 20 B】

FIGURE 20B

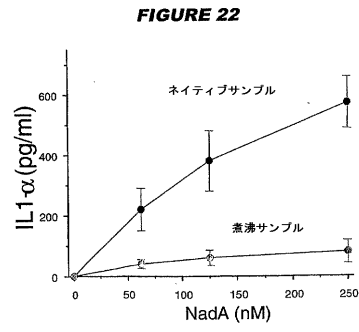
【図 20 C】

FIGURE 20C

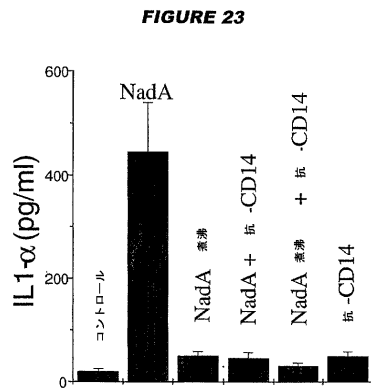
【図 21】

FIGURE 21

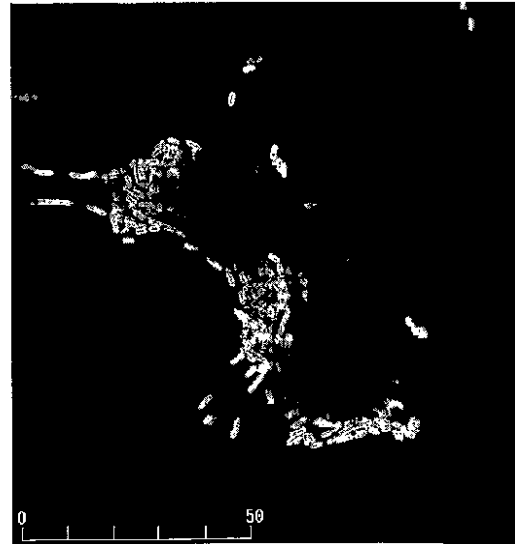
【図 2 2】



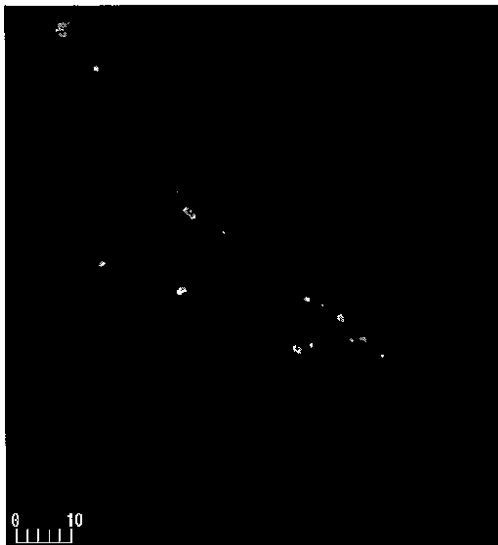
【図 2 3】



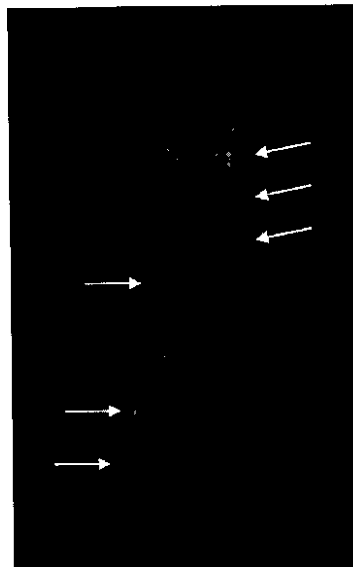
【図 2 4 A】

FIGURE 24A

【図 2 4 B】

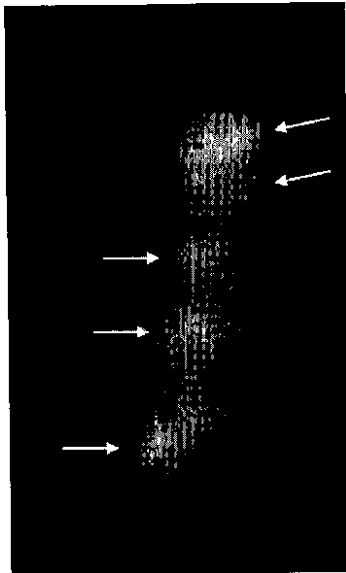
FIGURE 24B

【図 2 5 A】

FIGURE 25A

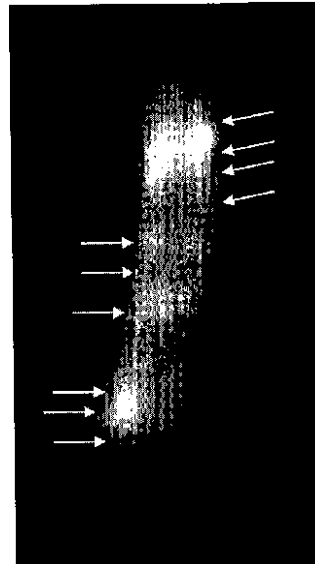
【図 25 B】

FIGURE 25B



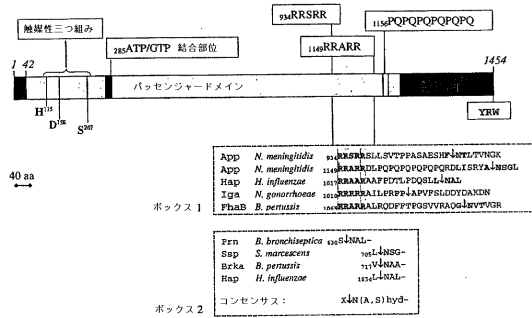
【図 25 C】

FIGURE 25C



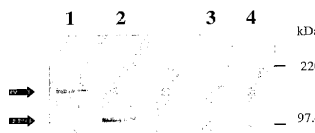
【図 26】

FIGURE 26



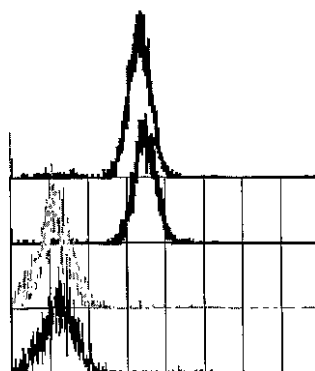
【図 28】

FIGURE 28



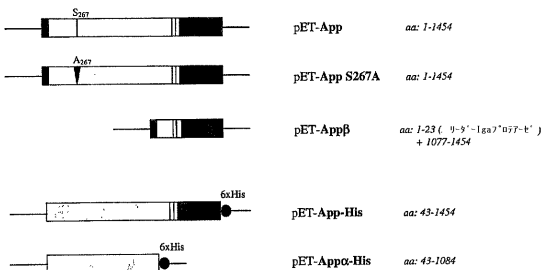
【図 29】

FIGURE 29



【図 27】

FIGURE 27



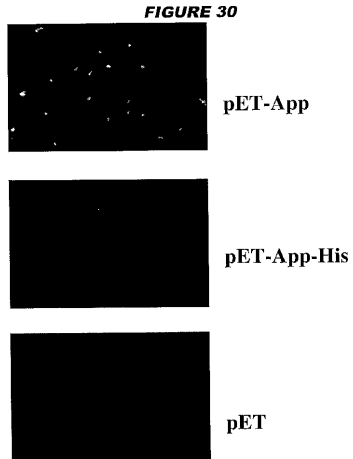
— pET-AppS267A

— pET-App

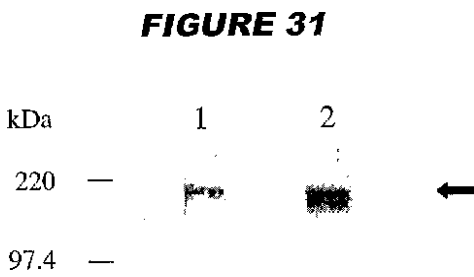
— pET-App-His

— pET

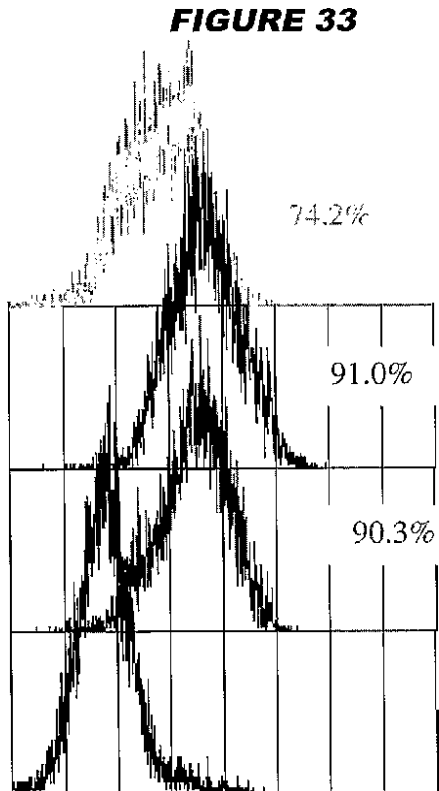
【図 3 0】



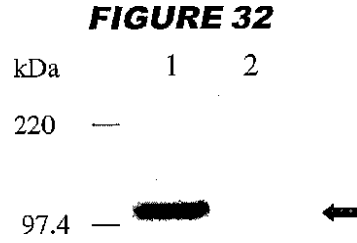
【図 3 1】



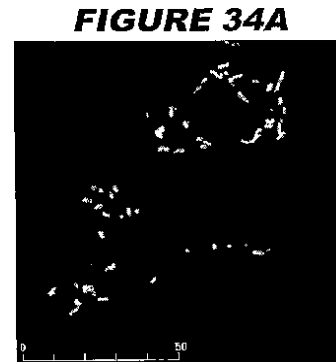
【図 3 3】



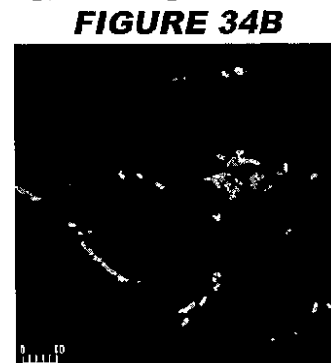
【図 3 2】



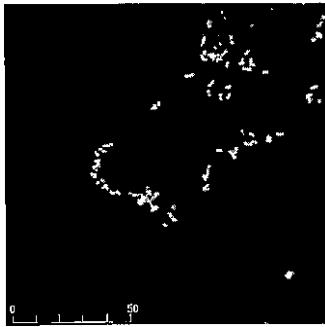
【図 3 4 A】



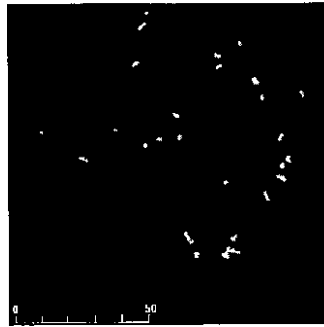
【図 3 4 B】



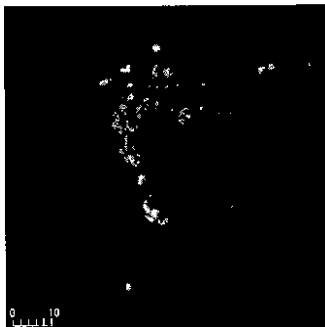
【図 3 4 C】

FIGURE 34C

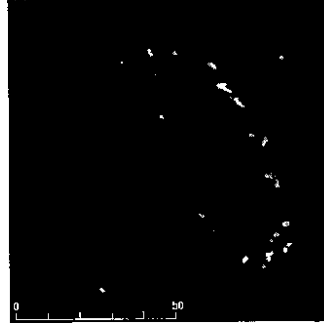
【図 3 4 E】

FIGURE 34E

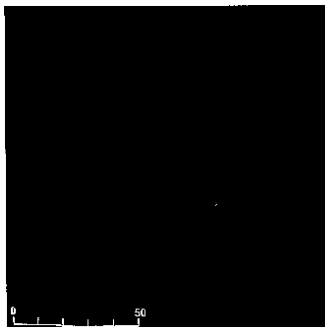
【図 3 4 D】

FIGURE 34D

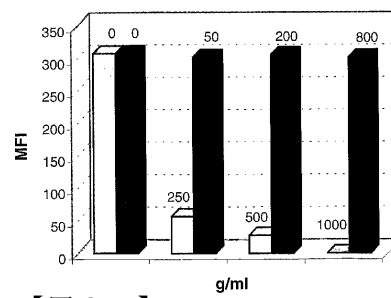
【図 3 4 F】

FIGURE 34F

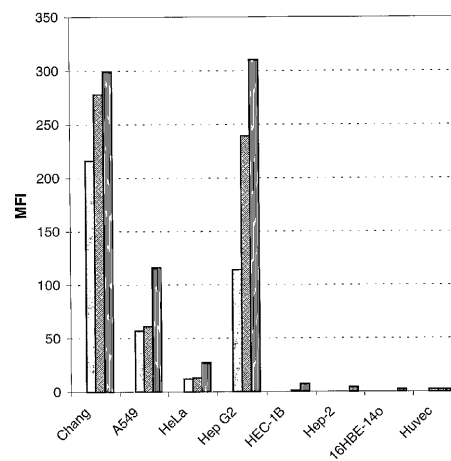
【図 3 4 G】

FIGURE 34G

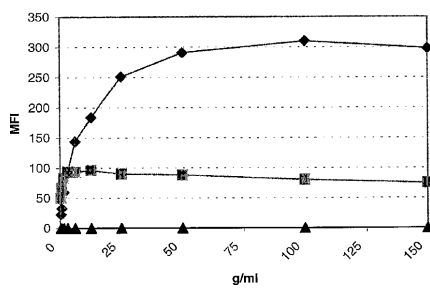
【図 3 6】

FIGURE 36

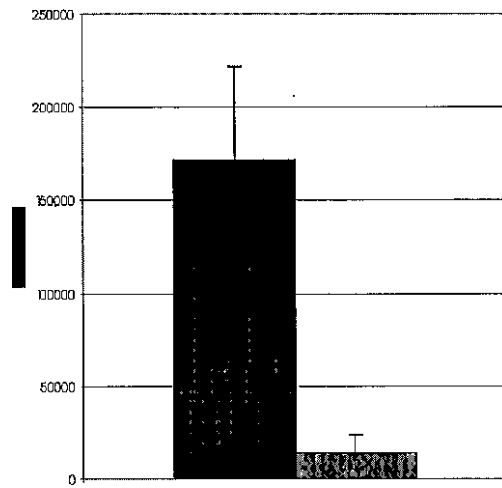
【図 3 7】

FIGURE 37

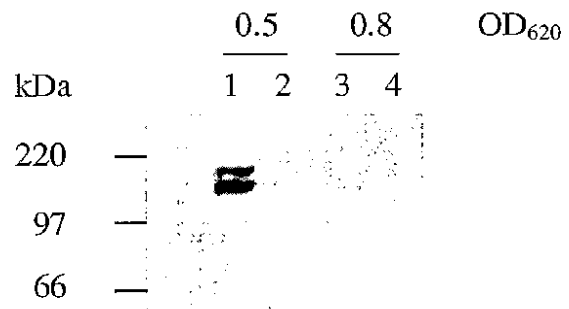
【図 3 5】

FIGURE 35

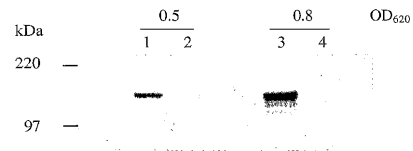
【図 38】

FIGURE 38

【図 39】

FIGURE 39

【図 40】

FIGURE 40

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 0211025.2

(32)優先日 平成14年5月14日(2002.5.14)

(33)優先権主張国 英国(GB)

前置審査

(72)発明者 コマンデュッチ, マウリツィオ
イタリア国 イー 5 3 1 0 0 シエナ, ビア フィオレンティーナ, 1, カイロン エセピ
ーアー

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 5 5 8 7 3 (WO, A 1)

Science, 287, p.1809-1815, 2000

Molecular Microbiology, 1 9 9 4 年, Vol.14, No.2, p.217-233

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-14/825

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq