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

特許第5495261号
(P5495261)

(45)発行日　平成26年5月21日(2014.5.21)　(24)登録日　平成26年3月14日(2014.3.14)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/112	(2006.01)	A61K	39/112	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61P 31/04	(2006.01)	A61K	39/395	N
C07K 14/25	(2006.01)	A61P	31/04	
		C07K	14/25	ZNA

請求項の数 19　(全 20 頁)

(21)出願番号　特願2009-531938(P2009-531938)
(86)(22)出願日　平成19年10月12日(2007.10.12)
(65)公表番号　特表2010-505939(P2010-505939A)
(43)公表日　平成22年2月25日(2010.2.25)
(86)国際出願番号　PCT/IB2007/004192
(87)国際公開番号　WO2008/044149
(87)国際公開日　平成20年4月17日(2008.4.17)
審査請求日　平成22年8月30日(2010.8.30)
(31)優先権主張番号　2,563,214
(32)優先日　平成18年10月12日(2006.10.12)
(33)優先権主張国　カナダ(CA)

微生物の受託番号　CNCM　I-3839

(73)特許権者　591222762
アンスティテユ・パストウール
フランス国、７５７２４・パリ・セデクス・１５、リユ・ドユ・ドクトウール・ルー、２５－２８
(73)特許権者　591100596
アンスティチュ　ナショナル　ドゥ　ラ　サンテ　エ　ドゥ　ラ　ルシェルシュ　メディカル
フランス国、エフ－７５０１３　パリ、リュ・ドゥ・トルビアック　１０１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】シゲラＩＰＡＤタンパク質、及び赤痢菌感染症ワクチンとしてのその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の要素、
－　ＩｐａＤポリペプチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤによりコードされ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片であるＩｐａＤポリペプチドの誘導体、
－　ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤに含まれ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片をコードするポリヌクレオチド断片、及び／又は
－　抗ＩｐａＤ中和抗体
の少なくとも１つを含む、許容性細胞への少なくとも１つのシゲラ血清型の侵入を遮断するための組成物。
【請求項２】
前記ＩｐａＤポリペプチドが配列番号１と同一のアミノ酸配列又は配列番号１に少なくとも９５％同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記ポリヌクレオチドが配列番号２と同一のヌクレオチド配列又は配列番号２に少なくとも９５％同一性を有するヌクレオチド配列を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項４】
抗ＩｐａＤ中和抗体がポリクローナルである、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５】
抗ＩｐａＤ中和抗体がモノクローナルである、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
多糖抗原を更に含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
許容性細胞への少なくとも１つのシゲラ血清型の侵入を遮断するための組成物を調製するための、以下の要素、
－　ＩｐａＤポリペプチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤによりコードされ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片であるＩｐａＤポリペプチドの誘導体、
－　ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤに含まれ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片をコードするポリヌクレオチド断片、及び／又は
－　抗ＩｐａＤ中和抗体
の少なくとも１つの使用。
【請求項８】
赤痢菌感染症の治療及び／又は予防のための組成物を調製するための、以下の要素、
－　ＩｐａＤポリペプチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤによりコードされ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片であるＩｐａＤポリペプチドの誘導体、
－　ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤに含まれ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片をコードするポリヌクレオチド断片、及び／又は
－　抗ＩｐａＤ中和抗体
の少なくとも１つの使用。
【請求項９】
前記ＩｐａＤポリペプチドが配列番号１と同一のアミノ酸配列又は配列番号１に少なくとも９５％同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項７に記載の使用。
【請求項１０】
前記ポリヌクレオチドが配列番号２と同一のヌクレオチド配列又は配列番号２に少なくとも９５％同一性を有するヌクレオチド配列を有する、請求項７に記載の使用。
【請求項１１】
抗ＩｐａＤ中和抗体がポリクローナルである、請求項７、９及び１０のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１２】
抗ＩｐａＤ中和抗体がモノクローナルである、請求項７、９及び１０のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１３】
多糖抗原を更に含む、請求項７及び９～１２のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１４】
前記ＩｐａＤポリペプチドが配列番号１と同一のアミノ酸配列又は配列番号１に少なくとも９５％同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項８に記載の使用。

【請求項１５】
前記ポリヌクレオチドが配列番号２と同一のヌクレオチド配列又は配列番号２に少なくとも９５％同一性を有するヌクレオチド配列を有する、請求項８に記載の使用。
【請求項１６】
抗ＩｐａＤ中和抗体がポリクローナルである、請求項８、１４及び１５のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１７】
抗ＩｐａＤ中和抗体がモノクローナルである、請求項８、１４及び１５のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１８】
多糖抗原を更に含む、請求項８及び１４～１７のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１９】
－　ＩｐａＤポリペプチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤによりコードされ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片であるＩｐａＤポリペプチドの誘導体、
－　ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＭａＩ－ＩｐａＤに含まれ、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まるＩｐａＤタンパク質の断片をコードするポリヌクレオチド断片、及び／又は
－　抗ＩｐａＤ中和抗体
を含む、許容性細胞への少なくとも１つのシゲラ血清型の侵入を遮断するためのキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、動物の細胞へのシゲラ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）の侵入を遮断し、それによって赤痢菌感染症から保護する、又は赤痢菌感染症の重症度を低下させる、組成物及び方法に関する。より詳細には、本発明は、シゲラ、特にＳ．フレックスネリ（ｆｌｅｘｎｅｒｉ）の幾つかの血清型に対して保護活性を有する中和抗体を誘導する、自然源から得られるＩｐａＤタンパク質、及び／又は合成若しくは組換え技術によって得られるＩｐａＤタンパク質、及びその複合体の使用に関する。本発明の組成物は、シゲラファミリーの細菌によって引き起こされる細菌性赤痢の予防及び／又は治療に有用である。
【背景技術】
【０００２】
多数のグラム陰性病原菌は、その宿主の細胞と相互作用するＩＩＩ型分泌（Ｔ３Ｓ）機構を使用する。各Ｔ３Ｓ機構は、細菌エンベロープにまたがり、細菌表面に広がる分泌装置（Ｔ３ＳＡ）と、Ｔ３ＳＡを通過し、宿主細胞の膜に入り、そこで細孔を形成する輸送体と、Ｔ３ＳＡ及び輸送体細孔を通過して、細胞質に達するエフェクターと、細菌細胞質中で輸送体及びエフェクターに付随する特定のシャペロンと、転写制御因子とからなる。Ｔ３ＳＡの構築には約１５種類のタンパク質が必要である。
【０００３】
シゲラファミリーに属する細菌は、ヒトにおける細菌性赤痢の病原体である［１］。上皮細胞への細菌の侵入、及びマクロファージにおけるアポトーシスの誘導に必要な遺伝子は、２２０ｋｂ病原プラスミドの侵入領域と命名された３０ｋｂ領域中でクラスターを形成する。侵入領域は、Ｔ３ＳＡの成分をコードするｍｘｉ及びｓｐａ遺伝子、Ｔ３ＳＡを通過するタンパク質をコードするｉｐａＡ、Ｂ、Ｃ及びＤ、ｉｐｇＢ１、ｉｐｇＤ並びにｉｃｓＢ遺伝子、シャペロンをコードするｉｐｇＡ、ｉｐｇＣ、ｉｐｇＥ及びｐａ１５遺伝子、並びに転写制御因子をコードするｖｉｒＢ及びｍｘｉＥ遺伝子を含む［２］。
【０００４】
Ｔ３ＳＡは、ブロス中で増殖する細菌中では低活性であり、細菌が上皮細胞に接触する

と活性化される［３］。ｉｐａＢ、ｉｐａＣ又はｉｐａＤ並びに大部分のｍｘｉ及びｓｐａ遺伝子を不活性化すると、上皮細胞に侵入する細菌の能力が無効になり、マクロファージにおけるアポトーシスが誘導され、接触溶血活性（ｃｏｎｔａｃｔ　ｈｅｍｏｌｙｔｉｃ　ａｃｔｉｖｉｔｙ）が発現する。ＩｐａＢ及びＩｐａＣは、疎水性セグメントを含み、溶解した赤血球の膜と結合したままであり、これら２種類のタンパク質がＳ．フレックスネリ輸送体の成分であることを示唆している。また、エフェクター機能は、ＩｐａＢ及びＩｐａＣに対して提案された［４、５、６、７、８］。ｉｐａＣではなく、ｉｐａＢ及びｉｐａＤの不活性化は、調節解除された、すなわち常時活性型のＴ３ＳＡをもたらし、ＩｐａＢ及びＩｐａＤが、誘導物質の非存在下でＴ３ＳＡの不活性の維持にある役割を果たすことを示唆している［９、１０］。ＩｐａＤの一小部分は細菌エンベロープと関連づけられる［９、１１］。Ｐｉｃｋｉｎｇと共同研究者［１２］は、Ｔ３ＳＡ活性の制御におけるＩｐａＤの役割を上皮細胞への細菌の侵入におけるその役割から分離できることを報告した。

【０００５】

針複合体の構造についての更なる見識を得るために、本発明者らは、架橋剤BS^3で処理した細菌の、細菌全体と軽度に精製された針複合体（ＮＣ）の両方について、免疫電子顕微鏡分析を実施した。本発明者らは、ＩｐａＤが針の先端に局在したＮＣの成分であり、ＩｐａＤに対する抗体が上皮細胞へのＳ．フレックスネリの侵入に対して阻害効果を有する証拠を提示する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】[1] E.H.LaBrec, H. Schneider, T.J. Magnani, S. B. Formal, Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J. Bacteriol. 43 (1994) 1503-1518.

【非特許文献２】[2] C. Parsot, Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS Microbiol. Lett. 252 (2005) 11-18.

【非特許文献３】[3] F.G. van der Goot, G. Tran van Nhieu, A. Allaoui, P. Sansonetti, F. Lafont, Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid- based mechanism. J Biol. Chem. 279 (2004) 47792-47798.

【非特許文献４】[4] Y. Chen, M. R. Smith, K. Thirumalai, A. Zychlinsky, A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. EMBO J. 15 (1996) 3853-3860.

【非特許文献５】[5] A. Kuwae, S. Yoshida, K. Tamano, H. Mimuro, T. Suzuki, C. Sasakawa, Shigella invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane: functional analysis of IpaC. J. Biol. Chem. 276 (2001) 32230-32239.

【非特許文献６】[6] R. Menard. M. C. Prevost. P. Gounon. P. Sansonetti. C. Dehio, The secreted lpa complex of Shigella flexneri promotes entry into mammalian cells. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996)1254-1258.

【非特許文献７】[7] G. Tran Van Nhieu, R. Bourdet-Sicard, G. Dumenil, A. Blocker, P.J. Sansonetti, Bacterial signals and cell responses during Shigella entry into epithelial cells. Cell Microbiol. 2 (2000) 187-193.

【非特許文献８】[8] G. Tran Van Nhieu, E. Caron, A. Hall, P.J. Sansonetti, IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during Shigella entry into epithelial cells. EMBO J. 18 (1999) 3249-3262.

【非特許文献９】[9] R. Menard, P. Sansonetti, C. Parsot, The secretion of the Shigella flexneri lpa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. EMBO J. 13 (1994) 5293-5302.

【非特許文献１０】[10] C. Parsot, R. Menard, P. Gounon, P.J. Sansonetti, Enhance

d secretion through the Shigella flexneri Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. Mol. Microbiol. 16 (1995) 291-300.
【非特許文献１１】[11] K.R. Turbyfill, J.A. Mertz, CP. Mallett, E.V. Oaks, Identification of epitope and surface-exposed domains of Shigella flexneri invasion plasmid antigen D (IpaD). Infect Immun. 66 (1998) 1999-2006.
【非特許文献１２】[12] W. L. Picking, H. Nishioka, P.D. Hearn, M.A. Baxter, AT. Harrington, A. Blocker, W. D. Picking, IpaD of Shigella flexneri is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. Infect. Immun. 73(2005) 1432-440.

【発明の概要】

【０００７】

本発明者らは、驚くべきことに、ＩｐａＤ特異的中和抗体が上皮細胞などの許容性細胞へのシゲラの侵入を遮断することができ、この中和作用が、異なるシゲラ血清型で認められることを見いだした。この点に関して、本発明は、特に、組成物の調製におけるＩｐａＤタンパク質、それをコードするポリヌクレオチド、又は抗ＩｐａＤ中和抗体の使用、及び赤痢菌感染症に対して交差保護（ｃｒｏｓｓ　ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ）を誘発する方法の作成（ｅｌａｂｏｒａｔｉｏｎ）に関する。

【０００８】

定義

「動物」又は「宿主」という用語は、Ｓ．フレックスネリなどのシゲラ系統によって感染されやすい、又は感染されることが知られている、任意の動物を指す。特に、動物はヒトからなる。

【０００９】

「許容性細胞」という用語は、シゲラ系統によって感染され得る細胞を指す。例えば、かかる細胞は、上皮細胞又は免疫系細胞、特に樹状細胞、単球／マクロファージなど、腸管粘膜免疫系におけるシゲラ浸潤の標的である免疫系細胞だけに限定されず、シゲラエフェクターの浸潤につながらない場合でも、ＩＩＩ型分泌機構によってシゲラエフェクターを注入され得るＢ及びＴリンパ球であり得る。

【００１０】

「治療」という用語は、シゲラ系統に関連する感染症又は疾患の症候が軽減又は完全に解消されるプロセスを指す。本明細書では「予防」という用語は、シゲラ系統に関連する感染症又は疾患の症候が妨害又は遅延されるプロセスを指す。

【００１１】

「防御応答」という用語は、種によって引き起こされるシゲラ関連疾患若しくは感染症の発症の防止、又は動物に存在する疾患の重症度の軽減を意味する。

【００１２】

「許容される担体」という表現は、動物宿主に有害作用なしに投与することができる、本発明によって企図される組成物の要素を含有するためのビヒクルを意味する。当分野で公知の適切な担体としては、金粒子、滅菌水、食塩水、グルコース、デキストロース又は緩衝溶液が挙げられるが、これらだけに限定されない。担体は、希釈剤、安定剤（すなわち、糖及びアミノ酸）、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、ｐＨ緩衝剤、増粘剤（ｖｉｓｃｏｓｉｔｙ　ｅｎｈａｎｃｉｎｇ　ａｄｄｉｔｉｖｅ）、着色剤（ｃｏｌｏｒ）などを含めて、ただしこれらだけに限定されない助剤を含み得る。

【００１３】

一般に理解され、本明細書において使用される「機能的誘導体」とは、ＩｐａＤタンパク質／ペプチド配列全体の生物活性に実質的に類似した機能的生物活性を有するタンパク質／ペプチド配列を指す。換言すれば、前記機能的誘導体を動物に投与したときに、シゲラ系統感染症に対する抗ＩｐａＤ中和抗体の産生を誘発する能力を実質的に保持するポリペプチド又はその断片を好ましくは指す。

【００１４】
一般に理解され、本明細書において使用される「機能的断片」とは、ＩｐａＤ核酸配列全体の生物活性に実質的に類似した機能的生物活性をコードする核酸配列を指す。換言すれば、また、本発明の状況において、動物に投与したときに、シゲラ系統感染症に対して抗ＩｐａＤ中和抗体の産生を誘発するＩｐａＤポリペプチド／タンパク質をコードする能力を実質的に保持する核酸又はその断片を好ましくは指す。
【００１５】
「シゲラ血清型」という用語は、Ａ－Ｄの大文字によって識別されるシゲラの４グループ、すなわちシゲラ　ディセンテリエ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）（Ａ）シゲラ　フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｆｌｅｘｎｅｒｉ）（Ｂ）、シゲラ　ボイディ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｂｏｙｄｉｉ）（Ｃ）及びシゲラ　ソンネ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｓｏｎｎｅｉ）（Ｄ）を指す。それぞれは、グループＡ：８血清型、グループＢ：１１血清型及びサブ血清型、グループＣ：１１血清型、グループＤ：１血清型を含む。例えば、シゲラ血清型は、シゲラ　フレックスネリ２ａ、１ｂ及び３ａ、シゲラ　ディセンテリエ１、並びにシゲラ　ソンネであり得るが、これらだけに限定されない。
【００１６】
「中和」又は「遮断」という用語は、ＩｐａＤタンパク質に特異的に結合し、また、ＩｐａＤタンパク質の生物学的機能に干渉し、したがって、例えば、その毒性エフェクターを標的細胞に送達する細菌の能力を遮断する、本発明の抗ＩｐａＤ抗体の能力を指す。換言すれば、かかる抗体は、有利には、病原体を無力にし、病変部を生じることも、宿主免疫防御に効率的に抵抗することもできなくする。
【００１７】
本発明の組成物
一態様においては、本発明は、赤痢菌感染症の治療及び／又は予防のための組成物を提供する。本発明は、許容性細胞への少なくとも１つのシゲラ血清型の侵入を遮断するための組成物も提供する。これらの企図された本発明の組成物は、以下の要素、すなわち、
－　ＩｐａＤポリペプチド又はその機能的誘導体、
－　ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその機能的断片、
－　抗ＩｐａＤ中和抗体
の少なくとも１つを含む。
【００１８】
当業者には理解されるように、本発明の組成物は、宿主に投与すると、１つを超えるシゲラ血清型に対する交差保護を有利に与える。換言すれば、本発明の組成物は、１つを超えるシゲラ血清型の許容性細胞への侵入を防止又は実質的に低減させる。
【００１９】
本発明によって企図されるＩｐａＤポリペプチド又はその機能的誘導体は、例えば、配列番号１として本明細書に示すＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ３９１７５３のアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列を有する（図６参照）。ＩｐａＤポリペプチドの機能的誘導体の場合には、ＣＮＣＭに２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９で寄託されたプラスミドｐＭａｌ－ＩｐａＤを用いることができる。このプラスミドは、ＩｐａＤタンパク質のコドン１３０で始まる、ＩｐａＤタンパク質の断片をコードする。
【００２０】
アミノ酸配列に言及するときに「実質的に同一」とは、本発明によって企図されるポリペプチドが、例えば、配列番号１の配列の一部又は全部と少なくとも７５％同一又は８５％同一、さらには９５％同一であるアミノ酸配列を有することを理解されたい。
【００２１】
本発明によって企図されるポリヌクレオチド又はその機能的断片は、上で定義したＩｐａＤポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする。例えば、かかるポリヌクレオチドは、本明細書に配列番号２として示すＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ３９１７５

３のヌクレオチド配列と同一又は実質的に同一である、ヌクレオチド又は核酸配列を有する（図７参照）。ＩｐａＤポリヌクレオチドの機能的断片の場合には、上で定義したプラスミドｐＭａｌ－ＩｐａＤを使用することができる。

【００２２】

ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列に言及するときに「実質的に同一」とは、本発明によって企図されるポリヌクレオチドが、例えば、配列番号２の配列の一部又は全部と少なくとも６５％同一又は８０％同一、さらには９５％同一である核酸配列を有することを理解されたい。

【００２３】

核酸及びアミノ酸「配列同一性」を決定する技術も、当分野で公知である。典型的には、かかる技術は、遺伝子に対するｍＲＮＡのヌクレオチド配列、ＤＮＡ配列自体を決定すること、及び／又はそれによってコードされるアミノ酸配列を決定すること、及びこれらの配列を第２のヌクレオチド又はアミノ酸配列と比較することを含む。一般に、「同一性」とは、２個のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列それぞれの正確なヌクレオチドとヌクレオチド又はアミノ酸とアミノ酸の一致を指す。２個以上の配列（ポリヌクレオチド又はアミノ酸）を、その「同一パーセント」を決定することによって比較することができる。２個の配列の同一パーセントは、核酸配列でもアミノ酸配列でも、短い方の配列の長さで除算し、１００を掛けた、２個の整列した配列間の正確な一致数である。核酸配列の近接（ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｅ）アラインメントは、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ, Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃｓ ２：４８２－４８９（１９８１）の局所的相同性アルゴリズムによって与えられる。このアルゴリズムは、Ｄａｙｈｏｆｆ, Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ, Ｍ．Ｏ．Ｄａｙｈｏｆｆ ｅｄ．, ５ ｓｕｐｐｌ．３：３５３－３５８, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ, Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ, Ｄ．Ｃ．, ＵＳＡによって開発されたスコア行列であって、Ｇｒｉｂｓｋｏｖ, Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４（６）：６７４５－６７６３（１９８６）によって正規化されたスコア行列を用いることによって、アミノ酸配列に適用することができる。配列の同一パーセントを決定するこのアルゴリズムの例示的実行は、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．）によって「ＢｅｓｔＦｉｔ」ユーティリティアプリケーションにおいて提供される。この方法の初期設定パラメータは、（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．から入手可能な）Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｍａｎｕａｌ, Ｖｅｒｓｉｏｎ ８（１９９５）に記載されている。本発明の状況において同一パーセントを確認する好ましい方法は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈが著作権を有し、Ｊｏｈｎ Ｆ．Ｃｏｌｌｉｎｓ及びＳｈａｎｅ Ｓ．Ｓｔｕｒｒｏｋによって開発され、ＩｎｔｅｌｌｉＧｅｎｅｔｉｃｓ, Ｉｎｃ．（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ、Ｃａｌｉｆ．）によって配布されたプログラムのＭＰＳＲＣＨパッケージを使用することである。この一組のパッケージから、初期設定パラメータをスコア表に用いた（例えば、ギャップ開始ペナルティ１２、ギャップ伸長ペナルティ１及びギャップ６）Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムを使用することができる。データから生成した「一致」値は、「配列同一性」を示す。配列間の同一パーセント又は類似度を計算する別の適切なプログラムは、一般に当分野で公知であり、例えば、別のアラインメントプログラムは、初期設定パラメータを用いて使用されるＢＬＡＳＴである。例えば、ＢＬＡＳＴＮ及びＢＬＡＳＴＰは、以下の初期設定パラメータ、すなわちｇｅｎｅｔｉｃ ｃｏｄｅ＝ｓｔａｎｄａｒｄ、ｆｉｌｔｅｒ＝ｎｏｎｅ、ｓｔｒａｎｄ＝ｂｏｔｈ、ｃｕｔｏｆｆ＝６０、ｅｘｐｅｃｔ＝１０、Ｍａｔｒｉｘ ＢＬＯＳＵＭ６２、Ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎｓ＝５０ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ、ｓｏｒｔ ｂｙ＝ＨＩＧＨ ＳＣＯＲＥ、Ｄａｔａｂａｓｅｓ＝ｎｏｎ－ｒｅｄｕｎｄａｎｔ, ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋ ＣＤＳ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎｓ＋Ｓｗｉｓｓ ｐ

ｒｏｔｅｉｎ＋Ｓｐｕｐｄａｔｅ＋ＰＩＲを用いて使用することができる。

【００２４】

ＩｐａＤタンパク質に特異的に結合する、本発明によって企図される中和抗体は、当業者に公知の種々の方法によって調製することができる。例えば、ＩｐａＤポリペプチドは、ポリクローナル抗体の産生を誘導するために、動物に投与することができる。或いは、本明細書に記載のように用いられる抗ＩｐａＤ中和抗体は、公知のハイブリドーマ技術によって調製されるモノクローナル抗体であり得る（例えば、Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，ＮＹ，１９８１参照）。本発明の企図される抗体に関して、「特異的に結合する」という用語は、ＩｐａＤポリペプチドの１個以上のエピトープに比較的高親和性で結合するが、ＩｐａＤポリペプチド以外の分子を実質的に認識せず、結合しない抗体を指す。本明細書では「比較的高親和性」という用語は、抗体と、少なくとも$10^{6}M^{-1}$、好ましくは少なくとも約$10^{7}M^{-1}$、更により好ましくは$10^{8}M^{-1}$から$10^{10}M^{-1}$のＩｐａＤポリペプチドとの結合親和性を意味する。かかる親和性の測定は、好ましくは、当業者に常識である標準競合的結合免疫測定条件下で実施される。

【００２５】

細胞へのシゲラの侵入を中和する抗体をスクリーニングし、特定することは、当分野における知識の範囲内であると理解される。

【００２６】

好ましい一実施形態においては、本発明の組成物はアジュバントを更に含む。本明細書では「アジュバント」という用語は、本発明の組成物に添加して、組成物の免疫原性を増加させる物質を意味する。アジュバントの作動機序は、完全には知られていない。幾つかのアジュバントは、抗原を徐々に放出することによって、免疫応答（液性及び／又は細胞応答）を増強すると考えられ、一方、別のアジュバントは、それ自体で強力に免疫原性であり、相乗的に機能すると考えられる。公知のアジュバントとしては、油及び水乳濁液（例えば、完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバント）、コリツェバクテイーイウム パルブイン（Ｃｏｒｙｔｚｅｂａｃｔｅｉ－ｉｕｍ ｐａｒｖｕｉｎ）、Ｑｕｉｌ Ａ、ＩＬ１２などのサイトカイン、Ｅｍｕｌｓｉｇｅｎ－Ｐｌｕｓ（登録商標）、バチルス カルメット ゲラン（Ｂａｃｉｌｌｕｓ Ｃａｌｍｅｔｔｅ Ｇｕｅｒｉｎ）、水酸化アルミニウム、グルカン、デキストラン硫酸、酸化鉄、アルギン酸ナトリウム、Ｂａｃｔｏ Ａｄｊｕｖａｎｔ、ポリアミノ酸、アミノ酸コポリマーなどのある種の合成ポリマー、サポニン、パラフィン油、並びにムラミルジペプチドが挙げられるが、これらだけに限定されない。アジュバントは、共接種されたＤＮＡ中に、又はＣｐＧオリゴヌクレオチドとして、コードされた免疫調節性分子などの遺伝子アジュバントも包含する。共接種されたＤＮＡは、同じプラスミド構築物中にプラスミド免疫原として、又は別のＤＮＡベクター中に、存在し得る。

【００２７】

本発明の好ましい実施形態によれば、組成物は、国際公開第２００５／００３９９５号に記載の多糖（ｐｏｌｙｏｓｉｄｉｃ）抗原などの多糖抗原を更に含み得る。例えば、企図される多糖抗原は、目的の系統、特に高い普及率が好ましくは考えられる血清型、すなわちシゲラ フレックスネリ２ａ、１ｂ及び３ａ、シゲラ ディセンテリエ１並びにシゲラ ソンネのＯ側鎖（血清型の構成要素（ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅ））に対応する合成多糖であり得るが、これらだけに限定されない。企図される多糖抗原は、類似の血清型の細菌培養物から抽出され、解毒されたリポ多糖（ＬＰＳ）でもあり得る。

【００２８】

治療方法及び組成物

本発明によって企図されるＩｐａＤポリペプチド又は機能的誘導体、それをコードするポリヌクレオチド又は機能的断片、及び抗体は、赤痢菌感染症の治療及び／又は予防、又は許容性細胞へのシゲラ系統の侵入の遮断に、様々な方法で使用することができる。

【００２９】
例えば、本発明の一態様によれば、ＩｐａＤポリペプチドは、特異的抗ＩｐａＤ中和抗体の産生に対する免疫原として使用することができる。上述したように、適切な抗ＩｐａＤ中和抗体は、適切な公知のスクリーニング方法を用いて、例えば、シゲラ系統が細胞に侵入するのを中和又は遮断する特定の抗体の能力を測定することによって、決定することができる。
【００３０】
別の一態様によれば、ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその誘導体は、ＤＮＡ免疫方法において、抗ＩｐａＤ中和抗体を産生するように使用することができる。すなわち、ＩｐａＤポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその誘導体は、ベクターに組み込むことができ、ベクターは、注入後に複製可能であり、発現可能であり、それによって抗原ポリペプチドを生体内で産生することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、真核細胞中で機能的であるＣＭＶプロモーターの制御下でプラスミドベクターに組み込むことができる。好ましくは、ベクターは筋肉内注射される。
【００３１】
遺伝子免疫法における本発明のポリヌクレオチドの使用は、好ましくは、筋肉中へのプラスミドＤＮＡの直接注射［Ｗｏｌｆ ｅｔ ａｌ．ＨＭＧ（１９９２）１：３６３、Ｔｕｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（１９９９），１７：２０８９、Ｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（２０００）１８：１８９３、Ａｌｖｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：７８８］、アジュバントと一緒又はアジュバントなしのプラスミドＤＮＡの注射［Ｕｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（１９９９）１８：１８、ＭａｃＬａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ（１９９８）５６：２５９、Ｈａｒｔｉｋｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．（２０００）７：１１７１－８２、Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｙ ａｎｄ Ｒｅｓｈｅｆ，ＰＮＡＳ ＵＳＡ（１９８６）８３：９５５１、Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ＵＳＡ（２００００）９７：８１１］、特定の担体と複合化されたＤＮＡの送達による細胞のターゲティング［Ｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ（１９８９）２６４：１６９８５、Ｃｈａｐｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．（１９９９）６７：６４３４］、種々の形のリポソーム中に複合化又は封入されたプラスミドの注射［Ｉｓｈｉｉ ｅｔ ａｌ．，ＡＩＤＳ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ（１９９７）１３：１４２、Ｐｅｒｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：３３０１］、異なる照射方法を用いたＤＮＡの投与［Ｔａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９２）３５６：１５２、Ｅｉｓｅｎｂｒａｕｎ ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ（１９９３）１２：７９１、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：２９０８］、生命のあるベクターを用いたＤＮＡの投与［Ｔｕｂｕｌｅｋａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ（１９９７）１９０：１９１、Ｐｕｓｈｋｏ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（１９９７）２３９：３８９、Ｓｐｒｅｎｇ ｅｔ ａｌ．ＦＥＭＳ（２０００）２７：２９９、Ｄｉｅｔｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ（２００１）１９：２５０６］などの適切な送達方法又は送達系を利用する。
【００３２】
本発明の更なる一態様は、受動免疫のための特異的抗ＩｐａＤ中和抗体の使用である。
【００３３】
さらに、本発明の別の一態様は、動物における赤痢菌感染症の治療及び／又は予防方法を提供することである。本発明の方法は、動物に本発明の組成物を投与する段階を含む。
【００３４】
さらに、本発明の別の一態様は、許容性細胞に感染する能力のあるシゲラ系統と抗ＩｐａＤ中和抗体を接触させることによって免疫複合体を形成させる段階を含み、前記免疫複

合体が許容性細胞における前記シゲラ系統の侵入を防止又は実質的に低減させる、許容性細胞への少なくとも１つのシゲラ血清型の侵入を遮断する方法を提供することである。

【００３５】

本発明の組成物の成分又は要素の量は、好ましくは治療有効量である。企図される成分の治療有効量は、組成物を投与する宿主において過度に負の効果を生じずに、該成分がその免疫学的役割（すなわち、抗ＩｐａＤ中和抗体の産生）を果たすのに必要な量である。使用成分及び投与組成物の正確な量は、治療する症状のタイプ、治療する動物のタイプ及び年齢、投与方法、組成物中の他の成分などの要因に応じて変わる。

【００３６】

本発明の組成物は、種々の投与経路によって動物に投与することができる。例えば、組成物は、無菌注射水性又は油性懸濁液などの無菌注射製剤の形で投与することができる。これらの懸濁液は、当分野で公知の技術に従って、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を用いて、処方することができる。無菌注射製剤は、無毒の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の無菌注射液又は懸濁液とすることもできる。無菌注射製剤は、非経口的に、例えば、注射によって静脈内、筋肉内若しくは皮下に、注入によって、又は経口的に投与することができる。適切な投与量は、組成物中の成分の各々の量、所望の効果（短期又は長期）、投与経路、治療する動物の年齢及び体重などの要因に応じて変わる。当分野で周知の任意の他の方法を、本発明の組成物の投与に使用することができる。

【００３７】

本発明の別の一態様は、本発明によって企図される上記方法のいずれか内で使用するキットを提供することである。キットは、規定のアッセイを実施するのに必要な２種類以上の成分を含み得る。成分は、化合物、試薬、容器及び／又は装置であり得る。例えば、キット内の１個の容器は、ＩｐａＤタンパク質を特異的に中和するモノクローナル抗体若しくはその断片又はポリクローナル抗体を含み得る。１個以上の追加の容器は、アッセイに使用する試薬、緩衝剤などの要素を含み得る。本発明によって企図される別のキットは、上述したように、シゲラのＩｐａＤタンパク質に対して中和免疫応答を誘導するために、少なくとも１種類のＩｐａＤポリペプチド、又はそれをコードするポリヌクレオチドを含み得る。

【００３８】

本発明は、以下の実施例を参照することによってより容易に理解されるはずである。これらの実施例は、本発明の広範囲な適用性を説明するものであって、その範囲を限定するものではない。本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、実施例を改変し、変更することができる。本明細書に記載のものと類似又は等価であるあらゆる方法及び材料を本発明の試験のための実施に使用することができるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１】ＢＳ^{3}で処理され、ネガティブ染色された細菌の電子顕微鏡写真である。矢印は、細菌表面から突出した針の先端における明瞭な密集（ｄｉｓｔｉｎｃｔ　ｄｅｎｓｉｔｉｅｓ）を示す。バーは１００ｎｍである。

【図２】単一粒子分析によって得られたＮＣの針部分の突出部地図（クラス合計）である。ＢＳ^{3}で処理された野生型から単離されたＮＣの（Ａ－Ｂ）地図（Ａ－Ｃ）、ＢＳ^{3}処理なしで野生型から単離されたＮＣの（Ａ－Ｂ）地図（Ｄ－Ｆ）、及びＢＳ^{3}処理されたＩｐａＤ変異体系統から単離されたＮＣの（Ａ－Ｂ）地図（Ｇ－Ｉ）。矢印は、ＢＳ^{3}処理なしで調製された針部分に結合したレムナント密集を指す。バーは１０ｎｍである。

【図３】精製ＮＣの免疫ブロット分析を示す図である。野生型及びＩｐａＤ欠損系統から精製された細胞全体の抽出物（ＷＣＥ）並びに架橋（＋ＣＲ）及び非架橋（－ＣＲ）ＮＣを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ並びにＭｘｉＪ、ＭｘｉＮ及びＩｐａＤに特異的な抗体を用いた免疫ブロットによって分析した。ＩｐａＤは、架橋された野生型細菌から調製されたＮＣ中でＷＣＥレベルに濃縮されたにすぎなかった。ＭｘｉＪは、完全なＴ３ＳＡを実証する正

の対照である。Ｔ３Ｓの細胞質成分であるＭｘｉＮは、非結合細胞質タンパク質の混入を実証する正の対照である。
【図４】免疫電子顕微鏡法によるＩｐａＤ局在化を示す図である。ＢＳ^{3}処理野生型細菌から精製されたＮＣを、抗ＩｐａＤ抗体と一緒に温置し、ネガティブ染色した（Ａ－Ｄ）。ＢＳ^{3}で処理されていない細菌から精製された２５０個のＮＣの平均画像を比較のためにＥに示す。バーは１０ｎｍである。
【図５】野生型Ｓ．フレックスネリによる上皮細胞の浸潤アッセイを示すグラフである。細菌を抗ＩｐａＤ又は抗ＩｐａＢポリクローナル抗体の段階希釈物と一緒に温置し、細胞溶解物を培養皿に蒔くことによって細胞内ゲンタマイシン耐性菌を数えた。各条件における侵入の効率を、ＰＢＳで処理した野生型系統の侵入効率に対して表す。値は、少なくとも３回の独立した実験の平均であり、エラーバーは標準偏差を示す。
【図６】シゲラ系統（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ３９１７５３）のＩｐａＤタンパク質の従来技術のアミノ酸配列である。
【図７】図６のＩｐａＤタンパク質をコードする従来技術の核酸配列である（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＬ３９１７５３）。
【００４０】
（実施例）
ＩＩＩ型分泌（Ｔ３Ｓ）機構は、多数のグラム陰性病原菌によって病原タンパク質を動物及び植物宿主細胞に注入するのに使用される。針複合体として知られるＴ３Ｓ装置の核は、細菌膜と細菌表面上に突出する針の両方を横断する基底小体で構成される。シゲラフレックスネリにおいては、ＩｐａＤは、細菌が宿主と接触する前にＴ３Ｓ装置の活性を阻害するのに必要であり、宿主細胞中への細菌タンパク質の転位を補助すると提案された。本発明者らは、架橋された細菌及び軽度に精製された針複合体の電子顕微鏡法分析によって、ＩｐａＤの局在化を調べた。この分析によって、針先端における明瞭な密集の存在が明らかになった。単一粒子分析、免疫標識化及び生化学分析の組合せによって、ＩｐａＤは、針先端における構造の一部を形成することが実証された。抗ＩｐａＤ抗体は、上皮細胞への細菌の侵入を遮断することが判明した。
【００４１】
一般材料及び方法
細菌系統及び増殖培地
この試験に使用した系統は、野生型Ｓ．フレックスネリ５系統Ｍ９０Ｔ－Ｓｍ［１３］、そのｉｐａＤ誘導体ＳＦ６２２［１４］である。細菌は、トリプシンカゼイン（ｔｒｙｐｔｉｃ　ｃａｓｅｉｎ）ソイブロス（ＴＳＢ）（Ｓｉｇｍａ）中で３７℃で増殖された。
【００４２】
針複合体（ＮＣ）の精製
ＮＣを［１５］に記載のように精製した。３７℃のＴＳＢ　１ｌ中の対数増殖期の細菌を遠心分離によって収集し、リン酸緩衝食塩水２５ｍｌに再懸濁させ、１ｍＭビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（ＢＳ^{3}）の存在下で３７℃で３０分間温置した。混合物に１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌを補充し、３７℃で１５分間温置した。ＢＳ^{3}で処理した培養物を収集し、１ｍＭフェニルメチルスルホニルフルオリドを補充した氷冷溶解緩衝剤（０．５Ｍスクロース、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ［ｐＨ７．５］、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５ｍｇ／ｍｌリゾチーム）に再懸濁させ、４℃で４５分間及び３７℃で１５分間温置した。生成したスフェロプラストを０．０１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００と一緒に３０分間温置し、４ｍＭ　$MgCl_2$及び８０μｇ／ｍｌ　ＤＮＡｓｅ（Ｓｉｇｍａ）で３０℃で２０分間処理した。破片を遠心分離（２０，０００ｇで４℃で２０分間）によって除去し、膜画分を遠心分離（１１０，０００ｇで４℃で３０分間）によってペレット化し、ＴＥＴ緩衝剤（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）に再懸濁させた。［１６］に記載のように、ＭｘｉＪ、ＭｘｉＮ及びＩｐａＤに対する抗体を用いて免疫ブロット分析を実施した。

【００４３】
電子顕微鏡法及び画像解析
細胞全体及び精製ＮＣの試料を、グロー放電炭素被覆銅格子上で２％酢酸ウラニルを用いてネガティブ染色した。電子顕微鏡法を、１２０ｋＶで操作された電界放出電子銃を備えたＰｈｉｌｉｐｓ　ＣＭ１２０ＦＥＧを用いて実施した。４０００　ＳＰ　４Ｋ低速走査ＣＣＤカメラを用いて、８０，０００倍で、試料レベルで３．７５Åの（画像を値域ごとにまとめた（ｂｉｎｎｉｎｇ）後の）画素サイズで、半自動化試料選択及びデータ収集用「ＧＲＡＣＥ」ソフトウェアを用いて、画像を記録した［１７］。［１５］に記載のように、複数基準（ｍｕｌｔｉ－ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）及び無基準（ｎｏｎ－ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）手順、多変量統計解析並びに分類を含む単一粒子分析を実施した。免疫標識化のために、精製ＮＣを親和性精製ＩｐａＤポリクローナル抗体（ｐＡｂ）と一緒に最終濃度０．１３２ｎｇ／μｌ）で２０℃で１時間温置した。試料を２％酢酸ウラニルで染色し、上記のように観察した。

【００４４】
浸潤アッセイ
対数増殖期の野生型又はｍｘｉＤ系統の培養物２ｍｌ（OD_{600nm}　０．４）を抗ＩｐａＤ（希釈１／２０００から１／５０）又は抗ＩｐａＢ（１／５０）抗体の存在下で３７℃で１時間温置し、細菌を２　10^5　ＨｅＬａ細胞を含むプレート上で２０００ｇで１０分間遠心分離した。３７℃で１時間温置後、細胞をＥＢＳＳ　２ｍｌで３回洗浄し、５０μｇ／ｍｌゲンタマイシンを含むＭＥＭ媒質２ｍｌと一緒に１時間温置した。ＥＢＳＳ　２ｍｌで３回洗浄後、プレートを０．５％デオキシコラート溶液と一緒に２０℃で１５分間温置し、細胞溶解物を希釈し、寒天板に蒔いて、コロニーを数えた。

【実施例１】

【００４５】
Ｔ３ＳＡ針の先端における特徴的構造
タンパク質精製手順は、弱く結合したサブユニットを含まなくてもよい最も安定な複合体を選択する傾向がある。本発明者らは、最近、０．０１％と低いＴｒｉｔｏｎ－Ｘ１００洗浄剤濃度が膜からのＮＣの放出を誘発するのに十分であることを示した（Ｓａｎｉｅｔ　ａｌ，　２００６）。針に結合した潜在的に不安定なサブユニットを検出するために、本発明者らは、精製前に細菌に対してBS^3を用いた架橋段階を実施した。電子顕微鏡法分析によれば、BS^3処理後に、大部分の細菌は、さらなる密集を有する針付属器を最先端に提示した（図１）。

【００４６】
［１８］に記載のように、膜の洗浄剤可溶化後にBS^3処理細菌からＮＣを精製した。調製物は、構造解析を実施するのに、針の先端にさらなる密集を有する十分な数のＮＣを含んだ。単離されたＮＣの２次元突出部地図を計算するために、電子顕微鏡法画像を単一粒子分析によって分析した。本発明者らは、比較的直線状の短い針付属器を有し、長さが４５ｎｍに近いＮＣの数百の画像を選択した。平均されたＮＣは、針先端周囲及び基底小体上部に密集の存在を明確に示した（図２Ａ及び２Ｂ。ＮＣの全景については図４Ｅも参照されたい。）。しかし、ＮＣは、針の長さが変動した結果として、平均後にわずかにかすんで見えた。基底部をマスクした後に突出部を整列させ、分類したときに、針部分先端のより鮮明な特徴が得られた（図２Ｃ）。架橋された粒子の平均地図の際立った特徴は、針先端の両側の密集の存在である。対照的に、野生型系統から架橋せずに調製された粒子の平均地図は、これらの密集の大部分を欠く針を示した（図２Ｄ－Ｆ）。これらの試料では、架橋調製物では強力な密集が存在する同じ位置に、かすかな密集が見られる（矢印、図２Ｅ及び２Ｆ）。これらの結果は、架橋の非存在下では、大部分の精製ＮＣが、架橋後に観察される密集を形成する追加の分子を欠くことを示唆している。Ｔ３ＳＡの先端に密集を形成する分子を確認するために、本発明者らは、ＩｐａＤを発現しないｉｐａＤ変異体を用いて類似の実験を実施した。ＩｐａＤは、ＩｐａＢと一緒に、誘導物質の非存在下でＴ３ＳＡ不活性を維持するのに必要であり、ＩｐａＤの一小部分は膜に結合している［

９］。ＢＳ^{3}処理ｉｐａＤ変異体から精製されたＮＣは、針先端の両側に密集を示さず（図２Ｇ－Ｉ）、ＩｐａＤがこの構造要素の一部であり、又はこの構造要素の構築に必要であることを示唆する。

【実施例２】

【００４７】

ＩｐａＤは、Ｔ３ＳＡ針の先端に存在する。

【００４８】

ＩｐａＤが、観察された密集を構成するかどうかを試験するために、ＢＳ^{3}処理野生型細菌から精製されたＮＣをＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び免疫ブロットによって分析した（図３）。ＩｐａＤは、非架橋細菌から調製されたＮＣよりも、架橋野生型細菌から調製されたＮＣにおいて豊富であったが（図３、右パネル、右レーン）、少量は非架橋調製物においても同時精製され、したがって非架橋ＮＣの平均の場合の針先端におけるかすかな密集を裏付けている。主要ＮＣ成分であるＭｘｉＪは、全調製物中に類似した量で存在する（図３）。ＭｘｉＮなどのＴ３Ｓ機構の細胞質成分を認識する抗体を用いた対照実験は、内細胞成分によるＮＣの汚染を示さず（図３）、調製物中のＩｐａＤの存在が細胞質タンパク質の混入によるものではないことを示した。

【００４９】

ＮＣ先端で検出される密集がＩｐａＤを含むことを確認するために、本発明者らは、抗ＩｐａＤ血清を用いた免疫染色を実施した。抗体は、ＢＳ^{3}処理野生型細菌から調製されたＮＣ中の針の先端に特異的に結合した（図４Ａ－Ｄ）。一部の針は、恐らくは、２本の針を有する二価の抗体との相互作用の結果として、その先端によって結合することも観察された（左下の枠、図４Ｄ）。対照実験では、抗体はｉｐａＤ変異体から単離されたＮＣの針に結合しないことが判明した（データ示さず）。

【実施例３】

【００５０】

抗ＩｐａＤ抗体は、上皮細胞への細菌の侵入を遮断する。

【００５１】

ＩｐａＤは、上皮細胞への細菌の侵入に必要であり［１４］、本明細書に示したように、Ｔ３ＳＡの先端に局在するので、本発明者らは、抗ＩｐａＤ抗体が、ＨｅＬａ細胞への細菌の侵入を妨害し得るかどうかを検討した。異なる濃度の抗ＩｐａＤ血清と一緒に温置した細菌、又は対照として抗ＩｐａＢ血清と一緒に温置した細菌を用いて、ＨｅＬａ細胞を感染させた。細菌を抗ＩｐａＤ血清に曝露し、抗ＩｐａＢ血清に曝露しないと、細菌の侵入は用量依存的に阻害された（図５）。抗ＩｐａＤ抗体で処理すると、Ｓ．フレックスネリ２ａ系統の侵入も阻害された（データ示さず）。

【００５２】

実施例１から３に関する一般的考察

Ｓ．フレックスネリＴ３ＳＡは、細菌と上皮細胞の接触によって活性化され、ｉｐａＢ又はｉｐａＤの不活性化によって調節解除される。これらのタンパク質は、Ｔ３ＳＡを塞ぐ複合体の形成に必要であると提案された。ここで、本発明者らは、ＩｐａＤが針の先端に存在する証拠を示す。架橋細菌からの表面が露出した針の透過型電子顕微鏡写真は、針の先端に存在する特徴的構造を示し、軽度に精製されたＮＣの免疫ブロット分析は、ＩｐａＤが架橋ＮＣと同時精製されることを示した。

【００５３】

架橋野生型細菌から単離されたＮＣの計算された平均は、針の先端の両側に明瞭な密集を示した。この特徴は、架橋剤で処理されなかった野生型系統と架橋剤で処理されたｉｐａＤ変異体の両方から単離されたＮＣにおいて認められなかった。免疫電子顕微鏡の結果によれば、針先端の観察された密集はＩｐａＤ分子を含む。しかし、追加の密集の正確な配置は、２Ｄ突出部地図からは想起することができない。２個の追加の集団は、約７×７ｎｍの寸法を有する。ＩｐａＤのサイズは３７ｋＤａであるので、ＩｐａＤの幾つかの複製物がこれらの構造中に恐らく存在する。実際、ＩｐａＤは、オリゴマーを形成すると提

案された［１９］。ＩｐａＤは、エルシニア　エンテロコリチカ（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）のＬｃｒＶと幾つかの機能的類似性を示し、これら２種類のタンパク質は類似のサイズを有し、どちらも宿主細胞の膜において、提案された輸送体、すなわち、Ｓ．フレックスネリにおけるＩｐａＢ及びＩｐａＣ、並びにＹ．エンテロコリチカにおけるＹｏｐＢ及びＵｏｐＤの挿入に必要である［９、２０、２１］。最近のデータによれば、ＬｃｒＶはＴ３ＳＡ針の先端に局在する［２０］。エルシニアにおける構造は、シゲラにおける構造とわずかに異なると考えられ、より小さい突出した密集を側面に有し、異なる先端を有する。

【００５４】

Ｔ３ＳＡ針の先端にＩｐａＤを含む構造要素を確認することは、Ｓ．フレックスネリＴ３ＳＡの組成及び構造に更なる見識を与える。ごく最近、ＩｐａＤがＴ３ＳＡ針の先端に局在し、そこで宿主細胞膜への輸送体の分泌及び適切な挿入を制御する機能を果たすことも生化学的方法によって実証された［２２］。しかし、今回の単一粒子分析は、針先端におけるＩｐａＤの位置を直接実証し、細菌が細胞と接触する前にＩｐａＤがＴ３ＳＡの栓として作用するという仮説に対する信頼を高める。エルシニアにおけるＬｃｒＶに対して提案されたように、ＩｐａＤは、細胞膜内の輸送体成分の挿入も促進し得る。抗ＩｐａＤ中和抗体を用いた処理によるＨｅＬａ細胞への細菌侵入の阻害は、抗体とＩｐａＤの結合がタンパク質の機能を妨害することを示す。ＬｃｒＶは、動物試験において疫病に対する感染防御抗原であることも判明した［２３、２４］。したがって、ＩｐａＤは、シゲラの幾つかの血清型に対して有効であるワクチンを調製するための興味深い標的である。

【実施例４】

【００５５】

生体内での抗ＩｐａＤ抗体の保護作用

ウサギにおいて実施された腸骨係蹄（Ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ　ｉｌｉａｃ　ｌｏｏｐ）に10^{9}ＣＦＵのシゲラ　フレックスネリ血清型５ａの懸濁液を単独で接種し、又は該腸骨係蹄をＩｐａＤに特異的なウサギポリクローナル血清の異なる希釈物の存在下で温置した。抗ＩｐａＤポリクローナル血清は、ＣＮＣＭに２００７年１０月１０日に受託番号Ｉ－３８３９で寄託されたｐＭａｌ－ＩｐａＤ発現ベクターによって発現されたＩｐａＤタンパク質の機能的誘導体で免疫化した後に、産生された。このモデルは、ヒトにおける細菌性赤痢中に、この腸管侵入性細菌による腸管上皮の破断、浸潤及び炎症性破壊後に観察された病変部セットの概要を示す。これらの病変部は、炎症細胞ろ液、特に多核好中球と組み合わされた、腸じゅう毛及び浮腫の形態学的変化と、最終的に腸管腔中の潰ようになる膿ようとの組合せによって顕在化する。全体として、これは、浸潤性であることが多い管腔の粘液膿性しん出物を増加させる。

【００５６】

細菌を単独で接種した腸係蹄中の組織破壊を、抗ＩｐａＤポリクローナル血清の存在下で細菌を接種したものと比較することによって、抗ＩｐａＤ抗体濃度に依存した保護作用が認められた。実際、使用する血清を希釈しないと、病変部が見られない。しかし、使用する血清が１／１０希釈であると、極めて離散的な病変部が出現し、１／１００希釈を用いるとより明確になり、その間中、細菌単独で認められた病変部よりも重要でないままである。非該当タンパク質に向けられる対照ポリクローナル血清では、保護作用は認められない。したがって、認められる保護作用は、抗ＩｐａＤ抗体の存在と特異的に関連づけられる。

【００５７】

【表１】

参考文献

[1] E.H.LaBrec, H. Schneider, T.J. Magnani, S.B. Formal, Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J. Bacteriol. 43 (1994) 1503-1518.

[2] C. Parsot, *Shigella spp.* and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS Microbiol. Lett. 252 (2005) 11-18.

[3] F.G. van der Goot, G. Tran van Nhieu, A. Allaoui, P. Sansonetti, F. Lafont, Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. J Biol. Chem. 279 (2004) 47792-47798.

[4] Y. Chen, M.R. Smith, K. Thirumalai, A. Zychlinsky, A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. EMBO J. 15 (1996) 3853-3860.

[5] A. Kuwae, S. Yoshida, K. Tamano, H. Mimuro, T. Suzuki, C. Sasakawa, *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane: functional analysis of IpaC. J. Biol. Chem. 276 (2001) 32230-32239.

[6] R. Ménard. M.C. Prevost. P. Gounon. P. Sansonetti. C. Dehio, The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996)1254-1258.

[7] G. Tran Van Nhieu, R. Bourdet-Sicard, G. Dumenil, A. Blocker, P.J. Sansonetti, Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. Cell Microbiol. 2 (2000) 187-193.

[8] G. Tran Van Nhieu, E. Caron, A. Hall, P.J. Sansonetti, IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. EMBO J. 18 (1999) 3249-3262.

[9] R. Ménard, P. Sansonetti, C. Parsot, The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. EMBO J. 13 (1994) 5293-5302.

[10] C. Parsot, R. Menard, P. Gounon, P.J. Sansonetti, Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. Mol. Microbiol. 16 (1995) 291-300.

[11] K.R. Turbyfill, J.A. Mertz, C.P. Mallett, E.V. Oaks, Identification of epitope and surface-exposed domains of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen D (IpaD). Infect Immun. 66 (1998) 1999-2006.

[12] W.L. Picking, H. Nishioka, P.D. Hearn, M.A. Baxter, A.T. Harrington, A. Blocker, W.D. Picking, IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. Infect. Immun. 73(2005) 1432-440.

[13] A. Allaoui, P.J. Sansonetti, C. Parsot, *MxiJ*, A Lipoprotein Involved in Secretion of Shigella Ipa Invasins, Is Homologous to *Yscj*, A Secretion Factor of the *Yersinia* Yop Proteins. J. Bacteriol. 174 (1992) 7661-7669.

[14] R. Menard, P.J. Sansonetti, C. Parsot, Nonpolar Mutagenesis of the Ipa Genes Defines *IpaB*, *IpaC*, and *IpaD* As Effectors of Shigella-Flexneri Entry Into Epithelial Cells. J. Bacteriol. 175(1993) 5899-5906.

[15] M. Sani, A. Allaoui, F. Fusetti, G.T. Oostergetel, W. Keegstra, E.J. Boekema, Structural organisation of the needle complex of the type III secretion Apparatus of *Shigella flexneri*. Micron (in press) 2006.

[16] N. Jouihri, M.P. Sory, A.L. Page, P. Gounon, C. Parsot, A. Allaoui, MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 49 (2003) 755-767.

[17] G.T. Oostergetel, W. Keegstra, A. Brisson, Automation of specimen selection and data acquisition for protein electron crystallography. Ultramicroscopy 74 (1998) 47-59.

[18] R Schuch, A.T. Maurelli, MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi Spa type III secretion system of Shigella, interact with and stabilize the *MxiD* secretin in the cell envelope. J. Bacteriol. 183 (2001) 6991-6998.

[19] R. Davis, M.E. Marquart, D. Lucius, W.D. Picking, Protein-protein interactions in the assembly of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens IpaB and IpaC into protein complexes. Biochim. Biophys. Acta 1429 (1998) 45-56.

[20] C.A. Mueller, P. Broz, S.A. Muller, P. Ringler, F. Erne-Brand I., Sorg, M. Kuhn, A. Engel, G.R. Cornelis, The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. Science 310 (2005) 674-676.

[21] L.J. Mota, Type III secretion gets an LcrV tip. Trends Microbiol. 14 (2006) 197-200.

[22] M. Espina, A.J.Olive, R. Kenjale, D.S. Moore, S.F. Ausar, R.W. Kaminski, E.V. Oaks, C.R. Middaugh, W.D. Picking, W.L. Picking, IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of Shigella flexneri Infect. Immun. 74 (2006) 4391-4400.

[23] J. Hill, J.E. Eyles, S.J. Elvin, G.D. Healey, R.A. Lukaszewski, R.W. Titball, Administration of antibody to the lung protects mice against pneumonic plague. Infect. Immun. 74 (2006) 3068-3070.

[24] S.J. Elvin, J.E. Eyles, K.A. Howard, E. Ravichandran, S. Somavarappu, H.O. Alpar, E.D. Williamson, Protection against bubonic and pneumonic plague with a single dose microencapsulated sub-unit vaccine. Vaccine 24 (2006) 4433-4439.

【図１】

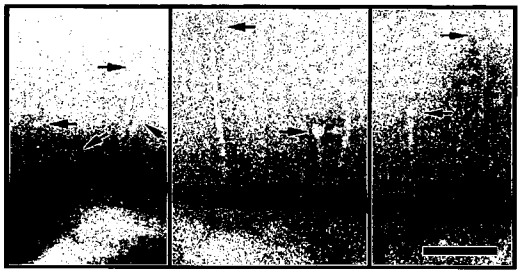


FIGURE 1

【図２】

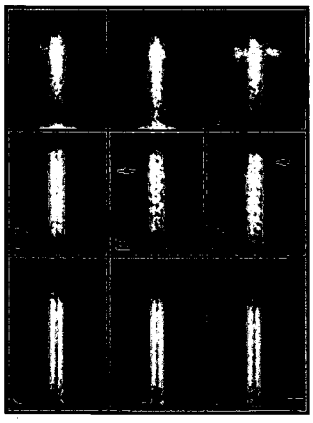


FIGURE 2

【図３】

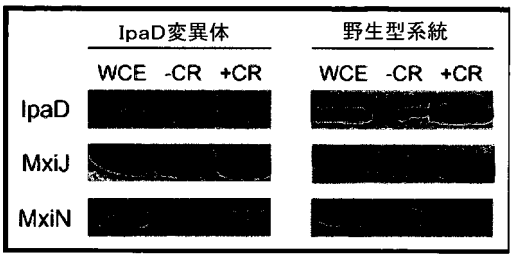


FIGURE 3

【図４】

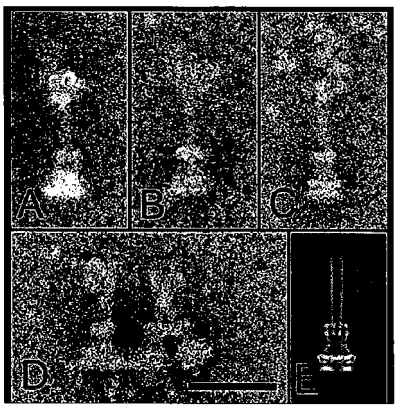


FIGURE 4

【図５】

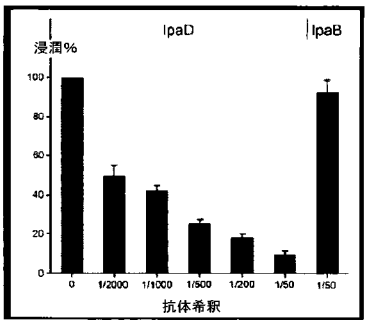


FIGURE 5

【図６】

```
MNITTLTNSI STSSFSPNNT NGSSTETVNS DIKTTTSSHP VSSLTMLNDT LHNIRTTNQA 60
LKKELSQKTL TKTSLEEIAL HSSQISMDVN KSAQLLDILS RNEYPINKDA RELLHSAPKE 120
AELDGDQMIS HRELWAKIAN SINDINEQYL KVYEHAVSSY TQMYQDFSAV LSSLAGWISP 180
GGNDGNSVKL QVNSLKKALE ELKEKYKDKP LYPANNTVSQ EQANKWLTEL GGTIGKVSQK 240
NGGYVVSINM TPIDNMLKSL DNLGGNGEVV LDNAKYQAWN AGFSAEDETM KNNLQTLVQK 300
YSNANSIFDN LVKVLSSTIS SCTDTDKLFL HF                               332
```

FIGURE 6

【図７】

```
   1 tcagaaatgg agaaaaagtt tatctgtatc tgtacatgag cttattgtac tactcaaaac
  61 ctttactaaa ttatcaaaaa tactattggc attactgtat ttttgaacta aagtttgaag
 121 attatttttc attgtttcat cttcggcaga gaatccggca ttccatgcct gatattttgc
 181 attatctagc acaacctggc catttccacc tagattatct aagcttttta acatattgtc
 241 tattggggtc atgtttatac tgacaacata tcccccgttt ttttgagata ccttgccgat
 301 tgttccacct aattctgtaa gccatttatt tgcttgttcc tgactaacag tattatttgc
 361 tggatatagc ggtttatctt tatatttttc cttgagttct tccaatgcct ttttaagcga
 421 gttgacttgt aatttcacgg agtttccgtc gttacctccg ggagagatcc agccggcaag
 481 actggaaaga acagcgctaa aatcttgata catttgagta tatgaactaa cggcatgttc
 541 atatactttc agatactgtt cattaatatc attgatggag tttgcaattt tagcccacag
 601 ttctctatga gatatcattt gatctccatc aagctcggct tctttcgggg ctgaatgtaa
 661 taattctctt gcgtctttat taattggata ttcgttcctg gaaagaatat ccaatagttg
 721 agcggattta tttacatcca tgctaatctg agatgaatgt aatgctattt cttctagcga
 781 tgttttagtc aacgtttttt gtgaaagctc tttctttaat gcctgatttg ttgttctgat
 841 attatgaagg gtgtcgttga gcatagtaag ggaacttaca ggatgagaac tggtcgttgt
 901 ttttatatca gaattaactg tttcggttga tgaaccgttg gtattgtttg gactgaatga
 961 tgaggtggaa atactattag tcagagttgt tatattcat
```

FIGURE 7

【配列表】
0005495261000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 509103705
ユニベルシテ・リーブル・ドウ・ブリユツセル
ベルギー国、ベ－１０５０・ブリユツセル、アブニユ・エフ・デ・ローズベルト・５０、カズ・ポスタル・５０
(73)特許権者 506188817
ユニバーシティ オブ フローニンゲン
オランダ国 エヌエル－９７１３ アーフェー フローニンゲン，アントニウス デウシングラーン １
(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(74)代理人 100114188
弁理士 小野 誠
(74)代理人 100140523
弁理士 渡邉 千尋
(74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 アラウイ，アドベルムナアイム
ベルギー国、ベ－１０７０・ブリユツセル、リユ・ドウ・ラ・ベリテ・ニユメロ・６
(72)発明者 サンソネツテイ，フイリツプ
フランス国、エフ－７５０１４・パリ、ブルバール・ブリユヌ、１３１
(72)発明者 サニ，ムサ
オランダ国、１０６６・エン・イエー・アムステルダム、ハーモントストラート・４１２
(72)発明者 ボトー，アンヌ
ベルギー国、ベ－１０７０・ブリユツセル、リユ・レオポルド・ドウ・スウエフ・３６
(72)発明者 パルソ，クロード
フランス国、エフ－７５０１５・パリ、リユ・モントーバン、７
(72)発明者 ブケマ，エフベルト・イエー
オランダ国、エン・エル－９７４２・エー・フエー・フローニンゲン、ユーピテルストラート・９９

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 国際公開第００／０１８３５５（WO，Ａ１）
MENARD R, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 米国, １９９６年 ２月, V93 N3, P1254-1258
TURBYFILL K R, INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, １９９８年 ５月 １日, V66 N5, P1999-2006

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／１１２
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｐ ３１／０４
Ｃ０７Ｋ １４／２５
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）