

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-229667

(P2004-229667A)

(43) 公開日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/106	A 6 1 K 39/106	4 B O 6 4
C O 7 K 14/195	C O 7 K 14/195	4 B O 6 5
C O 7 K 16/12	C O 7 K 16/12	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-92095 (P2004-92095)	(71) 出願人	397067152
(22) 出願日	平成16年3月26日 (2004.3.26)		ファイザー・プロダクツ・インク
(62) 分割の表示	特願2000-320736 (P2000-320736) の分割		アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市 イースタン・ポイント・ロード
原出願日	平成12年10月20日 (2000.10.20)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	60/160922		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成11年10月22日 (1999.10.22)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
		最終頁に続く	

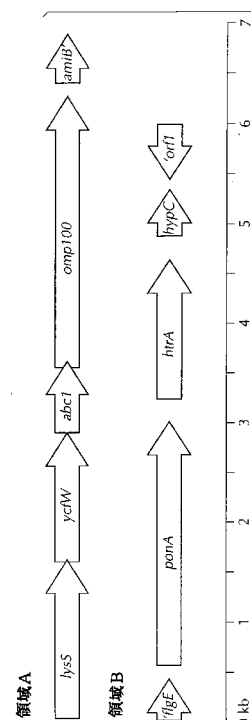
(54) 【発明の名称】 ローソニア・イントラセルラリスタンパク質、および関連の方法および材料

(57) 【要約】

【課題】 ローソニア・イントラセルラリスタンパク質、および関連の方法および材料を提供すること。

【解決手段】 単離されたポリペプチド分子は、L. イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列、その配列の実質的な部分または相同配列を含む。関連ポリペプチド、免疫原性組成物および検定法を記載する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたポリヌクレオチド分子であって、

(a) L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列；

(b) 該 L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質をコードしている該ヌクレオチド配列の実質的な部分であるヌクレオチド配列；および

(c) (a) または (b) のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む上記単離されたポリヌクレオチド分子 10

【請求項 2】

前記 L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質をコードしている前記ヌクレオチド配列を含む請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 3】

約 n t 1 6 5 ～約 n t 1 7 4 5 の配列番号：1 の読み取り枠、約 n t 3 0 3 1 ～約 n t 3 7 3 8 の配列番号：1 の読み取り枠、約 n t 3 6 9 5 ～約 n t 6 3 8 5 の配列番号：1 の読み取り枠、約 n t 2 5 2 ～約 n t 2 6 9 0 の配列番号：2 の読み取り枠、約 n t 2 8 9 1 ～約 n t 4 3 1 5 の配列番号：2 の読み取り枠、および約 n t 4 5 8 1 ～約 n t 4 8 2 9 の配列番号：2 の読み取り枠から成る群より選択される読み取り枠から成るヌクレオチド配列を含む請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 20

【請求項 4】

プロモーター活性を有する且つ約 n t 2 6 9 1 ～約 n t 2 8 9 0 の配列番号：2 内で見出される 2 0 ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子またはその補体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子を含む組換え体ベクター。

【請求項 6】

p o n A 遺伝子を含むプラスミド p E R 4 3 2 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 5) 30、h t r A 遺伝子を含むプラスミド p E R 4 3 4 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 6)、h y p C 遺伝子を含むプラスミド p E R 4 3 6 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 7)、l y s S および y c f W 遺伝子を含むプラスミド p T 0 6 8 (A T C C 受託番号 P T A - 2 2 3 2)、y c f W および a b c 1 遺伝子を含むプラスミド p E R 4 3 8 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 8)、および O m p 1 0 0 遺伝子を含むプラスミド p E R 4 4 0 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 9) から成る群より選択されるプラスミドから成る請求項 5 に記載の組換え体ベクター。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の組換え体ベクターを含む形質転換された宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の形質転換された宿主細胞によって生産されるポリペプチド。 40

【請求項 9】

ローソニア遺伝子を変化させるのに用いることができるポリヌクレオチド分子を含む遺伝子構築物であって、

(a) h t r A、p o n A、h y p C、l y s S、y c f W、a b c 1 または o m p 1 0 0 遺伝子のヌクレオチド配列と他の点では同様である、またはそれに相同のヌクレオチド配列と他の点では同様であるヌクレオチド配列、または該ヌクレオチド配列の実質的な部分を含むが、そのヌクレオチド配列が、該 h t r A、p o n A、h y p C、l y s S、y c f W、a b c 1 または o m p 1 0 0 遺伝子を変化させうる一つまたはそれ以上の突然変異を更に含むポリヌクレオチド分子；または

(b) 該 h t r A、p o n A、h y p C、l y s S、y c f W、a b c 1 または o m p 1 0 0 遺伝子の O R F にその場 (i n s i t u) で自然に隣接しているヌクレオチド配列、または該隣接する配列に相同のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み；

(a) または (b) の遺伝子構築物を用いたローソニア細胞の形質転換が、該 h t r A、p o n A、h y p C、l y s S、y c f W、a b c 1 または o m p 1 0 0 遺伝子を変化させるようにある上記遺伝子構築物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の遺伝子構築物を含む形質転換された細胞。

【請求項 11】

単離されたポリペプチドであって、

(a) L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質；

(b) 該 L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c) 該 L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質の実質的な部分、または該 L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有する該ポリペプチドの実質的な部分から成るポリペプチド；

(d) 別のタンパク質またはポリペプチドに融合した (a)、(b) または (c) のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質；および

(e) (a)、(b)、(c) または (d) のタンパク質またはポリペプチドの類似体または誘導体から成る群より選択される該ポリペプチド。

【請求項 12】

前記 L. イントラセルラリスタンパク質が、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8 および配列番号：102 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する請求項 11 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 13】

挿入された、欠失したまたは置換された 1～10 個のアミノ酸を有する、それらの組合せを含めた前記 L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質から成るポリペプチドを含む請求項 11 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

抗ローソニア抗体と特異的に反応性である H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質のエピトープを含む実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質と特異的に反応する単離された抗体。

【請求項 17】

請求項 10 に記載の形質転換された細胞を含む弱毒化生ワクチン。

【請求項 18】

請求項 10 に記載の形質転換された細胞を死滅した形で含む死菌ワクチン。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

請求項 11 に記載のポリペプチドの免疫学的有効量を薬学的に許容しうる担体との組合せで含む免疫原性組成物。

【請求項 20】

請求項 11 に記載のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子の免疫学的有効量を薬学的に許容しうる担体との組合せで含む免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ローソニア・イントラセルラリス (*Lawsonia intracellularis*) に由来するタンパク質に関し、関連のタンパク質、核酸および免疫原性組成物を包含する。それら免疫原性組成物は、ブタなどの感受性動物の L. イントラセルラリス感染の予防において特に有用である。それらタンパク質、フラグメントおよび核酸も、診断薬として用いることができる。

【背景技術】

【0002】

商業的に飼育されているブタは、ブタ繁殖性腸症 (PPE) と集合的に称される広範囲の腸疾患または症候群に感受性である。これら疾患には、腸腺腫症複合症 (Barker I.K. ら, 1985, "Pathology of Domestic Animals," 第 3 版, 2 巻, 1-237 頁中, K.V.F. Jubb ら監修 (Academic Press: オランダ))、ブタ腸腺腫症 (PIA)、壊死性腸炎 (Rowl and A.C. ら, 1976, Veterinary Record 97:178-180)、繁殖性出血性腸症 (Love, R.J. ら, 1977, Veterinary Record 100:473)、限局性回腸炎 (Jonsson, L. ら, 1976, Acta Veterinaria Scandinavica 17:223-232)、出血性腸症候群 (O'Neil, I.P.A., 1970, Veterinary Record 87:742-747)、ブタ繁殖性腸炎およびカンピロバクター (*Campylobacter*) 種によって起こる腸炎 (Straw, B.E., 1990, Journal of American Veterinary Medical Association 197:355-357) が含まれる。

【0003】

PPE の一つの主な種類は、非出血性であり、ブタ腸腺腫症 (PIA) によって現れる。この型の PPE は、しばしば、成長遅滞および軽い下痢を引き起こす。もう一つ重要な種類の PPE は、出血性である。それは、致死的事であることが多く、繁殖性出血性腸症 (PHE) によって現れ、その場合、遠位小腸内腔は、充血した状態になる。

【0004】

ブタの PPE は、商業的に最も重要であるが、PPE は、ハムスター (Stills, H.F., 1991, Infection and Immunology 59:3227-3236)、フェレット (Fox ら, 1989, Veterinary Pathology 26:515-517)、モルモット (Elwell ら, 1981, Veterinary Pathology 18:136-139)、ウサギ (Schodeb ら, 1990, Veterinary Pathology 27:73-80) および若干の鳥類 (Mason ら, 1998) の飼育においても問題である。

【0005】

PPE を引き起こす微生物は、カンピロバクター様細菌 "L. イントラセルラリス" である (McOrist S ら, 1995, International Journal Of Systematic Bacteriology 45:820-825)。この微生物は、回腸共生生物イントラセルラリスとしても知られている (Stills, 1991, 上記)。ブタの PPE 様疾患は、カンピロバクターの他の種によって引き起こされることもありうる (Gebhart ら, 1983, American Journal of Veterinary Research 44:361-367)。

【0006】

L. イントラセルラリスは、感染した動物の絨毛の細胞質中および腸陰窩細胞中で認められ、そこで、構造的な不規則および腸細胞増殖を引き起こす。絨毛および腸陰窩のような膿瘍形態は、分岐した状態になり且つ炎症性細胞で満たされる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

現行のPPE制御は、抗細菌化合物の使用に頼っている。しかしながら、L. イントラセルラリス感染を制御するそれに代わる手段が要求される。

国際特許出願第PCT/AU96/00767号には、ワクチンとして有用であるL. イントラセルラリスのポリペプチドおよび免疫原性組成物が記載されている。しかしながら、L. イントラセルラリス感染への抵抗性を与える更に別の組成物が要求される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、単離されたポリヌクレオチド分子であって、

(a) L. イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列； 10

(b) そのL. イントラセルラリスHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の実質的な部分であるヌクレオチド配列；および

(c) (a) または (b) のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む上記単離されたポリヌクレオチド分子に関する。

【0009】

もう一つの態様において、本発明は、これらポリヌクレオチド分子を含む組換え体ベクターに関し、その組換え体ベクターの発現が、上記のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質またはポリペプチドに融合した担体または融合パートナーを含む融合タンパク質を生じるような担体または融合パートナーをコードしているものが含まれる。本発明は、これら組換え体ベクターを含む形質転換された宿主細胞およびこのような形質転換された宿主細胞によって生産されるポリペプチドも包含する。 20

【0010】

もう一つの態様において、本発明は、単離されたポリペプチドであって、

(a) L. イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質；

(b) そのL. イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチド； 30

(c) そのL. イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質の実質的な部分、またはそのL. イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチドの実質的な部分から成るポリペプチド；

(d) 別のタンパク質またはポリペプチドに融合した(a)、(b) または (c) のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質；および

(e) (a)、(b)、(c) または (d) のタンパク質またはポリペプチドの類似体または誘導体 40
から成る群より選択される上記単離されたポリペプチドに関する。

【0011】

本発明は、更に、プロモーター活性を有する且つ約nt2691～約nt2890の配列番号：2内で見出される20ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0012】

本発明は、更に、これらポリペプチドのいずれかを製造する方法であって、組換え体発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞を培養し、その細胞培養から発現されたポリペプチドを回収することを含む上記方法に関する。そのベクターは、ポリペプチドのいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み、そのヌクレ 50

オチド配列は、一つまたはそれ以上の調節因子と機能的に結合している。培養は、ポリペプチドの発現を導きうる条件下で行われる。

【0013】

なおもう一つの態様において、本発明は、上記の L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質またはポリペプチドのいずれかと特異的に反応する単離された抗体に関する。

【0014】

本発明はまた、本発明のタンパク質、ポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチドの免疫学的有効量を薬学的に許容しうる担体との組合せで含む免疫感作用組成物に関する。本発明は、L. イントラセルラリス感染に対して P P E 感受性動物を免疫感作する方法であって、その動物に免疫感作用組成物を投与することを含む上記方法を包含する。 10

【0015】

本発明はまた、L. イントラセルラリスによって引き起こされるまたは悪化する疾患状態に対して P P E 感受性動物を免疫感作するためのキットであって、上記のタンパク質、ポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチドの内 1 種類の免疫学的有効量が入っている容器を含む上記キットに関する。本発明はまた、L. イントラセルラリス、L. イントラセルラリス特異的アミノ酸またはヌクレオチド配列、または抗 L. イントラセルラリス抗体の存在を検出するためのキットであって、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体が入っている容器を含む上記キットに関する。

【0016】

20

発明の詳細な記述

本明細書中に引用される特許、特許出願および公報は全て、本明細書中にそのまま援用される。

【0017】

ポリヌクレオチド分子

本発明の単離されたポリヌクレオチド分子は、ローソニアのいずれの種または菌株にも由来するヌクレオチド配列を有することができるが、好ましくは、イントラセルラリス種に由来する。本発明を実施するのに用いるための病原性ローソニア菌株または種は、下記の単離技術を用いて、感染した動物の器官、組織または体液から単離することができる。

【0018】

30

本明細書中で用いられるように、“ポリヌクレオチド分子”、“ポリヌクレオチド配列”、“コーディング配列”、“読み取り枠 (O R F)”等の用語は、D N A および R N A 分子双方を示すためのものであり、それは一本鎖かまたは二本鎖でありうるし、しかも、1 種類またはそれ以上の原核性配列、c D N A 配列、エクソンおよびイントロンを含めたゲノム D N A 配列、および化学合成された D N A および R N A 配列、並びにセンス鎖および対応するアンチセンス鎖双方を含むことがありうる。本明細書中で用いられるように、“O R F”という用語は、終止コドンを含み、ローソニア H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質をコードするのに必要な最小限のヌクレオチド配列を意味する。

【0019】

40

本明細書中に開示されるポリヌクレオチド分子およびオリゴヌクレオチド分子の製造および操作は、当該技術の範囲内であり、特に、Maniatis ら, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールド・スプリング・ハーバー, N Y ; Ausubel ら, 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N Y ; Sambrook ら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールド・スプリング・ハーバー, N Y ; Innis ら (監修), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., サン・ディエゴ; および Erlich (監修), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, ニューヨーク並びにこれら文献の全改訂版に記載の組換え技術によって行うことができる。

50

【0020】

配列番号：1および2に示されるヌクレオチド配列並びにそれらの実施的な部分の本明細書中での意味は、Central Research, イースタン・ポイント・ロード, グロートン, CTのPfizer Inc. によって、American Type Culture Collection, 12301 パークローン・ドライブ, ロックビル, MD, 20852に寄託された大腸菌 (E.coli) Top 10細胞中に含有される次のプラスミド中に存在するような該当するヌクレオチド配列およびそれらの実質的な部分をそれぞれ示すためのものでもある。

【0021】

p o n A遺伝子を含む、ATCC受託番号PTA-635として1999年9月9日に寄託されたpER432；

h t r A遺伝子を含む、ATCC受託番号PTA-636として1999年9月9日に寄託されたpER434；

h y p C遺伝子を含む、ATCC受託番号PTA-637として1999年9月9日に寄託されたpER436；

y c f Wおよびa b c 1遺伝子を含む、ATCC受託番号PTA-638として1999年9月9日に寄託されたpER438；

O m p 1 0 0遺伝子を含む、ATCC受託番号PTA-639として1999年9月9日に寄託されたpER440；および

l y s Sおよびy c f W遺伝子を含む、ATCC受託番号PTA-2232として2000年7月14日に寄託されたpT068。

【0022】

更に、配列番号：3～9および配列番号：102に示されるアミノ酸配列並びにそれらの実施的な部分およびペプチドフラグメントの本明細書中での意味は、特に断らない限り、上に挙げたプラスミド中に存在するヌクレオチド配列をコードしている該当するタンパク質によってコードされている該当するアミノ酸配列並びにそれらの実施的な部分およびペプチドフラグメントをそれぞれ示すためのものでもある。

【0023】

H t r A 関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L. イントラセルラリス由来のH t r Aタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのH t r Aタンパク質は、配列番号：7のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のH t r Aをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、h t r A遺伝子の読み取り枠 (ORF) のヌクレオチド配列である約n t 2891～約n t 4315の配列番号：2のヌクレオチド配列、およびプラスミドpER434 (ATCC受託番号PTA-636) のH t r AをコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0024】

本発明は、更に、本発明のH t r Aをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。H t r A 関連ポリヌクレオチド分子を論及するのに用いられる場合の“相同”という用語は、(a) 本発明の前述のH t r Aをコードしているポリヌクレオチド分子の一つと同様のタンパク質をコードしている；または (b) L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、少なくとも中程度のストリンジェントな条件下において、すなわち、0.5 M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1 mM EDTA中において65℃でフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーションおよび0.2 x SSC / 0.1% SDS中において42℃で洗浄すること (Ausubel ら (監修), 1989, Current Protocols In Molecular Biology, 1巻, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. ニューヨーク, 2.10.3頁を参照されたい) においてハイブリッド形成する、しかも本発明の実施において有用であるヌクレオチド配列を有するポリヌク

10

20

30

40

50

レオチド分子を意味する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下において、すなわち、0.5M NaHPO₄、7% SDS、1mM EDTA中において65℃でフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーションおよび0.1xSSC/0.1% SDS中において68℃で洗浄すること（Ausubel ら，1989，上記）においてハイブリッド形成し、しかも本発明の実施において有用である。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約nt 2891～約nt 4315である配列番号：2のH t r AをコードしているORFから成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。上記のように、本明細書中の相同ポリヌクレオチド分子の意味は、このような分子の補体を示すためのものでもある。

【0025】

本明細書中で用いられるように、ポリヌクレオチド分子は、そのポリヌクレオチド分子を、ポリメラーゼ連鎖反応のような標準的な増幅技術を用いてローソニア特異的ポリヌクレオチド分子を増幅させるのに用いることができる、またはローソニアに感染した動物由来の体液若しくは組織試料中のローソニア特異的ポリヌクレオチドの存在を検出する診断薬として用いることができる場合、またはそのポリヌクレオチド分子が、下記のように本発明の実施において有用であるポリペプチドをコードしている場合、“本発明の実施において有用”である。

【0026】

本発明のH t r Aをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、大腸菌、ネズミチフス菌（*S.typhimurium*）、C. ジジユニ（*jejuni*）、インフルエンザ菌（*H.influenzae*）、マルタ熱菌（*B.melitensis*）、ウシ流産菌（*B.abortus*）、トラコーマクラミジア（*C.t r achomatis*）、エルジニア・エンテロコリチカ（*Y.enterocolitia*）、リケッチア属（*R ickettsia*）、B. ブルグドルフェリ（*burgdorferi*）および枯草菌（*B.subtilis*）などの細菌から記載されてきたポリヌクレオチド分子が含まれない。配列番号：2によってコードされるL. イントラセルラリスH t r Aタンパク質は、B. アボルタスH t r Aタンパク質と39.6%のアミノ酸配列同一性を有する。そのL. イントラセルラリスタンパク質は474残基長さであるが、B. アボルタスタンパク質は513残基長さである。L. イントラセルラリスタンパク質は、インフルエンザ菌のそれと35.4%一致する。

【0027】

本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt 2891～約nt 4315である配列番号：2の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより好ましくは、約95%を越える、そして最も好ましくは、約99%を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLASTNアルゴリズム（GenBank, National Center for Biotechnology Information）の使用によって決定される。

【0028】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L. イントラセルラリスタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの70%を越え、もう一つの実施態様において、その配列は90%を越え、そしてもう一つの実施態様においては、約98%を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0029】

なおもう一つの実施態様において、L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、約nt 2891～約nt 4315である配列番号：2の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～50個、よ

り好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0030】

本発明は、更に、L．イントラセルラリスH t r Aタンパク質と相同であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。L．イントラセルラリスH t r Aタンパク質と相同であるポリペプチドを論及するのに本明細書中で用いられるように、“相同”という用語は、他の点ではL．イントラセルラリスH t r Aタンパク質のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるが、得られたポリペプチドが本発明の実施において有用である限りにおいて、その1個またはそれ以上のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換されているポリペプチドを意味する。保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において周知である。このような置換を行う規則には、特に、Dayhoff, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., ワシントン, D. C., 5巻, 補遺3によって記載されたものが含まれる。より具体的には、保存的アミノ酸置換は、側鎖の酸性度、極性または嵩高性に関するアミノ酸ファミリー内で一般的に起こるものである。遺伝子にコードされるアミノ酸は、概して、(1) 酸性＝アスパラギン酸、グルタミン酸；(2) 塩基性＝リシン、アルギニン、ヒスチジン；(3) 非極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および(4) 非荷電極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニンおよびチロシンの4群に分けられる。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは一緒に、芳香族アミノ酸としても分類される。いずれか特定の基内の1個またはそれ以上の置換、例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンで、またはアスパラギン酸をグルタミン酸で、またはトレオニンをセリンで、または任意の他のアミノ酸残基を構造的に関連したアミノ酸残基、例えば、側鎖の同様の酸性度、極性、嵩高性またはそれらのいくつかの組合せの類似性を有するアミノ酸残基での置換は、概して、そのポリペプチドの機能または免疫原性に有意の作用を有するであろう。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：7と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0031】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL．イントラセルラリスH t r Aタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：7のH t r A配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0032】

本明細書中で用いられるように、ポリペプチドは、ローソニアに免疫応答を示した動物からの血液、血清または他の体液試料中のローソニア特異的抗体の存在を検出する診断試薬としてそのポリペプチドを用いることができる場合、“本発明の実施において有用”である。そのポリペプチドはまた、それを用いてローソニアに対する動物の免疫応答を引き起こすことができるならば有用である。

【0033】

本発明は、更に、本発明の前述のローソニアH t r A関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的な部分から成るポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書中で用いられるように、H t r A関連ポリヌクレオチド分子の“実質的な部分”とは、H t r A関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列より少ないものから成るが、H t r A関連ポリヌクレオチド分子の少なくとも5%、より好ましくは、少なくとも約10%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約20%、そして最も好ましくは、少なくとも約50%のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を意味し、それは本発明の実施において有用である。このようなポリヌクレオチド分子には、例えば、H t r Aタンパクのペプチドフラグメントをコードしているポリヌクレオチド分子が含まれる。

【0034】

前述のH t r A関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にH t r A O R Fに隣接するものまたはL. イントラセルラリスのその場 (i n s i t u) の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、約n t 2 6 9 1～約n t 2 8 9 0および約n t 4 3 1 6～約n t 4 5 8 0の配列番号：2に示されるヌクレオチド配列またはそれらの実質的な部分を含む。

【0035】

P o n A関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L. イントラセルラリス由来のP o n Aタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのP o n Aタンパク質は、配列番号：6のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のP o n Aをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約n t 2 5 2～約n t 2 6 9 0の配列番号：2のヌクレオチド配列（P o n A遺伝子の読み取り枠（O R F）のヌクレオチド配列）、およびプラスミドp E R 4 3 2（A T C C受託番号P T A－6 3 5）のP o n AをコードしているO R Fのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0036】

本発明は、相同という用語がH t r A関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のP o n Aをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L. イントラセルラリスP o n Aタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約n t 2 5 2～約n t 2 6 9 0の配列番号：2のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0037】

本発明のP o n Aをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、ナイセリア・フラベセンス（*Neisseria flavescens*）、淋菌（*N.gonorrhoeae*）および髄膜炎菌（*N.meningitidis*）のP o n Aタンパク質をコードしている既知のポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0038】

本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約n t 2 5 2～約n t 2 6 9 0である配列番号：2の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより好ましくは、約95%を越える、そして最も好ましくは、約99%を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、B L A S T Nアルゴリズム（GenBank, National Center for Biotechnology Information）の使用によって決定される。

【0039】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリスP o n Aタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L. イントラセルラリスタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を越え、もう一つの実施態様においては約98%を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリスP o n Aタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0040】

なおもう一つの実施態様において、L. イントラセルラリスP o n Aタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：2の配列に関して、挿入さ

れた、欠失したまたは置換された1～50個、より好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0041】

本発明は、更に、相同という用語がH t r Aタンパクに関して上に相応して記載されているように、L．イントラセルラリスP o n Aタンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：6と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0042】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL．イントラセルラリスP o n Aタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：6のP o n A配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0043】

本発明は、更に、実質的な部分という用語がH t r Aタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアP o n A関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0044】

前述のP o n A関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にp o n A O R Fに隣接するものまたはL．イントラセルラリスのその場（i n s i t u）の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、約n t 1 2 6～約n t 2 5 1および約n t 2 6 9 1～約n t 2 8 9 0の配列番号：2に示されるヌクレオチド配列またはそれらの実質的な部分を含む。

【0045】

H y p C関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L．イントラセルラリス由来のH y p Cタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのH y p Cタンパク質は、配列番号：8のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のH y p Cをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約n t 4 5 8 1～約n t 4 8 2 9の配列番号：2のヌクレオチド配列、およびプラスミドp E R 4 3 6（A T C C受託番号P T A－6 3 7）のH y p CをコードしているO R Fのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0046】

本発明は、相同という用語がH t r A関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のH y p Cをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L．イントラセルラリスH y p Cタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約n t 4 5 8 1～約n t 4 8 2 9の配列番号：2のO R Fから成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0047】

本発明のH y p Cをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、デスルフォビブリオ

10

20

30

40

50

・ギガス (*Desulfovibrio gigas*) およびリゾビウム・レグミノサルム (*Rizobium leguminosarum*) の H y p C または H y p D タンパク質をコードしているポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0048】

本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約 n t 4 5 8 1 ～ 約 n t 4 8 2 9 である配列番号：2 の分子との 5 0 % を越える、より好ましくは、約 9 0 % を越える、なおより好ましくは、約 9 5 % を越える、そして最も好ましくは、約 9 9 % を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、B L A S T N アルゴリズム (GenBank, National Center for Biotechnology Information) の使用によって決定される。

【0049】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリス H y p C タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約 5 0 % を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L. イントラセルラリス H y p C タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの 9 0 % を越え、もう一つの実施態様においては約 9 8 % を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリス H y p C タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0050】

なおもう一つの実施態様において、L. イントラセルラリス H y p C タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：2 の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された 1 ～ 5 0 個、より好ましくは、1 ～ 2 5 個、そして最も好ましくは、1 ～ 5 個のヌクレオチドを有する。

【0051】

本発明は、更に、相同という用語が H t r A タンパクに関して上に相応して記載されているように、L. イントラセルラリス H y p C タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：8 と少なくとも約 5 0 %、より好ましくは、少なくとも約 7 0 %、そしてなおより好ましくは、少なくとも約 9 0 % の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。

【0052】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた 1 ～ 1 0 個、より好ましくは、1 ～ 5 個のアミノ酸を有する L. イントラセルラリス H y p C タンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：8 の H y p C 配列の代わりに保存的に置換された 1 ～ 5 個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0053】

本発明は、更に、実質的な部分という用語が H t r A タンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニア H y p C 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0054】

前述の H y p C 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然に h y p C O R F に隣接するものまたは L. イントラセルラリスのその場 (i n s i t u) の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、約 n t 4 3 1 6 ～ 約 n t 4 5 8 0 および約 n t 4 3 8 0 ～ 約 n t 4 9 1 1 の配列番号：2 に示されるヌクレオチド配列またはそれらの実質的な部分を含む。

【0055】

L y s S 関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L. イントラセルラリス由来の L y s S タンパク質をコードしているヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、その L y s S タンパク質は、配列番号：102のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明の L y s S をコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、l y s S 遺伝子のヌクレオチド配列の約 n t 165～約 n t 1745の配列番号：1のヌクレオチド配列、およびプラスミド p T 068（A T C C 受託番号 P T A - 2232）の L y s S をコードしている O R F のヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0056】

本発明は、相同という用語が H t r A 関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明の L y s S をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L．イントラセルラリス L y s S タンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約 n t 165～約 n t 1745の配列番号：1のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

10

【0057】

本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約 n t 165～約 n t 1745の配列番号：1の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより好ましくは、約95%を越える、そして最も好ましくは、約99%を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、B L A S T N アルゴリズム（GenBank, National Center for Biotechnology Information）の使用によって決定される。

20

【0058】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L．イントラセルラリス L y s S タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L．イントラセルラリス L y s S タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を越え、もう一つの実施態様においては約98%を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L．イントラセルラリス L y s S タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

30

【0059】

なおもう一つの実施態様において、L．イントラセルラリス L y s S タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：1の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～50個、より好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0060】

本発明は、更に、相同という用語が H t r A タンパクに関して上に相応して記載されているように、L．イントラセルラリス L y s S タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：102と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

40

【0061】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL．イントラセルラリス L y s S タンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：102の L y s S 配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

50

【0062】

本発明は、更に、実質的な部分という用語がH t r Aタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニア l y s S 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0063】

前述の l y s S 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然に l y s S O R F に隣接するものまたは L . イントラセルラリスの現場の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができる。

【0064】

Y c f W 関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L . イントラセルラリス由来の Y c f W タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、その Y c f W タンパク質は、配列番号：3 のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明の Y c f W をコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、Y c f W 遺伝子のヌクレオチド配列の約 n t 1 7 4 5 ～約 n t 3 0 2 8 の配列番号：1 のヌクレオチド配列、およびプラスミド p E R 4 3 8 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 8) と p T 0 6 8 (A T C C 受託番号 P T A - 2 2 3 2) の Y c f W をコードしている O R F のヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0065】

本発明は、相同という用語がH t r A 関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明の Y c f W をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L . イントラセルラリス Y c f W タンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約 n t 1 7 4 5 ～約 n t 3 0 2 8 の配列番号：1 のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0066】

本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約 n t 1 7 4 5 ～約 n t 3 0 2 8 の配列番号：1 の分子との 5 0 % を越える、より好ましくは、約 9 0 % を越える、なおより好ましくは、約 9 5 % を越える、そして最も好ましくは、約 9 9 % を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、B L A S T N アルゴリズム (GenBank, National Center for Biotechnology Information) の使用によって決定される。

【0067】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L . イントラセルラリス Y c f W タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約 5 0 % を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L . イントラセルラリス Y c f W タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの 9 0 % を越え、もう一つの実施態様においては約 9 8 % を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L . イントラセルラリス Y c f W タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0068】

なおもう一つの実施態様において、L . イントラセルラリス Y c f W タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：1 の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された 1 ～ 5 0 個、より好ましくは、1 ～ 2 5 個、そして最も好ましくは、1 ～ 5 個のヌクレオチドを有する。

【0069】

本発明は、更に、相同という用語がH t r A タンパクに関して上に相応して記載されて

10

20

30

40

50

いるように、L．イントラセルラリス Y c f W タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：3と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0070】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL．イントラセルラリス Y c f W タンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：3の Y c f W 配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。 10

【0071】

本発明は、更に、実質的な部分という用語が H t r A タンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニア Y c f W 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0072】

前述の Y c f W 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然に y c f W O R F に隣接するものまたは L．イントラセルラリスのその場 (i n s i t u) の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができる。 20

【0073】

A B C 1 関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L．イントラセルラリス由来の A B C 1 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、その A B C 1 タンパク質は、配列番号：4のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明の A B C 1 をコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約 n t 3 0 3 1 ～約 n t 3 7 3 8 の配列番号：1のヌクレオチド配列 (A B C 1 遺伝子の読み取り枠 (O R F) のヌクレオチド配列)、およびプラスミド p E R 4 3 8 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 8) の A B C 1 をコードしている O R F のヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。 30

【0074】

本発明は、相同という用語が H t r A 関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明の A B C 1 をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L．イントラセルラリス A B C 1 タンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約 n t 3 0 3 1 ～約 n t 3 7 3 8 である配列番号：1の O R F から成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。 40

【0075】

本発明の A B C 1 をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、ナイセリア・フラベセンス、淋菌および髄膜炎菌の A B C 1 タンパク質をコードしているポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0076】

本発明の分子のヌクレオチド配列は、好ましくは、約 n t 3 0 3 1 ～約 n t 3 7 3 8 の配列番号：1の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより 50

好ましくは、約 95 % を越える、そして最も好ましくは、約 99 % を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、B L A S T N アルゴリズム (GenBank, National Center for Biotechnology Information) の使用によって決定される。

【0077】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリス A B C 1 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約 50 % を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L. イントラセルラリス A B C 1 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの 90 % を越え、もう一つの実施態様においては約 98 % を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリス A B C 1 タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。 10

【0078】

なおもう一つの実施態様において、L. イントラセルラリス A B C 1 タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：1 の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された 1 ~ 50 個、より好ましくは、1 ~ 25 個、そして最も好ましくは、1 ~ 5 個のヌクレオチドを有する。

【0079】

本発明は、更に、相同という用語が H t r A タンパクに関して上に相応して記載されているように、L. イントラセルラリス A B C 1 タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。 20
好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：1 と少なくとも約 50 %、より好ましくは、少なくとも約 70 %、そしてなおより好ましくは、少なくとも約 90 % の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも 95 % の配列同一性を有する。

【0080】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた 1 ~ 10 個、より好ましくは、1 ~ 5 個のアミノ酸を有する L. イントラセルラリス A B C 1 タンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：4 の A B C 1 配列の代わりに保存的に置換された 1 ~ 5 個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。 30

【0081】

本発明は、更に、実質的な部分という用語が H t r A タンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニア A B C 1 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0082】

前述の A B C 1 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然に a b c 1 O R F に隣接するものまたは L. イントラセルラリスのその場 (i n s i t u) の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、配列番号：1 に示される隣接するヌクレオチド配列を含む。 40

【0083】

O m p 1 0 0 関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L. イントラセルラリス由来の O m p 1 0 0 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、その O m p 1 0 0 タンパク質は、配列番号：5 のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明の O m p 1 0 0 をコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約 n t 3 6 9 5 ~ 約 n t 6 3 8 5 の配列番号：1 のヌクレオチド配列 (O m p 1 0 0 遺伝子の読み取り枠 (O R F) のヌクレオチド配列)、およびプラスミド p E R 4 4 0 (A T C C 受託番号 P T A - 6 3 9) の O m p 1 0 0 をコードしている O R F のヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。 50

【0084】

本発明は、相同という用語がH t r A関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のO m p 1 0 0をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約n t 3 6 9 5～約n t 6 3 8 5である配列番号：1のO R Fから成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0085】

本発明のO m p 1 0 0をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、GenBank データベースに挙げられる次のタンパク質、大腸菌のY a e T (A c c n. U 7 0 2 1 4またはA E 0 0 0 1 2 7) ; フレクスナー赤痢菌 (Shigella flexneri) のO m a 9 0 (A c c n. A F 1 2 0 9 2 7) ; 髄膜炎菌のO m p 8 5 (A c c n. A F 0 2 1 2 4 5) ; インフルエンザ菌 (D 1 5) のD 1 5 (A c c n. U 6 0 8 3 4) ; パスツレラ・マルトシダ (Pasteurella multocida) のO m a 8 7 (A c c n. U 6 0 4 3 9) のいずれかをコードしているポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0086】

本発明の分子のヌクレオチド配列は、好ましくは、約n t 3 6 9 5～約n t 6 3 8 5の配列番号：1の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより好ましくは、約95%を越える、そして最も好ましくは、約99%を越える配列同一性を有する相同配列を含み、その配列同一性は、B L A S T Nアルゴリズム (GenBank, National Center for Biotechnology Information) の使用によって決定される。

【0087】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を越え、もう一つの実施態様においては約98%を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0088】

なおもう一つの実施態様において、L. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：5の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～50個、より好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0089】

本発明は、更に、相同という用語がH t r Aタンパクに関して上に相応して記載されているように、L. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：5と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0090】

もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL. イントラセルラリスO m p 1 0 0タンパク質から成る単離されたポリペプチドを

コードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：5のOmp100配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0091】

本発明は、更に、実質的な部分という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアOmp100関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0092】

前述のOmp100関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にomp100 ORFに隣接するものまたはL. イントラセルラリスの現場の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、配列番号：1に示される隣接するヌクレオチド配列を含む。

【0093】

プロモーター配列

本発明は、プロモーター活性を有する且つ約nt2691～約nt2890の配列番号：2内で見出される20ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子またはその補体にも関する。下記の実施例で更に論じられるように、ローソニア配列のこの領域は、htrA遺伝子の温度反応性プロモーターを含有することが確認されている。好ましい実施態様において、そのポリヌクレオチドは、約nt2797～nt2829の配列を含む。

【0094】

本発明は、約nt2691～約nt2890の配列番号：2内で見出される20ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列の補体に、中程度のストリンジェントな条件下および、より好ましくは、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する、プロモーター活性を有するオリゴヌクレオチドにも関する。好ましくは、プロモーター活性を有するそのオリゴヌクレオチドは、中程度のストリンジェントな条件下または高ストリンジェントな条件下において、約nt2797～nt2829の配列を含むポリヌクレオチドの補体にハイブリッド形成する。もう一つの実施態様において、本発明は、約nt2691～約nt2890である配列番号：2の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～25個、最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する、プロモーター活性を有するオリゴヌクレオチドを包含する。

【0095】

本発明のプロモーター活性を有する機能的配列は、L. イントラセルラリスの宿主細胞中若しくは任意の他のローソニア種の宿主細胞中におけるまたは任意の他の適当な宿主細胞中における本発明の遺伝子のいずれかまたは他の遺伝子若しくはコーディング配列の組換え体発現の制御を含めた種々の目的に有用である。このような他の遺伝子またはコーディング配列は、天然でありうるかまたは組換え体宿主細胞に異種でありうる。そのプロモーター配列は、当該技術分野において知られているような標準的な組換え技術を用いて特定の遺伝子またはコーディング配列に融合させることができるので、そのプロモーター配列は、“機能的結合”が下記に定義されているように、それらと機能的に結合している。プロモーターを用いることにより、組換え体発現系は、例えば、ローソニアまたは他の細菌の遺伝子の発現を調節することができる化合物および転写因子についてスクリーニングするように構築し且つ用いることができる。更に、このようなプロモーター構築物は、ローソニア、大腸菌または他の適当な宿主細胞において異種ポリペプチドを発現させるのに用いることができる。

【0096】

オリゴヌクレオチド分子

本発明は、更に、本発明の前述のポリヌクレオチド分子のいずれか一つにハイブリッド形成する、または本発明の前述のポリヌクレオチド分子のいずれか一つの補体であるヌク

レオチド配列を有するポリヌクレオチド分子にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチド分子を提供する。このようなオリゴヌクレオチド分子は、好ましくは、少なくとも約10ヌクレオチド長さ、より好ましくは、約15～約30ヌクレオチド長さであり、そして高ストリンジェントな条件下において、すなわち、6 x S S C / 0.5%ピロリン酸ナトリウム中において、約14塩基オリゴについては約37℃で、約17塩基オリゴについては約48℃で、約20塩基オリゴについては約55℃で、そして約23塩基オリゴについては約60℃で洗浄することにおいて前述のポリヌクレオチド分子の一つまたはそれ以上にハイブリッド形成する。本発明のより長いオリゴヌクレオチド分子のための他のハイブリダイゼーション条件は、標準的な技法を用いて当業者が決定することができる。好ましい実施態様において、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、本発明の前述のポリヌクレオチド分子の少なくとも一つの一部に相補的である。 10

【0097】

本発明のオリゴヌクレオチド分子は、例えば、鑑別疾病診断において用いるためのローソニア特異的ポリヌクレオチド分子の増幅におけるプライマーとして、または遺伝子調節において有用なアンチセンス分子として作用させることを含めた種々の目的に有用である。適当に設計されたプライマーは、脳組織、肺組織、腸組織、胎盤組織、血液、脳脊髄液、糞便、粘液、尿、羊水等を含めた動物の組織または体液の試料中のローソニア特異的ポリヌクレオチド分子の存在を検出するのに用いることもできる。オリゴヌクレオチド分子は、ローソニア微生物と特異的に反応するが、これは、概して、十分な長さの配列を用いることによって達成される。特異的増幅産物の生産は、ローソニア感染の診断を支持するが、増幅産物の欠如は、感染していないことを示すことができる。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような増幅を行う方法は、特に、Innis ら（監修）、1995、上記；および Erlich（監修）、1992、上記に記載されている。当該技術分野において知られている他の増幅技術、例えば、リガーゼ連鎖反応は、代わりに用いることができる。本明細書中に開示されているポリヌクレオチド分子の配列は、ローソニアの他の種若しくは菌株または他の細菌細胞から相同遺伝子を単離する場合に用いるためのプライマーを設計するのに用いることもできる。 20

【0098】

具体的ではあるが、本発明を実施するのに有用なオリゴヌクレオチド分子の非制限実施態様には、配列番号：10～101から成る群より選択されるオリゴヌクレオチド分子およびそれらの補体が含まれる。 30

【0099】

組換え体発現系

クローニングベクターおよび発現ベクター

本発明は、更に、クローニングベクター、発現ベクター、それらベクターのいずれかを含む形質転換された宿主細胞、および新規菌株またはそれらに由来する細胞系を含めた、本発明のポリヌクレオチド分子のいずれかをクローニングするおよび発現させる方法および組成物を包含する。好ましい実施態様において、本発明は、L. イントラセルラリスの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を含む組換え体ベクターを提供する。具体的な実施態様において、本発明は、p o n A 遺伝子を含有するプラスミド p E R 4 3 2（A T C C 受託番号 P T A - 6 3 5）、h t r A 遺伝子を含有するプラスミド p E R 4 3 4（A T C C 受託番号 P T A - 6 3 6）、h y p C 遺伝子を含有するプラスミド p E R 4 3 6（A T C C 受託番号 P T A - 6 3 7）、l y s S および y c f W 遺伝子を含有するプラスミド p T 0 6 8（A T C C 受託番号 P T A - 2 2 3 2）、y c f W および a b c 1 遺伝子を含有するプラスミド p E R 4 3 8（A T C C 受託番号 P T A - 6 3 8）、および O m p 1 0 0 遺伝子を含有するプラスミド p E R 4 4 0（A T C C 受託番号 P T A - 6 3 9）を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドを得るのに用いられる組換え体ベクターおよび形質転換された細胞も包含する。 40

【0100】

本発明の組換え体ベクター、特に、発現ベクターは、好ましくは、本発明のポリヌクレオチド分子のコーディング配列が、ポリペプチドを生産するためのそのコーディング配列の転写および翻訳に必要な一つまたはそれ以上の調節因子と機能的に結合しているように構築される。本明細書中で用いられるように、“調節因子”という用語には、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、およびポリヌクレオチドコーディング配列の発現を誘導するおよび／または調節するのに役立つ当該技術分野において知られている他の因子をコードするヌクレオチド配列が含まれるが、それらに制限されるわけではない。更に、本明細書中で用いられるように、そのコーディング配列は、一つまたはそれ以上の調節因子と“機能的に結合”していて、その場合、それら調節因子は、コーディング配列の転写またはそのmRNAの翻訳を効果的に調節し且つ可能にする。 10

【0101】

適当な調節因子と機能的に結合している特定のコーディング配列を含有する組換え体ベクターを構築する方法は当該技術分野において周知であり、これらを用いて本発明を実施することができる。これら方法には、*in vitro* 組換え技術、合成技術および *in vivo* 遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatis ら、1989、上記；Ausubel ら、1989、上記；Sambrook ら、1989、上記；Innis ら、1995、上記；および Erlich、1992、上記に記載された技術を参照されたい。

【0102】

特定のコーディング配列を含有する組換え体バクテリオファージDNA、プラスミドDNAおよびコスミドDNA発現ベクターを含めた、本発明のHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100コーディング配列を発現するのに用いることができる種々の発現ベクターは、当該技術分野において知られている。本発明のポリヌクレオチド分子を含有するように遺伝子操作することができる典型的な原核性発現ベクタープラスミドには、特に、pUC8、pUC9、pBR322およびpBR329（Biorad Laboratories、リッチモンド、CA）、pPLおよびpKK223（Pharmacia、ピスカタウェイ、NJ）、pQE50（Qiagen、チャツワース、CA）、およびpGEM-T EASY（Promega、マディソン、WI）が含まれる。本発明のポリヌクレオチド分子を含有するように遺伝子操作することができる典型的な真核性発現ベクターには、特に、エクジソン誘導性哺乳動物発現系（Invitrogen、カールズバット、CA）、サイトメガロウイルスプロモーター-エンハンサーに基づく系（Promega、マディソン、WI；Stratagene、ラ・ホヤ、CA；Invitrogen）およびバキュロウイルスに基づく発現系（Promega）が含まれる。 20 30

【0103】

これらおよび他のベクターの調節因子は、強度および特異性が異なることがありうる。用いられる宿主／ベクター系に依存して、多数の適当な転写因子および翻訳因子のいずれかを用いることができる。例えば、哺乳動物細胞系においてクロニングする場合、哺乳動物細胞のゲノムから単離されるプロモーター、例えば、マウスメタロチオネインプロモーター、またはこれら細胞中で成長するウイルスからの、例えば、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターまたはモロニーマウス肉腫ウイルス長末端反復配列を用いることができる。組換えDNA技術または合成技術によって得られるプロモーターは、挿入される配列を転写させるのに用いることもできる。更に、ある種のプロモーターからの発現は、メタロチオネインプロモーターの特定の誘導物質、例えば、亜鉛イオンおよびカドミウムイオンの存在下において増加することがありうる。転写調節領域すなわちプロモーターの非制限例には、特に、細菌については、 β -galプロモーター、T7プロモーター、TACプロモーター、 λ 左右プロモーター、trpおよびlacプロモーター、trp-lac融合プロモーター等；酵母については、ADH-Iおよび-IIプロモーター、GPKプロモーター、PGIプロモーター、TRPプロモーター等のような解糖酵素プロモーター；そして哺乳動物細胞については、SV40初期および後期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーターが含まれる。本発明は、更に、ローソニア、大腸菌または他の適 40 50

当な宿主において本発明のコーディング配列のいずれかを発現させるのに用いることができる、L. イントラセルラリスの h t r A 遺伝子のプロモーターのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0104】

特異的開始シグナルは、挿入されるコーディング配列の十分な翻訳にも必要である。これらシグナルには、典型的に、A T G 開始コドンおよび隣接した配列が含まれる。それ自体の開始コドンおよび隣接した配列を含めた本発明のポリヌクレオチド分子を適当な発現ベクター中に挿入する場合、追加の翻訳調節シグナルは必要でないことがありうる。しかしながら、コーディング配列の一部分だけを挿入する場合、A T G 開始コドンを含めた外因性翻訳調節シグナルを必要とすることがありうる。これら外因性翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、天然および合成両方の様々な源から入手することができる。更に、開始コドンは、インサート全体のインフレーム翻訳を確実にするために、コーディング領域の読み枠と同相でなければならない。

10

【0105】

本発明のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質を発現するであろう発現ベクターも構築することができる。このような融合タンパク質は、例えば、ローソニアタンパク質に対する抗血清を生じさせるために、ローソニアタンパク質の生化学的性状を研究するために、異なった免疫学的または機能的性状を示すローソニアタンパク質を遺伝子操作するために、または組換えによって発現されるローソニアタンパク質の識別若しくは精製を助けるためにまたは安定性を向上させるために用いることができる。可能な融合タンパク質発現ベクターには、β-ガラクトシダーゼおよび t r p E 融合、マルトース結合タンパク質融合 (p M a l 系列; New England Biolabs)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合 (p G E X 系列; Pharmacia)、ポリヒスチジン融合 (p E T 系列; Novagen Inc., マディソン, W I)、およびチオレドキシン融合 (p T r x F u s; Invitrogen, カールズバット, C A) をコードする配列を包含するベクターが含まれるが、それらに制限されるわけではない。これらおよび他の融合タンパク質をコードしている発現ベクターを構築する方法は、当該技術分野において周知である。

20

【0106】

融合タンパク質は、発現されるタンパク質の精製を助けるのに有用でありうる。非制限実施態様において、例えば、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0-マルトース結合融合タンパク質は、アミロース樹脂を用いて精製することができ; H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0-グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質は、グルタチオン-アガロースビーズを用いて精製することができ; そして H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0-ポリヒスチジン融合タンパク質は、二価のニッケル樹脂を用いて精製することができる。或いは、担体タンパク質またはペプチドに対する抗体を、融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製に用いることができる。例えば、単クローン性抗体の標的エピトープをコードするヌクレオチド配列は、発現されるエピトープが本発明のローソニアタンパク質に融合されるように、調節因子と機能的に結合している発現ベクター中に遺伝子操作し且つ配置することができる。非制限実施態様において、親水性マーカーペプチドである F L A G^{T M} エピトープ標識 (International Biotechnologies Inc.) をコードするヌクレオチド配列は、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端に相当する地点の発現ベクター中に、標準的な技法によって挿入することができる。次に、発現される H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質-F L A G^{T M} エピトープ融合産物を、商業的に入手可能な抗 F L A G^{T M} 抗体を用いて検出し且つアフィニティー精製することができる。

30

40

【0107】

発現ベクターは、特異的プロテアーゼ切断部位をコードするポリリンカー配列を含有す

50

るように遺伝子操作することもできるので、発現されるローソニアタンパク質は、特異的プロテアーゼを用いた処理によって担体領域または融合パートナーから解放されうる。例えば、融合タンパク質ベクターは、特に、トロンビンすなわち X a 因子切断部位をコードしているヌクレオチド配列を含むことができる。

【0108】

ローソニアコーディング配列と同じ読み枠から上流のおよび中のシグナル配列は、発現されるタンパク質の輸送および分泌を支配するように、既知の方法によって発現ベクター中に遺伝子操作することができる。シグナル配列の非制限例には、特に、 α 因子、免疫グロブリン、外膜タンパク質、ペニシリナーゼおよび T 細胞受容体からのものが含まれる。

【0109】

本発明の組換え体ベクターを用いて形質転換されるまたはトランスフェクションされる宿主細胞の選択を助けるために、そのベクターは、受容体遺伝子産物または他の選択可能マーカーのコーディング配列を更に含むように遺伝子操作することができる。このようなコーディング配列は、好ましくは、上記のように調節因子と機能的に結合している。本発明を実施する場合に有用である受容体遺伝子は、当該技術分野において周知であり、特に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、グリーン蛍光タンパク質、ホタルルシフェラーゼおよびヒト成長ホルモンをコードしているものを含む。選択可能マーカーをコードしているヌクレオチド配列は、当該技術分野において周知であり、抗生物質または抗代謝産物への耐性を与える遺伝子産物をコードするもの、または栄養要求性を与えるものが含まれる。このような配列の例には、特に、チミジンキナーゼ活性、またはメトトレキセート、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、ゼオシン (zeocin)、ピリメタミン、アミノグリコシドまたはハイグロマイシンへの耐性をコードするものが含まれる。

【0110】

宿主細胞の形質転換

本発明は、更に、本発明のポリヌクレオチド分子または組換え体ベクターを含む形質転換された宿主細胞、およびそれらに由来する細胞株を提供する。本発明の実施において有用な宿主細胞は、真核性細胞または原核性細胞でありうる。このような形質転換された宿主細胞には、特に、組換え体バクテリオファージ DNA、プラスミド DNA またはコスミド DNA ベクターを用いて形質転換された細菌、または組換え体ベクターを用いて形質転換された酵母のような微生物、または組換え体ウイルスベクター、例えば、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞のような動物細胞、または組換え体ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスまたはワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞が含まれるが、それらに制限されるわけではない。例えば、大腸菌の菌株、例えば、ATCC, ロックビル, MD, 米国から (受託番号 31343) または GIBCO BRL, ゲイサーズバーグ, MD から入手可能な DH5 α 菌株などを用いることができる。真核性宿主細胞には、酵母細胞が含まれるが、哺乳動物、例えば、特に、マウス、ハムスター、乳牛、サルまたはヒトの細胞株からの細胞も有効に用いることができる。本発明の組換え体タンパク質を発現させるのに用いることができる真核性宿主細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (例えば、ATCC 受託番号 CCL-61)、NIH スイスマウス胚細胞 NIH/3T3 (例えば、ATCC 受託番号 CRL-1658) および Madin-Darby ウシ腎 (MDBK) 細胞 (ATCC 受託番号 CCL-22) が含まれる。トランスフェクションされた細胞は、染色体組込みによってまたはエピソードによって本発明のポリヌクレオチドを発現することができる。

【0111】

本発明の組換え体ベクターは、好ましくは、細胞の実質的に均一な培養の 1 種類またはそれ以上の宿主細胞中に形質転換されるまたはトランスフェクションされる。そのベクターは、概して、既知の技法によって、例えば、特に、プロトプラスト形質転換、リン酸カルシウム沈降、塩化カルシウム処理、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、組換えられたウイルスとの接触によるトランスフェクション、リポソームに媒介され

10

20

30

40

50

るトランスフェクション、D E A Eーデキストラントランスフェクション、形質導入、接合または微量発射衝撃（microprojectile bombardment）などによって宿主細胞中に導入される。形質転換細胞の選択は、組換え体発現ベクターと結合した選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性を発現する細胞について選択することによるなどの標準法によって行うことができる。

【0112】

発現ベクターが宿主細胞中に導入されたら、宿主細胞ゲノム中かまたはエピソームによる本発明のポリヌクレオチド分子の組込みおよび保持は、標準的な技法によって、例えば、サザンハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、逆転写酵素PCR（rt-PCR）を含めたPCR分析、または予想されるタンパク質産物を検出する免疫学的検定によって確認することができる。本発明のポリヌクレオチド分子を含有するおよび／または発現する宿主細胞は、（i）DNA-DNA、DNA-RNAまたはRNA-アンチセンスRNAハイブリダイゼーション；（ii）“マーカー”遺伝子機能の存在を検出すること；（iii）宿主細胞中の特異的mRNA転写物の発現によって測定される転写レベルを評価すること；または（iv）当該技術分野において知られているように、例えば、免疫検定によって成熟ポリペプチド産物の存在を検出することを含めた当該技術分野において周知である少なくとも四つの一般的なアプローチのいずれかによって識別することができる。

【0113】

組換え体ポリペプチドの発現および精製

本発明のポリヌクレオチド分子が適当な宿主細胞中に安定して導入されたら、その形質転換された宿主細胞をクローン増殖させ、そして得られた細胞を、コードされているポリペプチドの最大生産をもたらす条件下で成長させる。このような条件には、典型的に、形質転換された細胞を高密度まで成長させることが含まれる。発現ベクターが誘導性プロモーターを含む場合、適当な誘導条件、例えば、温度シフト、栄養素の消耗、無償性誘導物質（例えば、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）などの炭水化物の類似体）の添加、過剰の代謝副産物の蓄積等のような条件を必要に応じて用いて発現を誘導する。

【0114】

ポリペプチドが宿主細胞内に保持されている場合、それら細胞を採取し、溶解させ、そしてその産物を、タンパク質分解を最小限にする当該技術分野において知られている抽出条件下において、例えば、4℃でまたはプロテアーゼインヒビターの存在下でまたはその両方などにおいてその溶解物から実質的に精製するまたは単離する。ポリペプチドが宿主細胞から分泌される場合、消耗した栄養培地を簡単に集め、そこからポリペプチドを実質的に精製するまたは単離することができる。

【0115】

ポリペプチドは、細胞溶解物または培地から、必要に応じて次の方法、すなわち、硫酸アンモニウム沈降、サイズ分画、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、密度遠心分離およびアフィニティークロマトグラフィーの一つまたはそれ以上が含まれるがそれらに制限されるわけではない標準法を用いて実質的に精製するまたは単離することができる。そのポリペプチドが生物学的活性を欠いている場合、それは、例えば、サイズ、またはポリペプチド特異的抗体との反応性に基づいて、または融合標識の存在によって検出することができる。本発明の実施において用いるためには、そのポリペプチドは、培養液中に分泌されているようにまたは細胞溶解物中に存在するように未精製の状態でありうるが、好ましくは、そこから実質的に精製されまたは単離される。本明細書中で用いられるように、ポリペプチドは、そのポリペプチドが特定の標品中の少なくとも約20wt%のタンパク質を構成している場合、“実質的に精製”されている。更に、本明細書中で用いられるように、ポリペプチドは、そのポリペプチドが特定の標品中の少なくとも約80wt%のタンパク質を構成している場合、“単離”されている。本発明のもう一つの実施態様において、そのタンパク質は、その天然の対応物がL. イントラセルラリス細胞溶解物の標品中で通常見出されるよりも少なくとも約1000x高い濃度で標品中に存在する。

【0116】

ポリペプチド

したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる実質的に精製されたまたは単離されたポリペプチドを包含する。非制限実施態様において、そのポリペプチドは、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0のL．イントラセルラリスタンパク質である。好ましい実施態様において、L．イントラセルラリスH t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0タンパク質は、配列番号：3～8または配列番号：1 0 2のアミノ酸配列を有する。もう一つの実施態様において、それらポリペプチドは、他のローソニアタンパク質を実質的に含まない。

10

【0117】

本発明は、更に、“相同”という用語がポリペプチドに関して上に定義されているように、前述のL．イントラセルラリスタンパク質のいずれかに相同であるポリペプチドを提供する。本発明のタンパク質に相同である本発明のポリペプチドには、本明細書中に記載の非ローソニアタンパク質のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれない。本発明のポリペプチドは、一つの実施態様において、ローソニアタンパク質との70%を越える、より好ましくは、約90%を越える、そして最も好ましくは、約95%を越えるアミノ酸配列同一性を有し、その配列同一性は、B L A S T Pアルゴリズム（GenBank，N C B I）の使用によって決定される。

【0118】

もう一つの実施態様において、そのポリペプチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL．イントラセルラリスH t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0タンパク質から成る。この実施態様のより具体的な例において、単離されたポリペプチドは、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0タンパク質のアミノ酸配列中に保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する。

20

【0119】

本発明は、更に、本発明の前述のポリペプチドのいずれか一つの実質的な部分から成るポリペプチドを提供する。本明細書中で用いられるように、本発明のポリペプチドの“実質的な部分”または“ペプチドフラグメント”とは、対応する完全長さポリペプチドの完全なアミノ酸配列より少ないアミノ酸配列から成るが、そのアミノ酸配列の少なくとも約5%、より好ましくは、少なくとも約20%、なおより好ましくは、少なくとも約50%、そして最も好ましくは、少なくとも約95%を含むポリペプチドを意味し、それは本発明の実施において有用である。特に好ましいのは、免疫原性である、すなわち、対応する完全長のローソニアポリペプチドに対して特異的に反応する抗体の生産をもたらす免疫応答を引き起こすことができるペプチドフラグメントである。

30

【0120】

もう一つの実施態様において、本発明のポリペプチドは、抗ローソニア抗体と特異的に反応性であるH t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0タンパク質のエピトープを含む。そのエピトープは、好ましくは、そのタンパク配列の8個を越える、より好ましくは、12個を越える、そして最も好ましくは、20個を越えるアミノ酸である。

40

【0121】

本発明は、更に、当該技術分野において知られている担体または融合パートナーに融合した本発明のポリペプチドのいずれかを含む融合タンパク質を提供する。

本発明は、更に、上記のポリペプチドのいずれかを製造する方法であって、組換え体発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞を培養し、その組換え体発現ベクターは、特定のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み、そのポリヌクレオチド分子は、ポリペプチドの発現をもたらす条件下において一つまた

50

はそれ以上の調節因子と機能的に結合していて、そして発現されたポリペプチドを細胞培養物から回収することを含む上記方法を提供する。

【0122】

ポリペプチドの使用

充分な純度の本発明のポリペプチドが得られたら、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸配列分析、免疫学的活性、生物学的活性等を含めた標準法によってそれを特性決定することができる。そのポリペプチドを、親水性分析（例えば、Hopp および Woods, 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:3824 を参照されたい）または類似のソフトウェアアルゴリズムを用いて更に特性決定して、疎水性および親水性領域を決定することができる。構造分析は、特異的二次構造をとるポリペプチドの領域を決定するように行うことができる。X線結晶学（Engstrom, 1974, Biochem.Exp.Biol. 11:7-13）、計算機モデル化（Fletterick および Zoller（監修）, 1986, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, コールド・スプリング・ハーバー, NY中）および核磁気共鳴（NMR）などの生物物理学的方法は、ポリペプチドと他の推定上の相互作用性タンパク質／受容体／分子との可能な相互作用部位を地図に示し且つ研究するのに用いることができる。これら研究から得られる情報を用いて、欠失突然変異体およびワクチン組成物を設計することができるし、そしてそのポリペプチドの生物学的機能を *in vivo* で特異的に阻止しうる治療的または薬理的化合物を設計するまたは選択することができる。

10

【0123】

本発明のポリペプチドは、PPE感受性動物をPPEから保護するワクチン組成物の成分として；または例えば、ELISA検定などの標準的な技法を用いて、動物からの血液または血清試料中のローソニア特異的抗体についてスクリーニングするための診断用試薬として；または例えば、ウェスタンブロット検定のような標準的な技法を用いて、動物からの細胞、組織または体液試料中のローソニア特異的タンパク質についてスクリーニングするための診断用試薬として有用である多クローン性または単クローン性抗体を下記のように生じさせる抗原としてを含めた種々目的に有用である。

20

【0124】

ポリペプチドの類似体および誘導体

本発明のポリペプチドは、その生物学的または免疫学的特性を向上させるようにまたは他の点では変化させるようにタンパク質レベルで修飾することができる。ポリペプチドの一つまたはそれ以上の化学修飾は、次のいずれか、すなわち、ポリペプチドの1個またはそれ以上のアミノ酸を、例えば、カルバゼートまたは第三中心を生じるように、該当するD-アミノ酸、アミノ酸類似体またはアミノ酸模擬体で置換すること；または、例えば、トリプシン、キモトリプシン、パパインまたはV8プロテアーゼを用いたタンパク質分解切断、またはNaBH₄または臭化シアンを用いた処理、またはアセチル化、ホルミル化、酸化または還元等のような特異的化学修飾が含まれるがそれらに制限されるわけではない既知の技法を用いて行って、そこから類似体を製造することができる。或いは、または更に、本発明のポリペプチドは、遺伝子組換え技術によって修飾することができる。

30

【0125】

本発明のポリペプチドは、アセチル基、硫黄橋架け基、グリコシル基、脂質およびリン酸塩が含まれるがそれらに制限されるわけではない1個またはそれ以上の化学基のそれへの結合によって、および／または本発明の別のポリペプチド、または別のタンパク質、例えば、血清アルブミン、スカシガイのヘモシアニンまたは商業的に活性化されたBSAなど、またはポリアミノ酸（例えば、ポリリシン）、または多糖（例えば、セファロース、アガロース、または修飾または非修飾セルロース）への結合によって誘導体化することができる。このような結合は、好ましくは、そのポリペプチドのアミノ酸側鎖および／またはN末端若しくはC末端における共有結合による。このような結合反応を行う方法は、当該タンパク質化学分野において周知である。

40

【0126】

50

請求の範囲に記載の発明を実施する場合に有用な誘導体には、例えば、ポリエチレングリコールのような水溶性ポリマーが本発明のポリペプチドまたはその類似体若しくは誘導体に結合することによって、そのポリペプチドの免疫原性を少なくとも一部分は維持しながら、追加の望ましい性状を与えているものも含まれる。これら追加の望ましい性状には、例えば、水溶液中での増加した溶解性、増加した貯蔵安定性、タンパク質分解脱水への増加した耐性および増加した *in vivo* 半減期が含まれる。本発明のポリペプチドへの結合に適した水溶性ポリマーには、ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマーが含まれるがそれらに制限されるわけではなく、ここにおいて、それらホモポリマーおよびコポリマーは、非置換であるかまたは、アルキル基、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖、ポリビニルエチルエーテルおよび α , β -ポリ[2-ヒドロキシエチル]-DL-アスパルトアミドで一方の末端に置換されている。ポリエチレングリコールが特に好ましい。ポリペプチドの水溶性ポリマー結合体を製造する方法は、当該技術分野において周知であり、特に、米国特許第3,788,948号；米国特許第3,960,830号；米国特許第4,002,531号；米国特許第4,055,635号；米国特許第4,179,337号；米国特許第4,261,973号；米国特許第4,412,989号；米国特許第4,414,147号；米国特許第4,415,665号；米国特許第4,609,546号；米国特許第4,732,863号；米国特許第4,745,180号；欧州特許(E P)第152,847号；E P 98,110号；および日本国特許第5,792,435号に記載されており、それら特許は本明細書中に援用される。

10

20

【0127】

抗体

本発明は、更に、本発明のポリペプチドに対して向けられる単離された抗体を提供する。好ましい実施態様において、抗体は、既知の方法を用いて、L. イントラセルラリスからのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質に対して生じさせることができる。ブタ、乳牛、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジまたはマウスより選択される種々の宿主動物は、部分的に若しくは実質的に精製されたまたは単離されたL. イントラセルラリスタンパク質を用いて、または上に記載されているようなその同族体、融合タンパク質、実質的な部分、類似体または誘導体を用いて免疫感作することができる。下記のようなアジュバントは、抗体産生を促進するのに用いることができる。

30

【0128】

多クローン性抗体は、免疫感作された動物の血清から得られ且つ単離され、抗原に対する特異性について標準的な技法を用いて調べることができる。或いは、単クローン性抗体は、培養中の連続的継代細胞系によって抗体分子を産生させる任意の技法を用いて製造し且つ単離することができる。これらには、Kohler および Milstein (Nature, 1975,256:495-497) によって最初に記載されたハイブリドーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor ら, 1983, Immunology Today 4:72; Cote ら, 1983, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:2026-2030) ；およびEBV-ハイブリドーマ技術 (Cole ら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R.Liss, Inc., 77-96頁) が含まれるがそれらに制限されるわけではない。或いは、単鎖抗体の産生について記載された技法 (例えば、米国特許第4,946,778号を参照されたい) を、L. イントラセルラリス抗原特異的単鎖抗体を生じるように適応することができる。これら公報は、本明細書中に援用される。

40

【0129】

本発明のポリペプチドに特異的な結合部位を含有する抗体フラグメントは、本発明の範囲内にも包含され、既知の技法によって生じさせることができる。このようなフラグメントには、自然のままの抗体分子のペプシン消化によって生じることができるF(ab')₂ フラグメント、およびそのF(ab')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生じることができるFabフラグメントが含まれるがそれらに制限されるわ

50

けではない。或いは、F a b 発現ライブラリーを構築して (Huse ら, 1989, Science 246 :1275-1281)、L. イントラセルラリスタンパク質への所望の特異性を有する F a b フラグメントの迅速な識別を可能にすることができる。

【0130】

単クローン性抗体および抗体フラグメントの産生および単離の技術は、当該技術分野において周知であり、特に、Harlow および Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory に、および J.W.Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, ロンドンに更に記載されており、それらは本明細書中に援用される。

【0131】

ローソニア遺伝子の標的突然変異

本発明のポリヌクレオチド分子の開示に基づいて、ローソニア h t r A、p o n A、l y s S、y c f W、h y p C、a b c l または o m p l 0 0 遺伝子 (その遺伝子を、以下、“ローソニア遺伝子”と称する) を無能力にするまたはそれ以外の場合は突然変異させる場合に用いるための遺伝子構築物を製造することができる。そのローソニア遺伝子は、適当に設計される遺伝子構築物を用いて突然変異させることができる。例えば、ローソニア遺伝子は、(a) ローソニア遺伝子のコーディング配列または調節配列の全部または一部分を欠失する；または (b) ローソニア遺伝子のコーディング配列または調節配列の全部または一部分を別のヌクレオチド配列で置き換える；または (c) ローソニア遺伝子のコーディング配列または調節配列中に、ローソニアからのまたは異種源からのヌクレオチド配列を含むことができる 1 個またはそれ以上のヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド分子、またはポリヌクレオチド分子を挿入する；または (d) (a)、(b) および (c) のいくつかの組合せを行うように機能する本発明の遺伝子構築物を用いて突然変異させることができる。或いは、構築物を用いて、ローソニア遺伝子の発現またはそのコードされているタンパク質の安定性を変化させることができる。

【0132】

ローソニア遺伝子が突然変異しているローソニア細胞は、例えば、その遺伝子の突然変異が、突然変異した遺伝子を有するローソニア細胞の病原性を、そのように遺伝子が突然変異していない同じローソニア菌株の細胞と比較して減少させる場合、および無能力にされた遺伝子を有するこのようなローソニア細胞をワクチン組成物中で、特に、修飾生ワクチン中で用いて、P P E に対する動物の防御応答を誘導するまたはその誘導に寄与することができる場合、本発明の実施において有用である。好ましい実施態様において、その突然変異は、ローソニア遺伝子を部分的にまたは完全に無能力にする、またはローソニア遺伝子によってコードされるタンパク質を部分的にまたは完全に無能力にするのに役立つ。この場合、ローソニア遺伝子またはタンパク質は、タンパク質産物が生産されていない (例えば、遺伝子が欠失している) かまたは、その通常の生物学的機能をもはや有することができない若しくはその通常の細胞の場所にもはや輸送され得ないタンパク質産物が生産される、またはその通常の生物学的機能は有するが、有意に低下した速度で生産物が生産される場合、部分的にまたは完全に無能力にされていると考えられる。ローソニア遺伝子が突然変異しているローソニア細胞は、その遺伝子の発現またはそのコードされるタンパク質の安定性を増加させるのにも有用である。病原性ローソニア菌株の細胞の病原性を検出可能に減少させる突然変異は、特に有用である。本発明は、本発明のタンパク質およびポリペプチドを発現する細胞が構成的突然変異体である場合、このような細胞も包含する。

【0133】

非制限実施態様において、本発明の遺伝子構築物は、野生型遺伝子のコーディング配列またはそのプロモーター若しくは他の調節領域、またはその一部分を、例えば、突然変異したコーディング配列若しくは突然変異した調節領域またはその一部分のような別のヌクレオチド配列で置き換えることによって、野生型ローソニア遺伝子を突然変異させるのに用いられる。このような遺伝子構築物中で用いるための突然変異したローソニア遺伝子配

10

20

30

40

50

列は、誤りがちの (error-prone) P C R の使用またはカセット突然変異誘発を含めた種々の既知の方法のいずれかによって生じることができる。例えば、オリゴヌクレオチドに支配された突然変異誘発は、野生型ローソニア遺伝子のコーディング配列またはプロモーター配列を一定方法で変化させるのに、例えば、その配列内の特定の地点にフレームシフトまたは終止コドンを導入するのに用いることができる。或いは、または更に、本発明の遺伝子構築物中で用いるための突然変異したヌクレオチド配列は、そのコーディング配列またはプロモーター配列の 1 個またはそれ以上のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子の挿入または欠失によって、またはそのコーディング配列またはプロモーター配列の一部分の、1 個またはそれ以上の別のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子を用いた置換によって製造することができる。このようなオリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子は、任意の天然に存在する源から得ることができるしまたは合成でありうる。挿入されるまたは欠失する配列は、ローソニア遺伝子の読み枠を簡単に破壊するのに役立つし、または選択可能マーカーのような異種遺伝子産物を更にコードすることができる。

10

【0134】

或いは、または更に、ランダム突然変異誘発を用いて、本発明の遺伝子構築物中で用いるための突然変異したローソニア遺伝子配列を生じることができる。ランダム突然変異誘発は、任意の適当な技法によって、例えば、ローソニア遺伝子を有する細胞を紫外線または x 線に、または N-メチル-N'-ニトロソグアニジン、スルホン酸エチルメタン、亜硝酸またはナイトロジェンマスタードのような化学的突然変異誘発物質に暴露した後、特定の遺伝子に突然変異を有する細胞について選択することなどによって行うことができる。突然変異誘発技術の概説については、例えば、Ausubel, 1989, 上記を参照されたい。

20

【0135】

本発明の実施において有用である修飾されたローソニア細胞を生じる突然変異は、O R F 中、プロモーター配列または他の調節領域中、または遺伝子若しくは O R F を天然に含むまたは遺伝子の発現若しくはそのコードされるタンパク質の安定性を変化させる任意の他の配列中を含めたローソニア遺伝子中のどこでも起こりうる。このようなローソニア細胞には、ローソニア遺伝子によって通常コードされるタンパク質の修飾型が生産される、またはローソニア遺伝子によって通常コードされるタンパク質が生産されない突然変異体が含まれ、ヌル (n u l l)、条件的、構成的または漏出性の突然変異体でありうる。

30

【0136】

或いは、本発明の遺伝子構築物は、ローソニア遺伝子または O R F にその場 (i n s i t u) で自然に隣接するヌクレオチド配列を含むことができ、遺伝子それ自体のコーディング領域からのヌクレオチド配列を一部分だけ含むまたは全く含まない。このような遺伝子構築物は、例えば、ローソニア遺伝子全体または O R F を欠失するのに有用であると考えられる。

【0137】

一つの実施態様において、本発明の遺伝子構築物は、ローソニア遺伝子が無能力にするのに用いることができるポリヌクレオチド分子であって、(a) L. イントラセルラリスからの H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列と他の点では同様であるヌクレオチド配列を有するが、そのヌクレオチド配列が、一つまたはそれ以上の無能力にする突然変異を更に含むポリヌクレオチド分子；または (b) ローソニア遺伝子の O R F に現場で自然に隣接するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含むものを含む。ローソニア菌株の細胞中にいったん形質転換されたら、その遺伝子構築物のポリヌクレオチド分子は、相同的組換えによって特定のローソニア遺伝子に特異的に集中し、それによって、その遺伝子若しくはその一部分を置換するかまたはその遺伝子中に挿入される。この組換え現象の結果として、その特定のローソニア菌株にとって他の点では本来のローソニア遺伝子が無能力にされる。

40

【0138】

50

もう一つの実施態様において、遺伝子構築物は、例えば、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0タンパク質を構成的に発現することまたは過発現することによって発現を変化させる突然変異に用いられる。このような突然変異は、例えば、宿主細胞を衰弱させるのに有用でありうる。その構築物は、タンパク質の安定性を増加させる突然変異を用いて、例えば、宿主細胞を弱毒化することもできる。

【0139】

相同的組換えによる標的遺伝子突然変異に関して、その遺伝子構築物は、好ましくは、上記のような突然変異したヌクレオチド配列を含む環状かまたは線状のプラスミドである。非制限実施態様において、突然変異した配列の少なくとも約200ヌクレオチドを用いて、相同的組換えのための特定の標的ローソニア遺伝子に本発明の遺伝子構築物を特異的に向けるが、より短いヌクレオチド長さも有効でありうる。更に、そのプラスミドは、好ましくは、破壊される天然のローソニア遺伝子の調節因子配列と機能的に結合しているローソニアゲノム中に挿入されるように構築される、リポーター遺伝子産物または他の選択可能マーカをコードしている追加のヌクレオチド配列を含む。本発明の実施において用いることができるリポーター遺伝子は、当該技術分野において周知であり、特に、C A T、グリーン蛍光タンパク質およびβ-ガラクトシダーゼをコードしているものが含まれる。選択可能マーカをコードしているヌクレオチド配列も、当該技術分野において周知であり、抗生物質または抗代謝産物への耐性を与える遺伝子産物をコードするもの、または栄養要求性を与えるものが含まれる。このような配列の例には、ピリメタミン耐性、またはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（アミノグリコシドへの耐性を与える）、またはハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（ハイグロマイシンへの耐性を与える）をコードするものが含まれる。

【0140】

本発明の遺伝子構築物を生じるのに用いることができる方法は、当該技術分野において周知であり、特に、Maniatis ら、1989、上記；Ausubel ら、1989、上記；Sambrook ら、1989、上記；Innis ら、1995、上記；および Erlich、1992、上記に記載のような、in vi tro 組換え技術、合成技術および in vivo 遺伝子組換えが含まれる。

【0141】

ローソニア細胞は、既知の技法にしたがって、例えば、エレクトロポレーションなどによって本発明の遺伝子構築物を用いて形質転換することができるしまたはトランスフェクションすることができる。形質転換細胞の選択は、その構築物と結合した選択可能マーカを発現する細胞について選択することなどによる標準的な技法を用いて行うことができる。満足すべき組換え現象が起こっているおよび特定の標的遺伝子に変更されている形質転換細胞の識別は、サザンブロット分析、または特定のタンパク質をコードしているm R N A 転写物が無いことを検出するノーザンブロット分析などによる遺伝分析によって、または例えば、免疫学的分析、減少した病原性のような新規表現型の出現、P C R 検定またはそれらのいくつかの組合せで確認されるような特定のタンパク質を欠いている細胞によって行うことができる。

【0142】

更に別の非制限実施態様において、本発明の遺伝子構築物は、ローソニアからのまたは動物に感染する別の病原体からの別の遺伝子またはコーディング領域を更に含むことができ、その遺伝子またはコーディング領域は、本発明の修飾されたローソニア生細胞を用いたワクチン接種によって動物において別々の且つ異なった防御免疫応答を誘導するまたはその誘導に寄与するのに有用な抗原をコードしている。この追加の遺伝子またはコーディング領域は、修飾されたローソニア生細胞からのコードされる抗原の分泌をもたらし、それによって、ワクチン接種された動物の免疫系に抗原を提示させるシグナル配列を含有するように更に遺伝子操作することができる。

【0143】

本発明は、したがって、h t r A、p o n A、h y p C、l y s S、y c f W、a b c

1 または omp 1 0 0 遺伝子が突然変異している修飾されたローソニア生細胞を提供する。更に、本発明は、修飾されたローソニア生細胞を製造する方法であって、(a) 本発明の遺伝子構築物を用いてローソニア細胞を形質転換し；(b) その遺伝子構築物によって h t r A、p o n A、h y p C、l y s S、y c f W、a b c 1 または omp 1 0 0 遺伝子が突然変異している形質転換された細胞を選択し；そして(c) 工程(b)の細胞の中から、P P E 感受性動物を P P E から防御するワクチン中で用いることができる細胞を選択することを含む上記方法を提供する。本発明は、このような修飾されたローソニア細胞から製造される死滅細胞組成物も包含する。

【0144】

ローソニア細菌の培養

本発明において用いるためのローソニア細菌は、例えば、Joens ら, 1997, Am.J.Vet.Res. 58:1125-1131; Lawson ら, 1993, Journal of Clinical Microbiology 31:1136-1142 ; および McOrist ら, 1995, 上記に記載の方法を用いて、in vitro で培養し且つ維持することができる。

【0145】

抗ローソニアワクチン

本発明は、更に、本発明のタンパク質またはポリペプチドの免疫学的有効量および薬学的に許容しうる担体を含む、P P E に対するワクチンを提供する。好ましい実施態様において、そのワクチンは、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 の L-イントラセルラリスタンパク質を含む。

【0146】

本発明は、更に、本発明の1種類またはそれ以上のポリヌクレオチド分子の免疫学的有効量および薬学的に許容しうる担体を含む、P P E に対するワクチンを提供する。好ましい実施態様において、そのワクチンは、L-イントラセルラリス H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1 または O m p 1 0 0 をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を含む。

【0147】

本発明は、更に、本発明の修飾されたローソニア細菌の免疫学的有効量および薬学的に許容しうる担体を含む、P P E に対するワクチンを提供する。一つの実施態様において、本発明のワクチン中で用いるための修飾されたローソニア細胞は、H t r A⁻、P o n A⁻、H y p C⁻、L y s S⁻、Y c f W⁻、A B C 1⁻ または O m p 1 0 0⁻ 表現型を発現する L-イントラセルラリス生細菌である。或いは、本発明のワクチンは、失活している本発明のこのような修飾されたローソニア細胞のいずれかを含むことができる。修飾されたローソニア細胞の失活は、二元エチレンイミン(B E I) または β-プロピオラク톤またはホルムアルデヒドなどを用いた化学的処理による、凍結融解または熱処理による、または細胞のホモジナイゼーションによる、或いはこれら種類の技法の組合せによることを含めた当該技術分野において知られているいずれの技法を用いても行うことができる。均一化され修飾されたローソニア細胞から製造されるワクチンは、未分画の細胞ホモジネートそのままかまたはその免疫学的に有効な部分画分から成りうる。

【0148】

本明細書中で用いられるように、“免疫学的有効量”という用語は、P P E 感受性動物種のメンバーに投与された場合、1回投与後かまたは多数投与後に、P P E に対する防御応答を誘導することができる抗原、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または修飾された細胞の量を意味する。

【0149】

“防御応答を誘導することができる”という句は、ワクチン接種された動物を P P E から防御するのに役立つ抗体かまたは細胞または両方に媒介される免疫応答を含めたワクチン接種に応答した動物の任意の免疫に基づく応答の誘導または促進を含むように本明細書中において広義に用いられる。本明細書中で用いられる“防御応答”および“防御する”という用語は、P P E の完全な予防またはローソニアによる感染の完全な予防のみなら

10

20

30

40

50

ず、このような病原体による感染度または率の任意の検出可能な減少、または例えば、ワクチン接種された動物において同種のワクチン接種されていない感染動物と比較される、1種類またはそれ以上の組織で形成される病変の形成速度若しくは絶対数または他の動物への伝染の任意の検出可能な減少を含めた、その病原体による感染によって生じる疾患または任意の症状若しくは状態の重症度の任意の検出可能な減少も意味する。

【0150】

更に好ましい実施態様において、本発明のワクチンは、PPE感受性動物をPPEおよび場合により、その動物を苦しめることがありうる1種類またはそれ以上の他の疾患または病理学的状態から防御する組合せワクチンであり、その組合せワクチンは、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または修飾されたローソニア細胞を含む第一成分の免疫学的有効量；その第一成分とは異なり、しかもPPE感受性動物を苦しめることがありうる疾患または病理学的状態に対する防御応答を誘導することができるまたはその誘導に寄与することができる第二成分の免疫学的有効量；および薬学的に許容しうる担体を含む。

10

【0151】

組合せワクチンの第二成分は、当該技術分野において知られているように、PPEまたは適切な種のメンバーを苦しめることがありうる疾患または病理学的状態に対する防御応答を誘導するまたはその誘導に寄与する能力に基づいて選択される。特定の種におけるワクチン組成物中で有用である抗原性成分は、組合せワクチンの第二成分として用いることができる。このような抗原性成分には、レプトスピラ属(*Leptospira*)種、カンピロバクター属(*Campylobacter*)種、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ(*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・スイス(*Streptococcus suis*)、マイコプラズマ属(*Mycoplasma*)種、クレブシエラ属(*Klebsiella*)種、サルモネラ属(*Salmonella*)種、ロタウイルス、コロナウイルス、狂犬病、パスツレラ・ヘモリティカ(*Pasteurella hemolytica*)、パスツレラ・マルトシダ(*Pasteurella multocida*)、クロストリジウム属(*Clostridia*)種、破傷風トキソイド、大腸菌、クリプトスポリジウム属(*Cryptosporidium*)種、アイメリア属(*Eimeria*)種、トリコモナス属(*Trichomonas*)種、セルプリナ(ブラキスピラ)・ヒオディセンテリエ(*Serpulina* (*Brachyspira*) *hyodysenteriae*)、アクチノバチルス・プレウロニューモニエ(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、アクチノバチルス・スイス(*Actinobacillus suis*)、ブタコレラ菌(*Salmonella choleraesuis*)、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、レプトスピラ属(*Leptospira*)種、スタフィロコッカス・ヒイクス(*Staphylococcus hyicus*)、ヘモフィルス・パラスイス(*Haemophilus parasuis*)、気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、ブタの生殖および呼吸症候群ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタ免疫欠損ウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ブタのパルボウイルス、脳心筋炎ウイルス、コロナウイルス、仮性狂犬病ウイルス、シルコウイルスおよび他の真核性寄生生物から成る群より選択される病原体に対する防御を与えるものが含まれるがそれらに制限されるわけではない。

20

30

【0152】

一つの実施態様において、本発明の組合せワクチンは、本発明のタンパク質またはポリペプチドの免疫学的有効量、本発明のポリヌクレオチド分子の免疫学的有効量、および本発明の修飾されたローソニア細胞の免疫学的有効量から成る群より選択される2種類またはそれ以上の成分の組合せを含む。

40

【0153】

本発明のワクチンは、例えば、下記のようなアジュバントまたはサイトカインを含めた1種類またはそれ以上の追加の免疫調節性成分を更に含むことができる。

本発明は、更に、PPEに対するワクチンを製造する方法であって、免疫学的有効量の本発明のL. イントラセルラリスタンパク質またはポリペプチド、またはポリヌクレオチド分子、または修飾されたローソニア細胞を、PPE感受性動物への投与に適した形で薬

50

学的に許容しうる担体と組み合わせることを含む上記方法を提供する。好ましい実施態様において、そのタンパク質は、L. イントラセルラリスのH t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0であり、ポリヌクレオチド分子は、好ましくは、L. イントラセルラリスのH t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含み、そして修飾されたローソニア細胞は、H t r A⁻、P o n A⁻、H y p C⁻、L y s S⁻、Y c f W⁻、A B C 1⁻またはO m p 1 0 0⁻表現型を有する。

【0154】

本発明の修飾されたローソニア生細胞を含むワクチンは、そのローソニア細胞を培地中に遊離した状態かまたは哺乳動物宿主細胞中に残した状態で含有する培養液のアリコートを用いて製造することができるし、P P E感受性動物に直接的にまたは濃縮した形で投与することができる。或いは、修飾されたローソニア生細胞は、当該技術分野において知られているものより選択される且つ選択された投与経路に適当な免疫調節性物質を用いてまたは用いることなく、薬学的に許容しうる担体と組み合わせることができ、好ましくは、そこで、ワクチン組成物中の修飾されたローソニア生細胞の少なくともある程度の生存度が維持される。

10

【0155】

本発明のワクチン組成物は、標準的な緩衝剤、安定化剤、希釈剤、保存剤および／または可溶化剤のような薬学的に許容しうる担体を含むように承認された慣例にしたがって製剤化することができるし、徐放を容易にするように製剤することもできる。希釈剤には、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロール等が含まれる。等張性のための添加剤には、特に、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトールおよびラクトースが含まれる。安定化剤には、特に、アルブミンが含まれる。調整生ワクチンを製剤する場合に特に有用であるものを含めた適当な他のワクチン用ビヒクルおよび添加剤は、知られているしまたは当業者に明らかであろう。例えば、本明細書中に援用される Remington's Pharmaceutical Science, 第18巻, 1990, Mack Publishing を参照されたい。

20

【0156】

本発明のワクチンは、更に、例えば、特にアジュバントまたはサイトカインのような1種類またはそれ以上の追加の免疫調節性成分を含むことができる。本発明のワクチン中で用いることができるアジュバントの非制限例には、R I B I アジュバント系 (Ribi Inc., ハミルトン, M T)、ミョウバン、水酸化アルミニウムゲルのようなミネラルゲル、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、例えば、フロイントの完全および不完全アジュバントなど、Block コポリマー (CytRx, アトランタ, G A)、Q S - 2 1 (Cambridge B iotech Inc., ケンブリッジ, M A)、S A F - M (Chiron, エメリービル, C A)、A M P H I G E N (登録商標) アジュバント、サポニン、Quil Aまたは他のサポニン画分、モノホスホリルリピドA、Avridine リピド-アミンアジュバント、およびコレラ菌 (V i b r i o c h o l e r a) 毒素および大腸菌不安定毒素などのタンパク質アジュバントが含まれる。本発明のワクチン中で有用な水中油エマルジョンの具体的な非制限例には、修飾されたS E A M 6 2およびS E A M 1 / 2 製剤が含まれる。修飾S E A M 6 2は、5 % (v / v) スクアレン (Sigma)、1 % (v / v) S P A N (登録商標) 8 5 デタージェント (I C I Surfactants)、0. 7 % (v / v) T W E E N (登録商標) 8 0 デタージェント (I C I Surfactants)、2. 5 % (v / v) エタノール、2 0 0 μ g / m l Quil A、1 0 0 μ g / m l コレステロールおよび0. 5 % (v / v) レシチンを含む水中油である。修飾S E A M 1 / 2は、5 % (v / v) スクアレン、1 % (v / v) S P A N (登録商標) 8 5 デタージェント、0. 7 % (v / v) T W E E N 8 0 デタージェント、2. 5 % (v / v) エタノール、1 0 0 μ g / m l Quil Aおよび5 0 μ g / m l コレステロールを含む水中油である。ワクチン中に含まれる他の免疫調節性物質には、例えば、1種類またはそれ以上のインターロイキン、インターフェロンまたは他の既知のサイトカインが含まれる。ワクチンが修飾されたローソニア生細胞を含む場合、アジュバントは、

30

40

50

好ましくは、得られたワクチン製剤がその修飾されたローソニア生細胞の生存率を少なくともある程度維持するその能力に基づいて選択される。

【0157】

ワクチン組成物がポリヌクレオチド分子を含む場合、そのポリヌクレオチド分子は、DNAかまたはRNAでありうるが、DNAが好適であり、そして好ましくは、当該技術分野において知られているように、組換え体プラスミドまたはウイルスベクターのような発現ベクター構築物中で、PPEから防御されるPPE感受性動物に投与される。組換え体ウイルスベクターの例には、組換え体アデノウイルスベクターおよび組換え体レトロウイルスベクターが含まれる。ワクチン製剤は、DNAプラスミドに基づくベクターのような非ウイルスDNAベクターも含むことができる。ポリヌクレオチド分子は、脂質と結合して、例えば、リポソームまたはコクレイト (cochleates) のようなDNA-脂質複合体を形成してよい。例えば、国際特許公開WO 93/24640号を参照されたい。

【0158】

DNAワクチン中のワクチン物質として有用な発現ベクターは、好ましくは、当該技術分野において知られているように、例えば、プロモーター配列などの真核性細胞中でのローソニアコーディング配列の発現に必要な一つまたはそれ以上の転写調節因子と機能的に結合している1種類またはそれ以上の抗原性ローソニアタンパク質をコードしているヌクレオチド配列、またはそのようなヌクレオチド配列の実質的な部分を含む。好ましい実施態様において、その調節因子は、例えば、RSVまたはCMVからのウイルスプロモーターのような強力なウイルスプロモーターである。このような発現ベクターには、好ましくは、クローニングのための細菌の複製起点および原核性選択可能マーカー遺伝子、および発現されるmRNAの適切な終結を確実にするポリアデニル化配列も含まれる。発現されるタンパク質の細胞分泌を支配するように、シグナル配列も含まれうる。

【0159】

DNAワクチン中のワクチン物質として有用な発現ベクターの必要条件是、特に、米国特許第5,703,055号、米国特許第5,580,859号、米国特許第5,589,466号、国際特許公開WO 98/35562号、および Ramsay ら, 1997, Immunol. Cell Biol. 75:360-363; Davis, 1997, Cur.Opinion Biotech. 8:635-640; Maniackan ら, 1997, Critical Rev.Immunol. 17:139-154; Robinson, 1997, Vaccine 15(8):785-787; Lai および Bennett, 1998, Critical Rev.Immunol. 18:449-484; および Vogel および Sarver, 1995, Clin.Microbiol.Rev. 8(3):406-410 を含めた種々の科学公報に更に記載されている。

【0160】

ワクチン組成物が修飾されたローソニア生細胞を含む場合、そのワクチンは、冷却して、凍結させてまたは凍結乾燥させて貯蔵することができる。ワクチン組成物が、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または失活した修飾されたローソニア細胞を代わりに含む場合、そのワクチンは、適当な希釈剤を用いて投与前に再水和される冷却した、凍結したまたは凍結乾燥した状態で貯蔵することができる。

【0161】

本発明のワクチンは、場合により、抗原の徐放のために製剤化することができる。このような徐放性製剤の例には、例えば、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-コグリコール酸)、メチルセルロース、ヒアルロン酸、コラーゲン等のような生体適合性ポリマーの組成物との組合せの抗原が含まれる。薬物デリバリービヒクル中の分解性ポリマーの構造、選択および使用は、本明細書中に援用される A.Domb ら, 1992, Polymers for Advanced Technologies 3:279-292 を含めたいくつかの公報に概説されてきた。医薬製剤中のポリマーを選択し且つ使用する場合の更に別の指針は、本明細書中にも援用される M.Chasin および R.Langer (監修), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", Drugs and the Pharmaceutical Science, 45巻, M.Dekker, NYの本文中で見出されうる。或いは、または更に、その抗原は、投与および効力を改善するようにマイクロカプセルに封入することができる。抗原をマイクロカプセルに封入する方法は、当該技術分野において

周知であり、例えば、いずれも本明細書中に援用される米国特許第3, 137, 631号；米国特許第3, 959, 457号；米国特許第4, 205, 060号；米国特許第4, 606, 940号；米国特許第4, 744, 933号；米国特許第5, 132, 117号；および国際特許公開WO 95/28227号に記載された技法が含まれる。

【0162】

リポソームも、抗原を徐放させるのに用いることができる。リポソーム製剤を製造するおよび使用方法に関する詳細は、特に、いずれも本明細書中に援用される米国特許第4, 016, 100号；米国特許第4, 452, 747号；米国特許第4, 921, 706号；米国特許第4, 927, 637号；米国特許第4, 944, 948号；米国特許第5, 008, 050号；および米国特許第5, 009, 956号で見出されうる。

10

【0163】

本発明は、更に、PPEに対してPPE感受性動物にワクチン接種する方法であって、本発明のワクチンの免疫学的有効量を動物に投与することを含む上記方法を提供すること。好ましくは、そのワクチンは、例えば、皮下かまたは筋肉内注射によって非経口投与される。しかしながら、ワクチンはまた、腹腔内または静脈内注射によって、または例えば、経口、鼻腔内、直腸、膈内、眼内を含めた他の経路によってまたは経路の組合せによっても、そして当該技術分野において知られている遅延放出装置によっても投与することができる。当業者は、最適のワクチン投与経路を決定し、その選択された投与経路にしたがってワクチン組成物に許容しうる製剤を確認することができる。

【0164】

有効な用量は、低用量の抗原を用いて開始した後、その作用を監視しながら用量を増加させる慣用的な手段によって決定することができる。動物当たりの最適用量を決定する場合、多数の因子が考慮されうる。これらの内の主なものは、動物の種、体格、齢および全身状態、その動物における他の薬物の存在、動物がワクチン接種される特定のローソニア菌株のビルレンス等である。実際用量は、好ましくは、他の動物の研究による結果の考察後に選択される。

20

【0165】

本発明のワクチン中の本発明のタンパク質またはポリペプチドの投与量は、好ましくは、約1 μ g～約10mg、より好ましくは、約50 μ g～約1mg、そして最も好ましくは、約100 μ g～約0.5mgである。本発明のワクチン中の本発明のローソニアポリヌクレオチド分子の投与量は、好ましくは、約50 μ g～約1mgである。本発明のワクチン中の本発明の修飾されたローソニア細胞の投与量は、好ましくは、細胞約 1×10^3 ～約 1×10^8 個/ml、より好ましくは、細胞約 1×10^5 ～約 1×10^7 個/mlである。適当な用量寸法は、約0.1ml～約10ml、より好ましくは、約1ml～約5mlである。これら抗原の投与量は、本発明の組合せワクチンにも当てはまる。組合せワクチンの第二成分が、本発明のローソニアタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは修飾された細胞以外の抗原である場合、組合せワクチン中で用いるための第二成分の投与量は、当該技術分野において知られているように、その第二成分の前のワクチン使用から決定することができる。

30

【0166】

本発明のワクチンは、動物、特に、ブタをPPEから防御するのに有用である。そのワクチンは、ハムスター、フェレット、モルモット、シカおよびウシ、ウマおよび鳥類の種が含まれるがそれらに制限されるわけではないいずれか適当な動物に投与することができる。本発明のワクチンは、例えば、特にPPEの発生のタイミング等を含めたいくつかの因子に依って、特定の動物の生存中のいずれかの時期に投与することができる。ワクチンは、離乳期の若しくはより若い動物に、またはより成熟した動物に投与することができる。有効なタンパク質は、一次ワクチン接種だけを必要とすることがありうるし、または1回またはそれ以上のブースターワクチン接種も必要とすることがありうる。適切な免疫防御が得られているかどうかを検出する方法は、ワクチン接種後の動物における血清交換および抗体力価を確認することである。ワクチン接種のタイミングおよびブースターを

40

50

行うとすればその回数は、好ましくは、全ての適切な因子の分析に基づいて獣医によって決定され、そのいくつかは上に記載されている。

【0167】

一つの実施態様において、本発明のタンパク質またはポリペプチド、例えば、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0のL、イントラセルラリスタンパク質、またはそれらの組合せは、1 m lの緩衝溶液中に1 0 0 μ gのポリペプチド、およびアジュバントとして2 5 μ gの大腸菌不安定毒素を含有する製剤中で投与される。その製剤は、例えば、ブタの筋肉内に、5～7日齢で投与され、1 4日後に再投与される。

【0168】

本発明は、更に、P P Eに対してP P E感受性動物にワクチン接種するためのキットであって、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または修飾されたローソニア細胞、またはそれらの組合せの免疫学的有効量を有する容器を含む上記キットを提供する。そのキットは、場合により、薬学的に許容しうる担体または希釈剤を有する第二容器を含むことができる。好ましい実施態様において、そのポリペプチドは、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0のL、イントラセルラリスタンパク質であり；ポリヌクレオチド分子は、好ましくは、H t r A、P o n A、H y p C、L y s S、Y c f W、A B C 1またはO m p 1 0 0のL、イントラセルラリスタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有し、そして修飾されたローソニア細胞は、好ましくは、H t r A⁻、P o n A⁻、H y p C⁻、L y s S⁻、Y c f W⁻、A B C 1⁻またはO m p 1 0 0⁻表現型を発現する生細胞または不活化細胞である。

【0169】

本発明は、L、イントラセルラリス、L、イントラセルラリス特異的アミノ酸またはヌクレオチド配列、または抗L、イントラセルラリス抗体の存在を検出するキットであって、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体を含有するキットにも関する。そのキットは、例えば、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体に結合した、またはそのタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体に結合する残基に結合した酵素、蛍光または放射性標識を含めた本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体を検出する手段も含有しうる。

【0170】

次の実施例は、本発明を単に詳しく説明するものであり、発明の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0171】

実施例1：L、イントラセルラリス染色体領域Aの分子クローニング

DNAの単離およびDNAライブラリーの構築

鋳型DNAを、実験的にL、イントラセルラリスに感染したブタの回腸から単離されたブタ腸粘膜から精製した。均一化された腸粘膜からのDNA精製は、(1) Nollauらの方法(Nollauら, 1996, Bio Techniques 20:784-788)または(2) DNAのフェノール抽出および酢酸ナトリウム-エタノール沈降によって行われた。L、イントラセルラリス遺伝子配列のクローニングを容易にするために、いくつかのゲノムライブラリーを構築した。これらライブラリーを、制限DNAフラグメントの5'および3'末端への既知の配列(Vectorette II^{T M}, Genosys Biotechnologies, Inc., ザ・ウッドランズ, TX)の連結によって特異的に修飾した。Vectorette^{T M}ライブラリーは、L、イントラセルラリスに感染したブタ粘膜DNA抽出物のアリコート、制限エンドヌクレアーゼH i n d I I I、E c o R I、D r a IまたはH p a Iを用いて37℃で一晩別々に消化することによって構築された。次に、その反応を、追加の新しい制限酵素を用いて止め、2 mM A T P、2 mM D T Tの最終濃度に調整した。Vectorette^{T M}テーリング(tailing)を、3ピコモルの適当な適合した Vectorette^{T M} リンカー(H i n d I I I Vectorette^{T M} : H i n d I I Iで消化されたDNA ; E c o R I ; E c o R Iで消化されたDNA ; B l u

10

20

30

40

50

nt : Dra I、Hpa Iで消化されたDNA)を加えたT₄ DNAリガーゼ(400 U)の添加によって行った。その混合物を20℃、60分間;および37℃、30分間で3サイクルインキュベートして、テーリング反応を完了させた後、水を用いて200 μlに調整し、-20℃で貯蔵した。

【0172】

Lys S、Ycf W、ABC 1およびOmp 100タンパク質をコードしているゲノム領域Aの分子クローニング

ゲノム領域A(図1に示される)の識別は、ゲノムウォーキングおよびフェージライブラリースクリーニング処理によって行われた。Hind III、Eco RI、Dra IおよびHpa IのVectorette^{T M}ライブラリーのスクリーニングは、細胞壁自己消化に関与する細菌N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼと相同のL-イントラセルラリスからの遺伝子(ami B)に隣接して位置するDNAフラグメントを得るように行われた。オリゴヌクレオチドプライマーER159(配列番号:37)、ER161(配列番号:38)およびER162(配列番号:39)は、ami Bのヌクレオチド配列に基づいて設計された。3種類全部のプライマーを、この領域内の(-)鎖を結合するように設計して、Ami Bをコードしている遺伝子上流に位置するDNAの増幅を可能にした。

10

【0173】

omp 100遺伝子のフラグメントのポリメラーゼ連鎖増幅には、オリゴヌクレオチドER159(配列番号:37)、ER161(配列番号:38)およびER162(配列番号:39)を、Vectorette^{T M}特異的プライマー(ER70)(配列番号:33)と組み合わせて、1x PCR Buffer II(Perkin Elmer)、1.5 mM MgCl₂、各200 μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5 U AmpliTaq^{T M} Gold(Perkin Elmer)熱安定性ポリメラーゼを含有する50 μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として4 μlのVectorette^{T M}ライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性(95° 9分間);40サイクルの変性(95° 30秒間)、アニーリング(65° 30秒間)および重合(72° 2.5分間);続いて72°で7分間の最終伸長で行った。

20

【0174】

増幅された産物を、1.2%アガロースゲル(Sigma)上での分離によって可視化した。ER159かまたはER162をVectorette^{T M}特異的プライマーER70と組み合わせて用いた場合、約2.5 kbの産物が、Hpa I Vectorette^{T M}ライブラリーの増幅によって生じた。このフラグメントは、Ami BをコードしているL-イントラセルラリス遺伝子の直ぐ上流の1.9 kb領域であった。そのPCR生産物を、JET sorb^{T M}キット(GENOME D, Inc., Research Triangle Park, NC)を用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてPCR 2.1 Topo(Invitrogen, カールズバット, CA)中にクローン化してプラスミドpER393を生じた。そのインサートを、ベクター特異的プライマーを用いて部分的に配列決定した。得られた配列は、BLASTxアルゴリズム(Altschul ら, 1990, J.Mol.Biol. 215:403-10)によって分析され、GenBank データベース中の約85 kDaタンパク質に類似したタンパク質を部分的にコードすることが示された。髄膜炎菌、インフルエンザ菌およびパスツレラ・マルトシダからの報告されたタンパク質は、それぞれ、Omp 85、防御表面抗原D15およびOma 87であった。

30

40

【0175】

この部分遺伝子フラグメントの新たに識別された配列(Omp 100タンパクのC末端の2/3をほぼコードしている)に基づいて、特異的プライマーER174(配列番号:46)およびER175(配列番号:47)を、PCR増幅によるVectorette^{T M}ライブラリーの2回目のスクリーニングによって追加の5'フランキング配列を得るよう設計した。オリゴヌクレオチドER174(配列番号:46)およびER175(配列番号:47)を、プライマーER70(配列番号:33)と組み合わせて、1x PCR Buffer

50

r II (Perkin Elmer)、1.5 mM $MgCl_2$ 、各 200 μM のデオキシ NTP、各 50 ピコモルのプライマーおよび 2.5 U AmpliTaqTM Gold (Perkin Elmer) 熱安定性ポリメラーゼを含有する 50 μl の反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA 鋳型として 2 μl の VectoretteTM EcoRI および DraI ライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性 (95° 9 分間) ; 35 サイクルの変性 (95° 30 秒間)、アニーリング (62° 30 秒間) および重合 (72° 2.5 分間) ; 続いて 72° で 7 分間の最終伸長で行った。

【0176】

PCR による EcoRI および DraI の VectoretteTM ライブラリーのスクリーニング (ER174 かまたは ER175 を ER70 と組み合わせて用いる) は、EcoRI VectoretteTM ライブラリーからの約 1.4 kb フラグメントの満足すべき増幅を生じた。その PCR 産物を、JETsorbTM キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そして pCR2.1 Topo 中にクローン化してプラスミド pER394 を生じた。ER175 およびベクター特異的プライマーを用いる pER394 内のインサート両末端の配列分析は、このフラグメントが、pER394 内のフラグメントインサートと隣接していた (例えば、オーバーラップしていた) ことを確認し、omp100 遺伝子の 5' 末端の決定を可能にした。この分析は、輸送体タンパク質の ATP 結合カセット (ABC) スーパーファミリーと相同の追加の部分 ORF の存在も示した。したがって、コードされる部分タンパク質を ABC1 と称した。

【0177】

この部分遺伝子フラグメントの新たに識別された配列 (ABC1 タンパクの C 末端の 1/2 をほぼコードしている) に基づいて、特異的プライマー ER188 (配列番号: 55) を、PCR 増幅による VectoretteTM ライブラリーの 3 回目のスクリーニングによって追加の 5' フランキング配列を得るように設計した。オリゴヌクレオチド ER188 (配列番号: 55) を、プライマー ER70 (配列番号: 33) と組み合わせて、1x PCR Buffer II、1.5 mM $MgCl_2$ 、各 200 μM のデオキシ NTP、各 50 ピコモルのプライマーおよび 2.5 U AmpliTaqTM Gold 熱安定性ポリメラーゼを含有する 50 μl の反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA 鋳型として 4 μl の VectoretteTM HindIII、DraI および HpaI ライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性 (95° 9 分間) ; 30 サイクルの変性 (95° 30 秒間)、アニーリング (60° 30 秒間) および重合 (72° 2.5 分間) ; 続いて 72° で 7 分間の最終伸長で行った。

【0178】

PCR による HindIII、DraI および HpaI の VectoretteTM ライブラリーのスクリーニング (ER188 を ER70 と組み合わせて用いる) は、HindIII Vector etteTM ライブラリーからの約 0.8 kb フラグメントの満足すべき増幅を生じた。その PCR 産物を、JETsorbTM キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そして pCR2.1 Topo 中にクローン化してプラスミド pER395 を生じた。ER188 およびベクター特異的プライマーを用いる pER395 内のインサート両末端の配列分析は、このフラグメントが、pER394 内のフラグメントインサートと隣接していた (例えば、オーバーラップしていた) ことを確認し、abc1 遺伝子の 5' 末端の決定を可能にした。追加の部分 ORF は、その abc1 遺伝子の上流で確認された。そのコードされるタンパク質を、多数の細菌で見出される保存タンパク質である YcfW との相同性に基づいて、YcfW と称した。

【0179】

ycfW ORF の残りの部分をコードしている領域は、L. イントラセリラリスゲノム DNA の部分 Tsp5091 消化によって生じた Lambda ZAP ExpressTM ファージライブラリーをスクリーニングすることによって得られた。そのファージライブラリーを、10 mM $MgSO_4$ 、IPTG および X-Gal の存在下において XL1-Blue MRF' 大腸菌細胞上にプレーティングした。透明なプラークを採取し、ファージインサー

10

20

30

40

50

トを、Expand Long Template P C R System^{T M} を供給者 (Boehringer Mannheim, インディアナポリス, I N) によって提示のように用いて増幅させた。T 3 および T 7 ファージ特異的プライマーを、変性 (94° 2 分間) ; 25 サイクルの変性 (94° 10 秒間)、アニーリング (50° 30 秒間) および重合 (68° 6 分間) ; 続いて 68° で 7 分間の最終伸長から成る P C R 条件で用いた。得られた P C R 産物を、T 3 および T 7 プライマーを用いて最終配列決定し、B L A S T x 分析によって GenBank データベース中の遺伝子と比較した。クローン A 2 1 と称される一つのファージは、前に識別された y c f W、A B C 1 および o m p 1 0 0 D N A 配列にオーバーラップした 2.8 k b を包含する約 6.1 k b インサートを含むした。したがって、このクローンは、Y c f W タンパクの N 末端をコードしている D N A 配列を決定するのに用いられた。追加の O R F は、y c f W 遺伝子の上流で確認された。この遺伝子は、いくつかのリシルー t R N A シンテターゼとの相同性を有し且つ l y s S と称されるタンパクをコードしていた。

10

【0180】

a b c 1 遺伝子の C 末端部分および o m p 1 0 0 の予備のヌクレオチド配列は、p E R 3 9 3 および p E R 3 9 4 内のインサートを配列決定することによって得られた。Y c f W の C 末端の 1 4 1 アミノ酸部分および A B C 1 のアミノ末端部分をコードしている予備ヌクレオチド配列は、p E R 3 9 5 内のインサートを配列決定することによって得られた。y c f W 遺伝子の N 末端および l y s S をコードしている予備ヌクレオチド配列は、ファージクローン A 2 1 中に含有されたインサートである P C R 産物を配列決定することによって得られた。予備配列決定に用いられたプライマーには、p E R 3 9 3 に関する E R 1 5 9 (配列番号: 37)、E R 1 6 9 (配列番号: 41)、E R 1 7 0 (配列番号: 42)、E R 1 7 6 (配列番号: 48) および E R 1 7 7 (配列番号: 49) ; p E R 3 9 4 に関する E R 1 7 5 (配列番号: 47)、E R 1 8 5 (配列番号: 52)、E R 1 8 6 (配列番号: 53) および E R 1 8 7 (配列番号: 54) ; p E R 3 9 5 に関する E R 1 8 8 (配列番号: 55) ; およびファージクローン A 2 1 に関する E R 2 4 6 (配列番号: 97)、E R 2 5 4 (配列番号: 98)、E R 2 5 5 (配列番号: 99)、E R 2 5 6 (配列番号: 100) および E R 2 5 7 (配列番号: 101) の他に、ベクター特異的前進 M 1 3、逆 M 1 3、ファージ T 3 および T 7 のプライマーが含まれた。

20

【0181】

L. イントラセルラリス領域 A を包含するサブゲノム D N A フラグメントの特異的 P C R 増幅

30

プラスミド p E R 3 9 3、p E R 3 9 4、p E R 3 9 5 およびファージクローン A 2 1 中に含有されるゲノムフラグメントからのクローニングおよび予備配列決定の結果を用いて、オーバーラップサブゲノムフラグメントの特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、L. イントラセルラリスに感染したブタ粘膜 D N A 抽出物から直接的に設計した。D N A 抽出は、上記の方法にしたがって行った。このアプローチは、大腸菌中での遺伝子フラグメントのクローニング中に起こる可能性がある突然変異のために、配列決定用人工産物の導入を省略する要求に基づいて好適である。l y s S と、y c f W の N 末端の 3 / 4 に隣接するオリゴヌクレオチド E R 2 4 6 (配列番号: 97) および E R 2 5 4 (配列番号: 98) ; a b c 1 遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチド E R 2 2 9 (配列番号: 73) および E R 2 0 6 (配列番号: 66) ; および o m p 1 0 0 遺伝子に隣接する E R 2 3 1 (配列番号: 75) および E R 2 3 2 (配列番号: 76) を用いて、この領域を粘膜 D N A 抽出物から特異的に増幅させた。l y s S 遺伝子は、50 μ l の最終試料容量中に鋳型としての 2 μ l の粘膜 D N A 抽出物、1 x P C 2 緩衝液 (Ab Peptide, Inc.)、各 200 μ M の d N T P、各 50 ピコモルのプライマー、7.5 U Klen Taq1 および 0.15 U クロニン化 P f u 熱安定性ポリメラーゼを含むする P C R 反応中で増幅した。増幅条件は、94° で 5 分間の変性後、30 サイクルの変性 (94° 1 分間)、アニーリング (55° 30 秒間) および重合 (72° 3 分間) から成った。72° で 7 分間の最終伸長は、標的の 2.6 k b 領域の増幅を完全にした。a b c 1 遺伝子は、50 μ l の最終試料容量中に鋳型としての 1 μ l の粘膜 D N A 抽出物、1 x P C 2 緩衝液、各 200 μ M

40

50

の d N T P、各 5 0 ピコモルのプライマー、7. 5 U Klen Taq1 および 0. 1 5 U クロ
ーン化 P f u 熱安定性ポリメラーゼを含有する 3 重 P C R 反応中で増幅した。増幅条件は
、9 5 ° で 5 分間の変性後、3 3 サイクルの変性 (9 4 ° 1 分間)、アニーリング (5 8
° 3 0 秒間) および重合 (7 2 ° 8 0 秒間) から成った。7 2 ° で 1 0 分間の最終伸長は
、標的遺伝子領域の増幅を完全にした。o m p 1 0 0 遺伝子は、5 0 μ l の最終試料容量
中に鋳型としての 2 μ l の粘膜 D N A 抽出物、1 x P C 2 緩衝液、各 2 0 0 μ M の d N T
P、各 5 0 ピコモルのプライマー、7. 5 U Klen Taq1 および 0. 1 5 U クローン化 P
f u 熱安定性ポリメラーゼを含有する 4 重 P C R 反応中で増幅した。増幅条件は、9 4 °
で 5 分間の変性後、3 5 サイクルの変性 (9 4 ° 3 0 秒間)、アニーリング (6 0 ° 3 0
秒間) および重合 (7 2 ° 3 分間) から成った。7 2 ° で 7 分間の最終伸長は、標的遺伝
子領域の増幅を完全にした。増幅後、適宜、試料をそれぞれプールし、特定の産物をアガ
ロースゲル電気泳動によって精製後、A B I 自動 D N A シークエンサー (Lark Technolog
ies, Inc., ヒューストン, T X) において DyeDeoxy^{T M} 終結反応を用いる直接配列分析
を行った。

10

【0182】

合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、L. イントラセルラリスからの増幅産物
の両 D N A 鎖を配列決定した。配列分析に用いられるプライマーには、A P 5 8. 1 (配
列番号: 2 6)、A P 5 8. 2 (配列番号: 2 7)、A P 5 9. 1 (配列番号: 2 8)、
A P 5 9. 2 (配列番号: 2 9)、A P 5 9. 3 (配列番号: 3 0)、A P 5 9. 4 (配
列番号: 3 1)、A P 5 9. 5 (配列番号: 3 2)、E R 1 5 9 (配列番号: 3 7)、E
R 1 6 9 (配列番号: 4 1)、E R 1 7 0 (配列番号: 4 2)、E R 1 7 5 (配列番号:
4 7)、E R 1 7 6 (配列番号: 4 8)、E R 1 7 7 (配列番号: 4 9)、E R 1 8 5 (配
列番号: 5 2)、E R 1 8 6 (配列番号: 5 3)、E R 1 8 7 (配列番号: 5 4)、E
R 1 8 8 (配列番号: 5 5)、E R 2 0 5 (配列番号: 6 5)、E R 2 0 6 (配列番号:
6 6)、E R 2 1 7 (配列番号: 7 1)、E R 2 2 9 (配列番号: 7 3)、E R 2 3 0 (配
列番号: 7 4)、R A 1 3 8 (配列番号: 7 9)、R A 1 3 9 (配列番号: 8 0)、R
A 1 4 0 (配列番号: 8 1)、A P 1 8 2. 1 (配列番号: 8 3)、A P 1 8 2. 2 (配
列番号: 8 4)、A P 1 8 2. 3 (配列番号: 8 5)、A P 1 8 2. 4 (配列番号: 8 6)
、A P 1 8 2. 5 (配列番号: 8 7)、A P 1 8 2. 6 (配列番号: 8 8)、A P 1 8
2. 7 (配列番号: 8 9)、A P 1 8 2. 8 (配列番号: 9 0)、A P 1 8 2. 9 (配列
番号: 9 1)、A P 1 8 2. 1 0 (配列番号: 9 2)、A P 1 8 2. 1 1 (配列番号: 9
3)、A P 1 8 2. 1 2 (配列番号: 9 4)、A P 1 8 2. 1 3 (配列番号: 9 5)、A
P 1 8 2. 1 4 (配列番号: 9 6)、E R 2 4 6 (配列番号: 9 7)、E R 2 5 4 (配列
番号: 9 8)、E R 2 5 5 (配列番号: 9 9)、E R 2 5 6 (配列番号: 1 0 0) および
E R 2 5 7 (配列番号: 1 0 1) が含まれた。

20

30

【0183】

L. イントラセルラリスゲノム領域 A のヌクレオチド配列を配列番号: 1 に挙げる。こ
の領域内にコードされる L y s S、Y c f W、A B C 1 および O m p 1 0 0 タンパク質の
推定上のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号: 1 0 2、配列番号: 3、配列番号: 4 およ
び配列番号: 5 に示す。

40

【0184】

領域 A によって規定される L. イントラセルラリス遺伝子および遺伝子産物の分子分析
a m i B 遺伝子の上流で確認された L. イントラセルラリス染色体領域 A は、L y s S
、Y c f W、A B C 1 および O m p 1 0 0 と称されるタンパク質をコードしている (図 1
)。これら遺伝子は、同じ D N A 鎖によってコードされ、極めて接近して配列している。
この体制は、これら遺伝子がオペロンの一部分でありうるし、L y s S / Y c f W および
A B C 1 / O m p 1 0 0 の場合に翻訳共役していると考えられることを示唆している。l
y s S O R F は、非定型 T T G 開始コドンから開始すると考えられ、配列番号: 1 のヌ
クレオチド 1 6 5 ~ 1 7 4 5 から伸長すると考えられる。この遺伝子は、約 6 0 , 6 2 8
ダルトンの理論分子量を有する L y s S (配列番号: 1 0 2) と称される推定上の 5 2 6

50

アミノ酸タンパク質をコードしている。y c f W O R F は、報告された配列（配列番号：1）のヌクレオチド1745～3028から伸長する。この遺伝子は、約46,957ダルトンの理論分子量を有するY c f W（配列番号：3）と称される推定上の427アミノ酸タンパク質をコードしている。a b c 1 O R F は、配列番号：1のヌクレオチド3031～3738から伸長し、約25,618ダルトンの理論分子量を有する推定上の235アミノ酸タンパク質A B C 1（配列番号：4）をコードしている。更に下流であるが44ヌクレオチドによってこのO R F にオーバーラップしているのは、更に別の大きい読み取り枠である。このO R F は o m p 1 0 0 と称されたが、配列番号：1のヌクレオチド3695～6388から伸長する。その o m p 1 0 0 遺伝子は、O m p 1 0 0（配列番号：5）と称された推定上の896アミノ酸タンパク質をコードしている。O m p 1 0 0 タンパク質は、約101,178ダルトンの理論分子量を有する。 10

【0185】

L. イントラセルラリス L y s S タンパク質のリシルー t R N A シンテターゼとの類似性

L y s S タンパク質の推定上のアミノ酸配列（配列番号：102）を、B L A S T p アルゴリズム（Altschul, S.F. ら, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402）によって GenBank に報告された他のタンパク質と比較し、C L U S T A L W アルゴリズム（Thompson, J.D. ら, 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680）によって整列させた。図9に示されるように、この分析は、L y s S が、細胞質リシルー t R N A シンテターゼファミリーのメンバーとの類似性を有するということを示した。L. イントラセルラリス L y s S タンパク質は、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）からのリシルー t R N A シンテターゼタンパク質（A c c n. A B 0 1 2 1 0 0）と47%の同一性を有する。その細胞質の場所と一致して、このタンパク質の予想されるN末端付近には、分泌シグナル配列が確認されなかった。 20

【0186】

L. イントラセルラリス Y c f W および A B C 1 タンパク質の他の仮定のタンパク質との類似性

Y c f W タンパク質は、約40～45 k D a の寸法の保存される仮定のタンパク質のファミリーと一定の相同性を有する。このファミリーのメンバーは、膜貫通タンパク質または膜内在性タンパク質であることが報告されている。このファミリーからの典型的なタンパク質の構造予想比較は、T M P r e d（E M B n e t - European Molecular Biology Network; <http://www.ch.embnet.org/index.html>）を用いて行われた。その T M P r e d プログラムは、膜に広がる領域およびそれらの配向の予測を行う。そのアルゴリズムは、天然に存在する膜貫通タンパク質のデータベースである T M b a s e の統計分析に基づく。（Hofmann & Stoffel, 1993, Biol.Chem. Hoppe-Seyler 347:166）。この分析は、このタンパク質ファミリー内の相同性が、そのタンパク質のC末端付近に集まった三つの強力な膜貫通ドメインを有することを示している。本発明者は、このファミリーを代表するものの極めてカルボキシル末端にある4個のアミノ酸（L R Y E）のところに極めて十分に保存されたドメインに注目してきた。そのC末端領域は多数の膜貫通ドメインを含有するが、先端のC末端は高度に保存されるという知見は、相同タンパク質のY c f W ファミリーのこの領域に関係した普遍の機能的必要条件を示唆している。配列番号：3に示されるL. イントラセルラリス Y c f W タンパク質は、先端のC末端アミノ酸（L R Y E）の他に、3個のC末端膜貫通ドメインも含有する。上の3個のカルボキシルドメインの他に、T M P r e d 分析は、Y c f W タンパク質の残基19～44が、膜貫通領域を形成していると考えられることを示している。Y c f W のアミノ末端は、既知の分泌シグナル配列上で操作される（trained）ネットワークを用いる P S O R T（6.4バージョン）計算機アルゴリズムによっても調べられる。この分析は、残基29～45が、切断できないシグナル配列（D.J.McGeoch, Virus Research, 3:271,1985 および G.von Heijne, Nucl.Acids Res., 14:4683,1986）として作用すると考えられる膜貫通領域（P.Klein ら, 1985, Biochim.Biophys.Acta, 815:468）を形成すると考えられることを示している。図2に示さ 40 50

れるように、その427アミノ酸のL. イントラセルラリスYcfWタンパク質は、発疹チフスリケッチア (*Rickettsia prowazekii*) からの415残基の仮定のタンパク質 (Accn. AJ235272) と32%の同一性を有する。

【0187】

ABC1タンパク質の推定上のアミノ酸配列 (配列番号: 4) を、BLASTpアルゴリズムによって GenBank に報告された他の既知のタンパク質と比較した。特に十分に保存される領域 (GASGSGKS) は、ABC1のアミノ末端付近で確認された。この領域は、ABC型輸送体中に存在するヌクレオチド結合モチーフA (Pループ) に相当する。それらABC型タンパク質は、広範囲の細胞機能を有するタンパク質の極めて大きいスーパーファミリーから成る。これらタンパク質の大部分は、ヌクレオチド結合モチーフ内の局所相同性に基づいてABC型タンパク質として分類され、概して、細胞輸送機能に
10
関与していると考えられる。図3は、約45%同一のアミノ酸残基を有する大腸菌からのYcfV (Accn. AE000212) の列と一緒にABC1の列を示す。大腸菌YcfVタンパク質は、有望なABC型輸送体タンパク質である。

【0188】

L. イントラセルラリスOmp100タンパク質の85kDaタンパク質との類似性
Omp100のアミノ末端の検討は、アミノ酸1~25が疎水性であり且つ正に荷電していることを示し、それはシグナル配列の特徴を示している (von Heijm, 1985, J.Mol.Biol. 184:99-105)。既知のシグナル配列上で操作されるネットワークを用いるSignalP (1.1バージョン) 計算機アルゴリズム (Nielsen, H. ら, 1997, Prot. Engineering, 10:1-6; <http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>) は、アミノ酸25と26との間の最も可能性のある切断部位を予測した。したがって、アミノ酸1~25は、外膜局在化過程中にOmp100から除去されると考えられる。Omp100のC末端アミノ酸は、外膜タンパク質の正しい局在と一致する特徴であるフェニルアラニン残基であると考えられる (Struyve, M., 1991, J.Mol.Biol. 218:141-148)。

【0189】

Omp100タンパク質の推定上のアミノ酸配列 (配列番号: 5) を、BLASTpアルゴリズム (Altschul, S.F. ら, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) によって GenBank に報告された他の既知のタンパク質と比較し、CLUSTAL Wアルゴリズム (Thompson, J.D. ら, 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) によって整列させた。図
30
4に示されるように、この分析は、Omp100が、GenBank データベース中の約85kDaタンパク質 (U70214と称される) と一定の類似性を有することを示した。大腸菌からのOmp100およびこの仮定のタンパク質 (YaeT, Accn. U70214 またはAE000127) のC末端の列は、これらタンパク質が約23%同一の残基を有することを示している。他の報告されたタンパク質には、特に、フレクスナー赤痢菌 (Omp90)、髄膜炎菌 (Omp85)、インフルエンザ菌 (D15) およびパスツレラ・マルトシダ (Omp87) から識別されたものが含まれる。アミノ酸1~139を含めたNH₂末端部分は、いずれの既知のタンパク質とも並列しない。コードされるOmp100タンパク質のアミノ酸1~200を包含する領域だけを用いるBLASTpアルゴリズムを用いた GenBank の追加の検索では、いずれの既知のOmp85様タンパク質も検出
40
できなかった。このデータは、Omp100のアミノ末端部分がL. イントラセルラリスに全く特有であることを示している。

【0190】

実施例2: L. イントラセルラリス染色体領域Bの分子クローニング

PonA、HtrA、HypCおよびORF1タンパク質をコードしているゲノム領域Bの分子クローニング

ゲノム領域B (図1に示される) の識別は、ゲノムA領域の識別について記載されたのと同様のゲノムウォーキング処理によって行われた。HindIII、EcoRI、DraIおよびHpaIのVectorette^{T M} ライブラリーのスクリーニングは、他の細菌の鞭毛フックタンパク質と相同のタンパク質をコードするL. イントラセルラリスからの遺伝子
50

f l g Eに隣接して位置するDNAフラグメントを得るように行われた。オリゴヌクレオチドプライマーE R 1 4 2（配列番号：34）、E R 1 5 3（配列番号：35）およびE R 1 5 8（配列番号：36）は、f l g Eの3'の既知のヌクレオチド配列に基づいて設計された。3種類全部のプライマーを、この領域内の（+）鎖を結合するように設計して、F l g Eをコードしている遺伝子の下流に位置するDNAの増幅を可能にした。

【0191】

p o n A遺伝子のフラグメントのポリメラーゼ連鎖増幅には、オリゴヌクレオチドE R 1 4 2（配列番号：34）、E R 1 5 3（配列番号：35）およびE R 1 5 8（配列番号：36）を、Vectorette^{T M} 特異的プライマー（E R 7 0）（配列番号：33）と組み合わせて、1 x P C R Buffer II、1. 5 mM Mg C l₂、各200 μMのデオキシN T P、各50ピコモルのプライマーおよび2. 5 U AmpliTaq^{T M} Gold 熱安定性ポリメラーゼを含有する50 μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として4 μlの Vectorette^{T M} ライブラリーを用いて行った。増幅アニーリング温度、伸長時間およびサイクル数は、実験間で異なり、次の範囲にわたって行われた。変性（95° 9分間）；35～40サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（50～60° 30秒間）および重合（72° 2. 5～3分間）；続いて72°で7分間の最終伸長。

【0192】

増幅された産物を、1. 2%アガロースゲル上での分離によって可視化した。E R 1 5 8（配列番号：36）を Vectorette^{T M} 特異的プライマーE R 7 0と組み合わせて用いた場合、約1. 2 kbの産物が、D r a I Vectorette^{T M} ライブラリーの増幅によって生じた。この産物の特異的増幅をもたらす条件には、変性（95° 9分間）；40サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（60° 30秒間）および重合（72° 2. 5分間）；続いて72°で7分間の最終伸長が含まれた。このフラグメントは、F l g EをコードしているL. イントラセルラリス遺伝子の直ぐ下流の1. 4 kb領域であった。そのP C R生産物を、J E T sorb^{T M} キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてp C R 2. 1 Topo 中にクローン化してプラスミドp E R 3 9 0を生じた。そのインサートを、E R 7 0およびE R 1 5 8プライマーを用いて部分的に配列決定した。得られた配列は、B L A S T xアルゴリズム（Altschul, S.F. ら, 1990）によって分析され、GenBank データベース中のペニシリン結合タンパク質のアミノ末端半分に類似したポリペプチドをコードすることが示された。

【0193】

この部分遺伝子の新たに識別された配列に基づいて、プライマーE R 1 6 3（配列番号：40）を、Vectorette^{T M} ライブラリーの2回目のスクリーニングによって追加の3'フランキング配列を得るように設計した。オリゴヌクレオチドE R 1 6 3（配列番号：40）を、プライマーE R 7 0（配列番号：33）と組み合わせて、1 x P C R Buffer II、1. 5 mM Mg C l₂、各200 μMのデオキシN T P、各50ピコモルのプライマーおよび2. 5 U AmpliTaq^{T M} Gold 熱安定性ポリメラーゼを含有する50 μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として2 μlの Vectorette^{T M} H i n d III、E c o R IおよびH p a Iライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性（95° 9分間）；30サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（62° 30秒間）および重合（72° 1. 5分間）；続いて72°で7分間の最終伸長で行った。

【0194】

H i n d III Vectorette^{T M} ライブラリーから2. 7 kbフラグメントを増幅させた。そのP C R産物を、J E T sorb^{T M} キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてp C R 2. 1 Topo 中にクローン化してプラスミドp E R 3 9 2を生じた。ベクター特異的プライマーを用いるクローン化されたインサート両末端の配列分析は、このフラグメントが、p E R 3 9 0内のフラグメントインサートと隣接していたことを確認した。この分析は、セリンプロテアーゼのH t r Aタンパク質ファミリーのNH₂末端の400残基にほぼ相当する追加の部分O R Fの存在も示した。したがって、コードさ

れる部分タンパク質をH t r Aと称した。

【0195】

3回目のゲノムウォーキングを行って、h t r A O R F内の更に別の配列を決定した。特異的プライマーE R 1 7 3（配列番号：45）を、p E R 3 9 2内のインサートの3'末端付近の既知の配列に基づいて設計した。オリゴヌクレオチドE R 1 7 3（配列番号：45）を、プライマーE R 7 0（配列番号：33）と組み合わせて、上記のような50 μ lの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として2 μ lのVectorett^{T M} e^{T M} D r a IおよびH p a Iライブラリーを用いて行った。増幅（変性（95° 9分間）；35サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（62° 30秒間）および重合（72° 2.5分間）；続いて72°で7分間の最終伸長）は、D r a Iライブラリーから0.3 kbフラグメントを生じた。そのP C R産物を、J E T sorb^{T M} キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、p C R 2.1 Topo中にクローン化し、そしてそのインサートの両末端について、ベクター特異的プライマーを用いて配列決定した。配列およびB L A S T xの分析は、h t r A O R Fがそのクローン化されたフラグメントの3'末端によってオープンの状態のままであることおよび追加の10アミノ酸が、コードされるH t r Aタンパク質の末端の前に残っていると考えられることを示した。

10

【0196】

最終回のゲノムウォーキングを行って、h t r A O R Fおよび3'フランキンク領域の残り部分を決定した。特異的プライマーE R 1 8 9（配列番号：56）を、h t r A O R Fの3'末端付近の既知の配列に基づいて設計した。オリゴヌクレオチドE R 1 8 9（配列番号：56）を、プライマーE R 7 0（配列番号：33）と組み合わせて、上記のような50 μ lの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として4 μ lのVectorette^{T M} H i n d III、E c o R IおよびH p a Iライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性（95° 9分間）；30サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（60° 30秒間）および重合（72° 2.5分間）；続いて72°で7分間の最終伸長で行った。増幅は、E c o R Iライブラリーから約1 kbフラグメントを生じた。そのP C R産物を、J E T sorb^{T M} キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、p C R 2.1 Topo中にクローン化してp E R 3 9 6を生じた。ベクター特異的プライマーを用いるp E R 3 9 6内のインサート両末端の配列分析は、h t r A遺伝子の3'末端の決定を可能にした。追加の小さいO R Fは、h t r A遺伝子の下流で確認された。コードされるタンパク質は、他の細菌で見出されるH y p Cタンパク質との相同性に基づいて、H y p Cと称された。h y p Cから更に下流は、o r f 1と称される更に別の部分O R Fであり、それは反対のDNA鎖によってコードされる。この切断された177アミノ酸ポリペプチドをO R F 1と称した。

20

30

【0197】

p o n A、h t r A、h y p C遺伝子、およびo r f 1遺伝子のC末端部分の予備ヌクレオチド配列は、p E R 3 9 0、p E R 3 9 2およびp E R 3 9 6内のインサートを配列決定することによって得られた。予備配列決定に用いられたプライマーには、p E R 3 9 0に関するE R 1 9 3（配列番号：59）およびE R 1 9 4（配列番号：60）；p E R 3 9 2に関するE R 1 7 1（配列番号：43）、E R 1 7 2（配列番号：44）、E R 1 7 8（配列番号：50）、E R 1 7 9（配列番号：51）、E R 1 9 0（配列番号：57）およびE R 1 9 1（配列番号：58）；およびp E R 3 9 6に関するE R 1 9 5（配列番号：61）およびE R 1 9 6（配列番号：62）の他に、ベクター特異的前進M 1 3および逆M 1 3プライマーが含まれた。

40

【0198】

L. イントラセルラリス領域Bを包含するサブゲノムDNAフラグメントの特異的P C R増幅

プラスミドp E R 3 9 0、p E R 3 9 2およびp E R 3 9 6中に含有されるゲノムフラグメントからのクローニングおよび予備配列決定の結果を用いて、オーバーラップサブゲノムフラグメントの特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、L. イントラ

50

セルラリスに感染したブタ粘膜DNA抽出物から直接的に設計した（DNA抽出については、上記の方法を用いた）。このアプローチは、大腸菌中での遺伝子フラグメントのクローニング中に起こる可能性がある突然変異のために、配列決定用人工産物の導入を省略する要求に基づいて好適である。ponA遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドER228（配列番号：72）およびER190（配列番号：57）；htrA遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドER207（配列番号：67）およびRA134（配列番号：78）；およびhypC遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドER189（配列番号：56）およびER196（配列番号：62）を用いて、この領域を粘膜DNA抽出物から特異的に増幅させた。これらフラグメントの端点はオーバーラップし、それによって、隣接しているサブゲノムDNAフラグメントの特異的増幅後、独特のオーバーラップDNAフラグメントそれぞれに存在する末端ヌクレオチド配列を比較することによる引き続きの確認を可能にした。したがって、最終配列は、完全なL. イントラセルラリスゲノム領域Bである。

10

【0199】

オーバーラップするponA、htrAおよびhypC遺伝子領域を、50μlの最終試料容量中に鋳型としての1μlの粘膜DNA抽出物、1xPC2緩衝液（Ab Peptide, Inc.）、各200μMのdNTP、各50ピコモルのプライマー、7.5U Klen Taq1および0.15Uクロン化Pfu熱安定性ポリメラーゼをそれぞれ含有する3重PCR反応中で増幅した。ponAの増幅条件は、95°で5分間の変性後、33サイクルの変性（95°30秒間）、アニーリング（62°30秒間）および重合（72°3分間）から成った。htrAの増幅条件は、94°で5分間の変性後、33サイクルの変性（95°30秒間）、アニーリング（58°30秒間）および重合（72°3分間）から成った。hypCの増幅条件は、94°で5分間の変性後、33サイクルの変性（95°30秒間）、アニーリング（62°30秒間）および重合（72°80秒間）から成った。72°で7分間の最終伸長は、標的の遺伝子領域それぞれの増幅を完全にした。増幅後、試料をそれぞれ別々にプールし、特定の産物をアガロースゲル電気泳動によって精製後、ABI自動DNAシーケンサー（Lark Technologies, Inc., ヒューストン, TX）においてDyeDeoxyTM終結反応を用いる直接配列分析を行った。

20

【0200】

合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、L. イントラセルラリスからの増幅産物の両DNA鎖を配列決定した。配列分析に用いられるプライマーには、AP55.1（配列番号：10）、AP55.2（配列番号：11）、AP55.3（配列番号：12）、AP55.4（配列番号：13）、AP55.5（配列番号：14）、AP55.6（配列番号：15）、AP55.7（配列番号：16）、AP55.8（配列番号：17）、AP55.9（配列番号：18）、AP55.10（配列番号：19）、AP55.11（配列番号：20）、AP56.1（配列番号：21）、AP56.2（配列番号：22）、AP56.3（配列番号：23）、AP57.1（配列番号：24）、AP57.2（配列番号：25）、ER158（配列番号：36）、ER163（配列番号：40）、ER171（配列番号：43）、ER172（配列番号：44）、ER173（配列番号：45）、ER178（配列番号：50）、ER179（配列番号：51）、ER189（配列番号：56）、ER190（配列番号：57）、ER191（配列番号：58）、ER193（配列番号：59）、ER194（配列番号：60）、ER195（配列番号：61）、ER196（配列番号：62）、ER203（配列番号：63）、ER204（配列番号：64）、ER207（配列番号：67）、ER208（配列番号：68）、ER213（配列番号：69）、ER228（配列番号：72）、RA133（配列番号：77）、RA134（配列番号：78）およびRA171（配列番号：82）が含まれた。

30

40

【0201】

L. イントラセルラリスゲノム領域Bのヌクレオチド配列を配列番号：2に挙げる。この領域内にコードされるPonA、HtrA、HypCおよびORF1タンパク質の推定上のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8および配列番

50

号：9に示す。

【0202】

領域Bによって規定されるL. イントラセルラリス遺伝子および遺伝子産物の分子分析
f l g E遺伝子の下流で確認されたL. イントラセルラリス染色体領域Bは、P o n A
、H t r A、H y p C、および部分“O R F 1”タンパク質と称されるタンパク質をコード
している(図1)。f l g E O R Fの一部は、ここで与えられ、ヌクレオチド1～
1 2 5から伸長する(配列番号：2)。p o n A O R Fは、配列番号：2のヌクレオチ
ド2 5 2～2 6 9 0から伸長し、約90, 2 6 3ダルトンの理論分子量を有する推定上の
8 1 2アミノ酸タンパク質P o n A(配列番号：6)をコードしている。別のインフ
レーム翻訳開始コドンは、ヌクレオチド2 7 6に存在し、それは、用いられる場合、約89,
3 1 3ダルトンの理論分子量を有する僅かに小さい8 0 4アミノ酸タンパク質をコードす
ると考えられる。h t r A O R Fは、配列番号：2のヌクレオチド2 9 8 1～4 3 1 5
から伸長し、約50, 4 7 8ダルトンの理論分子量を有する推定上の4 7 4アミノ酸タン
パク質H t r A(配列番号：7)をコードしている。小さいh y p C O R Fは、配列番
号：2のヌクレオチド4 5 8 1～4 8 2 9から伸長し、約8, 8 8 8ダルトンの理論分子
量を有する推定上の8 2アミノ酸タンパク質H y p C(配列番号：8)をコードしている
。更に下流で且つ反対の配向で転写されるのは、更に別の読み取り枠である。このO R F
は“o r f 1”と称されたが、配列番号：2の3'末端のヌクレオチド4 9 1 2～5 4 4
5から伸長する。このO R Fは、配列番号：2の3'末端によってオープンの状態のまま
であり、したがって、約20, 3 4 5ダルトンの理論分子量を有する切断されたタンパク
質のC末端の1 7 7アミノ酸をコードしている。図8に示されるように、コードされるO
R F 1タンパク質(配列番号：9)は、メタノコッカス・ヤナシイ(Methanococcus jann
aschii)ゲノムからの遺伝子“M J 1 1 2 3”(A c c n. U 6 7 5 5 5)によってコード
される2 0 5アミノ酸の仮定のタンパク質と一定の相同性を有する。

10

20

【0203】

L. イントラセルラリスH y p Cタンパク質のヒドロゲナーゼ成熟タンパク質との類似
性

H y p Cタンパク質は、ヒドロゲナーゼ成熟タンパク質のh y p / h u pファミリーと
の相同性を有する。ヒドロゲナーゼは、分子水素の可逆酸化を触媒し、水素が酸化される
または生じる多数の適切な嫌気性過程に関与している(Adams, M.W.W., ら, 1990, Bioche
m. Biophys. Acta 594:105-176)。H y p Cタンパク質は、大腸菌における触媒活性なヒド
ロゲナーゼイソ酵素の成熟に必要である。この過程におけるH y p Cの正確な役割はまだ
知られていないが、ヒドロゲナーゼ成熟は、ニッケル挿入、タンパク質折りたたみ、C末
端タンパク質分解プロセッシング、膜組込みおよび還元的活性化を伴う(Lutz, S., ら, 199
1, Mol. Microbiol. 5:123-135; Przybyla, A.E., ら, 1992, FEMS Microbiol. Rev. 88:109
-136)。H y p Cタンパク質は、デスルフォビブリオ・ギガス8 2アミノ酸H y n Dタン
パク質(A c c n. A J 2 2 3 6 6 9, 図7に示される)に41%一致し、リゾビウム・
レグミノサルムからの7 5アミノ酸H y p Cタンパク質に39%一致する。

30

【0204】

L. イントラセルラリスP o n Aタンパク質のペニシリン結合タンパク質との類似性
p o n A O R Fは、約90, 2 6 3ダルトンの理論分子量を有する推定上の8 1 2ア
ミノ酸タンパク質をコードしている。別のインフレームメチオニンコドンが存在し、それ
は、約89, 3 1 3ダルトンの理論分子量を有する僅かに小さい8 0 4アミノ酸タンパク
質をコードしている。類似のインフレームメチオニンコドンは、他の特性決定されたp o
n A O R F中で確認されている。例えば、ナイセリア・フラベセンス(A c c n. A F
0 8 7 6 7 7)、淋菌(A c c n. U 7 2 8 7 6)および髄膜炎菌(A c c n. U 8 0 9
3 3)からのP o n A同族体は、それぞれ8個、6個および6個のコドンによって隔てら
れたアミノ末端インフレームメチオニンコドンを含有する。L. イントラセルラリスと同
様、ナイセリア類のp o n A遺伝子は、認識できないリボソーム結合部位が先行するので
、真の開始メチオニンの予測は更に複雑である。淋菌F A 1 9 P o n Aタンパク質のN

40

50

末端配列決定は、次のメチオニンが、この菌株における好ましい出発部位であることを示した (Ropp ら, 1997, J.Bacteriol. 179:2783-2787)。上流のメチオニンコドンは、L・イントラセルラリスからのコードされる P o n A タンパク質の推定上の開始部位として用いられた。

【0205】

P o n A タンパク質の構造予測は、T M P r e d を用いて行われた。その T M P r e d プログラムは、膜に広がる領域およびそれらの配向の予測を行う (K.Hofmann & W.Stoffel, 1993. TMbase- A database of membrane spanning proteins segments. Biol.Chem. Hoppe-Seyler 347:166)。この分析は、P o n A が、そのタンパク質の N H₂ 末端に強力な膜貫通ドメインを有することを示す。P o n A のアミノ末端は、既知のシグナル配列上で操作されるネットワークを用いる P S O R T (6. 4 バージョン) 計算機アルゴリズムによっても調べられた。この分析は、残基 16 ~ 32 が、切断できないシグナル配列 (D. J.McGeoch, Virus Research, 3:271,1985 および G.von Heijne, Nucl.Acids Res., 14:4683,1986) として作用すると考えられる膜貫通領域 (P.Klein ら, 1985, Biochim.Biophys.Acta, 815:468) を形成すると考えられることを示している。したがって、P o n A のアミノ末端は、細菌の内膜にタンパク質を固定すると考えられ、それは、他のペニシリン結合タンパク質の局在化の方法と似ている。

10

【0206】

P o n A タンパク質は、他の細菌で識別されるクラス A 高分子質量ペニシリン結合タンパク質 (P B P) との相同性を有する。ペニシリン結合タンパク質は、ペプチドグリカン合成の最終段階に関与する細菌の細胞質膜タンパク質である。それらクラス A タンパク質は、概して、グリカン鎖を重合するグリコシルトランスフェラーゼおよびこれら鎖をそれらのペプチド側鎖によって架橋するトランスペプチダーゼの 2 種類の酵素活性を示す。これらの反応は、細胞質膜の外表面でかまたは更に外側で触媒されるので、ペプチドグリカン合成に関与するタンパク質の主要部分は、ペリプラズム中に局在している。P o n A タンパク質の推定上のアミノ酸配列 (配列番号: 6) を、B L A S T p アルゴリズム (Altschul, S.F. ら, 1997, 上記) によって GenBank に報告された他のタンパク質と比較し、C L U S T A L W アルゴリズム (Thompson ら, 1994, 上記) によって整列させた。図 5 に示されるように、この分析は、P o n A が、ナイセリア・フラベセンス (A c c n. A F 0 8 7 6 7 7) からのペニシリン結合タンパク質に最も似ていることを示した。P o n A は、クラス A 高分子質量 P B P に特有の特徴を有する。アミノ酸 124 ~ 134 (R Q G G S T I T Q Q V) を含めた配列は、全てのクラス A 高分子質量 P B P 中で見出される Q G A S T ボックス (Popham ら, 1994, J.Bacteriol. 176:7197-7205) として知られる高度に保存される共通アミノ酸配列に相当する。P o n A の C 末端側の半分内に、ペニシロイルセリントランスフェラーゼスーパーファミリーの全メンバー中に高度に保存される三つの領域が見出されうる。これら領域には、残基 507 ~ 510 の活性部位セリンを含有する S X X K 四分子 (S A F K)、残基 565 ~ 567 の S X N 三分子 (S R N) および残基 688 ~ 691 の K T (S) G 四分子 (K T G) が含まれる。これらモチーフは、折りたたまれたタンパク質中で互いに近づけられて、β-ラクタム抗生物質と相互作用するトランスペプチダーゼドメイン活性部位ポケットを形成すると考えられる。

20

30

40

【0207】

L・イントラセルラリス H t r A タンパク質のペリプラズムセリンプロテアーゼタンパク質との類似性

H t r A のアミノ末端の検討は、アミノ酸 1 ~ 26 が疎水性であり且つ正に荷電していることを示し、それはシグナル配列の特徴を示している (von Heijm, 1985, J.Mol.Biol. 184:99-105)。既知のシグナル配列上で操作されるネットワークを用いる P S O R T 計算機アルゴリズム (Nakai, K., 1991, PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 11:95-110) は、残基 1 ~ 26 が典型的なシグナル配列として機能すると考えられることを示し、アミノ酸 26 と 27 との間の最も可能性のある切断部位を予測する。したがって、アミノ酸 1 ~ 26 は、成熟過程に H t r A から除去されると考えられる。

50

【0208】

H t r Aタンパク質の推定上のアミノ酸配列（配列番号：7）を、B L A S T pアルゴリズム（Altschul, S.F. ら, 1997, 上記）によって GenBank に報告された他の既知のタンパク質と比較し、C L U S T A L Wアルゴリズム（Thompson, J.D. ら, 1994, 上記）によって整列させた。この分析は、ペリプラズムセリンプロテアーゼの大きいH r t A / D e g Pファミリーに属するH t r Aを示した。報告されるタンパク質には、特に、大腸菌、ネズミチフス菌、カンピロバクター・ジジューニ（*Campylobacter jejuni*）、インフルエンザ菌、マルタ熱菌（*Brucella melitensis*）、ウシ流産菌（*Brucella abortus*）、トラコーマクラミジア（*Chlamydia trachomatis*）、エルジニア・エンテロコリチカ（*Yersinia enterocolitica*）、ボレリア・ブルグドルフェリ（*Borrelia burgdorferi*）および枯草菌（*Bacillus subtilis*）から識別されるものが含まれる。ある場合には、H t r A同族体は、熱ショックタンパク質と称され、高温での細菌の生存または細胞内病原体の生存に必要であることが欠失分析によって示されてきた。他の場合には、H t r A同族体は温度によって生じないが、他の生理学的ストレスに応答して発現される。いくつかのH t r A同族体は、セリンプロテアーゼ活性を有することが示されており、多くの場合、細菌ビルレンスおよび／または細胞内生存に、例えば、高温、過酸化水素、酸化および浸透圧ストレスへの耐性に重要である。

10

【0209】

L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質と緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）（A c c n. # U 3 2 8 5 3）からの最も類似した相対物との整列は、それら二つのタンパク質が、40%一致するアミノ酸残基を有することを示す（図6に示される）。L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質と他のセリンプロテアーゼとの整列に基づき、ヒスチジン-109、アスパラギン酸-143および活性部位セリン-217を含めた特に十分に保存される残基は、細菌および哺乳動物のセリンプロテアーゼ中に高度に保存される残基の触媒性三分子を形成すると考えられる。多数のH t r A同族体は、カルボキシル末端R G Dモチーフを含有するが、他はR G Nモチーフを含有することが示されている。L. イントラセルラリスH t r Aタンパク質は、残基458～460に類似のモチーフを含有する（R N G）。R G Dモチーフは、哺乳動物接着性タンパク質の細胞結合部位として識別されている（Ruoslahti, E. ら, 1986, Cell 44:517-518）。セリンプロテアーゼのH t r A / D e g Pファミリーは、一定範囲のストレス応答中におよびL. イントラセルラリスによる感染中に生じ、H t r Aの表面発現は、ストレス応答機序の一部として起こりうる。他の細胞内熱ショックタンパク質は、生理学的ストレス条件下で表面に発現された状態になることが示されており、接着性因子として関係している（Ensgraber, M. ら, 1992, Infect. Immun. 60:3072-3078 および Hartmann, E. ら, Infect. Immun. 65:1729-1733）。

20

30

【0210】

h t r Aプロモーター領域の分析および温度に応じた誘導

L. イントラセルラリス領域Aおよび領域Bの遺伝子配置は、それらのコードされるタンパク質の間の遺伝子間スペーシングの程度に関して異なる。領域Aとは異なり、領域B内のO R Fは、より遠く離れている。例えば、f l g E、p o n A、h t r Aおよびh y p C遺伝子は、それぞれの読み取り枠の間が約125、200および265ヌクレオチドによって隔てられている。h t r Aの直ぐ上流の200bp領域は、特に、いくつかのH t r Aタンパク質同族体が、温度、酸化および浸透圧ストレスを含めた多数の異なった環境シグナルに応じて生じることが分かって以来、プロモーター領域を見つけるためにより詳細に検討された。h t r Aの上流の配列番号：2のヌクレオチド配列の検討は、ヌクレオチド2797～2802（T T G A T A；-35領域）およびヌクレオチド2824～2829（T A T A A T；-10領域）にほぼ位置するプロモーターを示した。これら二つの六量体は、21ヌクレオチドスペースによって隔てられ、共通のσ70型プロモーターにほぼ完全な相同性を有する。他のプロモーター因子はこの領域中に存在することができ、種々の環境シグナルに応じてh t r A発現を調節する。プラスミドp E R 4 3 4は、

40

50

h t r A O R F および h t r A プロモーター領域を含有し、30℃または37℃で成長する大腸菌宿主細胞に温度依存性表現型を与える。したがって、h t r A の上流の領域は、温度に応じた可能性のある機能的プロモーターとして認識されうる。したがって、h t r A プロモーターを用いて、温度に応じて大腸菌および他の微生物における異種タンパクの発現を機能的に調節することは可能なはずである。他の環境因子に応じて発現を調節する他のプロモーター因子の存在は、それら他のシグナルを用いて発現を調節することを可能にすると考えられる。

【0211】

実施例3：プラスミドの製造および寄託材料

L. イントラセルラリス領域Aを包含するDNAフラグメント含有プラスミド

10

l y s S、y c f W、a b c 1 および o m p 1 0 0 遺伝子を示すL. イントラセルラリスゲノム領域を含有するプラスミドを製造した。l y s S 遺伝子と y c f W 遺伝子の一部分とを包含する2.6kbフラグメントを、プライマーE R 2 4 6（配列番号：97）およびE R 2 5 4（配列番号：98）を用いて増幅させ、y c f W 遺伝子の一部分および完全なa b c 1 遺伝子フラグメントを包含する0.87kbフラグメントを、プライマーE R 2 2 9（配列番号：73）およびE R 2 0 6（配列番号：66）を用いて増幅させた。これらフラグメントは、実施例1に記載のように、“L. イントラセルラリス領域Aを包含するサブゲノムDNAフラグメントの特異的PCR増幅”の下で増幅した。それら2.6kbおよび0.87kb DNAフラグメントを、スピנקロマトグラフィー（Q I A q u i c k^{T M}）を用いた抽出によって単離し、p C R 2.1 Topo のT A クローニング 20 部位中に挿入した。ベクター特異的配列決定用プライマーを用いた単純配列伸長反応は、クローン化されたフラグメントの端点を確認し、そしてプラスミドp T 0 6 8 中のL y s S およびY c f W 並びにプラスミドp E R 4 3 8 中のY c f W およびA B C 1 をコードしている遺伝子が、ラクトースプロモーターに相対して反対の配向にあることを示した。

【0212】

o m p 1 0 0 遺伝子を含有する2.97kb DNAフラグメントを、PCRによって特異的5'および3'プライマーE R 1 8 7（配列番号：54）およびE R 1 7 0（配列番号：42）を用いて増幅させた。PCR反応は、三重に行われ、50μlの最終試料容量中に鋳型としての1μl DNA抽出物、1x PCR Buffer II、1.5mM M g C l₂、各200μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5U 30 Am pli Taq Gold 熱安定性ポリメラーゼを含有した。増幅条件は、95°で9分間の変性後、33サイクルの変性（95°30秒間）、アニーリング（62°30秒間）および重合（72°3分間）から成った。72°で7分間の最終伸長は、標的遺伝子領域の増幅を完全にした。増幅後、三重の試料をそれぞれプールし、その特定の生産物を、スピנקロマトグラフィー（Q I A q u i c k^{T M}）を用いた抽出によって単離し、p C R 2.1 Topo のT A クローニング部位中に、ラクトースプロモーターに相対して反対の配向で挿入した。このプラスミド構築物をp E R 4 4 0 と称した。

【0213】

プラスミドp E R 4 3 8 およびp E R 4 4 0 を、大腸菌T O P 1 0 細胞（Invitrogen, カールズバット, CA）中に導入した。得られたP z 4 3 8 およびP z 4 4 0 と称される 40 菌株を、1999年9月9日にATCC（10801 University Blvd, マナッサス, VA, 20110, 米国）に寄託し、受託番号P T A - 6 3 8 およびP T A - 6 4 0 をそれぞれ付与された。プラスミドp T 0 6 8 を大腸菌T O P 1 0 細胞中に導入し、得られた菌株を2000年7月14日にATCCに寄託し、受託番号P T A - 2 2 3 2 を付与された。

【0214】

L. イントラセルラリス領域Bを包含するDNAフラグメント含有プラスミド

p o n A、h t r A およびh y p C 遺伝子を示すL. イントラセルラリスゲノム領域を含有するプラスミドを製造した。それらp o n A、h t r A およびh y p C 遺伝子フラグメントを、上の実施例2の“L. イントラセルラリス領域Bを包含するサブゲノムDNA 50

フラグメントの特異的PCR増幅”と題する項目に記載のように、p o n A 遺伝子に隣接するプライマーE R 2 2 8（配列番号：72）およびE R 1 9 0（配列番号：57）；h t r A 遺伝子に隣接するプライマーE R 2 0 7（配列番号：67）およびR A 1 3 4（配列番号：78）；およびh y p C 遺伝子に隣接するプライマーE R 1 8 9（配列番号：56）およびE R 1 9 6（配列番号：62）を用いて増幅させた。得られたp o n A 含有2.98 kbフラグメントを、J E T sorb^{T M} キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてp C R 2.1 Topo 中にクローン化してプラスミドp E R 4 3 2を生じた。得られたh t r A 含有1.72 kbフラグメントを、スピנקロマトグラフィー（Q I A q u i c k^{T M}）を用いた抽出によって単離し、p C R 2.1 Topo のT A クローニング部位中に挿入してプラスミドp E R 4 3 4を生じた。h y p C と、O R F 1 のC 末端の94アミノ酸をコードしている追加の隣接するヌクレオチドを含有する得られた0.98 kbフラグメントを、スピנקロマトグラフィー（Q I A q u i c k^{T M}）を用いた抽出によって単離し、p C R 2.1 Topo のT A クローニング部位中に挿入してプラスミドp E R 4 3 6を生じた。ベクター特異的配列決定用プライマーを用いた単純配列伸長反応は、クローン化されたフラグメントの端点を確認し、そしてP o n A およびH y p C をコードしている遺伝子が、ラクトースプロモーターに相対して反対の配向にあることを示した。H t r A 遺伝子を、ラクトースプロモーターに相対して同じ配向でクローン化した。このようなプラスミドを含有する細胞は、37℃で不安定な表現型を示し、それは、30℃で成長を維持した場合に軽減された。

10

20

【0215】

プラスミドp E R 4 3 2、p E R 4 3 4 およびp E R 4 3 6 を、大腸菌T O P 1 0 細胞（Invitrogen, カールズバット, C A）中に導入した。得られたP z 4 3 2、P z 4 3 4 およびP z 4 3 6 と称される菌株を、1999年9月9日にA T C C（10801 Univ ersity Blvd, マナッサス, V A, 20110, 米国）に寄託し、受託番号P T A - 6 3 5、P T A - 6 3 6 およびP T A - 6 3 7 をそれぞれ付与された。

【0216】

実施例4：組換え体H t r A およびO m p 1 0 0 タンパク質の大腸菌での発現

プラスミド発現ベクター

組換え体H t r A およびO m p 1 0 0 の製造に用いられる発現ベクターは、p E T - 2 8 b（+）（Novagen, Inc., マディソン, W I）であった。H t r A およびO m p 1 0 0 タンパク質のコーディング配列を、L. イントラセリリスに感染したブタ粘膜DNA抽出物から増幅させた。それらPCR産物を、J E T sorb^{T M} キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてp C R 2.1 Topo 中にクローン化して、プラスミドp R L 0 0 1（H t r A）およびp E R 4 1 5（O m p 1 0 0）を生じた。H t r A O R F を増幅させるのに用いられた特異的PCRプライマーには、E R 2 0 8（配列番号：68）およびR A 1 3 3（配列番号：77）が含まれた。プライマーE R 2 0 8 は、N d e I 部位（C A T A T G）を導入するように設計されたが、H t r A シグナル配列を欠失していた。p R L 0 0 1 中に存在するH t r A インサートを、N d e I およびE c o R I を用いた消化後、p E T - 2 8 b（+）中にサブクローン化した。得られたp E R 4 0 5 と称される発現プラスミドを、挿入されるフラグメントの5'および3'両末端において配列決定し、ベクターにコードされる6xH i s リーダーとのインフレーム融合をコードすることを確認した。したがって、コードされるタンパク質の推定のアミノ末端配列は、ベクターによってコードされる配列M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M、その直後の、H t r A 読み取り枠のアラニン-27で開始する配列A L P N F V P から成った。

30

40

【0217】

O m p 1 0 0 O R F を増幅させるのに用いられた特異的PCRプライマーには、E R 2 1 6（配列番号：70）およびR A 1 3 8（配列番号：79）が含まれた。プライマーE R 2 1 6 は、N c o I 部位（C C A T G G）を導入するように設計されたが、O m p 1 0 0 シグナル配列を欠失していた。更に、E R 2 1 6 は、本明細書中に援用される Sung

50

ら, 1986, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:561-565; Sung ら, 1987, Meth.Enzymol. 153: 385-389; および米国特許第 5, 460, 954 号からの情報に基づいて、組換え体タンパク質をタンパク質分解から保護する“保護ペプチド”と称されるリーダーペプチドを規定した。アミノ酸配列 M G T T T T T S L から成る保護ペプチドは、E R 2 1 6 の 5' 近位ヌクレオチド配列によってコードされた。p E R 4 1 5 中に存在する O m p 1 0 0 インサートを、N c o I および E c o R I を用いた消化後、p E T - 2 8 b (+) 中にサブクローン化した。得られた p R L 0 2 9 と称される発現プラスミドを、挿入されるフラグメントの 5' および 3' 両末端において配列決定し、保護ペプチドリーダーとのインフレーム融合をコードすることを確認した。したがって、コードされるタンパク質の推定のアミノ末端配列は、E R 2 1 6 の 5' 近位ヌクレオチド配列によって規定される配列 M G T T T T T S L、その直後の、O m p 1 0 0 読み取り枠のアラニン-26 で開始する配列 A S K D D P S I V から成った。 10

【0218】

組換え体タンパク質の発現

組換え体 H t r A および O m p 1 0 0 をそれぞれコードしている、p E T - 2 8 b (+) に基づく発現ベクター p E R 4 0 5 および p R L 0 2 9 を、発現宿主大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 中に導入した。この発現宿主は、I P T G 誘導ファージ T 7 プロモーターによって推進されるクローン化遺伝子の高レベル転写を可能にする遺伝子型 F⁻, o m p T h s d S_B (r_B⁻ m_B⁻) g a l d c m (D E 3) (Novagen, Inc.) を有する。それら大腸菌の形質転換細胞を、5 L BioFlow^{T M} 3 0 0 0 発酵槽 (New Brunswick Scientific, エディソン, N J) 中の 50 μg/ml 硫酸カナマイシンを含有する S B # 2 培地 (2.4% 酵母エキス, 1.2% トリプトン, 0.5% K₂HPO₄, 0.25% KH₂PO₄, 0.14% MgSO₄) 中において 30~37℃で、A₆₂₅ が 2.5~30.1 になるまで増殖させた。組換え体タンパク質発現は、1 mM I P T G を用いた 1~4.5 時間の誘導後に得られた。 20

【0219】

組換え体 H t r A を発現する大腸菌の湿潤細胞を、10,000 p s i (2 工程) でのホモジナイゼーションによって溶解させた後、遠心分離した。そのペレットは H t r A を含有し、それを、5:4 比である 2 x R I P A / T E T を用いて洗浄した。2 x R I P A は、20 mM トリス (pH 7.4)、0.3 M N a C l、2.0% デオキシコール酸ナトリウムおよび 2% (v/v) Igepal C A - 6 3 0^{T M} (Sigma) である。T E T は、0.1 M トリス (pH 8.0)、50 mM E D T A および 2% (v/v) トリトン X-100 である。次に、洗浄したペレットを、8 M 尿素、10 mM トリス、0.1 M N a H₂ P O₄、pH 7.0 中に溶解させた。溶解したタンパク質を、8 M 尿素、10 mM トリス、0.1 M N a H₂ P O₄、pH 7.0 中で 2 倍に希釈し、N i N T A カラム (Q I A G E N, サンタ・クラリタ, C A) 上に加えた。所望のタンパク質を、このカラムから、8 M 尿素、10 mM トリス、0.1 M N a H₂ P O₄、pH 4.5 への pH の減少によって溶出させた。最後にプールされた画分を、4 M グアニジン H C l、50 mM トリス、pH 6.5 に対して透析し、次の工程では、2 M グアニジン H C l、25 mM トリス、pH 6.5 に透析した。最終生成物を、0.22 μM 濾過によって濾過した。タンパク質濃度は、S D S - P A G E による 70% の推定目視純度で 0.56 mg/ml であった。 30

【0220】

組換え体 O m p 1 0 0 を発現する大腸菌の湿潤細胞を、D N A 分解を容易にするために、リゾチーム、および Benzonase^{T M} (Benzonase^{T M} (E M Industries, Inc., ホーソーン, ニューヨーク)) の存在下の音波処理を用いて溶解させた後、遠心分離した。そのペレットは O m p 1 0 0 を含有し、それを、2 M 尿素、50 mM トリス、10 mM E D T A、25 mM D T T、1% Zwittergent 3-14 を用いて 2 回洗浄した。そのペレットを、6 M 尿素、50 mM トリス (pH 8.0) を用いて再懸濁させた後、遠心分離した。そのペレットを、5:4 比である 2 x R I P A / T E T を用いて洗浄し、次に、その 40 50

洗浄されたペレットを、8 M尿素、50 mMトリス (pH 8.0) 中に溶解させた。25 mM DTTをその溶解したタンパク質に加え、8 M尿素、25 mM DTT、50 mMトリス (pH 8.0) を用いて2:1に更に希釈した。希釈された溶解タンパク質を、8 M尿素、25 mM DTT、50 mMトリス (pH 8.0) を用いて平衡されたQ-セファロースカラム上加えた。組換え体Omp 100は、8 M尿素、25 mM DTT、50 mMトリス (pH 8.0) 中の0~1 M NaClの直線勾配で溶離した。プールされた画分を、6 MグアニジンHCl、10 mM DTT、50 mMトリス (pH 8.0) に対して透析し、次の工程では、4 MグアニジンHCl、6.7 mM DTT、33.3 mMトリス (pH 8.0) に透析した。最終生成物を、0.22 μ M濾過によって濾過し、-70℃で凍結させた。次に、精製されたOmp 100タンパク質を融解させ、遠心分離し (16,000 rpm, 60分間)、そしてその上澄みに再度0.22 μ M濾過を施して、不溶性粒子および凝集物を除去した。タンパク質濃度は、SDS-PAGEによる80%の推定目視純度で1.08 mg/mlであった。

10

【図面の簡単な説明】

【0221】

【図1】図1は、Lys S、Ycf W、ABC 1およびOmp 100タンパク質をコードしている遺伝子を含む遺伝子クラスターAの配列、およびPon A、Htr AおよびHyp Cタンパク質をコードしている遺伝子クラスターBの配列を示す。

【図2】図2は、Ycf Wアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

20

【図3】図3は、ABC 1アミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図4】図4は、Omp 100アミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図5】図5は、Pon Aアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図6】図6は、Htr Aアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

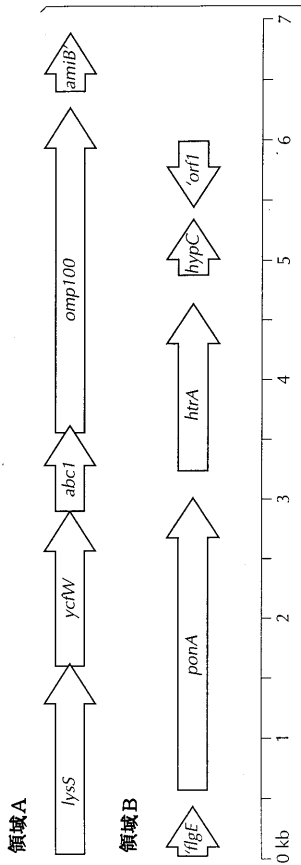
【図7】図7は、Hyp Cアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

30

【図8】図8は、Orf 1アミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図9】図9は、Lys Sアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図 1】



【図 2】

Li_Ycwf	--MKFELFIATHLYHLFAARRKQAFYILISLMSLTGVAIGVASLVVLGVNGFYTFIDIRKI	57
AJ235272	MINNPFSPNIAIFRYTRAKNEKFVSIIAASFSLVGVMIGVAAIVMVSVMNGPHLELTKYMI	60
	:*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	LGNAHIIITGNPDSPIHEPTFSQLSTSMSSQNALILNKTLQQTSAIIGATPPVIYAEC	117
AJ235272	IGLNGDIVINRQCEN-----IDNYEEIKTLLKQDYVHKHVTYIAHGQAALAGK-----	158
	:*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	MISSPHGVKGLILRGDIPPSAQNVIMLSHLTKGNLEDLPVKVLTPDGIIIGNELAQRLL	177
AJ235272	--SNN--SGVLVKGIKLNDLSRWGIFPKVNWFGSDPNFHGKN-----IALGEQASLN	158
	:*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	NVTIGSRVNLNSPTQGTSSGGFPRIPLIVTGIFWTGMFEYDTSLAFTSLNAARELLGL	237
AJ235272	GVTVGKRLRLISNSVSTAGSGIPRSKEEQIITAIINSMGMYDLDLTILMPUTAAGNFLSL	218
	:*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	PHYTTISGIEVSIHDVYQANYITNQLQQELGHNFVSRWMDMNANLFAALKLEKIGMFILL	297
AJ235272	G-NDNISINSULDDQQTATYSYIKQSLLGPLVFNWKTKLNSQFLSALAVERMTAMFTLI	277
	:*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	AMVVLIGSSSFVITLMVMEKTRDAILTSMGATSQMIRRIFFILQGTIIIGVLTGLYL	357
AJ235272	SLLITVAEINIIISNLFMVXDKTSDAILRTKMGASTQKTIVTYIFYNGMF IGLGLTGLVI	337
	:*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	LGITLALLLKQKY-----FIKLPGGVTTIDHLPVLLNWLDIFIIGTSAMLKCFPATL	409
AJ235272	LGVTFSYNIQTIKNYLERITGKIFEAAYFLSYLSPEKVYTDDOIILTSLSILCLPATI	397
	*: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *	
Li_Ycwf	YPAHQAARQLPIEGRLYE 427	
AJ235272	YPSYRASKLNPVDALRE 415	
	::: ::::: ::::: :::::	

【図 3】

Li_ABC1	MSOYLENIVKQYDSESPBICVYLHKINLSIAHGESLALIGASGSKTLLHILGALDIPS	60
AE0000212	---MOCNDLCKRYQBGSVQTDVLHNVSPVSGEGEMALVSGSGSKTLLHILGGLDTPPT	57
	*:	
Li_ABC1	SGTVLFFNNKNLSHMGPNPKACFRNKLKLGIFQFHNLILPEFSAENVAMKALIAGIPKKA	120
AE0000212	SGDVFNGQPMKLSAAKALRNQKLGFIQFHLLIPDFDTALLENVAMPLLIGKPKPAEI	117
	**:	
Li_ABC1	LLAREALSGVLENNKYHHRTITMLSGGRQORVATALLPEOVVLADEPTGNLDQKTGE	180
AE0000212	NSRALEMLKAVGLDHRANHRSELSSGGRQORVATARALVNNPRLVLADEPTGNLDARNAD	177
	*:	
Li_ABC1	HTANLLISUNKTFTNITLIVVTHNNDIAHSMGRCLSELKSGDLHDKTPEVISTVTVV	235
AE0000212	SIFQLLGEINRLQGTAFVLVWTHDLQAKRMGRQLEMRDGRVATLSLNGAE----	228

【図 4】

Li_Omp100 U70214	MTKRLNIFLLLLLNCILYCNITANAASKDDPSIVLVPFQINGSSNDEELQTELPMLLATA	60
Li_Omp100 U70214	LANKGRFVPIPKNSALNLLYQKNSIQWLSITAKKVAQQLHADYVYVGSFNQTGFENFSIDSR	120
Li_Omp100 U70214	LIDSTGVASARPLYIEKPPKNFELNIAVTELAERISNGLIKKINTADVIRHGLKVLDPDVI	180
	-----MAMKLLLSLFFSSATVYG-AEGFVKDIFHFGELQKRAVGAAG	42
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	LTLRTINKGDTHDKHINAEIKWIELVYSFSDVASIEESGBGRLLVTPYEKPKITLV	240
	LSMSPVPTGDSVDEDSINTIRALPAGFEDVRVLAD-----GTLTLVQKPTERTIASIT	98
	: : : : : * : : : : *	
Li_Omp100 U70214	VQGSKAVSINDILAAAMSS--KGSVISDRLLSQDIQK-TDLYKRGKYLYAEVNYEIKK	297
	PSNGSKVKDMLKQLBASGVRVGESLDRITADIEKLEGFVYVSGKYSASVKAVVTPFL	158
	: : : : : * : : : : *	
Li_Omp100 U70214	ENTSSATLLLVMEBKKKLYIKDVRIGLETIKAKTLAKELATERNFLSFTPTGQ-VLR	355
	P-RNRVDLKLVFQSGSAEQIINIVNGHASTGDELISHQL--RDEVPMWNVGDRKYQ	215
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	EYKLESDTATSAAYAMNHGVTDIQAPEPTFVN--EGKIVITFRVKEGKKRYKIGIKDFKG	413
	KKLAGDLETRISYLDRGYARFNDGTSQSLTPDKKGIYVTVNTFGDQYKLSGVBGVS	275
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	DLIETNQLLLVTKIDDKHXYQYFSLSVMGDQVKALTDVSDGVGYAFAEVDLETTKNEE	473
	NLAGHSAIEQLTKIEPGE-LYNGTKVTMKEDDIKLLG--RGYGVPFRVQSPMEINDA	331
	: : : : : * : : : : *	
Li_Omp100 U70214	DATAIDTVLIDDKQYFLRRIIEGNTNRDNLVIRELLRGLADGNDLHRLSRNECLNR	533
	DKTVKLVRVINDAGNKGRIYKIFBEGNDSKADVILREMRQMEGAWLPSGVQKGLRAN	391
	: : : : : * : : : : *	
Li_Omp100 U70214	LGYPNQVDTDTPLT-KGDDEVDLLAKVQEARTGATGGVGYSTHSGKFGVSGSISERNLNG	592
	LGCFETVDTDTQVRGSPGDQVVUYKVKERTNGSFNFGIGYTESGVSFQAGVQDMLG	451
	: : : : : * : : : : *	
Li_Omp100 U70214	KGYILSTEGFISKSSSLLDSPTNP--RYVDTDFG--FSNNIYTRDEWDPRFKTYGD	647
	TGYAVINGTNDNQTYAELSVTNPYTDVGSVSGGLRFLYNDQDADLSDYTNKSYGT	511
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	TLIRLPHPIGEYNSIRLVRIDQYRLYDI--PSTAPYSILDSQGNKNSVSVSGS--	700
	DTVLGFLIENYSSIRLVRIGYVINDSNLMPQVAMRYLYMCGHEPSTDSNSGSKTDDPT	571
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	FDSTDSRREPSPKGHIAK--LIVEYGGGGLGNDN-FPKPIAEQGYFYSIRSKSNHIIHW	756
	FNYGVTYNKLDRGYVPTDGSRVNLTKVTIPGSDNEYKYVLTDTATVPYIPDDHGWVLG	631
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	RTRGAAYANSKKPVPVDFRPIGGISDRVGTQEDLAPK-----DP-----	798
	RTRWGYSGLDGKGLGKGVYFVAGSSSTIRGCTFISYKPAVYFPHQASNYDPDYDYCA	691
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	-----RFGDEIGGRMAFLNLEYIWTP-----QPELGLAVPFYDIGPQTSVQTS	844
	TQDGAKDLCKSDDAVAGNMAVASLEITPTPIISDKYANSVRVSPFMDQVTDWTDWDS	751
	: : : : : *	
Li_Omp100 U70214	NRPS-----KLQSYGLELRSPMGDLRFAYGIPLNKNVSGKTKRGFGFSPMGOF	895
	SYQSYGPDYSDPSNIRSMAGIALQMSPLGLPVSYAGPKPKYGDGX--AQQPFNIGKT	809
	: : : : : * : : : : *	
Li_Omp100 U70214	F 896	
	W 810	

```

Li_ORF1
U67555 -----MNVFDKAAEYDKWFDENEIIYKSEIALKRHI PKRGLEITGVGTGRFAPFNKIGVDI 60

Li_ORF1
U67555 -----EFQI G ALDDL PDESFNYASIVLTILEVEDPKILAEAFVASDG- 46
SKEMAKIAEKRGIKVIITAKGDELPFKDEEFDFFLINTVLEFAENPKMIIEAKRVLKRG 120
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

Li_ORF1
U67555 -----IIIVGTNKKWSINHINSTLQLLHKPKKDSQWSPWQLFELTQLYPECRIYCRSTILG 105
KIIGTIDRDSFLGMYEKKQKSK-PYKDANFUSAKIEVIMLKELG-----FKN 169
***: : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Li_ORF1
U67555 -----PKRTWDVTSWSKLNRLILSTPGI--TYVGMRIEKRPKPTITPLLKAKQAVNVYNALS 153
IKATQTIFKEIDKVDKVEKYGEGGFVAISAKFI----- 205

```

【配列表】
2004229667000001.app




LIQKKSHPIKATKSPHVSFKYFELLESIAEKNELVNKCVCSCELDGSIPYD 60
 -----MSHEBNDLVRREKLUKKEELGVDPFGK 30

EFVKEHVAGMLRAFEYASASELESIDEIACAGRIISLRSFGKVIPIHMDSSGICQY 120
 RPERTHKAEELPELYGDLKSEBLEQVEVAVAGRTWTRGMKGAGAFHQDVTQYQIY 90

ASRENNGEAPSPKFKEDIDTGVNGKLPRTXGELTLNCSTITLLAKSFLSPKING 180
 VRQDDVGOQYELFKISDGDIVUGVGTMTKVGKLSYSSVYFETLKALRPEPPKING 150

LUNIELVRORYIDLINVKPTDIPRKSIIHEIRAFLENGFLEVETPILOIPGGAM 240
 LKDIQORQRYLIDLINPESKNTITRSLISOMRYLDSHYLEVEETPMHAVAGAA 210

ARPFTHNAMDWTLYRATAPELYKLRLVGGPEKFLNLSRFRNEGISLOHNPEFTMCE 300
 ARPFTTHNALDMTLYRATALEHKLRLVGGLEKVEYIGRVFRNEGISLRHNPEFTMLE 270

FWYAVATYLDMLTEEMFAYTKKICGWTWISYQGNWTDITPFGTWQKYTHFSLEKIG 360
 LYEAADFIDMLKUTENLJAHATEVJTKIKYQGBHVDLPP--EMRRLHWAIDAEYVG 329

HSPFYNNEFKVSEYKEHGEKVLTTDKIGKLOAKULFDJVDENKLIQPTFIYHYPTDISP 420
 VDFWRQSDSEARLAKEHGVAVPHMTFGHIVNEFPQKVEBKLIQPTFIYGHVEISP 389

LSKKNKNPEVTRDFELFIAGKEIANAFSELNPDIDORLRFQEOVLEKARDEACPMDE 480
 LAKKNPDPTDFELFTVGRHEANAFTEINPDIDORQFFQEKERQENDEAHMED 449

DYLRALGYMPPAAGEGIDIRLVMLLTDSPSIREVILFPLLRTER 526
 DFLALEYGMPPTGGIGVDSRLVMLLTNPSFSDVLLFPQMRHK-- 494

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 イヴレット・リー・ロージー

アメリカ合衆国コネチカット州06340, グロトン, イースタン・ポイント・ロード, ファイザー・セントラル・リサーチ

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA06 EA04 HA03
 4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CE11 CE12 DA01
 4B065 AA01Y AA26X AB01 BA02 BB03 BB19 BB29 BB37 BC03 CA24
 CA44
 4C085 AA03 BA20 DD62
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA86 EA20 FA74 GA23 GA26