

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4718174号
(P4718174)

(45) 発行日 平成23年7月6日(2011.7.6)

(24) 登録日 平成23年4月8日(2011.4.8)

(51) Int.Cl.	F I
C O 8 B 37/00 (2006.01)	C O 8 B 37/00 P
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 R
	A 6 1 P 31/04

請求項の数 2 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2004-525093 (P2004-525093)	(73) 特許権者	302046528
(86) (22) 出願日	平成15年7月30日 (2003.7.30)		ナショナル・リサーチ・カウンシル・オブ ・カナダ
(65) 公表番号	特表2005-534752 (P2005-534752A)		カナダ国、ケイ1エイ・Oアール6 オン タリオ州、オタワ、モントリオール・ロー ド 1200
(43) 公表日	平成17年11月17日 (2005.11.17)	(74) 代理人	100108855
(86) 国際出願番号	PCT/CA2003/001156		弁理士 蔵田 昌俊
(87) 国際公開番号	W02004/013151	(74) 代理人	100091351
(87) 国際公開日	平成16年2月12日 (2004.2.12)		弁理士 河野 哲
審査請求日	平成18年7月19日 (2006.7.19)	(74) 代理人	100088683
(31) 優先権主張番号	60/399,735		弁理士 中村 誠
(32) 優先日	平成14年8月1日 (2002.8.1)	(74) 代理人	100109830
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福原 淑弘
前置審査			
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 カンピロバクターグリカンおよびグリコペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 $\text{GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-1,3]GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,3-Bac}$ の七糖類であって、

前記 Bac は、2,4-ジアセトアミド-2,4,6-トリデオキシ-D-グルコピラノースである七糖類。

【請求項2】

アスパラギンと連結された、請求項1記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学的に活性な糖タンパク質 (glycoproteins) および糖タンパク質のグリカン部分 (glycan moieties)、同様にカンピロバクター細菌 (campylobacter bacteria) との戦い (combating) に有用なワクチン、抗体、および抗体フラグメントの分野に関する。

【発明の背景】

【0002】

カンピロバクターは、家禽 (poultry) を含む家畜生産品 (livestock products) における重大な食品媒介病原体 (food borne path

ogen)である。従って、ヒトにおける、その有害な影響と戦うための戦略を提供することが望まれる。これらの病原体を家畜(livestock)から排除することを、ヒトにおける感染の発生率を減少させ、影響される農場動物(farm animals)における病気(disease)を減少させる手段として利用することができる。グリコシル化タンパク質および特にこれらの化合物の特定のグリカン部分は、免疫戦略(immunologic strategies)に対する生きた標的(viable targets)を提示(represent)し、これにより家畜中のこれらの生物体の存在を減少させる又は排除(eliminate)する。このことは、動物生産物(animal products)を摂食すること(eating)又は操作すること(handling)からヒトが汚染するリスク並びに家畜の肥料(manure)からの細菌の糞便発散(fecal shedding)による汚染のリスクを減少させるために実施される。また、糖タンパク質及びそれらのフラグメント(例えば、グリカン部分)は、ワクチンおよび抗体調製(カンピロバクター感染を標的とする)のための基礎(a basis)を提供し得る。

10

タンパク質糖鎖形成(protein glycosylation)を研究するための、一般的な適用を有している研究道具を提供することも望ましい。タンパク質の糖鎖形成は、真核生物に固有の(specifically)現象であると考えられたが、しかし古細菌(Archaea)および真正細菌(Eubacteria)のドメイン(1, 2)の双方に広く存在していることが現在明かとなっている。

N-およびO-型両方のグリコシド結合(Glycosidic linkages)は、原核生物の多様なグループにおいて同定されており、古細菌において明らかなN連結型糖(N-linked sugars)が優勢(preponderance)である。しかし、これまで真正細菌において同定された糖タンパク質においてはO型の結合単位(linkage units)が優位(predominate)である(1, 2)。加えて、細菌性のN-およびO-結合は、真核生物性の糖タンパク質において観察されたものよりも、広い範囲の糖を形成する。

20

本発明者らは、次のことを発見した。それは即ち、特定のグリコペプチド(glycopeptides)およびグリカン部分が、複数の株のカンピロバクター菌に対するワクチンおよび抗体に対する効果的な基礎を形成することである。このことは、複数の株および種を横断する不変(invariant)(又はほとんど不変の)の形態において、これらの細菌の表面にそれらが遍在性に存在することによる。また、このグリカンは、カンピロバクターの複数の表面糖タンパク質のコンポーネントとして存在し、それゆえに免疫的な標的としての、その価値が増強される。

30

最近、特定の遺伝子座位が、腸内の病原体カンピロバクター ジェジュニ(Campylobacter jejuni)において同定された(これは複数のタンパク質の糖鎖形成に関与していると思われる)。このことにより、グラム陰性菌(gram-negative bacterium)において、広範囲に広がったタンパク質糖鎖形成に関する経路の最初の証拠が提供された(3)。pgl(protein glycosylationに対する)と称される本座位内の遺伝子の突然変異誘発(Mutagenesis)により、複数のタンパク質における免疫原性(immunogenicity)の欠損(loss)が生じた。これらのタンパク質のグリカン部分(glycan moieties)が、実験的に感染させたヒトのボランティアから採取した抗血清により認識されたことも示された(3)。pgl突然変異によるグリカン部分の除去により、減少した接着(adherence)および浸潤(invasion)をインビトロで並びにマウスコロニー形成(mouse colonization)の欠損をインビボで生じ(4)、このことはタンパク質糖鎖形成が、この生物体のビルレンス特性(virulence properties)に影響することを示唆している。

40

本発明者等は、C.jejuni株(NCTC 11168)のタンパク質の翻訳後修飾を同定し、特性を調査した。この株に関する、全ゲノム配列はParkhill等により記載された(6)。

50

2 Dゲル上で複数のスポットを生じるタンパク質のなかに、P E B 3 (またはC j 0 2 8 9 c)が存在し、これはC . j e j u n iの主要な抗原性タンパク質 (a n t i g e n i c p r o t e i n) であり、P e i 等により最初に記載された (7) 。

1 D S D S - P A G E により精製および分析した際に、2つのバンド (- 1 5 0 0 D aの質量差) が現れ、その双方は標準的なP E B 3 (a u t h e n t i c P E B 3) に対応するN末端配列を有していた。我々のP E B 3における観察と同時 (C o n c u r r e n t) にL i n t o n ら (8) は、2つの推定上の糖タンパク質をC . j e j u n i からG a l N A c 特異的なレクチン (ダイズ凝集素) を使用して同定した。そのうちの一方はP E B 3であり、他方は推定上のペリプラスムタンパク質 (p u t a t i v e p e r i p l a s m i c p r o t e i n) C j 1 6 7 0 c であった (彼らはC g p A と命名した) 。また、前記著者は、いくつかの他の推定上の糖タンパク質を観察したが (前記レクチンと結合する彼らの能力に基づいて) 、これらは同定されなかった。さらにまた、前記レクチンへのタンパク質結合は、p g l 座位中の遺伝子の突然変異誘発 (m u t a g e n e s i s) によっても影響された。加えて、我々は遺伝子p g l B の突然変異を示した。これのS a c c h a r o m y c e s c e r e v i s a e のN連結型オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (N - l i n k e d o l i g o s a c c h a r y l t r a n s f e r a s e) のS T T 3 サブユニットに対する相同性 (h o m o l o g y) は、糖タンパク質生合成に役割を有すること (3 , 9) 、同定された糖タンパク質の糖鎖形成に特異的に影響することを示唆している。

そのうえ、炭水化物 (c a r b o h y d r a t e s) は、生命の全てのドメイン (d o m a i n s) において様々な機能と結び付けられる。一般的には、細菌株と関連する種との間の、抗原性表面グリカン (a n t i g e n i c s u r f a c e g l y c a n s) における糖タンパク質及びそれらのグリカン部分の変動 (v a r i a n c e) は高い水準で存在するが、このことは常に事実であるわけではない。また、このような例外により、細菌を排除するための抗体またはワクチンに基づく戦略に適切な優れた候補者が提示される。特に、係る炭水化物の1つは、カンピロバクター糖タンパク質のグリカン部分 (g l y c a n m o i e t y) である。重要な食品媒介病原体 カンピロバクター ジェジュニのグリコム (g l y c o m e) を特徴付けるための我々の最近の努力は、全ての表面グリカン構造、即ち、リポオリゴ糖 (L O S ; l i p o o l i g o s a c c h a r i d e) 、莢膜多糖類 (C P S ; c a p s u l a r p o l y s a c c h a r i d e) 、N連結型グリカン、およびO連結型グリカンの解明へと向けられた (5 , 1 2 - 1 5) 。

【 0 0 0 3 】

本発明者らは、次の事項を示した。その事項とは、本明細書において記載される七糖類 (h e p t a s a c c h a r i d e) が、少なくとも数種のカンピロバクター種および多数の株 (ヒトおよび獣医学上の病原体として重要な種を含む) に共通であること、複数の糖タンパク質 (C j n o s . 0 1 1 4 , 0 2 0 0 c , 0 2 8 9 c , 0 3 6 7 c および他のものを含む) のコンポーネントであることである。このグリカン部分は強い免疫原性がある。そのようなものとして、このグリカン (および関連するフラグメントおよびグリコペプチド) は、カンピロバクターの複数の株および種に対する能動免疫のためのワクチンとして及びヒトにおける又は家畜におけるカンピロバクターのターゲッティングに適切な抗体または抗体フラグメントに関する基礎 (b a s i s) としての使用に関する良好な候補である。

本明細書中で使用される「家畜 (l i v e s t o c k) 」は、哺乳動物および家禽 (p o u l t r y) を含む。

【発明の概要】

【 0 0 0 4 】

本発明の課題は、単離された状態或いはオリゴペプチド、アミノ酸および/または免疫原性の抱合体 (i m m u n o g e n i c c o n j u g a t e) と連結された状態の何れかで存在し得る、グリカン (g l y c a n) を提供することである。

1つの側面に基づいて、本発明は、式 I の七糖類を含む化合物を提供する： G a l N

Ac - a 1 , 4 - GalNAc - a 1 , 4 - [Glc - 1 , 3] GalNAc - a 1 , 4 - GalNAc - a 1 , 4 - GalNAc - a 1 , 3 - Bacであって、Bacは、2 , 4 - ジアセトアミド - 2 , 4 , 6 - トリデオキシ - D - グルコピラノース (2 , 4 - diacetamido - 2 , 4 , 6 - trideoxy - D - glucopyranose) である。また、式 I は、上記の化合物の免疫学的に活性なフラグメントを含む。「免疫学的に活性な (immunologically active) 」は、係るフラグメントがカンピロバクターに対するワクチンの活性なコンポーネントを含み得ること、或いは係る化合物に特異的に結合する及び同一物が投与された生物体においてカンピロバクターを中和する、抗体または抗体フラグメントを提供し得ることを意味する。これらのグリカン、単離した形態で提供し得る又は新規のグリコペプチドを形成するために、オリゴペプチドまたはアミノ酸と連結し得る。前記アミノ酸は、N - 連結型のグリコペプチドを形成するための、アスパラギンを具備してもよい。これらのグリカンまたはグリコペプチドは、グラム陰性菌から由来する又は単離および精製されたものであってもよい。この糖タンパク質グリカン部分 (glycoprotein glycan moiety) は、治療上の調製物 (preparations) および方法 (以下に記載される) の基礎 (basis) を提供できる。

さらに別の側面に基づいて、本発明は、細菌性の糖タンパク質のグリカン部分を検出する方法を提供する、該方法は、前記サンプルを高分解能マジック角スピニング核磁気共鳴 (HR - MAS NMR) 分光法に供試することを含む。この方法により、グリカン部分 (その供給元を直接的に形成する) の検出を、前記タンパク質を精製する必要を伴うことなく可能にする。

更なる側面に基づいて、本発明は、式 I の七糖類および生理学的に許容される担体 (physiologically acceptable carrier) を含む、薬学的組成物を提供する。好ましくは、前記薬学的組成物は、前記グリカンもしくはグリコペプチド又はそのフラグメントに結合する、免疫原性の抱合体および/または免疫賦活薬 (immunostimulant) を更に含んでもよい。係る薬学的組成物は、カンピロバクター病原体により生じる病気に対して、ヒトまたは動物を免疫するためのワクチンとして有用である。係る病気は、例えば、胃腸の感染症 (gastro - intestinal infections) 、Guillain Barre GBSおよびミラーフィッシャー症候群 (Miller Fisher syndromes) 、関節炎 (arthritis) および菌血症 (bacteremia) である。係るワクチンは、1 以上の注射を介して又は別の医学的に許容される方法により、投与されてもよい。

別の側面に基づいて、本発明は、式 I のグリカン部分に相互作用し且つ特異的に結合する、抗体または抗原結合性の抗体フラグメントを提供する。係る抗体またはフラグメントは、動物またはヒトのレシピエント (recipient) に投与された場合、1 以上のカンピロバクター種を中和 (neutralize) するだろう。係る抗体は、多様な既知の方法により取得することができる；この方法には、上記の七糖類またはグリコペプチドで事前に (previously) 免疫した動物の血清から単離すること、或いは係る化合物に対する、マウスのモノクローナル抗体を調製することが含まれる。別の手段は、組換え DNA 技術を介するものであり；例えば、係る抗体または抗体フラグメントを、ラクダから以前に単離されたドメイン抗体 (「 dAb 」) 遺伝子のライブラリーセット (a library set) をクローニングすることにより取得し、そして次にバクテリオファージ ライブラリー中で発現させ、パニングし、そして次にバクテリオファージ中で、七糖類、グリコペプチド又はそのフラグメントに対して親和性を有する配列 dAbs (a sequence dAbs) を発現させることである。好適なラクダ (camelid) は、Camelus bactrianus、Camelus dromaderius、Lama pPaccos、Lama ggGlamaおよびLama vA alternatively から選択される；別の方法は、単一鎖抗体フラグメント (scFv) Vicugnaのバクテリオファージ ライブラリーをスクリーニングすることを伴う (involve) であろう。また、本発明は、上記の抗体又はその抗原結合性フ

10

20

30

40

50

ラグメント、および生理学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。係る薬学的組成物を、動物またはヒトにおける治療薬 (therapeutic agent) として使用できる。

適切な抗体フラグメントは、Fabフラグメント (ラクダ種は、軽鎖を含有しない独特な型の抗体を産生することが注目され、従来の用語 (例えば、「Fab」) は修正されるだろう) を含み、これには上記の技術により又は他の伝統的な技術により単離状態に調製され (prepared in isolation) 且つ抗体全体 (a whole antibody) に直接的に由来しない、フラグメントが含まれる。

更に別の側面に基づいて、本発明は、カンピロバクター細菌の存在を家畜において減少させる方法を提供する。前記方法は、家畜に、式Iのグリカン部分と相互作用する (interacts) 及び結合する (binds)、抗体または抗原結合性抗体フラグメントを投与することを含む。

【0005】

係る抗体は、十分な量で投与される場合、動物の系 (animal's system) からの全て又は実質的に全ての病原性のカンピロバクター生物体を中和し或いは細菌によるコロニー形成を阻止 (prevents) し、それによって前記動物を、動物生産物を摂食すること若しくは取り扱うこと又は動物廃棄物からの汚染を介することの何れかで感染したヒト (infecting humans) から防御する。投与は、家畜 (好ましくは、家禽) に、抗体または抗原結合性フラグメントを含有する、飼料または水を給餌すること (feeding) からなるものであってもよい。病原体を排除すること又はそれらの家畜における存在を減少させることは、前記病原体がヒト (該ヒトは、これらの病原体によって生じる病気から結果的に防御される) に到達することを阻止する方法 (a way of preventing) を構成する。従って、本発明は、ヒトにおけるカンピロバクター病原体により生じるカンピロバクター感染を阻止する方法を提供し、該方法は、前記病原体を家畜から除去することを含む (前記家畜に上記の抗体又はその抗原結合性フラグメントを配送することにより)。

前記抗体または抗体フラグメントは、動物飼料または水の何れかに添加し得る、或いは動物飼料植物 (an animal feed plant) の遺伝的な修飾 (これにより係る植物に前記抗体または抗体フラグメントを発現させる) の結果として存在するものであってもよい。

なお別の側面に基づいて、本発明は、ヒトまたは動物におけるカンピロバクター病原体により生じる病気を治療する方法を提供し、該方法は、上記で定義した抗体又はその抗原結合性フラグメントを前記ヒトへ投与することを含む。前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを、カンピロバクター病原体により生じる病気に関して、動物またはヒトを治療するための医薬 (medicament) の調製において使用できる。

別の側面に基づいて、本発明は、カンピロバクター病原体の地下水汚染 (ground water contamination) を阻止する方法を提供する。この汚染は、家畜による前記細菌の糞便発散 (fecal shedding)、引き続く水源 (water supply) への糞便物質 (fecal matter) の侵入 (entry) の結果として生じる。前記方法は、病原体の存在を家畜から排除すること又は減少させることを具備する (前記家畜に上記で規定した抗体又はその抗原結合性フラグメントを投与することによる)。

また、このことにより前記病原体がヒトに到達すること (reaching humans) を阻止する方法が構成され、その結果、彼らはこれらの病原体により生じる病気から防御される。

また、本発明の抗体および抗体フラグメントを診断上の道具として使用して、ヒトおよび動物における及び環境から採取された (drawn) サンプル (例えば、水または肥料のサンプル) における、カンピロバクターの存在を検出できる。

【発明の詳細記載】

【0006】

実施例は、本発明によるグリカン部分の単離 (i s o l a t i o n) および同定 (i d e n t i f i c a t i o n) を記載する。

一般的な実験手順

細菌株およびプラスミド：

C . j e j u n i N C T C 1 1 1 6 8 を、ミュラーヒントン寒天 (M u e l l e r H i n t o n a g a r) 上で微好気性 (m i c r o a e r o p h i l i c) の条件 (1 0 % C O ₂ 、 5 % O ₂ 、 8 5 % N ₂) 下で 3 7 °C で規定どおり成長させた。大腸菌 D H 1 0 B (インビトロゲン) をクローニング実験に関する宿主株として使用した。そしてクローンを L u r i a S - g a l 寒天 (シグマ) または M H 寒天で 3 7 °C で成長させた。適切な場合、抗生物質を次の最終濃度まで添加した、即ち： カナマイシン 3 0 μ g / m L およびアンピシリン 1 5 0 μ g / m L である。

10

プラスミド p P C R - S c r i p t A m p (ストラタジーン) をクローニングベクターとして使用した。

糖タンパク質抽出物の調製

一晩成長させた 2 つのプレートからの細胞を、 1 0 m L ミュラーヒントンブロスに再懸濁した、そして 1 リッターの M H 培養培地 (M H c u l t u r e m e d i u m) への接種に使用した。培養物を、微好気性条件下で 3 7 °C 、 2 4 h 、 1 5 0 r p m で振盪させて成長させた。 1 2 リッターの培養培地からの細菌細胞 (B a c t e r i a l c e l l s) を、遠心分離 (1 0 , 0 0 0 × g) を 1 5 m i n 処理して収穫し、そして即座に - 7 5 °C で凍結した。凍結した細胞ペレットを、氷上で 0 . 2 M グリシン H C l 緩衝剤 p H 2 . 2 (1 3) 中で融解し、そして 1 5 m i n 抽出した (穏やかに攪拌して) 。抽出物を、遠心分離 (1 0 , 0 0 0 × g) を 1 5 m i n することにより清澄 (c l a r i f i e d) し、純水 (M i l l i - Q システム、ミリポア社) に対して透析し、そして凍結乾燥した。

20

P E B 3 の精製および分析：

P E B 3 タンパク質を、グリシン抽出物を陽イオン交換クロマトグラフィーすることにより、均一 (h o m o g e n e i t y) に精製した (以前に記載の通り (7)) 。ファルマシア M o n o S H R 5 / 5 カラムを、A K T A エクスプローラー L C システム (アマシャムバイオサイエンス) に使用した。カラム溶出液を、UV 吸光度 (2 8 0 n m) に関してモニターした。そしてフラクション (f r a c t i o n s) を、M i n i P r o t e a n I I スラブゲル (バイオラドラボラトリーズ) 中で S D S - P A G E 分析 (2 1) により試験した。個々のタンパク質の N 末端シーケンシングを、S D S ゲルからプロブロット (P r o B l o t ^{T M}) P V D F 膜 (アプライドバイオシステム社) への転写に引き続き、モデル 4 9 1 プロサイズ (P r o c i s e) タンパク質配列決定システム (アプライドバイオシステム社) で実施した (L e G e n d r e 等の記載の通り) (2 2) 。

30

選択したフラクションのタンパク質分子量プロファイルを、エレクトロスプレーイオン化質量分析により決定した (アプライドバイオシステム / サイエックス Q スターハイブリッド四重極 飛行時間型質量分析計を用いて) 。

前記フラクションを、最初に頻繁に透析して塩を除去し、 3 0 % メタノール、 0 . 2 % ギ酸に対して調製した。溶液を 1 μ L / m i n の流速で流し、そしてスペクトルを m / z 6 0 0 > 2 0 0 0 の範囲で取得した。

40

【 0 0 0 7 】

トリプシンペプチド (t r y p t i c p e p t i d e s) の分析：

選択したフラクションを、修飾型トリプシン (プロメガ) を 5 0 m M アンモニウムバイカルボネート中で一晩 3 7 °C で消化し、Q - T O F 2 ハイブリッド四重極 飛行時間型質量分析計 (M i c r o m a s s) と連結したキャピラリー H P L C システム (C a p L C 、 ウォーターズ) を用いた、キャピラリー L C タンデム型質量分析により分析した。約 2 5 0 n g の各消化物を、 0 . 3 × 1 5 0 m m の P e p M a p C 1 8 キャピラリー L C カラム (D i o n e x / L C - P a c k i n g s) に注入し、そして勾配溶離 (5 - 9 0 % アセ

50

トニトリル、0.2%ギ酸を45分間で)により分離した。質量分析計をセットして、自動MS/MS獲得モードで実行した。そしてスペクトルを二重(doubly)、三重(triply)、および四重(quadruply)に荷電したイオンに関して獲得した。

トリプシン消化物(tryptic digest)のラージスケール分離を、4.6 mm x 250 mm Jupiter C18 LCカラム(Phenomenex Inc.)上で実施した。グリコペプチドを含有しているフラクションを、次に一定の流速(1 µL/min)でQ-TOF 2質量分析計のマイクロエレクトロスプレー界面へと注入した。グリコペプチドのフラグメンテーション(MS/MS分析の前の)を、フロントエンド衝突誘発解離(front-end collision-induced dissociation)により達成した(開口部電位を通常値40 Vから100 Vに増加させた)。この様式で産生された単一に荷電したフラグメントイオンに対するMS/MS衝突オフセットは、20-25 Vであった(参照のラボフレーム(lab frame))。Rademaker等(23)の方法による脱離実験(elimination experiments)に関して、グリコペプチド含有フラクションの約半分を蒸留して乾燥させて、そして25%水性アンモニウム水酸化物(25% aqueous ammonium hydroxide)に溶解した。前記溶液を、室温で一晩静置し、蒸留して乾燥させ(二回目の)、そして水中で再溶解させた。前記溶液を、次にインフュージョンMS(infusion-MS)で試験した(上記の通り)。

全糖タンパク質の精製および分析:

グリシン抽出物からの糖タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィーによりSBAレクチン/アガロース(シグマアルドリッチ社)上で分離した。凍結乾燥したグリシン抽出物を、PBS(100 mM塩化ナトリウム、50 mMリン酸ナトリウムpH 7.5)中に再溶解し、そしてSBA/アガロースカラム(事前にPBSで平衡化させた)を通過させた。前記カラムを10カラム容量のPBSで洗浄し、結合した糖タンパク質を0.1 M GalNAc(PBS中)で溶出した。糖タンパク質含有フラクション(Glycoprotein-containing fractions)を、プール(pooled)し、Milli-Q水に対して透析し、凍結乾燥した。

糖タンパク質を、SDS-PAGEにより12.5%の均質なポリアクリルアミドゲル上で分離した(21)。2D-PAGEを、pH 3-10、pH 4-7(バイオラドラボラトリーズ)またはpH 6-11(アマシャムバイオサイエンス)の何れかの固定化された直線状pHグラジエントを含有する、プレキャストIEFストリップを用いて実施した。タンパク質を、製造者の使用説明書にしたがってサンプル緩衝剤中に溶解し、そして等電点フォーカシング(プレキャストIEFストリップ上で)と、引き続くSDS-PAGE(均質な12.5%スラブゲル上、20 x 20 cm、二次元目に関して)とにより分離した。

ゲルを、バイオセーフ(Bio-Safe)コロイドG-250クーマシーブルー染色(バイオラドラボラトリーズ)または銀染色で染色した(23)。引き続くレクチンのプロービング(probing)に関して、前記ゲルを、PVDF膜上に50 Vで1時間、10 mM 3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸緩衝剤(pH 11、10%メタノール含有)中で電気プロット(electroblotted)した。前記膜をMilli-Q水中で洗浄し、そしてトリスで緩衝した(Tris-buffered)生理食塩水(100 mM塩化ナトリウム、50 mMトリスpH 7.5)に0.05% Tween 20を有するもの及び2%ブロッキング緩衝剤(ロシュ モレキュラー バイオケミカルズ)で、2時間室温でブロックした。

ブロッキング(blockage)後、転写物(blots)を、SBA-アルカリホスファターゼ抱合体(EY Laboratories Inc.)を10 µg/mLの濃度で上記ブロッキング溶液中に含有するもので、1時間室温で、更にインキュベートした。転写物を、トリス生理食塩水に0.05% Tween 20を添加したもので3回洗浄

10

20

30

40

50

し、そしてニトロブルーテトラゾリウム クロライド (NBT) および 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル リン酸 (BCIP) を 0.1 M 塩化ナトリウム、0.1 M トリス pH 9.5 (50 mM MgCl₂ を添加) 中に有する溶液を用いて発色させた。

2D - ゲルスポットの MS 分析:

タンパク質スポットを、切除し、1:1 比率の 30 mM フェリシアン化カリウムおよび 100 mM チオ硫酸ナトリウム (24) で脱染色した。ゲルスポット (gel spots) を、脱イオン水で頻繁に洗浄し、アセトニトリルで収縮させ、50 mM アンモニウムバイカルボネート (プロメガ修飾型トリプシン (10 ng / μ L) を含有する) で再膨潤 (re-swollen) させた。そして十分な 50 mM アンモニウムバイカルボネートをゲル片に添加してカバーした (典型的には 30 μ L)。

チューブを密封し、一晚 37 °C でインキュベーションした。消化液を除去し、ゲル片を 50 μ L の 5 % 酢酸で抽出し、次に 50 μ L の 5 % 酢酸 (50 % 水性メタノール中の) で抽出した。抽出液を、消化液と共にプールし、約 10 μ L に濃縮した。

強いタンパク質スポットからのペプチド抽出物を、MALDI - LR 質量分析計 (MicroMass) を用いた、MALDI - TOFMS で分析した。

約 0.5 μ L の MALDI マトリックス溶液剤 (10 mg / mL - シアノ - 4 - ヒドロキシ - 桂皮酸を 50 % アセトニトリル、0.2 % TFA 中に含有する) を、ターゲットプレート上に沈着 (deposited) させ、乾燥させた。ペプチド抽出物を、C18 ZipTipsTM (ミリボア) を用いて脱塩し、そしてマトリックススポット上に直接沈着させた。

MALDI - TOFMS スペクトルの獲得を自動的に実行した。スペクトルを、ペプチド標準 (peptide standards) を用いて外部的に校正 (calibrated) し、トリプシン自己消化ペプチドを用いて内部的に校正した。データベース探索を、バッチモードで Mascot DaemonsTM (Matrix Science) を用いて、C. jejuni NCTC 11168 ゲノム配列データベースを対象に実行した。

微かな (fainter) タンパク質スポットからの抽出物を、Q - TOF 2 質量分析計を用いた nano LC - MS / MS で分析した。全サンプルを、0.3 x 5 mm C18 ミクロプレカラムカートリッジ (Dionex / LC - Packings) に注入した。ペプチドは、サンプル溶液が洗浄され廃棄される間に保持された。トラップを 75 μ m x 150 mm C18 Nano シリーズカラム (Dionex / LC - Packings) 上に配置した。そしてペプチドを Cap LC ポンプ (15 ~ 75 % アセトニトリル、0.2 % 酢酸を 30 分間、約 300 nL / min 流速) により供給されるグラジエント (gradient) で分離した。質量分析計をセットして、自動化モードで MS / MS スペクトルを取得した (上記のとおり)。

データベース探索を、MALDI - TOFMS 分析に関する記載にしたがって実行した。

グリコペプチド調製:

凍結乾燥したトータルの糖タンパク質 (5 mg) を、250 μ L の 100 mM Tris pH 8.0 (2 mM CaCl₂ を含有) に溶解し、そしてプロナーゼ (pronase) で消化した (以前に記載の通り) (31)。消化物を、微量遠心 (10,000 x g、15 min) し、上清を BioGel P4、200 メッシュ (BioRad Laboratories) のカラム (1 x 120 cm) にアブライした。カラムを水中で実施し、カラム溶出液を屈折率 (refractive index) によりモニターした。フラクションを、ESI MS および前駆物質イオン走査質量分析 (m/z 204 での HexNAc オキシニウムイオンの前駆物質) を API 3000 三重四重極質量分析計 (Applied Biosystems / Sciex) 上で実施することにより選抜 (screened) した。HexNAc イオンサイン (ion signature) を提示するフラクションを、プールし、凍結乾燥した。グリコペプチドを、BioGel P2 ファイングレードの 1 x 120 cm カラム上で更に精製した (フラクションは上記の

とおりモニターされ、選抜される)。

NMR分光学：

全スペクトルを、Varian Inova 600MHz分光計(標準のVarianソフトウェアを用いて)を用いて取得した。グラジエント 4mm間接検出 高分解能マジック角スピニング(A gradient 4 mm indirect detection high-resolution magic angle spinning) nano-NMRプローブ(Varian)に、広帯域(broadband)のデカップリングコイル(decoupling coil)を備えたものを使用した。サンプルを、駆動(drive)およびベアリング(bearing) ガスとしての乾燥窒素と共に、3KHzでスピンさせた。スピン比率(spin rate)は、コンピュ

10

ータ制御されなかったが、セット値の10Hz内で一定に保持された。サンプル(40 μ LのD₂O溶液中)を、より鋭いピークを産生させるために、25 $^{\circ}$ 及び35 $^{\circ}$ で記録した。pHは、小さい容量のため分からなかった。重水素化したEDTA(CDN Isotopes Inc.)を添加して、金属イオンをキレートし、バシロサミン(bacillosamine)およびアミノ酸に対する鋭いピークを提供した。グリコペプチド単離物(P4カラムからの)が、いくつかのアミノ酸および糖 不純物(impurities)を含有していたにもかかわらず、スペクトルは、15mMの重水素化型EDTA(deuterated EDTA)の存在下において、グリコペプチドの完全な共鳴帰属(resonance assignments)を許容する十分な質のものであった。多くのNMR構造研究は、このサンプルで継続した(更なる精製による、分離されたグリコペプチドのバルクを失うリスクのため)。導き出された構造(The derived structure)は、グリコペプチドにおける付加的なNMR実験により確認された；このグリコペプチドは、P2カラムを用いて精製され、凍結乾燥され、そして40 μ LのD₂O(1mM 重水素化型EDTAを有する)に溶解されたものであった。実験は、HDOシグナルの抑制(suppression)を4.78ppm(25 $^{\circ}$)および4.67ppm(35 $^{\circ}$)で行い実施された。2次元実験(COSY、TOCSY、NOESY、HMQC、HMBC)の取得(Acquisition)および処理(processing)を、以前に記載されたとおり実施した(32)。¹Hリファレンスを、外部のアセトンにより2.23ppmでセットした。¹³Cリファレンスを、外部のアセトンのメチル共鳴で31.07ppmにセットした。¹Hおよび¹³C化学シフト(表1における)を、プロトン スペクトルから及びC-Hクロスピークから(HMQCおよびHMBCスペクトルにおける)測定した。1D TOCSY実験(30-151msの多様なスピン-ロック時間)および1D NOESY(400-800msの混合時間)を、以前に記載されたとおり実施した(25, 26)。選択的な実験を、1D EXP[選択されたスピン(selected spins)、選択励起バンド幅(selective excitation bandwidth)、混合時間(mixing time)、ここでEXPはTOCSYまたはNOESY)として記載した。

20

30

RFおよび磁場均質性(magnetic-field homogeneities)の双方の存在下において、マジック角スピニング(MAS; magic angle spinning)を液体状態サンプルに対して使用することは、TOCSY実験において混合シーケンス(mixing sequences)の性能に有意に影響することが示されており、これにより性能が劣化され得る(27, 28)。断熱性(WURST)混合シーケンスは、係る効果を排除できる(27, 29)。標準の2D TOCSYおよび1D TOCSYシーケンスを、MLEV-17またはDIPSI-2混合シーケンスが断熱性(adiabatic)WURST-2パルスで置換されるように修飾した。断熱性(WURST-2)混合は、Tp=1/MASスピン比率の単一の断熱性反転パルス長(adiabatic inversion pulse length)、8の変調深度(amodulation depth)、および2の断熱度(adiabaticity)を有していた。典型的には、WURST-2パルスに関して、スイープ帯域

40

50

幅 (sweep bandwidth) は、24 kHz、 $T_p = 0.333 \text{ ms}$ (3000 + / - 10 Hz の MAS スピン比率で)、 $B_1(\text{max}) = 8.51 \text{ kHz}$ 、 $B_1(\text{RMS}) = 4.77 \text{ kHz}$ であった。

GC - MS 分析：

P2 産物の Glc および GalNAc コンポーネントの鏡像異性配置 (enantiomeric configurations) は、ガス液体クロマトグラフィー質量分析において but - 2 - イル グリコシド (but - 2 - yl glycosides) のキャラクタリゼーションにより割り当てられた (21)。誘導体 (derivatives) を、ヒューレットパッカード クロマトグラフに 30 m DB - 17 キャピラリーカラム (180 から 260 を 3.5 / min) を備えた装置を用いて分析した。また、電子衝撃モード (electron impact mode) におけるスペクトルを、バリアンサターン (Varian Saturn) II 質量分析計で取得 (obtained) した。

10

pglB 突然変異体の構築およびキャラクタリゼーション：

pglB 突然変異体の構築に関して、遺伝子 Cj1121c から Cj1126c を、C. jejuni NCTC11168 から、次のプライマーを用いて PCR 増幅した：即ち、Cj1121c F (5' - ACTCACTATTGCCATTAAAGATAAGC - 3') および Cj1126c R (5' - AAAACCCCTTATTTAGTTTTGT TTGC - 3') である。PCR 産物を、Pfu ポリメラーゼで削り (polished)、そして pPCR - Script Amp (ストラタジーン) へと製造者の使用説明書にしたがって連結した。ライゲーション混合物を、電気穿孔法を適用可能な (electrocompetent) 大腸菌 DH10B へと電気穿孔して導入し、そして LB S - gal 寒天 (シグマ - アルドリッチ) にアンピシリンを含有させた培地で選択した。pILL600 からのプラントエンド化したカナマイシン抵抗性カセット (37) を、pglB のフィルインした XbaI 制限酵素部位に挿入して、pEAp26 を作出した。前記カセットの方向性を、ckanB プライマー (5' - CCTGGGTTC AAGCATTAAG - 3') でシーケンシングすることにより決定した。DNA を、ターミネーター化学および AmpliTaq サイクル シーケンシング キット (アプライドバイオシステム) を用いて配列決定し、アプライドバイオシステム 373 DNA シーケンサーで分析した。突然変異したプラスミド DNA を、C. jejuni NCTC11168 への電気穿孔に使用した (32)。また、カナマイシン耐性の形質転換体を PCR により特性を調査して、入った (incoming) プラスミド DNA が二重の交差イベントにより統合されたことを確認した。

20

30

タンパク質を、0.2 M グリシン (pH 2.2) を用いて、C. jejuni 細胞全体から抽出し (10)、そして水に対し透析した。サンプルを、11 cm pH 3 - 10 の Ready Strip IPG strips (バイオラドラボラトリーズ) およびプレキャスト 12 x 8 cm 8 - 16 % グラジエント・クライテリオン・スラブゲル (gradient Criterion slab gels、バイオラドラボラトリーズ) を用いた 2D - PAGE により分析した。ゲルを、コロイド性クーマシーブルーで染色し、写真を取り、次に水中で洗浄することにより部分的に脱染色した。タンパク質を、1 h、207 mA で PVDF 膜上に転写した (トランス - ブロット SD セミドライ転写セル (バイオラド) を用いた)。ブロッキングを一晩した後、膜を 1 : 500 希釈の HS : 2 セロタイプینگ血清 (serotyping serum) で、続いて 1 : 5000 希釈のヤギ抗ウサギ抗血清 (シグマ - アルドリッチ) でプローブし、そして NBT / BCIP (ロシモレキュラー バイオケミカルズ) で発色させた。

40

カンピロバクター細胞からのグリカンの検出のための実験手順

細菌株および成長条件：

カンピロバクター ジェジュニ NCTC11168 (HS : 2) は、ヒト腸炎の症例から分離された (46)、そして Parkhill 等 (6) により後に配列決定された。C. jejuni 血清株 (sero strains) : HS : 1 (ATCC 43429)、

50

HS: 2 (ATCC 43430)、HS: 3 (ATCC 43431)、HS: 4 (ATCC 43432)、HS: 10 (ATCC 43438)、HS: 19 (ATCC 43446)、HS: 36 (ATCC 43456) および HS: 41 (ATCC 43460) は、ATCC から取得された; C. jejuni HS: 23 は、Peggy Godschalk 博士 (エラスムス大学医療センター、ロッテルダム) から入手された; C. jejuni OH4382 および OH4384 は、ヘルスカナダ (Health Canada) から入手された; 並びに C. coli HS: 30 (NCTC 12532) は、NCTC から入手された。全カンピロバクター株を、ミューラーヒントン寒天 (ディフコ) 上で微好気性条件下 (37) でルーチ的に成長させた。

C. jejuni NCTC 11168 突然変異体を、ミューラーヒントン寒天に 30 μ g / mL カナマイシンを有する培地で成長させた。

部位特異的突然変異体の構築およびキャラクタリゼーション:

C. jejuni NCTC 11168 kpsM (12) および pglB (13) 突然変異体の構築は、既に記載されている。

【0008】

HR-MAS NMR のための細胞の調製:

1 つの寒天プレートから一晚成長させた C. jejuni ($\sim 10^{10}$ 細胞) を、収穫し、そして 1 mL の 10 mM カリウム緩衝生理食塩水 (potassium buffered saline) (pH 7) (10% アジ化ナトリウム (w/v) を含有している D₂O で作出された) 中に懸濁した。前記懸濁液を 1 h、室温でインキュベーションして、前記細菌を殺傷した。前記細胞を、遠心分離 (7500 x g、2 min) により沈殿させ、そして 10 mM カリウム緩衝生理食塩水 (D₂O 中) で 1 回洗浄した。前記ペレットを、20 μ L の D₂O を添加することにより再懸濁させた。次に 40 μ L の前記懸濁液を分析のためにローター (rotor) に挿入した。

HR-MAS NMR 分光学:

HR-MAS 実験を、Varian Inova 600 MHz 分光計に Varian nano-NMR プローブを備えた装置を用いて、以前に記載されたとおりに実施した (12, 13)。40 μ L サンプルからのスペクトルを、3 KHz でスピンさせ、そして外界温度 (ambient temperature) (21) で記録した。実験を、HOD シグナル (4.8 ppm で) の抑制により実行した。

細菌細胞のプロトン スペクトルを、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) パルス シークエンス [90 - (- 180 -)_n - acquisition] (34) で獲得して、脂質および固体様物質 (solid-like material) から生じる広幅なライン (broad lines) を除去した。CPMG パルス (n * 2) の全体の継続時間は、10 ms に セットから (1 / MAS スピン比率) を伴っていた。1 次元の選択的な TOCSY 実験 (30 - 150 ms の多様なスピン-ロック時間を有する) および選択的な NOESY (100 - 400 ms の混合時間を有する) を、以前に記載されたとおりに実施した (25, 35)。MAS 条件下での使用のために、TOCSY シークエンスを、DIPSI-2 混合シークエンスが断熱性 (adiabatic) WURST-2 パルスで置換されるように修飾した (13)。選択的な実験を、EXP [選択されたスピン (selected spins)、選択励起バンド幅 (selective excitation bandwidth)、混合時間 (mixing time)] として記載した (ここで EXP は TOCSY または NOESY である)。典型的には、細菌細胞のプロトン スペクトルは、256 から 1024 トランジェント (transients) (15 min から 1 時間) を用いて、取得できるであろう。細菌細胞においてマイナーなコンポーネントとして存在する N 連結型グリカン共鳴においての選択的な実験 (selective experiments) に関して、各 TOCSY および NOESY に関する前記時間は 1 から 8 時間まで変化していた。

【実施例】

【0009】

実施例1 PEB3の精製およびキャラクタリゼーション

PEB3タンパク質(Cj0289c)は、グリシン抽出物の2Dゲル中に、ペプチドマ
スフィンガープリント法により、pH9-10の範囲内に集束しているスポットの群のコ
ンポーネントとして、同定された(結果示さず)。PEB3は、前記抽出物から陽イオン
交換クロマトグラフィーで精製され、そして同じカラム上で再分画されて(より浅い塩化
ナトリウムの勾配を用いて)、結果的に前記PEB3は3つのフラクションに出現した(
図1)。SDS-PAGE分析により、2つのバンドが示された。前記バンドのN末端配
列は、前記バンドをPVDF膜へと転写した後に決定された。10サイクルのシーケン
シングにより、低質量の種(lower mass species)がPEB3と同定
された。一方で、高質量(より豊富なコンポーネント)もPEB3であって、PEB3に
PEB4(Cj0596)に対応する若干の配列(a minor sequence)
を有するものであった。

マスペクトルおよびフラクション#31に関する再構築された分子量プロファイルを
、図2a)およびb)に示す。3つのピークが、再構築された分子量プロファイルにおい
て観察された。25,454 Daおよび28,376 Daでのピークは、それぞれP
EB3(25,453 Da、Cj0289c)およびPEB4(28,377 Da、
Cj0596)の推定上の分子量と良く一致した(シグナルペプチドなし)。質量26,
861 Daのタンパク質を同定するため、CapLC-MS/MS分析を本フラクショ
ンのトリプシン消化物に関して実行した。同定されたペプチドの1つを除いた全てを、P
EB3またはPEB4に帰属させることが可能であった(N末端配列データと一致して)
。未同定のイオンのMS/MS分析(図3a)により、それがグリコペプチドであること
が明瞭に同定された。HexNAc(203 Da)の連続的な欠損(sequential
losses)を構成するフラグメンテーションシリーズ(fragmentation
series)および単一のHex(162 Da)が、本スペクトルにおいて観察
できる。トリプシンペプチド(tryptic peptide)は、⁶8 DFNVSK
⁷3と同定された(PEB3より)。このグリコペプチドのオリゴ糖部分の残基質量
(residue mass)は1406 Daであり、これはPEB3の分子量および未
知のタンパク質ピーク(図2bにおいて観察される)における差とよく対応している。従
って、約50%のPEB3タンパク質(このフラクション中の)は、単一のオリゴ糖(5
HexNAcs、1Hexおよび228 Daの残基質量を有する異常な糖から構成される
)で修飾されたと思われる。そのうえ、MS/MSスペクトルは、オリゴ糖が228 Da
の糖部分(sugar moiety)を介して前記ペプチドに連結していることを指摘
した。

実施例2 グリコペプチド結合(glycopeptide linkage)のキャラクタリゼーション

PEB3トリプシンペプチド(これに前記オリゴ糖が付着している)は、N-およびO-
結合(即ち、AsnおよびSer)の両方に対する部位を含有している。従って、この結
合の素性(nature)を決定するための更なる実験を実行することが必要であった。
以前、我々は 脱離(elimination)を使用して、O-連結型の炭水化物を、C.jejuni81-176のフラジェリン(flagellin)から除去した
(5)。しかしながら、この手順は、この事例において前記オリゴ糖の除去に失敗した。
このことは、前記オリゴ糖がN連結型であるとの我々の最初の指摘であった。このことは
、無傷の(intact)グリコペプチドのフロントエンド衝突誘起解離により産生され
た、単一的にプロトン化したフラグメント イオン(m/z 937.0での)のMS/
MS分析により確認された(図3b)。このイオンは、トリプシンペプチド プラス 異
常な(unusual)228 Da糖のみから構成されている。特定のイオンがm/z
605.1で観察された。これはb₃フラグメント イオン プラス 228 Da糖部分
にのみ帰属できた。フラグメント イオンは観察されず、炭水化物がセリン残基に連結し
ていることが示唆された。この証拠の全ては、前記オリゴ糖が前記ペプチドにAsn70
で連結していることを強く示唆している。

興味深いことに、このペプチドは、真核生物のN-結合コンセンサス シークオン (c o n s e n s u s s e q u o n) A s n - X a a - S e r を含有している。

実施例3 糖タンパク質の単離および同定

推定上の糖タンパク質を、SBAアフィニティークロマトグラフィーで、40g湿重量の細胞のグリシン抽出物から精製した。推定上の糖タンパク質の収量 (y i e l d) は、UV吸光度 (280nmでの) により推定されたとおり5mgであった。

GalNAc溶出物を、1Dおよび2D-PAGEに供試し (図4)、この様式で精製されたタンパク質がレクチン結合特性 (非特異的な結合特性ではなく) を有していることを確立した。また、ウエスタンブロット法 (SBA/アルカリホスファターゼ抱合体での) を実施した。約13のタンパク質種を、1D SDS-PAGEに続いて視覚化した。しかし、この数は、前記産物が2D-PAGEにより分析された場合、実質的に増加した。個々のバンド (1D SDS-PAGEからの) およびスポット (2D-PAGEからの) 中のタンパク質を、マスフィンガープリント法およびデータベース検索により同定した (表I)。同定されたタンパク質のなかには、以前Linton等により同定された、PEB3 (Cj0829c) およびCgpA (Cj1670c) が認められた (8)。Cj1670cおよび他のタンパク質により同一のpIで提示されたスポットの、垂直方向のパターンは、様々な程度の糖鎖形成を指摘しているようである。というのもそれらの予想されたアミノ酸配列 (C . j e j u n i N C T C 1 1 1 6 8 (6) の全体のゲノム配列に由来する) の調査 (e x a m i n a t i o n) が、複数の潜在的なN-連結した糖鎖形成部位 (シークオン A s n - X a a - S e r / T h r を含有する) の存在を明らかにしているからである (表I)。事実、Cj1670cを含有しているインゲル消化物の抽出物のMS/MS分析は、6つのN-連結部位のうち3つが、様々な程度に占有されることを指摘した (3つのCj1670cグリコペプチドはcapLC-MS/MSにより検出された、即ち: ⁷ T D Q N I T L V A P P E F Q K E E V K ^{2 5}、^{7 7} V L D V S V T I P E K N S S K ^{9 1} および ^{9 2} Q E S N S T A N V E I P L Q V A K ^{1 0 8} である。また、単一のグリコペプチドが、Cj0114 (^{7 1} L S Q V E E N N Q N I E N N F T S E I Q K ^{9 1}) に関して及びCj0200c (¹ D S L K L E G T I A Q I Y D N N K ^{1 7}) に関して観察された。さらにまた、全てのそれらのグリコペプチドのグリカンコンポーネントの質量および組成は、PEB3に関して観察されたものと同一であると思われる。

しかしながら、2D-PAGEから同定された特定のタンパク質、特にCj0147c、Cj0169、Cj0332c、Cj0334、Cj0638c、Cj1181cおよびCj1534cは、任意のこれらの特定のシークオン (s e q u o n s) を、彼らのアミノ酸配列中に含有していない。これらのタンパク質の何れもが、非共有結合性にSBA結合タンパク質と相互作用するか又は非特異的に前記カラムに結合する。この結論は、これらのタンパク質スポットがSBA/アルカリホスファターゼ抱合体と反応しない (2D-PAGEおよび電気プロットング後) との失敗により支持される (表I)。

実施例4 グリコペプチドの調製

混合した糖タンパク質サンプルを、2ラウンドのプロナーゼ消化に供試した、そして産物をゲル濾過 (B i o G e l P 4) で分離した (図5a)。炭水化物含有フラクションを、質量分析により決定した、NMR試験後 (以下を参照)、前記サンプルをB i o G e l P 2上で再精製した (図5b)。最終的な精製サンプルは、単一のA s nに連結したオリゴ糖から主に構成されていた。グリカンコンポーネント (g l y c a n c o m p o n e n t) において如何なる変化の証拠も存在していなかった。グリコペプチドの収量は、約200μgであると推定された。

実施例5 単離された七糖類の調製

実施例4 (式I) において同定された七糖類部分 (h e p t a s a c c h a r i d e m o i e t y) は、既知の方法で単離することにより取得し得る。例えば、アミノ酸部分 (A s n) を、実施例4において調製されたオリゴペプチドから、当該技術分野において周知の酵素的または化学的な加水分解により切断し得る。本発明者等は上記の工程を実施し

10

20

30

40

50

なかったが、係る工程を実施して前記七糖類を単離し得ることが明らかであろうことが注目される。また、前記七糖類は、前記糖タンパク質から直接取得できる（グリコペプチドを経由することなく）。また、この切断は、酵素的または化学的な加水分解により実施できる。例えば、Patel等（41）は、係る切断に関してヒドララジン（hydrazine）の使用を教示している。

実施例6 NMR分光学

精選された方法（selective methods）を使用したので、不純物のあるP4サンプルで作業可能であった。糖部分の完全な共鳴帰属（resonance assignment）を、更なる精製に際するグリコペプチドの損失の恐れがあるため、このサンプルで実施した。P2カラムを用いた第二の精製後、25%のグリコペプチドが損失した（P4およびP2精製サンプルに関するS/N比の測定により判断された）。HMQC実験を、P2精製サンプルで再試験して、P4精製サンプルを用いて取得した帰属を確認した。質量分析の結果、前記グリコペプチドは、5HexNAc残基、Hex残基、および未知の糖（質量228Daを有する）から構成されていた。HexNAcおよびHex残基の絶対配置（absolute configuration）は、化学分析によりDであると決定された。¹Hおよび¹³C NMRデータの分析により、アルファベット順にラベルされた8アノマープロトン（8 anomeric protons）の存在が指摘された（図6）。アノマー共鳴に関する一連の1D TOCSYを、プロトンの帰属（proton assignments）に関して実施した（図7）。異なる混合時間（mixing times）を使用して、各残基内のスピンを帰属させた。HMQCおよびHMB Cを使用して、次に¹³C共鳴を帰属させた。NMR帰属を表IIに示す。1D NOESY実験（図7）を使用して、示されるシークエンスを取得した（図6）。

残基gは、 α -D-Glc pと帰属された。144msの混合時間によるg1の1D TOCSY（図7a）に関して、H6およびH6'共鳴までの全てのスピンを検出した（ α -グルコピラノースの典型的な、大きい $J_{H,H}$ カップリングの表示）。また、共鳴g1はf2とオーバーラップし、これによりf1からf4共鳴の検出を可能にする。残基gは末端（terminal）であった（C2からC6に関する¹³Cおよび¹H化学シフトの、 α -D-グルコピラノースのものに対する類似する結果から）（36）。

5つの残基（a、c、d、e、およびf）は、 α -D-GalpNAcと同定された。 $J_{1,2}$ の 3.6 ± 0.2 Hz（強いH1-H2 NOE（図7））、および $J_{H,H}$ カップリングパターン（H4に対する小さいカップリングを含む（図7））の値により、それらのユニットが α -D-ガラクトピラノシル配置を有することが示された。e1およびf1のアノマー共鳴は狭いバンド幅（10 Hz）で選択的に励起されうるが、e1およびf1の連続的な励起（simultaneous excitation）に関するスペクトルは図7bに示される。

また、共鳴f2からf4は、g1f2の1D TOCSYに対して検出された（図7a）。51ppmに近いC2に関する化学シフトは、アセトアミド基の表示（indicative）であった。（C2, H4）HMB C相関を使用して、5つのGalNAc残基のC2共鳴を帰属させた。1D TOCSY-NOESY（H1, H4）を使用して、NOE（H4およびH5の間の）を検出し、H5共鳴を帰属させた（25）。1D-TOCSY実験（H5共鳴において）を、次に使用してH6s共鳴を検出した（示さず）。P2精製サンプルの統合（図6b）は7NAc基を指摘した、それらのうち5つは5つのGalNAc残基に相当している。

GalNAcユニットの¹³C化学シフトと α -D-GalpNAcのものとの比較により、残基a、c、e、fがO-4で連結していることが指摘された（C4に関する低磁場シフトによる）（37）。残基fが分岐点（O-3で）を有していたことが、C3に関する低磁場変化（downfield shift）により樹立された。残基dは末端（terminal）であった（C2からC6に関する¹³C化学シフトの、 α -D-GalpNAcのものに対する類似する結果から）（37）。

残基 b は、 α -D-バシロサミン(2,4-ジアセトアミド-2,4,6-トリデオキシ- α -D-グルコピラノース)に帰属された。残基 b および c に関して、アノマー共鳴(anomeric resonances)が部分的にオーバーラップした。b 1 および c 1 共鳴(144 ms の混合時間を有する)の1D TOCSY に関して(図7e)、広い共鳴がCH₃共鳴(b 6)まで1.14 ppm で同定できた。1.14 ppm でのb 6(66 ms の混合時間を有する)の1D TOCSY に関して(図7d)、b 4 までのピークが観察された。

異なる混合時間(30 ms から144 ms までの)を有する、一連の1D TOCSY を実施して、ピークを帰属させた。残基 b に関して、広いピークは、カップリング定数(coupling constants)を提供しない。しかしながら、b 1 の1D TOCSY(144 ms の混合時間を有する)に関して、H 6 までの共鳴が観察できた(α -Glc p(残基 g)のH 1 に対する1D TOCSY と類似する)。それ故、このような効率的な伝達は、 α -グルコピラノシル配置に典型的な、大きいカップリング定数の表示であった。b 1 - b 3 および b 1 - b 5 NOEs(図7kにおいて観察された)も、典型的なアノマーの配置であった。C 2 および C 4 に関する化学シフト(55 および 58 ppm での)は、アセトアミド基の表示であった(前記構造における7NAc基の存在と一致する)(図6a)。化学シフト(C 1 に関して、79 ppm および H 1 5.1 ppm)は、 α -GlcNAc-Asn に関して発見されたものに類似する、N-連結型アノマーを表示した(20)。残基 b の化学シフトと2,4-ジアミノ-2,4,6-トリデオキシ- α -D-グルコピラノース(他の構造において発見された)の化学シフトとの比較により、Bac がO-3(唯一可能なグリコシド化部位)で連結したことが指摘された(38-40)。

残基 b の絶対配置が、NOEs によって取得された(バシロサミンを含有している別の構造に関して以前記載されたように)(38)。1.14 ppm でのCH₃共鳴(b 6) および 1.95 ppm でのNAcの間で観察された強いNOEは、CH₃基(C 6 での)のNAC-CH₃基(C 4 での)に対する密接な近接性によるものであった。NAc共鳴(1.95 ppm での)は他のNAc共鳴から分離されていたので、それを選択的に励起できた。強いNOEが、このNAc共鳴と残基 a の α -D-GalpNAc H 1 共鳴との間で観察された。これは(1-3)b結合による(以下に示されるとおり)。残基 b がD-配置(残基 b のC 4 でのNAc基が、残基 a のアノマープロトンの近くに近接(3)する)を有する場合のみ、このNOEが発生し得る。残基 b がL-配置を有する場合、このNOEは可能ではない(H 1 a / 4 b - NAcプロトン間 距離が5 よりも大きいので)。

【0010】

シークエンスは、1D NOESY 実験により決定された(図7)。強いc 1 - f 4 NOE 並びにより小さいc 1 - f 6 および c 1 - f 6' NOEs により、c(1-4)f結合が確認された。強いd 1 - c 4 NOE 及びより小さいd 1 - c 6' により、d(1-4)cシークエンスが指摘された。e 1 - a 4、f 1 - e 4 および g 1 - f 3 により、e(1-4)a、f(1-4)e および g(1-3)f結合が確認された。a 1 - b 3 NOE(図7l)により、a-bシークエンス(a-b sequence)が確認された。前記構造を図6aに示す。前記シークエンスは、結合炭素(the linkage carbons)に対して観察された、グリコシド化(glycosidation)シフトと一致する(上記を参照)。

実施例7 pglB突然変異体のキャラクタリゼーション

pglB突然変異体を、カセット突然変異誘発により構築した(図8)。突然変異体細胞のグリシン抽出物により、タンパク質の免疫反応性における劇的な変化が実証された(2D-PAGEと共にHS:2セロタイピング血清でウエスタンブロット法を行うことによって)(図8b、e)。2Dゲル上の移動度および/または免疫反応性において変化を示した、タンパク質のいくつかを、マスフィンガープリント分析により同定した(表I)。タンパク質同定はSBAレクチンアフィニティークロマトグラフィーによ

り同定されたものと一致し、このことによりGalNAcレクチンと反応性のタンパク質が、Pgl経路によりグリコシル化されることに関する更なる証拠が提供される。SBA反応性タンパク質の完全なセットは、本実験では観察されなかった。というのも前記実験は、全グリシン抽出物(whole glycine extracts)で且つ異なるpH範囲で実施されたからである(即ち、図4および8は直接的に比較できない)。加えて、PEB3は、pglB突然変異体からイオン交換クロマトグラフィーで精製された(上記のとおり)。そして、質量分析法による分析により、タンパク質が前記グリカンに完全に欠損していることが示された(図2c、d)。

pglB突然変異が糖タンパク質の糖鎖形成にのみ影響することを示すため、分析を前記突然変異体のリポオリゴ糖および莢膜多糖類に関して実施した。プロテイナーゼK消化物のデオキシコレートPAGE(Deoxycholate-PAGE)および質量分析により、突然変異体LOSコア(the mutant LOS core)の質量が野生型のものと同じであったことが示された(結果示さず)。加えて、同一の莢膜の反復(capsular repeats)は、野生型および同質遺伝子的な突然変異体(isogenic mutant)の細胞の抽出物のデオキシコレートPAGE上で可視であった。カプセル(capsule)が不変(unaltered)であったことを更に実証するために、我々は前記ポリ多糖をHR-MAS NMRにより試験した。前記突然変異体のスペクトルは、野生型のものと比較して不変(unchanged)であった(結果示さず)。

実施例8 細胞全体におけるN連結型グリカンのHR-MAS NMRによる検出
完全な(intact)カンピロバクター細胞のHR-MAS NMRスペクトルにおいて(図9)、共通の¹H共鳴のセットが検出された。我々は、以前にC.jejuni NCTC11168のN連結型グリカンの構造を、MSおよびnano-NMR技術を用いて、七糖類であると決定した(13)。C.jejuni NCTC11168、NCTC11168 kpsM-、C.jejuni HS:19およびC.coli HS:30のHR-MAS NMRスペクトルにおいて観察できるように、精製されたN連結型グリカンのもので一致したアノマー共鳴が観察され、このことは本グリカンが全てに共通であったことを示唆している(図9)。NCTC11168のスペクトルにおいて(図9b)、N連結型グリカンに対応する共鳴は、CPSからの共鳴およびオーバーラップしたアノマー共鳴のいくつかと比較して、より低い強度であった。しかしながら、莢膜の共鳴がNCTC11168 kpsM突然変異体において排除される場合、それらは明瞭に区別できるだろう(図9c)。共通のグリカン共鳴のN連結型グリカンに対する帰属(assignment)は、NCTC11168 pglB突然変異体(ここではタンパク質糖鎖形成が消失している)のスペクトルを試験することにより更に確認できた(3, 13)。予想どおり、N連結型グリカンの共鳴は、この突然変異体のNMRスペクトルにおいて観察できなかった(図9f)。

推定上の共通グリカン(the putative common glycan)の同一性を、選択的なTOCSYおよびNOESY実験を用いて更に確認した(図10)。実験をC.jejuni HS:19細胞を用いて実施した(というのもN連結型グリカンのアノマー共鳴が明瞭に観察できたからである)。標準の選択的なNOESY実験(HS:19におけるa1共鳴の選択的な照射で開始される)により、4.21ppmでの共鳴との相関が確認された(図10a)。この共鳴は、精製したグリコペプチドのa1共鳴に関するNOESYスペクトルにおいて観察されたa2共鳴と同じ化学シフトを有している(図10b)。

HS:19と精製されたN連結型グリカンとの間の、他のアノマー共鳴に関するNOEパターンの比較により、2セットの実験間の類似する一致が明瞭に示された(図10c-f)。NOE実験により、イントラおよびインター残基相関(intra- and inter-residue correlations)の双方が明らかにされた。この一致は、共通グリカンのシーケンスが、以前に報告された精製されたN連結型グリカンのもので同一であることを示唆している(13)。選択的なTOCSY実験(g1およびf

10

20

30

40

50

2 オーバーラップ共鳴を 4 . 5 p p m で照射する) により、g 2 および f 3 共鳴に対応する交差ピーク (c r o s s p e a k s) が生じた (図 1 0 g) 。それらの多重線形状 (m u l t i p l e t s h a p e) および化学シフトは、精製された N 連結型グリカンに関する、対応する実験において観察されたものと一致していた (図 1 0 h) 。観察された他の共鳴は、より強い C P S 共鳴の部分的な励起によるものであった。従って、細菌細胞で実施した選択照射実験により、共通の N 連結型グリカンのインサイチューでの同一性が確認された。

多様なカンピロバクター種の H R - M A S プロトン N M R スペクトルにおける N 連結型グリカンの検出を、図 1 1 に示す。N 連結型グリカンの構造を、前記スペクトルの上部に示す。C . j e j u n i N C T C 1 1 1 6 8 における精製された N 連結型グリカンのスペクトル (a から g とラベルされたアノマー共鳴を示し、垂直方向の点線で示した共通の共鳴を有している) を、比較のために示す。細胞全体 (w h o l e c e l l s) の 1 0 m s C P M G フィルターを用いた H R - M A S N M R スペクトルが示される ; 該細胞は、C . c o l i H S : 3 0 (N C T C 1 2 5 3 2 、ブリュッセルのブタから単離された)、C . c o l i 4 2 3 (アルバータのニワトリから単離された) および C . f e t u s s s p . v e n e r e a l i s B i o t y p e A (N C T C 1 0 3 5 4 、雌ウシの膣粘液から分離された) である。H O D 共鳴 (4 . 8 p p m で) は、飽和され (s a t u r a t e d) 、デジタル方式でフィルターされた。

図 1 2 は、高分解能マジック角スピニング N M R (h i g h r e s o l u t i o n m a g i c a n g l e s p i n n i n g N M R) を塩化コバルトの有り無しで実施して、N 連結型 P g l グリカンの表面暴露を実証した図である。各々におけるトップスペクトル (t o p s p e c t r u m) は、C o C l ₂ が添加されたサンプルからのものである。それらは、同じく処理された。トップスペクトルの信号雑音比 (S / N) が、各々のボトムスペクトルのものよりも非常に低いことに注目すべきである。前記スペクトルは T 2 フィルターで効率的に取得されるので、それゆえ C o C l ₂ で広げられたラインは弱く出現する。k s p M 突然変異体に関して、3 . 1 5 p p m に近いピークが非常に異なる相対強度を 3 p p m に近いピーク (s) に対して呈したことに注目すべきである。3 . 1 5 p p m に近いピークに関する絶対的な S / N (C o C l ₂ の有り / 無し) はほぼ同じであるが、一方で 3 p p m でピークに対する絶対的な S / N は非常に異なっている。このことは次のこと、即ち、3 . 1 5 p p m でピークは、内部 (i n t e r n a l) である可能性が高く、C o C l ₂ に対して有効 (a v a i l a b l e) ではないことを指摘している。このように、外部 (e x t e r n a l) の残基は、強度が有意に減少している。

H S : 1 9 の場合において、同じ観察が 3 . 1 5 p p m 対 3 p p m のピークに関してなされる。更に、~ 2 . 7 および ~ 2 . 8 5 p p m でのアスパラギン酸ピーク (S z y m a n s k i e t a l , J B C , 2 0 0 3 を参照されたい) は、C o C l ₂ の存在下で消失する。このことにより外部表面または中間部 (m e d i u m) に暴露される残基が広げられた (b r o a d e n e d) ことが確認される。N - 連結型 P g l グリカン共鳴 (S z y m a n s k i e t a l , J B C , 2 0 0 3 および図 9 を参照されたい) は、C o C l ₂ の存在下で基本的に消失するので、このことはそれらも細胞表面に存在することを指摘している。

抗体およびワクチンの調製および投与

本発明によるグリカン部分に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合性フラグメント (a n t i g e n - b i n d i n g f r a g m e n t s t h e r e o f) は、従来の方法で生産し得る。例えば、マウスモノクローナル抗体は、式 I (フラグメントを含む) のグリカン (随意にオリゴペプチドまたはアミノ酸または免疫原性の抱合体に連結された) に対して産生し得る。別の戦略は、ラクダのリンパ球に由来し且つ d A b 抗体フラグメントを発現する能力を有する、クローン化された遺伝子の既存ライブラリー (p r e - e x i s t i n g l i b r a r y) を、パン (p a n) して、選択した抗原に対して免疫原性活性を有しているフラグメントを発現する能力を有する遺伝子を同定および単離するこ

10

20

30

40

50

とである。このように単離された遺伝子 (s) は、バクテリオファージライブラリー (この遺伝子を含むように修飾された) において発現されてもよい。係る抗原は、上記の七糖類または係る七糖類のフラグメント (随意に上記のとおりアミノ酸、オリゴペプチドまたは他の抱合体と連結される) を含んでいてもよい。この方法は、米国特許番号 5 , 7 5 9 , 8 0 8 (C a s t e r m a n らに対する) に記載される。なお更なる戦略は、前記遺伝子を、選択された抗体またはフラグメントを発現させるために、適切な植物のゲノムに導入することである ; これにより次に家畜の食物源として機能し得る。係る植物は、抗体または抗体フラグメントを発現するだろう、そして家畜により消費される際に、抗体またはフラグメントの適切な用量を動物に配送するだろう。

本発明のグリカンに特異的に結合する抗体またはフラグメントを産生するための様々な方法が存在することが理解される。係る抗体フラグメントを、完全抗体 (a c c o m p l e t e a n t i b o d y) と独立して (i n d e p e n d e n t l y) 調製または産生し得る。

また、抗体は、係る抗体を動物 (上記の実施例において同定された抗原の適切な量を投与された) の血清から単離する伝統的な手段により調製し得る。

例えば、係る方法は、米国特許 5 , 7 5 9 , 8 0 8 (C a s t e r m a n 等に対する) に記載されている。この参考文献は、独特のタイプの抗体 (軽鎖を含有しない) を産生するために、ラクダ種の使用を記載している。

上記のような抗体またはフラグメントは、適切な担体と共にヒトまたは家畜に、受動免疫の形態で投与し得る。

家畜 (例えば、家禽) に投与する場合、好適なアプローチは、抗体またはフラグメントを飼料 (f e e d) または飲料水 (d r i n k i n g w a t e r) と共に供給することである (濃縮物中に混合すること又は植物産物 (抗体または抗体フラグメントを発現するために修飾された) を供給することのいずれであれ) 。別々に提供される場合、抗体またはフラグメントを、適切な担体と共に濃縮物 (c o n c e n t r a t e) として、使用前に飼料または飲料に混合するために供給し得る。

家畜に投与される係る抗体またはフラグメントは家畜に存在するカンピロバクターと戦い、このようにして家畜を、動物生産物を食し且つ取り扱うヒトに伝播性の病原体の伝播から防御 (p r e v e n t i n g) し、同様に地下水を動物の排泄物から保護する。

また、これらの抗体およびフラグメントを使用して、ヒトまたは動物におけるカンピロバクター細菌の存在を、従来の手段により診断し得る。同様に、それらをアッセイのコンポーネントとして使用して、サンプル (例えば、水、土壌または肥料) におけるカンピロバクターの存在を決定し得る。

七糖類またはフラグメント (任意にアミノ酸、オリゴペプチドまたは他の適切な抱合体と連結された) を、ワクチンとして投与するための、適切なアジュバンドおよび免疫賦活薬 (i m m u n o s t i m u l a n t s) と組み合わせてもよい。このような目的に対して、1 以上の適切な用量が、従来の様式で投与される。

【参考文献】

【 0 0 1 1 】

10

20

30

参考文献

1. Schäffer, C., Graninger, M., and Messner, P. (2001) *Proteomics*. **1**, 248-261.
2. Moens, S. and Vanderleyden, J. (1997) *Arch. Microbiol* **168**, 169-175. 10
3. Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J., and Guerry, P. (1999) *Mol. Microbiol.* **32**, 1022-1030.
4. Szymanski, C. M., Burr, D. H., and Guerry, P. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 2242-2244.
5. Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J., and Guerry, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34862-34870. 20
6. Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (2000) *Nature* **403**, 665-668. 30
7. Pei, Z. H., Ellison, R. T., III, and Blaser, M. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16363-16369.
8. Linton, D., Allan, E., Karlyshev, A. V., Cronshaw, A. D., and Wren, B. W. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**, 497-508.
9. Wacker, M., Nita-Lazar, M., and Aebi, M. (2001) *Int. J. Med. Microbiol.* **291 Suppl 31**, 81. 40
10. Dell, A. and Morris, H. R. (2001) *Science* **291**, 2351-2356.

11. Krinos, C. M., Coyne, M. J., Weinacht, K. G., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L., and Comstock, L. E. (2001) *Nature* **414**, 555-558.
12. St Michael, F., Szymanski, C. M., Li, J., Chan, K. H., Khieu, N. H., Larocque, S., Wakarchuk, W. W., Brisson, J. R., and Monteiro, M. A. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 5119-5136.
13. Young, N. M., Brisson, J. R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H., Jarrell, H. C., Cadotte, N., St Michael, F., Aberg, E., and Szymanski, C. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 42530-42539. 10
14. Gilbert, M., Karwaski, M. F., Bernatchez, S., Young, N. M., Taboada, E., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., and Wakarchuk, W. W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 327-337.
15. Gilbert, M., Brisson, J. R., Kawarski, M. F., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., Wu, Y., Young, N. M., and Wakarchuk, W. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3896-3906. 20
16. Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A., Lastovica, A. J., and Wren, B. W. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 529-541.
17. Penner, J. L. and Hennessy, J. N. (1980) *J. Clin. Microbiol.* **12**, 732-737. 30
18. Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A., and Guerry, P. (2001) *Mol. Microbiol.* **40**, 769-777.
19. Moran, A. P., Penner, J. L., and Aspinall, G. O. (2000) in *Campylobacter* (Nachamkin, I. and Blaser, M. J., eds) pp. 241-257, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 40
20. Moran, A. P. and Prendergast, M. M. (2001) *J. Autoimmun.* **16**, 241-256.

21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
22. LeGendre, N. and Matsudaira, P. (1988) *Biotechniques* **6**, 154-159.
23. Rademaker, G. J., Pergantis, S. A., Blok-Tip, L., Langridge, J. I., Kleen, A., and Thomas-Oates, J. E. (1998) *Anal. Biochem.* **257**, 149-160. 10
24. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) *Electrophoresis* **20**, 601-605.
25. Uhrin, D. and Brisson, J. R. (2000) in *NMR in Microbiology: Theory and Applications* (Barbotin, J. N. and Portais, J. C., eds) pp. 165-210, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
26. Uhrin, D. and Barlow, P. N. (1997) *J. Magn. Reson.* **126**, 148-155. 20
27. Kupce, E., Keifer, P. A., and Delepierre, M. (2001) *J. Magn. Reson.* **148**, 115-120.
28. Piotto, M., Bourdonneau, M., Furrer, J., Bianco, A., Raya, J., and Elbayed, K. (2001) *J. Magn. Reson.* **149**, 114-118.
29. Kupce, E., Schmidt, P., Rance, M., and Wagner, G. (1998) *J. Magn. Reson.* **135**, 361-367. 30
30. Vinogradov, E. V., Holst, O., Thomas-Oates, J. E., Broady, K. W., and Brade, H. (1992) *Eur. J. Biochem.* **210**, 491-498.
31. Labigne-Roussel, A., Courcoux, P., and Tompkins, L. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 1704-1708.
32. Guerry, P., Yao, R., Alm, R. A., Burr, D. H., and Trust, T. J. (1994) *Methods Enzymol.* **235**, 474-481. 40

33. Ahmed, I. H., Manning, G., Wassenaar, T. M., Cawthraw, S., and Newell, D. G. (2002) *Microbiology* **148**, 1203-1212.
34. Meiboom, S. and Gill, D. (1958) *Rev. Sci. Instrum* **29**, 688-691.
35. Brisson, J. R., Sue, S. C., Wu, W. G., McManus, G., Nghia, P. T., and Uhrin, D. (2002) In *NMR spectroscopy of glycoconjugates* (Jimenez-Barbero, J. and Peters, T., eds) pp. 59-93, Wiley-VCH, Weinheim. 10
36. Jansson, P.-E., Kenne, L., and Widmalm, G. (1989) *Carbohydr. Res* **188**, 169-191.
37. Baumann, H., Tzianabos, A. O., Brisson, J. R., Kasper, D. L., and Jennings, H. J. (1992) *Biochem.* **31**, 4081-4089.
38. Hermansson, K., Perry, M. B., Altman, E., Brisson, J. R., and Garcia, M. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* **212**, 801-809. 20
39. Molinaro, A., Evidente, A., Sante, I. N., Lanzetta, R., Lo, C. P., Mancino, A., and Parrilli, M. (2002) *Carbohydr. Res.* **337**, 467-471.
40. Schäffer, C., Scherf, T., Christian, R., Kosma, P., Zayni, S., Messner, P., and Sharon, N. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 857-864. 30
41. Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jaques, A., and Parekh, R. (1993) *Biochemistry* **32**, 679-693.

本明細書中で使用される略語は：

B a c , バシロサミン , 2 , 4 - ジアセトアミド - 2 , 4 , 6 - トリデオキシ - D - グルコピラノース ;

capLC-MS/MS, キャピラリー液体クロマトグラフィータンデム型質量分析 (capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry);

CE, キャピラリー電気泳動法;

CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill;

CPS, 莢膜多糖類 (capsular polysaccharide);

COSY, 相関分光法 (correlated spectroscopy);

DIPS-2, スカラー結合 (scalar interactions) の存在下におけるデカップリング;

ESI-MS, エレクトロスプレーイオン化 質量分析; 10

GBS, ギラン-バレー症候群 (Guillain-Barre Syndrome);

HMBC, 異核間の複数の結合にわたる相関 (heteronuclear multiple-bond correlation);

HMQC, 異核間の複数の量子にわたる相関 (heteronuclear multiple quantum correlation);

HR-MAS, 高解像度マジック角スピニング (high-resolution magic angle spinning);

LOS, リポオリゴ糖 (lipooligosaccharides);

LPS, リポ多糖 (lipopolysaccharide); 20

MALDI-TOFMS, マトリックス支援レーザー脱離 飛行時間型質量分析 (matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry);

MAS, マジック角スピニング (magic angle spinning);

MLEV-17, Malcolm Levitt's カップリングサイクル;

MS - 質量分析

MS/MS - タンデム型質量分析

NOESY, 核オーバーハウザー効果分光法;

PVDF, ポリビニリデン ジフルオライド (polyvinylidene difluoride); 30

SBA, ダイズ凝集素 (soybean agglutinin);

TOCSY, 全相関分光法 (total correlation spectroscopy); 並びに

WURST-2, 広帯域 (wideband), 均一割合 (uniform rate), およびスムーズ トランケーション (smooth truncation)。

表 I

【表 1 - 1】

表 I 2-Dゲルのタンパク質の同定					
Cj遺伝子	注釈	シークオンス の数 ^a	SBA 染色 ^b	<i>pglB</i> 突然変異体 ^c	
Cj0114 ^d	推定上のペリプラスムタンパク質 (probable periplasmic protein)	2S, 3T	+	+	10
Cj0143c	ABC輸送系のペリプラスム 溶質結合タンパク質	1S, 1T	+		
Cj0147c	チオレドキシン(TrxA)		-		
Cj0169	スーパーオキシジスムターゼ(Fe; SodB)		-		
Cj0175c ^e	推定上の鉄摂取ABC輸送系の ペリプラスム鉄結合タンパク質	1S, 2T	+	+	20
Cj0200c ^d	推定上のペリプラスムタンパク質	1T	+	+	
Cj0238	推定上の統合型膜タンパク質 (probable integral membrane protein)	5S, 1T	-		
Cj0289c ^d	主要抗原性ペプチド(PEB3)	2S	+	+	
Cj0332c	ヌクレオシドニリン酸キナーゼ(Ndk)		-		
Cj0334	アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (AhpC)		-		30
Cj0376	推定上のペリプラスムタンパク質	1S, 1T	+		
Cj0415 ^e	推定上のオキシドリダクターゼ サブユニット	3T	+		
Cj0420	推定上のペリプラスムタンパク質	1T	±	+	
Cj0493	翻訳伸長因子EF-G(FusA)	1T	±		40

【表 1 - 2】

Cj遺伝子	注釈	シークオンス の数 ^a	SBA 染色 ^b	<i>pglB</i> 突然変異体 ^c	
Cj0511	推定上の分泌プロテイナーゼ	2S, 2T	+	+	
Cj0638c	無機ピロホスファターゼ(Ppa)		-		
Cj0694	推定上のペリプラスムタンパク質	4S, 2T	+		10
Cj0715	トランスサイレチン様 ペリプラスムタンパク質		-	+	
Cj0779	チオレドキシン ペルオキシダーゼ(Tpx)	1S	+		
Cj0835c	アコニテートヒドラターゼ(AcnB)	1S, 2T	+		
Cj0843c ^e	推定上の分泌トランスグリコシラーゼ	5S, 3T	+		
Cj0906c	推定上のペリプラスムタンパク質	2S, 2T	+		
Cj0944c	推定上のペリプラスムタンパク質	1S, 1T	+		20
Cj0998c	推定上のペリプラスムタンパク質	1S, 1T	+	+	
Cj1018c	分枝鎖アミノ酸ABC輸送系 ペリプラスム結合タンパク質	1S, 2T		+	
Cj1032	流出系の推定上の 膜融合コンポーネント	2T	+		
Cj1181c	翻訳伸長因子EF-Ts(Tsf)		-		30
Cj1214c	仮定上のタンパク質	1S	±		
Cj1221	60kDシャペロニン(Cpn60; GroEL)	1S, 2T	+		
Cj1345c	推定上のペリプラスムタンパク質	5S, 2T	+		
Cj1380	推定上のペリプラスムタンパク質	2T	-		
Cj1444c ^e	推定上の莢膜多糖類輸出系 ペリプラスムタンパク質	3S, 2T	+		40

【表 1 - 3】

Cj遺伝子	注釈	シークオンス の数 ^a	SBA 染色 ^b	<i>pglB</i> 突然変異体 ^c
(KpsD)				
Cj1496c	推定上のペリプラスムタンパク質	1S, 1T	+	+
Cj1534c	推定上のバクテリオフェリチン	(CpgA)	-	
Cj1565c	麻痺した鞭毛タンパク質 (paralysed flagellum protein)(PflA)	5S, 2T	+	
Cj1643	推定上のペリプラスムタンパク質	3S, 1T		+
Cj1659	ペリプラスムタンパク質(P19)		-	
Cj1670c ^d	推定上のペリプラスムタンパク質 (CpgA)	4S, 2T	+	+

^a S, Asn - Xaa - Ser シークオンス; T, Asn - Xaa - Thr シークオンス。

^b 2DゲルのウエスタンブロットにおけるSBAとの反応性。

^c 2Dゲルでの変化したスポット位置および/または免疫反応性を有するタンパク質(*pglB*突然変異体における)。Cj1018c & Cj1643は、SBAクロマトグラフィーで単離されなかった。

^d CapLC-MS/MSで観察されたグリコペプチド。

【0012】

^e 1-Dゲルから同定された。

表II

C. jejuni Asn結合型 グリコペプチドの化学シフト(ppm)。
600MHz (¹H) D₂O中、35 °C HOD 4.67 ppmで測定した。d_H 2.23 ppmおよびd_C 31.07 ppmでの外部アセトンメチル共鳴。d_Cにおけるエラーは±0.2 ppm、またd_Hに関して±0.02 ppm。d_H 2.07、2.05、2.04、2.03、2.02、2.02および1.95 ppmでの7つのNAc共鳴。23.1-23.4 ppmでのNAc-CH₃ d_C。175-176 ppmでのNAc-CO d_C。

10

20

30

【表 2】

残基	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
(a) α-GalNAc	98.0	50.7	68.0	77.6	72.7	62.2	
	5.21	4.21	3.83	4.02	3.83	3.93	3.90
(b) β-Bac	79.0	54.5	76.3	58.1	75.0	17.6	
	5.11	3.91	3.91	3.80	3.59	1.14	
(c) α-GalNAc	98.3	51.6	67.9	77.5	71.8	60.9	
	5.10	4.26	4.14	4.10	4.46	3.71	3.62
(d) α-GalNAc	99.7	51.4	68.4	69.6	72.3	60.7	
	5.04	4.20	4.01	4.03	4.36	3.67	3.61
(e) α-GalNAc	99.6	51.6	67.9	77.5	72.4	60.7	
	5.00	4.25	4.12	4.09	4.35	3.67	3.61
(f) α-GalNAc	99.9	50.7	77.5	75.8	72.5	60.5	
	4.98	4.50	4.14	4.32	4.42	3.61	3.53
(g) β-Glc	106.1	74.1	76.9	71.1	77.2	62.1	
	4.51	3.28	3.46	3.35	3.39	3.89	3.68

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】PEB3の精製および分析。a) グリシン抽出物のMono Sカラム上での陽イオン交換クロマトグラフィー。PEB3含有フラクションは、N末端シーケンシングを、SDS-PAGEバンド（指摘のとおりプールし、透析し、凍結乾燥した）で行い同定された。b) Mono Sカラム上で0～0.2M 塩化ナトリウムのより浅い（shallower）勾配を用いた、プールした物質の再分画。挿入図はフラクション30および31のSDS-PAGE分析を示す；これらはPEB3含有フラクションであることが、SDS-PAGEバンドのN末端シーケンシングにより同定された。

【図2】PEB3の陽イオン交換クロマトグラフィー精製からのフラクションのESI-MS分析。a) 図1のフラクション31のESI-MS（透析後）、及びこのスペクトルから取得した、再構築された質量プロファイル（the reconstructed molecular mass profile）。b) 25,454および28,376Daでのピークは、それぞれPEB3およびPEB4と同定された。更なる分析が、26,861Daでの第三のピークがグリコシル化PEB3であることを同定するために必要であった。c) pglB突然変異体から同様に精製されたPEB3のESI-MS、および再構築された質量プロファイル、d) PEB3のグリコシル化した形態の欠損を示し

ている。

【図3】PEB3トリプシングリコペプチド(tryptic glycopeptide)のMS/MS分析。a) m/z 1057.9の二重にプロトン化したグリコペプチドイオンの産物イオン スペクトル。オリゴ糖残基の連続的な欠損(sequential loss)に由来するフラグメント イオンが、前記スペクトル中に示されている。ペプチド配列は、挿入図中に示される。b) m/z 937.4でのグリコペプチドフラグメント イオンの二世代目の産物イオン(Second generation product ion)のスペクトル。前記グリコペプチドは、それが質量分析計に進入した際に、フロントエンド衝突誘導解離(front end collision induced dissociation)(開口部電位 = 100 V)によりフラグメンテーションされた。 m/z 605.3での $b_3 + 228$ フラグメント イオンの観察により、前記オリゴ糖がN-連結型であることが確認された。

10

【図4】SBAアフィニティークロマトグラフィー産物の2Dゲル。タンパク質を2D-PAGE上で2つのpH範囲、a) pH 4-7およびb) pH 6-11に分離し、そして銀染色した。スポットの正体(identities)(Cjナンバリングにより示される)は、それらのトリプシン消化物の質量分析により決定された。同定されたタンパク質の完全なリストを、表Iに示す。

【図5】SBAアフィニティークロマトグラフィー産物のプロナーゼ消化物からのグリコペプチドの精製。a) プロナーゼ消化物のBioGel P4 200メッシュ上でのサイズ排除クロマトグラフィー。b) BioGel P2ファイングレード上でのP4からのプールした物質の再分画。両方のフラクションにおいて、糖タンパク質含有フラクション(glycoprotein-containing fractions)がMSにより同定され、そしてプールされた(バーで指摘される)。c) 上記Bからのフラクション10のESI-MSスペクトル。 m/z 770.5での二重にプロトン化したイオン(MH_2^{2+})は、Asnに連結した七糖類に対応する。いくつかの大きなイオンも観察され、それは第二のアミノ酸残基(a second amino acid residue)の付加によるものである。主要なグリカン含有イオン(glycan-containing ions)のアミノ酸組成(amino acid compositions)は、前記スペクトル上に示される。

20

【図6】グリコペプチドの構造および 1H スペクトル。a) 前記グリコペプチドの推論上の構造(Deduced structure)。b) P2カラム上での最終的な精製後のスペクトル(D_2O 、35、1mM重水素化型EDTA)。領域4.4から5.4 ppmにおける、アノマー糖共鳴(anomeric sugar resonances)がラベルされる。

30

【図7】前記グリコペプチドでの1D選択的なNMR実験(1D selective NMR experiments)。a) 1D TOCSY(g1f2, 15 Hz, 144 ms)、b) 1D TOCSY(e1f1, 25 Hz, 144 ms)、c) 1D TOCSY(d1, 20 Hz, 144 ms)m、d) 1D TOCSY(b6, 50 Hz, 66 ms) ここで*はペプチド共鳴、e) 1D TOCSY(b1c1, 40 Hz, 151 ms)、f) 1D TOCSY(a1, 25 Hz, 144 ms)、g) 1D NOESY(g1f2, 15 Hz, 400 ms)、h) 1D NOESY(f1, 10 Hz, 400 ms)、i) 1D NOESY(e1, 10 Hz, 400 ms)、j) 1D NOESY(d1, 20 Hz, 400 ms)、k) 1D NOESY(b1c1, 40 Hz, 400 ms)、I) 1D NOESY(a1, 40 Hz, 400 ms)。

40

【図8】pgl座位およびpglB突然変異体のキャラクタリゼーション。a) C.jejuni NCTC11168の一般的なタンパク質糖鎖形成座位(general protein glycosylation locus)の遺伝子模式図(Gene schematic)。Neisseria spp.のpgl座位における遺伝子に相同な遺伝子は、灰色の矢印で示される。前記座位の下に示されるpglBにおける突然変

50

異は、pEAp26を用いて構築された。b)からe) C. jejuniの野生型および同質遺伝子的なpglB突然変異体の二次元ゲル分析。b)およびd) 2Dゲルのコロイド性のクーマシー染色(それぞれ野生型および突然変異体の免疫プロットの前)。c)およびe) それぞれ野生型および突然変異体のHS:2セロタイピング血清による、タンパク質の免疫検出。矢印は、ゲル移動(gel migration)および/または免疫反応性の何れかにおいて差異を示したタンパク質を指摘している;これらはマスフィンガープリント法による同定のために摘出された。スポットの正体は、それらのCjナンバリングにより示される。分子量タンパク質マーカー(kDa)の質量は、左に示される。

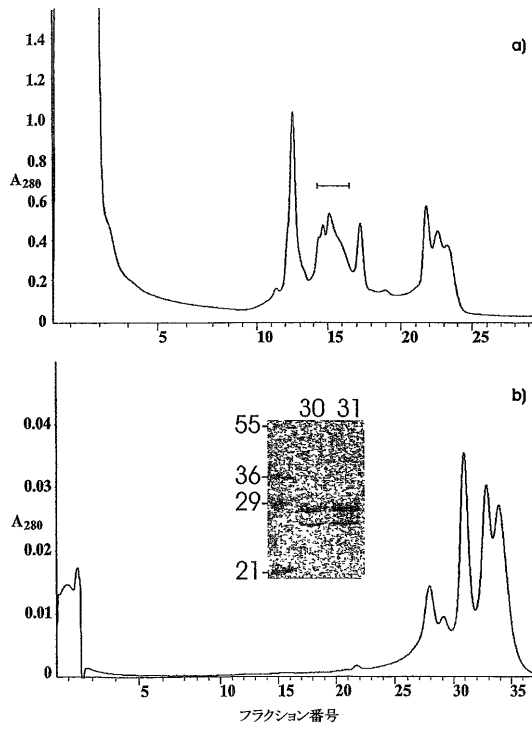
【図9】多様なカンピロバクター株のHR-MASプロトンNMRスペクトルにおけるN連結型グリカンの検出。N連結型グリカンの構造を、前記スペクトルの上部に示す。a) C. jejuni NCTC11168における精製されたN連結型グリカンのスペクトルは、aからgとラベルされたアノマー共鳴を示している。HR-MAS NMRスペクトラを10msのCPMGフィルターを用いて、次の細胞全体で測定した、b) C. jejuni NCTC11168、c) C. jejuni NCTC11168 kpsM-、d) C. jejuni HS:19血清株、e) C. coli HS:30血清株、およびf) C. jejuni NCTC11168 pglB-。b)からe)における共通の共鳴(a)におけるものと比較した)は、垂直方向の点線で示される。HOD共鳴(4.8ppmでの)は、飽和され(saturated)、デジタル方式でフィルターされた。

【図10】C. jejuni HS:19細胞および精製されたN連結型グリカンの選択的なNMR実験の比較。C. jejuni HS:19のHR-MASスペクトル(a), c), e), g)および精製されたN連結型グリカンのNMRスペクトル(b), d), f), h)。a)NOESY[a1, 90Hz, 250ms]。b)NOESY[a1, 40Hz, 400ms]。c)NOESY[b1c1, 60Hz, 250ms]。d)NOESY[b1c1, 40Hz, 400ms]。e)NOESY[d1e1f1, 90Hz, 250ms]。f)NOESY[d1, 20Hz, 400ms]およびNOESY[e1f1, 25Hz, 400ms]の合計。g)TOCSY[g1f2, 72Hz, 47ms]。h)TOCSY[g1f2, 15Hz, 33ms]。

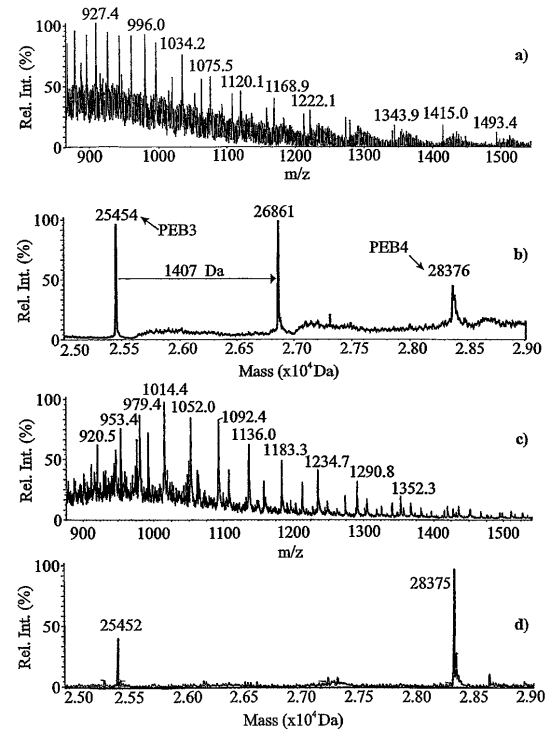
【図11】C. jejuni NCTC11168における精製されたN連結型グリカンのスペクトルが比較のために示される(aからgでラベルしたアノマー共鳴を示し、垂直方向の点線で示される共通の共鳴を有している)。

【図12】N-結合型Pglグリカンの表面暴露を実証するための、高分解能マジック角スピニングNMR(塩化コバルトの有無で)。

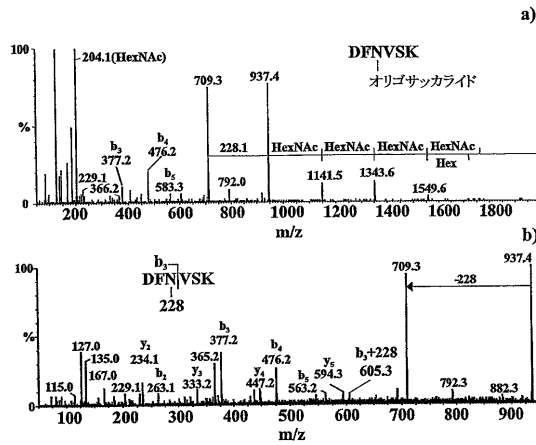
【図 1】



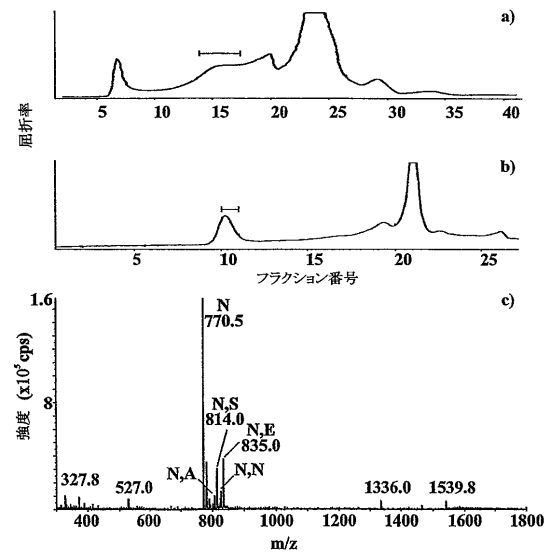
【図 2】



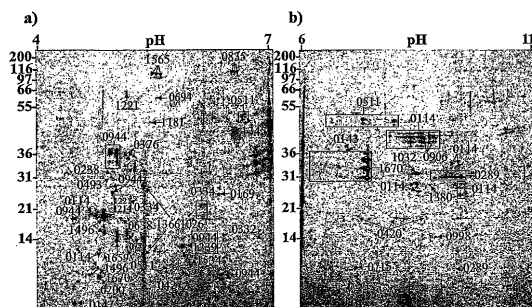
【図 3】



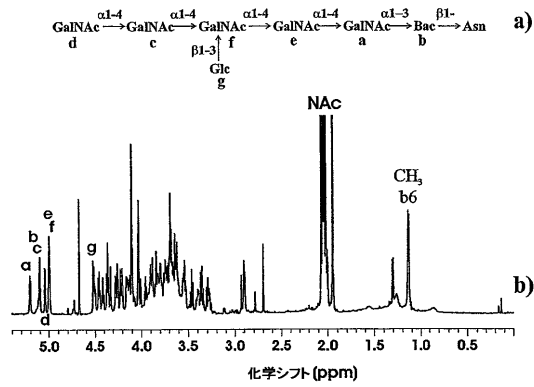
【図 5】



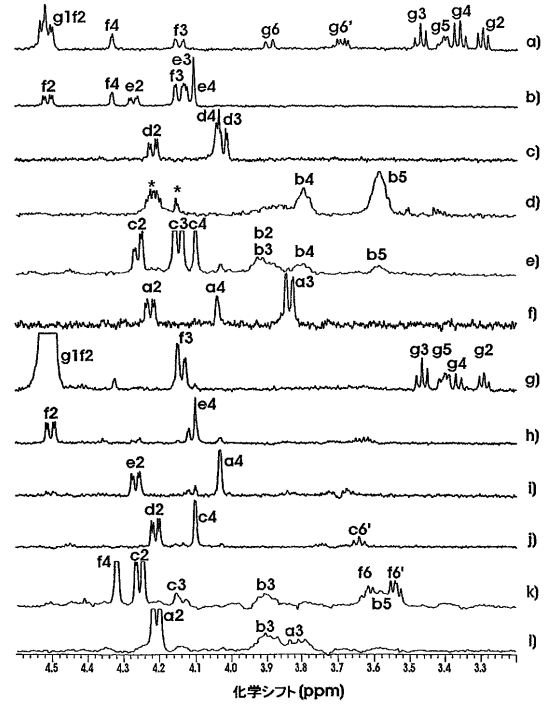
【図 4】



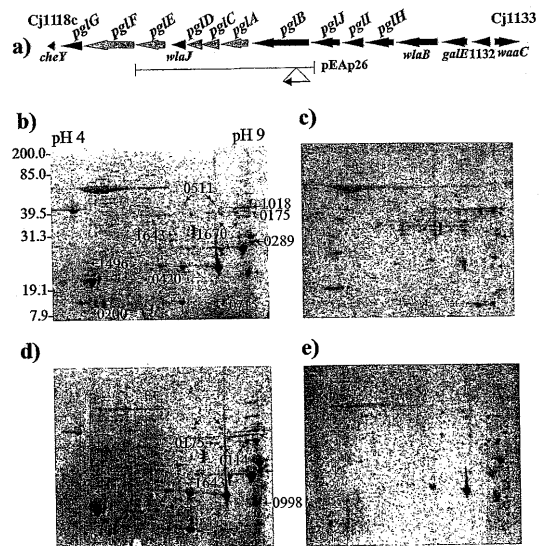
【図 6】



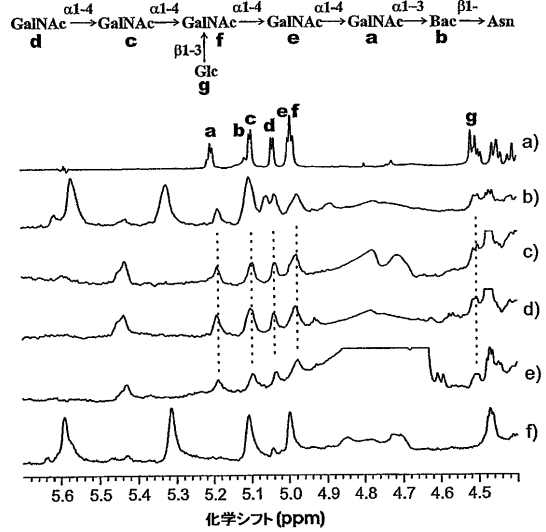
【図 7】



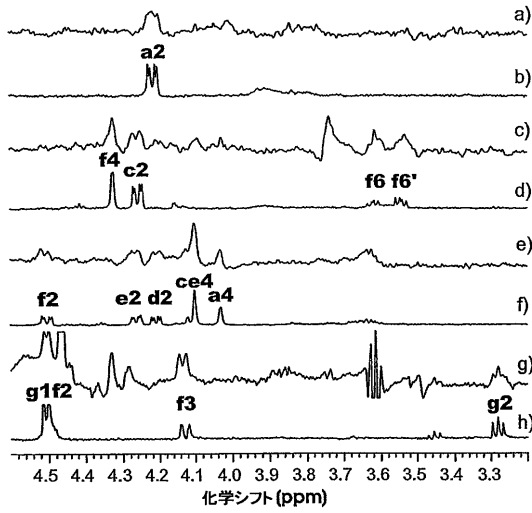
【図 8】



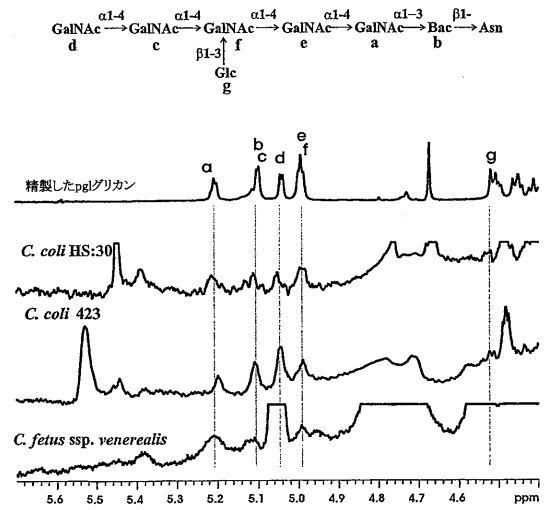
【図 9】



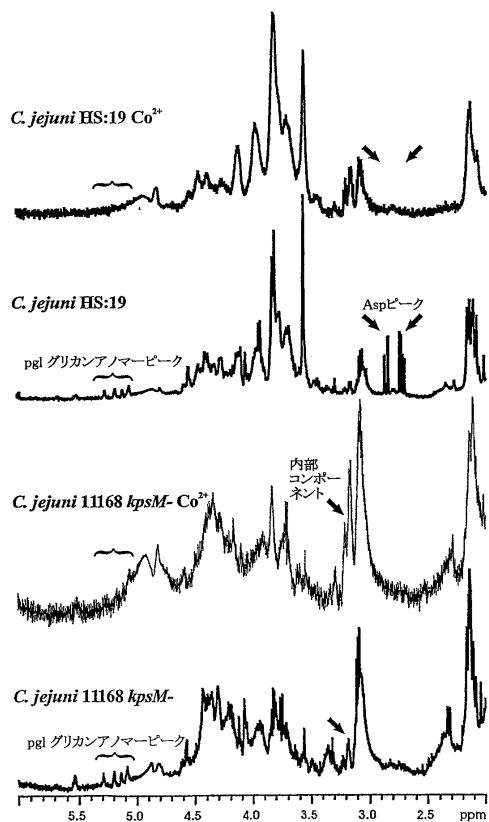
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
- (74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三
- (74)代理人 100141933
弁理士 山下 元
- (72)発明者 ヤング、ノエル・エム .
カナダ国、ケー 1 ピー・3 ゼット 6、オンタリオ州、オタワ、イースト・パーク・ドライブ 5 1
- (72)発明者 ブリッソン、ジャン - ロバート
カナダ国、ケー 1 エス・1 エー 2、オンタリオ州、オタワ、シムコー・ストリート 1 4
- (72)発明者 ケリー、ジョン・フランシス
カナダ国、ケー 4・1 イー 5、オンタリオ州、オタワ、ピー・オー・ボックス 6 4、ダンニング
・ロード 1 1 0 6
- (72)発明者 ワトソン、デイビッド・シー
カナダ国、ケー 1 ワイ・1 ティー 8、オンタリオ州、オタワ、メルローズ・アベニュー 6 5
- (72)発明者 スズイマンスキ、クリスティン・エム
カナダ国、ケー 1 シー・6 ジー 3、オンタリオ州、オタワ、トーネイ・ドライブ 6 5 7 3
- (72)発明者 ジャーレル、ハロルド・シー
カナダ国、ケー 4 シー・1 アール 6、オンタリオ州、オタワ、ジョージズ・パニエー・ドライバー
1 3 4 0

審査官 福井 悟

- (56)参考文献 特表平 0 9 - 5 0 2 6 0 4 (J P , A)
臨床と微生物, 2 0 0 0 年, 27,4, 407-411

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C08B 1/00-37/18

A61K 39/395

A61K 39/106

CA/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)