世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 G01N 33/569, C12P 21/02, 21/08 C12N 15/10, 15/31, C07K 13/00 // (C12N 15/31, C12R 1:445)	A1	(11) 国際公開番号 WO 93/07487 (43) 国際公開日 1993年4月15日(15.04.1993)

(21) 国際出願番号 PCT/JP92/01317
(22) 国際出願日 1992年10月9日(09. 10. 92)

(30) 優先権データ
特願平3/290742 1991年10月9日(09. 10. 91) JP
特願平4/129956 1992年4月23日(23. 04. 92) JP

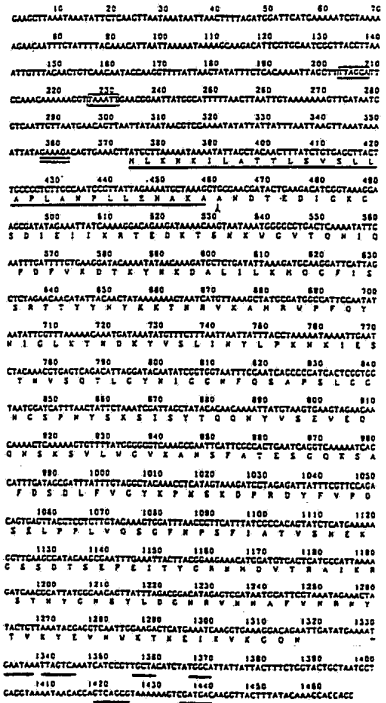
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
株式会社 ヤトロン(IATRON LABORATORIES, INC.)〔JP/JP〕
〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
神尾好是(KAMIO, Yoshiyuki)〔JP/JP〕
〒981-32 宮城県仙台市泉区住吉台東2-1-1 Miyagi, (JP)
伊崎和夫(IZAKI, Kazuo)〔JP/JP〕
〒981-33 宮城県黒川郡富谷町東向陽台2-15-14
Miyagi, (JP)
喜多 寛(KITA, Hiroshi)〔JP/JP〕
〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
株式会社ヤトロン内 Tokyo, (JP)
(74) 代理人
弁理士 森田憲一(MORITA, Kenichi)
〒174 東京都板橋区志村2丁目14番18号
秀和志村城山レジデンス204号 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AT(欧州特許), BE(欧州特許), CA, CH(欧州特許),
DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許),
GB(欧州特許), GR(欧州特許), IE(欧州特許), IT(欧州特許),
LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許),
US.

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : METHOD OF DETECTING MESITYLENE-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS, NOVEL PEPTIDE, AND DNA CODING FOR SAME

(54) 発明の名称 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法、新規ペプチド及びそれをコードするDNA



(57) Abstract

A method of detecting mesitylene-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with an antibody against proleucocidin or leucocidin; a DNA which codes for proleucocidin or leucocidin and a process for producing the DNA; a process for producing proleucocidin or leucocidin by using the DNA; and proleucocidin or leucocidin produced thereby. MRSA can be detected rapidly and accurately.

(57) 要約

プロロイコシジン又はロイコシジンに対する抗体を用いることを特徴とする、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）の検出方法、プロロイコシジン又はロイコシジンをコードするＤＮＡ及びその製造方法、並びにそのＤＮＡを用いるプロロイコシジン又はロイコシジンの製造方法及びプロロイコシジン又はロイコシジン。迅速且つ正確なＭＲＳＡの検出が可能になる。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバードス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
FI フィンランド
ES スペイン
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリー
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
SU ソヴィエト連邦
TD チャード
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国
VN ヴェトナム

明 細 書

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法、新規ペプチド及びそれをコードするＤＮＡ

技術分野

本発明は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin Resistant Staphylococcus aureus；以下、ＭＲＳＡと称することがある）が特異的に産生する新規のペプチド、そのペプチドをコードするＤＮＡ、及び前記ペプチドに対する抗体を用いる前記ＭＲＳＡの検出方法に関する。

背景技術

黄色ブドウ球菌は、通性嫌気性のグラム陽性球菌で、自然界に広く分布し、院内感染や日和見感染の原因となる微生物であり、腎盂炎、膀胱炎、膿痂疹、限局性膿症、骨髄炎、敗血症等の起炎菌として重視されている。黄色ブドウ球菌の中に、染色体変異により多種の抗生物質に対して高度の耐性を有するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）が存在する。このＭＲＳＡは、高齢者や新生児、ガン患者等のような抵抗力の衰えた人の体内で増殖し、肺炎や敗血症等を引き起こし、死亡させることがある。従って、ＭＲＳＡ感染を適格に診断することは臨床的に極めて重要である。

ＭＲＳＡの検出方法としては、生体液（血液、尿、唾液等）からＭＲＳＡを分離して同定する方法や薬剤耐性試験が行われているが、確定するには煩雑な手順を経る必要があった。ＭＲＳＡ感染の診断は、早期に、高感度で、正確に判定する必要があるにもかかわらず、これらの要望に応じることのできる手法は従来存在しなかった。

本発明者は、ＭＲＳＡが特異的に産生するペプチドが存在することを見出し、そのペプチド（即ち、ロイコシジン）の部分アミノ酸配列を利用してオリゴヌクレオチドプローブを合成し、そのプローブを用いてロ

イコシジン及びその前駆体（プロロイコシジン）をコードするＤＮＡをクローン化し、更にクローン化ＤＮＡを用いてロイコシジンＳ及びＦ、並びにプロロイコシジンＳ及びＦを発現させることに成功した。また、前記ロイコシジンＳ及びＦ、並びにプロロイコシジンＳ及びＦに対する抗体を作成し、ＭＲＳＡ検出用の抗体としての評価を行ったところ、迅速かつ正確で特異的にＭＲＳＡを検出することができることを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

発明の開示

従って、本発明は、式

Ala Asn Asp Thr Glu Asp Ile Gly
Lys Gly Ser Asp Ile Glu Ile Ile
Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser
Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn
Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp
Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu
Ile Leu Lys Met Gln Gly Phe Ile
Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Tyr Asn
Tyr Lys Lys Thr Asn His Val Lys
Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr
Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp
Lys Tyr Val Ser Leu Ile Asn Tyr
Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Ser
Thr Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly
Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln
Ser Ala Pro Ser Leu Gly Gly Asn
Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser
Ile Ser Tyr Thr Gln Gln Asn Tyr
Val Ser Glu Val Glu Gln Gln Asn
Ser Lys Ser Val Leu Trp Gly Val
Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr Glu
Ser Gly Gln Lys Ser Ala Phe Asp

Ser Asp Leu Phe Val Gly Tyr Lys
Pro His Ser Lys Asp Pro Arg Asp
Tyr Phe Val Pro Asp Ser Glu Leu
Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe
Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val
Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp
Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr
Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His
Ala Ile Lys Arg Ser Thr His Tyr
Gly Asn Ser Tyr Leu Asp Gly His
Arg Val His Asn Ala Phe Val Asn
Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu
Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile
Lys Val Lys Gly Gln Asn

のアミノ酸配列を有するペプチド又はそのペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡに関するものである。

また、本発明は式

Met Leu Lys Asn Lys Ile Leu Ala
Thr Thr Leu Ser Val Ser Leu Leu
Ala Pro Leu Ala Asn Pro Leu Leu
Glu Asn Ala Lys Ala Ala Asn Asp
Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser
Asp Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr
Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp
Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln Phe
Asp Phe Val Lys Asp Thr Lys Tyr
Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu Lys
Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg
Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys Lys
Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg
Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly
Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val
Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys
Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val

Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile
Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro
Ser Leu Gly Gly Asn Gly Ser Phe
Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr
Thr Gln Gln Asn Tyr Val Ser Glu
Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser
Val Leu Trp Gly Val Lys Ala Asn
Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln
Lys Ser Ala Phe Asp Ser Asp Leu
Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser
Lys Asp Pro Arg Asp Tyr Phe Val
Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu
Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu
Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn
Met Asp Val Thr His Ala Ile Lys
Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser
Tyr Leu Asp Gly His Arg Val His
Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr
Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp
Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys
Gly Gln Asn

のアミノ酸配列を有するペプチド又はそのペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡにも関する。

更にまた、本発明は、式

Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val
Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys
Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala
Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys
Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn
Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp
Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys Ala
Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly Phe

Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp Tyr
Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp Gly
Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile Ser
Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val Asn
Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn
Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln
Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Gly
Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn Gly
Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly Asn
Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile Asn
Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr
Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Lys
Asn Val Gly Trp Gly Val Glu Ala
His Lys Ile Met Asn Gly Trp Gly
Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe His
Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe
Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser Ala
Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile Ala
Gln His Gln Met Pro Leu Leu Ser
Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg Phe
Leu Ser Val Leu Ser His Arg Gln
Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys Ile
Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met
Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp Asn
Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala Asn
Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg Thr
Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Asp
Trp Glu Asn His Lys Val Lys Leu
Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn
Asn Lys

のアミノ酸配列を有するペプチド又はそのペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡに関する。

また、本発明は、式

Met Lys Met Asn Lys Leu Val Lys

Ser Ser Val Ala Thr Ser Met Ala
Leu Leu Leu Leu Ser Gly Thr Ala
Asn Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro
Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp
Lys Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe
Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr
Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
Ala Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly
Phe Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp
Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp
Gly Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile
Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val
Asn Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys
Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val
Gln Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe
Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn
Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile
Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr
Lys Asn Val Gly Trp Gly Val Glu
Ala His Lys Ile Met Asn Gly Trp
Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe
His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu
Phe Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser
Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile
Ala Gln His Gln Met Pro Leu Leu
Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg
Phe Leu Ser Val Leu Ser His Arg
Gln Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys
Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu
Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp

Asn Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala
Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg
Thr Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile
Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys
Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu
Asn Asn Lys

のアミノ酸配列を有するペプチド又はそのペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡに関する。

更には、本発明は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌体から染色体ＤＮＡを分離し、制限酵素で消化し、得られたＤＮＡ断片をベクターに挿入し、そのベクターで宿主を形質転換してＤＮＡライブラリーを作製し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌体から精製したロイコシジン又はプロロイコシジンの部分アミノ酸配列をコードする合成ＤＮＡをプローブとして用いて前記ＤＮＡライブラリーからロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡを選び、得られたＤＮＡをクローン化することを特徴とする、ロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡの製法に関する。

そして、本発明は、ロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡを発現ベクターに連結して複製可能な組換えＤＮＡを作製し、この組換えＤＮＡで宿主を形質転換し、その形質転換体を培養して前記のロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡを発現させてロイコシジン又はプロロイコシジンを産生させ、得られたロイコシジン又はプロロイコシジンを単離する特徴とする、ロイコシジン又はプロロイコシジンの製法に関する。

更に、本発明は、プロロイコシジン又はロイコシジンに対する抗体を用いることを特徴とする、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法にも関する。本明細書の塩基配列において、Ａはアデニン残基、Ｃはシトシン残基、Ｇはグアニン残基そしてＴはチミン残基の意味である。

図面の簡単な説明

第１図は、ＴＳＫゲルＳＰ－５ＰＷカラムを備えたＨＰＬＣによって、ＭＲＳＡ菌株Ｎｏ．４からロイコシジンのＳ画分を精製した結果を示すグラフである。Ｓ画分をイムノブロッティングによって定量した（第１図の点描部がＳ画分である。）

第２図は、ＭＲＳＡ菌株Ｎｏ．４及び黄色ブドウ球菌Ｖ８からの精製Ｓ画分調製物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動パターンの結果を示す。レーン１は黄色ブドウ球菌Ｖ８からのＳ画分であり、レーン２はＭＲＳＡ菌株Ｎｏ．４からのＳ画分であり、レーン３は分子量マーカーである。使用した分子量マーカーは以下のとおりである。

１…ホスホリラーゼ（９７．４ｋＤａ）、
２…ウシ血清アルブミン（６６．２ｋＤａ）、
３…オバルブミン（４５ｋＤａ）、
４…ウシカルボニックアンヒドラーゼ（３１ｋＤａ）、
５…大豆トリプシンインヒビター（２１．５ｋＤａ）、
６…リゾチーム（１４．４ｋＤａ）。

第３図は、プラスミドベクターｐＵＣ１１９にＨｉｎｄIII-ＸｂａI断片（２．２ｋｂ）を挿入した状態を示す説明図である。第３図の略号は以下の通りである。

Ｈ…ＨｉｎｄIII；Ｅ…ＥｃｏＲＩ；Ｘ…ＸｂａＩ；Ｂ…ＢａｍＨＩ；Ｋ…ＫｐｎＩ。

第４図は、ＨｉｎｄIII-ＸｂａI断片（２．２ｋｂ）の制限酵素地図である。ロイコシジン（Ｓ画分）コード領域を矢印で示す。２本線部分は挿入された２．２ｋｂ断片であり、１本線部分はベクタープラスミドｐＵＣ１１９のポリリンカー領域である。略号は以下の通りである。

Ｈ…ＨｉｎｄIII；Ｅ…ＥｃｏＲＩ；Ｘ…ＸｂａＩ；Ｂ…ＢａｍＨＩ；Ｋ…ＫｐｎＩ。

第５図は、ロイコシジン（Ｓ画分）コード領域の塩基配列及びそれから演繹されるロイコシジン（Ｓ画分）のアミノ酸配列である。配列は、制限酵素ＨｉｎｄIII の認識塩基配列の最初のヌクレオチドを１番目とし、

ｐＳＲＫ９１－１ＤＮＡの最後のヌクレオチドを１，４６６番目として示す。２本の下線で示した部分はリボソーム結合（推定）部位であり、長方形で囲った部分は（推定）プロモーター部位である。平行方向の矢印は翻訳停止コドンの下流にある３か所の逆位反復配列を示し、１本の下線で示した部分はシグナル配列であり、クサビ型で示した部分はＳ画分前駆体のプロセシング部位である。

第６図は、プラスミドｐＳＲＫ９１がコードするインビトロ翻訳産生物に関する電気泳動の結果を示す。レーン１はｐＳＲＫ９１ＤＮＡがコードするインビトロ産生物であり、レーン２はｐＵＣ１１９がコードするインビトロ産生物であり、ＰＳはＳ画分前駆体である。

第７図は、ウエスタンブロッティングの結果を示し、（Ａ）のレーン１は精製Ｓ画分であり、レーン２は大腸菌（ｐＳＲＫ９１）の細胞抽出物であり、レーン３は大腸菌（ｐＵＣ１１９）の細胞抽出物であり、レーン４は大腸菌（ｐＳＲＫ９１）の培養液であり、レーン５は大腸菌（ｐＵＣ１１９）の培養液である。

（Ｂ）は大腸菌ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）からの細胞抽出液中のＳ画分の分析結果であり、レーン１はＩＰＴＧ存在下、レーン２はＩＰＴＧ不在下、そしてレーン３はＳ画分標準品である。

第８図は、大腸菌ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）の細胞画分のウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン１は標準Ｓタンパク質であり、レーン２はショックを与えた細胞画分であり、レーン３はペリプラズム空間であり、レーン４は全細胞画分であり、レーン５は培養液である。

第９図は、ＴＳＫゲルＳＰ－５ＰＷカラムを備えたＨＰＬＣによって、ＭＲＳＡ菌株Ｎｏ．４からロイコシジンのＦ画分を精製した結果を示すグラフである。Ｆ画分をイムノブロッティングによって定量した。（第９図の斜線部がＦ画分である。）

第１０図は、ＭＲＳＡ菌株Ｎｏ．４及び黄色ブドウ球菌Ｖ８からの精製Ｆ画分調製物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動パターンの結果を示す。レーン１は黄色ブドウ球菌Ｖ８からのＦ画分であり、レーン２はＭＲＳＡ

菌株Ｎｏ．４からのＦ画分であり、レーン３は分子量マーカーである。使用した分子量マーカーは第２図のものと同じである。

第１１図は、プラスミドベクターｐＵＣ１１９にＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩ断片（４．０ｋｂ）を挿入した状態を示す説明図である。第１１図の略号は第３図の略号と同じ意味である。但しＣはＣｌａＩを意味する。

第１２図は、ＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩ断片（４．０ｋｂ）の制限酵素地図である。ロイコシジン（Ｆ画分）コード領域を、Ｆを含む太い矢印で示す。２本線部分は挿入された４．０ｋｂ断片であり、１本線部分はベクタープラスミドｐＵＣ１１９のポリリンカー領域である。略号は第４図の略号と同じである。なおＣはＣｌａＩを示す。

第１３図は、ロイコシジン（Ｆ画分）コード領域の塩基配列及びそれから演繹されるロイコシジン（Ｆ画分）のアミノ酸配列である。配列は、制限酵素ＥｃｏＲＩの認識塩基配列の最初のヌクレオチドを１番目とし、ｐＦＲＫ９２ＤＮＡの最後のヌクレオチドを２，０１２番目として示す。長方形で囲った部分は（推定）プロモーター部位である。平行方向の矢印は翻訳停止コドンの下流にある逆位反復配列を示し、１本の下線で示した部分はシグナル配列であり、クサビ型で示した部分はＦ画分前駆体のプロセシング部位である。

第１４図は、プラスミドｐＦＲＫ９２がコードするインビトロ翻訳産生物に関する電気泳動の結果を示す。レーン１はｐＦＲＫ９２ＤＮＡがコードするインビトロ産生物であり、レーン２はｐＵＣ１１９がコードするインビトロ産生物であり、ＰＦはＦ画分前駆体である。

第１５図は、ウエスタンブロッティングの結果を示し、レーン２は精製Ｆ画分であり、レーン１は大腸菌（ｐＦＲＫ９２）の細胞抽出物であり、レーン３は大腸菌（ｐＵＣ１１９）の細胞抽出物であり、レーン４は大腸菌（ｐＦＲＫ９２）の培養液であり、レーン５は大腸菌（ｐＵＣ１１９）の培養液である。

第１６図は、大腸菌ＤＨ５α（ｐＦＲＫ９２）の細胞画分のウエスタ

ンブロッティングの結果を示す。レーン１は標準Ｆタンパク質であり、レーン３はショックを与えた細胞画分であり、レーン２はペリプラズム空間である。

発明を実施するための最良の形態

黄色ブドウ球菌が産生する或る細胞変性外毒素は、２つのタンパク質画分〔即ち、カチオン交換クロマトグラフィーで分離した場合に早く溶出されるＦ画分（ｆａｓｔ－ｅｌｕｔｅｄ）及び遅く溶出されるＳ画分（ｓｌｏｗ－ｅｌｕｔｅｄ）〕とからなり、これらのＳ画分及びＦ画分はそれぞれ単独では不活性であるが、両者が協同して活性型となり、ヒトやラビットの多核性白血球に細胞毒性変化を起こすことが知られていた。しかしながら、これらの各画分の化学構造やその機能との関係等は従来全く分かっていなかった。本発明者が遺伝子工学の手法により見出したところによれば、後に詳述するように、前記のＳ画分はアミノ酸２８６個からなるタンパク質（成熟体：ロイコシジン）であり、そのタンパク質は細胞内においてアミノ酸３１５個からなる前駆体（プロロイコシジン）として生成されていることが分かった。また、前記のＦ画分はアミノ酸２９８個からなるタンパク質（成熟体：ロイコシジン）であり、そのタンパク質は細胞内においてアミノ酸３２３個からなる前駆体（プロロイコシジン）として生成されていることも分かった。以下、ロイコシジン及びプロロイコシジンをコードするＤＮＡのクローニング及びそのＤＮＡの発現について説明する。

（Ａ）ロイコシジンＳ画分及びＦ画分の精製及びアミノ酸部分配列の解明

ロイコシジンＳ画分及びＦ画分は、それぞれメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）の培養上清に含まれる。この培養上清に塩化亜鉛を加えて沈殿させ、この沈殿をリン酸ナトリウムで処理して得られる粗精製品をイオン交換クロマトグラフィーにより精製してロイコシジンＳ画分及びＦ画分を得ることができる。得られたロイコシジンＳ画分及びＦ

画分のアミノ酸の部分配列は、例えばエドマン分解等により、解明することができる。

（Ｂ）プローブの合成

前記（Ａ）項で決定したアミノ酸の部分配列の適当な部分を選択してプローブを合成することができる。プローブとして用いるＤＮＡの合成には、公知の方法〔例えば、ＤＮＡ自動合成機を利用するホスホアミダイト法、日本生化学会編：遺伝子研究法Ｉ，１－２７，（１９８６）又はＭａｔｔｅｕｃｃｉら：Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，２１，７１９，（１９８０）〕を使用することができる。

（Ｃ）ＤＮＡの抽出

培養上清にロイコシジン（Ｓ画分及びＦ画分）を産生しているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）からＤＮＡを抽出する。染色体ＤＮＡは、菌体を５０ｍＭグルコース及び２５ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．９）中でリゾスタフィンで処理した後、ＳＤＳで溶出させ、抽出する。抽出ＤＮＡは、Ｍａｎｉａｔｉｓらの方法〔Ｍａｎｉａｔｉｓら：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，（１９８２）〕を用いて精製すればよい。

（Ｄ）ベクターへのＤＮＡの挿入

ＤＮＡをベクターへ挿入するには、例えば、ｐＵＣ系又はｐＢＲ系のベクターへ前記のＭａｎｉａｔｉｓらの方法を利用することができる。

（Ｅ）スクリーニング

前記（Ｄ）項で作成されたＤＮＡライブラリーから、目的遺伝子を含むコロニーをスクリーニングするには、前記（Ｂ）項で作成されたプローブを用いることができる。まず、コロニーをナイロンメンブラン又はニトロセルロース等のフィルターメンブラン上に焼き付ける（ベイキング）。また、前記（Ｂ）項で得られたそれぞれのプローブを、Ｍａｎｉａｔｉｓらの前記文献に記載の方法等により〔^{32}Ｐ〕等の放射

性同位体でラベルする。前記フィルターメンブラン上に焼き付けたプラークと、前記^{32}P等でラベルしたプローブとをハイブリダイゼーションさせ、目的遺伝子を含むプラークのスクリーニングを行うことができる。更に、ＤＮＡライブラリーからの、目的遺伝子を含むプラークのスクリーニングに、Ｇｌｏｖｅｒ：ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，１，５１－５２，ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓに記載されている方法を用いることもできる。即ち、目的とするＤＮＡから発現したタンパク質の活性を検出したり、そのタンパク質に特異的な抗体を用いて目的とするＤＮＡから発現したタンパク質を検出することにより、目的とするＤＮＡを同定する、抗体によるスクリーニング方法である。

（Ｆ）サブクローニング

サブクローニングに用いるベクターとしては、例えばｐＵＣ系列又はｐＢＲ系列のプラスミドを挙げることができる。前記のスクリーニング工程によって選択されたプラーク又はコロニーからファージＤＮＡ又はプラスミドＤＮＡを取り出して精製し、適当な制限酵素で消化し、サブクローニング用ベクターに挿入する。こうして得られる組換えベクターを、例えば、Ｈａｎａｈａｎら：Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１６６，５５７－５８０，（１９８３）に記載の方法によって、コンピテント細胞に導入する。宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌又は酵母、例えば、大腸菌Ｋ１２株由来のものを挙げることができる。こうして得られた形質転換体を、例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓらの前記文献に記載の方法、例えば、イソプロピルチオガラクトシダーゼ（ＩＰＴＧ）を用いる方法によって選定することができる。

（Ｇ）プラスミドＤＮＡの調製

サブクローニングによって得られたクローンから、例えば、Ｍａ－ｎｉａｔｉｓらの前記文献に記載のアルカリ－ＳＤＳ法、又はボイリング法によってプラスミドＤＮＡを精製することができる。必要により、塩化セシウム超遠心法を用いることもできる。

（Ｈ）ＤＮＡの構造解析

前記（Ｇ）項で得られたプラスミドＤＮＡを、各種の制限酵素で切断して制限酵素地図を作成する。更に、ジデオキシ法〔Ｓａｎｇｅｒら：Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１４３，１６１－１７８，（１９８０）〕等によって、ヌクレオチド配列を決定する。

（Ｉ）発現

前記（Ｇ）項で得られたプラスミドＤＮＡを利用し、例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓらの前述の文献に記載の方法により、大腸菌ＹＡ２１株のコンピテント細胞を形質転換してロイコシジンを発現させることができる。発現用の宿主細胞としては、前記の大腸菌ＹＡ２１株の他、大腸菌、枯草菌又は酵母、例えば、大腸菌ＭＭ２９４、ＤＨ１、ＤＨ５、ＪＭ１０９、ＨＢ１０１、ＧＣ５０８又はＣＥＳ２０１等を挙げることができる。

更に、本発明で利用することのできるベクターとしてはＣｏｌＥ１系プラスミドベクターであるｐＵＣ系又はｐＢＲ系を挙げることができる。また、ファージ系ベクターとしては、λファージ由来のλｇｔ１０、λｇｔ１１、Ｃｈａｒｏｎ４Ａ、λｇｔＷＥＳ・λＢ、ＥＭＢＬ３、ＥＭＢＬ４等を挙げることができる。また、酵母用の発現ベクターとしては、例えば、ｐＹＥＳ２．０、ｐＡＨ９、ｐＭＡＣ５６１、ｐＬＧ６６９、ｐＭＡ９１、ｐＡＭ８２、ｐＭＣ２０１０、ｐＯＰ、ｐＴＥ４３２、ｐＳＤ９２２等を挙げることができ、枯草菌用の発現ベクターとしては、例えば、ｐＰＬ６０８、ｐＫＴＨ５０、ｐＫＴＨ５１、ｐＫＴＨ５３、ｐＫＴＨ３８、ｐＨＹ３００、ｐＬＫ等、そして、動物細胞（例えば、ＣＯＳ－７細胞、Ｂｏｗｅｓ黒色腫細胞、ＣＨＯ細胞）用の発現ベクターとしては、例えば、ｐＭＴ、ｐＳＶ、ｐＣＤ、ｐＭＤＳＧ、ｐＢＰＶ等を挙げることができる。

得られた形質転換体を適当な公知の培地において、細胞密度が十分な濃度に達するまで培養する。続いて、例えば超音波処理して細胞を破砕し、その破砕液を、例えば遠心分離してタンパク質や核酸等を含有する細胞上清を得、その細胞上清を公知の方法によって処理してロイコシジ

ンを精製することができる。

精製したロイコシジン又はプロロイコシジンを免疫原として用い、公知の方法、例えば続生化学実験講座（日本生化学会編）の「免疫生化学研究法」等に記載の方法に従って、抗体即ち、抗血清又はモノクローナル抗体を調製することができる。これらの抗体に必要に応じて公知の方法で標識を付ける。例えば、プロロイコシジン又はロイコシジンの検出を、ウエスタンブロットハイブリッド法によって行う場合には、非放射性標識抗体（例えば、酵素標識抗体、ビオチン化抗体、ジゴキシゲニン化抗体又は化学発光物質、蛍光物質で標識した抗体）を用いることができる。

本発明による検査方法で用いることのできる液体試料は、ＭＲＳＡを含有している疑いのある試料であれば特に制限されない。例えば、血液、唾液、尿、固定化遊離細胞、組織切片等を用いることができる。

本発明による検査方法を実施する際には、まず前記液体試料を直接、あるいは適当な希釈液によって希釈した液、又は必要に応じて培養し、その上清を被検試料とし、前記の抗体を用いて免疫学的手段等によって検査を行う。例えば、被検試料をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離し、電気的にニトロセルロースフィルターに吸着させ、標識した一次抗体か、又は標識した二次抗体を用いて同定することができる（いわゆるウエスタンブロッティング法）。別に、抗原－抗体反応による凝集反応も可能である。この場合、抗体はポリスチレン等の不溶性担体に感作した状態でもよい（いわゆるラテックス凝集反応）。また、その他公知のイムノアッセイ系（ＥＬＩＳＡ法、ＥＩＡ法、ＣＬＩＡ法等）への応用が可能である。これらの検出は、その信号を目視的あるいは光学的な手段によって検知することによって容易に行うことができ、その結果からＭＲＳＡ感染の有無を診断することができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明

の範囲を限定するものではない。

実施例１：ＭＲＳＡのマーカータンパク質の精製

培地１０リットル中に酵母エキス（オリエンタル酵母工業）２５０ｇ、カザミノ酸（Ｄｉｆｃｏ）２００ｇ、グリセロ燐酸ナトリウム（和光純薬）２００ｇ、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$－６０ｇ、KH_2PO_4 ４ｇ及び０．１％乳酸ナトリウム（和光純薬）を含む培地（以下、Ａ培地と称することがある）にＭＲＳＡ菌株Ｎｏ．４〔大阪大学微生物病研究所に、ＲＩＭＤ３１０９０２５（ＭＲＳＡＮｏ．４）として寄託されいる〕を接種し、３７℃で振盪培養した。２２時間後に培養液を４℃及び１１，０００×ｇで２０分間遠心して菌体を除き、上清１０リットルを得た。この上清に終末濃度が０．１Ｍになるように塩化亜鉛を加え、撹拌下に放置し、生じた沈殿を４℃及び８，０００×ｇで１５分間の遠心処理して集めた。得られた沈殿を、０．４Ｍ燐酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）１リットルに懸濁し、生じた燐酸亜鉛の沈殿を、４℃にて１０，０００×ｇで２０分間の遠心により除いた。上清を０．２Ｍ食塩含有０．０５Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．２）（以下、緩衝液Ａと称することがある）２０リットルに対して透析した後、硫酸アンモニウムを飽和になるまで加え、撹拌下に６０分間放置した。生じた濁りを、遠心（４℃、１５，０００×ｇ、２０分間）して集めた。得られた沈殿を緩衝液Ａに懸濁し、同じ緩衝液Ａに対して透析した。透析後、緩衝液Ａで平衡化したＣＭ－Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｃ５０カラム（２．５×５０ｃｍ）に載せ、緩衝液Ａ５００ｍｌと１．２Ｍ食塩含有０．０５Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．２）（以下、緩衝液Ｂと称することがある）５００ｍｌとを用いた食塩の直線濃度勾配により、吸着しているタンパク質を溶出した。食塩濃度０．９Ｍで溶出されるＳ画分及び食塩濃度０．５Ｍで溶出されるＦ画分を集め、緩衝液Ａに対して透析した。

透析したＳ画分及びＦ画分は、それぞれＴＳＫ　ＳＰ－５ＰＷゲルのカラム（０．７５×７．５ｃｍ）に載せ、２５ｍｌの０．４Ｍ食塩を含む０．０５Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．２）と同量の緩衝液Ｂを用いた食塩

の直線濃度勾配により精製し、食塩濃度０．７５Ｍで溶出されるＳ画分、及び食塩濃度０．０６～０．０８Ｍで溶出されるＦ画分を集めた。結果を第１図（Ｓ画分）及び第９図（Ｆ画分）に示す。得られたＳ画分及びＦ画分（第１図の点描部及び第９図の斜線部）のＭＲＳＡのマーカータンパク質は、電気泳動的に均一であった。結果を第２図（Ｓ画分）及び第１０図（Ｆ画分）に示す。第２図及び第１０図のレーン１は、それぞれＭＲＳＡの標準株であるブドウ球菌Ｖ８（ＡＴＣＣ２７７３３）を前記と同様に処理して得たＳ画分及びＦ画分であり、レーン２は本実施例１で得たＳ画分及びＦ画分である。

実施例２：ＭＲＳＡのマーカータンパク質の一次構造

前記実施例１で得られたＭＲＳＡのマーカータンパク質の一次構造をＰｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ Ｍｏｄｅｌ ６６００（Ｍｉ－ｌｌｉｐｏｒｅ Ｍｉｌｌｉｇｅｎ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ社）を用いて、エドマン分解法により、Ｓ画分はアミノ末端から５０番目までのアミノ酸配列が次の式（１）で表され、Ｆ画分はアミノ末端から４１番目までのアミノ酸配列が次の式（２）で表されることを明らかにした。

Ala Asn Asp Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser Asp Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu （１）

Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys Ile Ser Glu Ile Leu Thr Phe Asn Phe （２）

Ｓ画分及びＦ画分の有する生物活性〔Pretlow,ら，Immunology, 24, 85-92, (1973)，Rahmanら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 181, 138-144, 1991 に記載の方法で測定〕、精製したＳ画分及びＦ画分の分子量（第２図及び第１０図参照）、及び前記のアミノ酸組成より、実施例１で得られたＭＲＳＡのマーカータンパク質はロイコシジンであることが分かる。

実施例３：プローブの合成

ロイコシジンのＤＮＡをクローニングするためにプローブを合成した。プローブの合成は３８１型自動ＤＮＡ合成装置（アプライドバイオシステム社）を用い、常法により行った。Ｓ画分については、実施例２で決定したアミノ酸配列のアミノ末端から１８番目までのアミノ酸に対応する以下の式（３）で表される５３マーのＤＮＡ、２５番目から４０番目のアミノ酸に対応する以下の式（４）で表される４７マーのＤＮＡ及び２５番目から３１番目のアミノ酸に対応する以下の式（５）で表される２０マーのＤＮＡを合成し、Ｆ画分については、実施例２で決定したアミノ酸配列の１０番目から１５番目までのアミノ酸に対応する以下の式（６）で表される１７マーのＤＮＡ、及び１６番目から２１番目までのアミノ酸に対応する以下の式（７）で表される１８マーのＤＮＡを合成し、混合プローブとして用いた。なお、以下の各式でＩはイノシン残基であり、５’側を左側に、３’側を右側に記載する。

GCI AAT(又はC) GAT(又はC) ACI GAA(又はG) GAT(又はC) ATI GGI AAA (又はG) GGI A(又はT)G(又はC)I GAT(又はC) ATI GAA(又はG) ATI ATI AAA(又はG) AG （３）

AAT(又はC) AAA(又はG) TGG GGI GTI ACI CAA(又はG) AAT(又はC) ATI CAA(又はG) TTT(又はC)GAT(又はC) TTT(又はC) GTI AAA(又はG) GA （４）

AAT(又はC) AAA(又はG) TGG GGI GTI ACI CA （５）

GTI AAA(又はG) AAA(又はG) GTI GAT(又はC) GA （６）

AAA(又はG) GTI ACI C(又はT)TI TAT(又はC) AAA(又はG) （７）

実施例４：ＭＲＳＡ－ＤＮＡの抽出と精製

前記実施例１で使用したＭＲＳＡの菌株Ｎｏ．４を、実施例１に記載

した条件で培養して菌体を集めた。得られた菌体を１０倍量の１０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．５）に懸濁し、リゾスタフィン（シグマ社）（５０μｌ／ｍｌ）で処理した。次に、全体量の０．１容量の１０％ドデシル硫酸ナトリウム塩（以下、ＳＤＳと称することがある）、及び１０ｍＭ－ＥＤＴＡ含有の１０ｍＭトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン－塩酸緩衝液（ｐＨ７．９）（以下、トリス緩衝液１と称することがある）を加えて可溶化した。可溶化された液に、リボ核酸分解酵素（シグマ社）を終末濃度２μｇ／ｍｌになるように加え、３７℃で１時間保温した後、プロテアーゼＫを終末濃度５０μｇ／ｍｌになるように加えて、３７℃で２時間消化した。プロテアーゼ消化液から、フェノール／水／クロロホルムの系でＭＲＳＡのＤＮＡを抽出し、エチルアルコールを水層に加えてＤＮＡを沈殿させ、染色体ＤＮＡをガラス棒に巻き取った。このＤＮＡを１ｍＭ－ＥＤＴＡ含有のトリス緩衝液（ｐＨ７．６）（以下、トリス緩衝液３と称することがある）に溶かし、ＭＲＳＡ－ＤＮＡ標品として、以下の実験に用いた。

実施例５：ＭＲＳＡ－ＤＮＡ断片とプラスミドＤＮＡとの結合

前記実施例４で得たＭＲＳＡのＤＮＡ５μｌ（１５μｇ／ｍｌ）を、制限酵素ＨｉｎｄIII（２０単位）、１００ｍＭ－$MgCl_2$、１０ｍＭジチオスレイトール含有１００ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．５）２μｌ及び蒸留水を加えて２０μｌにした反応液中で、３７℃で４時間消化し、更に制限酵素ＸｂａＩ（２０単位）、１００ｍＭ－$MgCl_2$、１０ｍＭジチオスレイトール、５０ｍＭ食塩、０．１％牛血清アルブミン（以下、ＢＳＡと称することがある）含有トリス緩衝液（ｐＨ７．５）２μｌ及び蒸留水を加えて２０μｌにした反応液中で３７℃にて１０分間、部分消化して、ＭＲＳＡのＤＮＡ断片を調製した（Ｓ画分）。Ｆ画分については制限酵素ＥｃｏＲＩ（２０単位）を用いて行った。

他方、同じ条件でＳ画分として制限酵素ＸｂａＩ及びＨｉｎｄIII を用い、Ｆ画分として制限酵素ＥｃｏＲＩを用い、ｐＵＣ１１９プラスミドＤＮＡ（宝酒造；１９．５μｌ）に３Ｍ食塩１．０μｌ、０．１Ｍトリ

ス緩衝液（ｐＨ８．０）２．５μｌ、細菌由来のアルカリフォスファターゼ（宝酒造、大腸菌Ａ１９）（以下、ＢＡＰと称することがある）２μｌを加え、６５℃で１時間処理した。ＢＡＰ処理したｐＵＣ１１９プラスミドＤＮＡを、反応液にトリス緩衝液３（２５μｌ）及び３Ｍ酢酸ナトリウム（１５μｌ）を加えて実施例４に記載した条件で抽出し、エチルアルコールを加えて沈殿させ、室温で３０分間乾燥させ、蒸留水３０μｌに溶解した。前記の方法で調製したＭＲＳＡ－ＤＮＡ断片０．４５μｇとＢＡＰ処理したｐＵＣ１１９プラスミドＤＮＡ－０．１５μｇ（８．７４μｌ）の混合液に、ＤＮＡリガーゼ（Ｔａｋａｒａ　ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ）のＡ液を８容量、Ｂ液を１容量加え、１６℃で一夜反応させた。反応終了後の本反応液を溶液Ｉと呼ぶ。

実施例６：プラスミドｐＳＲＫ９１及びｐＦＲＫ９２による細菌の形質転換

アンピシリン感受性大腸菌ＤＨ５α（ニッポンジーン）の一白金耳を、トリプトン１０ｇ／リットル、酵母エキス１０ｇ／リットル及び食塩５ｇ／リットルの組成の２ＸＹＴ培地５ｍｌに接種し、３７℃で一夜培養した培養液３６０μｌを採り、新鮮な２ＸＹＴ培地３６ｍｌに移し、３７℃で、６００ｎｍの濁度が０．４になるまで振盪培養を続けた。その培養液２５ｍｌを採り、遠心により菌体を集め、冷５０ｍＭ $CaCl_2$（１２．５ｍｌ）に懸濁した。この懸濁液を溶液IIと呼ぶ。

実施例５で調製した溶液Ｉ（２０μｌ）と前記溶液II（２００μｌ）を混合し、０～５℃で３０分間放置した後、温度を４２℃に上げて４５秒間更に放置した。次いで、３７℃に予熱したアンピシリン含有トリプトン１０ｇ／リットル、酵母エキス５ｇ／リットル及び食塩１０ｇ／リットルの組成で、ｐＨ７．５のＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ培地（以下、ＬＢ培地と称することがある）７８０μｌを加え、３７℃で１時間振盪培養した。この培養液を、３７℃に保持したアンピシリン含有ＬＢ培地の寒天平板上にプレイティングし、３７℃で一夜培養した。

実施例７：ＭＲＳＡのロイコシジンのクローンのスクリーニング

実施例６で得られた形質転換処理を受けた菌を、アンピシリン含有ＬＢ寒天平板培地に接種し、３７℃で一夜培養した。４℃に３０分間置いて冷やした寒天平板上にＣｏｌｏｎｙ／Ｐｌａｑｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎ　ＮＥＦ－９７８Ｘ（ＤｕＰｏｎｔ社）を載せ、室温で約３分間放置した。菌が付着したスクリーンを寒天平板上より取り外し、室温で２回（各回２分間）、０．５Ｎ－ＮａＯＨ（７５０μｌ）に浸漬した。続いて、１Ｍトリス緩衝液（ｐＨ７．５）で同様な操作を２回行ってから、ＤＮＡをブロットしたスクリーンを室温で３０分間乾かした。乾かしたＣｏｌｏｎｙ／Ｐｌａｑｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎをプラスチック袋に入れ、０．２％ポリビニルピロリドン（分子量４０，０００）、０．２％フィコール（分子量４０，０００）、０．２％牛血清アルブミン、０．０５Ｍトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）、１Ｍ食塩、０．１％燐酸ナトリウム、１．０％ラウリル硫酸ナトリウム（分子量５００，０００）及び変性した鮭精子ＤＮＡ（１００μｇ／ｍｌ）の組成のハイブリダイゼイション用緩衝液５ｍｌを加えて封じた。６５℃で一夜放置した後、^{32}Ｐで標識した実施例３で合成したプローブの溶液１００μｌ（２ｎｇ－ＤＮＡ）を加え、更に６５℃で一夜放置した。処理の終わったＣｏｌｏｎｙ／Ｐｌａｑｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎを、室温で５分間、０．１×ＳＳＣに浸漬し、撹拌下に２回洗浄し、室温で１時間乾かした。ＭＲＳＡのＤＮＡプローブとのハイブリダイゼイション、洗浄、及び乾燥の済んだＣｏｌｏｎｙ／Ｐｌａｑｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎを感光用カセットに入れて固定し、フィルム（Ｋｏｄａｋ－Ｘ－ＯＭＡＴ－ＡＲ　ＸＡＲ－５）を重ね、－７０℃又は室温で感光させ、現像して、形質転換されたコロニーの判定を行った。判定の結果、前記した釣菌１，０００株中から、前記式（３）～（５）のプローブとのハイブリダイゼイションからはＮｏ．１１～Ｎｏ．１６の６株が選抜され、前記式（６）及び（７）のプローブとのハイブリダイゼイションからはＮｏ．２１～Ｎｏ．２５の５株が選抜された。

実施例８：形質転換コロニー中のＭＲＳＡ－ＤＮＡの大きさ

コロニーハイブリダイゼイションで選抜したコロニーに組み込まれているＭＲＳＡ－ＤＮＡの大きさを決定するために、前記Ｎｏ．１１～Ｎｏ．１６及びＮｏ．２１～Ｎｏ．２５の１１種の菌をそれぞれ１白金耳５０μｇ／ｍｌのアンピシリン含有ＬＢ培地２５ｍｌに接種し、３７℃で一夜振盪培養した後、培養液１ｍｌを採り、新鮮な同種の培地２００ｍｌに移し、６００ｎｍの濁度が０．４になるまで培養を続けた。菌体を遠心により集め、５０ｍＭグルコース及び１０ｍＭＥＤＴＡを含有する２５ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ８．０）４ｍｌに懸濁し、その懸濁液にリゾチームを７．５ｍｇ／ｍｌになるように加え、約０℃で処理した。３０分間経過した後、１％ラウリル硫酸ナトリウム含有０．２Ｎ－ＮａＯＨ８ｍｌを反応液に加え、更に１０分間、約０℃に保持した。最後に、５Ｍ酢酸カリウムを加えて約０℃に１０分間置いた後、ベックマンＪＡ２０の遠心機で１９，０００回転で３０分間遠心した。得られた上清を０．６容量のイソプロパノールと混合し、沈殿を集めた。この沈殿に７５％エチルアルコール３０ｍｌを加え、更に、同一条件で遠心し、沈殿を集めて５分間真空乾燥した。乾燥した沈殿を、トリス緩衝液３（２．４８ｍｌ）に溶かし、塩化セシウム２．９１ｇ及びエチジウムブロマイド（５ｍｇ／ｍｌ）０．４３ｍｌを加え、ベックマンＡＬＡ１０３．３の遠心機で６５，０００回転で一夜遠心し、環状ＤＮＡが局在する下側のバンドを採った。集めた画分を、まず１－ブタノールで処理して混在するエチジウムブロマイドを除去し、次いでエチルアルコールで処理してプラスミドＤＮＡを沈殿させ、得られた沈殿をトリス緩衝液３に溶かした。

前記の精製プラスミドＤＮＡを、実施例５に記述した条件でＳ画分についてはＸｂａＩ及びＨｉｎｄⅢで、またＦ画分についてはＥｃｏＲＩで消化した後、０．８％アガロース（フナコシ、ＧＡ－００１）、トリス塩酸４．４ｇ／リットル、氷酢酸１．１４２ｇ／リットル及び０．５Ｍ－ＥＤＴＡ２ｍｌ／リットルの組成のＴＥＡ緩衝液中で１．５時間電

気泳動を行った。電気泳動終了後、アガロースゲルを０．５Ｎ－ＮａＯＨ含有１．５Ｍ食塩水に室温で撹拌下に４５分間浸漬し、ＤＮＡを変性させた。次いで、アガロースゲルを１．５Ｍ食塩含有トリス緩衝液（ｐＨ８．０）で、室温で撹拌下に、４５分間浸漬して中和した。変性させたＤＮＡが載っているアガロースゲルの上に、Ｇｅｎｅ Ｓｃｒｅｅｎ Ｐｌｕｓ ＮＥＦ－９７６（ＤｕＰｏｎｔ社）を重ね、一夜キャピラリーブロッティングし、実施例７に記載した方法でハイブリダイゼイションを行った。このサザンハイブリダイゼイションの結果より、形質転換菌Ｎｏ．１１及びＮｏ．２１に組み込まれているＭＲＳＡ由来のＤＮＡの大きさはそれぞれ約２．２ｋｂと約４ｋｂであった。ロイコシジン（Ｓ画分）の遺伝子ＤＮＡが挿入されたプラスミドをｐＳＲＫ９１と命名し、ロイコシジン（Ｆ画分）の遺伝子ＤＮＡが挿入されたプラスミドをｐＦＲＫ９２と命名した。プラスミドｐＳＲＫ９１及びプラスミドｐＦＲＫ９２の構造を第３図及び第１１図に示す。プラスミドｐＳＲＫ９１及びプラスミドｐＦＲＫ９２の制限酵素地図を第４図及び第１２図に示す。なお、第４図において、ｐＳＲＫ９１の上に示した矢印はロイコシジンＳ画分遺伝子が存在する箇所であり、矢印の先端はＳ画分タンパク質のＣ末端に相当する。また、ｐＳＲＫ９１－１はｐＳＲＫ９１の誘導体でありそれらの下に示した矢印は塩基配列を決定した方向を示す。第１２図のｐＦＲＫ９２において、Ｆで示した太い矢印はロイコシジンＦ画分遺伝子が存在する箇所であり、矢印の先端はＦ画分タンパク質のＣ末端に相当する。また、複数の細い矢印は塩基配列を決定した方向を示す。更に、塩基配列をＤＹＥプライマーを利用してジデオキシ法によって決定した。その塩基配列と、その塩基配列から演繹されるアミノ酸配列を第１表及び第５図、並びに第２表及び第１３図に示した。なお、第５図においてアミノ酸配列は１文字表記で示し、第１３図においてアミノ酸配列は３文字表記で示してある。

第1表

```
GAAGCTTAAA TAAATATTCT CAAGTTAATA
AATAATTAAC TTTTAGATGG ATTCATCAAA
AATCGTAAAA AGAACAATTT GTATTTTACA
AACATTAATT AAAAATAAAA GCAAGACATT
CGTGCAATCG GTTACCTTAA ATTGTTTACA
ACTGTCAACA ATACCAAGGT TTTATTAACT
ATATTTCTCA CAAAATTAGC TTTTAGCATT
CCAAACAAAA AAGGTTAAAT TGAACGGAAT
TATGGCATTT TTAACTTAAT TGTAAAAAAA
GTTGATAATG GTCAATTGTT AATGAACAGT
TAATTATAAT AACGTCCAAA ATATATTATT
ATTTAATTAA GTTAAATAAA ATTATAGAAA
GACAGTGAAA CTT
ATG CTT AAA AAT AAA ATA TTA GCT
Met Leu Lys Asn Lys Ile Leu Ala
                -25
ACA ACT TTA TCT GTG AGC TTA CTT
Thr Thr Leu Ser Val Ser Leu Leu
    -20                 -15
GCC CCT CTT GCC AAT CCG TTA TTA
Ala Pro Leu Ala Asn Pro Leu Leu
            -10
GAA AAT GCT AAA GCT GCC AAC GAT
Glu Asn Ala Lys Ala Ala Asn Asp
 -5                 -1  1
ACT GAA GAC ATC GGT AAA GGA AGC
Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser
      5                     10
GAT ATA GAA ATT ATC AAA AGG ACA
Asp Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr
            15
GAA GAT AAA ACA AGT AAT AAA TGG
Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp
 20                     25
```

```
GGC GTG ACT CAA AAT ATT CAA TTT
Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln Phe
          30                  35
GAT TTT GTG AAG GAT ACA AAA TAT
Asp Phe Val Lys Asp Thr Lys Tyr
                40
AAC AAA GAT GCT CTG ATA TTA AAG
Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu Lys
    45                  50
ATG CAA GGA TTC ATT AGC TCT AGA
Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg
            55
ACA ACA TAT TAC AAC TAT AAA AAA
Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys Lys
 60                  65
ACT AAT CAT GTT AAA GCT ATG CGA
Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg
          70                  75
TGG CCA TTC CAA TAT AAT ATT GGT
Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly
                80
TTA AAA ACA AAT GAT AAA TAT GTT
Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val
    85                  90
TCT TTA ATT AAT TAT TTA CCT AAA
Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys
            95
AAT AAA ATT GAA TCT ACA AAC GTG
Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val
100                 105
AGT CAG ACA TTA GGA TAC AAT ATC
Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile
          110                 115
```

```
GGT GGT AAT TTC CAA TCA GCC CCA
Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro
                120
TCA CTC GGT GGT AAT GGA TCA TTT
Ser Leu Gly Gly Asn Gly Ser Phe
    125                 130
AAC TAT TCT AAA TCG ATT AGC TAT
Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr
            135
ACA CAA CAA AAT TAT GTA AGT GAA
Thr Gln Gln Asn Tyr Val Ser Glu
140                 145
GTA GAA CAA CAA AAC TCA AAA AGT
Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser
        150                 155
GTT TTA TGG GGC GTC AAA GCG AAT
Val Leu Trp Gly Val Lys Ala Asn
                160
TCA TTC GCC ACT GAA TCA GGT CAA
Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln
    165                 170
AAA TCA GCA TTT GAT AGC GAT TTA
Lys Ser Ala Phe Asp Ser Asp Leu
            175
TTT GTA GGC TAC AAA CCT CAT AGT
Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser
180                 185
AAA GAT CCT AGA GAT TAT TTC GTT
Lys Asp Pro Arg Asp Tyr Phe Val
        190                 195
CCA GAC AGT GAG TTA CCT CCT CTT
Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu
                200
```

```
GTA CAA AGT GGA TTT AAC CCT TCA
Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
    205                 210
TTT ATC GCC ACA GTA TCT CAT GAA
Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu
            215
AAA GGT TCA AGC GAT ACA AGC GAA
Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
220                 225
TTT GAA ATT ACT TAC GGA AGA AAC
Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn
        230                 235
ATG GAT GTC ACT CAT GCC ATT AAA
Met Asp Val Thr His Ala Ile Lys
                240
AGA TCA ACG CAT TAT GGC AAC AGT
Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser
    245                 250
TAT TTA GAC GGA CAT AGA GTC CAT
Tyr Leu Asp Gly His Arg Val His
            255
AAT GCA TTC GTA AAT AGA AAC TAT
Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr
260                 265
ACT GTT AAA TAC GAC GTC AAT TGG
Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp
        270                 275
AAG ACT CAT GAA ATC AAG GTG AAA
Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys
                280
GGA CAG AAT
Gly Gln Asn
    285
TGATATCAAA ATGAATAAAT TAGTCAAATC
ATCCGTTGCT ACATCTATGG CATTATTATT
```

```
ACTTTCTGGT  ACTGCTAATG  CTGAGGTAAA
ATAACACCAG  TCAGCGTAAA  AAAGTCGATG
ACAAGGTTAC  TTTATACAAA  CCACCAGC
```

第2表

```
GAATTCATTC  GCCACTGAAT  CAGGTCAAAA
ATCAGCATTT  GATAGCGATT  TATTTGTAGG
CTACAAACCT  CATAGTAAAG  ATCCTAGAGA
TTATTTCGTT  CAAGACAGTG  AGTTACCTCC
TCTTGTACAA  AGTGGATTTA  ACCCTTCATT
TATCGCCACA  GTATCTCATG  AAAAAGGTTC
AAGCGATACA  AGCGAATTTG  AAATTACTTA
CGGAAGAAAC  ATGGATGTCA  CTCATGCCAT
TAAAAGATCA  ACGCATTATG  GCAACAGTTA
TTTAGACGGA  CATAGAGTCC  ATAATGCATT
CGTAAATAGA  AACTATACTG  TTAAATACGA
GGTCAATTGG  AAGACTCATG  AAATCAAGGT
GAAAGGACAG  AATTGAT
```

```
ATG  AAA  ATG  AAT  AAA  TTA  GTC  AAA
Met  Lys  Met  Asn  Lys  Leu  Val  Lys
-25                     -20
TCA  TCC  GTT  GCT  ACA  TCT  ATG  GCA
Ser  Ser  Val  Ala  Thr  Ser  Met  Ala
          -15                     -10
TTA  TTA  TTA  CTT  TCT  GGT  ACT  GCT
Leu  Leu  Leu  Leu  Ser  Gly  Thr  Ala
                    -5
AAT  GCT  GAA  GGT  AAA  ATA  ACA  CCA
Asn  Ala  Glu  Gly  Lys  Ile  Thr  Pro
 -1   +1                  5
GTC  AGC  GTA  AAA  AAA  GTC  GAT  GAC
Val  Ser  Val  Lys  Lys  Val  Asp  Asp
          10                      15
```

```
AAA GTT ACT TTA TAC AAA ACA ACA
Lys Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
                20
GCC ACA GCA GAT TCT GAT AAG TTT
Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe
    25                  30
AAA ATT TCA CAG ATT TTA ACA TTT
Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
            35
AAT TTC ATC AAA GAT AAA AGT TAT
Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr
 40                 45
GAT AAA GAT ACT TTA GTA CTT AAA
Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
        50                      55
GCT ACT GGG AAT ATT AAC TCA GGC
Ala Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly
                60
TTT GTG AAA CCT AAT CCT AAT GAC
Phe Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp
    65                  70
TAT GAC TTT TCA AAA TTA TAT TGG
Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp
            75
GGA GCT AAA TAC AAT GTA TCT ATA
Gly Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile
 80                 85
AGC TCA CAA TCT AAT GAT TCA GTA
Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val
        90                      95
AAC GCT GTT GAT TAT GCA CCA AAA
Asn Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys
                100
```

```
AAT CAA AAT GAA GAG TTT CAA GTT
Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val
    105                 110
CAA AAT ACT TTA GGC TAT ACA TTT
Gln Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe
            115
GGT GGT GAC ATT AGT ATC TCT AAT
Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn
120                 125
GGT TTA TCT GGT GGA CTT AAT GGA
Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
        130                 135
AAT ACA GCT TTT TCT GAA ACA ATT
Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile
                140
AAT TAT AAA CAA GAA AGT TAC AGA
Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
    145                 150
ACA TTA AGT CGC AAC ACA AAT TAT
Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr
            155
AAA AAT GTT GGC TGG GGA GTT GAA
Lys Asn Val Gly Trp Gly Val Glu
160                 165
GCA CAT AAA ATT ATG AAT GGT TGG
Ala His Lys Ile Met Asn Gly Trp
        170                 175
GGA CCT TAT GGA AGA GAT AGC TTC
Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe
                180
CAC CCA ACA TAT GGT AAT GAA CTC
His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu
    185                 190
```

```
TTC TTA GCT GGC AGA CAA AGC AGT
Phe Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser
                195
GCA TAC GCT GGC CAA AAC TTC ATA
Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile
200                 205
GCG CAA CAC CAA ATG CCA TTA TTA
Ala Gln His Gln Met Pro Leu Leu
        210                 215
TCT AGA AGT AAC TTC AAT CCC AGA
Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg
                220
TTT TTA AGC GTA CTA TCA CAC AGA
Phe Leu Ser Val Leu Ser His Arg
    225                 230
CAA GAT GCC GCT AAA AAA TCT AAA
Gln Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys
            235
ATT ACA GTA ACT TAT CAA CGT GAA
Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu
240                 245
ATG GAT TTA TAC CAA ATT CGT TGG
Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp
        250                 255
AAT GGC TTC TAC TGG GCA GGC GCA
Asn Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala
                260
AAT TAT AAA AAC TTT AAA ACT AGA
Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg
    265                 270
ACA TTT AAA TCA ACA TAT GAA ATT
Thr Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile
            275
```

```
GAT TGG GAA AAT CAC AAA GTG AAA
Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys
280                     285
TTG TTA GAT ACA AAA GAA ACT GAA
Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu
          290                   295
AAC AAT AAA
Asn Asn Lys
          298
```

```
TAGCTAGTAA AACACGGTCG CCAACAGTAA
TTGTGACGAC CGTGTTTTGA TTTATTATCT
TAGTAAGACT GCCATTCTTT TTCTCAATGT
GAGATATAAA GGAATAGCTA CAATTAAAGT
GAATATTACG CCTGGAATCG CGTTTAACAA
CACTACCCAC ACAGGTAAAT TTAAAATAAT
AGATAATAGT AGCCTAGATA CCAAACTGCC
TAATACACTT GATAAAACTA ATGATAGTAC
ATTTATTTTC AATAAATAAA CAACTGCAAT
AGCTATAACT CTAAATATAA TAGAAATAAT
CACATTAATT GGATTAAATA CGCCAAATAT
CAGTAATAAT ACGCTTGATA AAAGCCCACC
TAAAAAGTAC TTTTTAATTC CAAAGAAAGC
TAATATCAAT AATGCTGCCG GTGCAGATAA
TTGAAAATCT AATCCTGGTA TAATGGACGG
TATTTTCAAA ACTGCCAAAA TGGTTAAAAT
CGCAGCCATG ACACTAATTT GAGTAATATC
TTTTGATGTC ATACTAAAAC CCCTATACCG
TTTCATAAAC TTCTTGCTTC GGTGTGCTTT
CTAAAAATGA TATGTAATGA TTTAAATCAA
TACAATCGTC CACAAATATT ATTCTGCCTC
CATATCTCGT ATTAACTGGT TTAATATCAA
ATAATC
```

実施例９

（ａ）プラスミドｐＳＲＫ９１及びｐＦＲＫ９２がコードするインビトロ翻訳産生物の同定

プラスミドｐＳＲＫ９１（実施例７の形質転換菌Ｎｏ．１１）及びプラスミドｐＦＲＫ９２（実施例７の形質転換菌Ｎｏ．２１）を用いてのインビトロ産生物をトランスクリプション／トランスレーション法〔Ｚｕｄａｙ，Ａｎｎ　Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．７，２６７－２８７（１９７４）〕によって確認した。即ち、〔^{35}Ｓ〕メチオニンでラベルされたインビトロ産生物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で電気泳動し、オートラジオグラフィーを行った。結果を第６図及び第１４図に示す。ｐＳＲＫ９１では約３５ｋｄのポリペプチド（ＰＳ）を確認することができ、ｐＦＲＫ９２では約３７ｋｄのポリペプチド（ＰＦ）を確認することができた。同様に行ったｐＵＣ１１９には見られない。実施例１においてＳ画分の分子量が約３２ｋｄであり、Ｆ画分の分子量が約３４ｋｄであったことから、この結果は約３５ｋｄのポリペプチド（ＰＳ）及び約３７ｋｄのポリペプチド（ＰＦ）がそれぞれ前駆体（ｐｒｅｍａｔｕｒｅｄ，Ｓ－プロテイン；プリプロロイコシジンＳ：及びＦ－プロテイン；プリプロロイコシジンＦ）であることを示唆している。

（ｂ）インビボにおけるＳ画分及びＦ画分の同定

（ｂ－１）抗体の作製

実施例１で調製したロイコシジンを抗原とし、常法によりウサギに免疫し、抗血清を調製した。得られた抗血清を硫安分画（５０％飽和）し、遠心分離によって沈殿を分取した。沈殿をＰＢＳに溶解し、再度硫安分画（３３％飽和）し、遠心分離によって沈殿を分取した。この沈殿を１７．５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．８）に溶かし、同緩衝液に対して透析を行ない、続けてＤＥＡＥ－セルロースカラムにより精製したＩｇＧ画分を抗体として用いた。

（ｂ－２）実施例７の形質転換菌Ｎｏ．１１及び形質転換菌Ｎｏ．２１をアンピシリン含有ＬＢ培地にてＩＰＴＧ（２ｍＭ）の存在下で培養（５×１０^{8}ｃｅｌｌ／ｍｌ：ｍｉｄ　Ｌｏｇ　ｐｈａｓｅ）した。遠心分離によって細胞を集め、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．５）で１回洗浄し、超音波処理してから遠心処理（１５０００×

ｇ，１０分間)した。この菌体抽出液を実施例１の条件で部分精製した。先の培養液及び菌体抽出部分精製物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で電気泳動し、上記抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。なお、二次抗体として、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体を用いて検出した。結果を第７図のＡ及び第１５図に示す。同様にしてＩＰＴＧ不存在下による試験結果を第７図のＢに示す。

これらの結果から、分子量３２ｋｄ及び分子量３４ｋｄの各成熟体（ｍａｔｕｒｅｄ　ｔｙｐｅ）は、培養液から確認することはできないが、超音波処理して調製された菌体抽出液からそれぞれ確認することができた。また、ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）及びＤＨ５α（ｐＦＲＫ９２）でのみ確認され、ＤＨ５α（ｐＵＣ１１９）においては、培養液及び菌体抽出液の両方で確認することができない。ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）においては、ＩＰＴＧを除いても、その菌体抽出液から３２ｋｄの成熟体（プロロイコシジンＳ）を確認することができる。またＤＨ５α（ｐＦＲＫ９２）においても同様であった。

（Ｃ）ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）及びＤＨ５α（ｐＦＲＫ９２）中の発現Ｓ画分及びＦ画分の位置

ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）及びＤＨ５α（ｐＦＲＫ９２）をアンピシリン含有（１００μｇ／ｍｌ）ＬＢ培地で３７℃にて培養した（ｍｉｄ　ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ　ｐｈａｓｅ）。１０ｍＭトリスＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．５）で１回洗浄し、Ｈｅｐｐｅｌの方法〔Ｓｃｉｅｎｃｅ，１５６，　１４５１－１４５５（１９６７）〕によりショックを与え、ペリプラズム空間(外膜と内膜の間隙)とショック細胞画分を得た。これらの画分に対して前記（ｂ－２）と同様にウエスタンブロッティングを行った。結果を第８図及び第１６図に示す。約３２ｋｂのプロロイコシジンＳは、ＤＨ５α（ｐＳＲＫ９１）のペリプラズム空間（外膜と内膜の間隙)に存在し、約３４ｋｂのプロロイコシジンＦは、ＤＨ５α（ｐＦＲＫ９２）のペリプラズム空間（外膜と内膜の間隙)に存在している。

以上の結果から、形質転換菌より得られたプリプロロイコシジンＳ

（３５ｋｄ）及びプロロイコシジンＳ（３２ｋｄ）、並びにプリプロロイコシジンＦ（３７ｋｄ）及びプロロイコシジンＦ（３４ｋｄ）は、抗ロイコシジンＦ抗体を作製するための抗原として使うことができ、ＭＲＳＡ診断への利用が可能であることがわかった。

実施例１０：ＭＲＳＡ検出マーカーとしてのロイコシジンの評価

ＭＲＳＡ２１株（信州大学医学部から入手の臨床株）を実施例１の条件で培養し、部分精製したプロロイコシジン画分を、実施例９記載の条件下でウエスタンブロットした。その結果、試験に用いた検体は総てロイコシジン（Ｓ及びＦ）を産生していることが確認された。同様に、通常の黄色ブドウ球菌について試験した結果、ロイコシジンを産生しているものは見い出されなかった。

従来、ＭＲＳＡに特異的なマーカーがなく、ＭＲＳＡの検出には、菌の分離等の操作を必要とするため、時間と手間がかかっていた。本発明では、ＭＲＳＡが特異的にロイコシジン（Ｓ画分及びＦ画分）、プロロイコシジン（Ｓ画分及びＦ画分）を産生していることを明らかにし、ＭＲＳＡ同定のマーカーになることを示した。このロイコシジン（Ｓ画分及びＦ画分）及びプロロイコシジン（Ｓ画分及びＦ画分）の全構造を初めて決定し、遺伝子操作の技術を用いてＭＲＳＡの免疫学的診断に用いる抗体調製に必要な抗原を産生させることに成功した。その結果、ＭＲＳＡ感染患者の早期発見に役立ち、問題になっているＭＲＳＡの院内感染防止に貢献することができる。更に、ロイコシジン及びプロロイコシジンをコードしている塩基配列を明らかにした結果、ＭＲＳＡの確定診断が可能になった。

請 求 の 範 囲

1．プロロイコシジン又はロイコシジンに対する抗体を用いることを特徴とする、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法。

2．式

Ala Asn Asp Thr Glu Asp Ile Gly
Lys Gly Ser Asp Ile Glu Ile Ile
Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser
Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn
Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp
Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu
Ile Leu Lys Met Gln Gly Phe Ile
Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Tyr Asn
Tyr Lys Lys Thr Asn His Val Lys
Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr
Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp
Lys Tyr Val Ser Leu Ile Asn Tyr
Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Ser
Thr Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly
Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln
Ser Ala Pro Ser Leu Gly Gly Asn
Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser
Ile Ser Tyr Thr Gln Gln Asn Tyr
Val Ser Glu Val Glu Gln Gln Asn
Ser Lys Ser Val Leu Trp Gly Val
Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr Glu
Ser Gly Gln Lys Ser Ala Phe Asp
Ser Asp Leu Phe Val Gly Tyr Lys
Pro His Ser Lys Asp Pro Arg Asp
Tyr Phe Val Pro Asp Ser Glu Leu
Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe
Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val
Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp

Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr
Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His
Ala Ile Lys Arg Ser Thr His Tyr
Gly Asn Ser Tyr Leu Asp Gly His
Arg Val His Asn Ala Phe Val Asn
Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu
Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile
Lys Val Lys Gly Gln Asn

のアミノ酸配列を有するペプチド。

3．式

Met Leu Lys Asn Lys Ile Leu Ala
Thr Thr Leu Ser Val Ser Leu Leu
Ala Pro Leu Ala Asn Pro Leu Leu
Glu Asn Ala Lys Ala Ala Asn Asp
Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser
Asp Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr
Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp
Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln Phe
Asp Phe Val Lys Asp Thr Lys Tyr
Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu Lys
Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg
Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys Lys
Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg
Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly
Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val
Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys
Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val
Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile
Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro
Ser Leu Gly Gly Asn Gly Ser Phe
Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr
Thr Gln Gln Asn Tyr Val Ser Glu
Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser
Val Leu Trp Gly Val Lys Ala Asn

Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln
Lys Ser Ala Phe Asp Ser Asp Leu
Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser
Lys Asp Pro Arg Asp Tyr Phe Val
Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu
Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu
Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn
Met Asp Val Thr His Ala Ile Lys
Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser
Tyr Leu Asp Gly His Arg Val His
Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr
Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp
Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys
Gly Gln Asn

のアミノ酸配列を有するペプチド。

4．式

Ala Asn Asp Thr Glu Asp Ile Gly
Lys Gly Ser Asp Ile Glu Ile Ile
Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser
Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn
Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp
Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu
Ile Leu Lys Met Gln Gly Phe Ile
Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Tyr Asn
Tyr Lys Lys Thr Asn His Val Lys
Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr
Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp
Lys Tyr Val Ser Leu Ile Asn Tyr
Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Ser
Thr Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly
Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln
Ser Ala Pro Ser Leu Gly Gly Asn

Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser
Ile Ser Tyr Thr Gln Gln Asn Tyr
Val Ser Glu Val Glu Gln Gln Asn
Ser Lys Ser Val Leu Trp Gly Val
Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr Glu
Ser Gly Gln Lys Ser Ala Phe Asp
Ser Asp Leu Phe Val Gly Tyr Lys
Pro His Ser Lys Asp Pro Arg Asp
Tyr Phe Val Pro Asp Ser Glu Leu
Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe
Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val
Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp
Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr
Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His
Ala Ile Lys Arg Ser Thr His Tyr
Gly Asn Ser Tyr Leu Asp Gly His
Arg Val His Asn Ala Phe Val Asn
Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu
Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile
Lys Val Lys Gly Gln Asn

のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

５．式

Met Leu Lys Asn Lys Ile Leu Ala
Thr Thr Leu Ser Val Ser Leu Leu
Ala Pro Leu Ala Asn Pro Leu Leu
Glu Asn Ala Lys Ala Ala Asn Asp
Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser
Asp Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr
Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp
Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln Phe
Asp Phe Val Lys Asp Thr Lys Tyr
Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu Lys
Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg
Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys Lys

Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg
Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly
Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val
Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys
Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val
Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile
Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro
Ser Leu Gly Gly Asn Gly Ser Phe
Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr
Thr Gln Gln Asn Tyr Val Ser Glu
Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser
Val Leu Trp Gly Val Lys Ala Asn
Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln
Lys Ser Ala Phe Asp Ser Asp Leu
Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser
Lys Asp Pro Arg Asp Tyr Phe Val
Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu
Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu
Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn
Met Asp Val Thr His Ala Ile Lys
Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser
Tyr Leu Asp Gly His Arg Val His
Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr
Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp
Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys
Gly Gln Asn

のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

６．式

Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val
Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys
Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala
Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys

Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn
Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp
Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys Ala
Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly Phe
Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp Tyr
Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp Gly
Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile Ser
Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val Asn
Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn
Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln
Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Gly
Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn Gly
Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly Asn
Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile Asn
Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr
Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Lys
Asn Val Gly Trp Gly Val Glu Ala
His Lys Ile Met Asn Gly Trp Gly
Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe His
Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe
Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser Ala
Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile Ala
Gln His Gln Met Pro Leu Leu Ser
Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg Phe
Leu Ser Val Leu Ser His Arg Gln
Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys Ile
Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met
Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp Asn
Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala Asn
Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg Thr
Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Asp
Trp Glu Asn His Lys Val Lys Leu
Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn
Asn Lys

のアミノ酸配列を有するペプチド。

7．式

Met Lys Met Asn Lys Leu Val Lys
Ser Ser Val Ala Thr Ser Met Ala
Leu Leu Leu Leu Ser Gly Thr Ala
Asn Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro
Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp
Lys Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe
Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr
Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
Ala Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly
Phe Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp
Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp
Gly Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile
Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val
Asn Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys
Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val
Gln Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe
Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn
Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile
Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr
Lys Asn Val Gly Trp Gly Val Glu
Ala His Lys Ile Met Asn Gly Trp
Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe
His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu
Phe Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser
Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile
Ala Gln His Gln Met Pro Leu Leu
Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg
Phe Leu Ser Val Leu Ser His Arg

Gln Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys
Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu
Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp
Asn Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala
Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg
Thr Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile
Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys
Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu
Asn Asn Lys

のアミノ酸配列を有するペプチド。

8. 式

Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val
Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys
Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala
Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys
Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn
Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp
Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys Ala
Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly Phe
Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp Tyr
Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp Gly
Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile Ser
Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val Asn
Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn
Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln
Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Gly
Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn Gly
Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly Asn
Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile Asn
Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr
Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Lys
Asn Val Gly Trp Gly Val Glu Ala
His Lys Ile Met Asn Gly Trp Gly
Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe His

Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe
Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser Ala
Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile Ala
Gln His Gln Met Pro Leu Leu Ser
Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg Phe
Leu Ser Val Leu Ser His Arg Gln
Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys Ile
Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met
Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp Asn
Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala Asn
Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg Thr
Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Asp
Trp Glu Asn His Lys Val Lys Leu
Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn
Asn Lys

のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

９．式

Met Lys Met Asn Lys Leu Val Lys
Ser Ser Val Ala Thr Ser Met Ala
Leu Leu Leu Leu Ser Gly Thr Ala
Asn Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro
Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp
Lys Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe
Lys Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr
Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
Ala Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly
Phe Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp
Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp
Gly Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile
Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val
Asn Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys
Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val

Gln Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe
Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn
Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile
Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr
Lys Asn Val Gly Trp Gly Val Glu
Ala His Lys Ile Met Asn Gly Trp
Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe
His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu
Phe Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser
Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile
Ala Gln His Gln Met Pro Leu Leu
Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Arg
Phe Leu Ser Val Leu Ser His Arg
Gln Asp Ala Ala Lys Lys Ser Lys
Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu
Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp
Asn Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala
Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg
Thr Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile
Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys
Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu
Asn Asn Lys

のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

１０．メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌体から染色体ＤＮＡを分離し、制限酵素で消化し、得られたＤＮＡ断片をベクターに挿入し、そのベクターで宿主を形質転換してＤＮＡライブラリーを作製し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌体から精製したロイコシジン又はプロロイコシジンの部分アミノ酸配列をコードする合成ＤＮＡをプローブとして用いて前記ＤＮＡライブラリーからロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡを選び、得られたＤＮＡをクレーン化することを特徴とする、ロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡの製法。

１１．ロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡを発現ベクターに連結して複製可能な組換えＤＮＡを作製し、この組換えＤＮＡで宿主を形質転換し、その形質転換体を培養して前記のロイコシジン又はプロロイコシジンをコードするＤＮＡを発現させてロイコシジン又はプロロイコシジンを産生させ、得られたロイコシジン又はプロロイコシジンを単離する特徴とする、ロイコシジン又はプロロイコシジンの製法。

Fig. 1

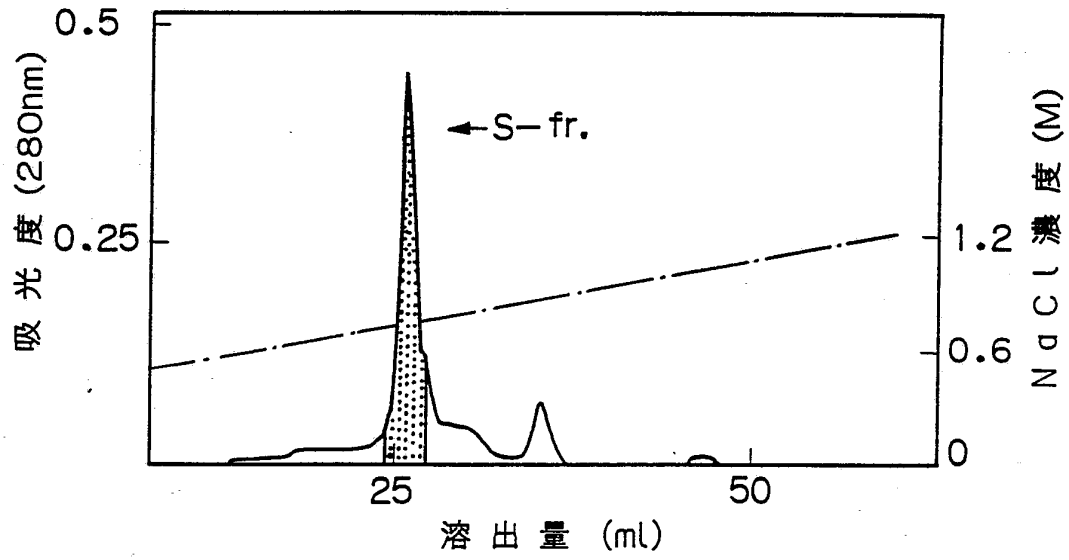


Fig. 2

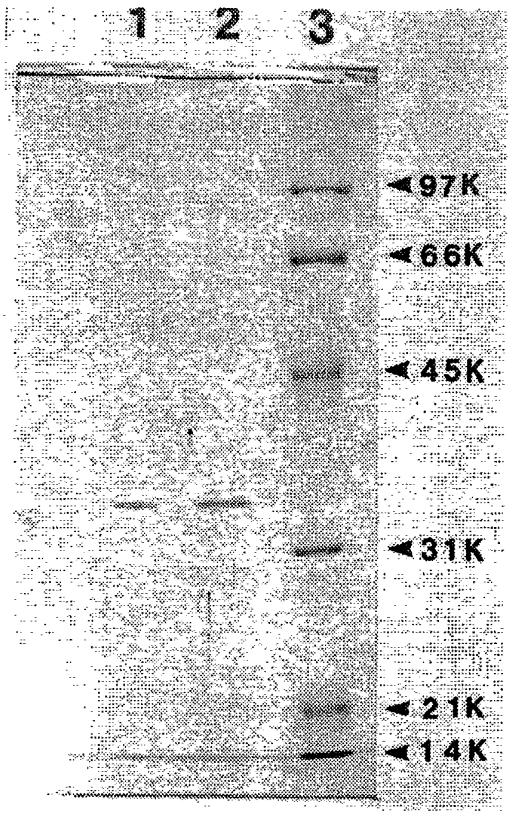


Fig. 3

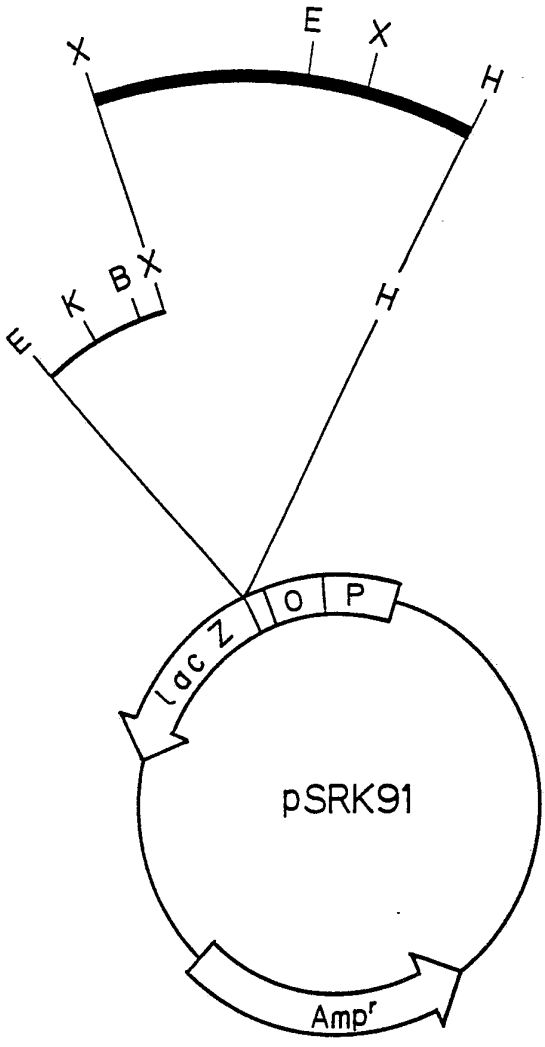


Fig. 4

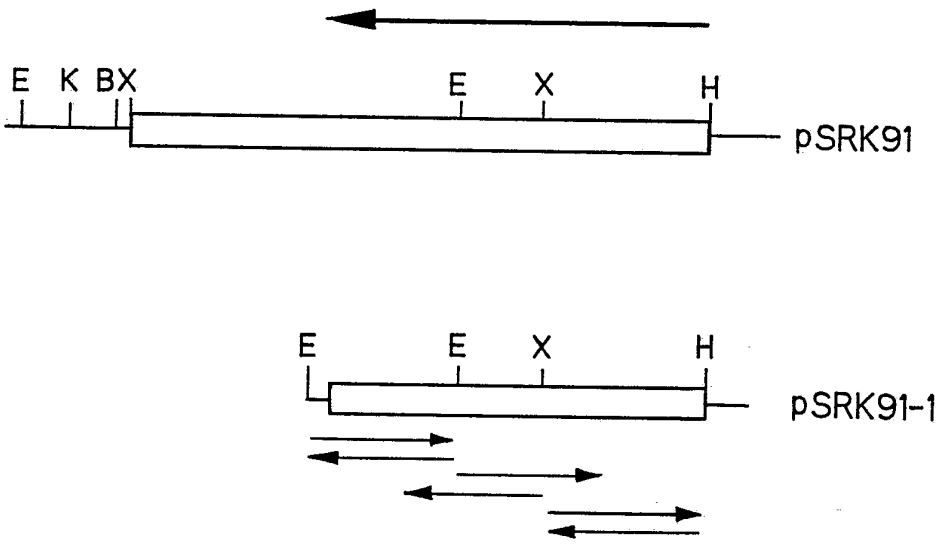


Fig. 5

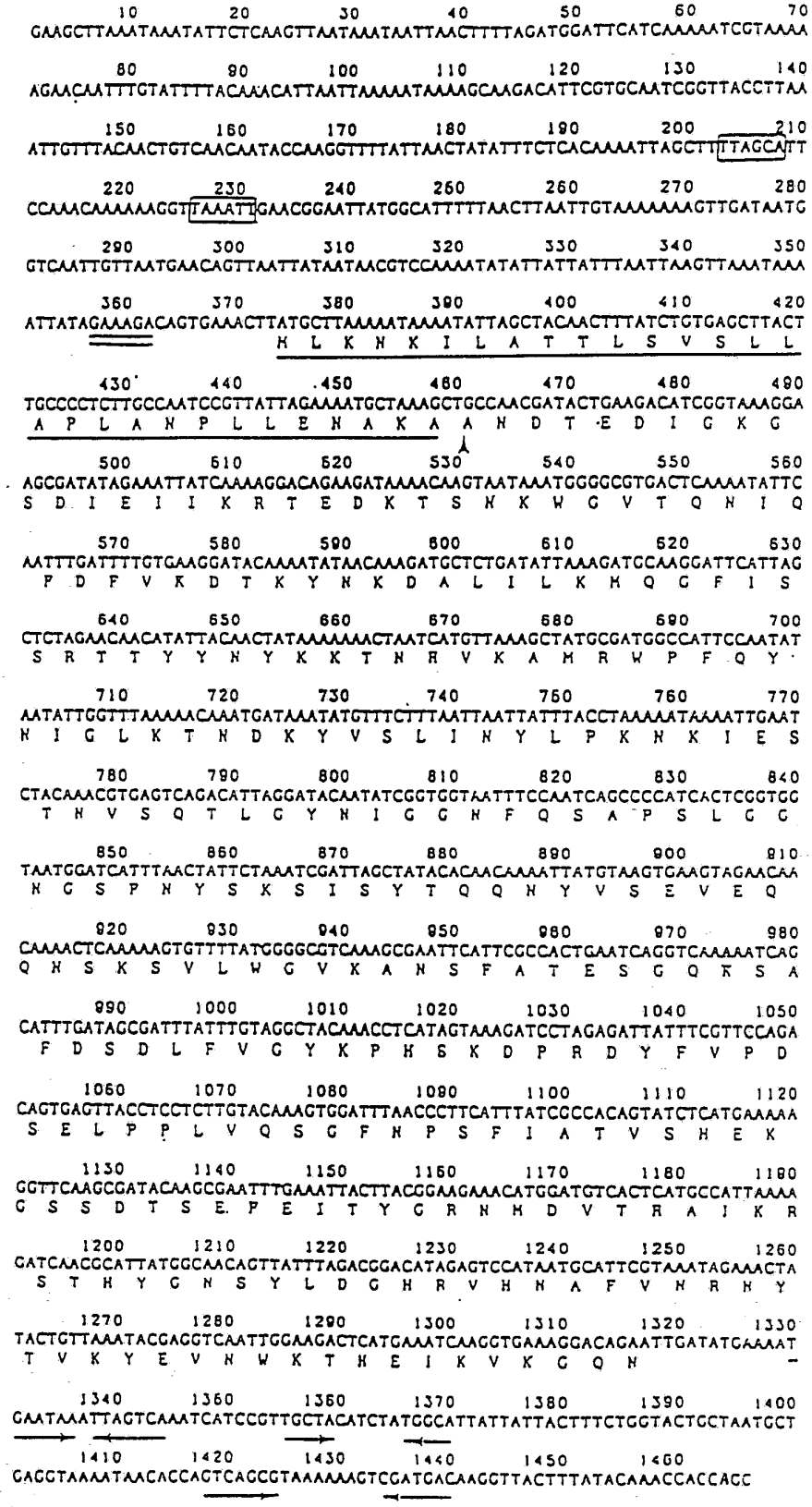

10 20 30 40 50 60 70
GAAGCTTAAATAAATATTCTCAAGTTAATAAATAATTAACTTTTAGATGGATTCATCAAAAATCGTAAAA
80 90 100 110 120 130 140
AGAACAATTTGTATTTTACAAACATTAATTAAAAATAAAAGCAAGACATTCGTGCAATCGGTTACCTTAA
150 160 170 180 190 200 210
ATTGTTTACAACTGTCAACAATACCAAGGTTTTATTAACTATATTTCTCACAAAATTAGCTTTTAGCATT
220 230 240 260 260 270 280
CCAAACAAAAAAGGTTAAATTGAACGGAATTATGGCATTTTTAACTTAATTGTAAAAAAAGTTGATAATG
290 300 310 320 330 340 350
GTCAATTGTTAATGAACAGTTAATTATAATAACGTCCAAAATATATTATTATTTAATTAAGTTAAATAAA
360 370 380 390 400 410 420
ATTATAGAAAGACAGTGAAACTTATGCTTAAAAATAAAATATTAGCTACAACTTTATCTGTGAGCTTACT
M L K N K I L A T T L S V S L L
430 440 450 460 470 480 490
TGCCCCTCTTGCCAATCCGTTATTAGAAAATGCTAAAGCTGCCAACGATACTGAAGACATCGGTAAAGGA
A P L A N P L L E N A K A A N D T E D I G K G
500 510 520 530 540 550 560
AGCGATATAGAAATTATCAAAAGGACAGAAGATAAAACAAGTAATAAATGGGGCGTGACTCAAAATATTC
S D I E I I K R T E D K T S N K W G V T Q N I Q
570 580 590 600 610 620 630
AATTTGATTTTGTGAAGGATACAAAATATAACAAAGATGCTCTGATATTAAAGATGCAAGGATTCATTAG
F D F V K D T K Y N K D A L I L K M Q G F I S
640 650 660 670 680 690 700
CTCTAGAACAACATATTACAACTATAAAAAAACTAATCATGTTAAAGCTATGCGATGGCCATTCCAATAT
S R T T Y Y N Y K K T N R V K A M R W P F Q Y
710 720 730 740 750 760 770
AATATTGGTTTAAAAACAAATGATAAATATGTTTCTTTAATTAATTATTTACCTAAAAATAAAATTGAAT
N I G L K T N D K Y V S L I N Y L P K N K I E S
780 790 800 810 820 830 840
CTACAAACGTGAGTCAGACATTAGGATACAATATCGGTGGTAATTTCCAATCAGCCCCATCACTCGGTGC
T N V S Q T L G Y N I G G N F Q S A P S L G G
850 860 870 880 890 900 910
TAATGGATCATTTAACTATTCTAAATCGATTAGCTATACACAACAAAATTATGTAAGTGAAGTAGAACAA
N G S P N Y S K S I S Y T Q Q N Y V S E V E Q
920 930 940 950 980 970 980
CAAAACTCAAAAAGTGTTTTATGGGGCGTCAAAGCGAATTCATTCGCCACTGAATCAGGTCAAAAATCAG
Q N S K S V L W G V K A N S F A T E S G Q K S A
990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
CATTTGATAGCGATTTATTTGTAGGCTACAAACCTCATAGTAAAGATCCTAGAGATTATTTCGTTCCAGA
F D S D L F V G Y K P H S K D P R D Y F V P D
1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
CAGTGAGTTACCTCCTCTTGTACAAAGTGGATTTAACCCTTCATTTATCGCCCACAGTATCTCATGAAAAA
S E L P P L V Q S G F N P S F I A T V S H E K
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
GGTTCAAGCGATACAAGCGAATTTGAAATTACTTACGGAAGAAACATGGATGTCACTCATGCCATTAAAA
G S S D T S E P E I T Y G R N M D V T R A I K R
1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
GATCAACGCATTATGGCAACAGTTATTTAGACGGACATAGAGTCCATAATGCATTCGTAAATAGAAACTA
S T H Y G N S Y L D G H R V H N A F V N R N Y
1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
TACTGTTAAATACGAGGTCAATTGGAAGACTCATGAAATCAAGGTGAAAGGACAGAATTGATATGAAAAT
T V K Y E V N W K T H E I K V K G Q N -
1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
GAATAAATTAGTCAAATCATCCGTTGCTACATCTATGGCATTATTATTACTTTCTGGTACTGCTAATGCT
1410 1420 1430 1440 1450 1460
GAGGTAAAATAACACCAGTCAGCGTAAAAAAGTCGATGACAAGGTTACTTTATACAAACCACCAGC

Fig. 6

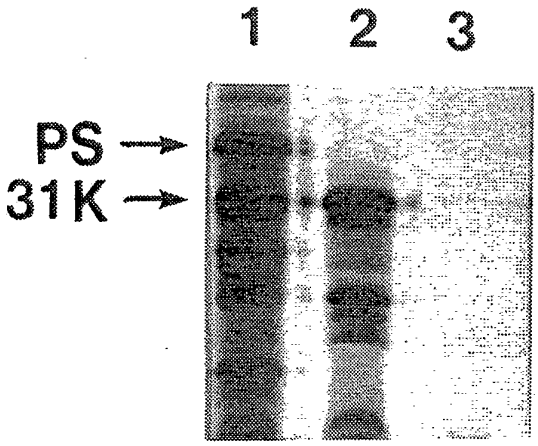


Fig. 7

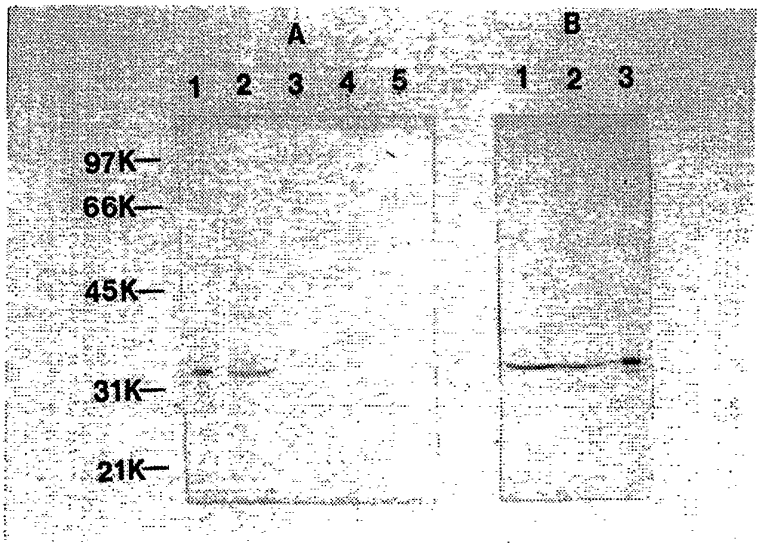


Fig. 8

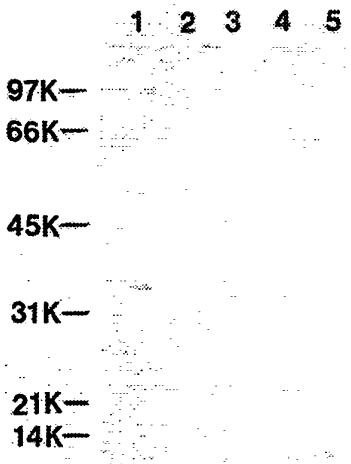


Fig. 9

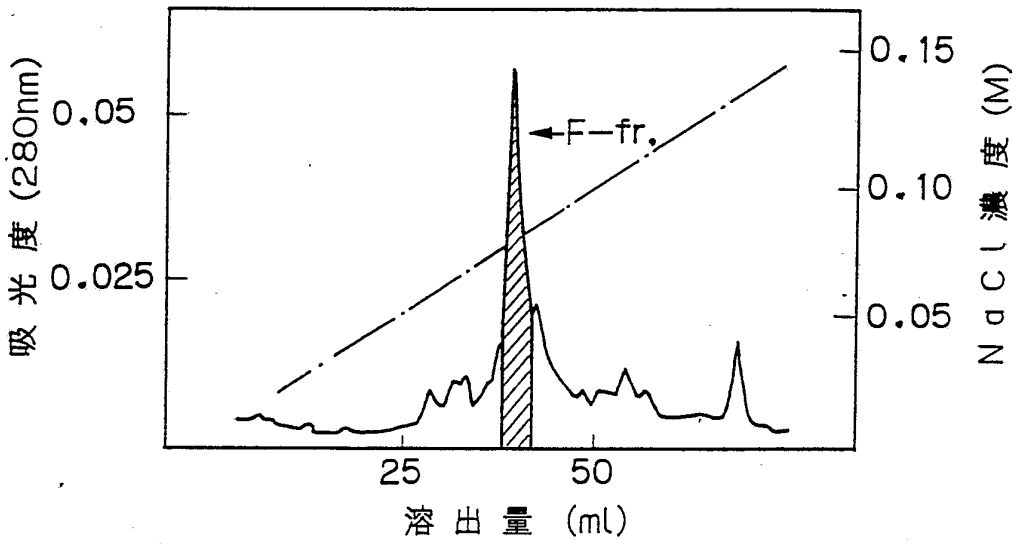


Fig. 10

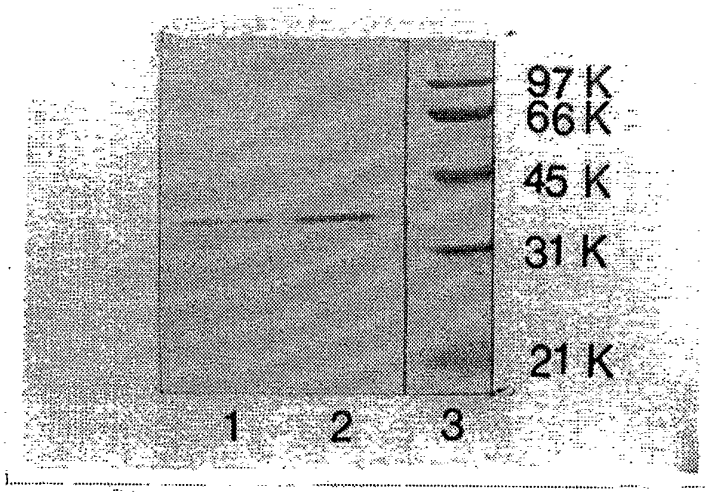


Fig. 11

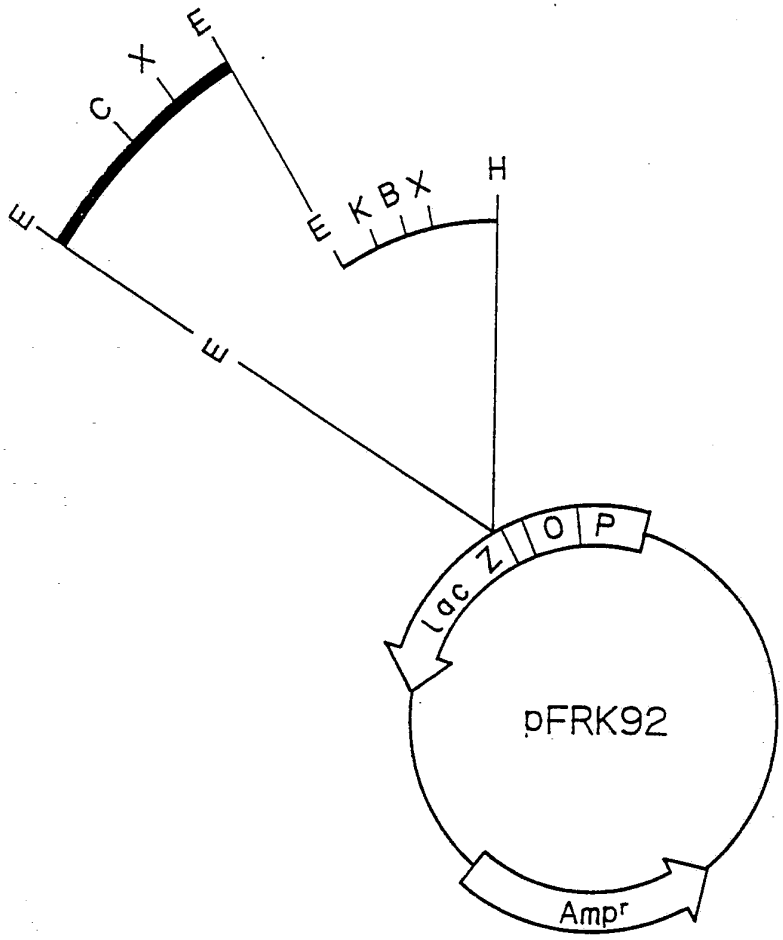


Fig. 12

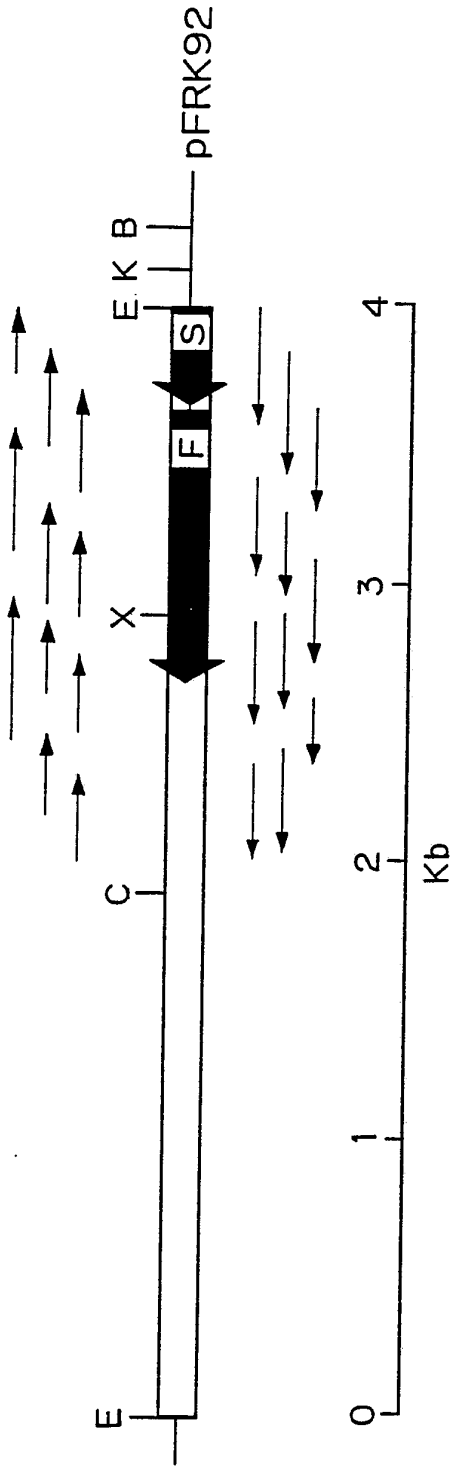


Fig. 13

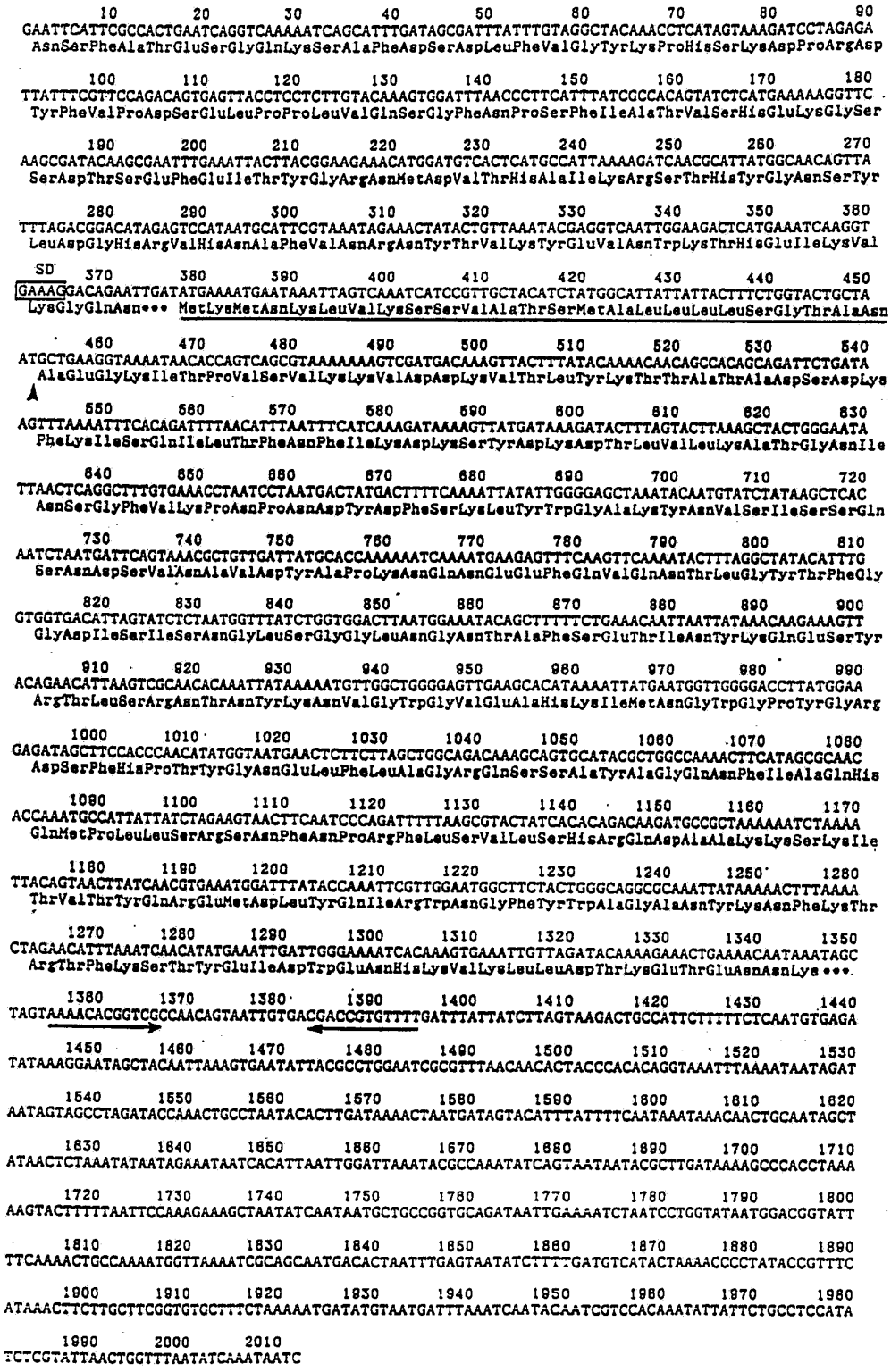

SD
MetLysMetAsnLysLeuValLysSerSerValAlaThrSerMetAlaLeuLeuLeuLeuSerGlyThrAlaAsn

Fig. 14

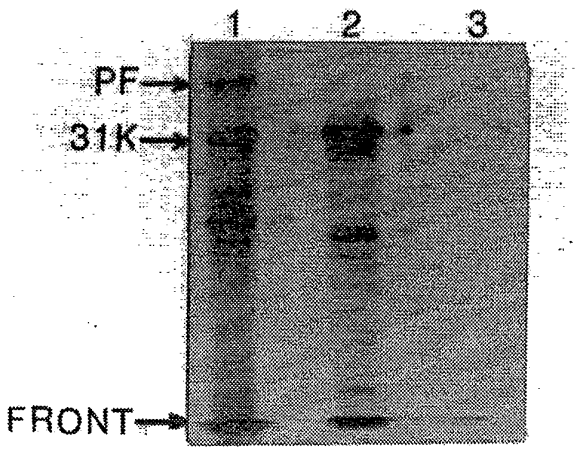


Fig. 15

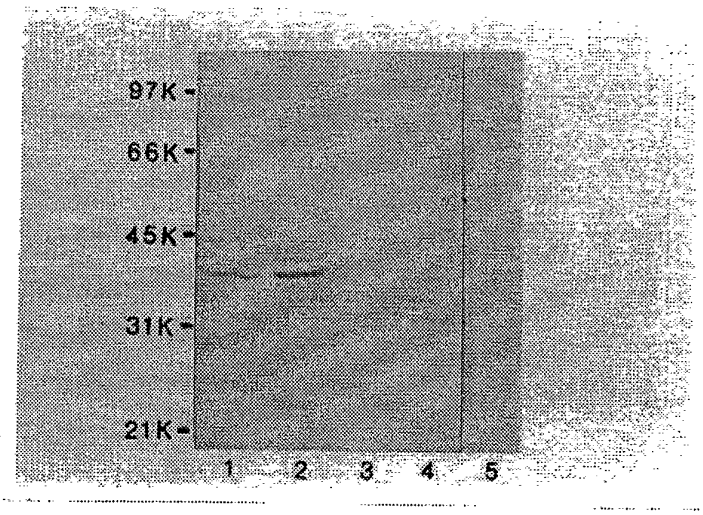
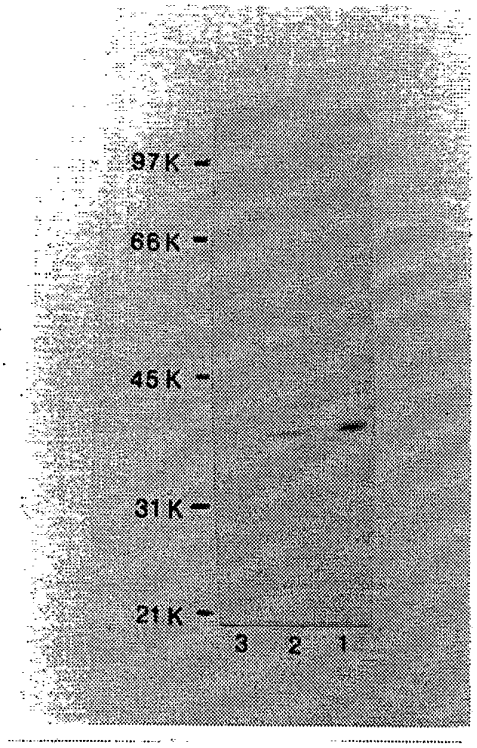


Fig. 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP92/01317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^5 G01N33/569, C12P21/02, C12P21/08, C12N15/10, C12N15/31, C07K13/00//(C12N15/31, C12R1:445)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^5 G01N33/569, C12P21/02, C12P21/08, C12N15/10, C12N15/31, C07K13/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS, WPI, BIOSIS PREVIEW

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Infect. Immun. Vol. 56, No. 1, 1988, Morinaga N. et al., "Changes in binding of Staphylococcal leukocidin to HL-60 cells during differentiation induced by DMSO" p. 2479-2483	2, 6
P,X	Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 181, No. 1, 1991, Rahman A. et al., "Nucleotide sequence of leukocidin S-component gene LUKS from methicillin resistant Staphylococcus-aureus" p. 138-144	2-5, 10, 11
P,X	Biochem. Biophys. Res. commun., Vol. 181, No. 2, 1992, Rahman A. et al., "Molecular cloning and nucleotide seguence of leukoxidin F-component gene LUKF from methicillin resistant Staphy lococcus-aureus" p. 640-646	6-11

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
December 10, 1992 (10. 12. 92)	January 7, 1993 (07. 01. 93)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 92 / 01317

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[5] G01N33/569, C12P21/02, C12P21/08, C12N15/10, C12N15/31, C07K13/00// (C12N15/31, C12R1:445)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[5] G01N33/569, C12P21/02, C12P21/08, C12N15/10, C12N15/31, C07K13/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAS, WPI, BIOSIS PREVIEW

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	Infect. Immun., 第56巻, 第9号, 1988, Morinaga N. et al. 「Changes in binding of Staphylococcal leukocidin to HL-60 cells during differentiation induced by DMSO」 p. 2479-2483	2, 6
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 第181巻, 第1号, 1991, Rahman A. et al. 「Nucleotide sequence of leukocidin S-component gene LUKS from methicillin resistant Staphylococcus - aureus」 p. 138-144	2-5, 10, 11

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.12.92

国際調査報告の発送日
07.01.93

名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
谷口 博 印
4B 9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 92/01317

C（続き）. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 第184巻, 第2号, 1992, Rahman A. et al. 「Molecular cloning and nucleotide seguence of leukocidin F-component gene LUKF from methicillin resistant Staphylococcus-aureus」 p. 640-646	6-11