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

特許第5911724号
(P5911724)

(45)発行日　平成28年4月27日(2016.4.27)　(24)登録日　平成28年4月8日(2016.4.8)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	ZNA
A61K 39/09	(2006.01)	A61K	39/09	
A61P 37/02	(2006.01)	A61P	37/02	
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04	
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39	

請求項の数 17　(全 23 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-530570 (P2011-530570)
(86)(22)出願日　平成21年10月6日 (2009.10.6)
(65)公表番号　特表2012-504661 (P2012-504661A)
(43)公表日　平成24年2月23日 (2012.2.23)
(86)国際出願番号　PCT/GB2009/051321
(87)国際公開番号　WO2010/041056
(87)国際公開日　平成22年4月15日 (2010.4.15)
審査請求日　平成24年9月25日 (2012.9.25)
(31)優先権主張番号　0818231.3
(32)優先日　平成20年10月6日 (2008.10.6)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

前置審査

(73)特許権者　500342709
ザ　ユニバーシティ　オブ　ノッティンガム
イギリス国エヌジー７　２アールディー　ノッティンガム、ユニバーシティ　パーク
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(74)代理人　100157956
弁理士　稲井　史生
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉　真奈美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】乳房連鎖球菌のソルターゼ固定化表面タンパク質を含む組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
乳房連鎖球菌(Streptococcus uberis)ソルターゼ固定化タンパク質ＳＵＢ１０９５を含む免疫原性組成物であって、対象に投与されたときに免疫応答を引き起こすことができ、そして、組成物中の抗原に対する免疫応答を引き起こすことができ、免疫原性組成物が投与された対象において乳房連鎖球菌による感染を予防するか、または減少させるように作用する、免疫原性組成物。
【請求項２】
免疫原性組成物が乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質ＳＵＢ１１５４およびＳＵＢ０１４５から選択される１つ以上をさらに含む、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項３】
免疫原性組成物が乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質ＳＵＢ１１５４をさらに含む、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項４】
１つ以上の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質が全長タンパク質由来の少なくとも１つのエピトープを含む、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項５】
対象が反芻動物であってもよい哺乳動物である、請求項１から４のいずれかに記載の免疫原性組成物。
【請求項６】

組成物が、１つ以上の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質に加えて、さらに１つ以上の抗原を含む、請求項１から５のいずれかに記載の免疫原性組成物。
【請求項７】
組成物が対象に投与されたときに防御免疫応答を引き起こす／生じるために使用される、請求項１から６のいずれかに記載の免疫原性組成物。
【請求項８】
組成物が乳房連鎖球菌に対する予防または治療ワクチンとして使用される、請求項１から７のいずれかに記載の免疫原性組成物。
【請求項９】
組成物がさらにアジュバントを含む、請求項１から８のいずれかに記載の免疫原性組成物。
【請求項１０】
組成物が乳房連鎖球菌に起因する感染に対するワクチンとして使用される、請求項１から９のいずれかに記載の免疫原性組成物。
【請求項１１】
ワクチンが、乳房連鎖球菌への暴露の危険性がある動物へ予防的に、および／または、すでに乳房連鎖球菌に暴露された動物へ治療的に投与される、請求項１０に記載の免疫原性組成物。
【請求項１２】
組成物が、免疫学的に有効量の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質からなる抗原を含む、請求項１０または１１に記載の免疫原性組成物。
【請求項１３】
乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質ＳＵＢ１０９５を、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に含む医薬組成物。
【請求項１４】
タンパク質ＳＵＢ１１５４およびＳＵＢ０１４５を含む群から選択される、１つ以上の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質をさらに含む、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
乳房連鎖球菌による感染の影響からヒトまたは非ヒト動物を防御するために使用するための、請求項１から１４のいずれかに記載の組成物。
【請求項１６】
ヒトまたは非ヒト動物における免疫応答を増強するために使用するための、請求項１から１４のいずれかに記載の組成物。
【請求項１７】
乳房連鎖球菌に起因する疾患の予防および／または処置のために使用するための、請求項１から１４のいずれかに記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、乳房連鎖球菌(Streptococcus uberis)に対する免疫応答の誘導に使用するための免疫原性組成物、特に、防御免疫応答を引き起こすことができる免疫原性組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
乳房連鎖球菌（S. uberis）は、現在、ＵＫにおいて全臨床型乳腺炎事象の約２０－３０％に関与しており、世界中で同様の発生率で起こる。乳腺炎は、世界中で最も経済的に重要な乳牛の感染病である。臨床型乳腺炎による年間損失は、ＵＫにおいて約１．７億ポンドおよびＵＳＡにおいて１５－２０億ドルと概算されている。これらの損失は、ミルク生産の減少、処置の関連コストならびに持続的および反復的に感染するウシの大量処分に

起因し得る。乳腺炎を引き起こす微生物は、接触感染性伝達経路を示すもの、例えば、黄色ブドウ球菌およびＢ群連鎖球菌(Streptococcus agalactiae)、ならびにさらに環境保有宿主から頻繁に乳房に感染するもの、例えば、大腸菌および乳房連鎖球菌に分けることができる。改善された搾乳実施、搾乳後の乳頭消毒およびそれぞれの泌乳後の日常の乳房内抗菌処置に基づいた、過去２０年にわたる種々の抑制対策の適用は、単独で接触感染性伝達経路を有する病原体に対して有効であることは証明されているが、環境保有宿主の乳腺への感染の発症に対して、たとえあったとしても、ほとんど影響を与えていない。乳房連鎖球菌に起因するウシ乳腺炎の抑制の失敗は、主に、感染の原因についての不十分な情報に起因する。

【０００３】

乳腺（乳房）の炎症を引き起こすウシ乳腺炎は、通常、細菌による乳腺内感染の結果として生じる。乳腺炎の徴候は、宿主および侵入病原体における因子にしたがって変化し、乳腺内感染は、無症候性疾患または症候性疾患をもたらし得る。無症候性乳腺炎は、本質的に、疾患の明らかな徴候を示さない。症候性疾患と関連する感染は、影響を受けた腺における疼痛および膨張を伴うミルク中の可視的な異常（タンパク質凝集体または凝固）から、漿液中の凝集タンパク質のみからなる分泌物の生産に及ぶことができる。重症例では、全身的な徴候、例えば、体温の上昇および食欲喪失が起こる場合があり、菌血症、敗血症を発症させて、動物の死に至ることもある。

【０００４】

感染していない乳腺由来のミルクは、一般的に１５０，０００細胞／ｍｌ以下の、マクロファージ、好中球およびリンパ球を含む白血球を含む。感染は、通常、感染した乳腺の乳房区(quarter)およびミルクへの好中球の流入により特徴付けられる局所的炎症性応答をもたらす。得られるミルク細胞数は、乳腺の感染の代替的測定値ならびに乳質および乳房健康の測定値として国際的に使用される。無症候的に感染した乳房区由来のミルクは、通常、２５０，０００細胞／ｍｌを超える細胞数を有するが、この数字は広範に変動し得る。症候的に感染した乳房区由来のミルクは、通常、２，０００，０００細胞／ｍｌを超える細胞を含有する。細菌および／またはそれらの産物と分泌における多数の好中球との間の相互作用は、乳腺炎の特徴であるミルク生産の減少率、分泌物の分解および広範囲の炎症性変化の誘導の根本的な主要原因であると考えられている。

【発明の概要】

【０００５】

本発明の１つの目的は、乳房連鎖球菌に対する防御免疫応答を引き起こし、それにより乳腺炎の発症を予防するか、または減少させるために使用することができる、１つ以上の組成物を提供することである。

【０００６】

第１の局面において、本発明は、１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質またはそれらの免疫原性部分を含む免疫原性組成物であって、対象に投与されたときに免疫応答を引き起こすことができる組成物を提供する。

【０００７】

好ましくは、１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ソルターゼ固定化タンパク質またはその免疫原性部分である。

【０００８】

乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質は、野生型乳房連鎖球菌において、ソルターゼ酵素の作用により細菌の表面に固定されているあらゆるタンパク質を示す。

【０００９】

１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、タンパク質ＳＵＢ０１４５、ＳＵＢ１０９５およびＳＵＢ１１５４、または上記タンパク質の１つと５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上、好ましくは８０％またはそれ以上の配列相同性を有するタンパク質を含む群から選択され得る。

【００１０】

免疫原性組成物は、２つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質またはその免疫原性部分を含み得る。

【００１１】

２つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または２つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、タンパク質ＳＵＢ０１４５、ＳＵＢ１０９５およびＳＵＢ１１５４、または上記タンパク質の１つと５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上、好ましくは８０％またはそれ以上の配列相同性を有するタンパク質を含む群から選択され得る。

【００１２】

免疫原性組成物は、タンパク質ＳＵＢ０１４５、ＳＵＢ１０９５およびＳＵＢ１１５４、または上記タンパク質の１つと５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上、好ましくは８０％またはそれ以上の配列相同性を有するタンパク質を含み得る。

【００１３】

免疫原性組成物は、タンパク質ＳＵＢ１０９５およびＳＵＢ１１５４、または上記タンパク質の１つと５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上、好ましくは８０％またはそれ以上の配列相同性を有するタンパク質を含み得る。

【００１４】

１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、タンパク質ＳＵＢ０１３５、ＳＵＢ０１４５、ＳＵＢ０２０７、ＳＵＢ０８２６、ＳＵＢ０８８８、ＳＵＢ１０９５、ＳＵＢ１１５４、ＳＵＢ１３７０、ＳＵＢ１７３０およびＳＵＢ０２４１、または上記タンパク質の１つと５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上、好ましくは８０％またはそれ以上の配列相同性を有するタンパク質を含む群から選択され得る。

【００１５】

１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、タンパク質ＳＵＢ０１３５、ＳＵＢ０２０７、ＳＵＢ０８２６、ＳＵＢ０８８８、ＳＵＢ１０９５、ＳＵＢ１１５４、ＳＵＢ１３７０、ＳＵＢ１７３０およびＳＵＢ０２４１、または上記タンパク質の１つと５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上、好ましくは８０％またはそれ以上の配列相同性を有するタンパク質を含む群から選択され得る。

【００１６】

相同性パーセントへの言及は、２つのアラインされた配列間の同一性パーセントに関係する。同一性パーセントは、２つのタンパク質配列が最大に一致するようにアラインされ、逆位および転座が明らかにされるとき、２つのタンパク質において同一の残基を示す。好ましくは、同一性パーセントは、機能に影響しないアラインされた配列間のあらゆる保存的相違点を無視する。アラインされた配列間の同一性パーセントは、よく確立されているツール（例えば、BLAST algorithm - Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., (1990) J Mol Biol. 215:403-10）を使用することにより、確立することができる。

【００１７】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０１３５である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０１３５ではない。

【００１８】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０１４５である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０１４５ではない。

【００１９】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０２０７である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０２０７ではない。

【００２０】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０８２６である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０８２６ではない。

【００２１】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０８８８である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０８８８ではない。

【００２２】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１０９５である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１０９５ではない。

【００２３】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１１５４である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１１５４ではない。

【００２４】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１３７０である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１３７０ではない。

【００２５】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１７３０である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１７３０ではない。

【００２６】

１つの態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０２４１である。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０２４１ではない。

【００２７】

他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０１６４ではない。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０３４８ではない。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ１７３９ではない。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０２０６ではない。他の態様において、１つ以上のソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質は、ＳＵＢ０３３７ではない。

【００２８】

タンパク質の免疫原性部分は、免疫応答を引き起こすことができる大型タンパク質の一

部を示す。好ましくは、引き起こされる免疫応答は、タンパク質の一部およびタンパク質の全体を認識する。好ましくは、免疫原性部分は、全長タンパク質由来の少なくとも１つのエピトープを含む。

【００２９】

免疫原性組成物は、対象に投与されたときに組成物中の抗原に対する免疫応答を引き起こすことができる組成物である。好ましくは、引き起こされる免疫応答は、防御的である。好ましくは、対象は、哺乳動物、さらに好ましくは反芻動物、例えばウシ、ヒツジまたはヤギである。本発明の免疫原性組成物中の抗原は、ソルターゼ酵素により乳房連鎖球菌の表面に固定されている１つ以上のタンパク質であり得る。

【００３０】

好ましくは、本発明の組成物により引き起こされる免疫応答は、組成物中の抗原に対するものであり、免疫原性組成物が投与された対象において乳房連鎖球菌による感染を予防するか、または減少させるように作用する。該免疫応答は、乳房連鎖球菌を認識して破壊し得る。あるいは、またはさらに、引き起こされる免疫応答は、乳房連鎖球菌の複製を妨げるか、または防止し得る。あるいは、またはさらに、引き起こされる免疫応答は、対象における乳房連鎖球菌誘発疾患、例えば、乳腺炎を妨げるか、または防止し得る。好ましくは、該組成物により引き起こされる免疫応答は、組成物中のタンパク質が由来する株以外の乳房連鎖球菌株に対するものであることもできる。

【００３１】

生じる免疫応答は、細胞性および／または抗体介在性免疫応答であり得る。通常、免疫応答は、組成物中の１つ以上の免疫原性タンパク質に対する、抗体、Ｂ細胞、ヘルパーＴ細胞、サプレッサーＴ細胞および／または細胞毒性Ｔ細胞の生産のうち１つ以上を含むが、これらに限定されない。

【００３２】

該組成物は、また、１つ以上の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質に加えて、さらに１つ以上の抗原を含み得る。さらなる抗原は、また、由来する病原体に対する免疫応答を引き起こすことができ得る。さらなる抗原は、乳房連鎖球菌由来であり得るか、または、異なる病原体由来であり得る。

【００３３】

該組成物は、対象に投与されたときに防御免疫応答を引き起こす／生じるために使用され得る。該防御免疫応答は、対象感染時に乳房連鎖球菌の死を引き起こすか、または、対象における乳房連鎖球菌の複製、および／または疾患の誘発を防止または阻止し得る。

【００３４】

該組成物は、乳房連鎖球菌に対する予防または治療ワクチンとして使用され得る。

【００３５】

さらなる局面において、本発明は、１つ以上の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質または１つ以上の乳房連鎖球菌タンパク質またはそれらの部分を、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に含む医薬組成物を提供する。

【００３６】

好ましくは、該医薬組成物は、本発明のあらゆる局面における組成物を含む。

【００３７】

好ましくは、該医薬組成物は、乳房連鎖球菌に対する防御免疫応答を生じることができる。

【００３８】

本明細書において使用される「防御免疫応答を生じる」なる表現は、組成物が投与される宿主生物、例えば、ウシにおいて防御応答を産生することができることを意味する。好ましくは、防御免疫応答は、乳房連鎖球菌による続発性感染に対して防御する。該防御免疫応答は、乳房連鎖球菌の作用機序に影響することによって乳房連鎖球菌の複製を減少させることにより、感染のレベルを排除させるか、または減少させ得る。好ましくは、防御免疫応答は、乳房連鎖球菌に起因する疾患を減少させるか、または予防する。

【００３９】
医薬組成物中で使用するために適当な許容される賦形剤および担体は、当業者によく知られている。これらは、固体または液体担体を含み得る。適当な液体担体は、水および塩水を含む。組成物のタンパク質は、エマルジョンに製剤化され得るか、または生分解性ミクロスフェアまたはリポソームに製剤化され得る。
【００４０】
該組成物はさらにアジュバントを含み得る。適当なアジュバントは、当業者によく知られており、フロイント不完全アジュバント（動物において使用するため）および金属塩、例えば、アルミニウムまたはカルシウム塩を含み得る。
【００４１】
該組成物は、また、組成物のコンシステンシー(consistency)を調節するための、および／または組成物からのタンパク質の放出を調節するためのポリマーまたは他の剤を含み得る。
【００４２】
該組成物は、また、希釈剤のような他の剤を含み得、水、塩水、グリセロールまたは他の適当なアルコールなど、湿潤剤または乳化剤、緩衝剤、増粘剤、例えばセルロースまたはセルロース誘導体、保存剤、界面活性剤、抗菌剤などを含み得る。
【００４３】
好ましくは、組成物中の活性成分は、５０％を越える純度、通常８０％を越える純度、しばしば９０％を越える純度、さらに好ましくは９５％、９８％または９９％を越える純度である。１００％の純度、例えば、約９９．５％の純度または約９９．９％の純度に達する活性成分が、非常にしばしば使用される。
【００４４】
本発明の組成物は、乳房連鎖球菌に起因する感染に対するワクチンとして使用され得る。該ワクチンは、乳房連鎖球菌への暴露の危険性がある動物へ予防的に、および／または、すでに乳房連鎖球菌に暴露された動物へ治療的に投与され得る。
【００４５】
好ましくは、該組成物がワクチンとして使用されるとき、該組成物は、免疫学的に有効量の抗原（乳房連鎖球菌タンパク質からなる）を含む。抗原の「免疫学的に有効量」は、個体に投与されるとき、単回投与または一連の投与のいずれかにおいて、乳房連鎖球菌による感染の処置または予防に有効な量である。該量は、処置される個体の健康および身体状態ならびに抗原に依存して変化し得る。該量は、日常の試験により決定することができる比較的広い範囲内であると予期される。
【００４６】
組成物の投与経路は、組成物中のタンパク質の製剤化に依存して変化し得る。該組成物は、筋肉内、皮内、皮下、腹腔内、静脈内または乳房内に投与されるように調整され得る。あるいは、該組成物は、例えば、鼻腔内による非経腸的、経口的、経口内、吸入的、表皮的、経皮的、局所的、膣内または経直腸投与的に投与されるように調整され得る。
【００４７】
該組成物は、単回投与または複数回投与スケジュールの一部として投与されるように調整され得る。複数回投与は、一次免疫後の１回以上の追加免疫として投与され得る。一次免疫および追加免疫間の適当なタイミングは、日常的に決定することができる。
【００４８】
本発明の組成物は、対象に投与後に、血清殺菌性抗体応答を誘導することができ得る。これらの応答は、好都合にはマウスにおいて測定され、該結果は、ワクチン有効性の標準指標である。
【００４９】
本発明の組成物は、また、あるいは、必ずしも細菌を破壊することなく、乳房連鎖球菌による感染に対して防御するために、宿主細胞上にタンパク質をもたらす免疫応答を引き起こすことができ得る。

【００５０】
さらなる局面において、本発明は、免疫応答を引き起こすための薬物の製造における１つ以上の乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質の使用を提供する。該薬物は、乳房連鎖球菌に対する対象の予防または治療ワクチンのために使用され得る。該薬物は、予防または治療ワクチンであり得る。
【００５１】
さらなる局面において、本発明は、本発明の任意の他の局面の組成物をヒトまたは非ヒト動物に投与することを含む、ヒトまたは非ヒト動物、好ましくはウシを乳房連鎖球菌による感染の影響から防御するための方法を提供する。
【００５２】
他の局面において、本発明は、本発明の組成物をヒトまたは非ヒト動物に投与することを含む、ヒトまたは非ヒト動物、好ましくはウシにおける免疫応答を増強するための方法を提供する。該免疫応答は、好ましくは防御的である。該方法は、すでに免疫(primed)されている対象における追加応答を増強させ得る。該免疫応答は、予防または治療的であり得る。
【００５３】
本発明の使用、方法および組成物は、好ましくは乳房連鎖球菌に起因する疾患の予防および／または処置用である。
【００５４】
当業者は、上記の好ましいあらゆる特性が、本発明のあらゆる局面に適用することができることを認識すべきである。
【００５５】
本発明の好ましい態様は、今回、図面および実施例において、単なる例示のために記載している。
【図面の簡単な説明】
【００５６】
【図１】図１Ａ、ＢおよびＣは、乳牛における野生型乳房連鎖球菌０１４０Ｊおよび乳房連鎖球菌Ｓｒｔ変異体での抗原投与後の細菌単離、体細胞数および臨床応答の結果を示す。図１（Ａ）は、抗原投与後の乳房連鎖球菌の細菌回収を示す。データは、株０１４０Ｊ（四角；ｎ＝４）またはＳｒｔＡ変異体（三角；ｎ＝８）のいずれかで抗原投与された動物のミルクから得られた細菌数の幾何平均として示される。図１（Ｂ）は、乳房連鎖球菌の野生型およびＳｒｔ変異体での抗原投与後の炎症性応答を説明する。データは、株０１４０Ｊ（四角；ｎ＝４）またはＳｒｔＡ変異体（三角；ｎ＝８）のいずれかで抗原投与された動物のミルクから得られた体細胞数の幾何平均として示される。図１（Ｃ）は、乳房連鎖球菌の野生型およびＳｒｔ変異体での抗原投与後の臨床的発現からの組合せ臨床スコアを説明する。データは、株０１４０Ｊ（四角；ｎ＝４）またはＳｒｔＡ変異体（三角；ｎ＝８）のいずれかで図２で概説されているとおり、乳房区の外観およびミルクの外観に関して得られた臨床スコアの平均により示される。
【００５７】
【図２】図２は、乳房連鎖球菌での感染に対する臨床応答の発現を表の形式で説明する。全ての乳房区およびミルクサンプルを、抗原投与後のそれぞれのミルクでこれらの基準に対して分析した。
【００５８】
【図３】図３は、乳房連鎖球菌ゲノムのバイオインフォマティクスにより見出された、ソルターゼにより固定される可能性のあったタンパク質を表の形式で説明する。乳房連鎖球菌のゲノムを、推定ソルターゼ固定化タンパク質に関してＬＰＸＸＧモチーフを使用して探索した。同定されたタンパク質の一覧は、Ｃ－末端に向かってモチーフ、すなわちＬＰＸＸＧの状況および位置、次にＣ－末端位置に疎水性領域および荷電残基ならびにＮ－末端に認識できる分泌シグナルペプチドの存在を使用することにより精密化した。
【００５９】

【図４Ａ】図４Ａは、ＴＨＢ培地において培養された乳房連鎖球菌０１４０Ｊの細胞壁抽出物において同定されたソルターゼ固定化タンパク質を記載する。[a]乳房連鎖球菌０１４０Ｊのゲノム配列(Ward et al 2009)における遺伝子およびタンパク質注釈、[b]Wellcome Trust Sanger InstituteのＡｒｔｅｍｉｓデータベース（http://www.sanger.ac.uk/）から得られるタンパク質前駆体に対する理論分子量値、[c]それぞれのタンパク質に対する特異的なペプチドヒット数、[d]実験的に検出されたペプチドにより包含されるタンパク質配列のパーセント、[e]ＳｒｔＡ変異体の細胞壁画分において同定された２つのペプチド。

【００６０】

【図４Ｂ】図４Ｂは、ＢＨＩ培地において培養された乳房連鎖球菌０１４０Ｊの細胞壁抽出物において同定されたソルターゼ固定化タンパク質を記載する。[a]乳房連鎖球菌０１４０Ｊのゲノム配列(Ward et al 2009)における遺伝子およびタンパク質注釈、[b]Wellcome Trust Sanger InstituteのＡｒｔｅｍｉｓデータベース（http://www.sanger.ac.uk/）から得られるタンパク質前駆体に対する理論分子量値、[c]それぞれのタンパク質に対する特異的なペプチドヒット数、[d]実験的に検出されたペプチドにより包含されるタンパク質配列のパーセント、[e]ＳｒｔＡ変異体の細胞壁画分において同定された４つのペプチド。

【００６１】

【図５】図５Ａおよび５Ｂは、乳房連鎖球菌０１４０ＪおよびｓｒｔＡ変異体の抽出物からのＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０の同定を示す。図５Ａ－Ｓｕｂ１１５４に対するウサギ抗血清を、０１４０Ｊ（レーン２）およびＳｒｔＡ変異体（レーン３）由来のタンパク質界面活性剤抽出物、０１４０Ｊ（レーン４）、ＳｒｔＡ変異体（レーン５）およびＳｕｂ１１５４変異体（レーン６）由来の濃縮され沈殿した媒体を免疫ブロット法で探索するために使用した。分子量標準はレーン１に示されている。図５Ｂ－Ｓｕｂ１３７０に対するウサギ抗血清を、０１４０Ｊ（レーン１）およびＳｒｔＡ変異体（レーン２）由来のタンパク質界面活性剤抽出物、０１４０Ｊ（レーン３）、ＳｒｔＡ変異体（レーン４）およびＳｕｂ１３７０変異体（レーン５）由来の濃縮され沈殿した媒体を免疫ブロット法で探索するために使用した。分子量標準はレーン６に示されている。

【００６２】

【図６】図６Ａから６Ｏは、乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質のアミノ酸配列である。

【図６Ａ】図６ＡはＳＵＢ１３７０の配列（配列番号：１）（亜鉛カルボキシペプチダーゼ）である。

【図６Ｂ】図６ＢはＳＵＢ０１４５の配列（配列番号：２）（ラクトフェリン結合タンパク質）である。

【図６Ｃ】図６ＣはＳＵＢ０１３５の配列（配列番号：３）（フルクタンベータフルクトシダーゼ前駆体）である。

【図６Ｄ】図６ＤはＳＵＢ１７３０の配列（配列番号：４）である。図６ＥはＳＵＢ０８８８の配列（配列番号：５）である。

【図６Ｆ】図６ＦはＳＵＢ０２０７の配列（配列番号：６）である。

【図６Ｇ】図６ＧはＳＵＢ１１５４の配列（配列番号：７）（スブチリン様セリンプロテアーゼ）である。

【図６Ｈ】図６ＨはＳＵＢ１０９５の配列（配列番号：８）（コラーゲン様タンパク質）である。

【図６Ｉ】図６ＩはＳＵＢ０８２６の配列（配列番号：９）（推定表面固定スブチラーゼ）である。

【図６Ｊ】図６ＪはＳＵＢ０１６４の配列（配列番号：１０）（推定短縮表面固定フィブロネクチン結合タンパク質）（推定偽遺伝子によってコードされるが）である。

【図６Ｋ】図６ＫはＳＵＢ０３４８の配列（配列番号：１１）（推定コラーゲン様タンパク質の残存物）（偽遺伝子によってコードされるが）である。

【図６Ｌ】図６ＬはＳＵＢ１７３９の配列（配列番号：１２）（推定表面固定化タンパク質）（偽遺伝子によってコードされるが）である。

【図６Ｍ】図６ＭはＳＵＢ０２０６の配列（配列番号：１３）（未知の機能の推定排出タンパク質）である。
【図６Ｎ】図６ＮはＳＵＢ０２４１の配列（配列番号：１４）（未知の機能の推定表面固定化タンパク質）である。
【図６Ｏ】図６ＯはＳＵＢ０３３７の配列（配列番号：１５）（推定表面存在グルタミン結合タンパク質）である。
【００６３】
【図７】図７は、野生型（０１４０Ｊ）およびｓｕｂ０１４５、ｓｕｂ１０９５またはｓｕｂ１１５４を欠いている弱毒変異体株での抗原投与後の細菌コロニー形成を示す。データは、実験的抗原投与後にそれぞれの搾乳で得られるミルクサンプルにおいて検出されるＬｏｇ$_{10}$ｃｆｕ／ｍｌの幾何平均として示す。
【発明を実施するための形態】
【００６４】
以下に示されているデータは、ソルターゼにより乳房連鎖球菌の表面に固定されているタンパク質であるトランスアミダーゼが、毒性において重要であることを証明し、さらに、いくつかのこのようなタンパク質（例えば、ｓｕｂ１０９５、ｓｕｂ１１５４およびｓｕｂ０１４５）が毒性に関して必須であり、したがって、この細菌において疾患を引き起こすために機能的に必要であることを明らかにする。タンパク質は良好な免疫原である。抗体の形態におけるこれらのタンパク質に対する免疫応答は、これらの機能を除去する可能性があり、したがって、同定されたタンパク質は、乳房連鎖球菌に起因する感染または疾患を減少または予防するために意図される免疫原性組成物内の有用な包含物である。
【実施例】
【００６５】
実施例１：乳房連鎖球菌のＳｒｔＡ変異体の生産および評価
方法および材料
細菌株および試薬
最初にＵＫにおけるウシ乳腺炎の臨床例から単離された乳房連鎖球菌株０１４０Ｊを、本試験にわたって使用した。該細菌は、常法通り日常的にTodd HewittまたはBrain Heart Infusion培養液において培養した。
【００６６】
スキムミルクは、Institute for Animal Healthの乳牛群内の数匹の乳牛から無菌で回収した未処理の牛乳から生産した。ミルクは乳腺内感染していない動物から回収した。遠心分離（３，０００×ｇ、１０分）後、上部脂肪層および沈降した細胞のペレットから、スキムミルクを注意深く取り出した。スキムミルクの無菌性を、アエスクリン（１．０％、ｗ／ｖ、ＡＢＡ）を含む血液寒天培地上に直接、５００μｌのミルクを置き、５ｍｌのミルクおよび等容量のTodd Hewitt培養液で集積培養し、次にＡＢＡ上の単一コロニーの単離を行うことにより決定した。両方の場合において、プレートを３７℃で１８時間インキュベートした。スキムミルクを４℃で保存し、７２時間以内に使用した。
【００６７】
他の細菌株および試薬を、テキストに記載されているとおりに使用した。
【００６８】
遺伝子型選択によるｓｒｔＡ変異体の単離
以前に記載されているもの（Taylor, D. L. et al, 2003. J Bacteriol 185:5210-5219; Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399）と同様のプロトコールにしたがって乳房連鎖球菌０１４０Ｊ　ｐＧｈｏｓｔ９：：ＩＳＳ１変異体バンクのＰＣＲスクリーニング後に、ｓｒｔＡ（Ｓｕｂ０８８１）変異体を単離した。簡単に言うと、個々の９６－ウェルプレートから一晩培養物を集め、ゲノムＤＮＡを、ローカス特異的プライマーＰ２６１（ｓｒｔＡ）およびＩＳＳ１特異的プライマー、Ｐ２４７またはＰ２５０を含むＰＣＲ増幅反応において鋳型として使用するために調製した。増幅は、３５サイクル（９５℃２０秒、５４℃１分および７２℃３分）を使用して実施し、AmpliTaq Gold master mix

（ＡＢＩ）で実施した。産物をゲル電気泳動、臭化エチジウムでの染色およびＵＶ光でのトランスイルミネーションにより可視化した。プレート同定後、ウェル位置を、標的プレートのカラムおよび列から集められたゲノムＤＮＡを使用して同様に同定した。変異体クローンの単離後、プラスミドベクターの切除を、抗生物質選択なしに許容温度（２８℃）での培養により促進させた。ｐＧｈｏｓｔ９ベクターの喪失およびＩＳＳ１の維持を、以前に記載されているサザンブロット法（Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399）により確認した。ｓｒｔＡにおける挿入物の存在を、オープン・リーディング・フレームのＰＣＲ増幅およびＩＳＳ１と破壊されたＯＲＦとの間の接合部にわたる得られた産物のシーケンシングにより確認した。使用されたＰＣＲプライマーは以下の表１に示されるとおりである。

【表１】

名称	配列 (5' - 3')	適用	テンプレート	アニーリング温度 (°C)
P247 ISS1 fwd	GCTCTTCGGATTTTCGGTATC	ISS1 プローブ	pGh9::ISS1	58
P250 ISS1 rev	CATTTTCCACGAATAGAAGGACTGTC	ISS1 プローブ	pGh9::ISS1	61
P261	TGGTTGAAGCAGAAGCTGAA	P247に対する srtA ORF 内の ISS1に関するスクリーニング	pGh9::ISS1	55
P409	GAGCAATTGCAAAATGAAAAGC	Sub1154 ORF の増幅	乳房連鎖球菌 0140J ゲノムDNA	58
P410	ATGTCAAAAGCCCGGTACCTTTACAG	Sub1154 ORF の増幅	乳房連鎖球菌 0140J ゲノムDNA	58
P615	GAAATGATGATGAGAAATTGAGA	P247に対する Sub1154 ORF 内の ISS1に関するスクリーニング	乳房連鎖球菌 0140J ::pGhost9-ISS1 ゲノムDNA プール	57
P630	AGCCACAAACACCATTCACA	P247に対する Sub1154 ORF 内の ISS1に関するスクリーニング	乳房連鎖球菌 0140J ::pGhost9-ISS1 ゲノムDNA プール	59
P480	GAAGAAGTGGTAACTGCTACAAAC	Sub1370 ORF の増幅	乳房連鎖球菌 0140J ゲノムDNA	60
P481	TACTAACTTCTTGTCATCTTGGTACCTTTT	Sub1370 ORF の増幅 Sub1370 ORF 内の ISS1に関するスクリーニング	乳房連鎖球菌 0140J ゲノムDNA	64
P621	CAACGAATCAACAAACTGAAAGC-3'	P250に対する Sub1370 内の ISS1に関するスクリーニング	乳房連鎖球菌 0140J ::pGhost9-ISS1 ゲノムDNA プール	59

表１：ＰＣＲプライマー。Ｐ２４７　ＩＳＳ１　ｆｗｄ（配列番号：１６）；Ｐ２５０

ＩＳＳ１　ｒｅｖ（配列番号：１７）；Ｐ２６１（配列番号：１８）；Ｐ４０９（配列番号：１９）；Ｐ４１０（配列番号：２０）；Ｐ６１５（配列番号：２１）；Ｐ６３０（配列番号：２２）；Ｐ４８０（配列番号：２３）；Ｐ４８１（配列番号：２４）；Ｐ６２１（配列番号：２５）。

【００６９】

乳房連鎖球菌から染色体ＤＮＡの抽出

ゲノムＤＮＡは、以前に記載されているHill and Leighの方法の変法を使用して調製した（Hill, A. W. et al 1994 FEMS Immunol Med Microbiol 8:109-117）。簡単に言うと、１．５ｍｌの一晩培養物を１０，０００×ｇで２分遠心分離し、細胞ペレットを５００μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．８で洗浄した。細菌細胞壁を、３０単位／ｍｌのムタノリシンおよび１０ｍｇ／ｍｌのリゾチーム（両方ともSigma-Aldrich, St Louis, MO, USAから）を含む３７５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｐＨ７．８中でのに再懸濁により崩壊させ、次に３７℃で３０分インキュベーションした。全細胞溶解を、最終濃度１５０μｇ／ｍｌに２０μｌのＳＤＳ溶液（２０％ｗ／ｖ　５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．８）およびプロテイナーゼＫ（Ｓｉｇｍａ）の添加により達成し、３７℃で１時間さらにインキュベーションした。細胞壁物質を、２００μｌの飽和ＮａＣｌの添加による沈降、次に１２，０００×ｇで１０分の遠心分離により除去した。上清をフェノール・クロロホルムで抽出し、ＤＮＡを２容量の無水エタノールの添加により沈澱させた。ＤＮＡペレットを、７０％水性エタノールで洗浄し、空気乾燥させ、２０μｇ／ｍｌのＲＮＡａｓｅ－Ａ（Ｓｉｇｍａ）を含むＴＥバッファーに再懸濁した。

【００７０】

泌乳期乳牛への乳房連鎖球菌０１４０ＪおよびＳｒｔＡ変異体での抗原投与

感染原因におけるＳｒｔＡの役割を、乳牛の乳腺内感染モデルにおいて、株０１４０ＪおよびＳｒｔＡを欠いている変異体（ｓｒｔＡ変異体）の毒性比較により決定した。細菌は、Ｔｏｄｄ　Ｈｅｗｉｔｔ　培養液において１８時間３７℃で培養した。細胞を遠心分離（１０，０００×ｇ、１０分）により回収し、発熱物質－非含有塩水（Ｓｉｇｍａ）に懸濁し、必要な細胞密度を提供するように同じもので希釈した。それぞれの株の懸濁液を、抗原投与動物に使用するまで氷上に保持した。それぞれの懸濁液の同一のアリコートにおける生菌数を抗原投与前後に数えた。

【００７１】

第１の泌乳から２－１０週以内の６匹の乳牛を、抗原投与のためにＩｎｓｔｉｔｕｔｅの乳牛群から選択した。選択のための基準は以下のものである。乳腺炎の徴候の非存在、抗原投与前にミルクサンプルにおける細菌の非存在、現在の泌乳中に乳腺炎の病歴がない、および出産７および１４日後に得られたミルクサンプルにおいて乳腺内感染の証拠がない。動物に対し、１ｍｌの乳房連鎖球菌を含む発熱物質－非含有塩水（Ｓｉｇｍａ）の注入により乳房区に抗原投与した。２匹の動物に対し、全４つの乳房区に6.0×10^{2}ｃｆｕの株０１４０Ｊを抗原投与し、さらに４匹の動物に対し、全８つの乳房区に類似の用量のｓｒｔＡ変異体を抗原投与した。抗原投与後、動物を１日に２回（０７：００時および１５：３０時）搾乳および検査し、臨床的エンドポイントのあらかじめ決められた基準（凝固し変色したミルクおよび／または乳房区腫大または触診において誘発する不快感）に達したものを、図２で概説された規定された基準にしたがって、商標登録された(proprietary branded)抗生物質で処置した。ミルクサンプルを取り、下記のとおりに細菌および体細胞に関して分析した。

【００７２】

ミルクサンプルの分析

存在する生菌数を、ＡＢＡ上に１ｍｌおよび１００μｌのそれぞれのミルクサンプルを直接置くことにより概算した。また、サンプルを塩水で希釈し、５０μｌのそれぞれの希釈物をＡＢＡ上に直接置いた。それぞれの場合において、乳房連鎖球菌の存在および／または数を測定し、回収された単離物の遺伝子型を、以下に記載されているとおり、染色体

ＤＮＡの制限酵素切断フラグメント長多型（ＲＦＬＰ）およびｓｒｔＡ遺伝子座の増幅を含むことにより、決定した。ミルクサンプル中に存在する体細胞数を、コールターカウンター（Beckman Coulter, Ltd）を使用して測定した。

【００７３】

メタノールクロロホルム沈降による細菌増殖培地由来のタンパク質の調製

細菌を、ＢＨＩ（２００ｍｌ）中で培養培地でＯＤ６００ｎｍで約０．５に増殖させ、遠心分離（１６，０００×ｇ、２０分、４℃）により回収し、細菌増殖培地を０．２２μＭフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を介してフィルター滅菌した。１×濃度で完全プロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）の添加後、細菌増殖培地を、１０ｋＤａの分子量排除でＡｍｉｃｏｎ遠心濾過機（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して、約１００倍に濃縮した。タンパク質を沈殿させるために、６００μｌのメタノールおよび１５０μｌのクロロホルム（両方ともＢＤＨ）を、２００μｌの濃縮された細菌増殖培地に加えた。調製物をボルテックスし、４５０μｌのＭｉｌｌｉＱ水を加え、遠心分離（１６，０００×ｇ、１分）した。上相を注意深く取り出して捨て、４５０μｌのメタノールを残りの物質に加え、これをボルテックスし、遠心（１６，０００×ｇ、２分）した。上清を除去し、残りのペレットを空気乾燥させ、ＳＤＳ－ローディングバッファーに再懸濁した。

【００７４】

界面活性剤での非固定化タンパク質の抽出

上記培養物由来の細菌ペレットを４０ｍｌのＰＢＳで３回洗浄し、５００μｌのヒアルロニダーゼを含むＰＢＳ（１００Ｕ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）に再懸濁した。細胞を２時間３７℃でインキュベートし、加水分解された莢膜物質を遠心分離（８０００×ｇ、６分、４℃）により除去した。細胞を４０ｍｌのＰＢＳで３回洗浄し、２００μｌのＰＢＳ中の０．１％（ｖ／ｖ） ＮｏｎＩｄｅｔ Ｐ－４０（ＮＰ－４０）に再懸濁した。遠心分離（１６，０００×ｇ、１０分、４℃）による細菌細胞の除去後に、界面活性剤抽出物を回収した。

【００７５】

組換えＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０タンパク質の生産および精製

乳房連鎖球菌０１４０Ｊ ゲノムＤＮＡから、スブチラーゼ様セリンプロテアーゼと相同性を有する推定ｓｒｔＡ基質であるＳｕｂ１１５４の予測される成熟コード配列（すなわち、Ｎ－末端シグナル配列を欠いている）を増幅するために、プライマーｐ４０９およびｐ４１０（上記表、参照）を設計した。３．４ｋｂのアンプリコンを、Ｐｈｕｓｉｏｎ™高忠実度ポリメラーゼ（New England Biolabs）を使用して産生し、MinElute PCR Purification Kit（Qiagen）を使用して精製し、方向性(directional)クローニングを容易にするために、ＫｐｎＩ（New England Biolabs）で処理した。プラスミドｐＱＥ１（Qiagen）を、ＰｖｕＩＩ、ＫｐｎＩおよびＡｎｔａｒｃｔｉｃホスファターゼ（全てNew England Biolabs）を使用して製造し、構築物を製造業者の指示にしたがって一晩２０℃でライゲーションした（Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ、New England Biolabs）。２０マイクロリットルのライゲーション混合物を、Atrazhev and Elliottの方法（Atrazhev, A. M., and J. F. Elliott. 1996 Biotechniques 21:1024）を使用して、脱塩した。約１０ｎｇの脱塩されたライゲーション混合物で、大腸菌 Ｍ１５ ｐＲＥＰ４（Ｑｉａｇｅｎ）を形質転換させ、組換えクローンをＬＢ Ｋａｎ２５μｇ／ｍｌ Ａｍｐ５０μｇ／ｍｌの寒天プレートで選択した。残基Ａｓｐ３４で開始する組換え（６×Ｈｉｓタグ）Ｓｕｂ１１５４タンパク質を、５０μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含む１６００ｍｌのＬＢ培養液への一晩培養物の希釈（１／３０）により精製し、２時間撹拌なしで２０℃で培養した。組換えＳｕｂ１３７０を、プライマーＰ４８０およびＰ４８１を使用することにより、同様に製造し、８００ｍｌの培養培地で同様に増殖した。タンパク質発現をＩＰＴＧの添加により最終濃度０．２ｍＭに誘導した。培養物をさらに２－４時間インキュベートし、次に８，０００×ｇで２０分遠心し、細菌細胞を回収した。それぞれ、約１ｍｇおよび０．３ｍｇの可溶性６×ＨｉｓタグＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０タンパク質を、製造業者の指示にしたがって、CelLyticおよびHisSelect高流量

カートリッジ（両方ともＳｉｇｍａ）を使用して、プロテアーゼ阻害剤（完全－ＥＤＴＡフリー；Ｒｏｃｈｅ）の存在下で精製した。

【００７６】

ウサギにおけるＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０抗血清の生産および免疫ブロット

約５０μｇのフリーズドライされた精製された組換えＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０タンパク質の５つのアリコートを、ウサギにおける血清生産のためにＤａｖｉｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ（Ｇｅｒｍａｎｙ）に提供した。抗血清（５０ｍｌ）は、フィルター滅菌され、保存剤として０．０２％のアジ化ナトリウムを含んで、提供された。

【００７７】

野生型乳房連鎖球菌およびＳｒｔＡ変異体の培養物由来の界面活性剤および培地抽出物を、１０％ドデシル硫酸ナトリウム　ポリアクリルアミド（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）ゲルで分離し、次に、免疫検出のためにニトロセルロース膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ）に移すか、あるいはＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ　（Ｎｏｖｅｘｉｎ）を使用してクマシー染色した。転写は、２５ｍＭのＴｒｉｓ－ｂａｓｅ、１９２ｍＭのグリシンおよび２０％（ｖ／ｖ）のメタノール、ｐＨ８．１－８．４からなる転写バッファーでＴｒａｎｓｂｌｏｔ装置（Ｂｉｏｒａｄ）において、１７０ｍＡで１時間で行った。転写後、膜をＰＢＳ中の１％のスキムミルク粉末のブロッキング溶液中で４℃で一晩インキュベートした。膜を、０．１％のＴｗｅｅｎ　２０（ＰＢＳＴ）を含むＰＢＳで５分間で３回洗浄し、次にブロッキング溶液中における、１／１２，０００希釈（Ｓｕｂ１１５４抗血清の場合）および１／１６，０００希釈（Ｓｕｂ１３７０抗血清の場合）のウサギ抗血清と共に１時間インキュベートした。膜をＰＢＳＴ中で５分間、３回洗浄し、次に１／１，０００希釈のＨＲＰに複合体化させたヤギ抗－ウサギ免疫グロブリンＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）と共に１時間インキュベートした。膜を、上記のとおりに再び洗浄し、ＨＲＰ複合体を、１６．７％のメタノールおよび０．０００１５％（ｖ／ｖ）のH_2O_2を含むＰＢＳ中の４－クロロナフトール（０．５ｍｇ／ｍｌ）の溶液を使用して検出し、暗下で１時間インキュベートし、膜をＰＢＳで洗浄し、乾燥させた。

【００７８】

ｓｒｔＡ変異体の単離および遺伝的特性化

乳房連鎖球菌０１４０Ｊの完全ゲノムの分析によって、単一のソルターゼ相同体であるソルターゼＡ（ｓｒｔＡ）の存在を確認した（Ward, P.N. et al (2008年提出) BMC Genomics）。変異体クローンを、逆方向性において、ソルターゼコード配列の塩基対２４８と２４９間に挿入されたＩＳＳ１エレメントで単離した。この変異ｓｒｔＡ遺伝子の翻訳産物は、ｓｒｔＡ　ＯＲＦにおいてコードされる２５２アミノ酸の最初の８２残基と終始コドンに達する前のＩＳＳ１エレメントにおけるさらなる１８残基からなった。

【００７９】

ウシ乳腺における実験的抗原投与後の野生型およびｓｒｔＡ変異体乳房連鎖球菌の感染性および毒性

野生型株と比較したｓｒｔＡ変異体の感染性および毒性を、多くの乳牛のウシ乳腺に抗原投与することにより測定した。６００ｃｆｕの野生型乳房連鎖球菌を与えた動物の全抗原投与乳房区は感染し、抗原投与４８－６０時間後までに、約10^6から10^7ｃｆｕ／ｍｌで細菌を流出した（図１Ａ）。類似の用量のｓｒｔＡ変異体を４匹の動物における８つの乳房区に抗原投与後、全てが感染の証拠を示し、ｓｒｔＡ変異体が、抗原投与２４時間以内に野生型のものと類似のレベルで、ミルク中で検出された。しかしながら、その後の細菌コロニー形成は、抗原投与２４時間後までの最大10^4ｃｆｕ／ｍｌミルクから減少し、その結果、実験の終わり（抗原投与の７日後）までに存在する平均細菌数が約１０ｃｆｕ／ｍｌになった（図１Ｂ）。この時点まで、８つの乳房区のうち２つだけが細菌を流出し続け、残りは感染を解消した（＜１ｃｆｕ／ｍｌ　ミルク）。

【００８０】

感染に応答した乳腺への細胞浸潤は、両方の動物群において同一であり、抗原投与株に

依存していなかった。それぞれの場合において、これは、このモデルにおいて以前に報告されているものと類似であり、抗原投与の４８－６０時間後までに最大約10^7細胞／ｍｌミルクに達した。野生型株で抗原投与された動物において、これは、乳腺炎の急性臨床徴候の外観と一致し（図２および図１Ｃ）、これは感染を解消し、疾患の徴候を緩和するために抗生物質治療の投与を必要とした。全く対照的に、ｓｒｔＡ変異体を投与された動物は、たとえあったとしても、乳腺炎の徴候をほとんど示さなかった（図２および図１Ｃ）。

【００８１】

図１に示される結果は、乳房連鎖球菌が、該細菌による毒性の完全発現のために、ｓｒｔＡによってコードされるソルターゼタンパク質を必要とすることを証明する。ＳｒｔＡを欠いている変異体は、最初に野生型乳房連鎖球菌と同様にウシ乳腺にコロニーを作ることができるが、最大細菌数が野生型株を抗原投与された動物由来のミルクにおいて検出されたものよりも約１０００倍低く維持されるので、高レベルで該腺にコロニーを作ることができなかった。これは、ｓｒｔＡ変異体が疾患の進行性臨床徴候を誘導できないことと一致した。

【００８２】

ｓｒｔＡは、高レベルのコロニー形成および／または症候性疾患と関連する重度の炎症応答の誘導のために、毒性に関与する１つ以上のタンパク質を細菌の表面に固定すると理解することができる。

【００８３】

乳房連鎖球菌におけるソルターゼ固定化タンパク質の検出

ソルターゼにより乳房連鎖球菌の細胞壁に固定されたタンパク質を同定するために、野生型乳房連鎖球菌の細胞壁タンパク質を乳房連鎖球菌のＳｒｔＡ変異体のものと比較した。

【００８４】

固定された細胞壁タンパク質のトリプシンペプチドを単離するために使用される方法論は、以下のとおりである。細菌培養物を、ＴＨＢまたはＢＨＩのいずれかにおいて指数増殖期および静止期の両方まで増殖させた。指数増殖培養物を、ＯＤ５５０ｎｍで０．６の光学濃度まで１．５リットルの培養液において増殖させ、静止期培養物を一晩１リットルの培養液において増殖させた。細菌細胞ペレットを遠心分離（１６，０００×ｇ、１０分、４℃）により回収し、ＰＢＳ、ＰＢＳ中の０．１％（ｖ／ｖ） Ｎｏｎｉｄｅｔ Ｐ４０（ＮＰ４０）およびＰＢＳで連続洗浄し、上記のとおりの遠心分離により回収した。細胞ペレットを、１×完全プロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）を含むＰＢＳに再懸濁し、０．１ｍｍのジルコニア／シリカビーズを含むねじぶた付きマイクロチューブ中で、氷上の散在された休息期間を有する５×１分間隔で最大速度でビーズ破砕することにより、破壊した。破壊されていない細胞およびビーズを遠心分離（８，０００×ｇ、１０分、４℃）２回により除去し、次に上清を高速遠心分離（１２５，０００×ｇ、３０分）に付した。得られたペレットを４％のＳＤＳ／ＰＢＳに再懸濁し、８０℃で４時間加熱し、次に遠心した（２００，０００×ｇ ３０分）。得られたペレットを３０℃でＭｉｌｌｉＱ水で４回洗浄し、上記のとおりに遠心した。次にペレットを１μｇのプロテオミクスグレードトリプシン（Ｓｉｇｍａ）を含む５０ｍＭの重炭酸アンモニウムに再懸濁し、一晩３７℃で撹拌してインキュベートした。遠心分離（１６，０００×ｇ、１０分）後に上清からペプチドを回収し、消化を最終濃度０．１％でのギ酸の添加により停止させた。

【００８５】

ペプチドを、逆相液体クロマトグラフィー系を使用するナノＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより、分離して分析した。ＭＳ／ＭＳデータの解釈および提示は、乳房連鎖球菌０１４０Ｊに関して生産されたゲノムデータベースを使用してＭａｓｃｏｔソフトウェア（Matrixscience, London, UK）を使用して行われる探索で、公開ガイドラインにしたがって行った。

【００８６】

存在するタンパク質を同定するために、トリプシンペプチドの配列を、乳房連鎖球菌の

翻訳ゲノム配列とアラインした。

【００８７】

図４およびＢに挙げられている９つのタンパク質は、乳房連鎖球菌０１４０Ｊから調製された細胞壁上に存在するが、乳房連鎖球菌の同系ｓｒｔＡ欠失変異体の培養物から作られた同等調製物に非存在であることが見出され、該タンパク質がソルターゼ固定化タンパク質であることが証明された。

【００８８】

９つのソルターゼ固定化タンパク質の配列は、図６Ａから６Ｉに挙げられている。図６Ｊから６Ｏは、プロテオミクスにより同定された推定ソルターゼ固定化タンパク質の配列である。

【００８９】

野生型およびＳｒｔＡ変異体乳房連鎖球菌のタンパク質抽出物におけるＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０タンパク質の検出

乳房連鎖球菌ソルターゼ固定化タンパク質の２つの例である組換えＳｕｂ１１５４および組換えＳｕｂ１３７０は、両方とも、増幅させたゲノム乳房連鎖球菌ＤＮＡから産生し、該産物をｐＱＥ１ベクターを使用する大腸菌でクローニングし、これはそれぞれのタンパク質のＮ－末端で６×Ｈｉｓタグを組み込んでいた。組換えタンパク質を、６×Ｈｉｓタグを利用して精製し、抗血清の生産のために使用した。

【００９０】

次に、ウサギ抗－Ｓｕｂ１１５４および抗－Ｓｕｂ１３７０を使用して、乳房連鎖球菌０１４０ＪおよびｓｒｔＡ変異体の界面活性剤および培地抽出物の免疫ブロット法により、Ｓｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０タンパク質を検出した。ＢＨＩにおいて培養されたＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０変異体由来の培地抽出物も、抗血清で調べた。Ｓｕｂ１１５４の検出を、ｓｒｔＡ界面活性剤抽出物およびＳｕｂ１１５４変異体培地抽出物において確認した。後者の場合において、タンパク質の予測される切断形を検出した（図５Ａ）。Ｓｕｂ１３７０に対応するタンパク質は、ｓｒｔＡ変異体から得られた増殖培地のみで検出された（図５Ｂ）。ｓｒｔＡ変異体由来の抽出物のみにおけるＳｕｂ１１５４およびＳｕｂ１３７０タンパク質の存在は、野生型株において、該タンパク質がソルターゼにより乳房連鎖球菌の細胞壁に固定されていることを示す。

【００９１】

実施例２：乳房連鎖球菌の毒性における特異的ソルターゼ固定化タンパク質の必要性に関する調査

ソルターゼ固定化タンパク質の同定後、これらをコードするそれぞれの遺伝子で野生型株を変異させた。それぞれ個々のソルターゼ固定化タンパク質を欠いている変異体を、毒性を評価するために、乳牛における抗原投与モデルにおいて使用した。毒性の減少または除去を示すものから欠失しているタンパク質は、疾患の病因／病理に関与する。のこれらのタンパク質のいずれか、好ましくは全てに対する中和免疫（抗体）応答の誘導は、野生型株での感染後の疾患を減少させるであろう。したがって、毒性において役割を有すると同定されたタンパク質のいずれか、好ましくは全てを含むワクチンは、畜牛における乳腺炎の予防において有用であろう。

【００９２】

方法論

ＳｒｔＡ固定化タンパク質（Ｓｕｂ０１３５、Ｓｕｂ０１４５、Ｓｕｂ０２０７、Ｓｕｂ０２４１、Ｓｕｂ０８２６、Ｓｕｂ０８８８、Ｓｕｂ１０９５、Ｓｕｂ１１５４、Ｓｕｂ１３７０、Ｓｕｂ１７３０）を欠いている乳房連鎖球菌の変異体株の生産および単離

挿入的に不活化された変異体は、以前に記載されている（Taylor, D. L. et al, 2003. J Bacteriol 185:5210-5219; Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399）ものと同様のプロトコールにしたがって、乳房連鎖球菌０１４０Ｊ　ｐＧｈｏｓｔ９：：ＩＳＳ１変異体バンクのＰＣＲスクリーニングにより、ランダム挿入変異体バンク内に位置していた。簡単に言うと、個々の９６－ウェルプレートから一晩培養物を集め、ゲノムＤＮ

Ａを、それぞれの興味ある遺伝子に対するローカス特異的プライマーを含むＰＣＲ増幅反応において、鋳型として使用するために調製し、ＩＳＳ１に特異的なプライマーと共に使用した。変異体クローンの単離後、プラスミドベクターの切除を、抗生物質選択なしに許容温度（２８℃）での培養により促進させた。ｐＧｈｏｓｔ９ベクターの喪失およびＩＳＳ１の維持を、以前に記載されているサザンブロット法（Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399）により確認した。適当なＯＲＦにおける挿入物の存在を、オープン・リーディング・フレームのＰＣＲ増幅およびＩＳＳ１と破壊されたＯＲＦの接合部にわたる得られた産物のシーケンシングにより確認した。

【００９３】

ＳＵＢ１１５４コード配列のほぼ開始点付近に位置するＩＳＳ１を有する０１４０Ｊランダム変異体バンクから挿入変異体を単離する試みは、不成功であることが証明された。標的欠失戦略を、ＳＵＢ１１５４遺伝子産物の生産を除去するために使用した。簡単に言うと、３４３２塩基対オープン・リーディング・フレームのいずれかの末端に位置する２つのフラグメントを、ゲノムＤＮＡから増幅した。該２つのフラグメントを精製し、次にさらなるＰＣＲ増幅反応において均等な割合で鋳型として使用して、３４３２塩基対のＳＵＢ１１５４コード配列から３１６９塩基対を欠いている単一のΔ１１５４産物を産生した。このアンプリコンを、低コピー・ｐＧ$^{+}$ｈ９温度感受性プラスミドのマルチクローニングサイトにサブクローニングした。プラスミド構築物を、２００μｇ／μｌのエリスロマイシン上で３７．５℃での選択を用いる大腸菌　ＴＧ１　ＲｅｐＡの形質転換により増幅し、次に精製したプラスミド１０ｎｇを使用して、１μｇ／ｍｌのエリスロマイシン上で２８℃での選択により乳房連鎖球菌０１４０Ｊをさらに形質転換した。乳房連鎖球菌０１４０Ｊ／ｐＧ$^{+}$ｈ９：：Δ１１５４形質転換体を、２８℃でＴｏｄｄ　Ｈｅｗｉｔｔ培養液中でOD_{550}０．５まで培養し、次に培養温度を３７．５℃の非許容プラスミド複製温度まで上昇させて、単一の交差染色体組み込みをさせた。組み込み体を１μｇ／ｍｌでＥｒｙを含むＴＨＡ上で３７℃で選択し、次に抗生物質を欠いているＴＨＢ中で２８℃で培養して、第２の交差事象によりｐＧ$^{+}$ｈ９レプリコンの切除を促進させた。得られた細菌をＴＨＡ上に置き、３７℃で一晩培養後に、コロニーを採取した。Ｓｕｂ１１５４遺伝子座の欠失は、Ｓｕｂ１１５４遺伝子座のＰＣＲ増幅により決定した。

【００９４】

乳房連鎖球菌での泌乳期乳牛への抗原投与

毒性のための個々のＳｒｔＡ基質の必要性を、乳牛においてよく確立した乳腺内感染モデルにおいて、実験的抗原投与により決定した。細菌は、Ｔｏｄｄ　Ｈｅｗｉｔｔ　培養液において１８時間３７℃で培養した。細胞を遠心分離（１０，０００×ｇ、１０分）により回収し、発熱物質－非含有塩水（Ｓｉｇｍａ）に懸濁し、必要な細胞密度（５００－１５００ｃｆｕ／ｍｌ）を提供するように同じものに希釈した。それぞれの株の懸濁液を、動物に抗原投与するために使用するまで氷上に保持した。それぞれの懸濁液の同一のアリコートにおける生菌数を抗原投与前後に数えた。

【００９５】

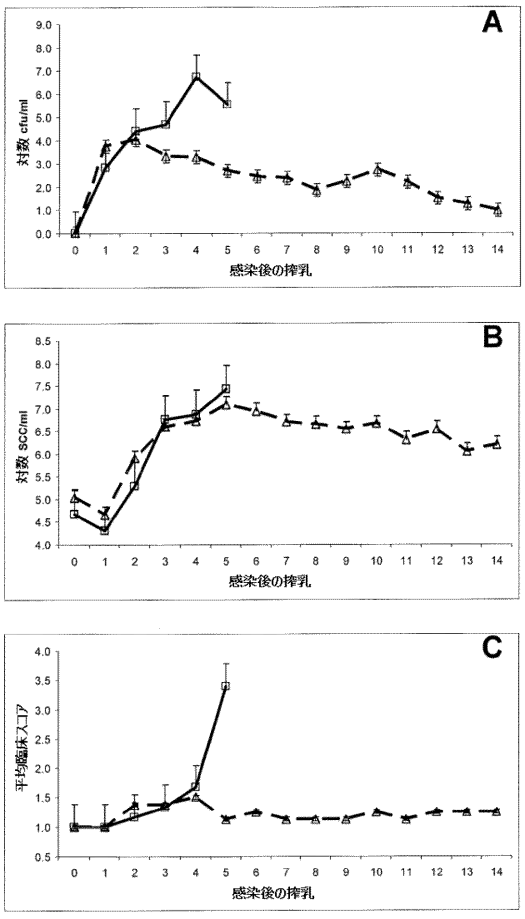
第１の泌乳から２－１０週以内の、乳牛を抗原投与のために選択した。選択のための基準は以下のものであった。乳腺炎の徴候の非存在、抗原投与前にミルクサンプルにおいて細菌の非存在、現在の泌乳中に乳腺炎の病歴がない、および出産７および１４日後に得られたミルクサンプルにおいて乳腺内感染の証拠がない。５００－１５００ｃｆｕの乳房連鎖球菌を含む１ｍｌの発熱物質－非含有塩水（Ｓｉｇｍａ）の注入により、動物の乳房区に抗原投与した。

【００９６】

抗原投与後、動物を１日に２回（０７：００および１５：３０）４日間、搾乳および検査した。臨床的エンドポイントのあらかじめ決められた基準（凝固し、変色したミルクおよび／または乳房区腫大または触診において誘発する不快感）に達したものを、商標登録された抗生物質で処置した。ミルクサンプルをそれぞれの搾乳時に採取し、下記のとおりに細菌および体細胞の存在に関して分析した。

【００９７】
ミルクサンプルの分析
存在する生菌数を、ＡＢＡ上に５０μｌのそれぞれのミルクサンプルを直接置くことにより概算した。また、サンプルを塩水で希釈し、５０μｌのそれぞれの希釈物をＡＢＡ上に直接置いた。それぞれの場合において、乳房連鎖球菌の存在および／または数を測定し、回収された単離物の遺伝子型を、適当な遺伝子座の増幅により決定した。ミルクサンプル中に存在する体細胞数を、製造業者の指示にしたがって、ＤｅＬａｖａｌ携帯型細胞カウンターを使用して測定した。
【００９８】
結果
Ｓｕｂ０１４５、Ｓｕｂ１０９５またはＳｕｂ１１５４の１つを欠いている変異体を、該変異が乳房連鎖球菌の主要な滅毒をもたらすか否かを決定するために、乳房区に抗原投与するために使用した。全ての場合において、株を抗原投与後のミルクから回収し、それぞれを、正確に変異した遺伝子の存在を示すために遺伝子型分析した。株（ｓｕｂ１０９５、ｓｕｂ０１４５またはｓｕｂ１１５４のいずれかを欠いている）での抗原投与は、実験の期間中に比較的乏しいコロニー形成をもたらし（図７）、野生型株と対照的にこれらのいずれの株も疾患の臨床徴候を誘導することはできなかった。結果として、感染原因におけるこれらのタンパク質の機能は、必須であると考えることができる。これらのタンパク質のいずれか、好ましくは全てに対する中和免疫（抗体）応答の誘導は、野生型株での感染後の疾患を減少させると予期される。

【図１】



【図２】

スコア	乳房区の外観	スコア	ミルクの外観
1	正常	1	正常
2	異常 （例えば、硬さ）	2	わずかな変化 （例えば、ほんの少しの断片）
3	異常 （例えば、紅潮、柔軟性）	3	異常 （例えば、凝固および／または凝集）
4	腫大 （例えば、膨張および触診における不快感）	4	異常 （例えば、色および／または組成物の変化）

【図３】

遺伝子	推定固定モチーフ	追加コメント
SUB0145	LPXTG	ラクトフェリン結合タンパク質
SUB0164	LPXTG	偽遺伝子
SUB0207	LPXAG	
SUB0241	LPKAG	2',3'環状ヌクレオチド 2'ホスホジエステラーゼ
SUB0337	LPATG	ABCトランスポーターアミノ酸結合タンパク質
SUB0348	LPHTG	偽遺伝子
SUB0888	LPPTG	
SUB1095	LPSTG	コラーゲン様タンパク質
SUB1730	LSPTG	
SUB1739	LPTTG	偽遺伝子

【図４Ａ】

遺伝子[a]	タンパク質注釈	推定ソルターゼ固定	分子量 (Da)[b]	MASCOT スコア	指数増殖期 マッチしたペプチド数[c]	指数増殖期 カバレージ (%)[d]	MASCOT スコア	定常増殖期 マッチしたペプチド数[c]	定常増殖期 カバレージ (%)[d]
sub0135	推定フルクタン ベータ－フルクトシダーゼ前駆体	LPMTSDS	142,956	41	(1)	1.4	541	10	11.3
sub0145	推定ラクトフェリン結合タンパク質	LPSTGDK	57,829	1138	15[e]	29.2	695	18	31.8
sub0207	推定表面固定タンパク質	LPMAGER	53,765	39	2	5.4	117	2	5.4
sub0826	推定表面固定スプラターゼファミリータンパク質	LPETRDS	168,468	ND	ND	ND	50	2	1.2
sub0888	推定表面固定タンパク質	LPPTGSQ	29,230	105	(1)	12.9	164	2	18.0
sub1095	推定コラーゲン様表面固定タンパク質	LPSTGDK	47,642	59	(1)	1.7	88	2	4.3
sub1154	推定C5aペプチダーゼ前駆体	LPKTVDS	127,957	68	(1)	1.7	111	6	4.8
sub1370	推定亜鉛－カルボキシペプチダーゼ	LPALADG	116,563	507	7	10.6	2614	17	25.5
sub1730	推定表面固定タンパク質	LPSTGED	40,439	165	2	6.8	238	4	13.6

【図５】

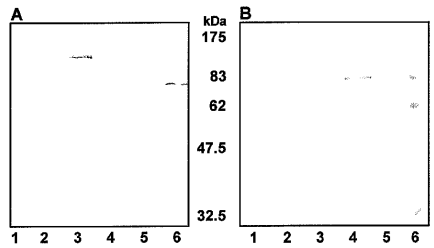


Figure 5

【図４Ｂ】

遺伝子[a]	タンパク質注釈	推定ソルターゼ固定	分子量 (Da)[b]	MASCOT スコア	指数増殖期 マッチしたペプチド数[c]	指数増殖期 カバレージ (%)[d]	MASCOT スコア	定常増殖期 マッチしたペプチド数[c]	定常増殖期 カバレージ (%)[d]
sub0135	推定フルクタン ベータ－フルクトシダーゼ前駆体	LPMTSDS	142,956	286	5	5.8	1032	18	23.2
sub0145	推定ラクトフェリン結合タンパク質	LPSTGDK	57,829	3047	17[e]	27.0	746	15	28.8
sub0207	推定表面固定タンパク質	LPMAGER	53,765	50	(1)	2.4	163	4	11.2
sub0888	推定表面固定タンパク質	LPPTGSQ	29,230	209	2	18.0	118	2	18.0
sub1154	推定C5a ペプチダーゼ前駆体	LPKTVDS	127,957	153	3	3.4	237	10	14.4
sub1370	推定亜鉛－カルボキシペプチダーゼ	LPALADG	116,563	146	3	4.0	1079	12	22.3
sub1730	推定表面固定タンパク質	LPSTGED	40,439	81	(1)	4.1	167	4	13.8

【図６Ａ】

MTKNRSSHSTYADKVIKGLSASCFILGAFVFAQQVSAEEVVTATNTSLTA
PTVTTVSPLTNTDVSATAVAADSIASPVTTTDSNLNSAPIIDTSNPSNITSPTD
TNTSTTSSDTTSSPIPVTLNKAAIASPTSQTETLASQEIYMDKVNQVTINTTV
NPATPMTWTIENYPNQTYNMQTGDFTGSPSYTVTSTSPNNSSVQIEIPPLFG
TDLSLRWPNNIRRTYRDYMGSYTLKGISEDGLTIVTKELILRPYADYMTHEE
LLNELNAIEANHATDRLVTIETIGQSALGNAIKMGIVAKDQASLDTYLNQTT
PMMLMDPDQALNLLAQGKFDYKLPILINNTHADEQPGIDVVRGLFKTFATE
SVINYQTVDAANNPTTVQIDIKALLDKVILLFNFTENPDGDIANTRALNNGL
DPNRDTGYQTNPETRAIVEQINKWNPISIFDVHGFVKEFLIEPCTPPHDPNFE
YDLFDASLVEGAREMGNAGITNSVYDSYIIPKFDYGSGWDDSFSGYTAVYG
LYQGILGHTIEIPETNQESYNAGYFAVLAGINYDLANSDQLMKNKLTFFSRG
IHKAEVAAAEEALLTVDGSVKGRIKDGHDTFFPDYYMIPMTLSTESDTDQA
FKMIDYFRRNGVILNELTADVAGYHKGDLVIDMAQAKRGFANHVLYKGAN
ESEWPAMYAELVMNFPAMRGFKADAIYADSLFAGNLGAVTLTSAPRTAPS
DKEYYIVSNNSLAAVQAVNAAIRAGKNVYLTNDGYVMDKATYESVIGTYP
LFAQATCMKPVGDTLKAIKVYAPGNPNLYLGFNSPSEVSLALNQMGFDVV
PSVDQADVIVLDNDQFDASILGKKPVIILGGSAMAKLESLGILTGFDAAMTS
ESDGSSYEGLMKISLDANSPYTSGYAANSLYYSNSGSWIEGVPTGFMTLANI
SASDFYVSGWWPNHEGLANKTVAISGLYQGQPMFIFAGNPVNKTHTINFYR
WVSNAIFGTNLTSFIEGQCTIPTDSETQVVRVNHNGQTVAVYQQVANKEVN
GTVSQNS**LPALADG**SHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRRED

Figure 6A

【図６Ｂ】

MRKFYYKEKKMEIKQKHGKHALRKAVTAAVLAGTAFSSLGGFAGAVT
TVKAEDLFTINNSEVQDKLESKVKQLLEAQRKGEDISEKLRELLSELPTDILK
DIMLSNIEADYLLGFLKPAVEEMVRRSEQNDERWKDITEKTLALEALKDSE
REIRKEKEKLEDEVQLAKVKIETKESELNDLKKDYIDTREELADTIEELDEV
KNSIVEKEAKVKGLEEKLRDLEKELGDYDKKLSEAAKQNSDLSNENKELKE
NLDTAENITVELQKKSHELEKTKKEVELELKAEKEALEAEKVKLAEANEAN
DKLSEERDAAKKEAEKVPELEGQVEKLVEEITAAKKEAEELQAKAEGLEKD
FEAVKAEKEALEAEIAKLKEDHQKEVDALNALLADKEKMLKSLQEQLDKA
KEEAMKNEQMSQEEKAKLQAELDKAKQELAEKIKDMPNKVAPQAEGKAN
AGQAAPNQNQNNQAQANQAKNANN**LPSTGDK**PVNPLLVASGLSLMIGAG
AFVYAGKRKKG

Figure 6B

【図６Ｃ】

MKQEKKCVNWFMRKRGKQWIYGCGILICGLVFGVEATSVAAETIPTTA
TVETLNSDVTSKTSQETQKTTEIATPVSEIVMPSQQKVVEEVTQEVSVQNQE
TVINMPVLTQGVNIAGPNETAILTDSIVQNNVQPIDRVEKMETSFSTELTKK
AESSYNTNLQDLNYDPNVWEVREDGLYSNAVGKGDNFLFSASTGENFIFQT
DVTFLQNTGAASLVFRSNNDPENLNGYVVNLDGNSHKARLWRWAEANLI
NDKEILASPDNKYFLKVVATNGWISYYINGILIANLSDYTIQRDDLGQTTYIK
DGHFGLLNWNGEMVFQNTFYRELTNEELPLLNDVTVTSKNGPVEPKGQFF
SESSVYIQYVSNDASTVDLSFDANNSDALITVTDAHGKVYSNPSAIPVTVGP
NYLTVTSTYTTTDGYVIPSTYRINVHRRQPQSVYYNENFRDQYHYSVKDGW
ANDPNGLVYYNGVYHMFYQFYDDTKWGPMHWAHATSTDLIHWEDQPIAF
YPDYNGTMFSGCIVADVNNSSGLFDSENGGLVALITINGEGQRIKLAYSTDE
GKTWQKVDEIVADWTTDPLQTRDFRDPKVFRWENKWFMVIAGGPLRLYSS
DDLKNWTVESTYPDLHTECPDLYPVLAEDQTVKWVLSRGGRYYKVGDLQ
QADGNWKFIPDANYQETDSIMNFGKDSYAAMTYYVQDFGTKANPTIPKIIE
LNWMNTWDNYCNLVADRLGQSFNGTFNLNLELGLVKEGDKYVLTQTPVE
AYESLRDNDNKVEYKNVVVGKENDLFKDFSGDTYEIVAHFKPSDKTTKVG
FNLRVGSGEMTKVYYDLIAGRIIIDRSQSGIILTELFSNIDSQAVTPNIDGSIDL
HIFVDRASVEVFSKNHTVAGANQIFTSAQSLGLEVLIDGEDAKADIVLYPLK
SIWKNKIIDTTPQIVIPASEPKVRMNVGDSTTVKAYVSPVGASQDLIWNISNP
SLVLDQISGNQVFLKAIKKGQVIVRAQSQSNPAVYQDFIIDILEDNFNTNVKD
VNVFSGDWYVDGESLKVANHNSNDIYMSADKIPYENYQMDLDIKYGRGIV
NIFFASGNPDANNAYTIQFGSNNSVRLFRFYRDTIFEAPMIDVINDNQFHHV
RLVKSANVIHVYVDNEMVMSYTFDQVEEFFNNPYLGLGLWDGELAVQNF
YVIDLDAQKPVFVEEHEKEKLLSELKKSVVKTSSYSTLKTIETSSKTNSENLE
APTVSKKNLPMTSDSNNNLEELGILVILTTLGAFLGRVILKKEK

Figure 6C

【図６Ｄ】

MKKKQEMKYYLRKSAYGLAAVSVAVLAVGSPVSAQEKAASTEATPKVA
PKVPEKPSKEVIKKALKKTDEETKEKEKEAKEKVENSEESTAMVSELSSTNE
ETSSEEENNTDEEETDGLESEESEETESEVKEESEEEKEDDPSESDTEVENVE
AINLSEAEGNDSSKPETSEEVTAEEDRQETDRLAEVKTEESAKEGDEDADK
KDEAEEKAKKGAELSRVKAEALAKLEALNASRLMKKIVESGKTVEGILSFM
KESLPQLEAARASEQAKAPEVTQSPDHLPSEKKAVHNPVQVAKRSESLEQK
AENAKTSTNLQNTQIPVQEAKRTQAQLPSTGEDYQAYLVAAAMALIASSGM
VAYGSYRKKKQK

Figure 6D

【図６Ｇ】

MVKNNIHSRKKHILKISLLATSVLTTTVSTVSAEQLQNEKQSDLLSKMTET
STPHTIISSEDLSNSNQEANQKDETASKSLQPMIEKVDPSHIQALWEKVGTGE
GDVLAVIDSGIETKHSMLQLPEDADKMYTDQASIDSKKQLLGIERGQWIND
KLPFYHDYTQGEESIDRNTYHGTHVAGIATASGLTQKENKEQMQGIVPNAQ
LLFLKVGQPSVEGEREKHYAMAIKDAIALGATAINMSFGQVGKASHELNDD
FKKALALAADKGVAIVVAAGNDYAMGGSQTKPLAKNPDTGVIGTPATTEE
VFTVAAYVAPHYWSRVLSVTDGSTSKALALEMASPFAENKDYELIFLEKGL
ETEENAERLKNKVLVLNYDFVTNSKEVAEKVEALGAAGVLVHNNQAKKPL
IPLAYNGPLPMGFISKEDADWLKTMTSPQFRLKKEKQLVEVPGGRQMTNFS
SWGLSVDGNMKPDFAAPGYEIYSPTPGNDYSKMSGTSAASPHAMGIIHLVR
KHIQKEYPHLSAKEQLQLVKNLLMSTASPIYSELDHSYYSPRVQGAGALDA
KKALETDVYVTAADGLSKIQLGDVNNQFELRVTLHNLSNQEKNFTYFARV
LTDKVEKGRILLRPQELYQTRPLQVKLAPNQKQEVVIKVDISNFDQQLKAQ
MPNGYFLDGFVVFQSKEGAQKDLSIPFIAFKGKFADLEALDSPIYRNLDGTF
YYSPKEGQDPYDFEVDSIQQIKEQYMTGLITTFTPWSLVEGSKIDGFSPEMA
SEFSTTDYLGSYNKEGDNTVRRFRFVEGKPYLALSPNGDDNMDKVGFRGV
FLRNVRDIKAQVFASDDLQHPIWESPIKAFAKKDVNTNDIKESMLENTVWE
GKDASGNPVTEGLYRYRVTYTPLAEGAKEQFIDFDILVDLTPSKLPQSAILM
LAERRIELTESRDYLSHDTYRDRLYYKYGTDDINFTTFEKDDMGHFVIPNQ
VEDELSGEKITINLDKTDHFFFVREDFSGNFSVISLSQLLNNHSDQMHSLEES
KSDRKESNTGDIRHEKQENLSQQTLLSTPSIDGQKQNDQLMVEKEKDIMDE
SKSERSEKNKFPKVPASITLKDGTLYPQSISQKTSLPKTVDSSQKTMTFLGIAM
LFGGILQVLWSYFKKRD

Figure 6G

【図６Ｈ】

MTHMNNNGRYKQRFSLRKYKFGAASVLLGTIFALGMTGTTAQAQMPSH
SHPGGVYPGGIIPGAPGAIPGIPGGGSGFDFDPSGYPAGPHGYLPSYGPGGVG
MLQGPPGPAGPIGPNGIPGERGPVGPAGAEGPRGPKGDKGETGQQGPRGEA
GIAGPSGPQGPAGVAGPAGPQGVAGRDGRDGRDGRPGEAGLDGLDGLNGL
NGIDGTDGKDGKDGKDGQNGQDGKNGRNGQDGQKGKDGQNGRNGQDGK
AGKDGKSGTDGKNGKAGTDGKNGKSGKDGKAGTDGKNGRAGTDGKNGK
AGQDGKDGKNGTDGLNGRDGRDGRDGRDGRDGLDGKDGKNGKDGESPII
NVKDNGNGSHTITFLNPDGSRKEVTISNGKDGQPGRDGKDGRDGKDGMPG
RDGMNGKDGQAAAGNTAGKGNASDMKPKAMAAPAAMTNQNAHANNNG
PAKAQLPSTGDKANPFFTAAALAVMASAGMVAVSRKRKED

Figure 6H

【図６Ｅ】

MSKPMTKKKKAISIQKSVKPILGFTFGALLLSTVFTPSVFAEEVVSSLGHA
TSGLLSVSVPKELTSLETTTYLMASESPSNTLTSDTISSDNGGTASNPNEIVTT
ETTSEAIPFDTEVIQNPDLPIGEIKVVQEGVAGEVTVTKTTTTITLNGVSQSTT
TESRVPVKKPINKIIEVGTKEISTSPSSSDVITVSPSPSSTSSESNQQGSLTPAPK
SRQNSQEKKGSQTKKSKDDAKEKEGDKKELPPTGSQESGIFSLFSALISTALG
LFLLKSNKND

Figure 6E

【図６Ｆ】

MKSYLKRRYGLITTSVLAATVLATGWQSTSVLAENPTTSPTTTVTSNGFN
FNATLLDHNGKTVSGKTVSLYDITDGNRTLVQSAVSDQNGIASFSQLPLNR
NLSVFVDNVAQGYTTRTSESGQVRSSAFYIDGQGTNTPKYSDKTITISVLNE
EAEPLANQKVTLTNPLKEVVGEAMTDADGHVVFKDKLLEGVFYNYAVNG
KAIDSAQPDSKRSVFLESNQLAKEGFTFTATILGKNGKTVAGKTVSLYDITD
GNRTLVQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFIDDVAQGYTTRTSENGQVRSS
AFYVDGQGTNTPKYSDKTITISVLNEEGEPLANQKVTLINPLKEVIGEANTD
ANGKVIFTDKLLDGVFYTYAVNDQTIDATQPDTSRNVFLRADQILKESPKN
TASEAATNLEKTTESKEGNMPQQNQSEAKEKAPEKQVDANAANKKAPGHG
EAKKGLPMAGERGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKKVKS

Figure 6F

【図６Ｉ】

LRYKKMTRSSNSRIVLQSTLIMIFASSCVNHFKGTIHADEKVINGSEASIQV
DYTLNTASENRQIPEEKVTEEATNDQPELLEKQAAFLHEGREKNTENLPLD
GRGSLIASIDSGVDIKHEAFANNDDNHDFHKETEVSEGSTSKIPFVYDFLSGD
TSVRDDEEHGMHIAGILVGDSKKGFKGMAPKAQLIAYRTWSKNNSEGYQ
EANQFFAMKDAIKRGADVISLSIGEIGSGQNDDIWAKVLEEAKKKNVVVVA
AMGNYGTSATSNTFDQVVDETFPQTDSSTLLSVSANPEVIGVGSIFEKEMYL
PTLKIDTLEVPYENINWQNYYLFKQEKQERISFNEMLITLNQSKEEGSLKDK
VVIIERQAENIFPQLKEVMKKGAKGVILINQSGPTTYGNYETVPELRNTLLD
DEDGDFKKTWAVSISANDGKALKDYLQKQDKKKSYSLVFNTKPQLKHVFK
YPGVSGFSTWGPGLDLTLKPDIVAPGENIYSTGNDNSYFISSGTSMSAPKVA
GASAMFLPVTKKWQKKWEKQNVSMSIPQLTKLLFQNTADILYDHSVPNGK
PILPYSPRRQGAGALNVKKAAQTNVFVTSADNKGAILLKDFKESRKEFDIVI
RNFSDQVRRFKIEPGSVLGKILYSKDRKNYDKNETIQTVHSRVIKDSAIESPL
YVQIAPNSSMILPLKLNVGKAVENEFVEGFIKLRSLEKDQPDLNIPMGFYGD
WNSENILDPVAWQEGSKTRLTGIVHPYGLGEDKFDIVPWGVDYEKWKQDP
KALDADQRFYVMQSQAGIANHAKMRLRLIFMRHAKDYRVDILNSQKDKVL
KTLKTGHQAPKYMESALLEHGDQYQMQFADFDPDLEWDGSVYNPKTNTE
DPLPDGNYFIRVSSRISKNRPYQEHIIPFAIDNQKPKVKIEEKTALQVVFHVD
DAHLQGIRLVKDNKIIQTLETDTQGRFRLNLADFQGKGFELEAIDFAENKTII
DLDSLKEKEVGYLFGASSSYNKSRYRSPRSVAHKNAEDILHENSEESEEIASA
LTFEDGSDFHDGKKTNAYSEINKSNDNSVHLKDNTYYRDYYIHLKEGQRLL
VTTTNAFHNSKQGNDITAPTWQANYTYDPSTNQGQYYRKIAIPIYQGSNTIN
VKAFYKDKLIFNKGYAVKLDTEVPQLTFDNPNISFTSDKWQNLSDDEYDDD
NIVGTITIPNNTLRLSGKIRDGLDGWRMFINGDMVDSDIKLGEYDDIFQQNR
RQWKYEKQVENDDYVLIKLSDHVKNSRSYLFKVKIDPTVSEYHFTNKNDII
DDDKTLLTLNTLTDSSLGYANKLLNMPKDLVKSTDDLFKAMTMLFKKESF
FLYPLKNDLNTNGISMMTSLVQFQAKDVKENIPLEWEIKTKASDSRQLLYQ
NLKNEKERLDQVSTNPLAHQLPLENSNQENGQDAILTSTKVLPMSKSSIFRD
SLRETSLPETRDSSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRRKRLNKL

Figure 6I

【図６Ｊ】

MENQNQLTLQGILGKCLKWFLLLSISLFTAFPFIWMLISSLKTKAEVMNTEV
IWPHIPQWGNYLEIFTQSPIPKYIWNSLWTSVVIVLIQIVTGAMLAYALVFLR
FKGRQLIFAIVMGTYMLPAAATYIPSYIILSKGGMLNTLTGLIVSSTISIFGIFL
LRQAFMQVPRSLIEASRMDGASHFRVLWEIVCPMTKSSFITFGLMSFIAAYN
SGKETSIGDVTLTFSKELVPVPNIDEEIVIPSIPEKPLVEPEVDSILPLIPLQPSL
PIYPSPDLPEMEQPDQDSPEISGQSQIVDIVEDTLPGVSGQQSSSEETEITEDT
RPESDNEIIIGGQSELVDIVEDTQSGMSGQHSSSEETEISEDTRPESDNEIIVGG
QNELVDIVEDTQPSLSGHQSESQETVTVEDTQPNQTNILIGGQSEIVDIIEDTQ
AGMTGQYSSTDQLTIVEDTLPEQMEETDEIKSDSQVMDIPKVNDTNNDKGA
KASVAFDVEESKVVTTQDIKPSTYVKGDNQLPQTGDDDNVNAFFTLAALSV
IGATGLRQNKRREKERN

Figure 6J

【図６Ｋ】

VVKVTVDGSDNSTIDSGFVKVEQPTPGSNSSSESLSQSTTQSSSQSSSAKPVA
SQTAAELPHTGQAENNGLYGSAALAILAALGLAGKKRDEK

Figure 6K

【図６Ｌ】

MFKTKKEIFSIRKTALGVGSVLLGVILTTQVASANEVSLMTPSVDKSLTTTSP
VLESTSSQLAATTAPTTTDTTSNVTATSPVLAAATTAPSVTTSPIASPIRYVS
DPNQPVGYRATQVQGTDGSIITTQTGALDANGNPIVTVERIEPTKTVIVLGT
KSTSQVTSTQAATTTYSIDVTKPVGTDVVIPAVDGQTTTTTTYKIETATTAP
VSPSVLSEGYKWIDQPFYHVDTTQTLPSDRISIDQLFVPMPVLTPDYNTTEST
VREYAQYAENYMYDYITVTNPDGSTTRQQVIRPVTSEMLDPTNTRLRTLTG
LTDDNAFYSRLFDASQQDLWNTSAQDYGLEIVPEDLSTSTDDFLRYHSSNII
NDALYVDIKADYLRAQLAYDLVSLGTLTSDQQSAMDMMTSQFESLTLRYN
NYKDSVAIVVDYSNTTMSATQADFEAKLAALPVEVQRAISELTIYDGQIPG
MGETTLGLANSADQTIALKYEANNLNLVSTVLHEMTHIIDFKSGLYSETTD
RNTDGSLSTVMAFSDTQEFLDVYHTYFDRPDVWSYYRDNSEEAFAEGLSQ
YIMHRLFGTPYSTYIANPYTGDAYNPGDGSGYSPFAETEFYFASLYNRLFEY
PRTAQVVPYLVTTTTTAPVNGQVIYGAMPEETTTTPYTTVYVGDTSFAYD
PTGQTDRVQAGVDGTETIRTTYSLDSNNQLVATQTVISSTPVQNQIITKGTQ
PTVVDTSVPMTIVYQEVTDGSLGDWQVNVLDAGQDGLIRSTTTYSVDPVTG
IVTPSTTEATITAMRPMIVQYQVGSEKVTAIPYQTRYVIDTSLATGTQVIVQE
GVNGSSTESVQSYNFIQDGSNSRFDAIVYASPVVVAAQDQVIAVGGQDQVT
DQAVAKTIFYQEVTDGSLGDWQVKVLDAGQDGLVRTTTSYSVDPVTGIVT
PSTTEATITAMKPMIVQYQVGKSKLSAIPPLTEYITDDSLAVGLEKVIQEGVG
GTQIETVQSFNFIQDGANSHFENIVYSSPTIVVAAVDQVIARGTKVVEVVVA
VPEVVTPKPETSEVISPEKGQTAPTITVEAIKAPAQKKAKVEVVTTPKESLPT
TGDDQNLLVTLMSSLLLMSLGLGLKKKEDE

Figure 6L

【図６Ｍ】

LLALSQLPDKLLEKIDITCFDDPKHFGRGIPFQEDSSTAWINSPIDAISYDYHD
MNDFQNWMEQKGLDTDQSYVPRSLYGRYMTERAHDLLQKLKASVIHEKV
TQLNYEPDSQKWNIGTSQRTIPTRFDEVHLTCGELPVLDPYHLQGNPNYIAD
PYPLKNLPKQPGKKDRIAIIGTGLASIDTLKWLLKNSQADLLAFSPSMTFPTV
RILKKETIDWQFLTDTNKQKLFEENSFNFKSLENLFLSELQALGFQNWEETC
RQFLAEGIPGISLSLAFPAQLFLLQQLASHLVDWLTDFWPQMTLSDRQYYK
ENYGKAIINLRNPMPEEAGRLLIEATAQGRLQIIEAVTDIEAGNYGFVLKRE
VGKELSVATVINATGYHLKESNVHQARTLIQQVIRDGLVQINPEGGLSILPQ
TGQVISPKYGILATLYAHGSLVNGVIYQNNSTIKIQQMAERAIGNVIKKPTI

Figure 6M

【図６Ｎ】

MRKHYVSKSAIFLAMLVATGSAQFVKAETPTTTTSPATSLTDASASTTPTTN
TTSTVTPALDPNTNFTVDSSATTSTTTPSPVEAAAISPVIATAQPTTNVTSAS
LAPAANTMATTPVEGQTVDVRIISTTDLHSNLVNYDYYQDKASQTIGLAKA
AVLIDQAKAENPNAVLVDNGDILQGTPLGTYEALIDPLQPGEVHPMYAALD
KLGFDASTLGNHEFNYGLTFIENAIASAGLPILNANVFDAATGEYLFQPYAI
VTKSFTDANGQAVDLKIGITGIVPPQIMLWDKANLEGKVTVKDAVQAVTEII
PTIKNAGADIVLVLAHTGIGDDVYETGEENVGYQIASLAGVDAVVTGHSHA
EFPSGQDTGFYESYNGVDGVSGLINGTPVTMAGKYGDHIGIIDLNVSYTGG
KWTVNRDKNHAEIRKIDTKSTIADADILALAQASHLGTIDYVRQTVGETTAP
INSYFALVKDDPSVQIVNNAQLWYAKQQLAGTPEADLPLLSAAAPFKAGTR
NDPTAYTDIPAGPIAIKNVADLYLYDNVTAILKLTGADIKEWLEMSAGQFN
TIDPNVAGPQNLVNTDYRTYNFDVIDGVTYEFDVTQPNKYDAKGNLLNPN
ASRVRNLKFQGKEIDPNQEFMVVTNNYRASGSFPGVKNATINRLLNLENRQ
AIINYIVSEKTINPSADNNWYFADTIQGLDLHFLSADTSKNLIGDKADISYTG
PSTIEGFGDFVFTYVKPELPVATPETPQETGSQLTENRRQEIHQLATRVYNQ
TKATSSSTTKAELPKAGSQESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

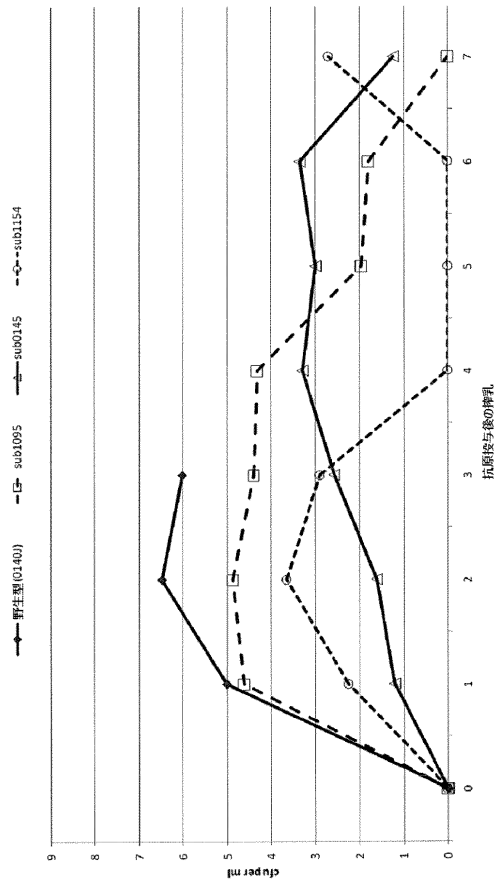
Figure 6N

【図６Ｏ】

MRKFLMSCFAALLLLFAGVSQADADQYLRVGMEAAYAPFNWTQDDNSNG
AVPIEGTNQYANGYDVQVAKKVAKSLNKKLLVVKTSWTGLIPALTSGKIDM
IAAGMSPTEERKKEIAFSDSYYTSEPVIVVKADSKFAKAKSLDDFAGAKITA
QQGVWHVNLIPQINGVKAQTPMGDFSQMRQALSSGVIDGYISERPEAMTAE
NANSAFKMVVLKKAFTVNESDAAIAVGMRKDDPRIVQVNTVLADLSANDR
LDLMDKMVTLQPKEKKAENGVQPSFLDQMWSIVTKNWKQFLRGTGLTLLI
STIGTIVGLIIGLLIGIYRTAPKSKHKVLAFFQKLFGWFLNVYIEVFRGTPMIV
QSMVIYYGTAQAFGISIDRTLAAIFIVSINTGAYMTEIVRGGIFAVDKGQFEA
ATALGFTHGQTMRKIVLPQVVRNILPATGNEFVINIKDTSVLNVISVVELYFS
GNTVATQNYQYFQTFSVIAVIYFILTFTVTRILRYVERRIDDDNYTTTVNELP

Figure 6O

【図７】



【配列表】
0005911724000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ａ６１Ｐ 43/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 43/00 １７１

(72)発明者 ジェイムズ・リー
英国エヌジー７・２アールディ、ノッティンガムシャー、ノッティンガム、ユニバーシティ・パーク、ザ ユニバーシティ オブ ノッティンガム

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特表２００１－５０４３３５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００９／０２０３９１（WO，Ａ１）
特表２０１０－５３５５００（ＪＰ，Ａ）
Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，２００６年，Ｖｏｌ．１１５，Ｎｏ．１－３，ｐ１８３－１９１
Ｖａｃｃｉｎｅ，２００２年，Ｖｏｌ．２０，Ｎｏ．１７－１８，ｐ２２７８－２２８６
Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ，２００４年，Ｖｏｌ．１００，Ｎｏ．３－４，ｐ１４５－１４９
Ｖａｃｃｉｎｅ，１９９９年，Ｖｏｌ．１７，Ｎｏ．７－８，ｐ８５１－８５７
GenBank databases，NCBI．ACCESSION No.AAQ83577.1，２００３年１０月 ３日，[online]，[平成２７年7月１０日検索]，インターネット，ＵＲＬ，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAQ83577.1

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／０９
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）