

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4172598号
(P4172598)

(45) 発行日 平成20年10月29日 (2008.10.29)

(24) 登録日 平成20年8月22日 (2008.8.22)

(51) Int.Cl. F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01) C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A

請求項の数 22 (全 170 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-541074	(73) 特許権者	507006422
(86) (22) 出願日	平成10年4月1日 (1998.4.1)		スタテンス セールム インスティトゥー
(65) 公表番号	特表2001-515359 (P2001-515359A)		ト
(43) 公表日	平成13年9月18日 (2001.9.18)		デンマーク王国 コペンハーゲン エス
(86) 国際出願番号	PCT/DK1998/000132		ディーケーイー 2300, アルティラリイベ
(87) 国際公開番号	W01998/044119		イ 5
(87) 国際公開日	平成10年10月8日 (1998.10.8)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成17年3月31日 (2005.3.31)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	0376/97	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成9年4月2日 (1997.4.2)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100140523
(31) 優先権主張番号	60/044,624		弁理士 渡邊 千尋
(32) 優先日	平成9年4月18日 (1997.4.18)	(74) 代理人	100119253
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 金山 賢敦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 結核菌由来の核酸フラグメント及びポリペプチドフラグメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) S E Q I D N O : 2 に示すアミノ酸配列、又は
b)

【化 1】

$$\frac{(N_{ref}-N_{dif})100}{N_{ref}}$$

[式中、 N_{dif} は整列している際の 2 つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は 1 つの配列における残基数である] により算出して、a) に定義したポリペプチドと少なくとも 95 % 同一の配列を有し、結核菌群に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、または結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での過去あるいは現在の感作を示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力を有するアミノ酸配列からなり、少なくとも 96 % 以上純粋な調製物であるポリペプチド。

【請求項 2】

結核菌群に属する細菌からのいずれの他の抗原も含まない請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

ヘルパー T 細胞のエピトープからなる請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

いずれのシグナル配列もない請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

【請求項 5】

1) 一次感染から 2 週間以内か、又はマウスを結核菌群に属するマイコバクテリアに再度実験的に感染させてから 4 日以内のマウスから回収した感作記憶 T - リンパ球からの IFN - γ の放出を誘導し、

その誘導が、約 200,000 個の脾臓細胞 / ml を含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が 1 ~ 4 μ g ポリペプチド / ml 懸濁液となり、IFN - γ の放出が、懸濁液にポリペプチドを添加して 2 日後に回収した上清中の IFN - γ の測定により評価できる、及び / 又は

2) 感染第 1 相の TB 患者又は BCG 予防接種した健康なドナー又は TB 患者に接触している健常者から単離した約 1,000,000 個の人 PBMC (末梢血液単核細胞) / ml から、少なくとも 300 pg 上のレベルで IFN - γ の放出を誘導し、その誘導が、約 1,000,000 個の PBMC / ml を含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が 1 ~ 4 μ g ポリペプチド / ml 懸濁液となり、IFN - γ の放出が、懸濁液にポリペプチドを添加して 2 日後に回収した上清中の IFN - γ の測定により評価できる、及び / 又は

3) 結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作した動物由来のウシ PBMC から IFN - γ の放出を誘導し、その放出が、結核菌群に属するバクテリアで予め感作していない動物由来のウシ PBMC から観察される放出の少なくとも 2 倍である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の少なくとも 1 つのポリペプチドと少なくとも 1 つの融合パートナーからなる融合ポリペプチド。

【請求項 7】

融合パートナーが、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに定義するポリペプチド及び結核菌群に属する細菌由来の他のポリペプチドからなる群から選択される請求項 6 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより引き起こされる結核の診断用の医薬として用いるための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

【請求項 9】

結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより引き起こされる結核の診断用の医薬組成物の製造における請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドの使用。

【請求項 10】

1) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに定義するポリペプチドをエンコードする核酸配列からなるか、又はその相補的な核酸配列からなり、又は

2) SEQ ID NO: 1 に示すヌクレオチド配列又はその相補的な配列からなる、単離形態の核酸。

【請求項 11】

DNA である請求項 10 に記載の核酸。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを含む免疫組成物。

【請求項 13】

少なくとも 2 つの異なるポリペプチドフラグメントからなり、異なるポリペプチドが、それぞれ請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドである請求項 12 に記載の免疫組成物。

【請求項 14】

3 ~ 20 の異なるポリペプチドからなり、異なるポリペプチドフラグメントが、それぞれ、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドである請求項 13 に記載の免疫組成

10

20

30

40

50

物。

【請求項 1 5】

請求項 1 0 又は 1 1 に記載の核酸からなる複製可能な発現ベクター。

【請求項 1 6】

ウィルス、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド及びマイクロクロモソームからなる群から選択される請求項 1 5 に記載のベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 又は 1 6 に記載の少なくとも 1 つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項 1 8】

結核菌群に属する細菌である請求項 1 7 に記載の形質転換細胞。

10

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを発現する請求項 1 7 又は 1 8 に記載の形質転換細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1 0 又は 1 1 に記載の核酸を、宿主細胞で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞へ導入し、ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下、培養細胞で宿主細胞を培養し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収する；又は短期培養液から請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つで定義するポリペプチドを単離する；又は結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物または画分からポリペプチドを単離する；又は

20

固相又は液相ペプチド合成でポリペプチドを合成する

からなる請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドの産生方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを製造、合成又は単離し、かつ

ワクチン用の培地にポリペプチドを可溶化又は分散させ、かつ

任意に他の結核菌抗原及び / 又は担体、賦形剤及び / 又はアジュバント物質を加えるか、又は、

請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の細胞を培養し、かつ

ワクチン用の培地に細胞を移し、かつ

任意に担体、賦形剤及び / 又はアジュバント物質を加えることからなる請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の免疫組成物の産生方法。

30

【請求項 2 2】

イムノアッセイで請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来で免疫学的に活性な幾つかの新規のポリペプチドフラグメント、免疫原性成分として該フラグメントを含むワクチン及び他の免疫性組成物、及び該ポリペプチドの産生方法ならびにその用途に関する。また、本発明は、本発明のポリペプチドフラグメントの製造又は結核菌感染の診断に有用な結核菌由来の新規の核酸フラグメントに関する。さらに、本発明は、ある融合ポリペプチド、特に ESAT-6 と MPT59 の融合物に関する。

40

発明の背景

結核菌により引き起こされるヒトの結核（以下、「TB」で示す）は、WHO によれば、一年に約 300 万件の死亡原因となっている世界的に深刻な健康問題である。新しい TB の症例の世界的な発症率は、最近 10 年の間、徐々に減少しているが、ごく最近は、エイズの発生や多くの薬剤に耐性の結核菌株の出現により、この傾向が著しく変わってきている。

臨床的な用途に現在利用可能な唯一のワクチンは BCG であり、有効なワクチンが議論の対象となっている。BCG は、一般的に TB の動物モデルにおいて高レベルな後天的耐性を誘導するが、開発途上国での数回のヒトの試験では、重要な防護を立証していない。特に、BC

50

Gは、合衆国での使用がFDAにより許可されていない。

このため、新規かつTBに対して改良されたワクチンの開発は緊急課題となっており、WHOによってかなり優先的に扱われている。防護的なマイコバクテリ物質を同定するための多くの試験がなされ、数人の研究者が、1950～1970年の間に実験的な予防接種後の耐性の増大を報告している。しかし、BCGの効力に対する特に長期間の防護的な免疫応答は、可溶性タンパク質又は細胞壁断片の投与によっても依然として立証されておらず、現在、短期培養ろ液から誘導されたポリペプチド（後述参照）によって研究中である。

結核菌に対する免疫性は、3つの基本的な特色で特徴づけられる。i) 生細菌は、死菌製剤と対照的に防護的な免疫応答を有効に誘導する；ii) 特異的な感作Tリンパ球は、この防護を媒介する；iii) もっとも重要な媒介分子は、インターフェロンガンマ（INF- γ ）であると思われる。

短期培養ろ液（ST-CF）は、液体培地で最初の数日成長させる間に結核菌から放出されるタンパク質の複合混合物である [Andersenら、1991]。培養ろ液は、TB感染の第一相で宿主に認識される防護抗原を有していることが示唆されている [Andersenら、1991、Ormeら、1993]。幾つかの研究機関からの最近のデータにより、培養ろ液の抗原をベースにする実験的なサブユニットワクチンは、TBに後天的な耐性を高レベルで生じることが立証されている [Pal及びHorwitz、1992；Robertsら、1995；Andersen、1994；Lindbladら、1997]。しかし、培養ろ液は複雑なタンパク質混合物で、これまで、この防護的な免疫反応を果たす分子について利用可能な情報は非常に限られている。この点に関しては、2つの培養ろ液抗原、つまり低質量抗原ESAT-6 [Andersenら、1995及びEP-A-0 706 571号] 及び31 kDaのAg85B分子 [EP-0 432 203] が免疫防護に関連して記載されているにすぎない。

したがって、最終的に有効なサブユニットワクチンを産生するために、TBに対する免疫防護誘導に關与する別の抗原を同定する必要がある。

発明の目的

本発明の目的は、TBに対するサブユニットワクチンの成分として有効であるか、又はマイコバクテリア（特に、毒性結合性（virulence-associated）のマイコバクテリア）感染の検出用診断組成物の成分として有用な新規の抗原を提供することにある。また、新規の抗原は、重要な薬剤の標的であってもよい。

発明の要約

本発明は、結核菌由来で、これまでに特徴づけられていない幾つかの培養ろ液抗原の同定と特徴づけに基づく。TBの動物モデルで、T細胞が介在する免疫性は、6～12及び17～30kDaの範囲のST-CF中の抗原に優勢である。本発明では、低分子量領域の8抗原（CFP7、CFP7A、CFP7B、CFP8A、CFP8B、CFP9、CFP10A及びCFP11）及び17～30kDaの範囲の18抗原（CFP16、CFP17、CFP19、CFP19B、CFP20、CFP21、CFP22、CFP22A、CFP23、CFP23A、CFP23B、CFP25、CFP26、CFP27、CFP28、CFP29、CFP30A及びCFP30B）が同定された。これらのうち、CFP19AとCFP23が選択された。これは、結核菌の2つのDNA配列orf19Aとorf23に相同性を示すCFP21とCFP25をエンコードする遺伝子（それぞれcfp21及びcfp25）を有するサンガー（Sanger）データベース（後述参照）でヌクレオチドのホモロジーシーケンスを調査した限りでは、それらが、それぞれCFP21とCFP25に比較的高い相同性を示すからである。orf19aとorf23の2つの配列は、それぞれ約19及び23kDaの分子量を有する仮想（putative）タンパク質CFP19AとCFP23をエンコードする。CFP21とCFP25に対するアミノ酸レベルでの同一性は、両タンパク質についてそれぞれ46%及び50%である。CFP21とCFP25は優勢なT細胞抗原であることを示しており、それ故、CFP19AとCFP23は新規なT-細胞抗原である可能性がある。

さらに、50kDaの抗原（CFP50）が培養ろ液から単離され、30kDaの領域の抗原（CWP32）も細胞壁から単離されている。

また、本発明は、マイコバクテリア・ボビス（M.bovis）BCG株に存在しない結核菌由来の幾つかの仮想抗原の同定に基づく。これらの仮想抗原をエンコードするヌクレオチド配列は、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bである。

10

20

30

40

50

最後に、本発明は、ESAT-6とMPT59の融合物が、それぞれ非融合タンパク質に比較して優れた免疫原性があるという驚くべき発見に基づいている。

33個の抗原をエンコードする遺伝子が決定され、様々なマイコバクテリア株での幾つかの抗原の分布が研究され、生成物の生物活性が特徴づけられた。抗原は、全て代謝しているマイコバクテリアにより分泌されるので、ワクチン目的ならびに診断目的での可能性がある抗原をパネルした。

以下の表は、ここで用いる名称ならびに関連するN-末端配列、全アミノ酸配列及び抗原をエンコードするDNA配列のSEQ ID番号を参照して、本発明の抗原を挙げている。

抗原	N-末端 配列 SEQ ID NO:	ヌクレオチド配列 SEQ ID NO:	アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
CFP7		1	2	10
CFP7A	81	47	48	
CFP7B	168	146	147	
CFP8A	73	148	149	
CFP8B	74	150	151	
CFP9		3	4	
CFP10A	169	140	141	
CFP11	170	142	143	
CFP16	79	63	64	
CFP17	17	5	6	
CFP19	82	49	50	
CFP19A		51	52	
CFP19B	80			20
CFP20	18	7	8	
CFP21	19	9	10	
CFP22	20	11	12	
CFP22A	83	53	54	
CFP23		55	56	
CFP23A	76			
CFP23B	75			
CFP25	21	13	14	
CFP25A	78	65	66	
CFP27	84	57	58	
CFP28	22			
CFP29	23	15	16	
CFP30A	85	59	60	
CFP30B	171	144	145	30
CFP50	86	61	62	
MPT51		41	42	
CWP32	77	152	153	
RD1-ORF8		67	68	
RD1-ORF2		71	72	
RD1-ORF9B		69	70	
RD1-ORF3		87	88	
RD1-ORF9A		93	94	
RD1-ORF4		89	90	
RD1-ORF5		91	92	
MPT59- ESAT6			172	
ESAT6- MPT59			173	40

T-細胞エピトープがTBに対する後天性免疫性を引き出す原因であることは当該分野で周知であるが、B-細胞エピトープは、後天性免疫と生体内でのマイコバクテリアの認識に全く影響しない。このようなT-細胞エピトープは直鎖状で、6アミノ酸残基という最も小さい長さであることが知られているので、本発明は、特に、このようなT-細胞エピトープの同定と利用に関している。

したがって、もっとも広い態様において、本発明は実質的に純粋なポリペプチドフラグメントに関し、

a) SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか1つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか1つ、88、90、92、94、14 50

1、143、145、147、149、151、153及び168～171のいずれか1つで示される配列から選択されるアミノ酸配列からなり、

b) 少なくとも6アミノ酸残基の長さを有するa) で定義されるポリペプチドフラグメントのサブ配列であって、結核菌群 (tuberculosis complex) に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力に関して、a) で定義されるポリペプチドに免疫学的に等しい配列からなり、又は

c) a) に定義したポリペプチド又はb) で定義したサブ配列と少なくとも70%同一な配列を有し、同時に結核菌群に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力に関して、a) で定義されるポリペプチドに免疫学的に等しいアミノ酸配列からなり、

但し、i) ポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列1～96からなるか、又は -ガラクトシダーゼに融合するSEQ ID NO:4のアミノ酸配列87～108からなる際には、本質的に純粋形であり、

ii) c) における配列の同一性の程度が、ポリペプチドがSEQ ID NO:12のアミノ酸配列か、b) で定義するそのサブ配列を有するポリペプチドのホモログからなる際に、少なくとも95%であり、

iii) ポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO:42の少なくとも6アミノ酸のアミノ酸配列からなる際に、SEQ ID NO:42の213の位置に相当するスレオニン残基を含む。

本発明の他の部分は、上記の定義を有するポリペプチドをエンコードするDNAフラグメント、ならびにこのようなポリペプチドをエンコードするDNAの存在を決定づけるのに有用なDNAフラグメントに関する。

発明の詳細な説明

この明細書及び請求の範囲において、「ポリペプチドフラグメント」の語は、少なくとも2アミノ酸残基、多くて10アミノ酸残基の長さの短いペプチド、オリゴペプチド(11～100アミノ酸残基)及び長いペプチド(「ポリペプチド」について通常想定されるもの、つまり長さ100アミノ酸残基以上)ならびにタンパク質(機能的単位は、少なくとも1つのペプチド、オリゴペプチド又はポリペプチドからなり、グリコシル化、脂質化(lipidate)あるいは補欠分子族からなることにより化学的に修飾されていてもよい)を示す。また、ポリペプチドの定義は、マイコバクテリア中で天然型のペプチド/タンパク質、ならびにいずれかの種類の宿主を形質転換する、いずれかのタイプの発現ベクター中の組換えタンパク質又はペプチド及び化学的に合成したペプチドも含む。

この明細書で、「実質的に純粋なポリペプチドフラグメント」は、天然に結合している他のポリペプチド物質を、多くて5重量%(他のポリペプチド物質は、より低い%、例えば多くて4%、多くて3%、多くて2%、多くて1%及び多くて0.5%が好ましい)含むポリペプチド調製物を意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、少なくとも96%純粋であることが好ましい。つまり、ポリペプチドは調製物中に存在する全ポリペプチド物質の少なくとも96重量%を構成し、より高い%であることが好ましく、例えば少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.25%、少なくとも99.5%及び少なくとも99.75%が好ましい。特に、ポリペプチドフラグメントは「本質的に純粋形」、つまり、ポリペプチドフラグメントは、天然に結合しているいずれの他の抗原も本質的になく、結核菌群に属する細菌由来のいずれの他の抗原もないことが好ましい。これは、以下に詳細に記載するように、マイコバクテリアでない宿主細胞で組換え法によりポリペプチドフラグメントを調製するか、又は周知の固相あるいは液相ペプチド合成法(例えば、Merrifieldにより記載の方法やその変法)でポリペプチドフラグメントを合成してなされる。

語「サブ配列」は、2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153及び168～171のいずれか一つから選択されるSEQ ID NOを有する本発明のポリペプチドに関して用いられる際に、SEQ ID NO: 2、4、6、8

10

20

30

40

50

、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153、168～171のいずれか一つの結核菌由来のポリペプチドから得られる少なくとも6アミノ酸残基のいずれかの連続的な範囲であって、結核菌群に属する細菌感染に抵抗性を増すことができる能力に関して上記ポリペプチドに免疫学的に等しいものを示す。したがって、異なる由来源、例えば他の細菌や真核細胞由来のポリペプチドも含まれる。

「免疫学的に等しい」ポリペプチドに関しては、ワクチン又は診断剤（つまり、医薬的に受容な担体もしくは賦形剤及び任意のアジュバントと組合さって）に製剤化される際に、ポリペプチドが、ここでI) 投与（単独、又は他の抗原と組合わさった免疫学的に活性な成分のいずれか）により、マウス及び／又はモルモット及び／又はヒトのような霊長類に

10

、結核菌群に属する細菌感染に対して後天的に増した特異的な耐性を付与すること、（その少なくとも20%がマイコバクテリア・ボビスBCGにより生じた後天的に増した耐性で、さらに少なくとも20%がSEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168～171のいずれか一つからなる親ポリペプチド（親ポリペプチドは、図6に示した2DEゲルと実質的に同じ相対位置とパターンを有する。実施例参照）により生じる後天的に増した耐性であり、

後天的に増した耐性を、結核菌のビルレント株に実験的に感染させたマウスあるいはモルモットから単離した脾臓、肺又は他の器官のホモジネート由来のマイコバクテリア数の減少を計測するか、又はヒトのような霊長類では、プラセボもしくはBCGを受けた対照の群に対して予防接種した群で観察される臨床的な結核の進行に対する防護を測定することにより評価する（増大した抵抗性はより高く、マイコバクテリア・ボビスBCGにより誘発される免疫防護応答の少なくとも50%、例えば少なくとも60%に相当することが好ましく、マイコバクテリア・ボビスBCGにより誘発される免疫防護応答の少なくとも80%、例えば少なくとも90%が、さらに好ましい。増大した抵抗性が、マイコバクテリア・ボビスBCGにより生じる抵抗性を代替することが期待される場合には、抵抗性は、増大した抵抗性の少なくとも100%、例えば少なくとも110%であることが好ましい））、及び／又は

20

II) 結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示している哺乳類で、診断上、顕著な免疫応答を誘発する

（この診断上、顕著な免疫応答は、例えば皮膚試験で決定できる遅延型の過度感作反応の形態、又は例えば以下に詳述するIFN- γ アッセイで測定されるIFN- γ 放出の形態であってもよい。一連の皮膚試験で、診断上、顕著な反応は、少なくとも直径5mmで、少なくとも65%（好ましくは、少なくとも75%、例えば少なくとも85%）がSEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168～171のいずれか一つからなる親ポリペプチドにより誘発される皮膚反応（皮膚反応直径として評価）を生じる反応である）ことを意味する。

30

したがって、免疫性を増すポリペプチドフラグメントの能力は、予めポリペプチドで免疫化した後で結核菌群に属するマイコバクテリアのビルレント株に実験的に感染させた実験動物（例えば、マウス又モルモット）から単離した脾臓、肺又は他の器官のホモジネートからのマイコバクテリア数の減少を、同じビルレント株に感染させた実験動物（結核に対して予め免疫化していない）の対照群のマイコバクテリア数と比較して、実験動物で計測して評価することができる。マイコバクテリア数の比較は、マイコバクテリア・ボビスBCGで免疫化した後に同じビルレント株で実験的に感染させた実験動物群からのマイコバクテリアを計測して行ってもよい。

40

本発明のポリペプチドフラグメントで免疫化した実験動物由来のホモジネート中のマイコバクテリア数は、マイコバクテリア・ボビスBCGで免疫化したマウス又はモルモットで多くて5倍の数で、例えば多くて3倍の数、好ましくは多くて2倍の数である。

抵抗性を増す本発明のポリペプチドフラグメントの能力についてのより適切な評価は、一方の群が本発明の抗原を含む、ここに記載するワクチンを受けており、他方の群がプラセ

50

ボもしくは他の公知のTBワクチン（例えばBCG）のいずれかを受けている、2つ個体群（例えば、ヒト又は他の霊長類）での臨床的な結核の発症率の比較である。このような条件では、本発明の抗原は（当業者に公知の統計方法で測定されるように）プラセボの投与で生じるよりも著しく高い免疫防護を生じるはずである。

「結核菌群」は通常の意味でTBを生じるマイコバクテリアの複合体であり、結核菌、マイコバクテリア・ボビス、マイコバクテリア・ボビスBCG及びマイコバクテリア・アフリカヌム（*M.africanum*）がある。

この明細書で、語「代謝しているマイコバクテリア」は、対数的に増殖し、培養されている培養培地にポリペプチドを放出している生きたマイコバクテリアを意味する。

語「配列の同一性」は、等しい長さの2つのアミノ酸配列又は2つのヌクレオチド配列間のホモロジーの程度の定量測定を示す。配列の同一性は、

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})}{N_{ref}} 100$$

[式中、 N_{dif} は配列している際の2つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は1つの配列における残基数である] として算出することができる。それ故、DNA配列AGTCAGTCは、配列AATCAATCと75%の配列の同一性を有するであろう（ $N_{dif}=2$ 、 $N_{ref}=8$ ）。

配列の同一性は、所定のポリペプチドのアミノ酸配列とSEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168～171のいずれか一つに示すアミノ酸配列との同一性の程度を例示するためにここで用いる。SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168～171のいずれか一つに示すアミノ酸配列と比較されるアミノ酸配列は、例えば後述するハイブリダイゼーションで得られるDNA配列から推定するか、又は従来のアミノ酸配列法により得ることができる。配列の同一性は成熟ポリペプチドのアミノ酸配列について、つまり、いずれのリーダー配列も考慮せずに測定することが好ましい。

上記の記載から明らかであるように、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168～171のいずれか一つを有するポリペプチドと同一でないポリペプチドは本発明には含まれない。本発明は、親配列に匹敵する免疫原性に不都合な影響を及ぼさず、重要かつ有用な新規の結合特性や生物学的機能及び免疫原性等を生じ得るマイナーな変形を可能にするものである。したがって、各ポリペプチドフラグメントは、特定のアミノ酸配列と核酸配列で特徴づけることができる。このような配列が組換え法で産生される類似体及び変異体を含み、このような核酸及びポリペプチド配列が、核酸配列への1以上のヌクレオチドの置換、挿入、付加及び/又は欠損により修飾され、組換えポリペプチド中での1以上のアミノ酸残基の置換、挿入、付加又は欠損を生じ得ることは理解されるであろう。語DNAを以下で用いる際、語DNAが、DNAがRNAで置換され得る目的のために当業者に明らかなRNAの具体例を含むように解釈すべきであることは理解されるべきである。ハイブリダイゼーション用には、PNAが、非常にダイナミックなハイブリダイゼーションプロファイルを示すことが分かっているので、DNAの代わりに用いてもよい（PNAは、Nielsen P EらのScience 254:1497-1500に記載）。

免疫応答診断及びワクチン調製で、公知の免疫原性のタンパク質又はポリペプチドのセグメントから抗原を調製することは、ともにしばしば可能であり、実用的である。あるエピトープ領域を用いて、抗原ポリペプチド全体で生じる反応に似た反応を生じることができる。抗原性又は免疫原性の可能性がある領域は、幾つかの試験法、例えばJameson-WolfもしくはKyte-Doolittleの抗原性解析又はHopp及びWoods（1981）の疎水性解析 [例えばJameson及びWolf、1988; Kyte及びDoolittle、1982; 又は米国特許第4,554,101号参照] のい

10

20

30

40

50

れかで同定できる。各アミノ酸残基に平均的な親水値を割り当てる疎水性解析により、これらの値から平均的な親水度を算出でき、もっとも親水性の領域を決定することができる。推測される抗原性領域は、これらの方法を1以上用いて本発明のポリペプチドを指定するアミノ酸配列から誘導することができる。

また、免疫応答のあいだに認識される関連したT-細胞エピトープを同定するために、「ブルートフォース (brute force)」法を使用することもできる。T-細胞エピトープは直鎖状であるので、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つのポリペプチドの欠損変異体は、系統的に構築すると、例えばこれらの欠損変異体をここに記載するIFN- γ アッセイに付すことにより免疫認識に必要なポリペプチドの領域を示す。別の方法は、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23いずれかの一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つのポリペプチドから誘導される重複オリゴマー（好ましくは、例えば20アミノ酸残基の長さの合成物）を利用している。これらのなかには、IFN- γ アッセイで陽性の反応を生じるものと生じないものがあるであろう。

本発明の好ましい具体例で、本発明のポリペプチドフラグメントはヘルパーT-細胞のエピトープからなる。

T-細胞エピトープの最も小さい長さは少なくとも6アミノ酸であることが示されているが、このようなエピトープはより長い範囲のアミノ酸から構成されていることが普通である。それ故、本発明のポリペプチドフラグメントは少なくとも7アミノ酸残基で、例えば少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも22、少なくとも24及び少なくとも30のアミノ酸残基を有していることが好ましい。

実施例から明らかであるように、本発明のポリペプチドの幾つかはリーダー配列（又は他の短いペプチド配列）を含む天然の翻訳産物であるが、結核菌群に属する細菌由来の短期培養液から単離できる生成物は、これらの配列を有しない。これらのポリペプチドを組み換えて産生し、これに関連して、ポリペプチドの遺伝子にリーダー配列をエンコードする情報を含むことによって宿主細胞からのポリペプチドの輸送を容易にすることは幾つかの用途で有利であるが、むしろ輸送を行う宿主系で優れていることが示されている配列でリーダー配列を置換するか又はリーダー配列を（例えば、ペプチド合成によるポリペプチド産生時に）全体的に省くことが、より好ましい。それ故、本発明の好ましい具体例は、SEQ ID NO: 6の-30~-1及び/又はSEQ ID NO: 10の-32~-1及び/又はSEQ ID NO: 12の-8~-1及び/又はSEQ ID NO: 14の-32~-1及び/又はSEQ ID NO: 42の-33~-1及び/又はSEQ ID NO: 52の-38~-1及び/又はSEQ ID NO: 56の-33~-1及び/又はSEQ ID NO: 58の-56~-1及び/又はSEQ ID NO: 151の-28~-1のアミノ酸残基がないポリペプチドである。

別の好ましい具体例では、本発明のポリペプチドフラグメントは、いずれのシグナル配列もない。これは、ポリペプチドフラグメントが合成して産生される際に特に重要であるが、ポリペプチドフラグメントが組換えて産生される際には、通常、それらがペリプラズムや細胞外空間へ宿主細胞により輸送されないようにすることができる。ポリペプチドフラグメントは宿主細胞の破壊後に細胞質から従来法（以下、参照）で回収でき、ポリペプチドフラグメントの再生が必要な場合には一般的な再生方法（例えば、このような一般的に使用可能な再生法を記載するW094/18227号の開示参照）を用いることができる。

SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つから誘導される所定のポリペプチドフラグメントの潜在的な有用性について適切なアッセイは、感作記憶T-リンパ球からのIFN- γ の放出に影響するポリペプチドフラグメントの能力の評価である。この能力を有するポリペプチドフラグメントは、本発明によれば本発明の特に重要な具体例である。

感染の開始後すぐにTリンパ球免疫応答を刺激するポリペプチドフラグメントは、マイコバクテリアが一瞬の感染で生じる細菌数まで増殖をなし遂げる前に感染を引き起こすマイコバクテリアの制御に重要であるものと推測される。

したがって、本発明の重要な具体例は、上記に定義されるポリペプチドフラグメントであって、

1) 一次感染から2週間以内か、又はマウスを結核菌群に属するマイコバクテリアに再度実験的に感染させてから4日以内のマウスから回収した感作記憶T-リンパ球からのIFN- γ の放出を誘導し、

その誘導が約200,000個の脾臓細胞/mlを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が1~4 μ gポリペプチド/ml懸濁液となり、IFN- γ の放出が懸濁液にポリペプチドを添加して2日後に回収した上清中のIFN- γ の測定により評価できる、及び/又は

2) 感染第1相のTB患者又はBCG予防接種した健康なドナー又はTB患者に接触している健康者から単離した約1,000,000個のヒトPBMC(末梢血液単核細胞)/mlから少なくとも1,500 pg/ml上のレベルでIFN- γ の放出を誘導し、

その誘導が約1,000,000個のPBMC/mlを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が1~4 μ gポリペプチド/ml懸濁液となり、IFN- γ の放出が懸濁液にポリペプチドを添加して2日後に回収した上清中のIFN- γ の測定により評価できる、及び/又は

3) 結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作した動物由来のウシPBMCからIFN- γ の放出を誘導し、その放出が結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作していない動物由来のウシPBMCから観察される放出の少なくとも2倍である。

1)及び2)の代わりに、ポリペプチドフラグメントによりもたらされる放出は上清中で少なくとも1,500pg/mlのIFN- γ を生じることが好ましく、より高い濃度、例えば上清中で少なくとも2,000pg/ml、少なくとも3,000pg/mlであることが好ましい。ウシPBMCからのIFN- γ の放出は、例えば標準的なサイトカインELISAでバックグラウンドに対し光学密度(OD)指数として測定でき、少なくとも2であるべきであるが、少なくとも3、5、8及び10のような、より高い数値であることが好ましい。

本発明のポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つと70%より高い配列の同一性を有する、少なくとも6アミノ酸残基の長さのアミノ酸配列からなることが好ましい。配列の同一性の最小割合は少なくとも80%、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%及び少なくとも99.5%であることが好ましい。

上述のとおり、本発明のポリペプチドフラグメントからリーダー配列を省くことは、通常、重要であろう。しかし、融合ポリペプチドの産生により、本発明のポリペプチドフラグメントは、より良好に特徴づけることができる。例えば、組換えて産生される際にポリペプチドの輸送を容易にする融合パートナー(partner)、ポリペプチドの精製を容易にする融合パートナー及び本発明のポリペプチドフラグメントの免疫原性を高める融合パートナーは全て重要である可能性がある。したがって、本発明は、少なくとも1つの上記ポリペプチドフラグメントと少なくとも1つの融合パートナーからなる融合ポリペプチドにも関する。免疫原性を増すためには、融合パートナーは、例えば(関連するエピトープを多重発現できるように)上記の別のポリペプチドフラグメント及び結核菌群に属する細菌由来の他のポリペプチド(例えば、ESAT-6、MPB64、MPT64及びMPB59)又はこれらの抗原のいずれかに対する少なくとも1つのT-細胞エピトープからなる群から選択できる。融合パートナーとして役立つことができる他の免疫原性を高めるポリペプチドは、T-細胞エピトープ(例えば、ポリペプチドESAT-6、MPB64、MPT64又はMPB59由来)又は標的の遺伝子産物の免疫原性を高める他の免疫原性エピトープ(例えば、IFN- γ 、IL-2及びIL-12のよう

10

20

30

40

50

なリンホカイン)である。発現及び/又は精製を容易にするためには、融合パートナーは、例えば細菌の線毛タンパク質、例えばピリン線毛成分及びpapA;タンパク質A;ZZ-ペプチド(ZZ-融合物は、スウェーデンのPharmaciaより市販されている);マルトース結合タンパク質;グルタチオンS-トランスフェラーゼ; -ガラクトシダーゼ;又はポリヒスチジンであってよい。

他の重要な融合パートナーは、脂質化されていることによって免疫原性ポリペプチドを免疫系に適切な様式で存在させるポリペプチドである。この作用は、例えばボレリア・ブルグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)のOspAポリペプチドベースのワクチンから公知であり、ポリペプチド中の脂質化膜アンカーが産生細胞から単離されると、ポリペプチド(天然に脂質化されている)に自己アジュバント作用を付与する。逆に、OspAポリペプチドは、脂質化アンカーなしで調製される際に免疫学的に比較的休止(silent)状態にある。実施例6Aに明らかにされているように、ESAT-6のN-末端に直接融合しているMPT59からなる融合ポリペプチドは、MPT59及びESAT-6のみの免疫原性から予想される以上にESAT-6の免疫原性を高める。この驚くべき知見が得られた正確な理由は依然として不明であるが、両方の抗原の存在により免疫原性に関する相乗効果が生じたか、又はESAT-6配列のN-末端配列の存在により、この免疫的に優勢なタンパク質をN-末端での存在が知られている重要なエピトープの損失から保護したものと考えられる。また、第三に、MPT59配列のC-末端に配列が存在することにより、この抗原の免疫特性が高められた可能性がある。

したがって、本発明の一部は、結核菌タンパク質ESAT-6又はMPT59由来のT-細胞エピトープを構成する少なくとも1つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、ESAT-6(最初のアミノ酸範囲がESAT-6から誘導される場合)又はMPT59(最初のアミノ酸範囲がMPT59から誘導される場合)とは異なる結核菌タンパク質由来の少なくとも1つのT-細胞エピトープを含み、及び/又は生体内分解又は翻訳後プロセッシングから第一アミノ酸配列を保護するアミノ酸の範囲を含む第二アミノ酸配列からなる融合ポリペプチドフラグメントに関する。第一アミノ酸配列は、第二アミノ酸配列にN-又はC-末端で位置していてもよいが、ESAT-6のN-末端保護についての上記の点を考慮すると、第一アミノ酸配列がESAT-6由来である際に第一アミノ酸配列は第二アミノ酸配列にC-末端で位置していることが好ましい。

現在はMPT59とESAT6の融合作用が研究されているにすぎないが、ESAT6とMPT59又はそれら由来のエピトープは、融合構築物の全体的な免疫原性に対し実質的に同じ作用を有する他の融合パートナーに有利に融合させることができると考えられる。それ故、本発明の融合ポリペプチドフラグメントは、第二アミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのT-細胞エピトープが、上記及び実施例に記載される本発明のポリペプチドフラグメントからなる群から選択される結核菌ポリペプチド(「親」ポリペプチド)に由来するか、又はアミノ酸配列が結核菌タンパク質DnaK、GroEL、ウレアーゼ、グルタミンシンセターゼ、プロリンリッチ複合体、L-アラニンデヒドロゲナーゼ、ホスフェート結合タンパク質、Ag 85複合体、HBHA(ヘパリン結合血球凝集素)、MPT51、MPT64、スーパーオキシドジスムターゼ、19kDaリポタンパク質、-クリスタリン、GroES、MPT59(第一アミノ酸配列がESAT-6由来である場合)及びESAT-6(第一アミノ酸配列がMPT59由来である場合)のいずれか1つに由来するものが好ましい。第一及び第二T-細胞エピトープは、由来タンパク質中の天然に存在する配列と少なくとも70%の配列同一性をそれぞれ有することが好ましく、第一及び/又は第二アミノ酸配列は、由来タンパク質と少なくとも70%の配列同一性を有することがさらに好ましい。この融合ポリペプチドのもっとも好ましい具体例は、第一アミノ酸配列がESAT-6又はMPT59のアミノ酸配列であり、及び/又は第二アミノ酸配列が上記の潜在的な「親」ポリペプチドのアミノ酸配列の全長であるポリペプチドである。

もっとも好ましい具体例において、融合ポリペプチドフラグメントはMPT59に融合したESAT-6(ESAT-6は、MPT59のC-末端に融合していることが有利である)からなり、1つの詳細な具体的では、2つの親ポリペプチドフラグメントからなる2つのアミノ酸配列間にリンカーは導入されていない。

本発明の別の部分は、

1) 上記のポリペプチド又は融合ポリペプチドをエンコードする核酸配列からなるか、又

10

20

30

40

50

はその相補的な核酸配列からなり、及び／又は
2) 少なくとも10ヌクレオチドの長さを有し、

SEQ ID NO: 1 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 3 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 5 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 7 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 9 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 11 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 13 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 15 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 41 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 47 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 49 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 51 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 53 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 55 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 57 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 59 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 61 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 63 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 65 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 67 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 69 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 71 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 87 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 89 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 91 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 93 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 140 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 142 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 144 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 146 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 148 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 150 又はその相補鎖及び
SEQ ID NO: 152 又はその相補鎖

10

20

30

40

から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸フラグメントと、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件（当該分野で定義のとおり、つまり融解温度 T_m の5～10℃下、Sambrookら、1989、11.45-11.49頁参照）下で容易にハイブリダイズし、

但し、核酸フラグメントがSEQ ID NO:41の配列からなる際、核酸フラグメントはSEQ ID NO:41の781の位置に相当するAを含み、核酸フラグメントがSEQ ID NO:41に正確に相補的なヌクレオチド配列のサブ配列からなる際は、核酸フラグメントはSEQ ID NO:41の781の位置に相当するTを含む、

50

単離形態の核酸フラグメントに関する。

核酸フラグメントは、DNAフラグメントであることが好ましい。

本発明を正確に有用なものとするには、ハイブリダイゼーションの研究やアッセイに用いる際の核酸配列は、選択される配列の少なくとも10~40ほどの範囲のヌクレオチドに相補的な配列を含むことが好ましい。少なくとも10ヌクレオチド長の大きさをフラグメントが十分な長さとなり、安定かつ選択的な二重らせん分子の形成が確実となる。ハイブリッドの安定性と選択性を増すためには、10塩基長より長い範囲の相補配列を有する分子が一般的に好ましく、それにより、得られる特異的なハイブリッド分子の質と程度が改善される。

それ故、語「サブ配列」は、本発明の核酸フラグメントに関して用いる際に、上記のハイブリダイゼーションパターンを示す少なくとも10ヌクレオチドの連続的な範囲を示すことが意図される。このため、最低でも、SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、12、15、21、41、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、87、89、91、93、140、142、144、146、148、150又は152を有するハイブリダイゼーションパートナーのサブ配列との配列同一性が少なくとも70%であることが、通常、必要となるであろう。核酸フラグメントは10ヌクレオチドより長く、例えば少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70及び少なくとも80ヌクレオチドの長さであることが好ましい。また、配列同一性は70%より高く、例えば少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%及び少なくとも98%であることが好ましい。配列同一性は100%であることが、もっとも好ましい。このようなフラグメントは、例えば化学的手段によるフラグメントの直接合成で、核酸再生技術（例えば、米国特許4,603,102号のPCR技術）の応用で、又は組換え産物用の組換えベクターへの選択配列の導入で容易に調製できる。

同じアミノ酸が様々なコドンでエンコードされていてもよく、用いられるコドンがヌクレオチド配列を発現する対象の微生物の好みに特に関係していることは周知である。したがって、本発明の核酸フラグメントの少なくとも1つのヌクレオチド又はコдонは他で置換されて、発現時に、対象の核酸フラグメントでエンコードされるポリペプチドと同一か、実質的に同一のポリペプチドを生じててもよい。それ故、本発明により、核酸フラグメントやそのサブ配列でエンコードされるポリペプチドに実質的に影響しない、1以上のヌクレオチドの置換、挿入（イントロン含む）、付加、欠損及び転位のような配列の変化が可能になる。語「置換」は、全ヌクレオチド配列中の1以上のヌクレオチドを、1以上の異なるヌクレオチドで置換することを意味する。「付加」は、全ヌクレオチド配列のいずれかの末端での1以上のヌクレオチドの付加を意味するものと理解される。「挿入」は、全ヌクレオチド配列内での1以上のヌクレオチドの導入を意味する。「欠損」は、1以上のヌクレオチドが、全ヌクレオチド配列から、配列のいずれかの末端又は配列内のいずれかの適切な位置で欠損されていることを示す。「転位」は、2以上のヌクレオチド残基が互いに置換されていることを意味する。

修飾されるヌクレオチド配列は、上記のcDNA又はゲノム由来でもよいが、合成由来であってもよい。さらに、配列は、上述のとおり混合したcDNAならびにゲノム、混合したcDNAならびに合成物又はゲノム、及び合成物由来でもよい。配列は、例えば部位特異的突然変異で修飾し、所望のポリペプチドをエンコードする所望の核酸フラグメントを生じててもよい。ポリペプチドをエンコードする核酸の修飾に焦点を絞った以下の記載は、このような可能性、ならびに2以上のDNAフラグメントを結合して所望の核酸フラグメント及び上記主題の組合せを生じる核酸構築の可能性も含むものと理解されるべきである。

ヌクレオチド配列をいずれかの適切な技術を用いて修飾し、本発明のポリペプチドをエンコードする核酸フラグメントを産生することができる。

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列の修飾は、得られるポリペプチドの免疫学的機能を損なわないものであるべきである。

ここに開示する抗原変異体の製造に好ましい方法は、部位特異的突然変異である。この技

10

20

30

40

50

術は、基礎となる核酸の特異的突然変異により、抗原配列由来の個々のペプチド又は生物学的機能が等しいタンパク質もしくはペプチドの製造に有用である。さらに、前記の記載を考慮すると、この技術により例えば核酸へ1以上のヌクレオチドの変更が導入されて、配列変異体の調製及び試験を容易に行うことができる。部位特異的突然変異によって、所望の変異のヌクレオチド配列ならびに十分な数の隣接したヌクレオチドをエンコードする特異的なオリゴヌクレオチド配列を用いる変異体の産生が、欠損連結点の両側が交差している安定な二重らせんの形成に十分な大きさで複雑な配列のプライマー配列を生じることができる。一般的には、配列連結点の両側の約5～10残基が変えられている約17～25ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましい。

一般に、部位特異的突然変異の技術は、刊行物で例示されているように当該分野で周知である [Adelmanら、1983]。この技術は、一般的に一本鎖及び二本鎖の両形態で存在するファージベクターを用いることが好ましい。部位特異的突然変異に有用な代表的なベクターは、M13ファージのようなベクターを含む [Messingら、1981]。これらのファージは容易に市場で入手でき、それらの用途は一般的に当業者に周知である。

一般に、この明細書によれば部位特異的突然変異は、その配列内に本発明のポリペプチドをエンコードする核酸配列を含む一本鎖ベクターを最初に得ることにより行なわれる。所望の変異配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、例えばCreaら (1978) の方法で一般的に合成して調製される。このプライマーは、次いで一本鎖ベクターにアニールされ、変異を有する鎖を完全に合成するために大腸菌ポリメラーゼIクレノウフラグメントのようなDNAポリメラーゼ酵素に付される。このようにして、一方の鎖が本来の非変異配列をエンコードし、第二の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖ベクターは、次いで大腸菌細胞のような適切な細胞を形質転換するのに用いられ、変異された転位配列を有する組換えベクターを含むクローンが選択される。

部位特異的突然変異を用いる本発明の選択される核酸フラグメントの配列変異体の調製は、有用である可能性がある遺伝子種の産生手段として提供されるもので、本発明の核酸フラグメントの配列変異体を得られる他の方法の限定を意図するものではない。例えば、所望の遺伝子をエンコードする組換えベクターは、ヒドロキシルアミンを用いるプラスミドDNAの突然変異用の配列変異体を得るために突然変異剤を用いて処理してもよい [例えば、Eichenlaub、1979により記載の方法参照]。

また、本発明は、上記の核酸フラグメントからなる複製可能な発現ベクター、特に本発明のポリペプチドフラグメントをエンコードする核酸フラグメントからなるベクターに関する。

ベクターは、組換えDNA方法に便利に付すことができるいずれのベクターでもよく、ベクターの選択は、しばしばベクターが導入される宿主細胞による。したがって、ベクターは、その複製が染色体の複製から独立した自律複製ベクター (つまり、染色体外の単位として存在するベクター) であってもよい。このようなベクターの例は、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ-クロモソーム又はウィルスである。また、ベクターは、宿主細胞に導入される際に宿主ゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体とともに複製されるベクターでもよい。

発現ベクターは、ここに開示するDNAセグメントのいずれかを含むように構築してもよい。そのようなDNAは、マイコバクテリアのビルレント株に特異的な抗原性タンパク質又はサンプル中のマイコバクテリア核酸の検出用ハイブリダイゼーションプローブをエンコードしていてもよい。所望の抗原性タンパク質によって、長い又は短いDNAセグメントを用いることができる。開示されるDNAで発現又はエンコードされるタンパク質のエピトープ領域は、DNAの比較的短いセグメントとして含まれることができる。広範囲な発現ベクターは、例えば異種遺伝子産物及び/又は耐性遺伝子、例えば形質転換細胞の同定に有用な抗生物質耐性遺伝子の同定に有用なレポーター遺伝子産物をエンコードするDNAセグメントを含んでいてもよい。

本発明のベクターを細胞の形質転換に用いて、本発明の核酸フラグメントを増殖させたり、本発明のポリペプチドフラグメントを発現させることができる。それ故、本発明は、本

10

20

30

40

50

発明のベクターを少なくとも1つ有する形質転換細胞（その中に含まれる本発明のベクター及び/又は核酸フラグメントを天然に有しない細胞）にも関する。このような形質転換細胞（本発明の一部でもある）は、いずれかの適切な細菌の宿主細胞又はいずれかの他のタイプの細胞（例えば、単核真核生物、真菌もしくは酵母）又は多細胞生物（例えば動物や植物）由来細胞であってもよい。特に、タンパク質のグリコシル化は原核生物では珍しい事象であるが、グリコシル化が望ましい場合には哺乳類細胞が用いられる。しかし、通常は、例えばマイコバクテリア、サルモネラ（*Salmonella*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、バシラス（*Bacillus*）及びエシェリキア（*Escherichia*）属に属する細菌のような原核細胞が好ましい。形質転換細胞は、大腸菌（*E.coli*）、枯草菌（*B.subtilis*）又はマイコバクテリア・ボビスBCG細胞が好ましく、形質転換細胞が、本発明のポリペプチドを

10

発現することが特に好ましい。後者によって、本発明のポリペプチドが、形質転換細胞を含む培養液から単に回収することで産生できる可能性が増す。この発明の部分のもっとも好ましい具体例では、形質転換細胞はマイコバクテリア・ボビスBCG株のダニシュ（*Danish*）1331、つまりデンマーク、コペンハーゲンのBCG研究所（*Statens Seruminstitut*）からのマイコバクテリア・ボビス株コペンハーゲンである。

本発明の核酸フラグメントは、本発明のポリペプチドフラグメントの組換え体を産生できる。しかし、ペプチド合成としてのポリペプチドフラグメントの提供方法は、天然源からの単離でもよい。

したがって、本発明は、宿主細胞で複製可能なベクターに上記の核酸フラグメントを挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し（形質転換細胞は、分化ハイブリダイゼーション、融合レポーター遺伝子産物の同定、耐性マーカー、抗-抗原抗体などでのスクリーニングを含む様々な技術を用いて選択できる）、ポリペプチドの発現を生じるのに十分な条件下、培養培地で宿主細胞を培養（当然、細胞は環境に適切な条件下で培養でき、DNAが望ましい場合には複製条件が用いられる）し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収するか；又は

20

請求項1に記載の短期培養液からポリペプチドを単離するか；又は
結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物もしくは画分（例えば、細胞壁含有画分）からポリペプチドを単離するか；又は

固相又は液相ペプチド合成でポリペプチドを合成する

ことからなる本発明のポリペプチドフラグメントの製造方法にも関する。

30

形質転換細胞の成長に用いられる培地は、目的に合った従来のいずれかの培地であればよい。適切なベクターは上記のベクターのいずれでもよく、適切な宿主細胞は上記に挙げた細胞タイプのいずれでもよい。ベクターの構築と宿主細胞へのその導入に用いられる方法は、組換えDNAの分野で、このような目的に公知のいずれの方法でもよい。以下に、考えられ得る可能性について、より詳細に記載する。

一般に、本発明の核酸配列の初期クローニングと本発明に有用なベクターの構築には、原核生物が好ましい。例えば、以下のより詳細に記載する特定の株に加えて、一例として大腸菌K12株294（ATCC No.31446）、大腸菌B及び大腸菌X 1776（ATCC No.31537）のような株が挙げられる。これらの例は当然に本発明の例示であり、限定するものではない。

発現にも、原核生物が好ましい。上記の株ならびに大腸菌W3110（F-、ラムダ-、原栄養性、ATCC No.273325）、枯草菌のような桿菌又はサルモネラ・ティフィムリウム（*S.typhimurium*）もしくはセラチア・マルセッセンス（*Serratia marcescens*）のような他の腸内細菌及び様々なシュードモナス種を用いることができる。特に、成長の早いマイコバクテリア、例えばマイコバクテリア・スメグマ（*M.smegmatis*）は結核菌群のマイコバクテリアと高度に類似し、それ故に発現産物の翻訳後修飾を行う必要を減じる可能性があるので、重要である。

40

一般に、宿主細胞と適合性の種から誘導されるレプリコン及び制御配列を含むプラスミドベクターは、これらの宿主に関して用いられる。ベクターは、複製部位ならびに形質転換細胞での表現型を選択させることができるマーキング配列を有する。例えば、大腸菌は、通常、大腸菌種由来プラスミドpBR322を用いて形質転換される[例えばBolivarら、1977

50

、Gene 2:95参照]。プラスミドpBR322はアンピシリンとテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、形質転換細胞の同定手段を容易にしている。プラスミドpBR又は他の微生物プラスミド又はファージは、発現用の微生物で用いることができるプロモーターを含んでいてもよく、含むように修飾されてもよい。

組換えDNAの構築でもっとも一般的に用いられるプロモーターは、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）及びラクトースプロモーターシステム [Changら、1978; Itakuraら、1977; Goeddelら、1979] 及びトリプトファン（trp）プロモーターシステム [Goeddelら、1979; EP 0出願公報No.0036776] を含む。これらはもっとも一般的に用いられるが、他の細菌プロモーターが発見され、利用されており、それらのヌクレオチド配列に関する詳細が公表され、プラスミドベクターとのそれらの機能的な結合が当業者により可能となっている [Siebwenlistら、1980]。原核生物由来の遺伝子は、それら自身のプロモーター配列から大腸菌で効率よく発現され、人為的手段による別のプロモーターの付加の必要性をなくしている。

本発明のポリペプチドの組換え調製後、ポリペプチドの単離は、例えば本発明のポリペプチドに実質的に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィー（又はクロマトグラフィーに基づく他の従来の生化学的方法）で行うことができる。さらに、Andersenらにより記載されている電気溶出技術 [J. Immunol. Methods 161:29-39] を同時に用いてもよい。

本発明によれば、翻訳後修飾は、ポリペプチドの脂質化、グリコシル化、切断又は伸長を含む。

ある態様において、この発明で提供されるDNA配列情報により、マイコバクテリア遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする能力を有する比較的短いDNA（又はRNA又はPNA）配列を調製することができる。これらの態様において、適切な長さの核酸プローブは、関連する配列を考慮して調製される。このような核酸プローブがマイコバクテリア遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする能力により、種々の具体例でプローブに特定の有用性が付与される。プローブは、サンプル中の病原性微生物の存在を検出するための様々な診断アッセイに使用できることが非常に重要である。しかし、変異種プライマー又は他の遺伝子構築物の調製に用いるプライマーの調製のための配列情報の使用をはじめ、いずれの用途も想定される。

本発明の核酸フラグメントは、本発明のポリペプチド合成及び（直接的なハイブリダイゼーションアッセイ又は例えばPCRもしくは他の分子増幅方法でのプライマーとして有用な）ハイブリダイゼーションプローブのための原点としての用途とは別に、抗原の生体内発現に用いてもよい。つまり、核酸フラグメントは、いわゆるDNAワクチンに用いることができる。最近の研究により、真核細胞で複製しないベクターにクローンされたDNAフラグメントは、例えば筋肉内注射もしくは経皮投与（いわゆる「遺伝子銃」法）により動物（ヒト含む）へ導入できることが示されている。DNAは例えば筋肉細胞により採取され、重要な遺伝子は、真核生物で機能するプロモーター、例えばウィルスプロモーターで発現され、遺伝子産物は、その後免疫系を刺激する（これらの新たに発見された方法は、ここで参照により導入されるUlmerら、1993を参照のこと）。

それ故、本発明は、本発明の核酸フラグメントからなるワクチンに関し、このワクチンは、ワクチンを投与したヒトを含む動物により抗原を生体内で発現させ、抗原の発現量は、ヒトを含む動物での結核菌群のマイコバクテリア感染に対する耐性を実質的に増す効果を有する。

このような「DNAワクチン」の効力は、免疫応答の調節能力を有するポリペプチドをエンコードするDNAフラグメントとともに発現産物をエンコードする遺伝子を投与して増強される可能性がある。例えば、リンホカイン前駆体又はリンホカイン（例えば、IFN- γ 、IL-2又はIL-12）をエンコードする遺伝子は、2つの別のDNAフラグメントを投与するか、又は同じベクターに含まれるDNAフラグメントをとともに投与することにより、免疫原性タンパク質をエンコードする遺伝子とともに投与することができる。また、ここに開示されるポリペプチドの関連するエピトープをそれぞれエンコードする多くのヌクレオチド配列が

らなるDNAフラグメントを投与して、これらのエピトープの広いスペクトルを有する免疫系を連続的に感作させてもよい。

上記のとおり、本発明のポリペプチドフラグメントは、結核菌群に属する代謝しているビルレントマイコバクテリアを含む培養培地で細胞外に存在するため、又はこのような細胞外抗原とホモロジーが高いため、又はマイコバクテリア・ボビスBCGに存在しないために、ワクチンの構成要素又は免疫診断剤の構成要素として優れている可能性がある。

したがって、本発明の別の態様は、本発明のポリペプチド又は融合ポリペプチドからなる免疫性組成物に関する。このような免疫性組成物の能力を確実に最適化するためには、免疫学的かつ医薬的に受容な担体、賦形剤又はアジュバントを含むことが好ましい。

適切な担体は、ポリペプチド（類）が疎水性の非共有相互作用で結合しているポリマー（例えばポリスチレンのようなプラスチック）、又はポリペプチド（類）が共有結合しているポリマー（例えば多糖）又はポリペプチド（例えば、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン又は鍵穴アオダイ（keyhole limpet）ヘモシアニン）からなる群から選択される。適切な賦形剤は、希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択される。アジュバントは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（DDA）、キュイル（Quil）A、ポリI:C、フロイント不完全アジュバント、IFN- γ 、IL-2、IL-12、モノホスホリル脂質A（MPL）及びムラミルジペプチド（MDP）からなる群から選択することが好ましい。

少なくとも2つの異なるポリペプチドフラグメントからなり、異なるポリペプチドフラグメントが、それぞれ上記のポリペプチド又は融合ポリペプチドである本発明の免疫性組成物が好ましい。免疫性組成物は、3～20の異なるポリペプチドフラグメント又は融合ポリペプチドを含むことが好ましい。このような免疫性組成物は、ワクチン形態又は皮膚試験の試薬形態であることが好ましい。

したがって、上記によれば、本発明は、本発明のポリペプチドを調製、合成又は単離し、ワクチン用媒体にポリペプチドを可溶化又は分散させ、任意に他の結核菌抗原及び/又は担体、賦形剤及び/又はアジュバント物質を加えることからなる、本発明の免疫性組成物の産生方法にも関する。

活性成分としてペプチド配列を含むワクチンの調製は、ここで参照として導入する米国特許第4,608,251号、第4,601,903号、第4,599,231号、第4,599,230号、第4,596,792号及び第4,578,770号に例示されているように、一般的に当該分野で十分理解されている。このようなワクチンは、代表的には液体溶液又は懸濁液のいずれかのような注射可能な剤として調製される。注射前の溶液中又は懸濁液中の液体に適切な固体の形態が調製されてもよい。製剤は、乳化されていてもよい。活性免疫原性成分は医薬的に受容で、活性成分と適合性である賦形剤としばしば混合される。適切な賦形剤は、例えば水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等とそれらの組合せである。さらに、所望の場合には、ワクチンは少量の補助物質、例えば湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤又はワクチンの効果を高めるアジュバントを含んでいてもよい。

ワクチンは、通常、非経口、例えば皮下又は筋肉内のいずれかの注射により投与される。他の投与様式に適切な別の製剤には座薬が含まれ、経口製剤が含まれる場合がある。座薬には、伝統的な結合剤及び担体、例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセリドが含まれていてもよい。このような座薬は0.5～10%、好ましくは1～2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成してもよい。経口製剤は、このような通常用いられる賦形剤、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。これらの組成物は溶液、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、継続放出製剤又は粉末形態であり、10～95%、好ましくは25～70%の活性成分を含む。

タンパク質は、中性又は塩の形態としてワクチンに製剤化できる。医薬的に受容な塩は、酸付加塩（ペプチドの遊離のアミノ基とともに形成される）を含む。酸付加塩は、無機酸（例えば塩酸もしくはリン酸）又はオキシカル酢酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸などとともに形成される。遊離のカルボキシル基とともに形成される塩は、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化鉄のような無機塩基、及びイソプロピルア

10

20

30

40

50

ミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインのような有機塩基などに由来してもよい。

ワクチンは、服用製剤に適合する様式で、治療上、有効かつ免疫原性であるような量で投与される。投与量は、処置すべき対象（例えば、免疫応答を増すための個々の免疫系の能力を含む）及び望まれる保護の程度による。投与範囲は、予防接種1回当たりに数100の微生物活性成分のオーダーが適切であり、約0.1~1000 μg の範囲、例えば約1~300 μg の範囲が好ましく、特に約10~50 μg の範囲が好ましい。最初の投与に適切な型及びブースター注射は変えることもできるが、最初の投与後の接種又は他の投与によって特徴づけられる。

応用方法は、広範囲に変えることができる。ワクチンの従来の投与方法は、いずれも使用することができる。これらは、固形の生理学的に受容な基剤又は生理学的に受容な分散剤での経口的な用途、非経口的な注射などを含むものと考えられる。ワクチンの用量は投与経路によっており、予防接種される人の年齢、症状の程度（lesser degree）、予防接種される人の体重により変化する。

ワクチンのポリペプチドには、ワクチンにおいて十分免疫原性なものがあるが、そうでないものについては、ワクチンがさらにアジュバント物質を含む際に免疫応答が高められるものがある。

ワクチンにアジュバント作用をさせるための様々な方法は、例えば生理食塩水中で通常0.05~0.1%溶液として用いられる水酸化アルミニウム又はホスフェート（alum）、0.25%溶液として用いられる糖（カルボポール）の合成ポリマーとの混合物、それぞれ30秒~2分間、70~101 °Cの範囲の温度で熱処理することによるワクチン中のタンパク質の凝集物のような剤の使用を含む。ペプシン処理（Fab）抗体でアルブミンに再活性化させることによる凝集物、シー・パルブム（C.parvum）のような細菌細胞又はエンドトキシン又はグラム陰性細菌のリボ多糖成分との混合物、マンニットモノオレエート（Aracel A）のような生理学的に受容な油性賦形剤中のエマルジョン又はブロック置換体として用いられるパーフルオロカーボン（Fluosol-DA）の20%溶液とのエマルジョンも、用いることができる。本発明によれば、DDA（ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド）はアジュバントの重要な代替物であるが、フロイントの完全及び不完全アジュバント、ならびにキュイルA及びRIBIも重要である可能性がある。さらに、モノホスホリル脂質A（MPL）及びムラミルジペプチド（MDP）でもよい。

さらに、アジュバント作用をなす可能性があるものとして、Gosselinらが1992年に記載する技術（ここで、参照により導入される）を用いることは、かなり重要（したがって、好ましい）である。要約すれば、本発明の抗原のような関連性のある抗原の存在は、単核細胞/マクロファージ上のFc γ レセプターに対する抗体（又は抗体フラグメント結合抗原）に抗原を結合させて高められる。特に、抗原と抗-Fc γ RIの結合は、予防接種目的のための免疫原性の増強を立証している。

ほかに、リンホカイン（例えば、IFN- γ 、IL-2及びIL-12）のような免疫調節物質又はポリI:Cのような合成IFN- γ インデューサーが、上記アジュバントと組合わせて使用されてもよい。実施例3で論じるように、抗原とアジュバントの混合物は、優れたワクチン製剤を生じるものと推測される。

多くの例で、何回にもわたって、通常6回の予防接種を越えないで、さらに、通常4回の予防接種を越えないで、好ましくは1又は2回、通常、少なくともほぼ3回の予防接種でワクチンを投与する必要があるであろう。予防接種は2~12週間隔が通常であり、3~5週間隔がより普通である。1~5年、通常3年間隔の定期的なブースターが、所望の免疫防護レベルを維持するのに望ましい。免疫化の進行は、ESAT-6又はST-CFと同時培養したPBL（末梢血液リンパ球）の生体外での増殖アッセイ、特に感作リンパ球から放出されたIFN- γ レベルの測定により追跡できる。アッセイは、放射性核種、酵素、蛍光発色物などのような従来の標識を用いて行ってもよい。これらの技術は周知であり、これらのアッセイタイプの例として広範囲な特許、例えば米国特許第3,791,932号、第4,174,384号及び第3,949,064号に見出すことができる。

10

20

30

40

50

遺伝的变化のために、異なる個体が、同じポリペプチドに対する強度を変えて免疫応答と反応することがある。したがって、本発明のワクチンは、免疫応答を増すために幾つかの異なるポリペプチドを含んでいてもよい。ワクチンは、全ポリペプチドが上記のとおりであるか、又は全てではなく幾つかのポリペプチドが結核菌複合体に属する細菌由来である2以上のポリペプチドを含んでいてもよい。後者の例で、ポリペプチドについて上記する基準を充たす必要のないポリペプチドは、それら自身の免疫原性により作用するか、又は単なるアジュバントとして作用することができる。このような重要なポリペプチドの例にはMPB64、MPT64及びMPB59があるが、マイコバクテリアから単離できるいずれかの他の物質も代替物となり得る。

ワクチンは、3～20の異なるポリペプチド、例えば3～10の異なるポリペプチドからなっているとしてもよい。

10

本発明のポリペプチドをアジュバントと混合する理由の1つは、細胞の免疫応答を有効に活性化させる点にある。しかし、この作用は、他の方法、例えば非病原性微生物のワクチンで有効な抗原を発現させてなすことができる。このような微生物の周知の例は、マイコバクテリア・ボビスBCGである。

したがって、本発明の別の重要な態様は、結核菌群に属するマイコバクテリアで起こされるTBに対して動物（ヒトを含む）を免疫化し、有効成分として微生物を含み、上記ポリペプチドをエンコードするDNA配列の1以上のコピーが、微生物にポリペプチドを発現、分泌させる様式で微生物ゲノムに挿入されているワクチンである現在利用可能なBCG生ワクチンの改良である。

20

この明細書で、語「ゲノム」は、微生物の染色体ならびにプラスミドのような染色体外のDNAもしくはRNAをいう。しかし、導入される遺伝物質の損失を妨げるために、本発明のDNA配列を非病原性微生物の染色体に導入することが好ましい。

非病原性微生物は、例えばマイコバクテリア、サルモネラ、シュドモナス及びエシェリキア属からなる群から選択される細菌が好ましい。特に、非病原性微生物は、マイコバクテリア・ボビスBCG、例えばマイコバクテリア・ボビスBCG株のダニシュ1331が好ましい。マイコバクテリア・ボビスBCG株由来のマイコバクテリアでの本発明のポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列の1以上のコピーの導入は、BCG株の免疫原性作用を高めるであろう。本発明のヌクレオチド配列の1以上のコピーの導入は、さらに免疫応答を高めるものと推測される。したがって、本発明の態様は、ポリペプチドをエンコードするDNA配列の少なくとも2コピー、例えば少なくとも5コピーが微生物のゲノムに導入されているワクチンである。DNA配列のコピーは、同一のポリペプチドをエンコードする同一物もしくは同一物をエンコードする同じDNA配列の変型もしくはポリペプチドのホモログのいずれであってもよく、又は別の具体例では、ポリペプチドの少なくとも1つが本発明によるものである異なるポリペプチドをエンコードする異なるDNA配列でもよい。

30

本発明の生ワクチンは、本発明による形質転換された非病原性細胞を培養し、これらの細胞をワクチン用の培地に移し、任意に担体、賦形剤及び/又はアジュバント物質を加えて製造することができる。

また、本発明は、本発明のポリペプチド又は上記する皮膚試験試薬を動物に皮肉注射することからなり、注射位置での陽性の皮膚反応はTBを有する動物を示し、注射位置で陰性の皮膚反応はTBを有しない動物を示す、結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより動物（ヒトを含む）に引き起こされるTBの診断方法に関する。陽性反応は少なくとも直径が5mmの皮膚反応であるが、より大きい反応、例えば直径が少なくとも1cm、1.5cm、少なくとも2cmであることが好ましい。皮膚試験試薬として用いられる組成物は、上記ワクチンについての記載と同じ方法で製造できる。

40

ワクチンの製造と用途に関する上記の記載内において、本発明は、本発明のポリペプチド又は上記のような本発明のワクチン組成物又は上記した生ワクチンを動物に投与することからなる、結核菌群に属するマイコバクテリアにより引き起こされるTBに対する動物（ヒトを含む）の免疫化方法にも関する。投与経路は、非経口（例えば、静脈及び動脈内）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、経口、口腔、舌下、鼻、直腸又は経皮経路が好ましい。

50

マイコバクテリア由来の短期培養液に存在するタンパク質ESAT-6ならびにマイコバクテリアゲノム中のesat-6遺伝子は、他のマイコバクテリア株での分布が非常に限られているので、結核菌、例えばesat-6がBCG及び環境から単離される多くのマイコバクテリア種（例えば、マイコバクテリア・アビウム（*M. avium*）及びマイコバクテリア・テラエ（*M. terrae*））の両方に存在しないことを立証している。これは、本発明の抗原及びその遺伝子の少なくとも1つにも当てはまると考えられ、それ故に本発明の診断の具体例は、結核菌群のビルレントマイコバクテリア株での現在又は過去の感染診断を行うのに特に適している。1）例えばBCGワクチンであらかじめ予防接種されるか、又は非ビルレントマイコバクテリア由来抗原に付された対象（動物又はヒト）と2）ビルレントマイコバクテリアに活性に感染しているか、又は感染していた対象は、区別できると考えられる。

10

幾つかの診断アッセイ及び方法が、可能であると考えられる。

過去又は現在のビルレントマイコバクテリア感染の診断が目的である際、患者の単核細胞（つまり、T-リンパ球）からなる血液サンプルを、本発明の1以上のポリペプチドサンプルに接触させることができる。この接触は生体外で行うことができ、陽性反応は、例えばT-細胞の増殖又は、 γ -インターフェロンのようなサイトカインの細胞外相（例えば、培養上清）への放出であってもよい。生体内試験では、上記のように皮膚試験が適している。血清サンプル中の抗体とポリペプチド間の結合の立証は過去又は現在の感染を示すので、対象の血清サンプルを本発明のポリペプチドを接触させることも考えられる。

したがって、本発明は、動物又はヒトの血液サンプルを提供し、本発明のポリペプチドと動物由来のサンプルを接触させることからなる、動物又はヒトにおける結核菌群に属する細菌との現在又は過去の感染を診断するための生体外の方法にも関する。血液サンプル中の単核細胞による細胞外相への少なくとも1つのサイトカインの顕著な放出は、動物が感染されていることを示す。ここで、サイトカインの放出が、結核でない対象（例えば、TBに対する伝統的な皮膚試験で反応しない対象）由来の血液サンプルからのサイトカインの放出より著しく高いことは、語「顕著な放出」により意味する。通常、顕著な放出は、このようなサンプルから認められる放出の少なくとも2倍である。

20

また、器官を感染する可能性があるサンプルは、本発明のポリペプチドに対して生じる抗体と接触させてもよい。当該分野で周知の方法でサンプルと抗体間の反応を立証することにより、現在の感染が示されるであろう。当然、対象由来の血清サンプルを本発明のポリペプチドフラグメントの少なくとも1つと接触させ、抗体及び抗原間の反応を可視化する周知の方法を用いることにより、血清中の抗マイコバクテリア抗体の存在を立証することもできる可能性がある。

30

また、動物に本発明の核酸フラグメントを投与するか、又はサンプルを本発明の核酸フラグメントもしくはその相補的な核酸フラグメントとインキュベートし、インキュベーションで生じるハイブリダイズした核酸の存在を検出する（当該分野で周知のハイブリダイゼーションアッセイを用いることによる）ことからなる、動物（ヒトを含む）又はサンプル中のマイコバクテリア核酸の存在の決定方法が、本発明に含まれる。このようなTBの診断方法は、上記ヌクレオチド配列の少なくとも一部からなる組成物の使用、及び試験される動物又はヒト由来のサンプルでのヌクレオチド配列（PCR技術を用いることにより、核酸フラグメント（又はその相補フラグメント）とハイブリダイズする）の存在の検出を含む。

40

開示されるある種の抗原はマイコバクテリア・ボビスBCGに存在しないが、ビルレントマイコバクテリアに存在するという事実は、それらが重要な薬剤の標的となることを示している。抗原は、マイコバクテリア感染を容易にするレセプター分子又は毒素を構成していてもよく、そのような機能が阻害される際にマイコバクテリアの感染性が減じられる。本発明の抗原のうちで特に適切な薬剤の標的を決定するために、本発明のポリペプチドの少なくとも1つをエンコードする遺伝子と必要な制御配列が、マイコバクテリア（例えばBCG）の非ビルレント株に導入され、毒性に決定的なポリペプチドを決定することができる。いったん特定のタンパク質が毒性に決定的であるノ寄与しているとして同定されると、重要な遺伝子の発現を阻害するか又は重要な遺伝子産物を攻撃するように、抗マイコバ

50

クテリア剤を合理的にデザインすることができる。例えば、抗体又はそのフラグメント（例えばFab及び（Fab'）2フラグメント）は、当該分野で公知の方法で重要なポリペプチドに対して調製し、その後、予防又は治療剤として用いることができる。また、小さい分子は、例えば遺伝子の内在性プロモーターを含む組換え発現系を用いて、重要な遺伝子産物の発現を選択的に阻害する能力又は標的の作用を直接阻害する能力についてスクリーニングすることができる。次いで、これらの小分子は、マイコバクテリアの毒性を阻害する治療剤又は予防剤として用いられる。

また、ビルレントマイコバクテリアを非毒性にする抗マイコバクテリア剤は、発現制御配列に実施可能に連結させ、ビルレントマイコバクテリアを形質転換するのに用いることができる。このような抗マイコバクテリア剤は、マイコバクテリアでの剤の転写又は翻訳により特定のマイコバクテリアの複製を阻害する。このような「新規の非ビルレント」マイコバクテリアは、免疫性が例えばBCGに比較してビルレントマイコバクテリアに非常に似ているので、ワクチン目的用に修飾した上記BCGの優れた代替物となっている。

最終的に、イムノアッセイで本発明のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体、又は特異的な抗体結合フラグメントも、本発明の一部である。このようなポリクローナル抗体の産生は、適切な動物がポリペプチドで免疫化されること、その後これらの抗体がイムノアフィニティクロマトグラフィーにより適切に単離されることを要する。本発明は、免疫化及び陽性ハイブリドーマのスクリーニングの両方に十分な量の抗原を提供するので、モノクローナルの産生は、当該分野で周知の方法で行うことができる。

図面の説明

図1：長期記憶免疫マウスは、結核菌感染に対して非常に有効に防護される。マウスを結核菌に付し、異なる時間のポイントで脾臓を単離した。脾臓リンパ球をST-CFと生体外で刺激し、IFN- γ の放出を研究した（パネルA）。2群のマウスの脾臓中のCFU含量は、パネルBに示す。免疫記憶マウスは1週間以内に感染を制御し、ST-CF中の抗原に応じて大量のIFN- γ を産生する。

図2：免疫防護に関与するT細胞は、6～12及び17～38kDaの分子に関して優勢である。脾臓のT細胞は結核菌に付してから4日後に単離し、ST-CFの狭い分子質量画分で生体外で刺激した。IFN- γ の放出を研究した。

図3：cfp7のヌクレオチド配列（SEQ ID NO:1）。CFP7の推定されるアミノ酸配列（SEQ ID NO:2）は、ヌクレオチド配列の下に従来の一文字のコードで示す。下線を付したイタリックで示す仮想のリボソーム結合部位は、-10～-35領域と推定される。太線で示したヌクレオチドは、CFP7をエンコードするヌクレオチドである。

図4：cfp9のヌクレオチド配列（SEQ ID NO:3）。CFP9の推定されるアミノ酸配列（SEQ ID NO:4）は、ヌクレオチド配列の下に従来の一文字のコードで示す。下線を付したイタリックで示す仮想のリボソーム結合部位シャインダルガノ配列は、-10～-35領域と推定される。太線で示したヌクレオチドは、CFP9をエンコードするヌクレオチドである。ラムダ26ファージから得られるヌクレオチド配列は、二重線を付している。

図5：mpt51のヌクレオチド配列。MPT51の推定されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列の下に一文字のコードで示す。シグナルは、イタリックで示す。リボソーム結合部位の可能性のある箇所に、下線を付している。ヌクレオチドの違い及びアミノ酸の違いをMPB51のヌクレオチド配列と比較して[Oharaら、1995]、780の位置に下線を付した。イタリックで示したヌクレオチドは、結核菌H37Rvに存在しない。

図6：2DE系での精製抗原の位置を決定し、参照ゲルにマッピングした。新たに精製した抗原を丸で囲み、周知のタンパク質の位置も示している。

実施例1：免疫防護に関与する単一培養液抗原の同定

有効に防護されているマウスの群は、8～12週齢のメスのC57Bl/6jマウスに 5×10^4 個の結核菌を静脈で感染させて得た。感染から30日後に、マウスはイソニアジドで処理した抗生物質に60日間付し、次いで、休眠長期記憶免疫（resting long-term memory immunity）を確立するために200～240日間放置した。このような免疫記憶マウスは、二次感染に対し

て非常に効率良く防護される(図1)。このモデルで長期に続く免疫は、感染部位に補充された高度に反応性のCD4細胞の増殖で媒介され、ST-CFに応じて大量のIFN- γ の産生を誘導する(図1)[Andersenら、1995]。

我々は、防護T細胞によって認識される単一抗原の同定にこのモデルを用いた。免疫記憶マウスを 1×10^6 個の結核菌に静脈で再感染させ、再感染から4~6日、つまり、この増殖がST-CFに高度に反応的な時間で、脾臓のリンパ球を回収した。これらのT細胞で認識される抗原は、多重溶出(multi-elution)技術によりマッピングした[Andersen及びHeron、1993]。この技術は、SDS-PAGEで分離した複雑なタンパク質混合物を、生理緩衝液中で狭い画分に分ける。これらの画分は生体外で脾臓リンパ球を刺激するのに用い、IFN- γ の放出をモニターした(図2)。長期記憶免疫マウスは、TB感染前はこれらの画分を認識しなかつたが、免疫防護の回復のあいだに得られる脾臓リンパ球は、ある範囲の培養液抗原を認識し、IFN- γ の産生ピークが6~12及び17~30kDaの見かけ分子量のタンパク質に応じて見出された(図2)。したがって、これらの領域内の培養液抗原は、免疫防護応答の第一相のあいだにIFN- γ の放出を誘発する記憶エフェクターT-細胞で認識される主要な標的であることが結論づけられた。

実施例2：低質量培養液抗原を発現する遺伝子のクローニング

実施例1で、低分子質量画分中の抗原は、免疫記憶マウスから単離した細胞で強く認識されることが立証された。それ故、これらの抗原に対するモノクローナル抗体(mAb)は、RIBIアジュバントで低質量画分と免疫化し(第一及び第二免疫化)、次いで水酸化アルミニウム中の画分で2回注射して得られた。反応性セルラインの融合及びクローニングは、標準的な方法にしたがって行った[Kohler及びMilstein、1975]。SDS-PAGEでの抗原の移動から分子量を見積もると、この方法により、2つのmAb：9kDaの培養液抗原(CFP9)に対するST-3及び7kDaの抗原(CFP7)に対するPV-2が得られた。

Mab類に結合する抗原を同定するために、以下の実験を行った。

モノクローナル抗体ST-3及びPV-2に結合する遺伝子産物を発現するファージについて、R. Young[Young,R.A.ら、1985]により構築され、世界保健機構IMMTUBプログラム(WHO.0032.wibr)を通して得られる組換えgt11結核菌DNAライブラリーをスクリーニングした。約 1×10^5 pfuの遺伝子ライブラリー(約25%の組換えファージ含有)は、柔らかい寒天で大腸菌Y1090(DlacU169、proA⁺、Dlon、araD139、supF、trpC22::tn10[pMC9]ATCC#37197)にプレートし、42℃で2.5時間培養した。

プレートは、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシドで飽和したニトロセルロース膜で積層(overlay)し、37℃で2.5時間培養を続けた。ニトロセルロースを除き、最終濃度が0.05%になるように加えたツイン20を有するPBS中のモノクローナル抗体サンプルとインキュベートした。結合モノクローナル抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ-結合ウサギ抗マウス免疫グロブリン(P260、Dako、Glostrup、DK)及び5,5',3,3'-テトラメチルベンジジン及びH₂O₂を含む染色反応で可視化した。

陽性プラークを再クローンし、プラーク1つから得たファージを大腸菌Y1089(DlacU169、proA⁺、Dlon、araD139、strA、hfl150[chr::tn10][pMC9]ATCC nr.37196)の溶原化に用いた。得られた溶原株は、DNA抽出用ファージ粒子の増殖に用いた。これらの溶原性大腸菌株は、以下のように命名した：

ブダベスト条約の規定にしたがって、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM)のコレクションに1993年6月28日に受託番号DSM 8377で寄託されたAA226(ST-3反応性ポリペプチドCFP9を発現する)、及び

ブダベスト条約の規定にしたがって、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM)のコレクションに1993年6月28日に受託番号DSM8379で寄託されたAA242(PV-2反応性ポリペプチドCFP7を発現する)。

これらの2つの溶原性大腸菌株はWO 95/01441号に開示され、それによりマイコバクテリアポリペプチド産物が発現される。しかし、これらのポリペプチドのアミノ酸配列又はそれらの遺伝子起源に関する情報がなかったために、AA226とAA242の直接的な発現産物が公衆に利用可能となっているにすぎない。

st-3結合タンパク質は、 α -ガラクトシダーゼに融合するタンパク質として発現するが、pv-2結合タンパク質は非融合型で発現されるようである。

PV-2及びST-3結合タンパク質をエンコードするヌクレオチド配列のシーケンシング

pv-2結合タンパク質をエンコードする遺伝子のヌクレオチド配列を得るために、AA242の約3kbの結核菌由来のEcoRI-EcoRIフラグメントを、pBluescript SK+ [Stratagene] のEcoRI部位にサブクローンし、大腸菌XL-1Blue [Stratagene] の形質転換に用いた。

同様に、st-3結合タンパク質をエンコードする遺伝子のヌクレオチド配列を得るために、AA226の約5kbの結核菌由来のEcoRI-EcoRIフラグメントを、pBluescript SK+ [Stratagene] のEcoRI部位にサブクローンし、大腸菌XL-1Blue [Stratagene] の形質転換に用いた。

両遺伝子の完全なDNA配列は、シーケナーゼDNAシーケンシングキット1.0バージョン [United States Biochemical Corp., Cleveland, OH] を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー (reader) (モデル373A; Applied Biosystems) と組合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンシングにより得た。DNA配列は、それぞれSEQ ID NO:1 (CFP7) 及びSEQ ID NO:3 (CFP9) ならびに図3及び4に示す。DNAの両鎖をシークエンスした。

CFP7

96アミノ酸残基の配列をエンコードするオープンリーディングフレーム (ORF) は、91~3位置のATG開始コドンから伸長する379~381位置のTAG停止コドンまで同定した。推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2 (及び従来の一文字アミノ酸コードを用いる図3) に示す。

CFP7は、非融合型として大腸菌で発現されると考えられる。78~84位置のヌクレオチド配列はシャインダルガノ配列であると考えられ、47~50及び14~19位置の配列は、それぞれ-10及び-35領域であると推測される。

CFP9

ST-3で認識されるタンパク質はAA226ラムダファージから発現する際に、 α -ガラクトシダーゼ融合タンパク質として産生した。この融合タンパク質は、約116~117kDaの大きさ (α -ガラクトシダーゼ116.25kDaに対するMw) を有し、CFP9遺伝子のごく一部は、ラムダクローン (AA226) に含まれたことを示唆している。

ラムダファージAA226からの挿入で得られるヌクレオチド配列90bpに基づいて、結核菌ゲノムのヌクレオチド配列とのホモロジー検索をサンガーデータベース (Sanger Mycobacterium tuberculosis database) ; <http://www.sanger.ac.uk/pathogens/TB-blast-server.html> ; Williams, 1996で行った。クローンされた配列との100%の同一性は、MTCY48コスミドで見出された。109アミノ酸残基の配列をエンコードするオープンリーディングフレーム (ORF) は、141~143位置のGTG開始コドンから伸長する465~467位置のTAG停止コドンまで同定した。推定されるアミノ酸配列は、従来の一文字コードを用いて図4に示す。123~130位置のヌクレオチド配列はシャインダルガノ配列であると推測され、73~78及び4~9位置の配列は、それぞれ-10及び-35領域であると推測される (図4)。AA229の配列の5'末端と重複するORFは、二重線で図4に示す。

発現ベクターでのCFP7及びCFP9のサブクローニング

CFP7及びCFP9をエンコードする2つのORFは、それぞれpMST24 [Theisenら, 1995] にPCRクローンして発現ベクターpRVN01、又はpQE-32 [QIAGEN] にクローンして発現ベクターpRVN02とした。

PCR増幅は、マスターミックス (各オリゴヌクレオチドプライマー0.5 μ M、BSA [Stratagene] 0.25 μ M、低塩緩衝液 (pH8.8、Tris-HCl 20mM、KCl 10mM、(NH₄)₂SO₄ 10mM、MgSO₄ 2mM及びTriton X-100 0.1%) [Stratagene]、各デオキシヌクレオシド三リン酸0.25mM及びTaq Plus Long DNAポリメラーゼ0.5U [Stratagene]) とプラスミドDNA 10ngを混合して温度反応器 (Rapid cycler, Idaho Technology, Idaho) で行った。最終容量は、10 μ lとした (示した全濃度は、最終容量での濃度である)。予備変性は、30秒94で行った。後の30サイクルは、30秒94での変性、30秒55でのアニーリング、及び1分72での伸長で行った。

オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAシンセサイザー [Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, PCR様式] で自動合成し、脱遮断 (deblock) し、エタノール沈殿で精製した。

cfp7オリゴヌクレオチド (表1) は、CFP7配列のヌクレオチド配列 (図3) をベースにして合成した。オリゴヌクレオチドは、直接的なサブクロニング用に5'末端のSmaI制限酵素部位及び3'末端のBamHI制限酵素部位を含むように設計した。

cfp9オリゴヌクレオチド (表1) は、部分的にAA229クローンの配列のヌクレオチド配列をベースにし、部分的にサンガーデータベースのコスミドMTCY48に見出されたのと同じ配列 (図4) から合成した。オリゴヌクレオチドは、直接的なサブクロニング用に5'末端のSmaI制限酵素部位及び3'末端のHindIII制限酵素部位を含むように設計した。

10

CFP7

コード領域のみが発現されるように、SmaI部位が、PCRを用いてcfp7遺伝子をエンコードする291bpのORFの最初のコドンの5'に隣接して設計され、BamHI部位が3'末端の停止コドンの直後に挿入された。291bpのPCRフラグメントはSmaIとBamHIで切断し、アガロースゲルから精製し、pMST24発現ベクターのSmaI-BamHI部位にサブクロンした。融合遺伝子を含むベクターDNAは、大腸菌XL1-Blueの形質転換に用いた (pRVN01)。

CFP9

コード領域のみが発現されるように、SmaI部位が、PCRを用いてcfp9遺伝子をエンコードする327bpのORFの最初のコドンの5'に隣接して設計され、HindIII部位が3'末端の停止コドンの直後に挿入された。327bpのPCRフラグメントはSmaIとHindIIIで切断し、アガロースゲルから精製し、pQE-32発現ベクター [QUIAGEN] のSmaI-HindIII部位にサブクロンした。融合遺伝子を含むベクターDNAは、大腸菌XL1-Blueの形質転換に用いた (pRVN02)。

20

組換えCFP7とCFP9の精製

ORFは、(His)₆-tagのN-末端に融合させた [EP-A-0 282 242号参照]。組換え抗原は、以下のようにして調製した。要約すれば、pRVN01又はpRVN02プラスミドのいずれかを有する大腸菌のコロニー1つを、アンピシリン100 µg/ml及びテトラサイクリン12.5 µg/mlを含むルリア-ベルタニ培地に接種し、OD_{600nm}が0.5になるまで37℃で成長させた。次いで、最終濃度が2mMになるようにIPTG (イソプロピル β-D-チオガラクトシド) を加え (発現が、強力なIPTG誘発性P_{tac}又はT5プロモーターのいずれかで調節される)、さらに2時間成長させた。細胞は、8分4秒で4,200xgの遠心分離で回収した。ペレット化した細菌は、-20℃で一晩保存した。ペレットは、BC 40/100緩衝液 (Tris-HCl pH7.9 20mM、20%グリセロール、KCl 100mM、イミダゾール40mM) に再懸濁し、4℃での超音波処理 (30秒間隔、30秒間5回)、その後の4℃で30分の12,000xgの遠心分離で細胞を破壊し、上清 (粗抽出物) を組換え抗原の精製に用いた。

30

2つのヒスチジン融合タンパク質 (His-rCFP7及びHis-rCFP9) は、100ml容量のNi²⁺-NTAカラム [QUIAGEN] でのアフィニティクロマトグラフィーで粗抽出物から精製した。His-rCFP7及びHis-rCFP9は、Ni²⁺に結合する。BC 40/100緩衝液でカラムを大量に洗浄した後、イミダゾール100mM、Tris pH7.9 20mM、20%グリセロール及びKCl 1Mを含むBC 1000/100緩衝液を用いて融合タンパク質を溶出した。次いで、精製した生成物を、Tris pH8.0 10mMに大量に透析した。次いで、His-rCFP7及びHis-rCFP9は、0 ~ 1MのNaClの直鎖状勾配でTris pH8.0 10mMのアニオン交換カラム (Mono Q、Pharmacia、スウェーデン) によりタンパク質高速液体クロマトグラフィー (FPLC) で不純物から分離した。画分のアリコートは、10 ~ 20%勾配のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。精製したHis-rCFP7又はHis-rCFP9のいずれかを含む画分をプールした。

40

表1.オリゴヌクレオチド^a *cfp7*と *cfp9*の配列

方向及び オリゴヌクレオチド センス	配列 (5' → 3')	位置 ^b (ヌクレオチド)
pvr3	GCAACACCCGGGATGTCGCAATCATG (SEQ ID NO: 43)	91-105 (SEQ ID NO: 1)
str2	GTAACACCCGGGGTGGCCGCGACCCG (SEQ ID NO: 44)	141-155 (SEQ ID NO: 3)
アンチセンス		
pvr4	CTACTAAGCTTGGATCCCTAGCCGCCCATTTGGCGG (SEQ ID NO: 45)	381-362 (SEQ ID NO: 1)
str2	CTACTAAGCTTCCATGGTCAGGTCTTTTCGATGCTTAC (SEQ ID NO: 46)	467 - 447 (SEQ ID NO: 3)

10

^a *cfp7*オリゴヌクレオチドは、図3に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:1)に基
づく。*cfp9* オリゴヌクレオチドは、図4に示すヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:3)
に基づく。

下線を付したヌクレオチドは、*cfp7*及び *cfp9*のヌクレオチド配列に含まれな
い。

20

^b 示している位置は、プライマーの下線を付していない部分であって、図3及び

図4それぞれに示すヌクレオチド配列に対応する。

実施例2 A : BCG株で発現されない抗原の同定

TBの治療を制御するために、弱毒化細菌カルメット-ゲラン (BCG) を生の弱毒化ワクチン
として用いた。BCGは、ビルレントマイコバクテリア・ボビスの弱毒化誘導体である。パ
スツール研究所 (フランス、パリ) 由来のオリジナルのBCGは、1908 ~ 1921年に液体培地
で231回継代してつくられたものであり、動物に毒性を復帰しないことが示されている。B
CGでの弱毒化変異は、容易に復帰しない安定な欠失及び / 又は多重変異であることを示し
ている。BCG及び結核菌及びマイコバクテリア・ボビスの生理的な差異が認められてい
るが、オリジナルのBCG株の一連の継代のあいだに生じる弱毒化変異は、最近まで知られて
いなかった。記載されている最初の変異は、幾つかのBCG株でMPB64をエンコードする遺伝
子 [Liら、1993、OettingerとAndersen、1994] 及び試験される全てのBCG株でESAT-6をエン
コードする遺伝子 [Harboeら、1996] を欠落しており、その後、BCGでの3つの大きな
欠失が同定されている [Mahairasら、1996]。RD1と命名される領域は、ESAT-6をエン
コードする遺伝子及びMPT64をエンコードする他の遺伝子 (RD2) を含む。抗原は、ともに診
断剤の可能性があることを示しており、ESAT-6は、ワクチンの代替物としての特性を有す
ることが分かっている [PCT/DK/00273号及びPCT/DK/00270号参照]。結核菌に特異的な新
規の診断用抗原ならびにTBに対する新規のワクチン用抗原を見出すために、結核菌H37Rv
のRD1領域 (17.499bp) を、オープンリーディングフレーム (ORF) について分析した。Bo
rodovskyとMcIninch (1993) により記載されているアルゴリズムを用いて、最小で96bpの
長さのORFが推測された。推測された全体で27個のORFにおいて、これらの20個は、全ての
公知のBCG株から欠失されているので、診断剤としての可能性及び / 又はワクチンとして
の可能性がある。推測されるORFは、アルゴリズムの能力についての正の対照として、あ
らかじめ記載 [Sorensenら、1995] されているESAT-6 (RD1-ORF7) 及びCFP10 (RD1-ORF6
) を含む。ここでは、推測される7つの抗原のTB診断に対する可能性ならびにTBに対する
新規のワクチン代替物としての可能性を記載する。

30

40

診断剤及びワクチンとしての可能性がある17,499kbのRD1領域由来のオープンリーディ
ングフレーム (ORF) 7つを同定し、クローンした。

ORFのrd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bの

50

同定

結核菌H37Rv由来のrd1-orf2のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:71に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:72に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf3のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:87に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:88に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf4のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:89に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:90に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf5のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:91に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:92に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf8のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:67に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:68に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf9aのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:93に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:94に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf9bのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:69に記載する。RD1-ORF2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:70に記載する。

DNA配列rd1-orf2 (SEQ ID NO:71) は、889～891位置のATGコドンで開始し、2662～2664の位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TAA) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:72) は、分子量64,525に相当する591残基を含む。

DNA配列rd1-orf3 (SEQ ID NO:87) は、2807～2809位置のATGコドンで開始し、3101～3103位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TAA) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:88) は、分子量9,799に相当する98残基を含む。

DNA配列rd1-orf4 (SEQ ID NO:89) は、4014～4012位置のGTGコドンで開始し、3597～3595位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TAG) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:90) は、分子量14,210に相当する139残基を含む。

DNA配列rd1-orf5 (SEQ ID NO:91) は、3128～3130位置のGTGコドンで開始し、4241～4243位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TGA) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:92) は、分子量37,647に相当する371残基を含む。

DNA配列rd1-orf8 (SEQ ID NO:67) は、5502～5500位置のGTGコドンで開始し、5084～5082位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TAG) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:68) は、分子量11,737に相当する139残基を含む。

DNA配列rd1-orf9a (SEQ ID NO:93) は、6146～6148位置のGTGコドンで開始し、7070～7072位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TAA) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:94) は、分子量33,453に相当する308残基を含む。

DNA配列rd1-orf9b (SEQ ID NO:69) は、5072～5074位置のATGコドンで開始し、7070～7072位置 (位置の数は、RD1での位置を参照) の終始コドン (TAA) で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:70) は、分子量70,650に相当する666残基を含む。

ORFのrd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bのクローニング

ORFのrd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bは、発現ベクターpMST24 [Theisenら、1995] (rd1-orf3) 又はpQE32 [QIAGEN] (rd1-orf2、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9b) にPCRクローンした。オリゴヌクレオチドの製造とrd1-orfエンコード遺伝子のPCR増幅は、実施例2に記載のように行った。結核菌H37Rv由来の染色体DNAは、PCR反応で鋳型として用いた。オリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドは、RD1領域のヌクレオチド配列（受託番号U34848）に基づいて合成した。オリゴヌクレオチドプライマーは、5'末端及び3'末端に制限酵素部位を含むように設計し、それによって後のサブクローニングを可能にした。プライマーを表2に示す。

rd1-orf2。BamHI部位はrd1-orf2の最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf2はpQE32にサブクローンし、pT096とした。

rd1-orf3。SmaI部位はrd1-orf3の最初のコドンの5'に隣接して設計し、NcoI部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf3はpMST24にサブクローンし、pT087とした。

rd1-orf4。BamHI部位はrd1-orf4の最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf4はpQE32にサブクローンし、pT089とした。

rd1-orf5。BamHI部位はrd1-orf5の最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf5はpQE32にサブクローンし、pT088とした。

rd1-orf8。BamHI部位はrd1-orf8の最初のコドンの5'に隣接して設計し、NcoI部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf8はpMST24にサブクローンし、pT098とした。

rd1-orf9a。BamHI部位はrd1-orf9aの最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf9aはpQE32にサブクローンし、pT091とした。

rd1-orf9b。ScaI部位はrd1-orf9bの最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII部位は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf9bはpQE32にサブクローンし、pT090とした。

PCRフラグメントは適切な制限酵素で消化し、アガロースゲルから精製し、pMST24又はpQE32のいずれかにクローンした。7つの構築物を用いて、大腸菌XL1-Blueを形質転換した。融合遺伝子のエンドポイントは、ジデオキシ鎖末端法で決定した。DNAの両鎖をシーケンシングした。

組換えRD1-ORF2、RD1-ORF3、RD1-ORF4、RD1-ORF5、RD1-ORF8、RD1-ORF9a及びRD1-ORF9bの精製

rRD1-ORFは、(His)₆-tagのN-末端に融合させた。組換え抗原は、接種用にpT087、pT088、pT089、pT090、pT091、pT096又はpT098のいずれかを有する大腸菌のコロニー1つを用いて実施例2に記載（例外として、pT090は37℃でなく30℃で発現させた）のようにして調製した。Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーによる組換え抗原の精製も、実施例2に記載のようにして行った。精製したHis-rRD1-ORF2、His-rRD1-ORF3、His-rRD1-ORF4、His-rRD1-ORF5、His-rRD1-ORF8、His-rRD1-ORF9a又はHis-rRD1-ORF9bを含む画分をプールした。His-rRD1-ORFは、10mM Tris/HCl (pH8.5)、ユレア3Mに大量に透析し、次いで、タンパク質高速液体クロマトグラフィー（FPLC）[Pharmacia,Uppsala,スウェーデン]を用いてアニオン交換カラム（Mono Q）でさらに精製工程を行った。精製は、10mM Tris/HCl (pH8.5)、ユレア3M中で行い、0～1MのNaClの直鎖状勾配でタンパク質を溶出した。His-rRD1-ORFを含有する画分をプールし、次いで、使用前に25mM Hepes (pH8.0)に大量に透析した。

10

20

30

40

表2. *rd1-orf* オリゴヌクレオチド^aの配列

方向及び オリゴヌクレオチド	配列 (5'→ 3')	位置 (nt)
センス		
RD1-ORF2f	<u>CTGGGGATCCGCATGACTGCTGAACCG</u>	886 - 903
RD1-ORF3f	<u>CTTCCCGGATGGAAAAATGTCAC</u>	2807 - 2822
RD1-ORF4f	<u>GTAGGATCCTAGGAGACATCAGCGGC</u>	4028 - 4045
RD1-ORF5f	<u>CTGGGGATCCGCGTGATCACCATGCTGTGG</u>	3028 - 3045
RD1-ORF8f	<u>CTCGGATCCTGTGGGTGCAGGTCCGGCGATGGGC</u>	5502 - 5479
RD1-ORF9af	<u>GTGATGTGAGCTCAGGTGAAGAAGGTGAAG</u>	6144 - 6160
RD1-ORF9bf	<u>GTGATGTGAGCTCCTATGGCGGCCGACTACGAC</u>	5072 - 5089
アンチセンス		
RD1-ORF2r	<u>TGCAAGCTTTTAACCGCGCTTGGGGGTGC</u>	2654 - 2644
RD1-ORF3r	<u>GATGCCATGGTTAGGCGAAGACGCCGGC</u>	3103 - 3086
RD1-ORF4r	<u>CGATCTAAGCTTTGGCAATGGAGTCTA</u>	3582 - 3597
RD1-ORF5r	<u>TGCAAGCTTTTACCAAGTCGTCTCTTCGTC</u>	4243 - 4223
RD1-ORF8r	<u>CTCCCATGGCTACGACAAGCTCTCCGGCCGC</u>	5083 - 5105
RD1-ORF9a/br	<u>CGATCTAAGCTTTCAACGACGTCCAGCC</u>	7073 - 7056

^a オリゴヌクレオチドは、受託番号 U34484 のヌクレオチド配列から構築した [Mahairas ら、1996]。下線を付したヌクレオチド(nt)は、RD1-ORF のヌクレオチド配列に含まれない。位置は、受託番号 U34484 のヌクレオチド配列に対応する。

結核菌H37Rv由来のヌクレオチド配列rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8 rd1-orf9a及びrd1-orf9bは、それぞれSEQ ID NO:71、87、89、91、67、93及び69に記載する。推定されるrd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8 rd1-orf9a及びrd1-orf9bのアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO:72、88、90、92、68、94及び70に記載する。

実施例 3 : ST-CF由来の17~30kDaの抗原を発現する遺伝子のクローニング

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25及びCFP28の単離

ST-CFは、80%飽和硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後、ユレア8Mで洗浄した。CHAPSとグリセロールは、それぞれ最終濃度が0.5% (w/v) 及び5% (v/v) になるまで加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞 (Rotofor isoelectrical Cell) [Biorad] に塗布した。ロトフォル細胞は、0.5% (w/v) CHAPS、5% (v/v) グリセロール、3% (v/v) バイオリット (Biolyt) 3/5及び1% (v/v) バイオリット4/6 [Biorad] を含むユレア8M緩衝液で平衡化した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。画分は、銀染色した10~20%のSDS-PAGEで分析した。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、1~3mlの最終容量になるように3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ (Centriprep) 濃縮器 [Amicon] でPBSを用いて3回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のSDSを加え、タンパク質溶液を5分煮沸した後、電気勾配下の16%ポリアクリルアミドのマトリクスでプレップ細胞 (Prep Cell) [Biorad] でさらに分離した。17~30kDaの分子質量を有する純粋なタンパク質を含有する画分を回収した。

CFP29の単離

CFP29と反応する抗-CFP29は、2週間の間隔でRIBIアジュバント (第一及び第二回目の免疫化) 又は水酸化アルミニウム (第三回目の免疫化及び追加免疫化 (boosting)) 中の破砕したゲル片で、BALB/cマウスを免疫化して生じた。2~5 µgのCFP29を含むSDS-PAGEのゲル片は、免疫化にそれぞれ用いた。マウスは、脾臓を除く前に3日間、抗原で追加免疫化した。CFP29に対する抗体を産生するモノクローナルセルラインの発生は、本質的にKohlerとMilstein (1975) により記載されているようにして得られた。成長しているクローン由来の上清のスクリーニングは、SDS-PAGEで分離したST-CFを含むニトロセルロースの

ストリップをイムノブロットして行った。各ストリップは、ST-CFを約50 µg含んだ。抗CFP29の抗体のクラスは、製造者の指示にしたがったマウスモノクローナル抗体イソタイピングキットRPN29 [Amersham] によりIgMとして同定した。

CFP29は、以下の方法で精製した：ST-CFは限外ろ過で10倍に濃縮し、45～55%の飽和範囲で硫酸アンモニウム沈殿を行った。ペレットは、50mMリン酸ナトリウム、1.5M硫酸アンモニウム (pH8.5) に再溶解し、Affi-Tゲルカラム [Kem-En-Tec] でチオフィル (thiophilic) 吸着クロマトグラフィー [Porathら、1985] に付した。タンパク質は1.5M～0Mの硫酸アンモニウムの直鎖状勾配で溶出し、0.44～0.31Mの範囲の硫酸アンモニウムで回収した画分を、mAb抗-CFP29を用いるウェスタンブロット実験でCFP29含有画分として同定した。これらの画分をプールし、FPLCシステム [Pharmacia] に接続したMono Q HR 5/5カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは、10mM Tris-HCl (pH8.5) で平衡化し、0～500mM NaClの線状勾配で溶出を行った。400～500mMの塩化ナトリウムから、かなり純粋なCFP29が溶出された。最終精製工程として、CFP29を含むMono Q画分を12.5%のSDS-PAGEゲルにローディングし、多重溶出技術 [Andersen及びHeron、1993] により純粋なCFP29を得た。

N-末端のシーケンシング及びアミノ酸解析

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25及びCFP28は、10kDaのカットオフを有するセントリコン (Centricon) 濃縮機 [Amicon] で水と洗浄し、次いで、プロスピ (ProSpin) 濃縮機 [Applied Biosystems] にアプライしてタンパク質をPVDF膜に回収した。膜は、プロサイス (Procise) シークエンサー [Applied Biosystems] でシークエンスする前に、メタノール20%で5回洗浄した。

CFP29含有画分は、トリシンSDS-PAGE後にPVDF膜にブロットした [Plougら、1989]。関連するバンドを切りだし、プロサイスシークエンサー [Applied Biosystems] でアミノ酸解析 [Barkholt及びJensen、1989] 及びN-末端配列解析に付した。

以下のN-末端配列が得られた：

CFP17について:	A/S E L D A P A Q A G T E X A V	(SEQ ID NO: 17)
CFP20について:	A Q I T L R G N A I N T V G E	(SEQ ID NO: 18)
CFP21について:	D F X S D I A V V F A R G T H	(SEQ ID NO: 19)
CFP22について:	T N S P L A T A T A T L H T N	(SEQ ID NO: 20)
CFP25について:	A X P D A E V V F A R G R F E	(SEQ ID NO: 21)
CFP28について:	X I V Q K S L E L I V / T V / F T A D / Q E	(SEQ ID NO: 22)
CFP29について:	M N N L Y R D L A P V T E A A W A E I	(SEQ ID NO: 23)

「X」は、用いたシークエンス法により決定できないアミノ酸を示すが、2つのアミノ酸間の「/」は、2つのアミノ酸のどちらが実際存在するものか、シークエンス法で決定できないことを示す。

CFP29をエンコードする遺伝子のクローニング

CFP29のN-末端配列は、シークエンス解析ソフトウェアパッケージ [Genetics Computer Group] のTFASTAプログラムを用いてEMBLデータベースでのホモロジー検索に用いた。検索により、CFP29の19個のN-末端アミノ酸と74%の同一性を有するブレビバクテリウム・リネンス (Brevibacterium linens) 由来のタンパク質、リノシン (Linocin) M18が同定された。

CFP29のN-末端配列とブレビバクテリウム・リネンス由来のリノシンM18タンパク質とのこの同一性に基づいて、CFP29をエンコードする結核菌遺伝子のPCRクローニング用に一連の変性プライマーを構築した。PCR反応物は、10 µlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250 µM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー5pmol及びTaq+DNAポリメラーゼ0.5ユニット [Stratagene] を加えた1x低塩Taq+緩衝液 [Stratagene] に結核菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology] を用いて15秒間94、15秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。

約300bpのフラグメントが、配列

1: 5'-CCCGGCTCGAGAACCTSTACCGCGACCTSGCSCC (SEQ ID NO: 24)

2: 5'-GGGCCGGATCCGASGCSGCGTCCTTSACSGGYTGCCA (SEQ ID NO: 25)

-ここで S = G/C 及び Y = T/C

を有するプライマーを用いて得られた：

フラグメントを 1 % アガロースゲルから切りだし、スピン-Xスピン (Spin-X spinn) カラム [Costar] で精製し、pBluescript SK II+T-ベクター [Stratagene] にクローンし、最後にシーケナーゼキット [United States Biochemical] でシーケンスした。

この配列の最初の150bpは、サンガーの結核菌データベース：

(http://www.sanger.ac.uk/projects/M-tuberculosis/blast_server) のブラスト (Blast) プログラムを用いてホモロジー検索に用いた。

このプログラムにより、データベースのコスミドcy444上の結核菌配列が、CFP29タンパク質の配列150bpにほぼ100%同一であることが同定された。この配列は、5'末端が、精製したCFP29タンパク質のN-末端シーケンスされた19アミノ酸に100%同一な配列に翻訳するオープンリーディングフレーム795bp内に含まれている。

最後に、795bpのオープンリーディングフレームは、プライマー：

3: 5'-GGAAGCCCCATATGAACAATCTCTACCG (SEQ ID NO: 26)

4: 5'-CGCGCTCAGCCCTTAGTGACTGAGCGCGACCG (SEQ ID NO: 27)

を用いて上記と同じPCR条件下でPCRクローンした。

得られたDNAフラグメントは、上記のようにしてアガロースゲルから精製し、以下のプライマー：

5: 5'-GGACGTTCAAGCGACACATCGCCG-3' (SEQ ID NO: 115)

6: 5'-CAGCACGAACGCGCCGTCGATGGC-3' (SEQ ID NO: 116)

に加えてプライマー 3 及び 4 を用いてシーケンスした。

3つの独立したクローンをシーケンスした。3つのクローンは全て、コスミドcy444上の配列と100%一致した。

全ての他のDNA操作は、Maniatisら (1989) にしたがって行った。

Taqポリメラーゼ以外の全ての酵素は、New England Biolabsのものであった。

サンガーデータベースでのホモロジー検索

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25及びCFP28について、各タンパク質のN-末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌のデータベース：

<http://www.sanger.ac.uk/pathogens/TB-blast-server.html>.

のブラストプログラムを用いてホモロジー検索に用いた。

CFP29については、DNA配列の最初の150bpを検索に用いた。さらに、EMBLデータベースで、CFP29とホモロジーを有するタンパク質を検索した。

これにより、以下の情報が得られた。

CFP17

CFP17で決定された14アミノ酸について、MTCY1A11.16c.と93%の同一性が見出された。2つの配列間の違いは、最初のアミノ酸にある。つまり、決定されたN-末端配列では、それはA又はSであり、MTCY1A11ではSである。N-末端シーケンスからは、13番目のアミノ酸を決定することはできなかった。

オープンリーディングフレーム内で、翻訳されたタンパク質は162アミノ酸の長さである。培養液から精製したタンパク質のN-末端は31番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子質量13833Da及び理論pI 4.4に相当する132アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。SDS-PAGEで認められた質量は、17kDaである。

CFP20

CFP20の決定された15アミノ酸に100%同一な配列が、翻訳されたコスミドcscy09F9に見出された。停止コドンは、1の位置のアミノ酸Mから166番目のアミノ酸に見出された。これ

10

20

30

40

50

により、理論分子質量16897kDa及びpI 4.2に相当する165アミノ酸の長さの生じることが推測される。SDS-PAGEで認められた分子量は、20kDaである。

TFASTAアルゴリズム [Pearson及びLipman、1988] を用いたGenEMBLデータベースの検索で、164アミノ酸長と推測される翻訳タンパク質にホモロジーを有する幾つかのタンパク質が示された。

最高のホモロジー、つまり163アミノ酸が重複する51.5%の同一性が、ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenza) Rd toxR reg (HIHI0751) に見られた。

CFP21

CFP21の決定された14アミノ酸に100%同一な配列は、MTCY39に見られた。N-末端シークエンスから、3番目のアミノ酸を決定できなかった。このアミノ酸は、MTCY39ではCである。おそらくこの違いにより、アミノ酸Cをシークエンサーで決定できない。

オープンリーディングフレーム内で、翻訳タンパク質は217アミノ酸長である。培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は33番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子質量18657Da、理論pI 4.6に相当する185アミノ酸長の成熟タンパク質が得られる。SDS-PAGEで認められた分子量は、21kDaである。

タンパク質は、193アミノ酸を重複して、209アミノ酸長のクチナーゼ (cutinase) 前駆体 (CUTI_ALTBR P41744) に32.6%の同一性を有する。

マイコバクテリア・ボビスBCGで欠失された翻訳領域 (RD2) と決定されたN-末端の14アミノ酸との比較により、100%同一な配列 (mb3484) が示された [Mahairasら、1996] 。

CFP22

CFP22の決定された15アミノ酸に100%同一な配列は、MTCY10H4に見られた。オープンリーディングフレーム内で、翻訳タンパク質は182アミノ酸長である。培養液から精製したタンパク質のN-末端配列は8番目のアミノ酸で始まり、それ故に結核菌培養液中で175アミノ酸長のタンパク質を生じる。これにより、理論分子質量18517Da及びpI 6.8が得られる。SDS-PAGEで認められた分子量は、22kDaである。

182アミノ酸の重複で、翻訳タンパク質は、E235739、ペプチジル-プロリル シス-トランスイソメラーゼと90.1%の同一性を有する。

CFP25

決定された15アミノ酸に93%同一な配列は、コスミドMTCY339.08cに見出された。2つの配列間で異なる1つのアミノ酸は、MTCY339.08cでCであり、N-末端シークエンスデータによればXである。シークエンサーでは、おそらくこの違いによりCを決定できない。

培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は33番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子量19665Da及び理論pI 4.9に相当する187アミノ酸長の成熟タンパク質が得られる。SDS-PAGEで認められた分子量は、25kDaである。

タンパク質は、217アミノ酸の重複でCFP21 (MTCY39.35) に42.9%の同一性を有する。

CFP28

データベース検索でSEQ ID NO:22の2～8、11、12及び14残基の決定された10アミノ酸を用いる際に、ホモロジーは見られなかった。

CFP29

サンガーデータベース検索：CFP29タンパク質の配列150bpにほぼ100%同一な配列は、コスミドcy444に見出された。配列は、オープンリーディングフレーム795bp内に含まれ、その5'末端は、精製されたCFP29タンパク質のN-末端シークエンスされた19アミノに100%同一な配列に翻訳する。オープンリーディングフレームは、265アミノ酸のタンパク質をエンコードする。

精製タンパク質について行ったアミノ酸解析により、コスミド444でのオープンリーディングフレームにエンコードされるタンパク質とCFP29の同一性がさらに確認された。

EMBLデータベース検索：オープンリーディングフレームは、リノシンM18タンパク質 (DNAレベルで61%同一) に58%同一で、74%類似している265アミノ酸タンパク質をエンコー

10

20

30

40

50

ドしている。これは、バクテリオシン活性を有する28.6kDaのタンパク質である [Valdes-Stauber及びScherer、1994;Valdes-Stauber及びScherer、1996]。2つのタンパク質は同じ長さ（1アミノ酸を除いて）を有し、同じ理論物理化学特性を有する。したがって、CF P29は、ブレビバクテリウム・リネンスのリノシンM18タンパク質と相同なマイコバクテリア（mycobacterial homolog）であることが示唆される。

サンガーデータベースから選んだ精製抗原のアミノ酸配列を以下のリストに示す。N-末端シーケンスで決定したアミノ酸は、太字で示す。

CFP17 (SEQ ID NO: 6):

1 MTDMPDIEK DQTSDEVTVE TTSVFRADFL **SELDAPAQAG** TESAVSGVEG
51 LPPGSALLVV KRGNAGSRF LLDQAITSAG RHPDSDFLD DVTVSRRHAE
101 FRLENNEFNV VDVGSLNGTY VNREPVDSAV LANGDEVQIG KFRLVFLTGP
151 KQGEDDGSTG GP

CFP20 (SEQ ID NO: 8):

1 **MAQITLRGNA** INTVGELPAV GSPAPAFTLT GGD LGVISSD QFRGKSVLLN
51 IFPSVDTPVC ATSVRTFDER AAASGATVLC VSKDLPFAQK RFCGAEGTEN
101 VMPASAFRDS FGEDYGVTTA DGPMAGLLAR AIVVIGADGN VAYTELVPEI
151 AQEPNYEAL AALGA

10

CFP21 (SEQ ID NO: 10):

1 MTPRSLVRIV GVVVATTLAL VSAPAGGRAA **HADPCSDIAV**
41 **VFARGTHEQAS** GLGDVGEAFV DSLTSQVGGR SIGVYAVNYP ASDDYRASAS
91 NGSDDASAH I QRTVASCPNT RIVLGGYSQG ATVIDLSTSA MPPAVADHVA
141 AVALFGEPPS GFSSMLWGGG SLPTIGPLYS SKTINLCAPD DPICTGGGNI
191 MAHVSIVQSG MTSQAATFAA NRLDHAG

20

CFP22 (SEQ ID NO: 12):

1 MADCD **SVTNS** PLATATATLE **TNRGDIKIAL** FGNHAPKTVA NFVGLAQGTK
51 DYSTQNASGG PSGPFYDGAV FHRVIQGFMI QGGDPTGTGR GGPGYKFADE
101 FHPELQFDKP YLLAMANAGP GTNGSQFFIT VGKTPHLNRR HTIFGEVIDA
151 ESQRVVEAIS KTATDGND RP TDPVVIESIT IS

30

CFP25 (SEQ ID NO: 14):

1 MGAAAAMLAA VLLLTPTITVP AGYPGAVAPA **TAACPDAEVV** **FARGRFEPPG**
51 IGTVGNAFVS ALRSKVKNV GVIYAVKYPAD NQIDVGANDM SAHIQSMANS
101 CPNTRLVPGG YSLGAAVTDV VLAVPTQMWG FTNPLPPGSD EHIAAVALFG
151 NGSQWGPIT NFSPAYNDRT IELCHGDDPV CHPADPNTWE ANWPQHLAGA
201 YVSSGMVNQA ADFVAGKLQ

40

CFP29 (SEQ ID NO: 16):

1 **MNNLYRDLAP** **VTEAAMAEIE** LEAARTFKRH IAGRRVVDVS DPGGPVTA AV
51 STGRLIDVKA PTNGVIAHLR ASKPLVRLRV PFTLSRNEID DVERGSKDSD
101 WEPVKEAAKK LAFVEDRTIF EGYSASIEG IRSASSNPAL TLPEDPREIP
151 DVISQALSEL RLAGVDGPYS VLLSADVYTK VSETSDHGYP IREHLNRLVD
201 GDIIWAPAI D GAFVLTTTRGG DFDLQLGTDV AIGYASHDTD TVRLYLQETL
251 TFLCYTAEAS VALSH

6つのタンパク質全てについて配列から推測される分子量は、SDS-PAGEで認められる分子

50

量に一致する。

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22及びCFP25をエンコードする遺伝子のクローニング

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22及びCFP25をエンコードする遺伝子は、大腸菌内で組換えタンパク質が発現されるように、遺伝子の特異的なプライマーを用いるPCR増幅により発現ベクターpMCT6に全てクローンした。

PCR反応物は、10 µlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー5pmol及びTaq+DNAポリメラーゼ0.5ユニット [Stratagene]を加えた1x低塩Taq+緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。

10

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだしてスピン-Xスピンカラム [Costar]で精製し、pBluescript SK II+-Tベクター [Stratagene]にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミドDNAを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクターpMCT6 (発現されるタンパク質のN-末端に加えられる8個のヒスチジン残基とフレームを合わせた)にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosystems]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより、シー

20

個々の抗原のクローニングには、以下の遺伝子の特定のプライマーを用いた：

CFP17: cfp17のクローニングに用いられるプライマー：

OPBR-51: ACAGATCTGTGACGGACATGAACCCG (SEQ ID NO: 117)

OPBR-52: TTTTCCATGGTCACGGGCCCCCGGTACT (SEQ ID NO: 118)

OPBR-51及びOPBR-52は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP20: cfp20のクローニングに用いられるプライマー：

OPBR-53: ACAGATCTGTGCCCATGGCACAGATA (SEQ ID NO: 119)

OPBR-54: TTTAAGCTTCTAGGCGCCAGCGCGGC (SEQ ID NO: 120)

OPBR-53及びOPBR-54は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びHindIII部位をそれぞれ生じる。

30

CFP21: cfp21のクローニングに用いられるプライマー：

OPBR-55: ACAGATCTGCGCATGCGGATCCGTGT (SEQ ID NO: 121)

OPBR-56: TTTTCCATGGTCATCCGGCGTGATCGAG (SEQ ID NO: 122)

OPBR-55及びOPBR-56は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP22: cfp22のクローニングに用いられるプライマー：

OPBR-57: ACAGATCTGTAATGGCAGACTGTGAT (SEQ ID NO: 123)

OPBR-58: TTTTCCATGGTCAGGAGATGGTGATCGA (SEQ ID NO: 124)

OPBR-57及びOPBR-58は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

40

CFP25: cfp25のクローニングに用いられるプライマー：

OPBR-59: ACAGATCTGCCGGCTACCCCGGTGCC (SEQ ID NO: 125)

OPBR-60: TTTTCCATGGCTATTGCAGCTTTCCGGC (SEQ ID NO: 126)

OPBR-59及びOPBR-60は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22及びCFP25の組換えタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにし

50

て行った。各タンパク質について、アンピシリン100 μ g/mlを含有するLB-培地 1 l を、組換えpMTC6プラスミドを有するXL1-Blue細胞の一晩培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.4~0.6の密度に達するまで37℃で振盪した。最終濃度が1mMになるようにIPTGをこの後加え、さらに4~16時間培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液 + 8Mユレアに再懸濁し、パルス間に30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

遠心分離後、再懸濁したタロン (Talon) 樹脂 [Clontech, Palo Alto, 合衆国] 25mlを含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにしてカラムを洗浄し、溶出した。溶出後、全画分 (各1.5ml) を、マイティ・スモール (Mighty Small) [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国] システムを用いるSDS-PAGEでの分析に付し、タンパク質濃度を280nmで見積もった。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl (pH8.5) 中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia, スウェーデン] でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で見積もった。タンパク質を含む画分をプールし、25mM Hepes緩衝液 (pH8.5) に透析した。

最後に、それぞれBCA [Pierce, オランダ] 及びLAL [Endosafe, Charleston, 合衆国] 試験でタンパク質濃度及びLPS含量を決定した。

実施例3A:CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19B、CFP22A、CFP23A、CFP23B、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50の同定

CFP16及びCFP19Bの同定

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後に8Mユレアで洗浄した。最終濃度がそれぞれ0.5% (w/v) と5% (v/v) になるようにCHAPSとグリセロールを加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞 [BioRad] に塗布した。ロトフォル細胞は、0.5%CHAPS (w/v)、5%グリセロール (v/v)、3%バイオリット3/5 (v/v) 及び1%バイオリット4/6 (v/v) [BioRad] を含む8Mユレア緩衝液で平衡化した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。画分を、銀染色した10~20%のSDS-PAGEで分析した。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が1~3mlになるように、3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレッス濃縮機 [Amicon] でPBSを用いて3回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のSDSを加え、タンパク質溶液を5分煮沸し、電気勾配下の16%ポリアクリルアミドのマトリクスでプレッス細胞 [Biorad] についてさらに分離した。PVDF膜への転移後に、SDS-PAGEで分離したバンドのウェル含有画分をN-末端シーケンス用を選択した。

CFP8A、CFP8B、CFP19、CFP23A及びCFP23Bの単離

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿させ、PBS (pH7.4) に再溶解し、25mMピペラジン-HCl (pH5.5) に3回透析し、FPLCシステム [Pharmacia] に接続したカラムでPBE94 [Pharmacia] のマトリクスについての等電点クロマトグラフィーに付した。カラムは25mMピペラジン-HCl (pH5.5) で平衡化し、溶出を10%PB74-HCl (pH4.0) [Pharmacia] を用いて行った。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が1~3mlになるように3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレッス濃縮機 [Amicon] でPBSを用いて3回洗浄し、上記のようにしてプレッス細胞で分離した。

CFP22Aの同定

ST-CFを限外ろ過で約10倍に濃縮し、80%飽和でタンパク質を沈殿させ、PBS (pH7.4) に再溶解し、PBS (pH7.4) に3回透析した。Rnase (0.2mg/ml, QUIAGEN) とDNase (0.2mg/ml, Boehringer Mannheim) で透析したST-CF5.1mlを6時間処理し、ソルバル (Sorvall) チューブ [Ultracrimp 03987, DuPont Medical Products] 内のPBS (pH7.4) 中48%ショ糖 (w/v) 6.4mlの上部に置き、10℃、257,300xg_{max}で20時間、超遠心分離した。ペレットは、200 μ lの25mM Tris-192mMグリシン、0.1% SDS (pH8.3) に再溶解した。

CFP7A、CFP25A、CFP27、CFP30A及びCFP50の同定

CFP27、CFP30A及びCFP50については限外ろ過でST-CFを約10倍に濃縮し、45~55%飽和の硫酸アンモニウム沈殿を行った。タンパク質は、50mMリン酸ナトリウム、1.5mM硫酸アンモニウム (pH8.5) に再溶解し、Affi-Tゲルカラム [Kem-En-Tec] でのチオフィル吸着ク

10

20

30

40

50

ロマトグラフィーに付した。タンパク質は、1.5から0Mに低下する硫酸アンモニウムの勾配で溶出した。SDS-PAGEで同様のバンドパターンを有する画分をプールし、FPLCシステム [Pharmacia] に接続したMono Q HR 5/5カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは、10mM Tris-HCl (pH8.5) で平衡化し、0~1MのNaCl勾配で溶出した。SDS-PAGEで分離したバンドのウェル含有画分を選択した。

CFP7とCFP25Aは、以下の点を変えるほかは上記のようにして得られた: 限外ろ過でST-CFを約10倍に濃縮し、80%飽和でタンパク質を沈殿させ、PBS (pH7.4) に再溶解し、PBS (pH7.4) に3回透析した。1.5Mの濃度まで硫酸アンモニウムを加え、ST-CFタンパク質をAffi T-ゲルカラムにロードした。Affi T-ゲルカラムとアニオン交換からの溶出は、上記のようにして行った。

10

CWP32の単離

熱処理したH37Rvは、Sorensenらが記載 (1995) しているように、細胞下画分にサブ分画した。細胞壁画分は、8Mユレア、0.2% (w/v) N-オクチル-β-D-グルコピラノシド [Sigma] 及び5% (v/v) グリセロールに再懸濁し、同じ緩衝液で平衡化したロトフォル等電点細胞 [BioRad] にタンパク質溶液を塗布した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。画分をSDS-PAGEで分析し、分離したバンドのウェル含有画分をプールし、PVDF膜への転移後にN-末端シーケンシングに付した。

N-末端シーケンシング

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19B、CFP22A、CFP23A、CFP23B、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50を含む画分は、トリシンSDS-PAGE後にPVDF膜にプロットした [Plougら、1989]。関連するバンドを切り出し、プロサイズ494シーケンサー [Applied Biosystems] でN-末端アミノ酸シーケンス解析に付した。CFP25Aを含む画分を、2-DE PAGE (一次で等電点フォーカス、二次でトリシンSDS-PAGE) 後にPVDF膜にプロットした。関連するスポットを切り出し、上記のようにシーケンスした。

20

以下のN-末端配列が得られた:

CFP7A:	AEDVRAEIVA SVLEVNVNEG DQIDKGDVVV LLESMYMEIP	
	VLAEAAAGTVS	(SEQ ID NO: 81)
CFP8A:	DPVDDAFIAKLNTAG	(SEQ ID NO: 73)
CFP8B:	DPVDAIINLDNYGX	(SEQ ID NO: 74)
CFP16:	AKLSTDELLDAFKEM	(SEQ ID NO: 79)
CFP19:	TTSPDPYAALPKLPS	(SEQ ID NO: 82)
CFP19B:	DPAXAPDVPTAAQLT	(SEQ ID NO: 80)
CFP22A:	TEYEGPKTKF HALMQ	(SEQ ID NO: 83)
CFP23A:	VIQ/AGMVT/GHIHXVAG	(SEQ ID NO: 76)
CFP23B:	AEMKXFKNAIVQEID	(SEQ ID NO: 75)
CFP25A:	AIEVSVLRVF TDSDG	(SEQ ID NO: 78)
CWP32:	TNIVVLIKQVPDTWS	(SEQ ID NO: 77)
CFP27:	TTIVALKYPG GVVMA	(SEQ ID NO: 84)
CFP30A:	SFPYFISPEX AMRE	(SEQ ID NO: 85)
CFP50:	THYDVVVV LGA GPGGY	(SEQ ID NO: 86)

30

サンガーデータベースでのN-末端ホモロジー検索及び相当する遺伝子の同定

各タンパク質由来のN-末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌データベース:

<http://www.sanger.ac.uk/projects.m-tuberculosis/TB-blast-server> のブラストプログラムを用いるホモロジー検索に用いた。

CFP23B、CFP23A及びCFP19Bについては、サンガーのデータベースで類似性が見出されなかった。これは、検索を行ったときにシーケンスされていた結核菌ゲノムは70%にすぎないという事実のためである。これらのタンパク質をエンコードする遺伝子は、シーケンスデータがいまだ利用できない残りの30%のゲノムに含まれているであろう。

40

50

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19B、CFP22A、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32
及びCFP50については、以下の情報が得られた。

CFP7A:CFP7Aの決定された50アミノ酸のうち、98%同一な配列がコスミドcsCY07D1 (contig 256)に見出された:スコア=226 (100.4ビット)、イクスペクト (expect) =1.4e-24、P =1.4e-24、同一性=49/50 (98%)、陽性=49 / 50 (98%)、フレーム (frame) =-1。

問 : 1 AEDVRAEIVASVLEV VVNEG DQIDKGDVVVLLESMYMEIPVLAEEAAGTVS 50
(Query) AEDVRAEIVASVLEV VVNEG DQIDKGDVVVLLESM MEIPVLAEEAAGTVS
対象 : 257679 AEDVRAEIVASVLEV VVNEG DQIDKGDVVVLLESMKMEIPVLAEEAAGTVS 257530
(subject)

(SEQ ID NOs: 127, 128, 及び 129)

10

同一性は、理論MWがCFP7Aの7305.9Da及びpI 3.762に相当する71アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEで認められた分子量は、7kDaである。

CFP8A:15個のN-末端アミノ酸に80%が同一な配列が、contig TB_1884に見出された。培養液から精製したタンパク質由来の決定されたN-末端配列は、32番目のアミノ酸で開始する。これにより、MW 9700Da及びpI 3.72の理論値に相当する98アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。これは、SDS-PAGEで認められる約8kDaのMWに一致する。全長タンパク質は、MW 12989Da及びpI 4.38の理論値を有する。

CFP8B:14個のN-末端アミノ酸に71%同一な配列が、contig TB_653に見出された。しかし、最初のN-末端配列データを注意深く再評価することにより、タンパク質の同一性が確認された。培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は、29番目のアミノ酸で開始する。これにより、MW 8337Da及びpI 4.23の理論値に相当する82アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。これは、SDS-PAGEで認められる約8kDaのMWに一致する。アミノ酸配列解析により、培養液に見出された成熟タンパク質から切断されたシグナルペプチドの存在することが予測される。

20

CFP16:15個のN-末端アミノ酸配列は、コスミドMTCY20H1に見られる配列と100%同一であることが分かった。

同一性は、13440.4Da及びpI 4.59のCFP16の理論MWに相当する130アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、16kDaである。

CFP19:15個のN-末端アミノ酸配列は、コスミドMTCY270に見られる配列と100%同一であることが分かった。

30

同一性は、18633.9Da及びpI 5.41のCFP19の理論MWに相当する176アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、19kDaである。

CFPA22A:15個のN-末端アミノ酸配列は、コスミドMTCY1A6に見られる配列と100%同一であることが分かった。

同一性は、20441.9Da及びpI 4.73のCFP22Aの理論MWに相当する181アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、22kDaである。

CFPA25A:15個のN-末端アミノ酸配列は、contig 255に見られる配列と100%同一であることが分かった。

40

同一性は、24574.3Da及びpI 4.95のCFP25Aの理論MWに相当する228アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、25kDaである。

CFPA27:15個のN-末端アミノ酸配列は、コスミドMTCY 261に見られる配列と100%同一であることが分かった。

同一性は、291アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は、58番目のアミノ酸で開始する。これにより、24422.4Daの理論分子量、4.64の理論pIに相当する233アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、27kDaである。

CFPA30A:CFP30Aで決定された13個のアミノ酸について、100%同一な配列がコスミドMTCY2

50

61に見出された。

同一性は、26881.0Da及びpI 5.41のCFP30Aの理論MWに相当する248アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、30kDaである。

CWP32:15個のN-末端アミノ酸配列は、contig 281に見られる配列と100%同一であることが分かった。同一性は、28083Da及びpI 4.563のCWP32の理論MWに相当する266アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出された。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、32kDaである。

CFP50:15個のN-末端アミノ酸配列は、MTV038.06に見られる配列と100%同一であることが分かった。同一性は、49244Da及びpI 5.66のCFP50の理論MWに相当する464アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、50kDaである。

CFP19AとCFP23の同定のためのEMBLデータベースでのホモロジー検索の使用

TFASTAアルゴリズムを用いる、2つの初期に同定された高度に免疫応答性のST-CFタンパク質のアミノ酸配列とのEMBLデータベース（BiobaseのGCGパッケージを使用、Arhus-DK）でのホモロジー検索により、これらのタンパク質（CFP21とCFP25、実施例3）が、真菌のクチナーゼホモログの群に属することが示された。これらのうちで、もっとも相同な配列は、コスミドMTCY13E12に見らる2つの結核菌配列であった。まず、MTCY13E12.04は、CFP25とCFP21に、それぞれ46%及び50%同一である。次に、MTCY13E12.05も、CFP25とCFP21に46%及び50%同一である。2つのタンパク質は、184残基を重複させて62.5%の同一なアミノ酸を共有する。強力なT-細胞抗原CFP21とCFP25に高度なホモロジーに基づくと、CFP19AとCFP23は、それぞれ新規なT-細胞抗原であるものと考えられる。

最初の読み枠は、254アミノ酸のタンパク質をエンコードし、最初の26アミノ酸は、タンパク質の細胞外の位置を強く示す仮想のリーダーペプチドを構成している。したがって、成熟タンパク質は、23149.0Daの理論MWと5.80のpIに相当する228アミノ酸の長さである。このタンパク質を、CFP23と命名する。

二番目の読み枠は、231アミノ酸のタンパク質をエンコードし、最初の44アミノ酸は、タンパク質の細胞外の位置を強く示す仮想のリーダーペプチドを構成している。したがって、成熟タンパク質は、19020.3Daの理論MWと7.03のpIに相当する187アミノ酸の長さである。このタンパク質を、CFP19Aと命名する。

両タンパク質での仮想リーダーペプチドの存在（及び、それによるST-CFでのそれらの存在）は、エクスパシー（Expasy）分子生物サーバー（<http://expasy.hcuge.ch/www/tools.html>）のシグナルPプログラムを用いる理論シークエンス解析で確認される。

EMBLデータベースでのCFP7A、CFP16、CFP19、CFP19A、CFP19B、CFP22A、CFP23、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50とのホモロジー検索

相同なタンパク質を見出し、抗原に最終的な機能的役割を果たさせるために、TFASTAアルゴリズムを用いるEMBL及びGenbankデータベースでのホモロジー検索に個々の抗原の翻訳遺伝子由来のアミノ酸配列を用いた。

CFP7A:CFP7Aは、仮想上（hypothetical）、メタノコッカス・ジャナスチ（*Methanococcus jannaschii*）タンパク質（1162199-1175341塩基由来のメタノコッカス・ジャナスチ）と44%の同一性及び70%の類似性、ならびにビー・ステアロサーモフィラス（*B. stearothermophilus*）のピルベートカルボキシラーゼのC-末端の一部、及びストレプトコッカス（*Streptococcus*）変異体のピオチンカルボキシル担体タンパク質と43%と38%の同一性及び68%と64%の類似性を有する。

CFP7Aは、この場合にわずかに修飾されたピオチン結合部位モチーフについて共通のEAMKM配列（ESMKMで34～38アミノ酸残基）を含む。SDS-PAGE後にストレプトアビジンに結合したアルカリホスファターゼとインキュベーションし、ニトロセルロースに転移することにより、天然のCFP7Aがピオチニル化されたことが立証された。

CFP16:RpIL遺伝子、130アミノ酸、マイコバクテリア・ボビス50sリボソームタンパク質L7/L12と同一（受託No P37381）。

10

20

30

40

50

CFP19:CFP19は、150アミノ酸重複して、大腸菌ペクチンストレアーゼホモログ (ybhC遺伝子) と47%同一で、55%類似している。

CFP19A:CFP19Aは、異なる真菌種由来の幾つかのクチナーゼと38~45%の同一性を有する。

さらに、CFP19AはCFP25と46%の同一性と61%の類似性、ならびにCFP21と50%の同一性と64%の類似性を有する (両タンパク質は、ST-CFから初期に単離される)。

CFP19B:ホモロジーは、見られない。

CFP22A:ホモロジーは、見られない。

CFP23:CFP23は、異なる真菌種由来の幾つかのクチナーゼと38~46%の同一性を有する。

さらに、CFP23はCFP25と46%の同一性と61%の類似性、ならびにCFP21と50%の同一性と63%の類似性を有する (両タンパク質は、ST-CFから初期に単離される)。

CFP25A:CFP25Aは、推測上、結核菌のチミジレートシンセターゼと241アミノ酸重複して95%の同一性を有する (450アミノ酸、受託番号p28176)。

CFP27:CFP27は、仮定上、らい菌 (*M. leprae*) タンパク質と81%の同一性、及びロドコッカス (*Rhodococcus*) 種のプロテアソーム - タイプサブユニット2 (prcb (2) 遺伝子) と64%の同一性ならびに78%の類似性を有する。

CFP30A:CFP30Aは、ロドコッカスのプロテアソーム - タイプ1サブユニットと67%の同一性を有する。

CWP32:CWP32のN-末端配列は、らい菌の配列MLCB637.03と100%同一である。

CFP50:CFP50のN-末端配列は、推測上、らい菌由来のリポアミドデヒドロゲナーゼと100%同一である (受託415183)。

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19A、CFP22A、CFP23、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50をエンコードする遺伝子のクローニング

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19A、CFP22A、CFP23、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50をエンコードする遺伝子は、大腸菌で組換えタンパク質を発現するように、特異的な遺伝子プライマーとのPCR増幅で発現ベクターpMCT6に全てクローンした。

PCR反応物は、10mlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー5pmol及びTaq+DNAポリメラーゼ0.5ユニット [Stratagene] を加えた1x低塩Taq+緩衝液 [Stratagene] に結核菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology] を用いて10秒間94、10秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピン-X スピнкаラム [Costar] で精製し、pBluescript SKII+ -Tベクター [Stratagene] にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミドDNAを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクターpMCT6 (発現されるタンパク質のN-末端に加えられる8個のヒスチジン残基とフレームを合わせた) にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国] を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosystems] と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンシングにより、シーケンシングした。遺伝子の両鎖をシーケンシングした。

個々の抗原のクローニングには、以下の特異的な遺伝子プライマーを用いた:

CFP7A:cfp7Aのクローニングに用いたプライマー

OPBR-79: AAGAGTAGATCTATGATGCCGAGGATGTTGCGG (SEQ ID NO: 95)

OPBR-80: CGGCGACGACGGATCCTACCGCGTCGG (SEQ ID NO: 96)

OPBR-79及びOPBR-80は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びBamHI部位をそれぞれ生じる。

CFP8A:cfp8Aのクローニングに用いたプライマー:

CFP8A-F: CTGAGATCTATGAACCTACGGCGCC (SEQ ID NO: 154)
 CFP8A-R: TCCCCATGGTACCCTAGGACCCGGGAGCCCCGGC (SEQ ID NO: 155)

CFP8A-F及びCFP8A-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP8B:cfp8Bのクローニングに用いたプライマー：

CFP8B-F: CTGAGATCTATGAGGCTGTCGTTGACCGC (SEQ ID NO: 156)
 CFP8B-R: CTCCCCGGGCTTAATAGTTGTTGCAGGAGC (SEQ ID NO: 157)

CFP8B-F及びCFP8B-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びSmaI部位をそれぞれ生じる。

CFP16:cfp16のクローニングに用いたプライマー：

OPBR-104: CCGGGAGATCTATGGCAAAGCTCTCCACCGACG (SEQ ID NOs: 111 and 130)
 OPBR-105: CGCTGGGCAGAGCTACTTGACGGTGACGGTGG (SEQ ID NOs: 112 and 131)

OPBR-104及びOPBR-105は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP19:cfp19のクローニングに用いたプライマー：

OPBR-96: GAGGAAGATCTATGACAACCTACCCGACCCG (SEQ ID NO: 107)
 OPBR-97: CATGAAGCCATGGCCCGCAGGCTGCATG (SEQ ID NO: 108)

OPBR-96及びOPBR-97は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP19A:cfp19Aのクローニングに用いたプライマー：

OPBR-88: CCCCCAGATCTGCACACCGGCATCGGCGGGC (SEQ ID NO: 99)
 OPBR-89: GCGGCGGATCCGTTGCTTAGCCGG (SEQ ID NO: 100)

OPBR-88及びOPBR-89は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びBamHI部位をそれぞれ生じる。

CFP22A:cfp22Aのクローニングに用いたプライマー：

OPBR-90: CCGGCTGAGATCTATGACAGAATACGAAGGGC (SEQ ID NO: 101)
 OPBR-91: CCCCAGCCAGGGAACCTAGAGCGGGC (SEQ ID NO: 102)

OPBR-90及びOPBR-91は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP23:cfp23のクローニングに用いたプライマー：

OPBR-86: CCTTGGGAGATCTTTGGACCCCGGTTGC (SEQ ID NO: 97)
 OPBR-87: GACGAGATCTTATGGGCTTACTGAC (SEQ ID NO: 98)

OPBR-86及びOPBR-87は、ともにpMCT6でのクローニングに用いられるBglIII部位を生じる。

CFP25A:cfp25Aのクローニングに用いたプライマー：

OPBR-106: GGCCCAGATCTATGGCCATTGAGGTTTCGGTGTTC (SEQ ID NO: 113)
 OPBR-107: CGCCGTGTTGCATGGCAGCGCTGAGC (SEQ ID NO: 114)

OPBR-106及びOPBR-107は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP27:cfp27のクローニングに用いたプライマー：

OPBR-92: CTGCCGAGATCTACCACCATTTGCGCGCTGAAATACCC (SEQ ID NO: 103)
 OPBR-93: CGCCATGGCCTTACGCGCCAACCTCG (SEQ ID NO: 104)

OPBR-92及びOPBR-93は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP30A:cfp30Aのクローニングに用いたプライマー：

OPBR-94: GGCCGAGATCTGTGAGTTTTCCGTATTTCATC (SEQ ID NO: 105)
 OPBR-95: CGCGTCGAGCCATGGTTAGGCGCAG (SEQ ID NO: 106)

OPBR-94及びOPBR-95は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CWP32:cwp32のクローニングに用いたプライマー：

10

20

30

40

CWP32-F: GCTTAGATCTATGATTTTCTGGCAACCAGGTA (SEQ ID NO: 158)
 CWP32-R: GCTTCCATGGCGAGGCACAGCGTGGGAA (SEQ ID NO: 159)

CWP32-F及びCWP32-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP50: cfp50のクローニングに用いたプライマー:

OPBR-100: GGCCGAGATCTGTGACCCACTATGACGTCGTCG (SEQ ID NO: 109)
 OPBR-101: GGC GCCCATGGTCAGAAATTGATCATGTGGCCAA (SEQ ID NO: 110)

OPBR-100及びOPBR-101は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19A、CFP22A、CFP23、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50の組換えタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン100 µg/mlを含有するLB-培地 1 lを、組換えpMCT6プラスミドを有するXL-1 Blue細胞の一晩培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.4~0.6の密度に達するまで37 °Cで振盪した。その後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、さらに4~16時間、培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレアに再懸濁し、パルス間で30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

遠心分離後、再懸濁したタロン樹脂 [Clontech, Palo Alto, 合衆国] を25ml含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにしてカラムを洗浄し、溶出した。

溶出後、全画分 (各1.5ml) を、マイティ・スモール [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国] システムを用いるSDS-PAGEでの分析に付し、タンパク質濃度を280nmで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl (pH8.5) 中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia, スウェーデン] でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で予測した。タンパク質含有画分をプールし、25mM Hepes 緩衝液 (pH8.5) に透析した。

最後に、タンパク質濃度及びLPS含量は、それぞれBCA [Pierce, オランダ] 及びLAL [Endo safe, Charleston, 合衆国] 試験で決定した。

実施例3B: CFP7B、CFP10A、CFP11及びCFP30Bの同定

CFP7Bの単離

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿し、PBS (pH7.4) に再溶解し、25mMピペラジン-HCl (pH5.5) に3回透析し、FPLCシステム [Pharmacia] に接続したカラムでPBE94 [Pharmacia] のマトリクスについての等電点クロマトグラフィーに付した。カラムは25mMピペラジン-HCl (pH5.5) で平衡化し、10%PB74-HCl (pH4.0) [Pharmacia] を用いて溶出を行った。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が1~3mlになるように3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機 [Amicon] でPBSを用いて3回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のSDSを加え、タンパク質溶液を5分煮沸し、10~20%ポリアクリルアミドのマトリクス [Andersen, P. 及びHeron, I., 1993] のマルチエリ्यूター (MultiEluter) [Biorad] でさらに分離した。PVDF膜への転移後に、10kDa以下で分離したバンドのウェル含有画分をN-末端シーケンス用を選択した。

CFP11の単離

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後に8Mユレアで洗浄した。最終濃度がそれぞれ0.5% (w/v) と5% (v/v) になるようにCHAPSとグリセロールを加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞 [BioRad] に塗布した。0.5%CHAPS (w/v)、5%グリセロール (v/v)、3%バイオリット3/5 (v/v) 及び1%バイオリット4/6 (v/v) [BioRad] を含む8Mユレア緩衝液で、ロトフォル細胞を平衡化した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。銀染色した10~20%のSDS-PAGEで画分を分析した。pH5.5~6の勾配で画分をプールし、最終容量が1mlになるように、3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機 [Amicon] でPBSを用いて3回洗浄した。タンパク質調製物300mgを10~20%トリシンSDS-PAGEで分離し [Plougら

10

20

30

40

50

、1989]、PVDF膜に移してクーマシー染色した。膜のもっとも低い位置で生じたバンドを切り出し、N-末端シーケンスに付した。

CFP10AとCFP30Bの単離

ST-CFは、限外ろ過及び80%飽和の硫酸アンモニウム沈殿で約10倍に濃縮した。タンパク質は、50mMのリン酸ナトリウム、1.5Mの硫酸アンモニウム (pH8.5) に再溶解し、Affi-Tゲルカラム [Kem-En-Tec] でのチオフィル吸着クロマトグラフィーに付した。タンパク質は、1.5から0Mに減少する硫酸アンモニウムの勾配で溶出した。SDS-PAGEで同様のバンドパターンを有する画分をプールし、FPLCシステム [Pharmacia] に接続したMono Q HR 5/5カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは10mM Tris-HCl (pH8.5) で平衡化し、0~1MのNaCl勾配で溶出した。SDS-PAGEで分離したバンドのウェル含有画分を選択した。

10

CFP10AとCFP30Bを含有する画分は、2-DE PAGE後にPVDF膜にプロットした [Plougら、1989]。関連するスポットを切り出し、N-末端アミノ酸配列の解析に付した。

N-末端シーケンシング

N-末端アミノ酸配列の解析は、プロサイス494シーケンサー [Applied Biosystems] で行った。

以下のN-末端配列が得られた：

CFP7B:	PQGTVKWFNAEKGFG	(SEQ ID NO: 168)
CFP10A:	NVTVSIPTILRPXXX	(SEQ ID NO: 169)
CFP11:	TRFMTDPHAMRDMAG	(SEQ ID NO: 170)
CFP30B:	PKRSEYRQGTNPWVD	(SEQ ID NO: 171)

20

「X」は、用いたシーケンス法では決定できないアミノ酸を示す。

サンガーデータベースでのN-末端ホモロジー検索及び相当する遺伝子の同定

各タンパク質由来のN-末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌ゲノムのデータベース：

<http://www.sanger.ac.uk/projects/m-tuberculosis/TB-blast-server>

のブラストプログラムを用いるホモロジー検索に用いた。

CFP11について15個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、contig TB_1314

に見られた。同一性は、MW 10977Da及びpI 5.14の理論値に相当する98アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

30

この配列も得られたように (結果を示していない)、アミノ酸の1つは、(Thrの代わりに) Alaでもよい。このN-末端に100%同一な配列がcontig TB_671及びMTCI 364.09の座に見出される。

CFP7Bについて15個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、EMBL受託番号がZ95436のcontig TB_2044及びMTY15C10.04の座に見られた。同一性は、MW 7240Da及びpI 5.18の理論値に相当する67アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

CFP10Aについて12個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、EMBL受託番号：Q10646及びZ73902のcontig TB_752及びCY130.20の座に見られた。同一性は、MW 9557Da及びpI 4.78の理論値に相当する93アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

CFP30Bについて15個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、contig TB_335に見られた。同一性は、MW 27345Da及びpI 4.24の理論値に相当する261アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

40

サンガーデータベースから選んだ精製抗原のアミノ酸配列を、以下のリストに示す。

CFP7B (SEQ ID NO: 147)

1 MPQGTVKWFN AEKGFGFIAP EDGSADVFEH YTEIQGTGFR TLEENQKVEF
51 EIGHSPKGPQ ATGVRSL

CFP10A (SEQ ID NO: 141)

1 MNVTVSIPTI LRPHTGGQKS VSASGDTLGA VISDLEANYS GISERLMDPS
51 SPGKLHREVN IYVNDEDVRF SGGLATAIAD GDSVTILPAV AGG

10

CFP11 protein sequence (SEQ ID NO: 143)

1 MATRFMTDPH AMRDMAGRFE VHAQTVEDEA RRMWASAQNI SGAGWSGMAE
51 ATSLDTMAQM NQAFRNIVNM LHGVRDGLVR DANNYEQQEQ ASQQILSS

CFP30B (SEQ ID NO: 145)

1 MPKRSEYRQG TPNWVDLQTT DQSAKKFYT SLFGWGYDDN PVPGGGGVYS
51 MATLNGEAVA AIAPMPPGAP EGMPPIWNTY IAVDDVDAVV DKVVPGGGQV
101 MMPAFDIGDA GRMSFITDPT GAAVGLWQAN RHIGATLVNE TGTLIWNELL
151 TDKPDLALAF YEAVVGLTHS SMEIAAGQNY RVLKAGDAEV GGCMEPPMPG
201 VPNHWHVYFA VDDADATAAK AAAAGGQVIA EPADIPSVGR FAVLSDPQGA
251 IFSVLKPAPQ Q

20

CFP7B、CFP10A、CFP11及びCFP30Bをエンコードする遺伝子のクローニング

PCR反応物は、10mlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、B
SA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー5pmol及びTaq+ DNAポ
リメラーゼ0.5ユニット [Stratagene]を加えた1x低塩Taq+緩衝液 [Stratagene]に結核
菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応物は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモ
サイクラー装置 [Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55 及び90秒間72 の
プログラムを30サイクル行った。

30

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピン-X
スピンカラム [Costar]で精製し、pBluescript SK II+ -Tベクター [Stratagene]にク
ローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミドDNAを調製し
、適切な制限酵素で消化し、発現ベクターpMCT6 (発現されるタンパク質のN-末端に加え
られる8個のヒスチジン残基とフレームを合わせた)にサブクローンした。得られたクロ
ーンは、この後、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States
Biochemical Corp.、合衆国]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端
法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosystems
]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより、
シーケンスした。遺伝子の両鎖をシーケンスした。

40

個々の抗原のクローニングには、以下の特異的な遺伝子プライマーを用いた：

CFP7B： cfp7Bのクローニングに用いたプライマー

CFP7B-F: CTGAGATCTAGAATGCCACAGGGAACCTGTG

(SEQ ID NO: 160)

CFP7B-R: TCTCCCGGGGTAACCTCAGAGCGAGCGGAC

(SEQ ID NO: 161)

CFP7B-F及びCFP7B-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びSmaI部位をそれぞ
れ生じる。

CFP10A： cfp10Aのクローニングに用いたプライマー：

CFP10A-F: CTGAGATCTATGAACGTCACCGTATCC (SEQ ID NO: 162)
 CFP10A-R: TCTCCCGGGGCTCACCACCGGCCACG (SEQ ID NO: 163)

CFP10A-F及びCFP10A-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びSmaI部位をそれぞれ生じる。

CFP11: cfp11のクローニングに用いたプライマー:

CFP11-F: CTGAGATCTATGGCAACACGTTTATGACG (SEQ ID NO: 164)
 CFP11-R: CTCCCCGGGTTAGCTGCTGAGGATCTGCTH (SEQ ID NO: 165)

CFP11-F及びCFP11-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びSmaI部位をそれぞれ生じる。

CFP30B: cfp30Bのクローニングに用いたプライマー:

CFP30B-F: CTGAAGATCTATGCCCAAGAGAAGCGAATAC (SEQ ID NO: 166)
 CFP30B-R: CGGCAGCTGCTAGCATTCTCCGAATCTGCCG (SEQ ID NO: 167)

CFP30B-F及びCFP30B-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びPvuII部位をそれぞれ生じる。

CFP7B、CFP10A、CFP11及びCFP30Bの組換えタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。アンピシリン100 μ g/mlを含有するLB-培地 1 lを、組換えpMCT6プラスミドを有するXL-1 Blue細胞の一晩培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.5の密度に達するまで37 で振盪した。この後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、さらに4時間、培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレアに再懸濁し、パルス間で30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

遠心分離後、再懸濁したタロン樹脂 [Clontech, Palo Alto, 合衆国] を25ml含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにしてカラムを洗浄し、溶出した。

溶出後、全画分(各1.5ml)を、マイティ・スモール [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国] システムを用いるSDS-PAGEで分析に付し、タンパク質濃度を280nmで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl (pH8.5) 中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia, スウェーデン] でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で予測した。タンパク質含有画分をプールし、25mM Hepes緩衝液 (pH 8.5) に透析した。

最後に、タンパク質濃度及びLPS含量は、それぞれBCA [Pierce、オランダ] 及びLAL [Endo safe, Charleston, 合衆国] 試験で測定した。

実施例4: CFP26 (MPT51) 発現遺伝子のクローニング

プローブの合成及びデザイン

オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAシンセサイザー [Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, PCRモード] で自動合成し、脱阻害し、エタノール沈殿で精製した。Oharaら (1995) により記載されているmpb51のヌクレオチド配列に基づいて、3つのオリゴヌクレオチドを合成した(表3)。オリゴヌクレオチドは、5'末端と3'末端にEcoRI制限酵素部位を含むように設計し、後者によってサブクローニングを可能にした。

MPT51のヌクレオチド配列(図5及びSEQ ID NO:41)に基づいて、さらに4つのオリゴヌクレオチドを合成した。PCR研究にはプライマーの4つの組み合わせを用いた。

DNAクローニングとPCR技術

DNAの調製と処理には、標準的な方法を用いた [Sambrookら、1989]。遺伝子mpt51は、前述のとおりポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を用いて結核菌H37Rvの染色体DNAからクローンした [OettingerとAndersen、1994]。PCR産物は、pBluescript SK+ [Stratagene] にクローンした。

mpt51のクローニング

遺伝子、つまりMPT51のシグナル配列とシャインダルガノ領域は、PCR技術を用いてpBluescript SK+に952bp及び815bpの2つのフラグメントとしてクローンし、pT052及びpT053とした。

10

20

30

40

50

DNAシーケンシング

MPT51のシャインダルガノ配列、シグナルペプチド配列及び構造遺伝子を含む952bpの結核菌H37Rv PCRフラグメントがクローンされたヌクレオチド配列pT052及びMPT51の構造遺伝子を含む815bpのPCRフラグメントがクローンされたヌクレオチド配列pT053は、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp., Cleveland, OH] を用いてスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー [モデル373A, Applied Biosystems] と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより決定した。DNAの両鎖をシーケンスした。

pT052とpT053のヌクレオチド配列及び推測されるアミノ酸配列は、図5に示す。DNA配列は、45～47の位置のATGコドンで開始し、942～944の位置の終止コドン (TAA) で終わるオープンリーディングフレームを含んだ。最初の33コドンのヌクレオチド配列は、シグナル配列をエンコードしているものと推測された。精製MPT51 [Nagaiら、1991] の公知のN-末端アミノ酸配列 (Ala-Pro-Tyr-Glu-Asn) 及びシグナルペプチドの特徴に基づく、シグナルペプチダーゼ認識配列 (Ala-X-Ala) [von Heijne, 1984] は、144位置の成熟タンパク質のN-末端領域の前に位置しているものと考えられる。したがって、結核菌H37Rv由来のMPT51をエンコードする構造遺伝子mpt51は、図5に示す配列の144～945の位置に位置していることが分かった。mpt51のヌクレオチド配列は、Oharaら (1995) により記載されているMPB51のヌクレオチド配列と比較してヌクレオチドが1つ異なった (図5)。mpt51の780の位置では、グアニンをアデニンに置換していることが分かった。推定されるアミノ酸配列によれば、この変化は最初の位置のコドンで生じ、アミノ酸をアラニンからスレオニンに変える。したがって、mpt51は801bpからなること、及び推定されるアミノ酸配列は、分子量が27,842の266残基を含むこと、MPT51はMPB51と99.8%の同一性を示すことが結論づけられる。

mpt51のサブクロニング

MPT51をエンコードする遺伝子のコード領域のみが発現されるように、EcoRI部位をmpt51の最初のコドンの5'に隣り合うように設計し、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。組換えプラスミドpT053のDNAは、EcoRI部位で切断した。アガロースゲルから815bpのフラグメントを精製し、pMAL-cR1発現ベクター [New England Biolabs] のEcoRI部位にサブクロンし、pT054とした。融合遺伝子を含有するベクターDNAは、DNA操作の標準的な方法で

大腸菌XL-1 Blueの形質転換に用いた。融合遺伝子のエンドポイントは、DNAシーケンシングの項に記載したようにジデオキシ鎖末端法で決定した。DNAの両鎖をシーケンスした。

rMPT51の調整及び精製

組換え抗原は、New England Biolabsの指示にしたがって調製した。要約すると、アンピシリン50 µg/ml及びテトラサイクリン12.5 µg/mlを含むルリア - ベルタニ培地にpT054プラスミドを有する大腸菌のシングルコロニーを接種し、 2×10^8 細胞/mlまで37℃で成長させた。次いで、最終濃度が0.3mMになるようにイソプロピル - β-D-チオガラクトシド (IPTG) を加え、さらに2時間成長させた。新しいカラム緩衝液 (Tris-HCl 20mM (pH7.4)、NaCl 200mM、EDTA 1mM、ジチオスレイトール (DTT) 1mM) にペレット化した細菌を-20℃で一晩置き、4℃で溶かした後、30分氷上でリゾチーム1mg/mlとインキュベーションし、超音波処理 (20秒間隔、10秒間20回) した。4℃で30分、9,000xgで遠心分離後、マルトース結合タンパク質-MPT51融合タンパク質 (MPB-rMPT51) を、アミロース樹脂カラムのアフィニティークロマトグラフィーで粗抽出物から精製した。MPB-rMPT51は、アミロースに結合する。カラムを何度も洗浄した後、融合タンパク質をマルトース10mMで溶出した。アリコートの画分を10% SDS-PAGEで分析した。重要な融合タンパク質を含む画分をプールし、生理食塩水に何度も透析した。

タンパク質濃度は、Pierce [Pierce Chemical Company, Rockford, IL] のBCA法で測定した。

表 3. *mpt51* ヌクレオチド^aの配列

方向及び オリゴヌクレオチド	配列 (5'→3')	位 置 ^b (ヌクレオチド)
センス		
MPT51-1	CTCGAATTCGCCGGGTGCACACAG (SEQ ID NO: 28)	6 - 21 (SEQ ID NO: 41)
MPT51-3	CTCGAATTCGCCCCATACGAGAAC (SEQ ID NO: 29)	143 - 158 (SEQ ID NO: 41)
MPT51-5	GTGTATCTGCTGGAC (SEQ ID NO: 30)	228 - 242 (SEQ ID NO: 41)
MPT51-7	CCGACTGGCTGGCCG (SEQ ID NO: 31)	418 - 432 (SEQ ID NO: 41)
アンチセンス		
MPT51-2	GAGGAATTCGCTTAGCGGATCGCA (SEQ ID NO: 32)	946 - 932 (SEQ ID NO: 41)
MPT51-4	CCACATTCGTTGG (SEQ ID NO: 33)	642 - 628 (SEQ ID NO: 41)
MPT51-6	GTCCAGCAGATACAC (SEQ ID NO: 34)	242 - 228 (SEQ ID NO: 41)

^a オリゴヌクレオチド MPT51-1 及び MPT51-2、MPB51 のヌクレオチド配列 [Ohara
ら、1995]から構築した。他のオリゴヌクレオチドは、この研究で報告した *mpt51*
から得られるヌクレオチド配列に基づいて構築した。下線のヌクレオチド(nt)は、
MPB/T51 のヌクレオチド配列には含まれない。

^b 示している位置は、プライマーの下線を付していない部分であって、SEQ ID NO:41

に示すヌクレオチド配列に相当する。

発現ベクター-pMST24での*mpt51*のクローニング

PCRフラグメントは、MPT51-FとMPT51-Rのプライマーの組み合わせを用いてpT052から産生
した(表4)。BamHI部位は、MPT51をエンコードする遺伝子のコード領域のみが発現され
るように*mpt51*の最初のコドンの5'に隣接して設計し、3'末端の停止コドンの直後にNco
I部位を導入した。

PCR産物は、BamHI及びNcoI部位で切断した。811bpのフラグメントをアガロースゲルから
精製し、pMST24発現ベクターのBamHI部位及びNcoI部位にサブクローンし、pT086とした。
DNA操作の標準的な方法で、融合遺伝子を含有するベクターDNAを大腸菌XL-1 Blueの形質
転換に用いた。

完全な融合遺伝子のヌクレオチド配列は、DNAシーケンシングの項に記載したようにジデ
オキシ鎖末端法で決定した。DNAの両鎖をシーケンシングした。

rMPT51の調整及び精製

組換え抗原は、アンピシリン50 µg/ml及びテトラサイクリン12.5 µg/mlを含むルリア - ベ
ルタニ培地に接種したプラスミドpT086を有する大腸菌のシングルコロニーから調製し、2
x10⁸細胞/mlまで37℃で成長させた。

次いで、最終濃度が1mMになるようにイソプロピル - β-D-チオガラクトシド (IPTG) を加
え、さらに2時間成長させた。BC 100/20緩衝液 (KCl 100mM、イミダゾール20mM、Tris/H
Cl 20mM (pH7.9)、グリセロール20%) にペレット化した細菌を再懸濁した。細胞は、超
音波処理 (20秒間隔、10秒間20回) で破壊した。4℃で30分、9,000xgで遠心分離後、不溶
物を8Mユレアを有するBC 100/20緩衝液に再懸濁し、超音波処理し、上記のように遠心分
離した。6xHis tag-MPT51融合タンパク質 (His-rMPT51) は、Ni-NTA樹脂カラム [Qiagen
、Hilden、ドイツ] でのアフィニティクロマトグラフィーで精製した。His-rMPT51は、Ni
-NTAに結合する。カラムを何度も洗浄した後、8Mユレアを有するBC 100/40緩衝液 (KCl 1
00mM、イミダゾール40mM、Tris/HCl 20mM (pH7.9)、グリセロール20%) 及び8Mユレアを
有するBC 1000/40緩衝液 (KCl 1000mM、イミダゾール40mM、Tris/HCl 20mM (pH7.9)、グ
リセロール20%) で融合タンパク質を溶出した。His-rMPT51は、Tris/HCl 10mM (pH8.5)
、3Mユレアに透析し、0~1MのNaClの線状勾配でTris/HCl 10mM (pH8.5)、3Mユレアを用

いるアニオン交換カラム (Mono Q) でタンパク質高速液体クロマトグラフィー (FPLC) [Pharmacia, Uppsala, スウェーデン] を用いて精製した。rMPT51含有画分をプールし、次いで使用前にHepes 25mM (pH8.0) に透析した。

タンパク質濃度は、Pierce [Pierce Chemical Company, Rockford, IL] のBCA法で測定した。リボポリサッカライド (LPS) 含量はリムルス変形細胞溶解試験 (LAL) で決定した。rMPT51は0.004ng/μg未満であった。この濃度は、細胞活性に影響がなかった。

表4. *mpt51*オリゴヌクレオチドの配列

方向及び オリゴヌクレオチド センス	配列 (5' → 3')	位置 (nt)
MPT51-F	<u>CTCGGATCCTGCCCCATACGAGAACCTG</u>	139 - 156
アンチセンス		
MPT51-R	<u>CTCCCATGGTTAGCGGATCGCACCG</u>	939 - 924

実施例4A : ESAT6-MPT59及びMPT59-ESAT6ハイブリッドのクローニング ESAT6-MPT59及びMPT59-ESAT6融合物のバックグラウンド

ESAT-6は免疫原性であるが、免疫化の際に一貫した結果を得るために補助するのは比較的難しいことが、幾つかの研究により立証されている。抗原での免疫化後にESAT-6の生体外認識を見出すことは、結核菌に対する免疫記憶を回復するあいだに見出される抗原の強力な認識と比較すると非常に困難である。切断型 (truncated version) のST-CFに見られるESAT-6は、1~15アミノ酸が欠失されている。欠損は、C57BL/6jマウスで認識される主要なT-細胞エピトープを含む [Brandtら、1996]。この結果、ESAT-6は、STCFでN-末端処理されているか、又はタンパク質加水分解で分解される。免疫原としてESAT-6を最適化するために、ESAT-6と別の主要なT細胞抗原MPT59の融合遺伝子が構築された。2つの異なる構築物、MPT59-ESAT-6 (SEQ ID NO:172) 及びESAT-6-MPT59 (SEQ ID NO:173) がつくられた。最初のハイブリッドで、ESAT-6はMPT59によりN-末端が保護され、後者では、2つの優勢なT-細胞抗原の融合で相乗効果の生じることが推測される。

ESAT6-MPT59及びMPT59-ESAT6ハイブリッドをエンコードする遺伝子は、ハイブリッドタンパク質を大腸菌で組換え発現するように、特異的な遺伝子プライマーでのPCR増幅により発現ベクターpMCT6にクローンした。

MPT59-ESAT6ハイブリッドの構築

クローニングは、3工程で行った。最初に、ハイブリッドの2成分をエンコードする遺伝子、ESAT6及びMPT59を以下のプライマー構築物を用いてPCR増幅した。

ESAT6 :

OPBR-4: GGC GCCG GCAAGCTTGCCATGACAGAGCAGCAGTGG (SEQ ID NO: 132)

OPBR-28: CGAACTCGCCGGATCCCGTGTTCGC (SEQ ID NO: 133)

OPBR-4及びOPBR-28は、それぞれHindIII及びBamHI部位を生じる。

MPT59 :

OPBR-48: GGCAACCGCGAGATCTTTCTCCCGCCGGGGC (SEQ ID NO: 134)

OPBR-3: GGCAAGCTTGCCGCGCCTAACGAAT (SEQ ID NO: 135)

OPBR-48及びOPBR-3は、それぞれBglIII及びHindIIIを生じる。さらに、OPBR-3は、MPT59の停止コドンを欠失している。

PCR反応物は、10μlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー5pmol及びTaq+ DNAポリメラーゼ0.5ユニット [Stratagene]を加えた1x低塩Taq+緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応物は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55 及び90秒間72

のプログラムを30サイクル行った。

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピン-X スピнкаラム [Costar] で精製した。2つのPCRフラグメントをHindIIIで消化し、結合した。MPT59-ESAT6をエンコードする結合したPCRフラグメントのPCR増幅は、プライマーOPBR-48及びOPBR-28を用いて行った。PCR反応は最初に25秒間94 に加熱し、30秒間94、30秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。得られたPCRフラグメントをBglIIとBamHIで消化し、発現ベクターpMCT6にクローン（発現されるハイブリッドタンパク質のN-末端に加えられる8個のヒスチジンとフレームを合わせた）した。得られたクローンは、この後シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国] を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー [モデル373、Applied Biosystems] と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスによりシーケンスした。DNAの両鎖をシーケンスした。

ESAT6-MPT59ハイブリッドの構築

ESAT6-MPT59ハイブリッドの構築は、ハイブリッドMPT59-ESAT6に記載しているようにして行った。構築及びクローニングに用いたプライマーは、以下のとおりであった：

ESAT6：

OPBR-75: GGACCCAGATCTATGACAGAGCAGCAGTGG (SEQ ID NO: 136)

OPBR-76: CCGGCAGCCCCGCGCCGGGAGAAAGCTTTGCGAACATCCCAGTGACG (SEQ ID NO: 137)

OPBR-75及びOPBR-76は、それぞれBglII及びHindIII部位を生じる。さらに、OPBR-76は、ESAT6の停止コドンを欠失している。

MPT59：

OPBR-77: GTTCGCAAAGCTTTTCTCCCGCCGGGGCTGCCGGTTCGAGTACC (SEQ ID NO: 138)

OPBR-18: CCTTCGGTGGATCCCGTCAG (SEQ ID NO: 139)

OPBR-77及びOPBR-18は、それぞれHindIII及びBamHI部位を生じる。

MPT59-ESAT6及びESAT6-MPT59ハイブリッドタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン100 µg/mlを含有するLB-培地1 lを、組換えpMCT6プラスミドを有するXL-1 Blue細胞の一晚培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.4~0.6の密度に達するまで37 で振盪した。この後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、さらに4~16時間、培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレ

アに再懸濁し、パルスの際に30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

遠心分離後、再懸濁したタロン樹脂 [Clontech, PaloAlto、合衆国] を25ml含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにカラムを洗浄し、溶出した。

溶出後、全画分（各1.5ml）を、マイティ・スモール [Hoefer Scientific Instruments、合衆国] システムを用いるSDS-PAGEで分析に付し、タンパク質濃度を280nmで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl (pH8.5) 中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia、スウェーデン] でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で予測した。タンパク質含有画分をプールし、25mM Hepes緩衝液 (pH8.5) に透析した。

最後に、タンパク質濃度及びLPS含量を、それぞれBCA [Pierce、オランダ] 及びLAL [Endosafe, Charleston、合衆国] 試験で測定した。

MPT59-ESAT6融合タンパク質の生物活性は、実施例6Aに記載する。

実施例5：2DEシステムでの精製抗原のマッピング

精製抗原を特徴づけるために、二次元電気泳動（2DE）参照システムで、それらをマッピングした。これは、等電点フォーカス、次いでポリアクリルアミドゲル電気泳動での大きさにしたがった分別で分離されるST-CFタンパク質を含む銀染色ゲルからなる。2DEは、Hochstrasserら（1989）にしたがって行った。ST-CF 85 µgは、両性電解質のバイオリット4-6（2部）とバイオリット5-7（3部） [BioRad] を含む等電点フォーカスチューブにアブ

ライした。一次元は、ユレア、界面活性剤CHAPS及び還元剤DTTの存在下、18時間400V及び2時間800Vでアクリルアミド/ビペラジンジアクリルアミドチューブゲルで行った。10～20%のSDS-PAGEの二次元は18時間100Vで行い、銀染色した。2DE参照ゲルでのCFP7、CFP7A、CFP7B、CFP8A、CFP8B、CFP9、CFP11、CFP16、CFP17、CFP19、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25、CFP27、CFP28、CFP29、CFP30A、CFP50及びMPT51の同定は、精製抗原を用いるか、用いないで、ST-CFとの精製抗原のスポットパターンを比較して行った。分析用2DEソフトウェアシステム [Phoretix International, 英国] を用いて、スポットを図6で同定した。MPT51とCFP29の位置は、Mabの抗CFP29及びHBT4を用いる2DEゲルのウェスタンブロットで確認した。

実施例6：精製抗原の生物活性

TB感染マウスモデルでのIFN- γ の誘導

TBに対する免疫記憶マウスモデル（実施例1に記載）での精製抗原の認識を研究した。表5に示す結果は、3つの実験について代表的な結果である。

非常に高度なIFN- γ の応答は、ST-CFとほぼ同じレベルの高さでCFP17とCFP21の2つの抗原により誘導された。

表5

天然抗原での刺激後に結核菌で再感染させた後で単離した C57BL/6J マウス由来の脾臓記憶エフェクター細胞からの IFN- γ の放出

抗原 ^a	IFN- γ (pg/ml) ^b
ST-CF	12564
CFP7	ND ^d
CFP9	ND
CFP17	9251
CFP20	2388
CFP21	10732
CFP22 + CFP25 ^c	5342
CFP26 (MPT51)	ND
CFP28	2818
CFP29	3700

データは、3回の実験のうちの代表的な実験に基づく。

^a ST-CFは5 μ g/mlの濃度で試験し、個々の抗原は2 μ g/mlの濃度で試験した。

^b 再試験から4日後に、3匹のマウス由来の細胞のプールを試験した。

結果は、デュプリケート値の平均として示す。デュプリケート培養の差は、平均の15%未満である。抗原なしで培養した培養液のIFN- γ 放出は、390pg/mlであった。

^c CFP22及びCFP25のプールを試験した。

^d ND、測定不能

TB感染したモルモットでの皮膚反応試験

精製タンパク質の皮膚活性試験は、結核菌に感染したモルモットで試験した。PBS 0.2ml 中に 1×10^4 CFUの結核菌H37Rvで耳の静脈を通して一群のモルモットを感染させた。4週間後に皮膚試験を行い、注射から24時間後に紅斑の直径を測定した。

表6及び6aから分かるように、全抗原が、顕著な遅延型過度感作(DTH)反応を誘導した。

表6

天然抗原での刺激後に、 1×10^4 CFUの結核菌に感染したモルモットでのDTH紅斑の直径

抗原 ^a	皮膚反応 (mm) ^b
対照	2.00
PPD ^c	15.40 (0.53)
CFP7	ND ^e
CFP9	ND
CFP17	11.25 (0.84)
CFP20	8.88 (0.13)
CFP21	12.44 (0.79)
CFP22 + CFP25 ^d	9.19 (3.10)
CFP26 (MPT51)	ND
CFP28	2.90 (1.28)
CFP29	6.63 (0.88)

示した値は、4匹の動物の紅斑直径の平均である。SEMは括弧に示す。PPDとCFP29については、値は、10匹の動物の紅斑直径の平均である。

^a 抗原は、CFP29を $0.8 \mu\text{g}$ の濃度で試験した以外は、 $0.1 \mu\text{g}$ の濃度で試験した。

^b 皮膚反応は、皮内注射から24時間後の紅斑をmmで測定する。

^c PPD 10TUを用いた。

^d CFP22とCFP25のプールを試験した。

^e ND、測定不能

これらの分析とともに、同定された抗原の多くは生物活性が高く、異なる動物モデルでのTB感染のあいだに認識されることが示された。

表 6a

1x10⁴ CFU の結核菌に感染した異系交配モルモットでの組換え抗原の DTH 紅斑の直径

抗原 ^a	皮膚反応 (mm) ^b	
対照	2.9	(0.3)
PPD ^c	14.5	(1.0)
CFP 7a	13.6	(1.4)
CFP 17	6.8	(1.9)
CFP 20	6.4	(1.4)
CFP 21	5.3	(0.7)
CFP 25	10.8	(0.8)
CFP 29	7.4	(2.2)
MPT 51	4.9	(1.1)

示した値は、4 匹の動物での紅斑直径の平均である。SEM は括弧に示す。

対照、PPD と CFP29 については、値は、8 匹の動物の紅斑直径の平均である。

^a 抗原は、1.0 μg の濃度で試験した。

^b 皮膚反応試験は、皮内注射から 24 時間後の紅斑を mm で測定する。

^c PPD 10TU を用いた。

精製組換え抗原の生物活性

TB 感染したマウスモデルでのインターフェロン - の誘導

一次感染：8～12週齢のメスのマウス C57BL/6j (H-2^b)、CBA/J (H-2^k)、DBA.2 (H-2^d) 及び A.SW (H-2^s) [Bomholtegaard, Ry] は、側方 (lateral) の尾の静脈を介して、0.1 ml 容量の PBS に懸濁した結核菌 5x10⁴ の接種物で静脈感染させた。感染から 14 日後に動物を屠殺し、脾臓細胞を単離し、組換え抗原の認識について試験した。

表 7 から分かるように、組換え抗原 rCFP7A、rCFP17、rCFP21、rCFP25 及び rCFP29 は、全て ST-CF に匹敵するレベルでマウスの少なくとも 2 つの種で認識された。rMPT51 と rCFP7 は、ST-CF の刺激後に検出された応答のわずか 1/3 に相当するレベルで、それぞれ 1 又は 2 つの種で認識されるにすぎなかった。抗原 rCFP20 と rCFP22 は、いずれも 4 つのマウスの種のいずれによっても認識されなかった。

記憶応答：8～12週齢のメスのマウス C57BL/6j (H-2^b) [Bomholtegaard, Ry] は、側方の尾の静脈を介して、0.1 ml 容量の PBS に懸濁した結核菌 5x10⁴ の接種物で静脈感染させた。感染から 1 カ月後に、飲料水中のイソニアジド [Merck and Co., Rahway, NJ] 及びリファブチン (rifabutin) [Farmatelia Carlo Erba, ミラノ、イタリア] でマウスを 2 ケ月間、処理した。実験に用いる前に、マウスを 4～6 カ月間休養させた。免疫記憶の回復研究のために、1x10⁶ 細菌の接種物で動物を静脈感染させ、感染から 4 日後に屠殺した。脾臓細胞を単離し、組換え抗原の認識について試験した。

表 8 から明らかであるように、rCFP17、rCFP21 及び rCFP25 での刺激後の IFN- の放出は、ST-CF で刺激した脾臓細胞で見られるのと同じレベルだった。rCFP7、rCFP7A 及び rCFP29 での刺激は、全て ST-CF で見られた応答の 1/3 に満たない IFN- を生じた。rCFP22 は、IFN- 産生細胞により認識されなかった。抗原のいずれも、天然のマウスでの IFN- の放出を刺

激しなかった。さらに、抗原のいずれも細胞培養液に毒性でなかった。

表7 TB 一次感染での T 細胞の応答

名称	c57BL/6J (H2 ^b)	DBA.2 (H2 ^d)	CBA/J (H2 ^k)	A.SW (H2 ^s)
rCFP7	+	+	-	-
rCFP7A	+++	+++	+++	+
rCFP17	+++	+	+++	+
rCFP20	-	-	-	-
rCFP21	+++	+++	+++	+
rCFP22	-	-	-	-
rCFP25	+++	++	+++	+
rCFP29	+++	+++	+++	++
rMPT51	+	-	-	-

10

結核菌に対する免疫記憶の回復のあいだのマウスの IFN- γ の放出

20

- : 応答なし、+ : ST-CF の 1/3、++ : ST-CF の 2/3、+++ : ST-CF レベル

表8 免疫記憶動物での T 細胞の応答

名称	免疫記憶
rCFP7	+
rCFP7A	++
rCFP17	+++
rCFP21	+++
rCFP22	-
rCFP29	+
rCFP25	+++
rMPT51	+

30

結核菌の一次感染から 14 日後のマウスの IFN- γ の放出

40

- : 応答なし、+ : ST-CF の 1/3、++ : ST-CF の 2/3、+++ : ST-CF レベル

ヒトTB患者及びBCG予防接種を受けたヒトでのインターフェロン- γ の誘導

ヒトドナー：PBMCは、TB患者への暴露が知られていない健康なBCG予防接種を受けたドナーから、及び結核菌感染が培養又は顕微鏡で分かった患者から得た。血液サンプルは、診断から1~4ヶ月後にTB患者から得た。

リンパ球調製及び細胞培養：PBMCは、リンホプレップ（Lymphoprep）[Nycomed、オスロ、ノルウェー]でヘパリン化した血液を勾配遠心分離により用時に単離した。細胞は、完全培地：ストレプトマイシン40 μ g/ml、ペニシリン40U/ml及びグルタミン0.04mM/ml [全

50

てGibco Laboratories, Paisley, スコットランド] 及び10%の通常のヒトABO血清 (NHS) [local blood bank] を補足したRPMI 1640 [Gibco, Grand Island, N.Y.] で再懸濁した。細胞数と生存度は、トリパンブルー染色で測定した。培養は、マイクロタイタープレート [Nunc, Roskilde, デンマーク] で200 μ l 中の 2.5×10^5 PBMCを用いて行い、最終濃度5 μ g/mlで、抗原なし、ST-CF、PPD (2.5 μ g/ml) ; rCFP7、rCFP7A、rCFP17、rCFP20、rCFP21、rCFP22、rCFP25、rCFP26、rCFP29で刺激した。フィトヘマグルチニン1 μ g/ml [PHA, Difcolaboratories, Dertoit, MI.] は、ポジティブコントロールとして用いた。サイトカインの検出のために、培養から5日後に上清を回収してプールし、-80 で使用するまで保存した。

サイトカイン分析：インターフェロン- γ (IFN- γ) は、市場で入手可能なmAbのペア [E

10

ndogen] を用いる標準的なELISA技法で測定し、使用の指示に従って用いた。組換えIFN- γ [Gibco Laboratories] は、標準として用いた。アッセイについての検出レベルは、50 pg/mlだった。デュプリケートのウェル間の変化は、平均の10%を超えなかった。9人の個々のドナーの応答を表9に示す。

表9から明らかであるように、IFN- γ の高レベルな放出は、幾つかの組換え抗原で刺激した後に得られる。rCFP7a及びrCFP17は、ほぼ全てのドナーでST-CFに匹敵する応答を生じる。rCFP7は、BCG予防接種した健康なドナーにより、おっとも強力に認識されるようである。rCFP21、rCFP25、rCFP26及びrCFP29は、各群での中間的な応答と合わさった現象を生じるが、rCFP20及びrCFP22により生じる応答は低い。

表9. 7人のBCG予防接種者及び組換え抗原を有する7人のTB患者由来のヒト

20

血液細胞の刺激から得られる結果の平均値。SE値は、各抗原について示す。

ST-CF 及びマイコバクテリウム・アビウム培養ろ液は、比較用に示す。

対照、健常者、BCG 予防接種者、公知のTB 暴露なし

ドナー:	no	ag	PHA	PPD	STCF	CFP7	CFP17	CFP7A	CFP20	CFP21
1	6	9564	6774	3566	7034	69	1799	58	152	
2	48	12486	6603	8067	3146	10044	5267	29	6149	
3	190	11929	10000	8299	8015	11563	8641	437	3194	
4	10	21029	4106	3537	1323	1939	5211	1	284	
5	1	18750	14209	13027	17725	8038	19002	1	3008	

30

診断から1~4ヵ月後のTB患者

	no	ag	PHA	PPD	STCF	CFP7	CFP17	CFP7A	CFP20	CFP21
6	9	8973	5096	6145	852	4250	4019	284	1131	
7	1	12413	6281	3393	168	6375	4505	11	4335	
8	4	11915	7671	7375	104	2753	3356	119	407	
9	32	22130	16417	17213	8450	9783	16319	91	5957	

40

実施例6A

4群の6~8週齢のメスのC57Bl/6Jマウス [Bomholtegaard, デンマーク] を、以下のワクチン組成物で尾の基部に皮下で免疫化した。

1群: ESAT-6/DDA (250 μ g) 10 μ g

2群: MPT59/DDA (250 μ g) 10 μ g

3群: MPT59-ESAT-6/DDA (250 μ g) 10 μ g

4群: アジュバント対照群: NaCl中のDDA (250 μ g)

動物は、0.2mlの容量で注射した。最初の注射から2週間後及び二回目の注射から3週間

50

後に、マウスの背の上部をわずかにブースターに付した。
最後の免疫化から1週間後にマウスを交配させ、血液細胞を単離した。関連する抗原で生体外で刺激した際の培養上清へのIFN- γ の放出により、誘導される免疫応答をモニターした（下記の表参照）。

免疫原 10 μ g/服用	再刺激用：生体外でのA g			
	抗原なし	ST-CF	ESAT-6	MPT59
ESAT-6	219 \pm 219	569 \pm 569	835 \pm 633	-
MPT59	0	802 \pm 182	-	5647 \pm 159
ハイブリッド： MPT59-ESAT-6	127 \pm 127	7453 \pm 581	15133 \pm 861	16363 \pm 1002

10

1) 血液細胞は、最後の免疫化から1週間後に単離し、抗原の刺激（5 μ g/ml）から72時間後にIFN- γ の放出（pg/ml）を測定した。

示した値は、3匹のマウスからプールした細胞について行ったトリプリケートの平均 \pm SEMである。

2) 測定せず

実験は、ハイブリッドでの免疫化が、単一抗原での免疫化後より強力にESAT-6及びMPT59を認識するT細胞を刺激していることを立証している。特に、ESAT-6の認識は、MPT59-ESAT-6ハイブリッドでの免疫化で促進された。DDAで免疫化した対照のマウスでのIFN- γ の放出は、1000pg/mlを超えなかった。

20

実施例6B

組換え抗原は、マウスでのサブユニットワクチンとして個々に試験した。11群の6～8週齢のメスのC57Bl/6Jマウス [Bomholtegaard, デンマーク] を、以下のワクチン組成物で尾の基部に皮下で免疫化した。

- 1群：CFP7 10 μ g
- 2群：CFP17 10 μ g
- 3群：CFP21 10 μ g
- 4群：CFP22 10 μ g
- 5群：CFP25 10 μ g
- 6群：CFP29 10 μ g
- 7群：MPT51 10 μ g
- 8群：ST-CF 50 μ g
- 9群：アジュバント対照群
- 10群：BCG 2.5 $\times 10^5$ /ml, 0.2ml
- 11群：対照群：未処理

30

全てのサブユニットワクチンは、アジュバントとしてDDAとともに与えた。動物は、0.2mlの容量で予防接種した。最初の注射から2週間後、及び二回目の注射から3週間後に、1～9群の背の上部をわずかにブースターに付した。最後の注射から1週間後にマウスを交配させ、血液細胞を単離した。相同なタンパク質で生体外で刺激された際の培養上清へのIFN- γ の放出により、誘導される免疫応答をモニターした。

40

最後の免疫化から6週間後に、生存能力のある結核菌5 $\times 10^6$ /mlを有するエアロゾルにマウスを付した。感染から6週間後にマウスを屠殺し、感染したマウスの肺及び脾臓で生存している細菌数を、7H11プレートで3連続希釈した器官のホモジネートをプレートして測定した。コロニーは、インキュベーションから2～3週間後に計測した。防護効率は、関連する5群のマウスから得られる数の幾何学上（geometric）の平均と、関連する対照の群の5匹のマウスから得られる数の幾何学上の平均のlog₁₀値の違いとして示す。

実験の結果は、以下の表に示す。

50

ST-CF及び7個のサブユニットワクチンのマウスでの免疫原性及び防護効率

サブユニット ワクチン	免疫原性	防護効率
ST-CF	+++	+++
CFP7	++	-
CFP17	+++	+++
CFP21	+++	++
CFP22	-	-
CFP25	+++	+++
CFP29	+++	+++
MPT51	+++	++

+++ 強力な免疫原性/高防護 (BCG レベル)

10

++ 中間的な免疫原性/中間的な防護

- 認識せず/防護せず

この結果、高レベルの防護を誘導する幾つかのタンパク質が同定された。これらのうちCFP17、CFP25及びCFP29の3つは、ST-CF及びBCGと同様の防護レベルを生じるが、2つのタンパク質CFP21とMPT51は、BCGとST-CFレベルの約2/3の防護を誘導する。CFP7及びCFP22の2つのタンパク質は、マウスモデルで防護を誘導しなかった。

実施例7: cfp7、cfp9、mpt51、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bならびにcfp7a、cfp7b、cfp10a、cfp17、cfp20、cfp21、cfp22、cfp22a、cfp23、cfp25及びcfp25aの種の分布

20

異なるマイコバクテリア種でのcfp7、cfp9、mpt51、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bの存在

結核菌 - 複合体に属する種及び他のマイコバクテリアでのcfp7、cfp9、mpt51、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9b遺伝子の分布を決定するために、PCR及び/又はサザンブロッティングを用いた。用いた細菌株は、表10に挙げている。ゲノムDNAは、前述のようにマイコバクテリア細胞から調製した [Andersenら、1992]。

PCR分析は、結核菌 - 複合体に属する種及び他のマイコバクテリアでのcfp7、cfp9及びmpt51遺伝子の分布を決定するために用いた。用いた細菌株は、表10に挙げている。PCRは、前述のようにマイコバクテリア細胞から調製したゲノムDNAについて行った [Andersenら、1992]。

30

用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、DNAシンセサイザーで自動合成し [Applied Biosystems, Foster City, CA, ABI-391, PCRモード]、脱阻害し、エタノール沈殿で精製した。分析に用いたプライマーは、表11に示す。

PCR増幅は、染色体20ngを、マスターミックス (各オリゴヌクレオチドプライマー0.5 µM、BSA [Stratagene] 0.25 µM、低塩緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH8.8)、KCl 10mM、(NH₄)₂SO₄10mM、MgSO₄2mM及びTriton X-100 0.1%) [Stratagene]、各デオキシヌクレオシド三リン酸0.25mM及びTaq Plus Long DNAポリメラーゼ [Stratagene] 0.5U) と混合して、サーマル反応機 [Rapid Cycler, Idaho Technology, Idaho] で行った。最終容量は、10 µlとした (示した濃度は、全て最終容量での濃度である)。予備変性は、30秒間94 で行った。変性30秒間94、アニーリング30秒間55 及び伸長1分間72 で、30サイクル行った。

40

以下のプライマーの組み合わせも用いた (増幅した産物の長さを括弧で示す)。mpt51: MPT51-3及びMPT51-2 (820bp)、MPT51-3及びMPT51-6 (108bp)、MPT51-5及びMPT51-4 (415bp)、MPT51-7及びMPT51-4 (325bp) cfp7: pVF1及びPVR1 (274bp)、pVF1及びPVR2 (197bp)、pVF3及びPVR1 (302bp)、pVF3及びPVR2 (125bp) cfp9: stR3及びstF1 (351bp)

表 10. この実施例で用いたマイコバクテリア株

種及び株		由来
1. <i>M. tuberculosis</i>	H37Rv (ATCC 27294)	ATCC ^a
2.		ATCC
3.		A. Lazlo, Ottawa, Canada から入手
4. <i>M. bovis</i> BCG substrain:	Danish 1331	SSI ^b
5.		SSI ^c
6.		SSI ^c
7.		SSI ^c
8.		SSI ^c
9.		SSI ^c
10.		WHO ^d
11. <i>M. bovis</i> MNC 27		SSI ^c
12. <i>M. africanum</i>		Danish の患者より単離
13. <i>M. leprae</i> (アルマジロ 由来)		J. M. Colston, London, UK から入手
14. <i>M. avium</i> (ATCC 15769)		ATCC
15. <i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)		ATCC
16. <i>M. marinum</i> (ATCC 927)		ATCC
17. <i>M. scrofulaceum</i> (ATCC 19275)		ATCC
18. <i>M. intercellulare</i> (ATCC 15985)		ATCC
19. <i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)		ATCC
20. <i>M. xenopi</i>		Danish の患者より単離
21. <i>M. flavescens</i>		Danish の患者より単離
22. <i>M. szulgai</i>		Danish の患者より単離
23. <i>M. terrae</i>		SSI ^c
24. <i>E. coli</i>		SSI ^d
25. <i>S. aureus</i>		SSI ^d

^a American Type Culture Collection、合衆国

^b Statens Serum Institut、コペンハーゲン、デンマーク

^c Statens Serum Institut (コペンハーゲン、デンマーク) 微生物部の我々のコレクション

^d Statens Serum Institut (デンマーク) 臨床微生物部

^e Statens Serum Institut (コペンハーゲン、デンマーク) 生物基準のための WHO 国際研究所

10

20

30

表 11. *mpt51*、*cfp7*及び*cfp9*オリゴヌクレオチドの配列

方向及び オリゴヌクレオチド センス	配列 (5'→3')	位置 (ヌクレオチド)
MPT51- 1	<u>CTCGAATTCCGCGGGTGCACACAG</u> (SEQ ID NO: 28)	6 - 21 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 3	<u>CTCGAATTCCGCCCCATACGAGAAC</u> (SEQ ID NO: 29)	143 - 158 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 5	<u>GTGTATCTGCTGGAC</u> (SEQ ID NO: 30)	228 - 242 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 7	<u>CCGACTGGCTGGCCG</u> (SEQ ID NO: 31)	418 - 432 (SEQ ID NO: 41)
pVR1	<u>GTACGAGAATTTCATGTCGCAAATCATG</u> (SEQ ID NO: 35)	91 - 105 (SEQ ID NO: 1)
pVR2	<u>GTACGAGAATTTCAGCTTGGGGTGCCG</u> (SEQ ID NO: 36)	168 - 181 (SEQ ID NO: 1)
stR3	<u>CGATTCCAAGCTTGTGGCCGCCGACCCG</u> (SEQ ID NO: 37)	141 - 155 (SEQ ID NO: 3)
アンチセンス		
MPT51- 2	<u>GAGGAATTCGCTTAGCGGATCGCA</u> (SEQ ID NO: 32)	946 - 932 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 4	<u>CCCACATTCCGTTGG</u> (SEQ ID NO: 33)	642 - 628 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 6	<u>GTCCAGCAGATACAC</u> (SEQ ID NO: 34)	242 - 228 (SEQ ID NO: 41)
pVF1	<u>CGTTAGGGATCCTCATCGCCATGGTGTGG</u> (SEQ ID NO: 38)	340 - 323 (SEQ ID NO: 1)
pVF3	<u>CGTTAGGGATCCGGTTCCTACTGTGCC</u> (SEQ ID NO: 39)	268 - 255 (SEQ ID NO: 1)
stF1	<u>CGTTAGGGATCCTCAGGTCCTTTTCGATG</u> (SEQ ID NO: 40)	467 - 452 (SEQ ID NO: 3)

^a 下線を付したヌクレオチドは、*mpt51*、*cfp7*及び*cfp9*のヌクレオチド配列に含まれない。

^b 示している位置は、プライマーの下線を付していない部分であって、*mpt51*、*cfp7*及び*cfp9*のそれぞれについて SEQ ID NO:41、1 及び 3 に示すヌクレオチド配列に相当する。

サザンプロットは、以下の点を変えるほかは、前述 [Oettinger 及び Anderse, 1994] のようにして行った：ゲノム DNA 2 µg は PvuII で消化し、0.8% アガロースゲルで電気泳動し、真空転移装置 [Milliblot, TM-v; Millipore Corp., Bedford, MA] を用いてナイロンメンブレン (Hybond N-プラス; Amersham International plc, Little Chalfont, 英国) に移した。*cfp7*、*cfp9*、*mpt51*、*rd1-orf2*、*rd1-orf3*、*rd1-orf4*、*rd1-orf5*、*rd1-orf8*、*rd1-orf9a* 及び *rd1-orf9b* 遺伝子フラグメントは、プラスミド pRVN01、pRVN02、pT052、pT087、pT088、pT089、pT090、pT091、pT096 又は pT098 に表 11 及び表 2 (実施例 2a) に示すプライマーを用いる PCR により増幅した。プローブは、改良されたケミルミネッセンスキット [ECL; Amersham International plc, Little Chalfont, 英国] で放射活性なしで標識した。ハイブリダイゼーション及び検出は、製品に添付されている指示書にしたがって行った。結果を表 12 及び 13 に要約する。

表 12

PCR 及び／又はサザンブロッティングによる *cfp7*, *cfp9* 及び *mpt51* 遺伝子及びウ
 エスタンブロッティングによる MPT51 タンパク質の種内(intraspecies)解析

種及び株	PCR			サザン プロット			ウェスタン プロット
	<i>cfp7</i>	<i>cfp9</i>	<i>mpt51</i>	<i>cfp7</i>	<i>cfp9</i>	<i>mpt51</i>	
1. <i>M. tub.</i> H37Rv	+	+	+	+	+	+	+
2. <i>M. tub.</i> H37Ra	+	+	+	N.D.	N.D.	+	+
3. <i>M. tub.</i> Erdmann	+	+	+	+	+	+	+
4. <i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+
5. <i>M. bovis</i> BCG Da- nish 1331	+	+	+	+	+	+	+
6. <i>M. bovis</i> BCG Japan	+	+	N.D.	+	+	+	N.D.
7. <i>M. bovis</i> BCG Chi- nese	+	+	N.D.	+	+	N.D.	N.D.
8. <i>M. bovis</i> BCG Ca- nadian	+	+	N.D.	+	+	N.D.	N.D.
9. <i>M. bovis</i> BCG Claxo	+	+	N.D.	+	+	N.D.	N.D.
10. <i>M. bovis</i> BCG Rus- sia	+	+	N.D.	+	+	N.D.	N.D.
11. <i>M. bovis</i> BCG Pasteur	+	+	N.D.	+	+	N.D.	N.D.
12. <i>M. africanum</i>	+	+	+	+	+	+	+
13. <i>M. leprae</i>	-	-	-	-	-	-	-
14. <i>M. avium</i>	+	+	-	+	+	+	-
15. <i>M. kansasii</i>	+	-	-	+	+	+	-
16. <i>M. marinum</i>	-	(+)	-	+	+	+	-
17. <i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-	-	-	-	-
18. <i>M. intercellulare</i>	+	(+)	-	+	+	+	-
19. <i>M. fortuitum</i>	-	-	-	-	-	-	-
20. <i>M. flavescens</i>	+	(+)	-	+	+	+	N.D.
21. <i>M. xenopi</i>	-	-	-	N.D.	N.D.	+	-
22. <i>M. szulgai</i>	(+)	(+)	-	-	+	-	-
23. <i>M. terrae</i>	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

＋；陽性反応、－；反応なし、N.D.；測定せず

cfp7, *cfp9* 及び *mpt51* は、BCG 及びその環境マイコバクテリア；マイコバクテリウム・アビウム、マイコバクテリウム・カンサシイ (*M. kansasii*)、マイコバクテリウム・マリナム (*M. marinum*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*M. intracellular*) 及びマイコバクテリウム・フラベッセンス (*M. flavescens*) を含む結核菌複合体に見出された。*cfp9* は、さらにマイコバクテリウム・シュルガイ (*M. szulgai*) に見られ、*mpt51* は、マイコバクテリウム・ゼノピ (*M. xenopi*) に見出された。

さらに、異なるマイコバクテリア株由来の培養液中中の天然のMPT51の存在は、Mab HBT4を用いて展開したウェスタンプロットで研究した。

結核菌H37Rv、Ra、Erdman、マイコバクテリウム・ボビスAN5、マイコバクテリウム・ボビスBCG垂株ダニシュ1331及びマイコバクテリウム・アフリカヌムには、約26kDaに強力なバンドがある。いずれの他の試験されたマイコバクテリア株にも、バンドは見られなかった。

。

表 13a

サザンブロッティングによる *rd1-orf2*, *rd1-orf3*, *rd1-orf4*, *rd1-orf5*, *rd1-orf8*, *rd1-orf9a* 及び *rd1-orf9b* 遺伝子の種内解析

種及び株	<i>rd1-orf2</i>	<i>rd1-orf3</i>	<i>rd1-orf4</i>	<i>rd1-orf5</i>	<i>rd1-orf8</i>	<i>rd1-orf9a</i>	<i>rd1-orf9b</i>
1. <i>M. tub.</i> H37Rv	+	+	+	+	+	+	+
2. <i>M. bovis</i>	+	+	+	+	N.D.	+	+
3. <i>M. bovis</i> BCG Danish 1331	+	-	-	-	N.D.	-	-
4. <i>M. bovis</i> BCG Japan	+	-	-	-	N.D.	-	-
5. <i>M. avium</i>	-	-	-	-	N.D.	-	-
6. <i>M. kansasii</i>	-	-	-	-	N.D.	-	-
7. <i>M. marinum</i>	+	-	+	-	N.D.	-	-
8. <i>M. scrofulaceum</i>	+	-	-	-	N.D.	-	-
9. <i>M. intercellulare</i>	-	-	-	-	N.D.	-	-
10. <i>M. fortuitum</i>	-	-	-	-	N.D.	-	-
11. <i>M. xenopi</i>	-	-	-	-	N.D.	-	-
12. <i>M. szulgai</i>	+	-	-	-	N.D.	-	-

10

20

＋；陽性反応、－；反応なし、N.D.；測定せず

rd1-orf2, *rd1-orf3*, *rd1-orf4*, *rd1-orf5*, *rd1-orf8*, *rd1-orf9a* 及び *rd1-orf9b* についての陽性の結果は、結核菌及びマイコバクテリウム・ボビス由来のゲノムDNAを用いた際にのみ得られ、*rd1-orf4*がマイコバクテリウム・マリナムにも見出された以外はマイコバクテリウム・ボビス又は分析された他のマイコバクテリアからも得られなかった。

異なるマイコバクテリア種での *cfp7a*, *cfp7b*, *cfp10a*, *cfp17*, *cfp20*, *cfp21*, *cfp22*, *cfp22a*, *cfp23*, *cfp25* 及び *cfp25a* の存在

サザンブロッティングは、*rd1-orf2*, *rd1-orf3*, *rd1-orf4*, *rd1-orf5*, *rd1-orf8*, *rd1-orf9a* 及び *rd1-orf9b* について記載しているようにして行った。*cfp7a*, *cfp7b*, *cfp10a*, *cfp17*, *cfp20*, *cfp21*, *cfp22*, *cfp22a*, *cfp23*, *cfp25* 及び *cfp25a* の遺伝子フラグメントは、個々の遺伝子をエンコードする組換えpMCT6プラスミドからPCRにより増幅した。用いたプライマー（クローニングに用いたプライマーと同じ）は、実施例3、3A及び3Bに記載する。結果を表13bに要約する。

30

表 13b

サザンブロッティングによる *cfp7a*、*cfp7b*、*cfp10a*、*cfp17*、*cfp20*、*cfp21*、*cfp22*、*cfp22a*、*cfp23*、*cfp25* 及び *cfp25a* 遺伝子の種内解析

種及び株	<i>cfp7a</i>	<i>cfp7b</i>	<i>cfp10a</i>	<i>cfp17</i>	<i>cfp20</i>	<i>cfp21</i>	<i>cfp22</i>	<i>cfp22a</i>	<i>cfp23</i>	<i>cfp25</i>	<i>cfp25a</i>
1. <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. <i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. <i>M. bovis</i> BCG Danish 1331	+	+	+	+	+	N.D.	+	+	+	+	+
4. <i>M. bovis</i> BCG Japan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. <i>M. avium</i>	+	N.D.	-	+	-	+	+	+	+	+	-
6. <i>M. kansasii</i>	-	N.D.	+	-	-	-	+	-	+	-	-
7. <i>M. marinum</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8. <i>M. scrofulaceum</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9. <i>M. intercellulare</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
10. <i>M. fortuitum</i>	-	N.D.	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11. <i>M. xenopi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. <i>M. szulgai</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

＋；陽性反応、－；反応なし、N.D.；測定せず

10

20

参照文献リスト

- Andersen, P. 及び Heron, I., 1993, *J. Immunol. Methods* **161**: 29-39.
- Andersen, A. B. et al., 1992, *Infect. Immun.* **60**: 2317-2323.
- Andersen P., 1994, *Infect. Immun.* **62**: 2536-44.
- Andersen P. et al., 1995, *J. Immunol.* **154**: 3359-72
- Barkholt, V. 及び Jensen, A. L., 1989, *Anal. Biochem.* **177**: 318-322.
- Borodovsky, M., 及び J. McIninch. 1993, *Computers Chem.* **17**: 123-133. 10
- van Dyke M. W. et al., 1992. *Gene* pp. 99-104.
- Gosselin et al., 1992, *J. Immunol.* **149**: 3477-3481.
- Harboe, M. et al., 1996, *Infect. Immun.* **64**: 16-22.
- von Heijne, G., 1984, *J. Mol. Biol.* **173**: 243-251.
- Hochstrasser, D.F. et al., 1988, *Anal. Biochem.* **173**: 424-435
- Köhler, G. 及び Milstein, C., 1975, *Nature* **256**: 495-497.
- Li, H. et al., 1993, *Infect. Immun.* **61**: 1730-1734.
- Lindblad E.B. et al., 1997, *Infect. Immun.* **65**: 623-629.
- Mahairas, G. G. et al., 1996, *J. Bacteriol* **178**: 1274-1282. 20
- Maniatis T. et al., 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Nagai, S. et al., 1991, *Infect. Immun.* **59**: 372-382.
- Oettinger, T. 及び Andersen, A. B., 1994, *Infect. Immun.* **62**: 2058-2064.
- Ohara, N. et al., 1995, *Scand. J. immunol.* **41**: 233-442.
- Pal P. G. 及び Horwitz M. A., 1992, *Infect. Immun.* **60**: 4781-92.
- Pearson, W. R. 及び Lipman D. J., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Ploug, M. et al., 1989, *Anal. Biochem.* **181**: 33-39.
- Porath, J. et al., 1985, *FEBS Lett.* **185**: 306-310. 30
- Roberts, A.D. et al., 1995, *Immunol.* **85**: 502-508.
- Sørensen, A.L. et al., 1995, *Infect. Immun.* **63**: 1710-1717.
- Theisen, M. et al., 1995, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**: 30-34.
- Valdés-Stauber, N. 及び Scherer, S., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3809-3814.
- Valdés-Stauber, N. 及び Scherer, S., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1283-1286.
- Williams, N., 1996, *Science* **272**: 27.
- Young, R. A. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2583-2587.

配列リスト

- (1) 一般的情報: 40
- (i) 出願人:
- (A) 名称: スタテンス セールム インスティトゥート
- (B) 通り: アルティラリイベイ 5
- (C) 都市: コペンハーゲン
- (E) 国: デンマーク
- (F) 郵便番号 (ZIP): 2300 エス
- (ii) 発明の名称: 結核菌由来の核酸フラグメント及びポリペプチドフラグメント
- (iii) 配列総数: 173
- (iv) コンピューター読み取り可能なフォーム:
- (A) 媒体の型: フロッピーディスク 50

(B) コンピューター：IBM PC コンパチブル

(C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントインリリース #1.0 バージョン #1.30

(2) SEQ ID NO: 1 : の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：381塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：二本鎖

(D) トポロジー：環状

(ii) 分子の型：DNA (ゲノム)

10

(vi) 起源：

(A) 生物名：マイコバクテリウム・ツベルクローシス (Mycobacterium tuberculosis)

(B) 株名：H37Rv

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：CDS

(B) 存在位置：91..381

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：- 35_signal

(B) 存在位置：14..19

(ix) 配列の特徴：

20

(A) 名称 / キー：- 10_signal

(B) 存在位置：47..50

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：RBS

(B) 存在位置：78..84

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：mat_peptide

(B) 存在位置：91..381

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 1

GGCCGCCGGT ACCTATGTGG CCGCCGATGC TCGGACGCG TCGACCTATA CCGGGTTCTG 60

30

ATCGAACCCT GCTGACCGAG AGGACTTGTG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC 114
Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr
1 5

CCC GCG ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG 162
Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr
10 15 20

CTG CAG AGC TTG GGT GCC GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG 210
Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln
25 30 35 40

AGT GCG TGG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG TAT CAG GCG TGG CAG GCA 258
Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala
45 50 55

40

CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CGG GCC TAT CAT GCG ATG 306
Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met
60 65 70

TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC 354
Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr
75 80 85

GCC GAA GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG 381
Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
90 95

(2) SEQ ID NO: 2 : の情報

50

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 96アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly
 1           5           10           15
Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile
      20           25           30
Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly
      35           40           45
Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp
      50           55           60
Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr
      65           70           75           80
Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
      85           90           95

```

10

20

(2) SEQ ID NO: 3: の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 467塩基対

(A) 配列の型: 核酸

(A) 鎖: 二本鎖

(B) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

30

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: CDS

(B) 存在位置: 141..467

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: - 10_signal

(B) 存在位置: 73..78

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: - 35_signal

(B) 存在位置: 4..9

(ix) 配列の特徴:

40

(A) 名称 / キー: RBS

(B) 存在位置: 123..130

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 141..467

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 3

GGGTAGCCGG ACCACGGCTG GGCAAAGATG TGCAGGCCGC CATCAAGGCG GTCAAGGCCG	60	
GCGACGGCGT CATAAACCCG GACGGCACCT TGTTGGCGGG CCCC GCGGTG CTGACGCCCC	120	
ACGAGTACAA CTCCCGGCTG GTG GCC GCC GAC CCG GAG TCC ACC GCG GCG	170	
Met Ala Ala Asp Pro Glu Ser Thr Ala Ala		
1 5 10		
TTG CCC GAC GGC GCC GGG CTG GTC GTT CTG GAT GGC ACC GTC ACT GCC	218	
Leu Pro Asp Gly Ala Gly Leu Val Val Leu Asp Gly Thr Val Thr Ala		
15 20 25		
GAA CTC GAA GCC GAG GGC TGG GCC AAA GAT CGC ATC CGC GAA CTG CAA	266	10
Glu Leu Glu Ala Glu Gly Trp Ala Lys Asp Arg Ile Arg Glu Leu Gln		
30 35 40		
GAG CTG CGT AAG TCG ACC GGG CTG GAC GTT TCC GAC CGC ATC CGG GTG	314	
Glu Leu Arg Lys Ser Thr Gly Leu Asp Val Ser Asp Arg Ile Arg Val		
45 50 55		
GTG ATG TCG GTG CCT GCG GAA CGC GAA GAC TGG GCG CGC ACC CAT CGC	362	
Val Met Ser Val Pro Ala Glu Arg Glu Asp Trp Ala Arg Thr His Arg		
60 65 70		
GAC CTC ATT GCC GGA GAA ATC TTG GCT ACC GAC TTC GAA TTC GCC GAC	410	
Asp Leu Ile Ala Gly Glu Ile Leu Ala Thr Asp Phe Glu Phe Ala Asp		
75 80 85 90		
CTC GCC GAT GGT GTG GCC ATC GGC GAC GGC GTG CGG GTA AGC ATC GAA	458	20
Leu Ala Asp Gly Val Ala Ile Gly Asp Gly Val Arg Val Ser Ile Glu		
95 100 105		
AAG ACC TGA		
Lys Thr	467	
(2) SEQ ID NO: 4 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 108 アミノ酸		
(B) 配列の型 : アミノ酸		
(D) トポロジ : 直鎖状		
(ii) 分子の型 : タンパク質		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO: 4 :		30
Met Ala Ala Asp Pro Glu Ser Thr Ala Ala Leu Pro Asp Gly Ala Gly		
1 5 10 15		
Leu Val Val Leu Asp Gly Thr Val Thr Ala Glu Leu Glu Ala Glu Gly		
20 25 30		
Trp Ala Lys Asp Arg Ile Arg Glu Leu Gln Glu Leu Arg Lys Ser Thr		
35 40 45		
Gly Leu Asp Val Ser Asp Arg Ile Arg Val Val Met Ser Val Pro Ala		
50 55 60		
Glu Arg Glu Asp Trp Ala Arg Thr His Arg Asp Leu Ile Ala Gly Glu		40
65 70 75 80		
Ile Leu Ala Thr Asp Phe Glu Phe Ala Asp Leu Ala Asp Gly Val Ala		
85 90 95		
Ile Gly Asp Gly Val Arg Val Ser Ile Glu Lys Thr		
100 105		
(2) SEQ ID NO: 5 の情報		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 889 塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		50

(C) 鎖：二本鎖
 (D) トポロジー：環状
 (ii) 分子の型：DNA (ゲノム)
 (vi) 起源：
 (A) 生物名：マイコバクテリウム・ツベルクローシス
 (B) 株名：H37Rv

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：CDS
 (B) 存在位置：201..689

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：sig_peptide
 (B) 存在位置：201..290

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：mat_peptide
 (B) 存在位置：291..689

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 5 :

CGGGTCTGCA CGGATCCGGG CCGGGCAGGG CAATCGAGCC TGGGATCCGC TGGGGTGCGC	60
ACATCGCGGA CCCGTGCGCG GTACGGTCGA GACAGCGGCA CGAGAAAGTA GTAAGGGCGA	120
TAATAGGCGG TAAAGAGTAG CGGGAAGCCG GCCGAACGAC TCGGTCAGAC AACGCCACAG	180
CGGCCAGTGA GGAGCAGCGG GTG ACG GAC ATG AAC CCG GAT ATT GAG AAG	230
Met Thr Asp Met Asn Pro Asp Ile Glu Lys	
-30 -25	
GAC CAG ACC TCC GAT GAA GTC ACG GTA GAG ACG ACC TCC GTC TTC CGC	278
Asp Gln Thr Ser Asp Glu Val Thr Val Glu Thr Thr Ser Val Phe Arg	
-20 -15 -10 -5	
GCA GAC TTC CTC AGC GAG CTG GAC GCT CCT GCG CAA GCG GGT ACG GAG	326
Ala Asp Phe Leu Ser Glu Leu Asp Ala Pro Ala Gln Ala Gly Thr Glu	
1 5 10	
AGC GCG GTC TCC GGG GTG GAA GGG CTC CCG CCG GGC TCG GCG TTG CTG	374
Ser Ala Val Ser Gly Val Glu Gly Leu Pro Pro Gly Ser Ala Leu Leu	
15 20 25	
GTA GTC AAA CGA GGC CCC AAC GCC GGG TCC CGG TTC CTA CTC GAC CAA	422
Val Val Lys Arg Gly Pro Asn Ala Gly Ser Arg Phe Leu Leu Asp Gln	
30 35 40	
GCC ATC ACG TCG GCT GGT CGG CAT CCC GAC AGC GAC ATA TTT CTC GAC	470
Ala Ile Thr Ser Ala Gly Arg His Pro Asp Ser Asp Ile Phe Leu Asp	
45 50 55 60	
GAC GTG ACC GTG AGC CGT CGC CAT GCT GAA TTC CGG TTG GAA AAC AAC	518
Asp Val Thr Val Ser Arg Arg His Ala Glu Phe Arg Leu Glu Asn Asn	
65 70 75	
GAA TTC AAT GTC GTC GAT GTC GGG AGT CTC AAC GGC ACC TAC GTC AAC	566
Glu Phe Asn Val Val Asp Val Gly Ser Leu Asn Gly Thr Tyr Val Asn	
80 85 90	
CGC GAG CCC GTG GAT TCG GCG GTG CTG GCG AAC GGC GAC GAG GTC CAG	614
Arg Glu Pro Val Asp Ser Ala Val Leu Ala Asn Gly Asp Glu Val Gln	
95 100 105	
ATC GGC AAG TTC CGG TTG GTG TTC TTG ACC GGA CCC AAG CAA GGC GAG	662
Ile Gly Lys Phe Arg Leu Val Phe Leu Thr Gly Pro Lys Gln Gly Glu	
110 115 120	
GAT GAC GGG AGT ACC GGG GGC CCG TGA GCGACCCGA TAGCCCCGCG	709
Asp Asp Gly Ser Thr Gly Gly Pro	
125 130	
CTGGCCGGGA TGTCGATCGG GGCGGTCCTC GACCTGCTAC GACCGGATTT TCCTGATGTC	769
ACCATCTCCA AGATTGATT CTTGGAGGCT GAGGGTCTGG TGACGCCCCG GCGGGCCTCA	829
TCGGGGTATC GGCGGTTTAC CGCATACGAC TGCGCACGGC TGCGATTCAT TCTCACTGCC	889

10

20

30

40

50

(2) SEQ ID NO: 6 の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 162 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 6:

```

Met Thr Asp Met Asn Pro Asp Ile Glu Lys Asp Gln Thr Ser Asp Glu
-30          -25          -20          -15

Val Thr Val Glu Thr Thr Ser Val Phe Arg Ala Asp Phe Leu Ser Glu
          -10          -5          1
10

Leu Asp Ala Pro Ala Gln Ala Gly Thr Glu Ser Ala Val Ser Gly Val
          5          10          15

Glu Gly Leu Pro Pro Gly Ser Ala Leu Leu Val Val Lys Arg Gly Pro
          20          25          30

Asn Ala Gly Ser Arg Phe Leu Leu Asp Gln Ala Ile Thr Ser Ala Gly
          35          40          45          50

Arg His Pro Asp Ser Asp Ile Phe Leu Asp Asp Val Thr Val Ser Arg
          55          60          65

Arg His Ala Glu Phe Arg Leu Glu Asn Asn Glu Phe Asn Val Val Asp
          70          75          80
20

Val Gly Ser Leu Asn Gly Thr Tyr Val Asn Arg Glu Pro Val Asp Ser
          85          90          95

Ala Val Leu Ala Asn Gly Asp Glu Val Gln Ile Gly Lys Phe Arg Leu
          100          105          110

Val Phe Leu Thr Gly Pro Lys Gln Gly Glu Asp Asp Gly Ser Thr Gly
115          120          125          130

```

Gly Pro

(2) SEQ ID NO: 7 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 898 塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: CDS

(B) 存在位置: 201..698

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 201..698

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 7:

10

20

30

40

30

(2) SEQ ID NO: 8 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：165アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：タンパク質

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 8：

Met Ala Gln Ile Thr Leu Arg Gly Asn Ala Ile Asn Thr Val Gly Glu
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala Val Gly Ser Pro Ala Pro Ala Phe Thr Leu Thr Gly Gly
 20 25 30
 Asp Leu Gly Val Ile Ser Ser Asp Gln Phe Arg Gly Lys Ser Val Leu
 35 40 45
 Leu Asn Ile Phe Pro Ser Val Asp Thr Pro Val Cys Ala Thr Ser Val
 50 55 60
 Arg Thr Phe Asp Glu Arg Ala Ala Ala Ser Gly Ala Thr Val Leu Cys
 65 70 75 80
 Val Ser Lys Asp Leu Pro Phe Ala Gln Lys Arg Phe Cys Gly Ala Glu
 85 90 95
 Gly Thr Glu Asn Val Met Pro Ala Ser Ala Phe Arg Asp Ser Phe Gly
 100 105 110
 Glu Asp Tyr Gly Val Thr Ile Ala Asp Gly Pro Met Ala Gly Leu Leu
 115 120 125
 Ala Arg Ala Ile Val Val Ile Gly Ala Asp Gly Asn Val Ala Tyr Thr
 130 135 140
 Glu Leu Val Pro Glu Ile Ala Gln Glu Pro Asn Tyr Glu Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Ala
 165

10

20

(2) SEQ ID NO: 9 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1054塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: CDS

(B) 存在位置: 201..854

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: sig_peptide

(B) 存在位置: 201..296

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 297..854

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 9:

30

40

ATAATCAGCT CACCGTTGGG ACCGACCTCG ACCAGGGGTC CTTTGTGACT GCCGGGCTTG	60	
ACGCGGACGA CCACAGAGTC GGTCATCGCC TAAGGCTACC GTTCTGACCT GGGGCTGCGT	120	
GGGCGCCGAC GACGTGAGGC ACGTCATGTC TCAGCGGCCC ACCGCCACCT CGGTCGCCGG	180	
 CAGTATGTCA GCATGTGCAG ATG ACT CCA CGC AGC CTT GTT CGC ATC GTT	230	
Met Thr Pro Arg Ser Leu Val Arg Ile Val		
-32 -30 -25		
 GGT GTC GTG GTT GCG ACG ACC TTG GCG CTG GTG AGC GCA CCC GCC GGC	278	10
Gly Val Val Val Ala Thr Thr Leu Ala Leu Val Ser Ala Pro Ala Gly		
-20 -15 -10		
 GGT CGT GCC GCG CAT GCG GAT CCG TGT TCG GAC ATC GCG GTC GTT TTC	326	
Gly Arg Ala Ala His Ala Asp Pro Cys Ser Asp Ile Ala Val Val Phe		
-5 1 5 10		
 GCT CGC GGC ACG CAT CAG GCT TCT GGT CTT GGC GAC GTC GGT GAG GCG	374	
Ala Arg Gly Thr His Gln Ala Ser Gly Leu Gly Asp Val Gly Glu Ala		
15 20 25		
 TTC GTC GAC TCG CTT ACC TCG CAA GTT GGC GGG CGG TCG ATT GGG GTC	422	20
Phe Val Asp Ser Leu Thr Ser Gln Val Gly Gly Arg Ser Ile Gly Val		
30 35 40		
 TAC GCG GTG AAC TAC CCA GCA AGC GAC GAC TAC CGC GCG AGC GCG TCA	470	
Tyr Ala Val Asn Tyr Pro Ala Ser Asp Asp Tyr Arg Ala Ser Ala Ser		
45 50 55		

AAC GGT TCC GAT GAT GCG AGC GCC CAC ATC CAG CGC ACC GTC GCC AGC	518	
Asn Gly Ser Asp Asp Ala Ser Ala His Ile Gln Arg Thr Val Ala Ser		
60 65 70		
TGC CCG AAC ACC AGG ATT GTG CTT GGT GGC TAT TCG CAG GGT GCG ACG	566	
Cys Pro Asn Thr Arg Ile Val Leu Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Thr		
75 80 85 90		
GTC ATC GAT TTG TCC ACC TCG GCG ATG CCG CCC GCG GTG GCA GAT CAT	614	
Val Ile Asp Leu Ser Thr Ser Ala Met Pro Pro Ala Val Ala Asp His		
95 100 105		
GTC GCC GCT GTC GCC CTT TTC GGC GAG CCA TCC AGT GGT TTC TCC AGC	662	10
Val Ala Ala Val Ala Leu Phe Gly Glu Pro Ser Ser Gly Phe Ser Ser		
110 115 120		
ATG TTG TGG GGC GGC GGG TCG TTG CCG ACA ATC GGT CCG CTG TAT AGC	710	
Met Leu Trp Gly Gly Gly Ser Leu Pro Thr Ile Gly Pro Leu Tyr Ser		
125 130 135		
TCT AAG ACC ATA AAC TTG TGT GCT CCC GAC GAT CCA ATA TGC ACC GGA	758	
Ser Lys Thr Ile Asn Leu Cys Ala Pro Asp Asp Pro Ile Cys Thr Gly		
140 145 150		
GGC GGC AAT ATT ATG GCG CAT GTT TCG TAT GTT CAG TCG GGG ATG ACA	806	20
Gly Gly Asn Ile Met Ala His Val Ser Tyr Val Gln Ser Gly Met Thr		
155 160 165 170		
AGC CAG GCG GCG ACA TTC GCG GCG AAC AGG CTC GAT CAC GCC GGA TGA	854	
Ser Gln Ala Ala Thr Phe Ala Ala Asn Arg Leu Asp His Ala Gly		
175 180 185		
TCAAAGACTG TTGTCCCTAT ACCGCTGGGG CTGTAGTCGA TGTACACCGG CTGGAATCTG	914	
AAGGGCAAGA ACCCGGTATT CATCAGGCCG GATGAAATGA CGGTCGGGCG GTAATCGTTT	974	
GTGTTGAACG CGTAGAGCCG ATCACCGCCG GGGCTGGTGT AGACCTCAAT GTTTGTGTTC	1034	30
GCCGGCAGGG TTCCGGATCC	1054	

(2) SEQ ID NO: 10の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 217アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 10:

Met Thr Pro Arg Ser Leu Val Arg Ile Val Gly Val Val Val Ala Thr
 -32 -30 -25 -20

Thr Leu Ala Leu Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly Arg Ala Ala His Ala
 -15 -10 -5

Asp Pro Cys Ser Asp Ile Ala Val Val Phe Ala Arg Gly Thr His Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Leu Gly Asp Val Gly Glu Ala Phe Val Asp Ser Leu Thr
 20 25 30

Ser Gln Val Gly Gly Arg Ser Ile Gly Val Tyr Ala Val Asn Tyr Pro
 35 40 45

Ala Ser Asp Asp Tyr Arg Ala Ser Ala Ser Asn Gly Ser Asp Asp Ala
 50 55 60

Ser Ala His Ile Gln Arg Thr Val Ala Ser Cys Pro Asn Thr Arg Ile
 65 70 75 80

Val Leu Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Thr Val Ile Asp Leu Ser Thr
 85 90 95

Ser Ala Met Pro Pro Ala Val Ala Asp His Val Ala Ala Val Ala Leu
 100 105 110

Phe Gly Glu Pro Ser Ser Gly Phe Ser Ser Met Leu Trp Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Leu Pro Thr Ile Gly Pro Leu Tyr Ser Ser Lys Thr Ile Asn Leu
 130 135 140

Cys Ala Pro Asp Asp Pro Ile Cys Thr Gly Gly Gly Asn Ile Met Ala
 145 150 155 160

His Val Ser Tyr Val Gln Ser Gly Met Thr Ser Gln Ala Ala Thr Phe
 165 170 175

Ala Ala Asn Arg Leu Asp His Ala Gly
 180 185

(2) SEQ ID NO: 11の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 949塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: CDS

(B) 存在位置: 201..749

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 224..749

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 11:

AGCCGCTCGC GTGGGGTCAA CCGGGTTTCC ACCTGCTCAC TCATTTTGCC GCCTTTCTGT	60	
GTCCGGGCGC AGGCTTGCGC TCAATAACTC GGTCAAGTTC CTTACAGAC TGCCATCACT	120	
GGCCCCGTCGG CGGGCTCGTT GCGGGTGCGC CGCGTGCGGG TTTGTGTTCC GGGCACCGGG	180	
TGGGGGCCCC CCCGGGCGTA ATG GCA GAC TGT GAT TCC GTG ACT AAC AGC	230	
Met Ala Asp Cys Asp Ser Val Thr Asn Ser		
-7 -5 1		
CCC CTT GCG ACC GCT ACC GCC ACG CTG CAC ACT AAC CGC GGC GAC ATC	278	
Pro Leu Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu His Thr Asn Arg Gly Asp Ile		
5 10 15		
AAG ATC GCC CTG TTC GGA AAC CAT GCG CCC AAG ACC GTC GCC AAT TTT	326	
Lys Ile Ala Leu Phe Gly Asn His Ala Pro Lys Thr Val Ala Asn Phe		
20 25 30 35		10
GTG GGC CTT GCG CAG GGC ACC AAG GAC TAT TCG ACC CAA AAC GCA TCA	374	
Val Gly Leu Ala Gln Gly Thr Lys Asp Tyr Ser Thr Gln Asn Ala Ser		
40 45 50		
GGT GGC CCG TCC GGC CCG TTC TAC GAC GGC GCG GTC TTT CAC CGG GTG	422	
Gly Gly Pro Ser Gly Pro Phe Tyr Asp Gly Ala Val Phe His Arg Val		
55 60 65		
ATC CAG GGC TTC ATG ATC CAG GGT GGC GAT CCA ACC GGG ACG GGT CGC	470	
Ile Gln Gly Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Pro Thr Gly Thr Gly Arg		
70 75 80		
GGC GGA CCC GGC TAC AAG TTC GCC GAC GAG TTC CAC CCC GAG CTG CAA	518	
Gly Gly Pro Gly Tyr Lys Phe Ala Asp Glu Phe His Pro Glu Leu Gln		
85 90 95		20
TTC GAC AAG CCC TAT CTG CTC GCG ATG GCC AAC GCC GGT CCG GGC ACC	566	
Phe Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Ala Met Ala Asn Ala Gly Pro Gly Thr		
100 105 110 115		
AAC GGC TCA CAG TTT TTC ATC ACC GTC GGC AAG ACT CCG CAC CTG AAC	614	
Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Val Gly Lys Thr Pro His Leu Asn		
120 125 130		
CGG CGC CAC ACC ATT TTC GGT GAA GTG ATC GAC GCG GAG TCA CAG CGG	662	
Arg Arg His Thr Ile Phe Gly Glu Val Ile Asp Ala Glu Ser Gln Arg		
135 140 145		
GTT GTG GAG GCG ATC TCC AAG ACG GCC ACC GAC GGC AAC GAT CGG CCG	710	
Val Val Glu Ala Ile Ser Lys Thr Ala Thr Asp Gly Asn Asp Arg Pro		
150 155 160		
ACG GAC CCG GTG GTG ATC GAG TCG ATC ACC ATC TCC TGA CCCGAAGCTA	759	
Thr Asp Pro Val Val Ile Glu Ser Ile Thr Ile Ser		
165 170 175		30
CGTCGGCTCG TCGCTCGAAT ACACCTTG TG GACCCGCCAG GGCACGTGGC GGTACACCGA	819	
CACGCCGTTG GGGCCGTTCA ACCGGACGCC CTCACGCCAA GTCCGCTCAC CTTTGCCCGC	879	
GACCCGGCGTA ACCGGCAGCG GTAAGCGCAT CGAGCACCTC CACTGGGTGCG GTGCCGAGAT	939	
CCCAGCGGGA	949	

(2) SEQ ID NO: 12の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 182アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 12:

Met Ala Asp Cys Asp Ser Val Thr Asn Ser Pro Leu Ala Thr Ala Thr
 -7 -5 1 5

Ala Thr Leu His Thr Asn Arg Gly Asp Ile Lys Ile Ala Leu Phe Gly
 10 15 20 25

Asn His Ala Pro Lys Thr Val Ala Asn Phe Val Gly Leu Ala Gln Gly
 30 35 40

Thr Lys Asp Tyr Ser Thr Gln Asn Ala Ser Gly Gly Pro Ser Gly Pro
 45 50 55

Phe Tyr Asp Gly Ala Val Phe His Arg Val Ile Gln Gly Phe Met Ile
 60 65 70

Gln Gly Gly Asp Pro Thr Gly Thr Gly Arg Gly Gly Pro Gly Tyr Lys
 75 80 85

Phe Ala Asp Glu Phe His Pro Glu Leu Gln Phe Asp Lys Pro Tyr Leu
 90 95 100 105

Leu Ala Met Ala Asn Ala Gly Pro Gly Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe
 110 115 120

Ile Thr Val Gly Lys Thr Pro His Leu Asn Arg Arg His Thr Ile Phe
 125 130 135

Gly Glu Val Ile Asp Ala Glu Ser Gln Arg Val Val Glu Ala Ile Ser
 140 145 150

Lys Thr Ala Thr Asp Gly Asn Asp Arg Pro Thr Asp Pro Val Val Ile
 155 160 165

Glu Ser Ile Thr Ile Ser
 170 175

(2) SEQ ID NO: 13の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1060塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: CDS

(B) 存在位置: 201..860

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: sig_peptide

(B) 存在位置: 201..296

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 297..860

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 13:

TGGACCTTCA CCGGCGGTCC CTTCGCTTCG GGGGCGACAC CTAACATACT GGTGTCACAC	60	
CTACCGCGAC ACCGCTGGGA CTTTGTGCCA TTGCCGGCCA CTCGGGGCCG CTGCGGCCTG	120	
GAAAAATTGG TCGGGCACGG GCGGCGCGG GTCGCTACCA TCCCACTGTG AATGATTAC	180	
TGACCGCGCG ACTGCTCACC ATG GGC GCG GCC GCC GCA ATG CTG GCC GCG	230	
Met Gly Ala Ala Ala Ala Met Leu Ala Ala		
-32 -30 -25		
GTG CTT CTG CTT ACT CCC ATC ACC GTT CCC GCC GGC TAC CCC GGT GCC	278	
Val Leu Leu Leu Thr Pro Ile Thr Val Pro Ala Gly Tyr Pro Gly Ala		
-20 -15 -10		
GTT GCA CCG GCC ACT GCA GCC TGC CCC GAC GCC GAA GTG GTG TTC GCC	326	
Val Ala Pro Ala Thr Ala Ala Cys Pro Asp Ala Glu Val Val Phe Ala		
-5 1 5 10		
CGC GGC CGC TTC GAA CCG CCC GGG ATT GGC ACG GTC GGC AAC GCA TTC	374	
Arg Gly Arg Phe Pro Pro Gly Ile Gly Thr Val Gly Asn Ala Phe		
15 20 25		
GTC AGC GCG CTG CGC TCG AAG GTC AAC AAG AAT GTC GGG GTC TAC GCG	422	
Val Ser Ala Leu Arg Ser Lys Val Asn Lys Asn Val Gly Val Tyr Ala		
30 35 40		
GTG AAA TAC CCC GCC GAC AAT CAG ATC GAT GTG GGC GCC AAC GAC ATG	470	
Val Lys Tyr Pro Ala Asp Asn Gln Ile Asp Val Gly Ala Asn Asp Met		
45 50 55		
AGC GCC CAC ATT CAG AGC ATG GCC AAC AGC TGT CCG AAT ACC CGC CTG	518	
Ser Ala His Ile Gln Ser Met Ala Asn Ser Cys Pro Asn Thr Arg Leu		
60 65 70		
GTG CCC GGC GGT TAC TCG CTG GGC GCG GCC GTC ACC GAC GTG GTA CTC	566	
Val Pro Gly Gly Tyr Ser Leu Gly Ala Ala Val Thr Asp Val Val Leu		
75 80 85 90		
GCG GTG CCC ACC CAG ATG TGG GGC TTC ACC AAT CCC CTG CCT CCC GGC	614	
Ala Val Pro Thr Gln Met Trp Gly Phe Thr Asn Pro Leu Pro Pro Gly		
95 100 105		
AGT GAT GAG CAC ATC GCC GCG GTC GCG CTG TTC GGC AAT GGC AGT CAG	662	
Ser Asp Glu His Ile Ala Ala Val Ala Leu Phe Gly Asn Gly Ser Gln		
110 115 120		
TGG GTC GGC CCC ATC ACC AAC TTC AGC CCC GCC TAC AAC GAT CGG ACC	710	
Trp Val Gly Pro Ile Thr Asn Phe Ser Pro Ala Tyr Asn Asp Arg Thr		
125 130 135		
ATC GAG TTG TGT CAC GGC GAC GAC CCC GTC TGC CAC CCT GCC GAC CCC	758	
Ile Glu Leu Cys His Gly Asp Asp Pro Val Cys His Pro Ala Asp Pro		
140 145 150		
AAC ACC TGG GAG GCC AAC TGG CCC CAG CAC CTC GCC GGG GCC TAT GTC	806	
Asn Thr Trp Glu Ala Asn Trp Pro Gln His Leu Ala Gly Ala Tyr Val		
155 160 165 170		
TCG TCG GGC ATG GTC AAC CAG GCG GCT GAC TTC GTT GCC GGA AAG CTG	854	
Ser Ser Gly Met Val Asn Gln Ala Ala Asp Phe Val Ala Gly Lys Leu		
175 180 185		
CAA TAG CCACCTAGCC CGTGCGCGAG TCTTTGCTTC ACGCTTTCGC TAACCGACCA	910	
Gln		
ACGCGCGCAC GATGGAGGGG TCCGTGGTCA TATCAAGACA AGAAGGGAGT AGGCGATGCA	970	
CGCAAAAGTC GGCGACTACC TCGTGGTGAA GGGCACAACC ACGGAACGGC ATGATCAACA	1030	
TGCTGAGATC ATCGAGGTGC GCTCCGCAGA	1060	
(2) SEQ ID NO: 14の情報:		
(i) 配列の特徴:		
(A) 配列の長さ: 219アミノ酸		
(B) 配列の型: アミノ酸		
(D) トポロジー: 直鎖状		
(ii) 分子の型: タンパク質		
(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 14:		

10

20

30

40

Met Gly Ala Ala Ala Ala Met Leu Ala Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro
 -32 -30 -25 -20

Ile Thr Val Pro Ala Gly Tyr Pro Gly Ala Val Ala Pro Ala Thr Ala
 -15 -10 -5

Ala Cys Pro Asp Ala Glu Val Val Phe Ala Arg Gly Arg Phe Glu Pro
 1 5 10 15

Pro Gly Ile Gly Thr Val Gly Asn Ala Phe Val Ser Ala Leu Arg Ser
 20 25 30

Lys Val Asn Lys Asn Val Gly Val Tyr Ala Val Lys Tyr Pro Ala Asp
 35 40 45

Asn Gln Ile Asp Val Gly Ala Asn Asp Met Ser Ala His Ile Gln Ser
 50 55 60

Met Ala Asn Ser Cys Pro Asn Thr Arg Leu Val Pro Gly Gly Tyr Ser
 65 70 75 80

Leu Gly Ala Ala Val Thr Asp Val Val Leu Ala Val Pro Thr Gln Met
 85 90 95

Trp Gly Phe Thr Asn Pro Leu Pro Pro Gly Ser Asp Glu His Ile Ala
 100 105 110

Ala Val Ala Leu Phe Gly Asn Gly Ser Gln Trp Val Gly Pro Ile Thr
 115 120 125

Asn Phe Ser Pro Ala Tyr Asn Asp Arg Thr Ile Glu Leu Cys His Gly
 130 135 140

Asp Asp Pro Val Cys His Pro Ala Asp Pro Asn Thr Trp Glu Ala Asn
 145 150 155 160

Trp Pro Gln His Leu Ala Gly Ala Tyr Val Ser Ser Gly Met Val Asn
 165 170 175

Gln Ala Ala Asp Phe Val Ala Gly Lys Leu Gln
 180 185

10

20

(2) SEQ ID NO: 15の情報:

30

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1198塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(ix) 配列の特徴:

40

(A) 名称 / キー: CDS

(B) 存在位置: 201..998

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 201..998

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 15:

CAGATGCTGC GCAACATGTT TCTCGGCGAT CCGGCAGGCA ACACCGATCG AGTGCTTGAC	60	
TTTTCCACCG CGGTGACCGG CGGACTGTTC TTCTACCCCA CCATCGACTT TCTCGACCAT	120	
CCACCGCCCC TACCGCAGGC GGCGACGCCA ACTCTGGCAG CCGGGTCGCT ATCGATCGGC	180	
AGCTTGAAAG GAAGCCCCCG ATG AAC AAT CTC TAC CGC GAT TTG GCA CCG	230	
Met Asn Asn Leu Tyr Arg Asp Leu Ala Pro		
1 5 10		
GTC ACC GAA GCC GCT TGG GCG GAA ATC GAA TTG GAG GCG GCG CGG ACG	278	10
Val Thr Glu Ala Ala Trp Ala Glu Ile Glu Leu Glu Ala Ala Arg Thr		
15 20 25		
TTC AAG CGA CAC ATC GCC GGG CGC CGG GTG GTC GAT GTC AGT GAT CCC	326	
Phe Lys Arg His Ile Ala Gly Arg Arg Val Val Asp Val Ser Asp Pro		
30 35 40		
GGG GGG CCC GTC ACC GCG GCG GTC AGC ACC GGC CGG CTG ATC GAT GTT	374	
Gly Gly Pro Val Thr Ala Ala Val Ser Thr Gly Arg Leu Ile Asp Val		
45 50 55		
AAG GCA CCA ACC AAC GGC GTG ATC GCC CAC CTG CGG GCC AGC AAA CCC	422	
Lys Ala Pro Thr Asn Gly Val Ile Ala His Leu Arg Ala Ser Lys Pro		
60 65 70		20
CTT GTC CGG CTA CGG GTT CCG TTT ACC CTG TCG CGC AAC GAG ATC GAC	470	
Leu Val Arg Leu Arg Val Pro Phe Thr Leu Ser Arg Asn Glu Ile Asp		
75 80 85 90		
GAC GTG GAA CGT GGC TCT AAG GAC TCC GAT TGG GAA CCG GTA AAG GAG	518	
Asp Val Glu Arg Gly Ser Lys Asp Ser Asp Trp Glu Pro Val Lys Glu		
95 100 105		
GCG GCC AAG AAG CTG GCC TTC GTC GAG GAC CGC ACA ATA TTC GAA GGC	566	
Ala Ala Lys Lys Leu Ala Phe Val Glu Asp Arg Thr Ile Phe Glu Gly		
110 115 120		30
TAC AGC GCC GCA TCA ATC GAA GGG ATC CGC AGC GCG AGT TCG AAC CCG	614	
Tyr Ser Ala Ala Ser Ile Glu Gly Ile Arg Ser Ala Ser Ser Asn Pro		
125 130 135		
GCG CTG ACG TTG CCC GAG GAT CCC CGT GAA ATC CCT GAT GTC ATC TCC	662	
Ala Leu Thr Leu Pro Glu Asp Pro Arg Glu Ile Pro Asp Val Ile Ser		
140 145 150		
CAG GCA TTG TCC GAA CTG CGG TTG GCC GGT GTG GAC GGA CCG TAT TCG	710	
Gln Ala Leu Ser Glu Leu Arg Leu Ala Gly Val Asp Gly Pro Tyr Ser		
155 160 165 170		40
GTG TTG CTC TCT GCT GAC GTC TAC ACC AAG GTT AGC GAG ACT TCC GAT	758	
Val Leu Leu Ser Ala Asp Val Tyr Thr Lys Val Ser Glu Thr Ser Asp		
175 180 185		

CAC GGC TAT CCC ATC CGT GAG CAT CTG AAC CGG CTG GTG GAC GGG GAC	806	
His Gly Tyr Pro Ile Arg Glu His Leu Asn Arg Leu Val Asp Gly Asp		
190 195 200		
ATC ATT TGG GCC CCG GCC ATC GAC GGC GCG TTC GTG CTG ACC ACT CGA	854	
Ile Ile Trp Ala Pro Ala Ile Asp Gly Ala Phe Val Leu Thr Thr Arg		
205 210 215		
GGC GGC GAC TTC GAC CTA CAG CTG GGC ACC GAC GTT GCA ATC GGG TAC	902	
Gly Gly Asp Phe Asp Leu Gln Leu Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Tyr		
220 225 230		
GCC AGC CAC GAC ACG GAC ACC GAG CGC CTC TAC CTG CAG GAG ACG CTG	950	10
Ala Ser His Asp Thr Asp Thr Glu Arg Leu Tyr Leu Gln Glu Thr Leu		
235 240 245 250		
ACG TTC CTT TGC TAC ACC GCC GAG GCG TCG GTC GCG CTC AGC CAC TAA	998	
Thr Phe Leu Cys Tyr Thr Ala Glu Ala Ser Val Ala Leu Ser His		
255 260 265		
GGCACGAGCG CGAGCAATAG CTCCTATGGC AAGCGGCCGC GGGTTGGGTG TGTTCCGAGC	1058	
TGGGCTGGTG GACGGTGCGC AGGGCCTGGA AGACGGTGCG GGCTAGGCGG CGTTTGAGGC	1118	
AGCGTAGTGC TGCGCGTTTG GTTTTCCCGG CGTCTTGACAG CCTTTGGTAG TAGGCCTGGC	1178	
CCCGGCTGTC GGTCATCCGG	1198	20

(2) SEQ ID NO: 16の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 265アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 16:

```

Met Asn Asn Leu Tyr Arg Asp Leu Ala Pro Val Thr Glu Ala Ala Trp
  1              5              10              15

Ala Glu Ile Glu Leu Glu Ala Ala Arg Thr Phe Lys Arg His Ile Ala
      20              25              30

Gly Arg Arg Val Val Asp Val Ser Asp Pro Gly Gly Pro Val Thr Ala
      35              40              45

Ala Val Ser Thr Gly Arg Leu Ile Asp Val Lys Ala Pro Thr Asn Gly
      50              55              60

Val Ile Ala His Leu Arg Ala Ser Lys Pro Leu Val Arg Leu Arg Val
      65              70              75              80

Pro Phe Thr Leu Ser Arg Asn Glu Ile Asp Asp Val Glu Arg Gly Ser
      85              90              95

Lys Asp Ser Asp Trp Glu Pro Val Lys Glu Ala Ala Lys Lys Leu Ala
      100              105              110
Phe Val Glu Asp Arg Thr Ile Phe Glu Gly Tyr Ser Ala Ala Ser Ile
      115              120              125
Glu Gly Ile Arg Ser Ala Ser Ser Asn Pro Ala Leu Thr Leu Pro Glu
      130              135              140
Asp Pro Arg Glu Ile Pro Asp Val Ile Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu
      145              150              155              160
Arg Leu Ala Gly Val Asp Gly Pro Tyr Ser Val Leu Leu Ser Ala Asp
      165              170              175
Val Tyr Thr Lys Val Ser Glu Thr Ser Asp His Gly Tyr Pro Ile Arg
      180              185              190
Glu His Leu Asn Arg Leu Val Asp Gly Asp Ile Ile Trp Ala Pro Ala
      195              200              205
Ile Asp Gly Ala Phe Val Leu Thr Thr Arg Gly Gly Asp Phe Asp Leu
      210              215              220
Gln Leu Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Tyr Ala Ser His Asp Thr Asp
      225              230              235              240
Thr Glu Arg Leu Tyr Leu Gln Glu Thr Leu Thr Phe Leu Cys Tyr Thr
      245              250              255
Ala Glu Ala Ser Val Ala Leu Ser His
      260              265

```

10

20

(2) SEQ ID NO: 17の情報:

30

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 15アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) フラグメントの型: N-terminal

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

40

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/キー: duplication

(B) 存在位置: 1

(D) 他の情報: AlaはAlaまたはSer

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/キー: duplication

(B) 存在位置: 13

(D) 他の情報: Xaaは不明

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 17:

Ala Glu Leu Asp Ala Pro Ala Gln Ala Gly Thr Glu Xaa Ala Val
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 18の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 15アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) フラグメントの型: N-terminal

10

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 18:

Ala Gln Ile Thr Leu Arg Gly Asn Ala Ile Asn Thr Val Gly Glu
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 19の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 15アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

20

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) フラグメントの型: N-terminal

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/キー: その他

(B) 存在位置: 3

30

(C) 他の情報: Xaaは不明

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 19:

Asp Pro Xaa Ser Asp Ile Ala Val Val Phe Ala Arg Gly Thr His
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 20の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 15アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

40

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) フラグメントの型: N-terminal

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 20:

Thr Asn Ser Pro Leu Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu His Thr Asn
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 21の情報:

(i) 配列の特徴:

50

- (A) 配列の長さ：15アミノ酸
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (C) 鎖：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) フラグメントの型：N-terminal
- (vi) 起源：
 - (A) 生物名：マイコバクテリウム・ツベルクローシス
 - (B) 株名：H37Rv

10

- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：その他
 - (B) 存在位置：2
 - (C) 他の情報：Xaaは不明

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 21:

Ala Xaa Pro Asp Ala Glu Val Val Phe Ala Arg Gly Arg Phe Glu
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 22の情報:

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 配列の長さ：15アミノ酸
 - (B) 配列の型、アミノ酸
 - (C) 鎖：一本鎖
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子の型：ペプチド
- (v) フラグメントの型：N-terminal
- (vi) 起源：
 - (A) 生物名：マイコバクテリウム・ツベルクローシス
 - (B) 株名：H37Rv

20

- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：その他
 - (B) 存在位置：1
 - (C) 他の情報：Xaaは不明

30

- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：duplication
 - (B) 存在位置：2
 - (D) 他の情報：IleはIleまたはVal
- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：duplication
 - (B) 存在位置：10
 - (D) その他の情報：ValはValまたはThr

40

- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：duplication
 - (B) 存在位置：11
 - (D) その他の情報：ValはValまたはPhe
- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：duplication
 - (B) 存在位置：14
 - (D) その他の情報：AspはAspまたはGln

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 22:

Xaa Ile Gln Lys Ser Leu Glu Leu Ile Val Val Thr Ala Asp Glu
 1 5 10 15

50

(2) SEQ ID NO: 23の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 19アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: ペプチド

(v) フラグメントの型: N-terminal

(vi) 起源:

(A) 生物名: マイコバクテリウム・ツベルクローシス

(B) 株名: H37Rv

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 23:

Met Asn Asn Leu Tyr Arg Asp Leu Ala Pro Val Thr Glu Ala Ala Trp
1 5 10 15

Ala Glu Ile

10

(2) SEQ ID NO: 24の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 34塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA (合成)

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 24:

CCCGGCTCGA GAACCTSTAC CGCGACCTSG CSCC

34

(2) SEQ ID NO: 25の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 37塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA (合成)

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 25:

GGGCCGATC CGASGCSGCG TCCTTSACSG GTTGCCA

37

(2) SEQ ID NO: 26の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 28塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA (合成)

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 26:

GGAAGCCCCA TATGAACAAT CTCTACCG

28

(2) SEQ ID NO: 27の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 32塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 27 : CGCGCTCAGC CCTTAGTGAC TGAGCGCGAC CG	32
(2) SEQ ID NO : 28 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：24塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	10
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 28 : CTCGAATTCG CCGGGTGCAC ACAG	24
(2) SEQ ID NO : 29 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：25塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	20
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 29 : CTCGAATTCG CCCCCATACG AGAAC	25
(2) SEQ ID NO : 30 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：15塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	30
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 30 : GTGTATCTGC TGGAC	15
(2) SEQ ID NO : 31 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：15塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	40
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 31 : CCGACTGGCT GGCCG	15
(2) SEQ ID NO : 32 の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：24塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	50

(ii) 分子の型：DNA（合成）	
(iv) アンチセンス：あり	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：32： GAGGAATTCG CTTAGCGGAT CGCA	24
(2) SEQ ID NO：33の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：15塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	10
(ii) 分子の型：DNA（合成）	
(iv) アンチセンス：あり	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：33： CCCACATTCC GTTGG	15
(2) SEQ ID NO：34の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：15塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	20
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA（合成）	
(iv) アンチセンス：あり	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：34： GTCCAGCAGA TACAC	15
(2) SEQ ID NO：35の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：27塩基対	
(B) 配列の型：核酸	
(C) 鎖：一本鎖	30
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA（合成）	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：35： GTACGAGAAT TCATGTCGCA AATCATG	27
(2) SEQ ID NO：36の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：27塩基対	
(B) 配列の型：核酸	40
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジー：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA（合成）	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：36： GTACGAGAAT TCGAGCTTGG GGTGCCG	27
(2) SEQ ID NO：37の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：28塩基対	
(B) 配列の型：核酸	50

(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジ：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 37 : CGATTCCAAG CTTGTGGCCG CCGACCCG	28
(2) SEQ ID NO: 38の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：30塩基対	
(B) 配列の型：核酸	10
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジ：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：あり	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 38 : CGTTAGGGAT CCTCATCGCC ATGGTGTGG	30
(2) SEQ ID NO: 39の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：26塩基対	
(B) 配列の型：核酸	20
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジ：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：あり	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 39 : CGTTAGGGAT CCGGTTCAC TGTGCC	26
(2) SEQ ID NO: 40の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：28塩基対	
(B) 配列の型：核酸	30
(C) 鎖：一本鎖	
(D) トポロジ：直鎖状	
(ii) 分子の型：DNA (合成)	
(iv) アンチセンス：あり	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 40 : CGTTAGGGAT CCTCAGGTCT TTTCGATG	28
(2) SEQ ID NO: 41の情報：	
(i) 配列の特徴：	
(A) 配列の長さ：952塩基対	
(B) 配列の型：核酸	40
(C) 鎖：二本鎖	
(D) トポロジ：環状	
(ii) 分子の型：DNA (ゲノム)	
(vi) 起源：	
(A) 生物名：マイコバクテリウム・ツベルクローシス	
(B) 株名：H37Rv	
(ix) 配列の特徴：	
(A) 名称 / キー：CDS	
(B) 存在位置：45..944	
(ix) 配列の特徴：	50

(A) 名称 / キー : sig_peptide

(B) 存在位置 : 45..143

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : mat_peptide

(B) 存在位置 : 144..941

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 41 :

GAATTCGCCG GGTGCACACA GCCTTACACG ACGGAGGTGG ACAC ATG AAG GGT CGG	56	
	Met Lys Gly Arg	
	-33 -30	
TCG GCG CTG CTG CGG GCG CTC TGG ATT GCC GCA CTG TCA TTC GGG TTG	104	10
Ser Ala Leu Leu Arg Ala Leu Trp Ile Ala Ala Leu Ser Phe Gly Leu		
	-25 -20 -15	
GGC GGT GTC GCG GTA GCC GCG GAA CCC ACC GCC AAG GCC GCC CCA TAC	152	
Gly Gly Val Ala Val Ala Ala Glu Pro Thr Ala Lys Ala Ala Pro Tyr		
	-10 -5 1	
GAG AAC CTG ATG GTG CCG TCG CCC TCG ATG GGC CGG GAC ATC CCG GTG	200	
Glu Asn Leu Met Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Pro Val		
	5 10 15	
GCC TTC CTA GCC GGT GGG CCG CAC GCG GTG TAT CTG CTG GAC GCC TTC	248	
Ala Phe Leu Ala Gly Gly Pro His Ala Val Tyr Leu Leu Asp Ala Phe		
	20 25 30 35	
AAC GCC GGC CCG GAT GTC AGT AAC TGG GTC ACC GCG GGT AAC GCG ATG	296	20
Asn Ala Gly Pro Asp Val Ser Asn Trp Val Thr Ala Gly Asn Ala Met		
	40 45 50	
AAC ACG TTG GCG GGC AAG GGG ATT TCG GTG GTG GCA CCG GCC GGT GGT	344	
Asn Thr Leu Ala Gly Lys Gly Ile Ser Val Val Ala Pro Ala Gly Gly		
	55 60 65	
GCG TAC AGC ATG TAC ACC AAC TGG GAG CAG GAT GGC AGC AAG CAG TGG	392	
Ala Tyr Ser Met Tyr Thr Asn Trp Glu Gln Asp Gly Ser Lys Gln Trp		
	70 75 80	
GAC ACC TTC TTG TCC GCT GAG CTG CCC GAC TGG CTG GCC GCT AAC CGG	440	
Asp Thr Phe Leu Ser Ala Glu Leu Pro Asp Trp Leu Ala Ala Asn Arg		
	85 90 95	
GGC TTG GCC CCC GGT GGC CAT GCG GCC GTT GGC GCC GCT CAG GGC GGT	488	30
Gly Leu Ala Pro Gly Gly His Ala Ala Val Gly Ala Ala Gln Gly Gly		
	100 105 110 115	
TAC GGG GCG ATG GCG CTG GCG GCC TTC CAC CCC GAC CGC TTC GGC TTC	536	
Tyr Gly Ala Met Ala Leu Ala Ala Phe His Pro Asp Arg Phe Gly Phe		
	120 125 130	
GCT GGC TCG ATG TCG GGC TTT TTG TAC CCG TCG AAC ACC ACC ACC AAC	584	
Ala Gly Ser Met Ser Gly Phe Leu Tyr Pro Ser Asn Thr Thr Thr Asn		
	135 140 145	
GGT GCG ATC GCG GCG GGC ATG CAG CAA TTC GGC GGT GTG GAC ACC AAC	632	
Gly Ala Ile Ala Ala Gly Met Gln Gln Phe Gly Gly Val Asp Thr Asn		
	150 155 160	
GGA ATG TGG GGA GCA CCA CAG CTG GGT CCG TGG AAG TGG CAC GAC CCG	680	40
Gly Met Trp Gly Ala Pro Gln Leu Gly Arg Trp Lys Trp His Asp Pro		
	165 170 175	
TGG GTG CAT GCC AGC CTG CTG GCG CAA AAC AAC ACC CGG GTG TGG GTG	728	
Trp Val His Ala Ser Leu Leu Ala Gln Asn Asn Thr Arg Val Trp Val		
	180 185 190 195	
TGG AGC CCG ACC AAC CCG GGA GCC AGC GAT CCC GCC GCC ATG ATC GGC	776	

Trp Ser Pro Thr Asn Pro Gly Ala Ser Asp Pro Ala Ala Met Ile Gly		
200 205 210		
CAA ACC GCC GAG GCG ATG GGT AAC AGC CGC ATG TTC TAC AAC CAG TAT	824	
Gln Thr Ala Glu Ala Met Gly Asn Ser Arg Met Phe Tyr Asn Gln Tyr		
215 220 225		
CGC AGC GTC GGC GGG CAC AAC GGA CAC TTC GAC TTC CCA GCC AGC GGT	872	
Arg Ser Val Gly Gly His Asn Gly His Phe Asp Phe Pro Ala Ser Gly		
230 235 240		
GAC AAC GGC TGG GGC TCG TGG GCG CCC CAG CTG GGC GCT ATG TCG GGC	920	10
Asp Asn Gly Trp Gly Ser Trp Ala Pro Gln Leu Gly Ala Met Ser Gly		
245 250 255		
GAT ATC GTC GGT GCG ATC CGC TAA GCGAATTC	952	
Asp Ile Val Gly Ala Ile Arg		
260 265		

(2) SEQ ID NO: 42の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 299アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 42:

Met Lys Gly Arg Ser Ala Leu Leu Arg Ala Leu Trp Ile Ala Ala Leu
 -33 -30 -25 -20
 Ser Phe Gly Leu Gly Gly Val Ala Val Ala Ala Glu Pro Thr Ala Lys
 -15 -10 -5
 Ala Ala Pro Tyr Glu Asn Leu Met Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg
 1 5 10 15
 Asp Ile Pro Val Ala Phe Leu Ala Gly Gly Pro His Ala Val Tyr Leu
 20 25 30
 Leu Asp Ala Phe Asn Ala Gly Pro Asp Val Ser Asn Trp Val Thr Ala
 35 40 45
 Gly Asn Ala Met Asn Thr Leu Ala Gly Lys Gly Ile Ser Val Val Ala
 50 55 60
 Pro Ala Gly Gly Ala Tyr Ser Met Tyr Thr Asn Trp Glu Gln Asp Gly
 65 70 75
 Ala Ala Asn Arg Gly Leu Ala Pro Gly Gly His Ala Ala Val Gly Ala
 100 105 110
 Ser Lys Gln Trp Asp Thr Phe Leu Ser Ala Glu Leu Pro Asp Trp Leu
 80 85 90 95
 Ala Gln Gly Gly Tyr Gly Ala Met Ala Leu Ala Ala Phe His Pro Asp
 115 120 125
 Arg Phe Gly Phe Ala Gly Ser Met Ser Gly Phe Leu Tyr Pro Ser Asn
 130 135 140
 Thr Thr Thr Asn Gly Ala Ile Ala Ala Gly Met Gln Gln Phe Gly Gly
 145 150 155
 Val Asp Thr Asn Gly Met Trp Gly Ala Pro Gln Leu Gly Arg Trp Lys
 160 165 170 175
 Trp His Asp Pro Trp Val His Ala Ser Leu Leu Ala Gln Asn Asn Thr
 180 185 190
 Arg Val Trp Val Trp Ser Pro Thr Asn Pro Gly Ala Ser Asp Pro Ala
 195 200 205
 Ala Met Ile Gly Gln Thr Ala Glu Ala Met Gly Asn Ser Arg Met Phe
 210 215 220
 Tyr Asn Gln Tyr Arg Ser Val Gly Gly His Asn Gly His Phe Asp Phe
 225 230 235
 Pro Ala Ser Gly Asp Asn Gly Trp Gly Ser Trp Ala Pro Gln Leu Gly
 240 245 250 255
 Ala Met Ser Gly Asp Ile Val Gly Ala Ile Arg
 260 265

10

20

30

(2) SEQ ID NO: 43の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 27塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

40

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型、DNA (合成)

(iv) アンチセンス: なし

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 43:

GCAACACCCG GGATGTCGCA AATCATG

27

(2) SEQ ID NO: 44の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 27塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 分子の型：DNA (合成)
(iv) アンチセンス：なし
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 44 :
GTAACACCCG GGGTGGCCGC CGACCCG

27

(2) SEQ ID NO : 45 の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：37塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 分子の型：DNA (合成)
(iv) アンチセンス：あり
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 45 :
CTACTAAGCT TGGATCCCTA GCCGCCCCAT TTGGCGG

10

37

(2) SEQ ID NO : 46 の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：38塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 分子の型：DNA (合成)
(iv) アンチセンス：あり
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 46 :
CTACTAAGCT TCCATGGTCA GGTCTTTTCG ATGCTTAC

20

38

(2) SEQ ID NO : 47 の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ：450塩基対
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称 / キー：Cording Sequence
(B) 存在位置：105...320
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO : 47 :

30

GTGCCGCGCT CCCCAGGGTT CTTATGGTTC GATATACCTG AGTTTGATGG AAGTCCGATG	60	
ACCAGCAGTC AGCATACGGC ATGGCCGAAA AGAGTGGGGT GATG ATG GCC GAG GAT	116	
		Met Ala Glu Asp
		1
GTT CGC GCC GAG ATC GTG GCC AGC GTT CTC GAA GTC GTT GTC AAC GAA	164	
Val Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Val Leu Glu Val Val Val Asn Glu		
5 10 15 20		
GGC GAT CAG ATC GAC AAG GGC GAC GTC GTG GTG CTG CTG GAG TCG ATG	212	
Gly Asp Gln Ile Asp Lys Gly Asp Val Val Val Leu Leu Glu Ser Met		
		25 30 35
AAG ATG GAG ATC CCC GTC CTG GCC GAA GCT GCC GGA ACG GTC AGC AAG	260	
Lys Met Glu Ile Pro Val Leu Ala Glu Ala Ala Gly Thr Val Ser Lys		
		40 45 50
GTG GCG GTA TCG GTG GGC GAT GTC ATT CAG GCC GGC GAC CTT ATC GCG	308	
Val Ala Val Ser Val Gly Asp Val Ile Gln Ala Gly Asp Leu Ile Ala		
		55 60 65
GTG ATC AGC TAGTCGTTGA TAGTCACTCA TGTCCACACT CGGTGATCTG CTCGCCGAA	366	
Val Ile Ser		
		70
CACACGGTGC TGCCGGGCAG CGCGGTGGAC CACCTGCATG CGGTGGTCGG GGAGTGGCAG	426	
CTCCTTGCCG ACTTGTCGTT TGCC	450	
(2) SEQ ID NO: 48の情報:		
(i) 配列の特徴:		
(A) 配列の長さ: 71アミノ酸		
(B) 配列の型: アミノ酸		
(C) 鎖: 一本鎖		
(D) トポロジー: 直鎖状		
(ii) 分子の型: タンパク質	30	
(v) フラグメントの型: internal		
(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 48:		
Met Ala Glu Asp Val Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Val Leu Glu Val		
1 5 10 15		
Val Val Asn Glu Gly Asp Gln Ile Asp Lys Gly Asp Val Val Val Leu		
		20 25 30
Leu Glu Ser Met Lys Met Glu Ile Pro Val Leu Ala Glu Ala Ala Gly		
		35 40 45
Thr Val Ser Lys Val Ala Val Ser Val Gly Asp Val Ile Gln Ala Gly	40	
		50 55 60
Asp Leu Ile Ala Val Ile Ser		
		65 70
(2) SEQ ID NO: 49の情報:		
(i) 配列の特徴:		
(A) 配列の長さ: 750塩基対		
(B) 配列の型: 核酸		
(C) 鎖: 一本鎖		
(D) トポロジー: 直鎖状		
(ix) 配列の特徴:	50	

(A) 名称 / キー : Cording Sequence

(B) 存在位置 : 113...640

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 49 :

```

GGGTACCCAT CGATGGGTTG CGGTTCCGGCA CCGAGGTGCT AACGCACTTG CTGACACACT      60
GCTAGTCGAA AACGAGGCTA GTCGCAACGT CGATCACACG AGAGGACTGA CC ATG ACA      118
                                     Met Thr
                                     1
ACT TCA CCC GAC CCG TAT GCC GCG CTG CCC AAG CTG CCG TCC TTC AGC      166
Thr Ser Pro Asp Pro Tyr Ala Ala Leu Pro Lys Leu Pro Ser Phe Ser      10
      5      10      15
CTG ACG TCA ACC TCG ATC ACC GAT GGG CAG CCG CTG GCT ACA CCC CAG      214
Leu Thr Ser Thr Ser Ile Thr Asp Gly Gln Pro Leu Ala Thr Pro Gln
      20      25      30
GTC AGC GGG ATC ATG GGT GCG GGC GGG GCG GAT GCC AGT CCG CAG CTG      262
Val Ser Gly Ile Met Gly Ala Gly Gly Ala Asp Ala Ser Pro Gln Leu
      35      40      45      50
AGG TGG TCG GGA TTT CCC AGC GAG ACC CGC AGC TTC GCG GTA ACC GTC      310
Arg Trp Ser Gly Phe Pro Ser Glu Thr Arg Ser Phe Ala Val Thr Val
      55      60      65
TAC GAC CCT GAT GCC CCC ACC CTG TCC GGG TTC TGG CAC TGG GCG GTG      358
Tyr Asp Pro Asp Ala Pro Thr Leu Ser Gly Phe Trp His Trp Ala Val      20
      70      75      80
GCC AAC CTG CCT GCC AAC GTC ACC GAG TTG CCC GAG GGT GTC GGC GAT      406
Ala Asn Leu Pro Ala Asn Val Thr Glu Leu Pro Glu Gly Val Gly Asp
      85      90      95
GGC CGC GAA CTG CCG GGC GGG GCA CTG ACA TTG GTC AAC GAC GCC GGT      454
Gly Arg Glu Leu Pro Gly Gly Ala Leu Thr Leu Val Asn Asp Ala Gly
      100      105      110
ATG CGC CGG TAT GTG GGT GCG GCG CCG CCT CCC GGT CAT GGG GTG CAT      502
Met Arg Arg Tyr Val Gly Ala Ala Pro Pro Pro Gly His Gly Val His
      115      120      125      130
CGC TAC TAC GTC GCG GTA CAC GCG GTG AAG GTC GAA AAG CTC GAC CTC      550
Arg Tyr Tyr Val Ala Val His Ala Val Lys Val Glu Lys Leu Asp Leu
      135      140      145
CCC GAG GAC GCG AGT CCT GCA TAT CTG GGA TTC AAC CTG TTC CAG CAC      598
Pro Glu Asp Ala Ser Pro Ala Tyr Leu Gly Phe Asn Leu Phe Gln His
      150      155      160
GCG ATT GCA CGA GCG GTC ATC TTC GGC ACC TAC GAG CAG CGT TAGCGCTTT      649
Ala Ile Ala Arg Ala Val Ile Phe Gly Thr Tyr Glu Gln Arg
      165      170      175
AGCTGGGTTG CCGACGTCTT GCCGAGCCGA CCGCTTCGTG CAGCGAGCCG AACCCGCCGT      709
CATGCAGCCT GCGGGCAATG CCTTCATGGA TGTCCTTGGC C      750 40

```

(2) SEQ ID NO : 50 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 176 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : タンパク質

(v) フラグメントの型 : internal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 50 :

Met Thr Thr Ser Pro Asp Pro Tyr Ala Ala Leu Pro Lys Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Phe Ser Leu Thr Ser Thr Ser Ile Thr Asp Gly Gln Pro Leu Ala Thr
 20 25 30
 Pro Gln Val Ser Gly Ile Met Gly Ala Gly Gly Ala Asp Ala Ser Pro
 35 40 45
 Gln Leu Arg Trp Ser Gly Phe Pro Ser Glu Thr Arg Ser Phe Ala Val
 50 55 60
 Thr Val Tyr Asp Pro Asp Ala Pro Thr Leu Ser Gly Phe Trp His Trp
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Asn Leu Pro Ala Asn Val Thr Glu Leu Pro Glu Gly Val
 85 90 95
 Gly Asp Gly Arg Glu Leu Pro Gly Gly Ala Leu Thr Leu Val Asn Asp
 100 105 110
 Ala Gly Met Arg Arg Tyr Val Gly Ala Ala Pro Pro Pro Gly His Gly
 115 120 125
 Val His Arg Tyr Tyr Val Ala Val His Ala Val Lys Val Glu Lys Leu
 130 135 140
 Asp Leu Pro Glu Asp Ala Ser Pro Ala Tyr Leu Gly Phe Asn Leu Phe
 145 150 155 160
 Gln His Ala Ile Ala Arg Ala Val Ile Phe Gly Thr Tyr Glu Gln Arg
 165 170 175

10

20

(2) SEQ ID NO: 51の情報:

(i) 配列の特徴:

30

(A) 配列の長さ: 800塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 18...695

(C) 他の情報:

(A) 名称 / キー: Signal Sequence

(B) 存在位置: 18...134

40

(C) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 51:

TCATGAGGTT CATCGGG GTG ATC CCA CGC CCG CAG CCG CAT TCG GGC CGC	50	
Met Ile Pro Arg Pro Gln Pro His Ser Gly Arg		
-35 -30		
TGG CGA GCC GGT GCC GCA CGC CGC CTC ACC AGC CTG GTG GCC GCC GCC	98	
Trp Arg Ala Gly Ala Ala Arg Arg Leu Thr Ser Leu Val Ala Ala Ala		
-25 -20 -15		
TTT GCG GCG GCC ACA CTG TTG CTT ACC CCC GCG CTG GCA CCA CCG GCA	146	
Phe Ala Ala Ala Thr Leu Leu Leu Thr Pro Ala Leu Ala Pro Pro Ala		
-10 -5 1 5		
TCG GCG GGC TGC CCG GAT GCC GAG GTG GTG TTC GCC CGC GGA ACC GGC	194	
Ser Ala Gly Cys Pro Asp Ala Glu Val Phe Ala Arg Gly Thr Gly		10
10 15 20		
GAA CCA CCT GGC CTC GGT CGG GTA GGC CAA GCT TTC GTC AGT TCA TTG	242	
Glu Pro Pro Gly Leu Gly Arg Val Gly Gln Ala Phe Val Ser Ser Leu		
25 30 35		
CGC CAG CAG ACC AAC AAG AGC ATC GGG ACA TAC GGA GTC AAC TAC CCG	290	
Arg Gln Gln Thr Asn Lys Ser Ile Gly Thr Tyr Gly Val Asn Tyr Pro		
40 45 50		
GCC AAC GGT GAT TTC TTG GCC GCC GCT GAC GGC GCG AAC GAC GCC AGC	338	
Ala Asn Gly Asp Phe Leu Ala Ala Ala Asp Gly Ala Asn Asp Ala Ser		
55 60 65		
GAC CAC ATT CAG CAG ATG GCC AGC GCG TGC CGG GCC ACG AGG TTG GTG	386	
Asp His Ile Gln Gln Met Ala Ser Ala Cys Arg Ala Thr Arg Leu Val		20
70 75 80 85		
CTC GGC GGC TAC TCC CAG GGT GCG GCC GTG ATC GAC ATC GTC ACC GCC	434	
Leu Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Val Ile Asp Ile Val Thr Ala		
90 95 100		
GCA CCA CTG CCC GGC CTC GGG TTC ACG CAG CCG TTG CCG CCC GCA GCG	482	
Ala Pro Leu Pro Gly Leu Gly Phe Thr Gln Pro Leu Pro Pro Ala Ala		
105 110 115		
GAC GAT CAC ATC GCC GCG ATC GCC CTG TTC GGG AAT CCC TCG GGC CGC	530	
Asp Asp His Ile Ala Ala Ile Ala Leu Phe Gly Asn Pro Ser Gly Arg		
120 125 130		
GCT GGC GGG CTG ATG AGC GCC CTG ACC CCT CAA TTC GGG TCC AAG ACC	578	
Ala Gly Gly Leu Met Ser Ala Leu Thr Pro Gln Phe Gly Ser Lys Thr		
135 140 145		
ATC AAC CTC TGC AAC AAC GGC GAC CCG ATT TGT TCG GAC GGC AAC CGG	626	
Ile Asn Leu Cys Asn Asn Gly Asp Pro Ile Cys Ser Asp Gly Asn Arg		30
150 155 160 165		
TGG CGA GCG CAC CTA GGC TAC GTG CCC GGG ATG ACC AAC CAG GCG GCG	674	
Trp Arg Ala His Leu Gly Tyr Val Pro Gly Met Thr Asn Gln Ala Ala		
170 175 180		
CGT TTC GTC GCG AGC AGG ATC TAACGCGAGC CGCCCCATAG ATTCCGGCTA AGCA	729	
Arg Phe Val Ala Ser Arg Ile		
185		
ACGGCTGCGC CGCCGCCCGG CCACGAGTGA CCGCCGCCGA CTGGCACACC GCTTACCACG	789	
GCCTTATGCT G	800	40

(2) SEQ ID NO: 52の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 226アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/キー: Signal Sequence

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 52 :

40

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 53 :

CTAGGAAAGC CTTTCCTGAG TAAGTATTGC CTTCGTTGCA TACCGCCCTT TACCTGCGTT	60
AATCTGCATT TT ATG ACA GAA TAC GAA GGG CCT AAG ACA AAA TTC CAC GCG	111
Met Thr Glu Tyr Glu Gly Pro Lys Thr Lys Phe His Ala	
1 5 10	
TTA ATG CAG GAA CAG ATT CAT AAC GAA TTC ACA GCG GCA CAA CAA TAT	159
Leu Met Gln Glu Gln Ile His Asn Glu Phe Thr Ala Ala Gln Gln Tyr	
15 20 25	
GTC GCG ATC GCG GTT TAT TTC GAC AGC GAA GAC CTG CCG CAG TTG GCG	207
Val Ala Ile Ala Val Tyr Phe Asp Ser Glu Asp Leu Pro Gln Leu Ala	
30 35 40 45	10
AAG CAT TTT TAC AGC CAA GCG GTC GAG GAA CGA AAC CAT GCA ATG ATG	255
Lys His Phe Tyr Ser Gln Ala Val Glu Glu Arg Asn His Ala Met Met	
50 55 60	
CTC GTG CAA CAC CTG CTC GAC CGC GAC CTT CGT GTC GAA ATT CCC GGC	303
Leu Val Gln His Leu Leu Asp Arg Asp Leu Arg Val Glu Ile Pro Gly	
65 70 75	
GTA GAC ACG GTG CGA AAC CAG TTC GAC AGA CCC CGC GAG GCA CTG GCG	351
Val Asp Thr Val Arg Asn Gln Phe Asp Arg Pro Arg Glu Ala Leu Ala	
80 85 90	
CTG GCG CTC GAT CAG GAA CGC ACA GTC ACC GAC CAG GTC GGT CGG CTG	399
Leu Ala Leu Asp Gln Glu Arg Thr Val Thr Asp Gln Val Gly Arg Leu	
95 100 105	
ACA GCG GTG GCC CGC GAC GAG GGC GAT TTC CTC GGC GAG CAG TTC ATG	447
Thr Ala Val Ala Arg Asp Glu Gly Asp Phe Leu Gly Glu Gln Phe Met	
110 115 120 125	20
CAG TGG TTC TTG CAG GAA CAG ATC GAA GAG GTG GCC TTG ATG GCA ACC	495
Gln Trp Phe Leu Gln Glu Gln Ile Glu Glu Val Ala Leu Met Ala Thr	
130 135 140	
CTG GTG CCG GTT GCC GAT CGG GCC GGG GCC AAC CTG TTC GAG CTA GAG	543
Leu Val Arg Val Ala Asp Arg Ala Gly Ala Asn Leu Phe Glu Leu Glu	
145 150 155	
AAC TTC GTC GCA CGT GAA GTG GAT GTG GCG CCG GCC GCA TCA GGC GCC	591
Asn Phe Val Ala Arg Glu Val Asp Val Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala	
160 165 170	
CCG CAC GCT GCC GGG GGC CGC CTC TAGATCCCTG GCGGGGATCA GCGAGTGGTC	645
Pro His Ala Ala Gly Gly Arg Leu	
175 180	30
CCGTTGCCCC GCCCGTCTTC CAGCCAGGCC TTGGTGCGGC CGGGGTGGTG AGTAC	700

(2) SEQ ID NO: 54の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 181アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 54:

Met Thr Glu Tyr Glu Gly Pro Lys Thr Lys Phe His Ala Leu Met Gln
 1 5 10 15
 Glu Gln Ile His Asn Glu Phe Thr Ala Ala Gln Gln Tyr Val Ala Ile
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Asp Ser Glu Asp Leu Pro Gln Leu Ala Lys His Phe
 35 40 45
 Tyr Ser Gln Ala Val Glu Glu Arg Asn His Ala Met Met Leu Val Gln
 50 55 60
 His Leu Leu Asp Arg Asp Leu Arg Val Glu Ile Pro Gly Val Asp Thr
 65 70 75 80
 Val Arg Asn Gln Phe Asp Arg Pro Arg Glu Ala Leu Ala Leu Ala Leu
 85 90 95
 Asp Gln Glu Arg Thr Val Thr Asp Gln Val Gly Arg Leu Thr Ala Val
 100 105 110
 Ala Arg Asp Glu Gly Asp Phe Leu Gly Glu Gln Phe Met Gln Trp Phe
 115 120 125
 Leu Gln Glu Gln Ile Glu Glu Val Ala Leu Met Ala Thr Leu Val Arg
 130 135 140
 Val Ala Asp Arg Ala Gly Ala Asn Leu Phe Glu Leu Glu Asn Phe Val
 145 150 155 160
 Ala Arg Glu Val Asp Val Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Pro His Ala
 165 170 175
 Ala Gly Gly Arg Leu
 180

10

20

(2) SEQ ID NO: 55の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 950塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Coding Sequence

(B) 存在位置: 133...918

(D) 他の情報:

(A) 名称 / キー: Signal Sequence

(B) 存在位置: 133...233

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 55:

30

TGGGCTCGGC ACTGGCTCTC CCACGGTGGC GCGCTGATTT CTCCCCACGG TAGGCGTTGC	60	
GACGCATGTT CTTACCGTC TATCCACAGC TACCGACATT TGCTCCGGCT GGATCGCGGG	120	
TAAAATTCCG TC GTG AAC AAT CGA CCC ATC CGC CTG CTG ACA TCC GGC AGG	171	
Met Asn Asn Arg Pro Ile Arg Leu Leu Thr Ser Gly Arg		
-30 -25		
GCT GGT TTG GGT GCG GGC GCA TTG ATC ACC GCC GTC GTC CTG CTC ATC	219	
Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ala Leu Ile Thr Ala Val Val Leu Leu Ile		
-20 -15 -10 -5		
GCC TTG GGC GCT GTT TGG ACC CCG GTT GCC TTC GCC GAT GGA TGC CCG	267	10
Ala Leu Gly Ala Val Trp Thr Pro Val Ala Phe Ala Asp Gly Cys Pro		
1 5 10		
GAC GCC GAA GTC ACG TTC GCC CGC GGC ACC GGC GAG CCG CCC GGA ATC	315	
Asp Ala Glu Val Thr Phe Ala Arg Gly Thr Gly Glu Pro Pro Gly Ile		
15 20 25		
GGG CGC GTT GGC CAG GCG TTC GTC GAC TCG CTG CGC CAG CAG ACT GGC	363	
Gly Arg Val Gly Gln Ala Phe Val Asp Ser Leu Arg Gln Gln Thr Gly		
30 35 40		
ATG GAG ATC GGA GTA TAC CCG GTG AAT TAC GCC GCC AGC CGC CTA CAG	411	20
Met Glu Ile Gly Val Tyr Pro Val Asn Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln		
45 50 55 60		
CTG CAC GGG GGA GAC GGC GCC AAC GAC GCC ATA TCG CAC ATT AAG TCC	459	
Leu His Gly Gly Asp Gly Ala Asn Asp Ala Ile Ser His Ile Lys Ser		
65 70 75		
ATG GCC TCG TCA TGC CCG AAC ACC AAG CTG GTC TTG GGC GGC TAT TCG	507	
Met Ala Ser Ser Cys Pro Asn Thr Lys Leu Val Leu Gly Gly Tyr Ser		
80 85 90		
CAG GGC GCA ACC GTG ATC GAT ATC GTG GCC GGG GTT CCG TTG GGC AGC	555	30
Gln Gly Ala Thr Val Ile Asp Ile Val Ala Gly Val Pro Leu Gly Ser		
95 100 105		
ATC AGC TTT GGC AGT CCG CTA CCT GCG GCA TAC GCA GAC AAC GTC GCA	603	
Ile Ser Phe Gly Ser Pro Leu Pro Ala Ala Tyr Ala Asp Asn Val Ala		
110 115 120		
GCG GTC GCG GTC TTC GGC AAT CCG TCC AAC CGC GCC GGC GGA TCG CTG	651	
Ala Val Ala Val Phe Gly Asn Pro Ser Asn Arg Ala Gly Gly Ser Leu		
125 130 135 140		

TCG AGC CTG AGC CCG CTA TTC GGT TCC AAG GCG ATT GAC CTG TGC AAT	699
Ser Ser Leu Ser Pro Leu Phe Gly Ser Lys Ala Ile Asp Leu Cys Asn	
145 150 155	
CCC ACC GAT CCG ATC TGC CAT GTG GGC CCC GGC AAC GAA TTC AGC GGA	747
Pro Thr Asp Pro Ile Cys His Val Gly Pro Gly Asn Glu Phe Ser Gly	
160 165 170	
CAC ATC GAC GGC TAC ATA CCC ACC TAC ACC ACC CAG GCG GCT AGT TTC	795
His Ile Asp Gly Tyr Ile Pro Thr Tyr Thr Thr Gln Ala Ala Ser Phe	
175 180 185	
GTC GTG CAG AGG CTC CGC GCC GGG TCG GTG CCA CAT CTG CCT GGA TCC	843
Val Val Gln Arg Leu Arg Ala Gly Ser Val Pro His Leu Pro Gly Ser	
190 195 200	
GTC CCG CAG CTG CCC GGG TCT GTC CTT CAG ATG CCC GGC ACT GCC GCA	891
Val Pro Gln Leu Pro Gly Ser Val Leu Gln Met Pro Gly Thr Ala Ala	
205 210 215 220	
CCG GCT CCC GAA TCG CTG CAC GGT CGC TGACGCTTTG TCAGTAAGCC CATAAAA	945
Pro Ala Pro Glu Ser Leu His Gly Arg	
225	
TCGCG	950

10

20

(2) SEQ ID NO: 56の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 262アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Signal Sequence

(B) 存在位置: 1...33

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 57:

30

Met Asn Asn Arg Pro Ile Arg Leu Leu Thr Ser Gly Arg Ala Gly Leu
 -30 -25 -20

Gly Ala Gly Ala Leu Ile Thr Ala Val Val Leu Leu Ile Ala Leu Gly
 -15 -10 -5

Ala Val Trp Thr Pro Val Ala Phe Ala Asp Gly Cys Pro Asp Ala Glu
 1 5 10 15

Val Thr Phe Ala Arg Gly Thr Gly Glu Pro Pro Gly Ile Gly Arg Val
 20 25 30

Gly Gln Ala Phe Val Asp Ser Leu Arg Gln Gln Thr Gly Met Glu Ile
 35 40 45

Gly Val Tyr Pro Val Asn Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Leu His Gly
 50 55 60

Gly Asp Gly Ala Asn Asp Ala Ile Ser His Ile Lys Ser Met Ala Ser
 65 70 75

Ser Cys Pro Asn Thr Lys Leu Val Leu Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala
 80 85 90 95

Thr Val Ile Asp Ile Val Ala Gly Val Pro Leu Gly Ser Ile Ser Phe
 100 105 110

Gly Ser Pro Leu Pro Ala Ala Tyr Ala Asp Asn Val Ala Ala Val Ala
 115 120 125

Val Phe Gly Asn Pro Ser Asn Arg Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Leu
 130 135 140

Ser Pro Leu Phe Gly Ser Lys Ala Ile Asp Leu Cys Asn Pro Thr Asp
 145 150 155

Pro Ile Cys His Val Gly Pro Gly Asn Glu Phe Ser Gly His Ile Asp
 160 165 170 175

Gly Tyr Ile Pro Thr Tyr Thr Thr Gln Ala Ala Ser Phe Val Val Gln
 180 185 190

Arg Leu Arg Ala Gly Ser Val Pro His Leu Pro Gly Ser Val Pro Gln
 195 200 205

Leu Pro Gly Ser Val Leu Gln Met Pro Gly Thr Ala Ala Pro Ala Pro
 210 215 220

Glu Ser Leu His Gly Arg
 225

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO: 57の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1000塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 94...966

50

(D) 他の情報 :

(A) 名称 / キー : Signal Sequence

(B) 存在位置 : 94...264

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 57 :

CGAGGAGACC GACGATCTGC TCGACGAAAT CGACGACGTC CTCGAGGAGA ACGCCGAGGA 60

CTTCGTCCGC GCATACGTCC AAAAGGGCGG ACA GTG ACC TGG CCG TTG CCC GAT 114
Met Thr Trp Pro Leu Pro Asp
-55 -50

CGC CTG TCC ATT AAT TCA CTC TCT GGA ACA CCC GCT GTA GAC CTA TCT 162
Arg Leu Ser Ile Asn Ser Leu Ser Gly Thr Pro Ala Val Asp Leu Ser
-45 -40 -35

TCT TTC ACT GAC TTC CTG CGC CGC CAG GCG CCG GAG TTG CTG CCG GCA 210
Ser Phe Thr Asp Phe Leu Arg Arg Gln Ala Pro Glu Leu Leu Pro Ala
-30 -25 -20

AGC ATC AGC GGC GGT GCG CCA CTC GCA GGC GGC GAT GCG CAA CTG CCG 258
Ser Ile Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ala Gly Gly Asp Ala Gln Leu Pro
-15 -10 -5

CAC GGC ACC ACC ATT GTC GCG CTG AAA TAC CCC GGC GGT GTT GTC ATG 306
His Gly Thr Thr Ile Val Ala Leu Lys Tyr Pro Gly Gly Val Val Met
1 5 10 15

GCG GGT GAC CGG CGT TCG ACG CAG GGC AAC ATG ATT TCT GGG CGT GAT 354
Ala Gly Asp Arg Arg Ser Thr Gln Gly Asn Met Ile Ser Gly Arg Asp
20 25 30

GTG CGC AAG GTG TAT ATC ACC GAT GAC TAC ACC GCT ACC GGC ATC GCT 402
Val Arg Lys Val Tyr Ile Thr Asp Tyr Thr Ala Thr Gly Ile Ala
35 40 45

GGC ACG GCT GCG GTC GCG GTT GAG TTT GCC CGG CTG TAT GCC GTG GAA 450
Gly Thr Ala Ala Val Ala Val Glu Phe Ala Arg Leu Tyr Ala Val Glu
50 55 60

CTT GAG CAC TAC GAG AAG CTC GAG GGT GTG CCG CTG ACG TTT GCC GGC 498
Leu Glu His Tyr Glu Lys Leu Glu Gly Val Pro Leu Thr Phe Ala Gly
65 70 75

AAA ATC AAC CGG CTG GCG ATT ATG GTG CGT GGC AAT CTG GCG GCC GCG 546
Lys Ile Asn Arg Leu Ala Ile Met Val Arg Gly Asn Leu Ala Ala Ala
80 85 90 95

ATG CAG GGT CTG CTG GCG TTG CCG TTG CTG GCG GGC TAC GAC ATT CAT 594
Met Gln Gly Leu Leu Ala Leu Pro Leu Leu Ala Gly Tyr Asp Ile His
100 105 110

GCG TCT GAC CCG CAG AGC GCG GGT CGT ATC GTT TCG TTC GAC GCC GCC 642
Ala Ser Asp Pro Gln Ser Ala Gly Arg Ile Val Ser Phe Asp Ala Ala
115 120 125

GGC GGT TGG AAC ATC GAG GAA GAG GGC TAT CAG GCG GTG GGC TCG GGT 690
Gly Gly Trp Asn Ile Glu Glu Gly Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly
130 135 140

TCG CTG TTC GCG AAG TCG TCG ATG AAG AAG TTG TAT TCG CAG GTT ACC 738
Ser Leu Phe Ala Lys Ser Ser Met Lys Lys Leu Tyr Ser Gln Val Thr
145 150 155

GAC GGT GAT TCG GGG CTG CCG GTG GCG GTC GAG GCG CTC TAC GAC GCC 786
Asp Gly Asp Ser Gly Leu Arg Val Ala Val Glu Ala Leu Tyr Asp Ala
160 165 170 175

GCC GAC GAC GAC TCC GCC ACC GGC GGT CCG GAC CTG GTG CCG GGC ATC 834
Ala Asp Asp Asp Ser Ala Thr Gly Gly Pro Asp Leu Val Arg Gly Ile
180 185 190

TTT CCG ACG GCG GTG ATC ATC GAC GCC GAC GGG GCG GTT GAC GTG CCG 882
Phe Pro Thr Ala Val Ile Ile Asp Ala Asp Gly Ala Val Asp Val Pro
195 200 205

GAG AGC CGG ATT GCC GAA TTG GCC CGC GCG ATC ATC GAA AGC CGT TCG 930
Glu Ser Arg Ile Ala Glu Leu Ala Arg Ala Ile Ile Glu Ser Arg Ser
210 215 220

GGT GCG GAT ACT TTC GGC TCC GAT GGC GGT GAG AAG TGAGTTTTC GTATTT 982
Gly Ala Asp Thr Phe Gly Ser Asp Gly Gly Glu Lys
225 230 235

CATCTCGCCT GAGCAGGC 1000

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO: 58の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 291アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

50

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：タンパク質

(v) フラグメントの型：internal

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：Signal Sequence

(B) 存在位置：1...56

(D) 他の情報：

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：58：

Met Thr Trp Pro Leu Pro Asp Arg Leu Ser Ile Asn Ser Leu Ser Gly
 -55 -50 -45

10

Thr Pro Ala Val Asp Leu Ser Ser Phe Thr Asp Phe Leu Arg Arg Gln
 -40 -35 -30 -25

Ala Pro Glu Leu Leu Pro Ala Ser Ile Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ala
 -20 -15 -10

Gly Gly Asp Ala Gln Leu Pro His Gly Thr Thr Ile Val Ala Leu Lys
 -5 1 5

Tyr Pro Gly Gly Val Val Met Ala Gly Asp Arg Arg Ser Thr Gln Gly
 10 15 20

Asn Met Ile Ser Gly Arg Asp Val Arg Lys Val Tyr Ile Thr Asp Asp
 25 30 35 40

20

Tyr Thr Ala Thr Gly Ile Ala Gly Thr Ala Ala Val Ala Val Glu Phe
 45 50 55

Ala Arg Leu Tyr Ala Val Glu Leu Glu His Tyr Glu Lys Leu Glu Gly
 60 65 70

Val Pro Leu Thr Phe Ala Gly Lys Ile Asn Arg Leu Ala Ile Met Val
 75 80 85

Arg Gly Asn Leu Ala Ala Ala Met Gln Gly Leu Leu Ala Leu Pro Leu
 90 95 100

Leu Ala Gly Tyr Asp Ile His Ala Ser Asp Pro Gln Ser Ala Gly Arg
 105 110 115 120

30

Ile Val Ser Phe Asp Ala Ala Gly Gly Trp Asn Ile Glu Glu Glu Gly
 125 130 135

Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Ser Leu Phe Ala Lys Ser Ser Met Lys
 140 145 150

Lys Leu Tyr Ser Gln Val Thr Asp Gly Asp Ser Gly Leu Arg Val Ala
 155 160 165

Val Glu Ala Leu Tyr Asp Ala Ala Asp Asp Asp Ser Ala Thr Gly Gly
 170 175 180

40

Pro Asp Leu Val Arg Gly Ile Phe Pro Thr Ala Val Ile Ile Asp Ala
 185 190 195 200

Asp Gly Ala Val Asp Val Pro Glu Ser Arg Ile Ala Glu Leu Ala Arg
 205 210 215

Ala Ile Ile Glu Ser Arg Ser Gly Ala Asp Thr Phe Gly Ser Asp Gly
 220 225 230

Gly Glu Lys
 235

(2) SEQ ID NO：59の情報：

(i) 配列の特徴：

50

- (A) 配列の長さ：900塩基対
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ix) 配列の特徴：
 - (A) 名称 / キー：Cording Sequence
 - (B) 存在位置：66...808
 - (D) 他の情報：
- (xi) 配列の記載：SEQ ID NO：59：

TTGGCCCGCG CGATCATCGA AAGCCGTTTCG GGTGCGGATA CTTTCGGCTC CGATGGCGGT	60	
GAGAA GTG AGT TTT CCG TAT TTC ATC TCG CCT GAG CAG GCG ATG CGC GAG	110	
Met Ser Phe Pro Tyr Phe Ile Ser Pro Glu Gln Ala Met Arg Glu		
1 5 10 15		
CGC AGC GAG TTG GCG CGT AAG GGC ATT GCG CGG GCC AAA AGC GTG GTG	158	
Arg Ser Glu Leu Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Lys Ser Val Val		
20 25 30		
GCG CTG GCC TAT GCC GGT GGT GTG CTG TTC GTC GCG GAG AAT CCG TCG	206	
Ala Leu Ala Tyr Ala Gly Gly Val Leu Phe Val Ala Glu Asn Pro Ser		
35 40 45		
CGG TCG CTG CAG AAG ATC AGT GAG CTC TAC GAT CGG GTG GGT TTT GCG	254	10
Arg Ser Leu Gln Lys Ile Ser Glu Leu Tyr Asp Arg Val Gly Phe Ala		
50 55 60		
GCT GCG GGC AAG TTC AAC GAG TTC GAC AAT TTG CGC CGC GGC GGG ATC	302	
Ala Ala Gly Lys Phe Asn Glu Phe Asp Asn Leu Arg Arg Gly Gly Ile		
65 70 75		
CAG TTC GCC GAC ACC CGC GGT TAC GCC TAT GAC CGT CGT GAC GTC ACG	350	
Gln Phe Ala Asp Thr Arg Gly Tyr Ala Tyr Asp Arg Arg Asp Val Thr		
80 85 90 95		
GGT CGG CAG TTG GCC AAT GTC TAC GCG CAG ACT CTA GGC ACC ATC TTC	398	
Gly Arg Gln Leu Ala Asn Val Tyr Ala Gln Thr Leu Gly Thr Ile Phe		
100 105 110		20
ACC GAA CAG GCC AAG CCC TAC GAG GTT GAG TTG TGT GTG GCC GAG GTG	446	
Thr Glu Gln Ala Lys Pro Tyr Glu Val Glu Leu Cys Val Ala Glu Val		
115 120 125		
GCG CAT TAC GGC GAG ACG AAA CGC CCT GAG TTG TAT CGT ATT ACC TAC	494	
Ala His Tyr Gly Glu Thr Lys Arg Pro Glu Leu Tyr Arg Ile Thr Tyr		
130 135 140		
GAC GGG TCG ATC GCC GAC GAG CCG CAT TTC GTG GTG ATG GGC GGC ACC	542	
Asp Gly Ser Ile Ala Asp Glu Pro His Phe Val Val Met Gly Gly Thr		
145 150 155		
ACG GAG CCG ATC GCC AAC GCG CTC AAA GAG TCG TAT GCC GAG AAC GCC	590	30
Thr Glu Pro Ile Ala Asn Ala Leu Lys Glu Ser Tyr Ala Glu Asn Ala		
160 165 170 175		
AGC CTG ACC GAC GCC CTG CGT ATC GCG GTC GCT GCA TTG CGG GCC GGC	638	
Ser Leu Thr Asp Ala Leu Arg Ile Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Gly		
180 185 190		
AGT GCC GAC ACC TCG GGT GGT GAT CAA CCC ACC CTT GGC GTG GCC AGC	686	
Ser Ala Asp Thr Ser Gly Gly Asp Gln Pro Thr Leu Gly Val Ala Ser		
195 200 205		
TTA GAG GTG GCC GTT CTC GAT GCC AAC CGG CCA CGG CGC GCG TTC CGG	734	
Leu Glu Val Ala Val Leu Asp Ala Asn Arg Pro Arg Arg Ala Phe Arg		
210 215 220		
CGC ATC ACC GGC TCC GCC CTG CAA GCG TTG CTG GTA GAC CAG GAA AGC	782	40
Arg Ile Thr Gly Ser Ala Leu Gln Ala Leu Leu Val Asp Gln Glu Ser		
225 230 235		
CCG CAG TCT GAC GGC GAA TCG TCG GG CTGAGTCCGA AAGTCCGACG CGTGTCTG	836	
Pro Gln Ser Asp Gly Glu Ser Ser Gly		
240 245		
GGACCCCGCT GCGACGTTAA CTGCGCCTAA CCCCGGCTCG ACGCGTCGCC GGCCGTCCTG	896	
ACTT	900	

(2) SEQ ID NO: 60の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 248アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : タンパク質

(v) フラグメントの型 : internal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 60 :

```

Met Ser Phe Pro Tyr Phe Ile Ser Pro Glu Gln Ala Met Arg Glu Arg
 1           5           10           15

Ser Glu Leu Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Lys Ser Val Val Ala
      20           25           30

Leu Ala Tyr Ala Gly Gly Val Leu Phe Val Ala Glu Asn Pro Ser Arg
      35           40           45

Ser Leu Gln Lys Ile Ser Glu Leu Tyr Asp Arg Val Gly Phe Ala Ala
      50           55           60

Ala Gly Lys Phe Asn Glu Phe Asp Asn Leu Arg Arg Gly Gly Ile Gln
      65           70           75           80

Phe Ala Asp Thr Arg Gly Tyr Ala Tyr Asp Arg Arg Asp Val Thr Gly
      85           90           95

Arg Gln Leu Ala Asn Val Tyr Ala Gln Thr Leu Gly Thr Ile Phe Thr
      100          105          110

Glu Gln Ala Lys Pro Tyr Glu Val Glu Leu Cys Val Ala Glu Val Ala
      115          120          125

His Tyr Gly Glu Thr Lys Arg Pro Glu Leu Tyr Arg Ile Thr Tyr Asp
      130          135          140

Gly Ser Ile Ala Asp Glu Pro His Phe Val Val Met Gly Gly Thr Thr
      145          150          155          160

Glu Pro Ile Ala Asn Ala Leu Lys Glu Ser Tyr Ala Glu Asn Ala Ser
      165          170          175

Leu Thr Asp Ala Leu Arg Ile Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Gly Ser
      180          185          190

Ala Asp Thr Ser Gly Gly Asp Gln Pro Thr Leu Gly Val Ala Ser Leu
      195          200          205

Glu Val Ala Val Leu Asp Ala Asn Arg Pro Arg Arg Ala Phe Arg Arg
      210          215          220

Ile Thr Gly Ser Ala Leu Gln Ala Leu Leu Val Asp Gln Glu Ser Pro
      225          230          235          240

Gln Ser Asp Gly Glu Ser Ser Gly
      245

```

(2) SEQ ID NO : 61 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1560塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : Cording Sequence

(B) 存在位置 : 98...1487

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 61 :

GAGTCATTGC CTGGTCGGCG TCATTCCGTA CTAGTCGGTT GTCGGACTTG ACCTACTGGG	60	
TCAGGCCGAC GAGCACTCGA CCATTAGGGT AGGGGCC GTG ACC CAC TAT GAC GTC	115	
Met Thr His Tyr Asp Val		
1 5		
GTC GTT CTC GGA GCC GGT CCC GGC GGG TAT GTC GCG GCG ATT CGC GCC	163	
Val Val Leu Gly Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala		
10 15 20		
GCA CAG CTC GGC CTG AGC ACT GCA ATC GTC GAA CCC AAG TAC TGG GGC	211	
Ala Gln Leu Gly Leu Ser Thr Ala Ile Val Glu Pro Lys Tyr Trp Gly		
25 30 35		
GGA GTA TGC CTC AAT GTC GGC TGT ATC CCA TCC AAG GCG CTG TTG CGC	259	10
Gly Val Cys Leu Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu Arg		
40 45 50		
AAC GCC GAA CTG GTC CAC ATC TTC ACC AAG GAC GCC AAA GCA TTT GGC	307	
Asn Ala Glu Leu Val His Ile Phe Thr Lys Asp Ala Lys Ala Phe Gly		
55 60 65 70		
ATC AGC GGC GAG GTG ACC TTC GAC TAC GGC ATC GCC TAT GAC CGC AGC	355	
Ile Ser Gly Glu Val Thr Phe Asp Tyr Gly Ile Ala Tyr Asp Arg Ser		
75 80 85		
CGA AAG GTA GCC GAG GGC AGG GTG GCC GGT GTG CAC TTC CTG ATG AAG	403	
Arg Lys Val Ala Glu Gly Arg Val Ala Gly Val His Phe Leu Met Lys		
90 95 100		
AAG AAC AAG ATC ACC GAG ATC CAC GGG TAC GGC ACA TTT GCC GAC GCC	451	20
Lys Asn Lys Ile Thr Glu Ile His Gly Tyr Gly Thr Phe Ala Asp Ala		
105 110 115		
AAC ACG TTG TTG GTT GAT CTC AAC GAC GGC GGT ACA GAA TCG GTC ACG	499	
Asn Thr Leu Leu Val Asp Leu Asn Asp Gly Gly Thr Glu Ser Val Thr		
120 125 130		
TTC GAC AAC GCC ATC ATC GCG ACC GGC AGT AGC ACC CGG CTG GTT CCC	547	
Phe Asp Asn Ala Ile Ile Ala Thr Gly Ser Ser Thr Arg Leu Val Pro		
135 140 145 150		
GGC ACC TCA CTG TCG GCC AAC GTA GTC ACC TAC GAG GAA CAG ATC CTG	595	30
Gly Thr Ser Leu Ser Ala Asn Val Val Thr Tyr Glu Glu Gln Ile Leu		
155 160 165		
TCC CGA GAG CTG CCG AAA TCG ATC ATT ATT GCC GGA GCT GGT GCC ATT	643	
Ser Arg Glu Leu Pro Lys Ser Ile Ile Ile Ala Gly Ala Gly Ala Ile		
170 175 180		
GGC ATG GAG TTC GGC TAC GTG CTG AAG AAC TAC GGC GTT GAC GTG ACC	691	
Gly Met Glu Phe Gly Tyr Val Leu Lys Asn Tyr Gly Val Asp Val Thr		

185	190	195		
ATC GTG GAA TTC CTT CCG CGG GCG CTG CCC AAC GAG GAC GCC GAT GTG Ile Val Glu Phe Leu Pro Arg Ala Leu Pro Asn Glu Asp Ala Asp Val 200 205 210			739	
TCC AAG GAG ATC GAG AAG CAG TTC AAA AAG CTG GGT GTC ACG ATC CTG Ser Lys Glu Ile Glu Lys Gln Phe Lys Lys Leu Gly Val Thr Ile Leu 215 220 225 230			787	
ACC GCC ACG AAG GTC GAG TCC ATC GCC GAT GGC GGG TCG CAG GTC ACC Thr Ala Thr Lys Val Glu Ser Ile Ala Asp Gly Gly Ser Gln Val Thr 235 240 245			835	
GTG ACC GTC ACC AAG GAC GGC GTG GCG CAA GAG CTT AAG GCG GAA AAG Val Thr Val Thr Lys Asp Gly Val Ala Gln Glu Leu Lys Ala Glu Lys 250 255 260			883	10
GTG TTG CAG GCC ATC GGA TTT GCG CCC AAC GTC GAA GGG TAC GGG CTG Val Leu Gln Ala Ile Gly Phe Ala Pro Asn Val Glu Gly Tyr Gly Leu 265 270 275			931	
GAC AAG GCA GGC GTC GCG CTG ACC GAC CGC AAG GCT ATC GGT GTC GAC Asp Lys Ala Gly Val Ala Leu Thr Asp Arg Lys Ala Ile Gly Val Asp 280 285 290			979	
GAC TAC ATG CGT ACC AAC GTG GGC CAC ATC TAC GCT ATC GGC GAT GTC Asp Tyr Met Arg Thr Asn Val Gly His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val 295 300 305 310			1027	20
AAT GGA TTA CTG CAG CTG GCG CAC GTC GCC GAG GCA CAA GGC GTG GTA Asn Gly Leu Leu Gln Leu Ala His Val Ala Glu Ala Gln Gly Val Val 315 320 325			1075	
GCC GCC GAA ACC ATT GCC GGT GCA GAG ACT TTG ACG CTG GGC GAC CAT Ala Ala Glu Thr Ile Ala Gly Ala Glu Thr Leu Thr Leu Gly Asp His 330 335 340			1123	
CGG ATG TTG CCG CGC GCG ACG TTC TGT CAG CCA AAC GTT GCC AGC TTC Arg Met Leu Pro Arg Ala Thr Phe Cys Gln Pro Asn Val Ala Ser Phe 345 350 355			1171	
GGG CTC ACC GAG CAG CAA GCC CGC AAC GAA GGT TAC GAC GTG GTG GTG Gly Leu Thr Glu Gln Gln Ala Arg Asn Glu Gly Tyr Asp Val Val Val 360 365 370			1219	30
GCC AAG TTC CCG TTC ACG GCC AAC GCC AAG GCG CAC GGC GTG GGT GAC Ala Lys Phe Pro Phe Thr Ala Asn Ala Lys Ala His Gly Val Gly Asp 375 380 385 390			1267	
CCC AGT GGG TTC GTC AAG CTG GTG GCC GAC GCC AAG CAC GGC GAG CTA Pro Ser Gly Phe Val Lys Leu Val Ala Asp Ala Lys His Gly Glu Leu 395 400 405			1315	
CTG GGT GGG CAC CTG GTC GGC CAC GAC GTG GCC GAG CTG CTG CCG GAG Leu Gly Gly His Leu Val Gly His Asp Val Ala Glu Leu Leu Pro Glu 410 415 420			1363	
CTC ACG CTG GCG CAG AGG TGG GAC CTG ACC GCC AGC GAG CTG GCT CGC Leu Thr Leu Ala Gln Arg Trp Asp Leu Thr Ala Ser Glu Leu Ala Arg 425 430 435			1411	40
AAC GTC CAC ACC CAC CCA ACG ATG TCT GAG GCG CTG CAG GAG TGC TTC Asn Val His Thr His Pro Thr Met Ser Glu Ala Leu Gln Glu Cys Phe 440 445 450			1459	
CAC GGC CTG GTT GGC CAC ATG ATC AAT T TCTGAGCGGC TCATGACGAG GCGCG His Gly Leu Val Gly His Met Ile Asn Phe 455 460			1512	
CGAGCACTGA CACCCCCCAG ATCATCATGG GTGCCATCGG TGGTGTGG			1560	50

(2) SEQ ID NO: 62の情報:

- (i) 配列の特徴 :
- (A) 配列の長さ : 464 アミノ酸
- (B) 配列の型 : アミノ酸
- (C) 鎖 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 分子の型 : タンパク質
- (v) フラグメントの型 : internal
- (xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 62 :

Met	Thr	His	Tyr	Asp	Val	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Tyr		
1				5					10					15			
Val	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Ile	Val		
			20					25					30				
Glu	Pro	Lys	Tyr	Trp	Gly	Gly	Val	Cys	Leu	Asn	Val	Gly	Cys	Ile	Pro		
		35					40					45					
Ser	Lys	Ala	Leu	Leu	Arg	Asn	Ala	Glu	Leu	Val	His	Ile	Phe	Thr	Lys		
		50				55					60						
Asp	Ala	Lys	Ala	Phe	Gly	Ile	Ser	Gly	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Tyr	Gly		
65					70				75					80			
Ile	Ala	Tyr	Asp	Arg	Ser	Arg	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	Arg	Val	Ala	Gly		
			85					90					95				
Val	His	Phe	Leu	Met	Lys	Lys	Asn	Lys	Ile	Thr	Glu	Ile	His	Gly	Tyr		
			100					105					110				
Gly	Thr	Phe	Ala	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Asn	Asp	Gly		
		115					120					125					
Gly	Thr	Glu	Ser	Val	Thr	Phe	Asp	Asn	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Ser		
		130				135					140						
Ser	Thr	Arg	Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Asn	Val	Val	Thr		
145					150				155					160			
Tyr	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Ser	Arg	Glu	Leu	Pro	Lys	Ser	Ile	Ile	Ile		
			165					170					175				
Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ile	Gly	Met	Glu	Phe	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asn		
		180					185						190				
Tyr	Gly	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	Pro		
		195					200					205					
Asn	Glu	Asp	Ala	Asp	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Glu	Lys	Gln	Phe	Lys	Lys		
		210				215					220						
Leu	Gly	Val	Thr	Ile	Leu	Thr	Ala	Thr	Lys	Val	Glu	Ser	Ile	Ala	Asp		
225					230				235					240			
Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Thr	Val	Thr	Val	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	Ala	Gln		
			245					250					255				
Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Lys	Val	Leu	Gln	Ala	Ile	Gly	Phe	Ala	Pro	Asn		
		260					265						270				
Val	Glu	Gly	Tyr	Gly	Leu	Asp	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	Asp	Arg		
		275				280						285					
Lys	Ala	Ile	Gly	Val	Asp	Asp	Tyr	Met	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	His	Ile		
	290				295						300						
Tyr	Ala	Ile	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Ala	His	Val	Ala		
305					310				315					320			
Glu	Ala	Gln	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Ile	Ala	Gly	Ala	Glu	Thr		
			325					330				335					
Leu	Thr	Leu	Gly	Asp	His	Arg	Met	Leu	Pro	Arg	Ala	Thr	Phe	Cys	Gln		
		340					345					350					
Pro	Asn	Val	Ala	Ser	Phe	Gly	Leu	Thr	Glu	Gln	Gln	Ala	Arg	Asn	Glu		
		355				360						365					
Gly	Tyr	Asp	Val	Val	Val	Ala	Lys	Phe	Pro	Phe	Thr	Ala	Asn	Ala	Lys		
	370				375						380						
Ala	His	Gly	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Gly	Phe	Val	Lys	Leu	Val	Ala	Asp		
385					390				395					400			
Ala	Lys	His	Gly	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	His	Leu	Val	Gly	His	Asp	Val		
			405					410					415				
Ala	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Trp	Asp	Leu	Thr		
		420					425					430					
Ala	Ser	Glu	Leu	Ala	Arg	Asn	Val	His	Thr	His	Pro	Thr	Met	Ser	Glu		
	435					440					445						
Ala	Leu	Gln	Glu	Cys	Phe	His	Gly	Leu	Val	Gly	His	Met	Ile	Asn	Phe		
	450				455						460						

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO: 63の情報:

(i) 配列の特徴:

50

(A) 配列の長さ : 550塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : Cording Sequence

(B) 存在位置 : 101...490

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 63 :

```

GGCCCCGGCTC GCGGCCGCCC TGCAGGAAAA GAAGGCCTGC CCAGGCCAG ACTCAGCCGA      60      10
GTAGTCACCC AGTACCCAC ACCAGGAAGG ACCGCCATC  ATG GCA AAG CTC TCC      115
                                         Met Ala Lys Leu Ser
                                         1           5

ACC GAC GAA CTG CTG GAC GCG TTC AAG GAA ATG ACC CTG TTG GAG CTC      163
Thr Asp Glu Leu Leu Asp Ala Phe Lys Glu Met Thr Leu Leu Glu Leu
                        10                        15                        20

TCC GAC TTC GTC AAG AAG TTC GAG GAG ACC TTC GAG GTC ACC GCC GCC      211
Ser Asp Phe Val Lys Lys Phe Glu Glu Thr Phe Glu Val Thr Ala Ala
                        25                        30                        35
                                         20

GCT CCA GTC GCC GTC GCC GCC GCC GGT GCC GCC CCG GCC GGT GCC GCC      259
Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ala
                        40                        45                        50

GTC GAG GCT GCC GAG GAG CAG TCC GAG TTC GAC GTG ATC CTT GAG GCC      307
Val Glu Ala Ala Glu Glu Gln Ser Glu Phe Asp Val Ile Leu Glu Ala
                        55                        60                        65

GCC GGC GAC AAG AAG ATC GGC GTC ATC AAG GTG GTC CGG GAG ATC GTT      355
Ala Gly Asp Lys Lys Ile Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Val
                        70                        75                        80                        85
                                         30

TCC GGC CTG GGC CTC AAG GAG GCC AAG GAC CTG GTC GAC GGC GCG CCC      403
Ser Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Asp Gly Ala Pro
                        90                        95                        100

AAG CCG CTG CTG GAG AAG GTC GCC AAG GAG GCC GCC GAC GAG GCC AAG      451
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Val Ala Lys Glu Ala Ala Asp Glu Ala Lys
                        105                        110                        115

GCC AAG CTG GAG GCC GCC GGC GCC ACC GTC ACC GTC AAG TAGCTCTGCC CA      502
Ala Lys Leu Glu Ala Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Lys
                        120                        125                        130

GCGTGTTCCTT TTGCGTCTGC TCGGCCGTA GCGAACACTG CGCCCGCT      550

```

(2) SEQ ID NO : 64の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 130アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : タンパク質

(v) フラグメントの型 : internal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 64 :

50

Met Ala Lys Leu Ser Thr Asp Glu Leu Leu Asp Ala Phe Lys Glu Met
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Glu Leu Ser Asp Phe Val Lys Lys Phe Glu Glu Thr Phe
 20 25 30

Glu Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Gly Ala Ala
 35 40 45

Pro Ala Gly Ala Ala Val Glu Ala Ala Glu Glu Gln Ser Glu Phe Asp
 50 55 60

Val Ile Leu Glu Ala Ala Gly Asp Lys Lys Ile Gly Val Ile Lys Val
 65 70 75 80

Val Arg Glu Ile Val Ser Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu
 85 90 95

Val Asp Gly Ala Pro Lys Pro Leu Leu Glu Lys Val Ala Lys Glu Ala
 100 105 110

Ala Asp Glu Ala Lys Ala Lys Leu Glu Ala Ala Gly Ala Thr Val Thr
 115 120 125

Val Lys
 130

(2) SEQ ID NO: 65の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 900塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 87...770

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 65:

10

20

30

TGAACGCCAT CGGGTCCAAC GAACGCAGCG CTACCTGATC ACCACCGGGT CTGTTAGGGC	60	
TCTTCCCCAG GTCGTACAGT CGGGCC ATG GCC ATT GAG GTT TCG GTG TTG CGG	113	
Met Ala Ile Glu Val Ser Val Leu Arg		
1 5		
GTT TTC ACC GAT TCA GAC GGG AAT TTC GGT AAT CCG CTG GGG GTG ATC	161	
Val Phe Thr Asp Ser Asp Gly Asn Phe Gly Asn Pro Leu Gly Val Ile		
10 15 20 25		
AAC GCC AGC AAG GTC GAA CAC CGC GAC AGG CAG CAG CTG GCA GCC CAA	209	
Asn Ala Ser Lys Val Glu His Arg Asp Arg Gln Gln Leu Ala Ala Gln		
30 35 40		
TCG GGC TAC AGC GAA ACC ATA TTC GTC GAT CTT CCC AGC CCC GGC TCA	257	10
Ser Gly Tyr Ser Glu Thr Ile Phe Val Asp Leu Pro Ser Pro Gly Ser		
45 50 55		
ACC ACC GCA CAC GCC ACC ATC CAT ACT CCC CGC ACC GAA ATT CCG TTC	305	
Thr Thr Ala His Ala Thr Ile His Thr Pro Arg Thr Glu Ile Pro Phe		
60 65 70		
GCC GGA CAC CCG ACC GTG GGA GCG TCC TGG TGG CTG CGC GAG AGG GGG	353	
Ala Gly His Pro Thr Val Gly Ala Ser Trp Trp Leu Arg Glu Arg Gly		
75 80 85		
ACG CCA ATT AAC ACG CTG CAG GTG CCG GCC GGC ATC GTC CAG GTG AGC	401	
Thr Pro Ile Asn Thr Leu Gln Val Pro Ala Gly Ile Val Gln Val Ser		
90 95 100 105		
TAC CAC GGT GAT CTC ACC GCC ATC AGC GCC CGC TCG GAA TGG GCA CCC	449	20
Tyr His Gly Asp Leu Thr Ala Ile Ser Ala Arg Ser Glu Trp Ala Pro		
110 115 120		
GAG TTC GCC ATC CAC GAC CTG GAT TCA CTT GAT GCG CTT GCC GCC GCC	497	
Glu Phe Ala Ile His Asp Leu Asp Ser Leu Asp Ala Leu Ala Ala Ala		
125 130 135		
GAC CCC GCC GAC TTT CCG GAC GAC ATC GCG CAC TAC CTC TGG ACC TGG	545	
Asp Pro Ala Asp Phe Pro Asp Asp Ile Ala His Tyr Leu Trp Thr Trp		
140 145 150		
ACC GAC CGC TCC GCT GGC TCG CTG CGC GCC CGC ATG TTT GCC GCC AAC	593	
Thr Asp Arg Ser Ala Gly Ser Leu Arg Ala Arg Met Phe Ala Ala Asn		
155 160 165		
TTG GGC GTC ACC GAA GAC GAA GCG ACC GGT GCC GCG GCC ATC CGG ATT	641	30
Leu Gly Val Thr Glu Asp Glu Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ile Arg Ile		
170 175 180 185		
ACC GAT TAC CTC AGC CGT GAC CTC ACC ATC ACC CAG GGC AAA GGA TCG	689	
Thr Asp Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Thr Ile Thr Gln Gly Lys Gly Ser		
190 195 200		
TTG ATC CAC ACC ACC TGG AGT CCC GAG GGC TGG GTT CGG GTA GCC GGC	737	
Leu Ile His Thr Thr Trp Ser Pro Glu Gly Trp Val Arg Val Ala Gly		
205 210 215		
CGA GTT GTC AGC GAC GGT GTG GCA CAA CTC GAC TGACGTAGAG CTCAGCGCTG	790	
Arg Val Val Ser Asp Gly Val Ala Gln Leu Asp		
220 225		
CCGATGCAAC ACGGCGGCAA GGTGATCCTG CAGGGGTTGC CCGACCGCGC GCATCTGCAA	850	
CGAGTACGAA AGCTCGTCGC CGTCGATGCG GTAGGAACGG TCAAGGGCGG	900	40

(2) SEQ ID NO: 66の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 228アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型 : internal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 66 :

```

Met Ala Ile Glu Val Ser Val Leu Arg Val Phe Thr Asp Ser Asp Gly
 1           5           10           15
Asn Phe Gly Asn Pro Leu Gly Val Ile Asn Ala Ser Lys Val Glu His
 20           25           30
Arg Asp Arg Gln Gln Leu Ala Ala Gln Ser Gly Tyr Ser Glu Thr Ile
 35           40           45
Phe Val Asp Leu Pro Ser Pro Gly Ser Thr Thr Ala His Ala Thr Ile
 50           55           60
His Thr Pro Arg Thr Glu Ile Pro Phe Ala Gly His Pro Thr Val Gly
 65           70           75           80
Ala Ser Trp Trp Leu Arg Glu Arg Gly Thr Pro Ile Asn Thr Leu Gln
 85           90           95
Val Pro Ala Gly Ile Val Gln Val Ser Tyr His Gly Asp Leu Thr Ala
100           105           110
Ile Ser Ala Arg Ser Glu Trp Ala Pro Glu Phe Ala Ile His Asp Leu
115           120           125
Asp Ser Leu Asp Ala Leu Ala Ala Ala Asp Pro Ala Asp Phe Pro Asp
130           135           140
Asp Ile Ala His Tyr Leu Trp Thr Trp Thr Asp Arg Ser Ala Gly Ser
145           150           155           160
Leu Arg Ala Arg Met Phe Ala Ala Asn Leu Gly Val Thr Glu Asp Glu
165           170           175
Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ile Arg Ile Thr Asp Tyr Leu Ser Arg Asp
180           185           190
Leu Thr Ile Thr Gln Gly Lys Gly Ser Leu Ile His Thr Thr Trp Ser
195           200           205
Pro Glu Gly Trp Val Arg Val Ala Gly Arg Val Val Ser Asp Gly Val
210           215           220
Ala Gln Leu Asp
225

```

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO : 67の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 500塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : Cording Sequence

(B) 存在位置 : 49...465

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 67 :

GT TTGTGGTG TCGGTGGTCT GGGGGGCGCC AACTGGGATT CGGTTGGG GTG GGT GCA	57	
Met Gly Ala		
1		
GGT CCG GCG ATG GGC ATC GGA GGT GTG GGT GGT TTG GGT GGG GCC GGT	105	
Gly Pro Ala Met Gly Ile Gly Gly Val Gly Gly Leu Gly Gly Ala Gly		
5 10 15		
TCG GGT CCG GCG ATG GGC ATG GGG GGT GTG GGT GGT TTG GGT GGG GCC	153	
Ser Gly Pro Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Gly Leu Gly Gly Ala		
20 25 30 35		
GGT TCG GGT CCG GCG ATG GGC ATG GGG GGT GTG GGT GGT TTA GAT GCG	201	10
Gly Ser Gly Pro Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Gly Leu Asp Ala		
40 45 50		
GCC GGT TCC GGC GAG GGC GGC TCT CCT GCG GCG ATC GGC ATC GGA GTT	249	
Ala Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Pro Ala Ala Ile Gly Ile Gly Val		
55 60 65		
GGC GGA GGC GGA GGT GGG GGT GGG GGT GGC GGC GGC GGG GCC GAC ACG	297	
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Asp Thr		
70 75 80		
AAC CGC TCC GAC AGG TCG TCG GAC GTC GGG GGC GGA GTC TGG CCG TTG	345	20
Asn Arg Ser Asp Arg Ser Ser Asp Val Gly Gly Gly Val Trp Pro Leu		
85 90 95		
GGC TTC GGT AGG TTT GCC GAT GCG GGC GCC GGC GGA AAC GAA GCA CTG	393	
Gly Phe Gly Arg Phe Ala Asp Ala Gly Ala Gly Gly Asn Glu Ala Leu		
100 105 110 115		
GGG TCG AAG AAC GGC TGC GCT GCC ATA TCG TCC GGA GCT TCC ATA CCT	441	
Gly Ser Lys Asn Gly Cys Ala Ala Ile Ser Ser Gly Ala Ser Ile Pro		
120 125 130		
TCG TGC GGC CGG AAG AGC TTG TCG TAGTCGGCCG CCATGACAAC CTCTCAGAGT	495	30
Ser Cys Gly Arg Lys Ser Leu Ser		
135		
GCGCT	500	

(2) SEQ ID NO: 68の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 139アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 68:

40

Met Gly Ala Gly Pro Ala Met Gly Ile Gly Gly Val Gly Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Ser Gly Pro Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Gly Leu
 20 25 30
 Gly Gly Ala Gly Ser Gly Pro Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Gly
 35 40 45
 Leu Asp Ala Ala Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Pro Ala Ala Ile Gly
 50 55 60
 Ile Gly Val Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Thr Asn Arg Ser Asp Arg Ser Ser Asp Val Gly Gly Gly Val
 85 90 95
 Trp Pro Leu Gly Phe Gly Arg Phe Ala Asp Ala Gly Ala Gly Gly Asn
 100 105 110
 Glu Ala Leu Gly Ser Lys Asn Gly Cys Ala Ala Ile Ser Ser Gly Ala
 115 120 125
 Ser Ile Pro Ser Cys Gly Arg Lys Ser Leu Ser
 130 135

10

20

(2) SEQ ID NO: 69の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2050塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 22...2019

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 69:

30

AGCGCACTCT GAGAGGTTGT C ATG GCG GCC GAC TAC GAC AAG CTC TTC CGG	51
Met Ala Ala Asp Tyr Asp Lys Leu Phe Arg	
1 5 10	
CCG CAC GAA GGT ATG GAA GCT CCG GAC GAT ATG GCA GCG CAG CCG TTC	99
Pro His Glu Gly Met Glu Ala Pro Asp Asp Met Ala Ala Gln Pro Phe	
15 20 25	
TTC GAC CCC AGT GCT TCG TTT CCG CCG GCG CCC GCA TCG GCA AAC CTA	147
Phe Asp Pro Ser Ala Ser Phe Pro Pro Ala Pro Ala Ser Ala Asn Leu	
30 35 40	
CCG AAG CCC AAC GGC CAG ACT CCG CCC CCG ACG TCC GAC GAC CTG TCG	195
Pro Lys Pro Asn Gly Gln Thr Pro Pro Pro Thr Ser Asp Asp Leu Ser	
45 50 55	
GAG CGG TTC GTG TCG GCC CCG CCG CCG CCA CCC CCA CCC CCA CCT CCG	243
Glu Arg Phe Val Ser Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro	
60 65 70	
CCT CCG CCA ACT CCG ATG CCG ATC GCC GCA GGA GAG CCG CCC TCG CCG	291
Pro Pro Pro Thr Pro Met Pro Ile Ala Ala Gly Glu Pro Pro Ser Pro	
75 80 85 90	
GAA CCG GCC GCA TCT AAA CCA CCC ACA CCC CCC ATG CCC ATC GCC GGA	339
Glu Pro Ala Ala Ser Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly	
95 100 105	
CCC GAA CCG GCC CCA CCC AAA CCA CCC ACA CCC CCC ATG CCC ATC GCC	387
Pro Glu Pro Ala Pro Pro Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala	
110 115 120	
GGA CCC GAA CCG GCC CCA CCC AAA CCA CCC ACA CCT CCG ATG CCC ATC	435
Gly Pro Glu Pro Ala Pro Pro Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile	
125 130 135	

10

20

GCC GGA CCT GCA CCC ACC CCA ACC GAA TCC CAG TTG GCG CCC CCC AGA 483
Ala Gly Pro Ala Pro Thr Pro Thr Glu Ser Gln Leu Ala Pro Pro Arg
140 145 150

CCA CCG ACA CCA CAA ACG CCA ACC GGA GCG CCG CAG CAA CCG GAA TCA 531
Pro Pro Thr Pro Gln Thr Pro Thr Gly Ala Pro Gln Gln Pro Glu Ser
155 160 165 170

CCG GCG CCC CAC GTA CCC TCG CAC GGG CCA CAT CAA CCC CGG CGC ACC 579
Pro Ala Pro His Val Pro Ser His Gly Pro His Gln Pro Arg Arg Thr
175 180 185

GCA CCA GCA CCG CCC TGG GCA AAG ATG CCA ATC GGC GAA CCC CCG CCC 627
Ala Pro Ala Pro Pro Trp Ala Lys Met Pro Ile Gly Glu Pro Pro Pro
190 195 200

GCT CCG TCC AGA CCG TCT GCG TCC CCG GCC GAA CCA CCG ACC CGG CCT 675
Ala Pro Ser Arg Pro Ser Ala Ser Pro Ala Glu Pro Pro Thr Arg Pro
205 210 215

GCC CCC CAA CAC TCC CGA CGT GCG CGC CGG GGT CAC CGC TAT CGC ACA 723
Ala Pro Gln His Ser Arg Arg Ala Arg Gly His Arg Tyr Arg Thr
220 225 230

GAC ACC GAA CGA AAC GTC GGG AAG GTA GCA ACT GGT CCA TCC ATC CAG 771
Asp Thr Glu Arg Asn Val Gly Lys Val Ala Thr Gly Pro Ser Ile Gln
235 240 245 250

GCG CGG CTG CCG GCA GAG GAA GCA TCC GGC GCG CAG CTC GCC CCC GGA 819
Ala Arg Leu Arg Ala Glu Glu Ala Ser Gly Ala Gln Leu Ala Pro Gly
255 260 265

ACG GAG CCC TCG CCA GCG CCG TTG GGC CAA CCG AGA TCG TAT CTG GCT 867
Thr Glu Pro Ser Pro Ala Pro Leu Gly Gln Pro Arg Ser Tyr Leu Ala
270 275 280

CCG CCC ACC CGC CCC GCG CCG ACA GAA CCT CCC CCC AGC CCC TCG CCG 915
Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Thr Glu Pro Pro Pro Ser Pro Ser Pro
285 290 295

CAG CGC AAC TCC GGT CGG CGT GCC GAG CGA CGC GTC CAC CCC GAT TTA 963
Gln Arg Asn Ser Gly Arg Arg Ala Glu Arg Arg Val His Pro Asp Leu
300 305 310

GCC GCC CAA CAT GCC GCG GCG CAA CCT GAT TCA ATT ACG GCC GCA ACC 1011
Ala Ala Gln His Ala Ala Ala Gln Pro Asp Ser Ile Thr Ala Ala Thr
315 320 325 330

ACT GGC GGT CGT CGC CGC AAG CGT GCA GCG CCG GAT CTC GAC GCG ACA 1059
Thr Gly Gly Arg Arg Arg Lys Arg Ala Ala Pro Asp Leu Asp Ala Thr
335 340 345

CAG AAA TCC TTA AGG CCG GCG GCC AAG GGG CCG AAG GTG AAG AAG GTG 1107
Gln Lys Ser Leu Arg Pro Ala Ala Lys Gly Pro Lys Val Lys Lys Val
350 355 360

AAG CCC CAG AAA CCG AAG GCC ACG AAG CCG CCC AAA GTG GTG TCG CAG 1155
Lys Pro Gln Lys Pro Lys Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln
365 370 375

CGC GGC TGG CGA CAT TGG GTG CAT GCG TTG ACG CGA ATC AAC CTG GGC 1203
Arg Gly Trp Arg His Trp Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly
380 385 390

CTG TCA CCC GAC GAG AAG TAC GAG CTG GAC CTG CAC GCT CGA GTC CGC 1251
Leu Ser Pro Asp Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg
395 400 405 410

CGC AAT CCC CGC GGG TCG TAT CAG ATC GCC GTC GTC GGT CTC AAA GGT 1299
Arg Asn Pro Arg Gly Ser Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly
415 420 425

GGG GCT GGC AAA ACC ACG CTG ACA GCA GCG TTG GGG TCG ACG TTG GCT 1347
Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala
430 435 440

CAG GTG CCG GCC GAC CGG ATC CTG GCT CTA GAC GCG GAT CCA GGC GCC 1395
Gln Val Arg Ala Asp Arg Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala
445 450 455

GGA AAC CTC GCC GAT CGG GTA GGG CGA CAA TCG GGC GCG ACC ATC GCT 1443
Gly Asn Leu Ala Asp Arg Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala
460 465 470

10

20

30

40

GAT GTG CTT GCA GAA AAA GAG CTG TCG CAC TAC AAC GAC ATC CGC GCA 1491
 Asp Val Leu Ala Glu Lys Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala
 475 480 485 490

CAC ACT AGC GTC AAT GCG GTC AAT CTG GAA GTG CTG CCG GCA CCG GAA 1539
 His Thr Ser Val Asn Ala Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu
 495 500 505

TAC AGC TCG GCG CAG CGC GCG CTC AGC GAC GCC GAC TGG CAT TTC ATC 1587
 Tyr Ser Ser Ala Gln Arg Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile
 510 515 520

GCC GAT CCT GCG TCG AGG TTT TAC AAC CTC GTC TTG GCT GAT TGT GGG 1635
 Ala Asp Pro Ala Ser Arg Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly
 525 530 535

GCC GGC TTC TTC GAC CCG CTG ACC CGC GGC GTG CTG TCC ACG GTG TCC 1683
 Ala Gly Phe Phe Asp Pro Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser
 540 545 550

GGT GTC GTG GTC GTG GCA AGT GTC TCA ATC GAC GGC GCA CAA CAG GCG 1731
 Gly Val Val Val Val Ala Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala
 555 560 565 570

TCG GTC GCG TTG GAC TGG TTG CGC AAC AAC GGT TAC CAA GAT TTG GCG 1779
 Ser Val Ala Leu Asp Trp Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala
 575 580 585

AGC CGC GCA TGC GTG GTC ATC AAT CAC ATC ATG CCG GGA GAA CCC AAT 1827
 Ser Arg Ala Cys Val Val Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn
 590 595 600

GTC GCA GTT AAA GAC CTG GTG CGG CAT TTC GAA CAG CAA GTT CAA CCC 1875
 Val Ala Val Lys Asp Leu Val Arg His Phe Glu Gln Gln Val Gln Pro
 605 610 615

GGC CGG GTC GTG GTC ATG CCG TGG GAC AGG CAC ATT GCG GCC GGA ACC 1923
 Gly Arg Val Val Val Met Pro Trp Asp Arg His Ile Ala Ala Gly Thr
 620 625 630

GAG ATT TCA CTC GAC TTG CTC GAC CCT ATC TAC AAG CGC AAG GTC CTC 1971
 Glu Ile Ser Leu Asp Leu Leu Asp Pro Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu
 635 640 645 650

GAA TTG GCC GCA GCG CTA TCC GAC GAT TTC GAG AGG GCT GGA CGT CGT T 2020
 Glu Leu Ala Ala Ala Leu Ser Asp Asp Phe Glu Arg Ala Gly Arg Arg
 655 660 665

GAGCGCACCT GCTGTGCTG CTGGTCCTAC 2050

10

20

30

(2) SEQ ID NO: 70の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 666アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 70:

Met	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Phe	Arg	Pro	His	Glu	Gly	Met	Glu
1				5					10					15	
Ala	Pro	Asp	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Pro	Phe	Phe	Asp	Pro	Ser	Ala	Ser
		20						25					30		
Phe	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Lys	Pro	Asn	Gly	Gln
		35					40					45			
Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Ser	Asp	Asp	Leu	Ser	Glu	Arg	Phe	Val	Ser	Ala
	50					55					60				
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Pro	Met
65					70				75					80	
Pro	Ile	Ala	Ala	Gly	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Ala	Ala	Ser	Lys
				85					90					95	
Pro	Pro	Thr	Pro	Pro	Met	Pro	Ile	Ala	Gly	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro
		100						105					110		
Lys	Pro	Pro	Thr	Pro	Pro	Met	Pro	Ile	Ala	Gly	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro
	115						120					125			
Pro	Lys	Pro	Pro	Thr	Pro	Pro	Met	Pro	Ile	Ala	Gly	Pro	Ala	Pro	Thr
	130						135				140				
Pro	Thr	Glu	Ser	Gln	Leu	Ala	Pro	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Gln	Thr
145					150				155					160	
Pro	Thr	Gly	Ala	Pro	Gln	Gln	Pro	Glu	Ser	Pro	Ala	Pro	His	Val	Pro
			165					170					175		
Ser	His	Gly	Pro	His	Gln	Pro	Arg	Arg	Thr	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Trp
		180						185					190		
Ala	Lys	Met	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	Pro	Ser
		195					200					205			
Ala	Ser	Pro	Ala	Glu	Pro	Pro	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gln	His	Ser	Arg
	210						215					220			
Arg	Ala	Arg	Arg	Gly	His	Arg	Tyr	Arg	Thr	Asp	Thr	Glu	Arg	Asn	Val
225					230					235				240	
Gly	Lys	Val	Ala	Thr	Gly	Pro	Ser	Ile	Gln	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Glu
				245					250					255	
Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Gln	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Glu	Pro	Ser	Pro	Ala
			260					265					270		
Pro	Leu	Gly	Gln	Pro	Arg	Ser	Tyr	Leu	Ala	Pro	Pro	Thr	Arg	Pro	Ala
		275					280						285		
Pro	Thr	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Asn	Ser	Gly	Arg
	290					295					300				
Arg	Ala	Glu	Arg	Arg	Val	His	Pro	Asp	Leu	Ala	Ala	Gln	His	Ala	Ala
305					310					315				320	
Ala	Gln	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Arg
				325					330					335	
Lys	Arg	Ala	Ala	Pro	Asp	Leu	Asp	Ala	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Arg	Pro
		340						345					350		

Ala Ala Lys Gly Pro Lys Val Lys Lys Val Lys Pro Gln Lys Pro Lys	
355 360 365	
Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln Arg Gly Trp Arg His Trp	
370 375 380	
Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly Leu Ser Pro Asp Glu Lys	
385 390 395 400	
Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg Arg Asn Pro Arg Gly Ser	
405 410 415	
Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly Gly Ala Gly Lys Thr Thr	10
420 425 430	
Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala Gln Val Arg Ala Asp Arg	
435 440 445	
Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala Gly Asn Leu Ala Asp Arg	
450 455 460	
Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala Glu Lys	
465 470 475 480	
Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala His Thr Ser Val Asn Ala	
485 490 495	20
Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu Tyr Ser Ser Ala Gln Arg	
500 505 510	
Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ser Arg	
515 520 525	
Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly Ala Gly Phe Phe Asp Pro	
530 535 540	
Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser Gly Val Val Val Val Ala	
545 550 555 560	
Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala Ser Val Ala Leu Asp Trp	30
565 570 575	
Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Arg Ala Cys Val Val	
580 585 590	
Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn Val Ala Val Lys Asp Leu	
595 600 605	
Val Arg His Phe Glu Gln Gln Val Gln Pro Gly Arg Val Val Val Met	
610 615 620	
Pro Trp Asp Arg His Ile Ala Ala Gly Thr Glu Ile Ser Leu Asp Leu	
625 630 635 640	
Leu Asp Pro Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Glu Leu Ala Ala Ala Leu	40
645 650 655	
Ser Asp Asp Phe Glu Arg Ala Gly Arg Arg	
660 665	

(2) SEQ ID NO: 71の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1890塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー : Cording Sequence

(B) 存在位置 : 79...1851

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 71 :

GCAGCGATGA GGAGGAGCGG CGCCAACGGC CCGCGCCGGC GACGATGCAA AGCGCAGCGA	60	
TGAGGAGGAG CGGCGCGC ATG ACT GCT GAA CCG GAA GTA CGG ACG CTG CGC	111	
Met Thr Ala Glu Pro Glu Val Arg Thr Leu Arg		
1 5 10		
GAG GTT GTG CTG GAC CAG CTC GGC ACT GCT GAA TCG CGT GCG TAC AAG	159	
Glu Val Val Leu Asp Gln Leu Gly Thr Ala Glu Ser Arg Ala Tyr Lys		10
15 20 25		
ATG TGG CTG CCG CCG TTG ACC AAT CCG GTC CCG CTC AAC GAG CTC ATC	207	
Met Trp Leu Pro Pro Leu Thr Asn Pro Val Pro Leu Asn Glu Leu Ile		
30 35 40		
GCC CGT GAT CGG CGA CAA CCC CTG CGA TTT GCC CTG GGG ATC ATG GAT	255	
Ala Arg Asp Arg Arg Gln Pro Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ile Met Asp		
45 50 55		
GAA CCG CGC CGC CAT CTA CAG GAT GTG TGG GGC GTA GAC GTT TCC GGG	303	
Glu Pro Arg Arg His Leu Gln Asp Val Trp Gly Val Asp Val Ser Gly		20
60 65 70 75		
GCC GGC GGC AAC ATC GGT ATT GGG GGC GCA CCT CAA ACC GGG AAG TCG	351	
Ala Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Gly Ala Pro Gln Thr Gly Lys Ser		

80	85	90		
ACG CTA CTG CAG ACG ATG GTG ATG TCG GCC GCC GCC ACA CAC TCA CCG Thr Leu Leu Gln Thr Met Val Met Ser Ala Ala Ala Thr His Ser Pro 95 100 105			399	
CGC AAC GTT CAG TTC TAT TGC ATC GAC CTA GGT GGC GGC GGG CTG ATC Arg Asn Val Gln Phe Tyr Cys Ile Asp Leu Gly Gly Gly Gly Leu Ile 110 115 120			447	
TAT CTC GAA AAC CTT CCA CAC GTC GGT GGG GTA GCC AAT CGG TCC GAG Tyr Leu Glu Asn Leu Pro His Val Gly Gly Val Ala Asn Arg Ser Glu 125 130 135			495	10
CCC GAC AAG GTC AAC CGG GTG GTC GCA GAG ATG CAA GCC GTC ATG CGG Pro Asp Lys Val Asn Arg Val Val Ala Glu Met Gln Ala Val Met Arg 140 145 150 155			543	
CAA CGG GAA ACC ACC TTC AAG GAA CAC CGA GTG GGC TCG ATC GGG ATG Gln Arg Glu Thr Thr Phe Lys Glu His Arg Val Gly Ser Ile Gly Met 160 165 170			591	
TAC CGG CAG CTG CGT GAC GAT CCA AGT CAA CCC GTT GCG TCC GAT CCA Tyr Arg Gln Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Pro Val Ala Ser Asp Pro 175 180 185			639	
TAC GGC GAC GTC TTT CTG ATC ATC GAC GGA TGG CCC GGT TTT GTC GGC Tyr Gly Asp Val Phe Leu Ile Ile Asp Gly Trp Pro Gly Phe Val Gly 190 195 200			687	20
GAG TTC CCC GAC CTT GAG GGG CAG GTT CAA GAT CTG GCC GCC CAG GGG Glu Phe Pro Asp Leu Glu Gly Gln Val Gln Asp Leu Ala Ala Gln Gly 205 210 215			735	
CTG GGG TTC GGC GTC CAC GTC ATC ATC TCC ACG CCA CGC TGG ACA GAG Leu Gly Phe Gly Val His Val Ile Ile Ser Thr Pro Arg Trp Thr Glu 220 225 230 235			783	
CTG AAG TCG CGT GTT CGC GAC TAC CTC GGC ACC AAG ATC GAG TTC CGG Leu Lys Ser Arg Val Arg Asp Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Glu Phe Arg 240 245 250			831	30
CTT GGT GAC GTC AAT GAA ACC CAG ATC GAC CGG ATT ACC CGC GAG ATC Leu Gly Asp Val Asn Glu Thr Gln Ile Asp Arg Ile Thr Arg Glu Ile 255 260 265			879	
CCG GCG AAT CGT CCG GGT CGG GCA GTG TCG ATG GAA AAG CAC CAT CTG Pro Ala Asn Arg Pro Gly Arg Ala Val Ser Met Glu Lys His His Leu 270 275 280			927	
ATG ATC GGC GTG CCC AGG TTC GAC GGC GTG CAC AGC GCC GAT AAC CTG Met Ile Gly Val Pro Arg Phe Asp Gly Val His Ser Ala Asp Asn Leu 285 290 295			975	
GTG GAG GCG ATC ACC GCG GGG GTG ACG CAG ATC GCT TCC CAG CAC ACC Val Glu Ala Ile Thr Ala Gly Val Thr Gln Ile Ala Ser Gln His Thr 300 305 310 315			1023	40
GAA CAG GCA CCT CCG GTG CGG GTC CTG CCG GAG CGT ATC CAC CTG CAC Glu Gln Ala Pro Pro Val Arg Val Leu Pro Glu Arg Ile His Leu His 320 325 330			1071	
GAA CTC GAC CCG AAC CCG CCG GGA CCA GAG TCC GAC TAC CGC ACT CGC Glu Leu Asp Pro Asn Pro Pro Gly Pro Glu Ser Asp Tyr Arg Thr Arg 335 340 345			1119	

TGG GAG ATT CCG ATC GGC TTG CGC GAG ACG GAC CTG ACG CCG GCT CAC Trp Glu Ile Pro Ile Gly Leu Arg Glu Thr Asp Leu Thr Pro Ala His 350 355 360	1167	
TGC CAC ATG CAC ACG AAC CCG CAC CTA CTG ATC TTC GGT GCG GCC AAA Cys His Met His Thr Asn Pro His Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Lys 365 370 375	1215	
TCG GGC AAG ACG ACC ATT GCC CAC GCG ATC GCG CGC GCC ATT TGT GCC Ser Gly Lys Thr Thr Ile Ala His Ala Ile Ala Arg Ala Ile Cys Ala 380 385 390 395	1263	
CGA AAC AGT CCC CAG CAG GTG CGG TTC ATG CTC GCG GAC TAC CGC TCG Arg Asn Ser Pro Gln Gln Val Arg Phe Met Leu Ala Asp Tyr Arg Ser 400 405 410	1311	10
GGC CTG CTG GAC GCG GTG CCG GAC ACC CAT CTG CTG GGC GCC GGC GCG Gly Leu Leu Asp Ala Val Pro Asp Thr His Leu Leu Gly Ala Gly Ala 415 420 425	1359	
ATC AAC CGC AAC AGC GCG TCG CTA GAC GAG GCC GCT CAA GCA CTG GCG Ile Asn Arg Asn Ser Ala Ser Leu Asp Glu Ala Ala Gln Ala Leu Ala 430 435 440	1407	
GTC AAC CTG AAG AAG CGG TTG CCG CCG ACC GAC CTG ACG ACG GCG CAG Val Asn Leu Lys Lys Arg Leu Pro Pro Thr Asp Leu Thr Thr Ala Gln 445 450 455	1455	20
CTA CGC TCG CGT TCG TGG TGG AGC GGA TTT GAC GTC GTG CTT CTG GTC Leu Arg Ser Arg Ser Trp Trp Ser Gly Phe Asp Val Val Leu Leu Val 460 465 470 475	1503	
GAC GAT TGG CAC ATG ATC GTG GGT GCC GCC GGG GGG ATG CCG CCG ATG Asp Asp Trp His Met Ile Val Gly Ala Ala Gly Gly Met Pro Pro Met 480 485 490	1551	
GCA CCG CTG GCC CCG TTA TTG CCG GCG GCG GCA GAT ATC GGG TTG CAC Ala Pro Leu Ala Pro Leu Leu Pro Ala Ala Ala Asp Ile Gly Leu His 495 500 505	1599	
ATC ATT GTC ACC TGT CAG ATG AGC CAG GCT TAC AAG GCA ACC ATG GAC Ile Ile Val Thr Cys Gln Met Ser Gln Ala Tyr Lys Ala Thr Met Asp 510 515 520	1647	30
AAG TTC GTC GGC GCC GCA TTC GGG TCG GGC GCT CCG ACA ATG TTC CTT Lys Phe Val Gly Ala Ala Phe Gly Ser Gly Ala Pro Thr Met Phe Leu 525 530 535	1695	
TCG GGC GAG AAG CAG GAA TTC CCA TCC AGT GAG TTC AAG GTC AAG CGG Ser Gly Glu Lys Gln Glu Phe Pro Ser Ser Glu Phe Lys Val Lys Arg 540 545 550 555	1743	
CGC CCC CCT GGC CAG GCA TTT CTC GTC TCG CCA GAC GGC AAA GAG GTC Arg Pro Pro Gly Gln Ala Phe Leu Val Ser Pro Asp Gly Lys Glu Val 560 565 570	1791	40
ATC CAG GCC CCC TAC ATC GAG CCT CCA GAA GAA GTG TTC GCA GCA CCC Ile Gln Ala Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Glu Glu Val Phe Ala Ala Pro 575 580 585	1839	
CCA AGC GCC GGT TAAGATTATT TCATTGCCGG TGTAGCAGGA CCCGAGCTC Pro Ser Ala Gly 590	1890	

(2) SEQ ID NO: 72の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 591アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：タンパク質

(v) フラグメントの型：internal

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 72:

Met	Thr	Ala	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Leu	Asp	
1				5					10					15		
Gln	Leu	Gly	Thr	Ala	Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Lys	Met	Trp	Leu	Pro	Pro	
			20					25					30			10
Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Leu	Asn	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Asp	Arg	Arg	
		35					40					45				
Gln	Pro	Leu	Arg	Phe	Ala	Leu	Gly	Ile	Met	Asp	Glu	Pro	Arg	Arg	His	
		50				55					60					
Leu	Gln	Asp	Val	Trp	Gly	Val	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Asn	Ile	
65					70					75				80		
Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Pro	Gln	Thr	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu	Leu	Gln	Thr	
				85					90					95		20
Met	Val	Met	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	His	Ser	Pro	Arg	Asn	Val	Gln	Phe	
			100					105					110			
Tyr	Cys	Ile	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Ile	Tyr	Leu	Glu	Asn	Leu	
		115					120					125				
Pro	His	Val	Gly	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Ser	Glu	Pro	Asp	Lys	Val	Asn	
		130				135					140					

Arg Val Val Ala Glu Met Gln Ala Val Met Arg Gln Arg Glu Thr Thr	
145 150 155 160	
Phe Lys Glu His Arg Val Gly Ser Ile Gly Met Tyr Arg Gln Leu Arg	
165 170 175	
Asp Asp Pro Ser Gln Pro Val Ala Ser Asp Pro Tyr Gly Asp Val Phe	
180 185 190	
Leu Ile Ile Asp Gly Trp Pro Gly Phe Val Gly Glu Phe Pro Asp Leu	
195 200 205	
Glu Gly Gln Val Gln Asp Leu Ala Ala Gln Gly Leu Gly Phe Gly Val	10
210 215 220	
His Val Ile Ile Ser Thr Pro Arg Trp Thr Glu Leu Lys Ser Arg Val	
225 230 235 240	
Arg Asp Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Glu Phe Arg Leu Gly Asp Val Asn	
245 250 255	
Glu Thr Gln Ile Asp Arg Ile Thr Arg Glu Ile Pro Ala Asn Arg Pro	
260 265 270	
Gly Arg Ala Val Ser Met Glu Lys His His Leu Met Ile Gly Val Pro	20
275 280 285	
Arg Phe Asp Gly Val His Ser Ala Asp Asn Leu Val Glu Ala Ile Thr	
290 295 300	
Ala Gly Val Thr Gln Ile Ala Ser Gln His Thr Glu Gln Ala Pro Pro	
305 310 315 320	
Val Arg Val Leu Pro Glu Arg Ile His Leu His Glu Leu Asp Pro Asn	
325 330 335	
Pro Pro Gly Pro Glu Ser Asp Tyr Arg Thr Arg Trp Glu Ile Pro Ile	30
340 345 350	
Gly Leu Arg Glu Thr Asp Leu Thr Pro Ala His Cys His Met His Thr	
355 360 365	
Asn Pro His Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Lys Ser Gly Lys Thr Thr	
370 375 380	
Ile Ala His Ala Ile Ala Arg Ala Ile Cys Ala Arg Asn Ser Pro Gln	
385 390 395 400	
Gln Val Arg Phe Met Leu Ala Asp Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Asp Ala	40
405 410 415	
Val Pro Asp Thr His Leu Leu Gly Ala Gly Ala Ile Asn Arg Asn Ser	
420 425 430	
Ala Ser Leu Asp Glu Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val Asn Leu Lys Lys	
435 440 445	

Arg Leu Pro Pro Thr Asp Leu Thr Thr Ala Gln Leu Arg Ser Arg Ser
 450 455 460
 Trp Trp Ser Gly Phe Asp Val Val Leu Leu Val Asp Asp Trp His Met
 465 470 475 480
 Ile Val Gly Ala Ala Gly Gly Met Pro Pro Met Ala Pro Leu Ala Pro
 485 490 495
 Leu Leu Pro Ala Ala Ala Asp Ile Gly Leu His Ile Ile Val Thr Cys
 500 505 510
 Gln Met Ser Gln Ala Tyr Lys Ala Thr Met Asp Lys Phe Val Gly Ala
 515 520 525
 Ala Phe Gly Ser Gly Ala Pro Thr Met Phe Leu Ser Gly Glu Lys Gln
 530 535 540
 Glu Phe Pro Ser Ser Glu Phe Lys Val Lys Arg Arg Pro Pro Gly Gln
 545 550 555 560
 Ala Phe Leu Val Ser Pro Asp Gly Lys Glu Val Ile Gln Ala Pro Tyr
 565 570 575
 Ile Glu Pro Pro Glu Glu Val Phe Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gly
 580 585 590

10

20

(2) SEQ ID NO: 73の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 15アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: なし

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 73:

Asp Pro Val Asp Asp Ala Phe Ile Ala Lys Leu Asn Thr Ala Gly
 1 5 10 15

30

(2) SEQ ID NO: 74の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 14アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: なし

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: その他

(B) 存在位置: 14

(D) 他の情報: Xaaは不明

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 74:

Asp Pro Val Asp Ala Ile Ile Asn Leu Asp Asn Tyr Gly Xaa
 1 5 10

40

(2) SEQ ID NO: 75の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 15アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

50

- (C) 鎖：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 分子の型：なし
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 名称 / キー：その他
 (B) 存在位置：5
 (D) 他の情報：Xaaは不明
 (xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 75 :
 Ala Glu Met Lys Xaa Phe Lys Asn Ala Ile Val Gln Glu Ile Asp
 1 5 10 15 10
- (2) SEQ ID NO: 76の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：14アミノ酸
 (B) 配列の型：アミノ酸
 (C) 鎖：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 分子の型：なし
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 名称 / キー：その他
 (B) 存在位置：3...3 20
 (D) 他の情報：AlaはAlaまたはGln
 (A) 名称 / キー：その他
 (B) 存在位置：7...7
 (D) 他の情報：ThrはGlyまたはThr
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 名称 / キー：その他
 (B) 存在位置：11
 (D) 他の情報：Xaaは不明
 (xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 76 :
 Val Ile Ala Gly Met Val Thr His Ile His Xaa Val Ala Gly 30
 1 5 10
- (2) SEQ ID NO: 77の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：15アミノ酸
 (B) 配列の型：アミノ酸
 (C) 鎖：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 分子の型：ペプチド
 (v) フラグメントの型：N-terminal
 (xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 77 : 40
 Thr Asn Ile Val Val Leu Ile Lys Gln Val Pro Asp Thr Trp Ser
 1 5 10 15
- (2) SEQ ID NO: 78の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ：15アミノ酸
 (B) 配列の型：アミノ酸
 (C) 鎖：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 分子の型：ペプチド
 (v) フラグメントの型：N-terminal 50

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 78 :
 Ala Ile Glu Val Ser Val Leu Arg Val Phe Thr Asp Ser Asp Gly
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO : 79 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 15 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : ペプチド

10

(v) フラグメントの型 : N-terminal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 79 :
 Ala Lys Leu Ser Thr Asp Glu Leu Leu Asp Ala Phe Lys Glu Met
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO : 80 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 15 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(ii) 分子の型 : ペプチド

(v) フラグメントの型 : N-terminal

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : その他

(B) 存在位置 : 4...4

(D) 他の情報 : Asp は Asp または Glu

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 80 :
 Asp Pro Ala Asp Ala Pro Asp Val Pro Thr Ala Ala Gln Leu Thr
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO : 81 の情報 :

30

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 50 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : ペプチド

(v) フラグメントの型 : N-terminal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 81 :
 Ala Glu Asp Val Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Val Leu Glu Val Val
 1 5 10 15

40

Val Asn Glu Gly Asp Gln Ile Asp Lys Gly Asp Val Val Val Leu Leu
 20 25 30

Glu Ser Met Tyr Met Glu Ile Pro Val Leu Ala Glu Ala Ala Gly Thr
 35 40 45

Val Ser

50

(2) SEQ ID NO : 82 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 15 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

50

(C) 鎖：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 分子の型：ペプチド
 (v) フラグメントの型：N-terminal
 (xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 82 :
 Thr Thr Ser Pro Asp Pro Tyr Ala Ala Leu Pro Lys Leu Pro Ser
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 83の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

10

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：ペプチド

(v) フラグメントの型：N-terminal

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 83 :

Thr Glu Tyr Glu Gly Pro Lys Thr Lys Phe His Ala Leu Met Gln
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 84の情報：

(i) 配列の特徴：

20

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：ペプチド

(v) フラグメントの型：N-terminal

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 84 :

Thr Thr Ile Val Ala Leu Lys Tyr Pro Gly Gly Val Val Met Ala
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 85の情報：

30

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：ペプチド

(v) フラグメントの型：N-terminal

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：その他

(B) 存在位置：15

40

(D) 他の情報：Xaaは不明

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 85 :

Ser Phe Pro Tyr Phe Ile Ser Pro Glu Xaa Ala Met Arg Glu Xaa
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 86の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：15アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

50

(ii) 分子の型：ペプチド

(v) フラグメントの型：N-terminal

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 86:

Thr His Tyr Asp Val Val Val Leu Gly Ala Gly Pro Gly Gly Tyr
 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 87の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 450塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

10

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: その他

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 107...400

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 87:

AGCCCGGTAA TCGAGTTCGG GCAATGCTGA CCATCGGGTT TGTTTCCGGC TATAACCGAA 60

CGGTTTGTGT ACGGGATACA AATACAGGGA GGAAGAAGT AGGCAA ATG GAA AAA 115
 Met Glu Lys 20
 1

ATG TCA CAT GAT CCG ATC GCT GCC GAC ATT GGC ACG CAA GTG AGC GAC 163
 Met Ser His Asp Pro Ile Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gln Val Ser Asp
 5 10 15

AAC GCT CTG CAC GGC GTG ACG GCC GGC TCG ACG GCG CTG ACG TCG GTG 211
 Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser Thr Ala Leu Thr Ser Val
 20 25 30 35

ACC GGG CTG GTT CCC GCG GGG GCC GAT GAG GTC TCC GCC CAA GCG GCG 259
 Thr Gly Leu Val Pro Ala Gly Ala Asp Glu Val Ser Ala Gln Ala Ala 30
 40 45 50

ACG GCG TTC ACA TCG GAG GGC ATC CAA TTG CTG GCT TCC AAT GCA TCG 307
 Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ala Ser
 55 60 65

GCC CAA GAC CAG CTC CAC CGT GCG GGC GAA GCG GTC CAG GAC GTC GCC 355
 Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu Ala Val Gln Asp Val Ala
 70 75 80

CGC ACC TAT TCG CAA ATC GAC GAC GGC GCC GCC GGC GTC TTC GCC TAATA 405
 Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala Ala Gly Val Phe Ala 40
 85 90 95

GGCCCCAAC ACATCGGAGG GAGTGATCAC CATGCTGTGG CACGC 450

(2) SEQ ID NO: 88の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 98アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

50

(v) フラグメントの型 : internal

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 88 :

```

Met Glu Lys Met Ser His Asp Pro Ile Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gln
 1           5           10           15
Val Ser Asp Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser Thr Ala Leu
          20           25           30
Thr Ser Val Thr Gly Leu Val Pro Ala Gly Ala Asp Glu Val Ser Ala
          35           40           45
Gln Ala Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu Leu Ala Ser
          50           55           60
Asn Ala Ser Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu Ala Val Gln
          65           70           75           80
Asp Val Ala Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala Ala Gly Val
          85           90           95

```

10

Phe Ala

(2) SEQ ID NO : 89の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 460塩基対

20

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : Cording Sequence

(B) 存在位置 : 37...453

(D) 他の情報 :

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 89 :

GCAACCGGCT TTTCGATCAG CTGAGACATC AGCGGC GTG CGG GTC AAC GAC CCA	54	
Met Arg Val Asn Asp Pro		
1 5		
CCT GCG CCA GGT AGC GAC TCC GCG CGC AGC AGG CCC GCG CCC GCG CTG	102	
Pro Ala Pro Gly Ser Asp Ser Ala Arg Ser Arg Pro Ala Pro Ala Leu		
10 15 20		
GGG CCT GAT CCA CCA GCC AGC GGA TGG TTC GAC AGC GGA CTG GTG CCG	150	
Gly Pro Asp Pro Pro Ala Ser Gly Trp Phe Asp Ser Gly Leu Val Pro		
25 30 35		
AGC AGG CCC ATC TGC GCG GCT TCC TCG TCG GCT GGG TTG CCG CCG CCG	198	10
Ser Arg Pro Ile Cys Ala Ala Ser Ser Ser Ala Gly Leu Pro Pro Pro		
40 45 50		
GTG CCG CCC ACC TGG CTG AAC AAC GAC GTC ACC TGC TGC AGC GGC TGG	246	
Val Pro Pro Thr Trp Leu Asn Asn Asp Val Thr Cys Cys Ser Gly Trp		
55 60 65 70		
GTC AGC TGC TGC ATC GGG CCG CTC ATC TCA CCC AGT TGG CCG AGG GTC	294	
Val Ser Cys Cys Ile Gly Pro Leu Ile Ser Pro Ser Trp Pro Arg Val		
75 80 85		
TGG GTA GCC GCC GGC GGC AAC TGG CCA ACC GGT GTT GAG CTG CCA GGG	342	20
Trp Val Ala Ala Gly Gly Asn Trp Pro Thr Gly Val Glu Leu Pro Gly		
90 95 100		
GAG GGC ATT CCG AAG ATC GGG TTC GTC GTG CTC TGG CTC GCG CCG GGA	390	
Glu Gly Ile Pro Lys Ile Gly Phe Val Val Leu Trp Leu Ala Pro Gly		
105 110 115		
TCA AGG ATC GAC GCC ATC GGC TCG AGC TTC TCG AAA AGC GTG TTA ACC	438	
Ser Arg Ile Asp Ala Ile Gly Ser Ser Phe Ser Lys Ser Val Leu Thr		
120 125 130		
GCG GTC TCG GCC TGG TAGACCT	460	30
Ala Val Ser Ala Trp		
135		

(2) SEQ ID NO: 90の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 139アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 90:

40

Met Arg Val Asn Asp Pro Pro Ala Pro Gly Ser Asp Ser Ala Arg Ser
 1 5 10 15
 Arg Pro Ala Pro Ala Leu Gly Pro Asp Pro Pro Ala Ser Gly Trp Phe
 20 25 30
 Asp Ser Gly Leu Val Pro Ser Arg Pro Ile Cys Ala Ala Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ala Gly Leu Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Trp Leu Asn Asn Asp Val
 50 55 60
 Thr Cys Cys Ser Gly Trp Val Ser Cys Cys Ile Gly Pro Leu Ile Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Trp Pro Arg Val Trp Val Ala Ala Gly Gly Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Gly Val Glu Leu Pro Gly Glu Gly Ile Pro Lys Ile Gly Phe Val Val
 100 105 110
 Leu Trp Leu Ala Pro Gly Ser Arg Ile Asp Ala Ile Gly Ser Ser Phe
 115 120 125
 Ser Lys Ser Val Leu Thr Ala Val Ser Ala Trp
 130 135

10

20

(2) SEQ ID NO: 91の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1200塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 28...1140

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 91:

30

TAATAGGCCC CCAACACATC GGAGGGA GTG ATC ACC ATG CTG TGG CAC GCA ATG	54	
Met Ile Thr Met Leu Trp His Ala Met		
1 5		
CCA CCG GAG CTA AAT ACC GCA CGG CTG ATG GCC GGC GCG GGT CCG GCT	102	
Pro Pro Glu Leu Asn Thr Ala Arg Leu Met Ala Gly Ala Gly Pro Ala		
10 15 20 25		
CCA ATG CTT GCG GCG GCC GCG GGA TGG CAG ACG CTT TCG GCG GCT CTG	150	
Pro Met Leu Ala Ala Ala Ala Gly Trp Gln Thr Leu Ser Ala Ala Leu		10
30 35 40		
GAC GCT CAG GCC GTC GAG TTG ACC GCG CGC CTG AAC TCT CTG GGA GAA	198	
Asp Ala Gln Ala Val Glu Leu Thr Ala Arg Leu Asn Ser Leu Gly Glu		
45 50 55		
GCC TGG ACT GGA GGT GGC AGC GAC AAG GCG CTT GCG GCT GCA ACG CCG	246	
Ala Trp Thr Gly Gly Gly Ser Asp Lys Ala Leu Ala Ala Ala Thr Pro		
60 65 70		
ATG GTG GTC TGG CTA CAA ACC GCG TCA ACA CAG GCC AAG ACC CGT GCG	294	
Met Val Val Trp Leu Gln Thr Ala Ser Thr Gln Ala Lys Thr Arg Ala		20
75 80 85		
ATG CAG GCG ACG GCG CAA GCC GCG GCA TAC ACC CAG GCC ATG GCC ACG	342	
Met Gln Ala Thr Ala Gln Ala Ala Ala Tyr Thr Gln Ala Met Ala Thr		
90 95 100 105		

ACG CCG TCG CTG CCG GAG ATC GCC GCC AAC CAC ATC ACC CAG GCC GTC Thr Pro Ser Leu Pro Glu Ile Ala Ala Asn His Ile Thr Gln Ala Val 110 115 120	390	
CTT ACG GCC ACC AAC TTC TTC GGT ATC AAC ACG ATC CCG ATC GCG TTG Leu Thr Ala Thr Asn Phe Phe Gly Ile Asn Thr Ile Pro Ile Ala Leu 125 130 135	438	
ACC GAG ATG GAT TAT TTC ATC CGT ATG TGG AAC CAG GCA GCC CTG GCA Thr Glu Met Asp Tyr Phe Ile Arg Met Trp Asn Gln Ala Ala Leu Ala 140 145 150	486	
ATG GAG GTC TAC CAG GCC GAG ACC GCG GTT AAC ACG CTT TTC GAG AAG Met Glu Val Tyr Gln Ala Glu Thr Ala Val Asn Thr Leu Phe Glu Lys 155 160 165	534	10
CTC GAG CCG ATG GCG TCG ATC CTT GAT CCC GGC GCG AGC CAG AGC ACG Leu Glu Pro Met Ala Ser Ile Leu Asp Pro Gly Ala Ser Gln Ser Thr 170 175 180 185	582	
ACG AAC CCG ATC TTC GGA ATG CCC TCC CCT GGC AGC TCA ACA CCG GTT Thr Asn Pro Ile Phe Gly Met Pro Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Val 190 195 200	630	
GGC CAG TTG CCG CCG GCG GCT ACC CAG ACC CTC GGC CAA CTG GGT GAG Gly Gln Leu Pro Pro Ala Ala Thr Gln Thr Leu Gly Gln Leu Gly Glu 205 210 215	678	20
ATG AGC GGC CCG ATG CAG CAG CTG ACC CAG CCG CTG CAG CAG GTG ACG Met Ser Gly Pro Met Gln Gln Leu Thr Gln Pro Leu Gln Gln Val Thr 220 225 230	726	
TCG TTG TTC AGC CAG GTG GGC GGC ACC GGC GGC GGC AAC CCA GCC GAC Ser Leu Phe Ser Gln Val Gly Gly Thr Gly Gly Gly Asn Pro Ala Asp 235 240 245	774	
GAG GAA GCC GCG CAG ATG GGC CTG CTC GGC ACC AGT CCG CTG TCG AAC Glu Glu Ala Ala Gln Met Gly Leu Leu Gly Thr Ser Pro Leu Ser Asn 250 255 260 265	822	30
CAT CCG CTG GCT GGT GGA TCA GGC CCC AGC GCG GGC GCG GGC CTG CTG His Pro Leu Ala Gly Gly Ser Gly Pro Ser Ala Gly Ala Gly Leu Leu 270 275 280	870	
CGC GCG GAG TCG CTA CCT GGC GCA GGT GGG TCG TTG ACC CGC ACG CCG Arg Ala Glu Ser Leu Pro Gly Ala Gly Gly Ser Leu Thr Arg Thr Pro 285 290 295	918	

CTG ATG TCT CAG CTG ATC GAA AAG CCG GTT GCC CCC TCG GTG ATG CCG Leu Met Ser Gln Leu Ile Glu Lys Pro Val Ala Pro Ser Val Met Pro 300 305 310	966	
GCG GCT GCT GCC GGA TCG TCG GCG ACG GGT GGC GCC GCT CCG GTG GGT Ala Ala Ala Ala Gly Ser Ser Ala Thr Gly Gly Ala Ala Pro Val Gly 315 320 325	1014	
GCG GGA GCG ATG GGC CAG GGT GCG CAA TCC GGC GGC TCC ACC AGG CCG Ala Gly Ala Met Gly Gln Gly Ala Gln Ser Gly Gly Ser Thr Arg Pro 330 335 340 345	1062	
GGT CTG GTC GCG CCG GCA CCG CTC GCG CAG GAG CGT GAA GAA GAC GAC Gly Leu Val Ala Pro Ala Pro Leu Ala Gln Glu Arg Glu Glu Asp Asp 350 355 360	1110	10
GAG GAC GAC TGG GAC GAA GAG GAC GAC TGG TGAGCTCCCG TAATGACAAC AGA Glu Asp Asp Trp Asp Glu Glu Asp Asp Trp 365 370	1163	
CTTCCCGGCC ACCCGGGCCG GAAGACTTGC CAACATT	1200	

(2) SEQ ID NO: 92の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 371アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 92:

Met Ile Thr Met Leu Trp His Ala Met Pro Pro Glu Leu Asn Thr Ala
 1 5 10 15
 Arg Leu Met Ala Gly Ala Gly Pro Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
 Gly Trp Gln Thr Leu Ser Ala Ala Leu Asp Ala Gln Ala Val Glu Leu
 35 40 45
 Thr Ala Arg Leu Asn Ser Leu Gly Glu Ala Trp Thr Gly Gly Gly Ser
 50 55 60
 Asp Lys Ala Leu Ala Ala Ala Thr Pro Met Val Val Trp Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Ala Ser Thr Gln Ala Lys Thr Arg Ala Met Gln Ala Thr Ala Gln Ala
 85 90 95
 Ala Ala Tyr Thr Gln Ala Met Ala Thr Thr Pro Ser Leu Pro Glu Ile
 100 105 110
 Ala Ala Asn His Ile Thr Gln Ala Val Leu Thr Ala Thr Asn Phe Phe
 115 120 125
 Gly Ile Asn Thr Ile Pro Ile Ala Leu Thr Glu Met Asp Tyr Phe Ile
 130 135 140
 Arg Met Trp Asn Gln Ala Ala Leu Ala Met Glu Val Tyr Gln Ala Glu
 145 150 155 160
 Thr Ala Val Asn Thr Leu Phe Glu Lys Leu Glu Pro Met Ala Ser Ile
 165 170 175
 Leu Asp Pro Gly Ala Ser Gln Ser Thr Thr Asn Pro Ile Phe Gly Met
 180 185 190
 Pro Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Val Gly Gln Leu Pro Pro Ala Ala
 195 200 205
 Thr Gln Thr Leu Gly Gln Leu Gly Glu Met Ser Gly Pro Met Gln Gln
 210 215 220
 Leu Thr Gln Pro Leu Gln Gln Val Thr Ser Leu Phe Ser Gln Val Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Gly Gly Gly Asn Pro Ala Asp Glu Glu Ala Ala Gln Met Gly
 245 250 255
 Leu Leu Gly Thr Ser Pro Leu Ser Asn His Pro Leu Ala Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Pro Ser Ala Gly Ala Gly Leu Leu Arg Ala Glu Ser Leu Pro Gly
 275 280 285
 Ala Gly Gly Ser Leu Thr Arg Thr Pro Leu Met Ser Gln Leu Ile Glu
 290 295 300
 Lys Pro Val Ala Pro Ser Val Met Pro Ala Ala Ala Ala Gly Ser Ser
 305 310 315 320
 Ala Thr Gly Gly Ala Ala Pro Val Gly Ala Gly Ala Met Gly Gln Gly
 325 330 335
 Ala Gln Ser Gly Gly Ser Thr Arg Pro Gly Leu Val Ala Pro Ala Pro
 340 345 350
 Leu Ala Gln Glu Arg Glu Glu Asp Asp Glu Asp Asp Trp Asp Glu Glu
 355 360 365
 Asp Asp Trp
 370

10

20

30

40

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1000塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：Cording Sequence

(B) 存在位置：46...969

(D) 他の情報：

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：93：

GACGCGACAC AGAAATCCTT AAGGCCGGCG GCCAAGGGGC CGAAG GTG AAG AAG GTG	57	
Met Lys Lys Val		
1		
AAG CCC CAG AAA CCG AAG GCC ACG AAG CCG CCC AAA GTG GTG TCG CAG	105	
Lys Pro Gln Lys Pro Lys Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln		
5 10 15 20		
CGC GGC TGG CGA CAT TGG GTG CAT GCG TTG ACG CGA ATC AAC CTG GGC	153	
Arg Gly Trp Arg His Trp Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly		
25 30 35		
CTG TCA CCC GAC GAG AAG TAC GAG CTG GAC CTG CAC GCT CGA GTC CGC	201	
Leu Ser Pro Asp Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg		20
40 45 50		
CGC AAT CCC CGC GGG TCG TAT CAG ATC GCC GTC GTC GGT CTC AAA GGT	249	
Arg Asn Pro Arg Gly Ser Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly		
55 60 65		
GGG GCT GGC AAA ACC ACG CTG ACA GCA GCG TTG GGG TCG ACG TTG GCT	297	
Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala		
70 75 80		
CAG GTG CGG GCC GAC CGG ATC CTG GCT CTA GAC GCG GAT CCA GGC GCC	345	
Gln Val Arg Ala Asp Arg Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala		
85 90 95 100		
GGA AAC CTC GCC GAT CGG GTA GGG CGA CAA TCG GGC GCG ACC ATC GCT	393	30
Gly Asn Leu Ala Asp Arg Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala		
105 110 115		
GAT GTG CTT GCA GAA AAA GAG CTG TCG CAC TAC AAC GAC ATC CGC GCA	441	
Asp Val Leu Ala Glu Lys Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala		
120 125 130		
CAC ACT AGC GTC AAT GCG GTC AAT CTG GAA GTG CTG CCG GCA CCG GAA	489	
His Thr Ser Val Asn Ala Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu		
135 140 145		
TAC AGC TCG GCG CAG CGC GCG CTC AGC GAC GCC GAC TGG CAT TTC ATC	537	
Tyr Ser Ser Ala Gln Arg Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile		
150 155 160		40

GCC GAT CCT GCG TCG AGG TTT TAC AAC CTC GTC TTG GCT GAT TGT GGG 585
 Ala Asp Pro Ala Ser Arg Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly
 165 170 175 180
 GCC GGC TTC TTC GAC CCG CTG ACC CGC GGC GTG CTG TCC ACG GTG TCC 633
 Ala Gly Phe Phe Asp Pro Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser
 185 190 195
 GGT GTC GTG GTC GTG GCA AGT GTC TCA ATC GAC GGC GCA CAA CAG GCG 681
 Gly Val Val Val Val Ala Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala
 200 205 210
 TCG GTC GCG TTG GAC TGG TTG CGC AAC AAC GGT TAC CAA GAT TTG GCG 729
 Ser Val Ala Leu Asp Trp Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala
 215 220 225
 AGC CGC GCA TGC GTG GTC ATC AAT CAC ATC ATG CCG GGA GAA CCC AAT 777
 Ser Arg Ala Cys Val Val Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn
 230 235 240
 GTC GCA GTT AAA GAC CTG GTG CGG CAT TTC GAA CAG CAA GTT CAA CCC 825
 Val Ala Val Lys Asp Leu Val Arg His Phe Glu Gln Gln Val Gln Pro
 245 250 255 260
 GGC CGG GTC GTG GTC ATG CCG TGG GAC AGG CAC ATT GCG GCC GGA ACC 873
 Gly Arg Val Val Val Met Pro Trp Asp Arg His Ile Ala Ala Gly Thr
 265 270 275
 GAG ATT TCA CTC GAC TTG CTC GAC CCT ATC TAC AAG CGC AAG GTC CTC 921
 Glu Ile Ser Leu Asp Leu Leu Asp Pro Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu
 280 285 290
 GAA TTG GCC GCA GCG CTA TCC GAC GAT TTC GAG AGG GCT GGA CGT CGT T 970
 Glu Leu Ala Ala Ala Leu Ser Asp Asp Phe Glu Arg Ala Gly Arg Arg
 295 300 305

GAGCGCACCT GCTGTTGCTG CTGGTCCTAC

1000

(2) SEQ ID NO: 94の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 308アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(iii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 94:

10

20

30

Met Lys Lys Val Lys Pro Gln Lys Pro Lys Ala Thr Lys Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Val Val Ser Gln Arg Gly Trp Arg His Trp Val His Ala Leu Thr Arg
 20 25 30

Ile Asn Leu Gly Leu Ser Pro Asp Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Leu His
 35 40 45

Ala Arg Val Arg Arg Asn Pro Arg Gly Ser Tyr Gln Ile Ala Val Val
 50 55 60

Gly Leu Lys Gly Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Gly
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Ala Gln Val Arg Ala Asp Arg Ile Leu Ala Leu Asp Ala
 85 90 95

Asp Pro Gly Ala Gly Asn Leu Ala Asp Arg Val Gly Arg Gln Ser Gly
 100 105 110

Ala Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala Glu Lys Glu Leu Ser His Tyr Asn
 115 120 125

Asp Ile Arg Ala His Thr Ser Val Asn Ala Val Asn Leu Glu Val Leu
 130 135 140

Pro Ala Pro Glu Tyr Ser Ser Ala Gln Arg Ala Leu Ser Asp Ala Asp
 145 150 155 160

Trp His Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ser Arg Phe Tyr Asn Leu Val Leu
 165 170 175

Ala Asp Cys Gly Ala Gly Phe Phe Asp Pro Leu Thr Arg Gly Val Leu
 180 185 190

Ser Thr Val Ser Gly Val Val Val Val Ala Ser Val Ser Ile Asp Gly
 195 200 205

Ala Gln Gln Ala Ser Val Ala Leu Asp Trp Leu Arg Asn Asn Gly Tyr
 210 215 220

Gln Asp Leu Ala Ser Arg Ala Cys Val Val Ile Asn His Ile Met Pro
 225 230 235 240

Gly Glu Pro Asn Val Ala Val Lys Asp Leu Val Arg His Phe Glu Gln
 245 250 255

Gln Val Gln Pro Gly Arg Val Val Val Met Pro Trp Asp Arg His Ile
 260 265 270

Ala Ala Gly Thr Glu Ile Ser Leu Asp Leu Leu Asp Pro Ile Tyr Lys
 275 280 285

Arg Lys Val Leu Glu Leu Ala Ala Ala Leu Ser Asp Asp Phe Glu Arg
 290 295 300

Ala Gly Arg Arg
 305

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO: 95の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 34塩基対

50

(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：95： AAGAGTAGAT CTATGATGGC CGAGGATGTT CGCG	34	
(2) SEQ ID NO：96の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：27塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		10
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：96： CGGCGACGAC GGATCCTACC GCGTCGG	27	
(2) SEQ ID NO：97の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：28塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：97： CCTTGGGAGA TCTTTGGACC CCGGTTGC	28	20
(2) SEQ ID NO：98の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：25塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：98： GACGAGATCT TATGGGCTTA CTGAC	25	
(2) SEQ ID NO：99の情報：		30
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：33塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：99： CCCCCAGAT CTGCACCACC GGCATCGGCG GGC	33	
(2) SEQ ID NO：100の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：24塩基対		40
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：100： GCGGCGGATC CGTTGCTTAG CCGG	24	
(2) SEQ ID NO：101の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：32塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：101：

32

CCGGCTGAGA TCTATGACAG AATACGAAGG GC

(2) SEQ ID NO：102の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：24塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：102：

24

CCCCGCCAGG GAACTAGAGG CGGC

(2) SEQ ID NO：103の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：38塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：103：

20

CTGCCGAGAT CTACCACCAT TGTCGCGCTG AAATACCC

38

(2) SEQ ID NO：104の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：25塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：104：

CGCCATGGCC TTACGCGCCA ACTCG

25

(2) SEQ ID NO：105の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：32塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：105：

30

GGCGGAGATC TGTGAGTTTT CCGTATTTC A TC

32

(2) SEQ ID NO：106の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：25塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：106：

CGCGTCGAGC CATGGTTAGG CGCAG

25

(2) SEQ ID NO：107の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：32塩基対

(B) 配列の型：核酸

50

(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：107：		
GAGGAAGATC TATGACAACT TCACCCGACC CG	32	
(2) SEQ ID NO：108の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：28塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		10
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：108：		
CATGAAGCCA TGGCCCGCAG GCTGCATG	28	
(2) SEQ ID NO：109の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：33塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：109：		
GGCCGAGATC TGTGACCCAC TATGACGTGG TCG	33	20
(2) SEQ ID NO：110の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：36塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：110：		
GGCGCCCATG GTCAGAAATT GATCATGTGG CCAACC	36	
(2) SEQ ID NO：111の情報：		
(i) 配列の特徴：		30
(A) 配列の長さ：33塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：111：		
CCGGGAGATC TATGGCAAAG CTCTCCACCG ACG	33	
(2) SEQ ID NO：112の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：32塩基対		
(B) 配列の型：核酸		40
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：112：		
CGCTGGGCAG AGCTACTTGA CGGTGACGGT GG	32	
(2) SEQ ID NO：113の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：36塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジ：直鎖状		50

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 113 : GGCCCAGATC TATGGCCATT GAGGTTTCGG TGTTCG	36	
(2) SEQ ID NO : 114 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 26塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 114 : CGCCGTGTTG CATGGCAGCG CTGAGC	26	10
(2) SEQ ID NO : 115 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 24塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 115 : GGACGTTCAA GCGACACATC GCCG	24	
(2) SEQ ID NO : 116 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		20
(A) 配列の長さ : 24塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 116 : CAGCACGAAC GCGCCGTCGA TGGC	24	
(2) SEQ ID NO : 117 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 26塩基対		30
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 117 : ACAGATCTGT GACGGACATG AACCCG	26	
(2) SEQ ID NO : 118 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 28塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		40
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 118 : TTTTCCATGG TCACGGGCCC CCGGTACT	28	
(2) SEQ ID NO : 119 の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 26塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 119 :		50

ACAGATCTGT GCCCATGGCA CAGATA

26

(2) SEQ ID NO: 120の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 27塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 120:

TTTAAGCTTC TAGGCGCCCA GCGCGGC

27

(2) SEQ ID NO: 121の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 121:

ACAGATCTGC GCATGCGGAT CCGTGT

26

(2) SEQ ID NO: 122の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 28塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 122:

TTTTCCATGG TCATCCGGCG TGATCGAG

28

(2) SEQ ID NO: 123の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 123:

ACAGATCTGT AATGGCAGAC TGTGAT

26

(2) SEQ ID NO: 124の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 28塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 124:

TTTTCCATGG TCAGGAGATG GTGATCGA

28

(2) SEQ ID NO: 125の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 125:

ACAGATCTGC CGGCTACCCC GTTGCC

26

(2) SEQ ID NO: 126の情報:

10

20

30

40

50

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 28塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 126 :

TTTCCATGG CTATTGCAGC TTTCCGGC

28

(2) SEQ ID NO : 127の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 50アミノ酸

10

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : なし

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 127 :

Ala Glu Asp Val Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Val Leu Glu Val Val
1 5 10 15

Val Asn Glu Gly Asp Gln Ile Asp Lys Gly Asp Val Val Val Leu Leu
20 25 30

20

Glu Ser Met Tyr Met Glu Ile Pro Val Leu Ala Glu Ala Ala Gly Thr
35 40 45

Val Ser

50

(2) SEQ ID NO : 128の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 49アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : なし

30

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 128 :

Ala Glu Asp Val Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Val Leu Glu Val Val
1 5 10 15

Val Asn Glu Gly Asp Gln Ile Asp Lys Gly Asp Val Val Val Leu Leu
20 25 30

Glu Ser Met Met Glu Ile Pro Val Leu Ala Glu Ala Ala Gly Thr Val
35 40 45

Ser

(2) SEQ ID NO : 129の情報 :

40

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 50アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : なし

(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 129 :

Ala Glu Asp Val Arg Ala Glu Ile Val Ala Ser Val Leu Glu Val Val
 1 5 10 15
 Val Asn Glu Gly Asp Gln Ile Asp Lys Gly Asp Val Val Val Leu Leu
 20 25 30
 Glu Ser Met Lys Met Glu Ile Pro Val Leu Ala Glu Ala Ala Gly Thr
 35 40 45

Val Ser
 50

(2) SEQ ID NO: 130の情報:

10

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 33塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 130:

CCGGGAGATC TATGGCAAAG CTCTCCACCG ACG

33

(2) SEQ ID NO: 131の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 32塩基対

20

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 131:

CGCTGGGCAG AGCTACTTGA CGGTGACGGT GG

32

(2) SEQ ID NO: 132の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 36塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

30

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 132:

GGCGCCGGCA AGCTTGCCAT GACAGAGCAG CAGTGG

36

(2) SEQ ID NO: 133の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 133:

CGAACTCGCC GGATCCCGTG TTTCGC

26

(2) SEQ ID NO: 134の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 32塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 134:

GGCAACCGCG AGATCTTTCT CCCGGCCGGG GC

32

(2) SEQ ID NO: 135の情報:

50

(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 27塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 135 :		
GGCAAGCTTG CCGGCGCCTA ACGAACT	27	
(2) SEQ ID NO : 136の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 30塩基対		10
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 136 :		
GGACCCAGAT CTATGACAGA GCAGCAGTGG	30	
(2) SEQ ID NO : 137の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 47塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		20
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 137 :		
CCGGCAGCCC CGGCCGGGAG AAAAGCTTTG CGAACATCCC AGTGACG	47	
(2) SEQ ID NO : 138の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 44塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 138 :		30
GTTCGCAAAG CTTTTCTCCC GGCCGGGGCT GCCGGTCGAG TACC	44	
(2) SEQ ID NO : 139の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 20塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 139 :		
CCTTCGGTGG ATCCCGTCAG	20	
(2) SEQ ID NO : 140の情報 :		40
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 450塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(ix) 配列の特徴 :		
(A) 名称 / キー : Cording Sequence		
(B) 存在位置 : 68...346		
(D) 他の情報 :		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 140 :		50

TGGCGCTGTC ACCGAGGAAC CTGTCAATGT CGTCGAGCAG TACTGAACCG TTCCGAGAAA	60	
GGCCAGC ATG AAC GTC ACC GTA TCC ATT CCG ACC ATC CTG CGG CCC CAC	109	
Met Asn Val Thr Val Ser Ile Pro Thr Ile Leu Arg Pro His		
1 5 10		
ACC GGC GGC CAG AAG AGT GTC TCG GCC AGC GGC GAT ACC TTG GGT GCC	157	
Thr Gly Gly Gln Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Asp Thr Leu Gly Ala		
15 20 25 30		
GTC ATC AGC GAC CTG GAG GCC AAC TAT TCG GGC ATT TCC GAG CGC CTG	205	
Val Ile Ser Asp Leu Glu Ala Asn Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Arg Leu		10
35 40 45		
ATG GAC CCG TCT TCC CCA GGT AAG TTG CAC CGC TTC GTG AAC ATC TAC	253	
Met Asp Pro Ser Ser Pro Gly Lys Leu His Arg Phe Val Asn Ile Tyr		
50 55 60		
GTC AAC GAC GAG GAC GTG CGG TTC TCC GGC GGC TTG GCC ACC GCG ATC	301	
Val Asn Asp Glu Asp Val Arg Phe Ser Gly Gly Leu Ala Thr Ala Ile		
65 70 75		
GCT GAC GGT GAC TCG GTC ACC ATC CTC CCC GCC GTG GCC GGT GGG TGAGC	351	
Ala Asp Gly Asp Ser Val Thr Ile Leu Pro Ala Val Ala Gly Gly		20
80 85 90		
GGAGCACATG ACACGATACG ACTCGCTGTT GCAGGCCTTG GGCAACACGC CGCTGGTTGG	411	
CCTGCAGCGA TTGTCGCCAC GCTGGGATGA CGGGCGAGA	450	

(2) SEQ ID NO: 141の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 93アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

30

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 141:

Met Asn Val Thr Val Ser Ile Pro Thr Ile Leu Arg Pro His Thr Gly		
1 5 10 15		
Gly Gln Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Asp Thr Leu Gly Ala Val Ile		
20 25 30		
Ser Asp Leu Glu Ala Asn Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Arg Leu Met Asp		
35 40 45		
Pro Ser Ser Pro Gly Lys Leu His Arg Phe Val Asn Ile Tyr Val Asn		
50 55 60		
Asp Glu Asp Val Arg Phe Ser Gly Gly Leu Ala Thr Ala Ile Ala Asp		
65 70 75 80		
Gly Asp Ser Val Thr Ile Leu Pro Ala Val Ala Gly Gly		
85 90		

(2) SEQ ID NO: 142の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 480塩基対

50

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：Cording Sequence

(B) 存在位置：88...381

(D) 他の情報：

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：142：

GGTGTCCCG CGGCCGGCTA TGACAACAGT CAATGTGCAT GACAAGTTAC AGGTATTAGG	60	
TCCAGGTTCA ACAAGGAGAC AGGCAAC ATG GCA ACA CGT TTT ATG ACG GAT CCG	114	10
Met Ala Thr Arg Phe Met Thr Asp Pro		
1 5		
CAC GCG ATG CGG GAC ATG GCG GGC CGT TTT GAG GTG CAC GCC CAG ACG	162	
His Ala Met Arg Asp Met Ala Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr		
10 15 20 25		
GTG GAG GAC GAG GCT CGC CGG ATG TGG GCG TCC GCG CAA AAC ATC TCG	210	
Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser		
30 35 40		
GGC GCG GGC TGG AGT GGC ATG GCC GAG GCG ACC TCG CTA GAC ACC ATG	258	20
Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met		
45 50 55		
GCC CAG ATG AAT CAG GCG TTT CGC AAC ATC GTG AAC ATG CTG CAC GGG	306	
Ala Gln Met Asn Gln Ala Phe Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly		
60 65 70		
GTG CGT GAC GGG CTG GTT CGC GAC GCC AAC AAC TAC GAG CAG CAA GAG	354	
Val Arg Asp Gly Leu Val Arg Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu		
75 80 85		
CAG GCC TCC CAG CAG ATC CTC AGC AGC TAACGTCAGC CGCTGCAGCA CAATACT	408	30
Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu Ser Ser		
90 95		
TTTACAAGCG AAGGAGAACA GGTTTCGATGA CCATCAACTA TCAGTTCGGT GATGTCGACG	468	
CTCATGGCGC CA	480	

(2) SEQ ID NO：143の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：98アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：タンパク質

(v) フラグメントの型：internal

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：143：

40

Met Ala Thr Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
 1 5 10 15
 Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
 20 25 30
 Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
 35 40 45
 Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Ala Gln Met Asn Gln Ala Phe
 50 55 60
 Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
 65 70 75 80
 Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
 85 90 95

10

Ser Ser

(2) SEQ ID NO: 144の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 940塩基対

(B) 配列の型: 核酸

20

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 86...868

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 144:

```

GCCCCAGTCC TCGATCGCCT CATCGCCTTC ACCGGCCGCC AGCCGACCGC AGGCCACGTG      60
TCCGCCACCT AACGAAAGGA TGATC ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA      112
               Met Pro Lys Arg Ser Glu Tyr Arg Gln
               1               5
GGC ACG CCG AAC TGG GTC GAC CTT CAG ACC ACC GAT CAG TCC GCC GCC      160
Gly Thr Pro Asn Trp Val Asp Leu Gln Thr Thr Asp Gln Ser Ala Ala
   10               15               20               25
AAA AAG TTC TAC ACA TCG TTG TTC GGC TGG GGT TAC GAC GAC AAC CCG      208
Lys Lys Phe Tyr Thr Ser Leu Phe Gly Trp Gly Tyr Asp Asp Asn Pro
               30               35               40
GTC CCC GGA GGC GGT GGG GTC TAT TCC ATG GCC ACG CTG AAC GGC GAA      256
Val Pro Gly Gly Gly Val Tyr Ser Met Ala Thr Leu Asn Gly Glu
               45               50               55
GCC GTG GCC GCC ATC GCA CCG ATG CCC CCG GGT GCA CCG GAG GGG ATG      304
Ala Val Ala Ala Ile Ala Pro Met Pro Pro Gly Ala Pro Glu Gly Met
               60               65               70
CCG CCG ATC TGG AAC ACC TAT ATC GCG GTG GAC GAC GTC GAT GCG GTG      352
Pro Pro Ile Trp Asn Thr Tyr Ile Ala Val Asp Asp Val Asp Ala Val
               75               80               85
GTG GAC AAG GTG GTG CCC GGG GGC GGG CAG GTG ATG ATG CCG GCC TTC      400
Val Asp Lys Val Val Pro Gly Gly Gly Gln Val Met Met Pro Ala Phe
   90               95               100               105
GAC ATC GGC GAT GCC GGC CGG ATG TCG TTC ATC ACC GAT CCG ACC GGC      448
Asp Ile Gly Asp Ala Gly Arg Met Ser Phe Ile Thr Asp Pro Thr Gly
               110               115               120
GCT GCC GTG GGC CTA TGG CAG GCC AAT CGG CAC ATC GGA GCG ACG TTG      496
Ala Ala Val Gly Leu Trp Gln Ala Asn Arg His Ile Gly Ala Thr Leu
               125               130               135
GTC AAC GAG ACG GGC ACG CTC ATC TGG AAC GAA CTG CTC ACG GAC AAG      544
Val Asn Glu Thr Gly Thr Leu Ile Trp Asn Glu Leu Leu Thr Asp Lys
               140               145               150
CCG GAT TTG GCG CTA GCG TTC TAC GAG GCT GTG GTT GGC CTC ACC CAC      592
Pro Asp Leu Ala Leu Ala Phe Tyr Glu Ala Val Val Gly Leu Thr His
               155               160               165
TCG AGC ATG GAG ATA GCT GCG GGC CAG AAC TAT CGG GTG CTC AAG GCC      640
Ser Ser Met Glu Ile Ala Ala Gly Gln Asn Tyr Arg Val Leu Lys Ala
   170               175               180               185
GGC GAC GCG GAA GTC GGC GGC TGT ATG GAA CCG CCG ATG CCC GGC GTG      688
Gly Asp Ala Glu Val Gly Gly Cys Met Glu Pro Pro Met Pro Gly Val
               190               195               200
CCG AAT CAT TGG CAC GTC TAC TTT GCG GTG GAT GAC GCC GAC GCC ACG      736
Pro Asn His Trp His Val Tyr Phe Ala Val Asp Asp Ala Asp Ala Thr
               205               210               215
GCG GCC AAA GCC GCC GCA GCG GGC GGC CAG GTC ATT GCG GAA CCG GCT      784
Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Val Ile Ala Glu Pro Ala
               220               225               230
GAC ATT CCG TCG GTG GGC CGG TTC GCC GTG TTG TCC GAT CCG CAG GGC      832
Asp Ile Pro Ser Val Gly Arg Phe Ala Val Leu Ser Asp Pro Gln Gly
               235               240               245
GCG ATC TTC AGT GTG TTG AAG CCC GCA CCG CAG CAA TAGGGAGCAT CCCGGG      884
Ala Ile Phe Ser Val Leu Lys Pro Ala Pro Gln Gln
   250               255               260
CAGGCCCGCC GGCCGGCAGA TTCGGAGAAT GCTAGAAGCT GCCGCCGGCG CCGCCG      940

```

(2) SEQ ID NO: 145の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 261アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 145:

10

20

30

40

Met Pro Lys Arg Ser Glu Tyr Arg Gln Gly Thr Pro Asn Trp Val Asp
 1 5 10 15
 Leu Gln Thr Thr Asp Gln Ser Ala Ala Lys Lys Phe Tyr Thr Ser Leu
 20 25 30
 Phe Gly Trp Gly Tyr Asp Asp Asn Pro Val Pro Gly Gly Gly Val
 35 40 45
 Tyr Ser Met Ala Thr Leu Asn Gly Glu Ala Val Ala Ala Ile Ala Pro
 50 55 60
 Met Pro Pro Gly Ala Pro Glu Gly Met Pro Pro Ile Trp Asn Thr Tyr
 65 70 75 80
 Ile Ala Val Asp Asp Val Asp Ala Val Val Asp Lys Val Val Pro Gly
 85 90 95
 Gly Gly Gln Val Met Met Pro Ala Phe Asp Ile Gly Asp Ala Gly Arg
 100 105 110
 Met Ser Phe Ile Thr Asp Pro Thr Gly Ala Ala Val Gly Leu Trp Gln
 115 120 125
 Ala Asn Arg His Ile Gly Ala Thr Leu Val Asn Glu Thr Gly Thr Leu
 130 135 140
 Ile Trp Asn Glu Leu Leu Thr Asp Lys Pro Asp Leu Ala Leu Ala Phe
 145 150 155 160
 Tyr Glu Ala Val Val Gly Leu Thr His Ser Ser Met Glu Ile Ala Ala
 165 170 175
 Gly Gln Asn Tyr Arg Val Leu Lys Ala Gly Asp Ala Glu Val Gly Gly
 180 185 190
 Cys Met Glu Pro Pro Met Pro Gly Val Pro Asn His Trp His Val Tyr
 195 200 205
 Phe Ala Val Asp Asp Ala Asp Ala Thr Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
 210 215 220
 Gly Gly Gln Val Ile Ala Glu Pro Ala Asp Ile Pro Ser Val Gly Arg
 225 230 235 240
 Phe Ala Val Leu Ser Asp Pro Gln Gly Ala Ile Phe Ser Val Leu Lys
 245 250 255

10

20

30

Pro Ala Pro Gln Gln
260

(2) SEQ ID NO: 146の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 280塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 47...247

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 146:

40


```

      CCGAAAGGCG GTGCACCGCA CCCAGAAGAA AAGGAAAGAT CGAGAA ATG CCA CAG      55
                                   Met Pro Gln
                                   1
GGA ACT GTG AAG TGG TTC AAC GCG GAG AAG GGG TTC GGC TTT ATC GCC      103
Gly Thr Val Lys Trp Phe Asn Ala Glu Lys Gly Phe Gly Phe Ile Ala
      5              10              15

CCC GAA GAC GGT TCC GCG GAT GTA TTT GTC CAC TAC ACG GAG ATC CAG      151
Pro Glu Asp Gly Ser Ala Asp Val Phe Val His Tyr Thr Glu Ile Gln
      20              25              30              35

GGA ACG GGC TTC CGC ACC CTT GAA GAA AAC CAG AAG GTC GAG TTC GAG      199
Gly Thr Gly Phe Arg Thr Leu Glu Glu Asn Gln Lys Val Glu Phe Glu
              40              45              50
ATC GGC CAC AGC CCT AAG GGC CCC CAG GCC ACC GGA GTC CGC TCG CTC T      248
Ile Gly His Ser Pro Lys Gly Pro Gln Ala Thr Gly Val Arg Ser Leu
              55              60              65
GAGTTACCCC CGCGAGCAGA CGCAAAAAGC CC
                                         280

```

(2) SEQ ID NO: 147の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 67アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 147:

```

Met Pro Gln Gly Thr Val Lys Trp Phe Asn Ala Glu Lys Gly Phe Gly
  1              5              10              15

Phe Ile Ala Pro Glu Asp Gly Ser Ala Asp Val Phe Val His Tyr Thr
      20              25              30

Glu Ile Gln Gly Thr Gly Phe Arg Thr Leu Glu Glu Asn Gln Lys Val
      35              40              45

Glu Phe Glu Ile Gly His Ser Pro Lys Gly Pro Gln Ala Thr Gly Val
      50              55              60

Arg Ser Leu
      65

```

(2) SEQ ID NO: 148の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 540塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 105...491

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 148:

10

20

30

40

ATCGTGTCTGT ATCGAGAACC CCGGCCGGTA TCAGAACGCG CCAGAGCGCA AACCTTTATA	60	
ACTTCGTGTC CCAAATGTGA CGACCATGGA CCAAGGTTCC TGAG ATG AAC CTA CGG	116	
		Met Asn Leu Arg
		1
CGC CAT CAG ACC CTG ACG CTG CGA CTG CTG GCG GCA TCC GCG GGC ATT	164	
Arg His Gln Thr Leu Thr Leu Arg Leu Leu Ala Ala Ser Ala Gly Ile		
5 10 15 20		
CTC AGC GCC GCG GCC TTC GCC GCG CCA GCA CAG GCA AAC CCC GTC GAC	212	
Leu Ser Ala Ala Ala Phe Ala Ala Pro Ala Gln Ala Asn Pro Val Asp		
25 30 35		10
GAC GCG TTC ATC GCC GCG CTG AAC AAT GCC GGC GTC AAC TAC GGC GAT	260	
Asp Ala Phe Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Gly Val Asn Tyr Gly Asp		
40 45 50		
CCG GTC GAC GCC AAA GCG CTG GGT CAG TCC GTC TGC CCG ATC CTG GCC	308	
Pro Val Asp Ala Lys Ala Leu Gly Gln Ser Val Cys Pro Ile Leu Ala		
55 60 65		
GAG CCC GGC GGG TCG TTT AAC ACC GCG GTA GCC AGC GTT GTG GCG CGC	356	
Glu Pro Gly Gly Ser Phe Asn Thr Ala Val Ala Ser Val Val Ala Arg		
70 75 80		
GCC CAA GGC ATG TCC CAG GAC ATG GCG CAA ACC TTC ACC AGT ATC GCG	404	
Ala Gln Gly Met Ser Gln Asp Met Ala Gln Thr Phe Thr Ser Ile Ala		20
85 90 95 100		
ATT TCG ATG TAC TGC CCC TCG GTG ATG GCA GAC GTC GCC AGC GGC AAC	452	
Ile Ser Met Tyr Cys Pro Ser Val Met Ala Asp Val Ala Ser Gly Asn		
105 110 115		
CTG CCG GCC CTG CCA GAC ATG CCG GGG CTG CCC GGG TCC TAGGCGTGCG CG	503	
Leu Pro Ala Leu Pro Asp Met Pro Gly Leu Pro Gly Ser		
120 125		
GCTCCTAGCC GGTCCCTAAC GGATCGATCG TGGATGC	540	30

(2) SEQ ID NO: 149の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 129アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: タンパク質

(v) フラグメントの型: internal

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 149:

Met Asn Leu Arg Arg His Gln Thr Leu Thr Leu Arg Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Gly Ile Leu Ser Ala Ala Ala Phe Ala Ala Pro Ala Gln Ala
 20 25 30
 Asn Pro Val Asp Asp Ala Phe Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Gly Val
 35 40 45
 Asn Tyr Gly Asp Pro Val Asp Ala Lys Ala Leu Gly Gln Ser Val Cys
 50 55 60
 Pro Ile Leu Ala Glu Pro Gly Gly Ser Phe Asn Thr Ala Val Ala Ser
 65 70 75 80
 Val Val Ala Arg Ala Gln Gly Met Ser Gln Asp Met Ala Gln Thr Phe
 85 90 95
 Thr Ser Ile Ala Ile Ser Met Tyr Cys Pro Ser Val Met Ala Asp Val
 100 105 110
 Ala Ser Gly Asn Leu Pro Ala Leu Pro Asp Met Pro Gly Leu Pro Gly
 115 120 125
 Ser

10

20

(2) SEQ ID NO: 150の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 400塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Cording Sequence

(B) 存在位置: 25...354

(D) 他の情報:

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: mat_peptide

(B) 存在位置: 109...357

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 150:

30

ATAGTTTGGG GAAGGTGTCC ATAA ATG AGG CTG TCG TTG ACC GCA TTG AGC	51	
Met Arg Leu Ser Leu Thr Ala Leu Ser		
-28 -25 -20		
GCC GGT GTA GGC GCC GTG GCA ATG TCG TTG ACC GTC GGG GCC GGG GTC	99	
Ala Gly Val Gly Ala Val Ala Met Ser Leu Thr Val Gly Ala Gly Val		
-15 -10 -5		
GCC TCC GCA GAT CCC GTG GAC GCG GTC ATT AAC ACC ACC TGC AAT TAC	147	
Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr		
1 5 10		
GGG CAG GTA GTA GCT GCG CTC AAC GCG ACG GAT CCG GGG GCT GCC GCA	195	10
Gly Gln Val Val Ala Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala		
15 20 25		
CAG TTC AAC GCC TCA CCG GTG GCG CAG TCC TAT TTG CGC AAT TTC CTC	243	
Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu		
30 35 40 45		
GCC GCA CCG CCA CCT CAG CGC GCT GCC ATG GCC GCG CAA TTG CAA GCT	291	
Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala		
50 55 60		
GTG CCG GGG GCG GCA CAG TAC ATC GGC CTT GTC GAG TCG GTT GCC GGC	339	20
Val Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly		
65 70 75		
TCC TGC AAC AAC TAT TAAGCCCATG CGGGCCCAT CCCGCGACCC GGCATCGTCG	394	
Ser Cys Asn Asn Tyr		
80		
CCGGGG	400	
(2) SEQ ID NO : 151の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 110アミノ酸		30
(B) 配列の型 : アミノ酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(ii) 分子の型 : タンパク質		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 151 :		

Met Arg Leu Ser Leu Thr Ala Leu Ser Ala Gly Val Gly Ala Val Ala
 -28 -25 -20 -15
 Met Ser Leu Thr Val Gly Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp
 -10 -5 1
 Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Val Ala Ala Leu
 5 10 15 20
 Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val
 25 30 35
 Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg
 40 45 50
 Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly Ala Ala Gln Tyr
 55 60 65
 Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn Asn Tyr
 70 75 80

(2) SEQ ID NO: 152の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 990塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: cDNA

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称 / キー: Coding Sequence

(B) 存在位置: 93...890

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 152:

10

20

AATAGTAATA TCGCTGTGCG GTTGCAAAAC GTGTGACCGA GGTTCGCGAG TCGAGCGCTG	60	
CGGGCCGCCT TCGAGGAGGA CGAACCACAG TC ATG ACG AAC ATC GTG GTC CTG	113	
Met Thr Asn Ile Val Val Leu		
1 5		
ATC AAG CAG GTC CCA GAT ACC TGG TCG GAG CGC AAG CTG ACC GAC GGC	161	
Ile Lys Gln Val Pro Asp Thr Trp Ser Glu Arg Lys Leu Thr Asp Gly		
10 15 20		
GAT TTC ACG CTG GAC CGC GAG GCC GCC GAC GCG GTG CTG GAC GAG ATC	209	
Asp Phe Thr Leu Asp Arg Glu Ala Ala Asp Ala Val Leu Asp Glu Ile		
25 30 35		
AAC GAG CGC GCC GTG GAG GAA GCG CTA CAG ATT CGG GAG AAA GAG GCC	257	10
Asn Glu Arg Ala Val Glu Glu Ala Leu Gln Ile Arg Glu Lys Glu Ala		
40 45 50 55		
GCC GAC GGC ATC GAA GGG TCG GTA ACC GTG CTG ACG GCG GGC CCC GAG	305	
Ala Asp Gly Ile Glu Gly Ser Val Thr Val Leu Thr Ala Gly Pro Glu		
60 65 70		
CGC GCC ACC GAG GCG ATC CGC AAG GCG CTG TCG ATG GGT GCC GAC AAG	353	
Arg Ala Thr Glu Ala Ile Arg Lys Ala Leu Ser Met Gly Ala Asp Lys		
75 80 85		
GCC GTC CAC CTA AAG GAC GAC GGC ATG CAC GGC TCG GAC GTC ATC CAA	401	20
Ala Val His Leu Lys Asp Asp Gly Met His Gly Ser Asp Val Ile Gln		
90 95 100		
ACC GGG TGG GCT TTG GCG CGC GCG TTG GGC ACC ATC GAG GGC ACC GAG	449	
Thr Gly Trp Ala Leu Ala Arg Ala Leu Gly Thr Ile Glu Gly Thr Glu		
105 110 115		
CTG GTG ATC GCA GGC AAC GAA TCG ACC GAC GGG GTG GGC GGT GCG GTG	497	
Leu Val Ile Ala Gly Asn Glu Ser Thr Asp Gly Val Gly Gly Ala Val		
120 125 130 135		

CCG GCC ATC ATC GCC GAG TAC CTG GGC CTG CCG CAG CTC ACC CAC CTG	545	
Pro Ala Ile Ile Ala Glu Tyr Leu Gly Leu Pro Gln Leu Thr His Leu		
140 145 150		
CGC AAA GTG TCG ATC GAG GGC GGC AAG ATC ACC GGC GAG CGT GAG ACC	593	
Arg Lys Val Ser Ile Glu Gly Gly Lys Ile Thr Gly Glu Arg Glu Thr		
155 160 165		
GAT GAG GGC GTA TTC ACC CTC GAG GCC ACG CTG CCC GCG GTG ATC AGC	641	
Asp Glu Gly Val Phe Thr Leu Glu Ala Thr Leu Pro Ala Val Ile Ser		
170 175 180		
GTG AAC GAG AAG ATC AAC GAG CCG CGC TTC CCG TCC TTC AAA GGC ATC	689	10
Val Asn Glu Lys Ile Asn Glu Pro Arg Phe Pro Ser Phe Lys Gly Ile		
185 190 195		
ATG GCC GCC AAG AAG AAG GAA GTT ACC GTG CTG ACC CTG GCC GAG ATC	737	
Met Ala Ala Lys Lys Lys Glu Val Thr Val Leu Thr Leu Ala Glu Ile		
200 205 210 215		
GGT GTC GAG AGC GAC GAG GTG GGG CTG GCC AAC GCC GGA TCC ACC GTG	785	
Gly Val Glu Ser Asp Glu Val Gly Leu Ala Asn Ala Gly Ser Thr Val		
220 225 230		
CTG GCG TCG ACG CCC AAA CCG GCC AAG ACT GCC GGG GAG AAG GTC ACC	833	20
Leu Ala Ser Thr Pro Lys Pro Ala Lys Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr		
235 240 245		
GAC GAG GGT GAA GGC GGC AAC CAG ATC GTG CAG TAC CTG GTT GCC CAG	881	
Asp Glu Gly Glu Gly Gly Asn Gln Ile Val Gln Tyr Leu Val Ala Gln		
250 255 260		
AAA ATC ATC TAAGACATAC GCACCTCCCA AAGACGAGAG CGATATAACC CATGGCTGA	939	
Lys Ile Ile		
265		
AGTACTGGTG CTCGTTGAGC ACGCTGAAGG CGCGTTAAAG AAGGTCAGCG C	990	
(2) SEQ ID NO: 153の情報:		
(i) 配列の特徴:		
(A) 配列の長さ: 266アミノ酸		30
(B) 配列の型: アミノ酸		
(C) 鎖: 一本鎖		
(D) トポロジー: 直鎖状		
(ii) 分子の型: タンパク質		
(v) フラグメントの型: internal		
(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 153:		

Met Thr Asn Ile Val Val Leu Ile Lys Gln Val Pro Asp Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Lys Leu Thr Asp Gly Asp Phe Thr Leu Asp Arg Glu Ala Ala
 20 25 30

Asp Ala Val Leu Asp Glu Ile Asn Glu Arg Ala Val Glu Glu Ala Leu
 35 40 45

Gln Ile Arg Glu Lys Glu Ala Ala Asp Gly Ile Glu Gly Ser Val Thr
 50 55 60

Val Leu Thr Ala Gly Pro Glu Arg Ala Thr Glu Ala Ile Arg Lys Ala
 65 70 75 80

Leu Ser Met Gly Ala Asp Lys Ala Val His Leu Lys Asp Asp Gly Met
 85 90 95

His Gly Ser Asp Val Ile Gln Thr Gly Trp Ala Leu Ala Arg Ala Leu
 100 105 110

Gly Thr Ile Glu Gly Thr Glu Leu Val Ile Ala Gly Asn Glu Ser Thr
 115 120 125

Asp Gly Val Gly Gly Ala Val Pro Ala Ile Ile Ala Glu Tyr Leu Gly
 130 135 140

Leu Pro Gln Leu Thr His Leu Arg Lys Val Ser Ile Glu Gly Gly Lys
 145 150 155 160

Ile Thr Gly Glu Arg Glu Thr Asp Glu Gly Val Phe Thr Leu Glu Ala
 165 170 175

Thr Leu Pro Ala Val Ile Ser Val Asn Glu Lys Ile Asn Glu Pro Arg
 180 185 190

Phe Pro Ser Phe Lys Gly Ile Met Ala Ala Lys Lys Lys Glu Val Thr
 195 200 205

Val Leu Thr Leu Ala Glu Ile Gly Val Glu Ser Asp Glu Val Gly Leu
 210 215 220

Ala Asn Ala Gly Ser Thr Val Leu Ala Ser Thr Pro Lys Pro Ala Lys
 225 230 235 240

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Asp Glu Gly Glu Gly Gly Asn Gln Ile
 245 250 255

Val Gln Tyr Leu Val Ala Gln Lys Ile Ile
 260 265

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO: 154の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 25塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 154:

CTGAGATCTA TGAACCTACG GCGCC

25

(2) SEQ ID NO: 155の情報:

50

(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 35塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 155 : CTCCCATGGT ACCCTAGGAC CCGGGCAGCC CCGGC	35	
(2) SEQ ID NO : 156の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 29塩基対		10
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 156 : CTGAGATCTA TGAGGCTGTC GTTGACCGC	29	
(2) SEQ ID NO : 157の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 30塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		20
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 157 : CTCCCCGGGC TTAATAGTTG TTGCAGGAGC	30	
(2) SEQ ID NO : 158の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 33塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 158 : GCTTAGATCT ATGATTTTCT GGGCAACCAG GTA	33	30
(2) SEQ ID NO : 159の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 30塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 159 : GCTTCCATGG GCGAGGCACA GGCGTGGGAA	30	
(2) SEQ ID NO : 160の情報 :		40
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 30塩基対		
(B) 配列の型 : 核酸		
(C) 鎖 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		
(xi) 配列の記載 : SEQ ID NO : 160 : CTGAGATCTA GAATGCCACA GGGAACTGTG	30	
(2) SEQ ID NO : 161の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 配列の長さ : 30塩基対		50

(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：161： TCTCCCGGGG GTAAC TCAGA GCGAGCGGAC	30	
(2) SEQ ID NO：162の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：27塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		10
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：162： CTGAGATCTA TGAACGTCAC CGTATCC	27	
(2) SEQ ID NO：163の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：27塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：163： TCTCCCGGGG CTCACCCACC GGCCACG	27	20
(2) SEQ ID NO：164の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：30塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：164： CTGAGATCTA TGGCAACACG TTTTATGACG	30	
(2) SEQ ID NO：165の情報：		30
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：30塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：165： CTCCCGGGT TAGCTGCTGA GGATCTGCTH	30	
(2) SEQ ID NO：166の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：31塩基対		40
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：二本鎖		
(D) トポロジー：環状		
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：166： CTGAAGATCT ATGCCCAAGA GAAGCGAATA C	31	
(2) SEQ ID NO：167の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 配列の長さ：31塩基対		
(B) 配列の型：核酸		
(C) 鎖：一本鎖		50

(D) トポロジー：直鎖状	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 167:	
CGGCAGCTGC TAGCATTCTC CGAATCTGCC G	31
(2) SEQ ID NO: 168の情報:	
(i) 配列の特徴:	
(A) 配列の長さ: 15アミノ酸	
(B) 配列の型: アミノ酸	
(C) 鎖: 一本鎖	
(D) トポロジー: 直鎖状	
(ii) 分子の型: なし	10
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 168:	
Pro Gln Gly Thr Val Lys Trp Phe Asn Ala Glu Lys Gly Phe Gly	
1 5 10 15	
(2) SEQ ID NO: 169の情報:	
(i) 配列の特徴:	
(A) 配列の長さ: 15アミノ酸	
(B) 配列の型: アミノ酸	
(C) 鎖: 一本鎖	
(D) トポロジー: 直鎖状	
(ii) 分子の型: なし	20
(ix) 配列の特徴:	
(A) 名称/キー: その他	
(B) 存在位置: 15	
(D) 他の情報: Xaaは不明	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 169:	
Asn Val Thr Val Ser Ile Pro Thr Ile Leu Arg Pro Xaa Xaa Xaa	
1 5 10 15	
(2) SEQ ID NO: 170の情報:	
(i) 配列の特徴:	
(A) 配列の長さ: 15アミノ酸	30
(B) 配列の型: アミノ酸	
(C) 鎖: 一本鎖	
(D) トポロジー: 直鎖状	
(ii) 分子の型: なし	
(ix) 配列の特徴:	
(A) 名称/キー: その他	
(B) 存在位置: 1	
(D) 他の情報: ThrはAlaでもよい	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 170:	
Thr Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala Gly	40
1 5 10 15	
(2) SEQ ID NO: 171の情報:	
(i) 配列の特徴:	
(A) 配列の長さ: 15アミノ酸	
(B) 配列の型: アミノ酸	
(C) 鎖: 一本鎖	
(D) トポロジー: 直鎖状	
(ii) 分子の型: なし	
(xi) 配列の記載：SEQ ID NO: 171:	

Pro Lys Arg Ser Glu Tyr Arg Gln Gly Thr Pro Asn Trp Val Asp
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 172の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 404アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 172:

Met Ala Thr Val Asn Arg Ser Arg His His His His His His His
 1 5 10 15
 Ile Glu Gly Arg Ser Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu
 20 25 30
 Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln
 35 40 45
 Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg
 50 55 60
 Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu
 65 70 75 80
 Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln
 85 90 95
 Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly
 100 105 110
 Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln
 115 120 125
 Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile
 130 135 140
 Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His
 145 150 155 160
 Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro
 165 170 175
 Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala
 180 185 190
 Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala
 195 200 205
 Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn
 210 215 220
 Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser
 245 250 255
 Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn
 260 265 270
 Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp
 275 280 285
 Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly
 290 295 300
 Ala Gly Lys Leu Ala Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile
 305 310 315 320
 Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser
 325 330 335
 Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp
 355 360 365
 Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr
 370 375 380
 Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr
 385 390 395 400
 Gly Met Phe Ala

10

20

30

40

(2) SEQ ID NO: 173の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 403アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 173:

50

Met Ala Thr Val Asn Arg Ser Arg His His His His His His His
 1 5 10 15
 Ile Glu Gly Arg Ser Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile
 20 25 30
 Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp
 50 55 60
 Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp
 65 70 75 80
 Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr
 85 90 95
 Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr
 100 105 110
 Gly Met Phe Ala Lys Leu Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe
 130 135 140
 Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu
 145 150 155 160
 Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe
 165 170 175
 Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly
 180 185 190
 Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala
 195 200 205
 Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro
 210 215 220
 Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr
 245 250 255
 His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp
 260 265 270
 Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp
 275 280 285
 Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro
 290 295 300
 Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala
 305 310 315 320
 Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu
 325 330 335
 Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg
 340 345 350
 Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His
 355 360 365
 Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr
 370 375 380
 Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu
 385 390 395 400
 Gly Ala Gly

10

20

30

40

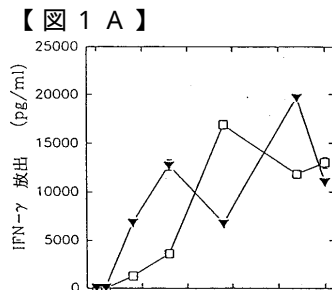


Fig. 1A

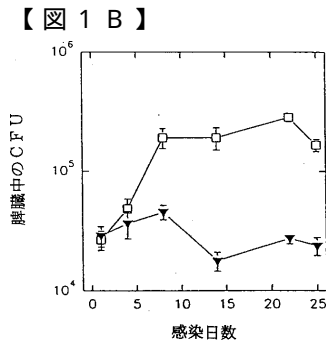


Fig. 1B

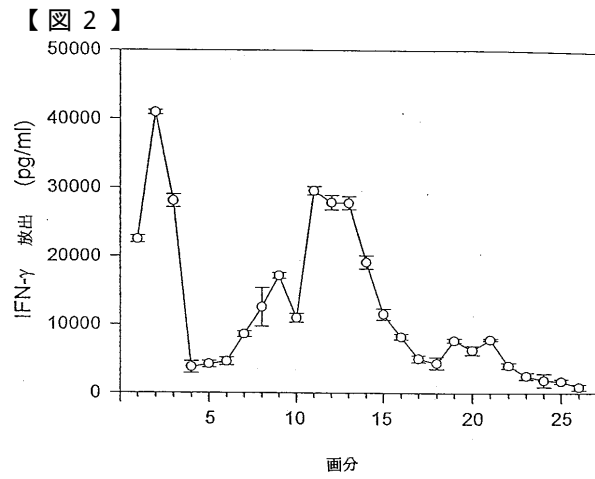


Fig. 2

【図 3】

1	GGCGCGCGT	ACCTAATGG	CGCGCATGC	TGCGNCGCG	TGACCATATA	CCGGTTCTG	60
61	ATCGAACCT	GCTGACCGAG	AGGACTTGTG	ATG	TG	GAA	120
121	ATG	TTC	GAT	CAC	GAT	ATC	180
181	ATG	TTC	GAT	CAC	GAT	ATC	240
241	ATG	TTC	GAT	CAC	GAT	ATC	300
301	ATG	TTC	GAT	CAC	GAT	ATC	360
361	ATG	TTC	GAT	CAC	GAT	ATC	381

Fig. 3

【図 4】

1	GGGTAGCCCG	ACCGCGCTG	GGCAAGATG	TGCGAGCGC	CATCAGCGC	GTCAAGCGC	60
61	GGCGCGCGT	CATTAACCG	GACGCGCAT	TGTTGCGCG	CCCGCGCTG	CTGAGCGCG	120
121	ACGAGTACAA	CTCCGCGCTG	GTG	GCC	GAC	CCG	170
171	TTC	CCC	GAC	GCC	GCG	GTC	230
231	GAG	GCG	TGG	GCC	AAA	GAT	290
291	GAC	GTT	TCC	GAC	ATC	CGG	350
351	CGC	ACC	GAT	CGC	GAC	ATC	410
411	CTC	GCC	GAT	GAT	GCC	GAC	467

Fig. 4

【図 5】

```

1  GAA17CGCCGGGTGCACACAGCCTTACACGACGGAGGTGGACACATGAAG  50
   M K
51  GGTGGGTGCGGCGTCTGCTGCGGGCGCTCTGGATTGCCGCACTGTCATTGGG  100
   G R S A L L R A L W I A A L S F G
101 GTTGGGCGGTGTCGCGGTAGCCGCGGAACCCACGCCAAGGCCGCCCAT  150
   L G G V A V A A E P T A K A A P
151 ACGAGAACTGATGGTGGCGTGGCGCTCGATGGGCGGGACATCCCGGTG  200
   Y E N L M V P S P S M G R D I P V
201 GCCTTCCTAGCCGGTGGGCGGCACGCGGTGTATCTGCTGGACGCCCTCAA  250
   A F L A G G P H A V Y L L D A F N
251 CGCGGGCCCGGATGTAGTAAGTGGTCACCGCGGTAACGCGATGAACA  300
   A G P D V S N W V T A G N A M N
301 CGTGGCGGGCAAGGGGATTTCGGTGGTGGCACCGCGCGTGGTGGCTAC  350
   T L A G K G I S V V A P A G G A Y
351 AGCATGTACACCAACTGGGAGCAGGATGGCAGCAAGCAGTGGGACACCTT  400
   S M Y T N W E Q D G S K Q W D T F
401 CTGTCCGCTGAGCTGCCCGACTGGCTGGCGCTAACCGGGCTTGGCCC  450
   L S A E L P D W L A A N R G L A
451 CCGGTGGCCATGCGGCGGTGGCGCGCTCAGGCGGTTACGGGGCGATG  500
   P G G H A A V G A A Q G G Y G A M
501 GCGCTGGCGGCTTCCACCCCGACCGCTTCGGCTTCGCTGGCTCGATGTC  550
   A L A A F H P D R F G F A G S M S
551 GGGCTTTTGTACCCGTCGAACACCAACCAACCGGTGCGATCGCGCGG  600
   G F L Y P S N T T T N G A I A A
601 GCATGCAGCAATTCCGCGGTGTGGACCAACGGAATGTGGGGAGCACCA  650
   G M Q Q F G G V D T N G M W G A P
651 CAGCTGGGTGGTGAAGTGGCAGCACCGGTGGGTGATGCCAGCCTGCT  700
   Q L G R W K W H D P W V H A S L L
701 GCGCAAAACACACCGGTGTGGGTGTGGAGCCCGACCAACCCGGGAG  750
   A Q N N T R V W V W S P T N P G
751 CCAGCGATCCCGCGCATGATCGGCCAAACCGCGAGGCGATGGGTAAC  800
   A S D P A A M I G Q T A E A M G N
801 AGCCGCGATGTTCTACAACCAAGTATCGCAGCGTCGGCGGGCACAAACG  850
   S R M F Y N Q Y R S V G G H N G H
851 CTTGACTTCCAGCCAGCGGTGACAACGGCTGGGCTCGTGGGCGCCCC  900
   F D F P A S G D N G W G S W A P
901 AGCTGGGCGCTATGTGGGCGATATCGTCGGTGGATCCGCTAACCGAAT  950
   Q L G A M S G D I V G A I R
951 TC

```

【図 6】

ST-CFの2-DE参照マップ

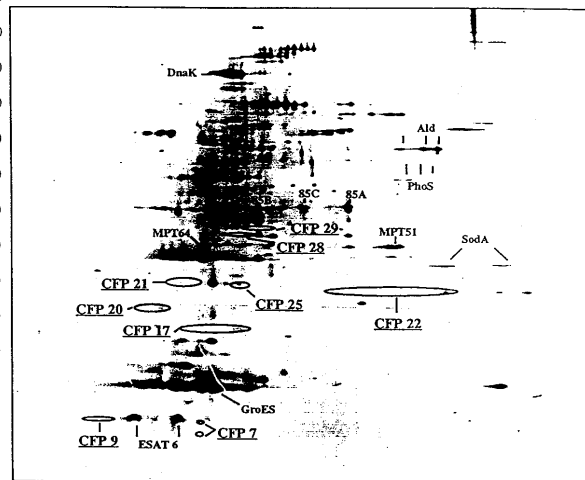


Fig. 5

Fig. 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/35	(2006.01)	C 0 7 K 14/35	
C 0 7 K 16/12	(2006.01)	C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1/32	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
		C 1 2 R 1:32	

(31)優先権主張番号 1277/97

(32)優先日 平成9年11月10日(1997.11.10)

(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(31)優先権主張番号 60/070,488

(32)優先日 平成10年1月5日(1998.1.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 アンデルセン, ペーター

デンマーク国、ブロンショイ ディーケイ 2 7 0 0、リストルブヴェイ 7

(72)発明者 スクジヨト, リッケ

デンマーク国、フレデリクスベルグ シー ディーケイ 1 8 7 1、サル 5 .、ツアヴァルセン
スヴェイ 9

(72)発明者 ローゼン克蘭ツ, イーダ

デンマーク国、コペンハーゲン オー ディーケイ 2 1 0 0、ティーエイチ 1 .、ラグンヒル
ドガード 7 0

(72)発明者 ヴェルディング, カーリン

デンマーク国、コペンハーゲン エヌ ディーケイ 2 4 0 0、ティーバイ 3 .、ノレプロガー
ド 2 2 4

(72)発明者 ラースムセン, ペータ, ピアク

デンマーク国、コペンハーゲン オー ディーケイ 2 1 0 0、ルドルフ ベルグスガード 5

(72)発明者 エティンガ, トマス

デンマーク国、ヘレラップ ディーケイ 2 9 0 0、エゲブジェルグ アレ 1 2

(72)発明者 フロリオ, ヴァルタ

デンマーク国、フレデリクスベルグ シー ディーケイ 1 9 6 4、インゲマンスヴェイ 2 1

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第 9 7 / 0 0 9 4 2 9 (WO, A 1)

Infect. Immun., (1995), 63, [5], p.1710-1717

Infect. Immun., (1994), 62, [6], p.2536-2544

Infect. Immun., (1993), 61, [3], p.844-851

Scand. J. Immunol., (1994), 40, [3], p.345-349

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed