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

特許第4053085号
(P4053085)

(45)発行日　平成20年2月27日(2008.2.27)　(24)登録日　平成19年12月14日(2007.12.14)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 ZNAA
C07K 14/35 (2006.01)　　C07K 14/35

請求項の数 6　(全 34 頁)

(21)出願番号　特願平6-502594
(86)(22)出願日　平成5年6月28日(1993.6.28)
(65)公表番号　特表平7-508649
(43)公表日　平成7年9月28日(1995.9.28)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/006080
(87)国際公開番号　WO1994/000493
(87)国際公開日　平成6年1月6日(1994.1.6)
審査請求日　平成12年6月28日(2000.6.28)
審判番号　不服2003-24270(P2003-24270/J1)
審判請求日　平成15年12月15日(2003.12.15)
(31)優先権主張番号　906,395
(32)優先日　平成4年6月29日(1992.6.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　503459383
カプール　アルチャナ
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２１２２　サン　ディエゴ　リージェンツ　ロード　８３２８　アパートメント　３ビー
(73)特許権者　503459394
ムンシ　アニル
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２１２２　サン　ディエゴ　リージェンツ　ロード　８３２８　アパートメント　３ビー
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイコバクテリアの膜－関連免疫原

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
マイコバクテリア核酸配列を有する組換え核酸であって、前記核酸が配列番号Ｎｏ：２で示される配列を有するポリペプチドをコードする、組換え核酸。
【請求項２】
マイコバクテリア核酸配列を有する組換え核酸であって、前記核酸配列が配列番号Ｎｏ：１で表される、組換え核酸。
【請求項３】
配列番号Ｎｏ：１で表される核酸によりコードされる、単離されたマイコバクテリアポリペプチド。
【請求項４】
配列番号Ｎｏ：２で表される配列を有する、請求項３に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項５】
請求項１または２に記載の核酸を含む複製可能なベクター。
【請求項６】
請求項５に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
発明の技術分野
本発明は、マイコバクテリアの膜－関連ポリペプチドに関し、特にかかるポリペプチドおよびこれらをコードする核酸の、ワクチンおよび診断試薬としての利用に関するものであ

る。

発明の背景

マイコバクテリアは、抗酸性、グラム－陽性バクテリアの多様な集合であり、その幾つかは重大なヒトおよび動物の疾患を引き起こす。ヒトにおける、２つの最も一般的なマイコバクテリアに起因する疾患は結核症（TB）および癩病であり、これらは、それぞれM.チューバークローシス（M.tuberculosis）およびM.レプラエ（M.leprae）による感染に起因する。

結核症は包括的な流行性疾患の主な諸特徴の全てを示す。通常、結核症は世界中で三千五百万人を越える人々が苦しめられ、毎年四百万人を越える死者を出している。インドにおいては、任意の与えられた時点において、ほぼ八百万人もの人々がこの疾病に罹患し、五十万人が死亡していることが報告されている。これらの数値は、この国における該疾病に罹患した人々の全てを包括していない可能性がある。かくして、結核症はインドばかりか世界中の他の多くの国々において重大な問題であると考えられる。

結核症は、M.チューバークローシス、M.ボビス（M.bovis）、M.アフリカヌム（M.africanum）およびM.ミクロッティ（M.microti）、即ちマイコバクテリアセアエ科の抗－酸性、グラム－陽性結核菌によって引き起こされる。M.チューバークローシスの幾つかの地域の病原性菌株も、マドラスおよびインドの他の都市における患者から単離されており、これらは幾つかの点で、ビルレント菌株であるM.チューバークローシスH37Rvとは異なっている。

近年、AIDSに感染した幾つかの個体群が、TBの著しく高い罹患率をも示すことが見出された。集合的にMAIS群として知られている、M.アビウム（M.avium）、M.イントラセルラレ（M.intracellulare）およびM.スクロフラシウム（M.scrofulaceum）からなる一群のマイコバクテリアが、AIDSに感染した多数の人々における散在性の疾患の原因となることが、今や明らかとなっている（キーン（Kiehn）等,J.Clin.Microbiol.,1985,21,pp.168-173;ワン（Wong）等,Amer.J.Med.,1985,78,pp.35-40）。

1882年に、コッホ（Koch）がM.チューバークローシスを結核症の原因媒介物として同定して以来、多くの科学的研究および公共衛生努力が、この疾病の診断、治療および鎮制に向けられてきた。しかしながら、M.チューバークローシスの諸特性が、診断法の改良並びにより効果的なワクチンを開発するための研究を妨害している。更に、この微生物の生化学的な組成が、細胞成分の同定並びに精製を困難にしており、また多くのこれら物質は一旦精製されると、診断試薬としての感度および特異性に欠けてしまう。結果として、マイコバクテリアによる疾患に対する診断並びに免疫予防手段は、過去半世紀におけるものと殆ど変わっていない。M.チューバークローシスの従来の診断法は、面倒であり、しかも結果の出るのも遅い。

M.ボビスのアビルレント菌株である、バチルスカルメット－ゲラン（Bacillus Calmette-Guerin）（BCG）（カルメット（Calmette）,A.,Masson et Cie,Paris,1936）が、結核症に対するワクチンとして広範に利用されている。多くの研究により、その結核症に対する予防的有効性が見出されている（ルエルモ（Luelmo）,F.,Am.Rev.Respir.Dis.,1982,125,pp.70-72）が、幾つかの試み（WHO,Tech.Rep.Ser.,1980,651,pp.1-15）においては、完全には明らかにされていない理由のために、BCGは結核症に対して予防効果を示さなかった（ファイン（Fine）,P.,Tubercle,1984,65,pp.137-153;ファイン等, Lancet,（ii）,1986,pp.499-502）。

ワクチン接種による撲滅、初期診断、および効果的な治療は、マイコバクテリウム症撲滅運動の重大な目的の一つである。これら病原体、その構成、その自然発達、その生理、生化学的および免疫学的反応性に関する生物学の現時点の知識における欠陥は、該病原体の弱化を解明する試みの必要性を際立たせ、結果としてこの疾病を撲滅するためのより効果的な方法を工夫することが可能となる。これら諸疾患の診断並びに予防のためのより効果的な手段を開発するためには、マイコバクテリア病原体による感染に対する免疫応答を理解することが重要である。細胞性免疫応答を引き出す上で重要な該マイコバクテリア成分は、未だ十分には定義されていない。マイコバクテリアの死菌による感染または接種に対

する抗体およびT-細胞の応答が、ヒト並びに動物において研究されている。TBまたは癩病に罹患したヒトの患者は、マイコバクテリア抗原に対する血清抗体を生成する。抗体は抗－マイコバクテリア免疫応答においてある機能をもつが、その正確な機能は依然として明確にされてはいない。というのは、これらの抗体には、何等の予防的役割も与えられていないからである。マイコバクテリアによる疾患に対する予防は細胞－媒介免疫を含む。マイコバクテリアは如何なる直接的な有害物質をも生成せず、結果としてその病原性は、該感染した宿主との相互作用に関与する多数のファクタによる。細胞内寄生は、恐らく宿主細胞の栄養ファクタに依存し、その供給不足は静菌作用性であり、かつマイコバクテリアの潜伏機構においてある役割を演ずる可能性があるものと理解される。

マイコバクテリア感染における防禦免疫性は、マクロファージを活性化して非－特異的結核菌活性とする特異的Ｔ細胞によって媒介されることが、一般的に理解されている。γ-IFNがH_2O_2－媒介バクテリアのマクロファージによる殺菌を誘発する証拠があるが、関連するあるいは他のマクロファージ活性化ファクタ（MAF）分子も関与している可能性がある。活発なＴ細胞増殖サイトにおける不十分な殺菌機能による、これらの原因は未だに説明されていない。遅延－型過敏症（DTH）および防禦免疫性は、別々のサブセットまたは特異性のT-細胞がマイコバクテリア感染に対する後天的耐性の原因であり得るという見方に導く。また、防禦の妨害は付随する細胞反応、即ちサプレッサーT-細胞およびマクロファージによって、あるいはT-細胞のB-細胞に対するヘルパー機能への転位によって生ずる可能性がある。

抗原転位（antigenic shift）により、宿主の耐性を回避できるウイルスおよび幾つかの寄生病原体とは違って、マイコバクテリアは弾性細胞壁構造をもち、かつその免疫調節細胞壁成分の作用によって宿主の免疫応答を抑制できる。他の微生物病原体に対する防禦免疫化の成功は、主として免疫性の定量的パラメータに依存するが、マイコバクテリアの免疫調節刺激が、宿主免疫系の調節機能障害を引き起こすものと思われる。これは、単に複雑な組成をもつ、例えば全マイコバクテリアを含むワクチン（例えば、BCG）を使用することによる、より強力な免疫化によって克服し得るものではないと考えられる。多分、マイコバクテリアは、該宿主の免疫性を高める強力な「アジュバント」構造を発達させるのではなく、寧ろ宿主の防禦を、該病原体に有利なように作用する効果的でない細胞反応に逆転させるように発展させた。弱毒化病原体、例えばBCGによるワクチン接種は免疫応答を更に増幅するが、該宿主の防禦性を制限されたものとし、規定された抗原による免疫化の潜在的な余地は依然として増大している。

個々の抗原タンパクの精製および特徴付けは、分子レベルでの該DTH反応の基本的なメカニズムを理解する上で必須である。マイコバクテリアによる疾患の発病における並びに診断的目的のための規定された構造をもつタンパク質の可能な機能的役割が、極めて興味深いものとして残されている。多くの研究者グループが、標準的な生化学的並びに免疫学的技術によって、マイコバクテリア抗原を明らかにしようと試みており、かつマイコバクテリアにおける共通の並びに種特異的な抗原が報告されている（ミンデン（Minden）等，Infect.Immun.,1984,46,pp.519-525;クロス（Closs）等，Scand.J.Immunol.,1980,12,pp.249-263;チャパラス（Chaparas）等，Am.Rev.Respir.Dis.,1980,122,p.533;ダニエル（Daniel）等，Microbiol.Rev.,1978,42,pp.84-113;スタンフォード（Stanford）等，Tubercle,1974,55,pp.143-152;クワバラ（Kuwabara）,S.,J.Biol.Chem.,1975,250,pp.2556-2562）。

マイコバクテリアゲノムに関連する情報は殆ど入手できない。先ず、該ゲノムのサイズ、G+C含有率および種々のマイコバクテリアゲノム間のDNA相同性の程度を評価するために、基本的な研究が実施された（グロスキンスキー（Grosskinsky）等，Infect.Immun.,1989,57,5:1535-1541;ガルシア（Garcia）等，J.Gen.Microbiol.,1986,132,pp.2265-2269;イマエダ（Imaeda），T.,Int.J.Sys.Bacteriol.,1985,35,2:147-150;クラーク－カーティス（Clark-Curtiss），等，J.Bacteriol.,1985,161 3:1093-1102;バエス（Baess），I. 等，B.,Acta.Path.Microbiol.Scand.,1978,86,pp.309-312;ブラッドリー（Bradley），S.G.,Am.Rev.Respir.Dis.,1972,106,pp.122-124）。最近、マイコバクテリア遺伝子のクローニン

グおよび発現のために組み換えDNA技術が利用されている。M.チューバークローシス、M.レプラエおよび幾つかの他のマイコバクテリア種のゲノムDNAが、λ-gtllファージ（ヤング（Young）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1985,82,pp.2583-2587;ヤング（Young）等，Nature（ロンドン），1985,316,pp.450-452）あるいは他のベクターに基く組み換え遺伝子ライブラリーの構築に利用された。これらのライブラリーは、二十日鼠のモノクローナル抗体（エンゲルス（Engers）等，Infect.Immum.,1985,48,pp.603-605;エンゲルス（Engers）等，Infect.Immun.,1986,51,pp.718-720）並びにポリクローナル抗血清でスクリーニングされ、かつ幾つかの免疫優性の抗原が同定された。これらの中で、主な抗原はM.チューバークローシスの12、14、19、65および71kDaの５種の抗原（ヤング（Young）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1985,82,pp.2583-2587;シニック（Shinnick）等，Infect.Immun.,1987,55（7），pp.1718-1721;ハッソン＆ヤング（Husson & Young），Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1987,84,pp.1679-1683）およびM.レプラエの12、18、23、36および65kDaの５種抗原（ヤング（Young）等，Nature（ロンドン），1985,316,pp.450-452）である。幾つかのこれら抗原に対する幾つかの類似抗原も、幾つかの他のマイコバクテリア種（例えば、BCG）中に同定された（ヤマグチ（Yamaguchi）等，FEB 06511,1988,240,pp.115-117;ヤマグチ（Yamaguchi）等，Infect.Immun.,1989,57,pp.283-288;マツオ（Matsuo）等，J.Bacteriol.,1988,170,9:3847-3854;ラドフォード（Radford）等，Infect.Immun.,1988,56,4:921-925;リュー（Lu）等，Infect.Immun.,1987,55,10:2378-2382;ミンデン（Minden）等，Infect.Immun.,1986,53,3:560-564;ハーボエ（Harboe）等，Infect.Immun.,1986,52,1:293-302;トール（Thole）等，Infect.Immun.,1985,50,3:800-806）。しかしながら、これらの抗原は細胞内または分泌分子の何れかである。

M.ボビスBCGは結核症に対するワクチンとして広範に利用されてきたが、防禦免疫応答を誘発し得るマイコバクテリアの膜－関連ポリペプチドの決定が強く望まれている。このような膜－関連ポリペプチドおよびこれをコードするDNAの使用は、組み換えワクチン、例えばワクシニアウイルス、サルモネラ菌等の生担体として使用され、ウイルスまたはバクテリア内で発現される、マイコバクテリア膜－関連免疫原の発生、または組み換え生ワクチンとして使用できる培養可能なマイコバクテリア菌株の表面上における、非－マイコバクテリア性免疫原の発現をもたらす。

従って、本発明の目的は、マイコバクテリアの膜－関連ポリペプチドをコードする核酸を同定し、かつ単離する方法を提供することにある。

更に、本発明のもう一つの目的は、マイコバクテリアの膜－関連ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードする核酸を提供することにある。

本発明の更に別の目的は、マイコバクテリアの該膜－関連ポリペプチドまたは該膜－関連ポリペプチドをコードするDNAの全体または一部を利用したワクチンを提供することにある。

本発明の目的は、更にマイコバクテリア感染に関する診断アッセイにおいて有用な、マイコバクテリアと共に該膜－関連ポリペプチドを含む、あるいは該ポリペプチドをコードするDNAを含有する試薬を提供することにある。

更に、本発明の目的は、マイコバクテリア並びにE.コリ（E.coil）等の他の微生物中で遺伝子発現可能な、該膜－関連ポリペプチドのプロモータを含むプロモータ配列を提供することにある。

発明の概要

上記目的に従って、本発明は、マイコバクテリアの膜－関連ポリペプチド全体またはその一部をコードする核酸および該DNAによってコードされた該膜－関連ポリペプチドを含む組成物を包含する。該膜－関連ポリペプチドは、病原性マイコバクテリア即ち該ポリペプチドまたはその一部を取り出したマイコバクテリアに対する免疫応答を検出し得ることにより特徴付けられる。かかるマイコバクテリアはM.ボビス（M.bovis）、M.チューバークローシス（M.tuberculosis）、M.レプラエ（M.leprae）、M.アフリカヌム（M.africanum）、M.ミクロッティ（M.microti）、M.アビウム（M.avium）、M.イントラセルラー（M.intracellular）、M.スクロフラシウム（M.scrofulaceum）およびM.ボビス（M.bovis）BCG

を包含する。
ある特別なマイコバクテリアの膜－関連ポリペプチドは79kDのイオン－移動性（ion-motive）ATPアーゼである。細胞外、細胞内および経膜ドメインは、このマイコバクテリア膜－関連ポリペプチドにおいて、そのDNAおよびその推定されたアミノ酸配列に基いて同定される。
本発明は、また膜－関連マイコバクテリアポリペプチドまたはこれをコードする核酸の表現型の全体または一部を利用したワクチンをも包含する。本発明は、更にマイコバクテリアまたはE.コリ等の他の微生物中で遺伝子発現可能なマイコバクテリアプロモータ配列をも包含する。このようなプロモータは、膜－関連ATPアーゼをコードするマイコバクテリア遺伝子由来のものである。好ましいプロモータは、M.ボビス（M.bovis）BCGの79kDの膜－関連ポリペプチドをコードする遺伝子のプロモータである。このプロモータ配列は、マイコバクテリア中で対象とする遺伝子を発現するのに特に有用である。

【図面の簡単な説明】

第１図は、TBに罹患した患者由来の血清を使用した、M.ボビスBCG DNA（パネルA）およびM.チューバークローシスH37Rv DNA（パネルB）をもつ、組み換えコロニーの免疫スクリーニングの結果を示した図であり、該患者における、該抗血清と反応し得るM.ボビスBCG抗原およびM.チューバークローシスH37Rv抗原の存在は、定性的シグナルによって示される。
第２図は、本明細書に記載した免疫スクリーニングアッセイを利用して同定されたBCG DNAを担持する、組み換えクローンの制限サイトマップ（パネルＢ）と、それぞれM.チューバークローシスおよびM.ボビスBCGゲノムDNAの５種の免疫優性抗原の制限サイトマップ（ハッソン＆ヤング（Husson and Young）, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1987,84,pp.1679-1683;シニック（Shinnick）等, Infect.Immun.,1987,55,pp.1718-1721（パネルA））とを比較して示した図である。各パネルにおける制限マップは、同一の縮尺で描かれており（上部に示されている）、また制限サイトは該制限マップの上部に示されている。パネルＡの点線は非－マイコバクテリアDNAを表す。制限酵素：B,BamHI;E,EcoRI;G,BglII;K,KpnI;P,PvuI;X,XhoI;H,HincII;U,PvuII;Ps,PstI,Hi,HindIII。パネルＡにおいて、ＡはSalIであり、またＳはSacIである。
第３図は、組み換えクローンpMBB51Aの超音波照射した上澄のウエスタンブロット分析の結果を示す図であり、該組み換えクローンは該組み換えコロニーの免疫スクリーニングに従って同定されたBCG DNAインサートをもつ。上部パネルはMBB51A（レーン2）およびE.コリ（レーン1）と、TBに罹患した患者由来の血清との反応性を示す。下方のパネル（パートＡ）は、MBB51A（レーン１および2）およびE.コリ（レーン3）と、兎中に発生した抗-H37Rv血清との反応性を示す。パートＢはMBB51A（レーン１および2）およびE.コリ（レーン3）と、第二抗体のみとの反応性を示す。矢印は、該組み換えMBB51Aにより発現された90kDの免疫反応性BCGタンパクの位置を示し、これは負のコントロールには見られなかった。
第４図は、推定分子量79kDを有する、イオン－移動性ATPアーゼをコードするM.ボビスBCG免疫反応性MBB51A遺伝子を含むクローンpMBB51Aの、3.25kbインサートDNAのヌクレオチド配列（Seq.ID NO.:1）を示す。その推定アミノ酸配列（Seq.ID NO.:2）は該ヌクレオチド配列の下方に示されている。上流プロモータエレメントは下線で示してある。転写終止領域は逆向きの矢印で示してある。5'および3'ブランキング領域も図示してある。
第５図は、BCGのイオン－移動性ATPアーゼを表す、pMBB51Aによってコードされる、79kDのタンパクについて誘導された模式的なモデルを表す。このモデルは、該タンパクの経膜ドメインの他のイオン－移動性ATPアーゼ類似体中で顕著な、構造上および機能上の特徴のみを考慮したものである。機能上重要なアミノ酸残基はそれぞれ（P）,位置400におけるプロリン；（D）,位置443におけるアスパラギン酸；（G）,位置521におけるグリシン；（A）,位置646におけるアラニンを表す。数値は該経膜ドメインの限界を大まかに画成するアミノ酸残基を示す。
第６図は、M.ボビス（レーン6）、M.チューバークローシスH37Rv（レーン5）、M.スメグ

マチス（Smegmatis）（レーン4）およびM.バッカエ（Vaccae）（レーン3）由来のゲノムDNAのBamHI消化物のサザンブロットハイブリッド形成の結果を示す（プローブとしてpMMB51A DNAを使用した）。パネルＡはエチジウムブロミド染色したゲルを示し、パネルＢは該サザンブロットハイブリッド形成の結果を示すものである。

発明の詳細な説明

本明細書で使用する、マイコバクテリアの「膜－関連ポリペプチド」とは、該膜－関連ポリペプチドを含有する野性－型のマイコバクテリアに対する免疫応答の検出を可能とする、任意のマイコバクテリア膜－関連ポリペプチドとして定義される。しかしながら、M.ボビスBCGの79kD膜－関連ポリペプチドと、結核に罹患した患者のプールした抗－血清との間の観測された交差－反応性、および該79kD膜－関連ポリペプチドをコードするDNAとM.チューバークローシスH37RvのDNAとの間におけるような、交差－ハイブリダイゼーションを基にすれば、本発明の該膜－関連ポリペプチドは、本明細書でM.ボビスBCGから同定したポリペプチドに限定されるものではない。寧ろ、本発明は、79kDのイオン－移動性ATPアーゼのみならず、該膜－関連ポリペプチドが通常見出される、同一のまたは異なるマイコバクテリアによる免疫応答を検出するのに利用できるマイコバクテリアの任意のおよび全ての膜－関連ポリペプチドをも包含する。

本明細書で使用する用語「核酸」とは、DNAまたはRNA並びに検出可能な標識が組み込まれた、あるいは安定性を高めるための種々の変性、例えばホスホリボース骨格へのホスホロチオエート結合の組み込み等により変性された核酸を包含する。このような核酸は、また該膜－関連ポリペプチドをコードするDNAのアンチセンス配列を含んでおり、今や周知となっているアンチセンス技術がかかる膜－関連ポリペプチドの発現を変調するのに利用できる。

本発明の幾つかの局面においては、該マイコバクテリアの膜－関連ポリペプチド全体またはその一部をコードする核酸配列をワクチンとして利用する。

このように使用する場合、該核酸は一般的に「発現可能な核酸」であって、これは全ての必要な発現調節配列を含んでいて、選択された宿主系内の核酸の転写並びに翻訳を制御する。幾つかのワクチンの態様において、該DNAは該膜－関連ポリペプチドおよび「免疫原性ポリペプチド」の経膜ドメインの少なくとも１つにおいて、キメラポリペプチドをコードする。この経膜ドメインは、弱毒生ワクチン等の特定の宿主生物の表面上に、該免疫原性ポリペプチドを発現するのに利用される。該膜－関連ポリペプチドが１を越える経膜領域を含む場合、該経膜領域の１以上を免疫原性ポリペプチドと共に使用できる。かくして、例えば第５図に示したような79kDイオン－移動性ATPアーゼは少なくとも３個の細胞外ドメインを有し、該ドメインには、組み換えDNA技術を含む周知の方法によって、免疫原性ポリペプチドを組み込むことができる。１を越える経膜領域を、免疫原性ポリペプチドを発現するのに利用することが好ましいが、当業者は容易にこのような膜－関連ポリペプチドの長さを変えて、免疫応答を最小化し、あるいはこのような用途に使用する膜－関連ポリペプチドの量を最小化することができる。

本明細書で使用する用語「免疫原性ポリペプチド」とは、ワクチンまたは診断用途において潜在的に利用可能である任意のポリペプチド全体またはその一部を含む。かくして、該免疫原性ポリペプチドは、非相同性免疫原、即ち非－マイコバクテリア源、例えばサルモネラ（Salmonella）またはシゲラ（Shigella）由来の免疫原、あるいは該膜－関連ポリペプチドを誘導したものとは異なるマイコバクテリア由来の免疫原、例えばM.ボビスBCGからの膜－関連ポリペプチドと融合したM.チューバークローシス由来の免疫原を含むことができる。しかしながら、幾つかの例においては、相同性免疫原を使用できる。例えば、本明細書の第５図に示された細胞外ドメインの各々を、通常経膜ドメインを含む膜－関連ポリペプチド由来の該ドメインの１以上と組み合わせ、かつ表示することができる。あるいはまた、該細胞間ドメインを、同一の分子由来の適当な経膜領域を利用して、細胞外的に発現することもできる。

別のワクチンの態様においては、該膜－関連ポリペプチドをコードするDNAではなく、寧ろマイコバクテリアの該膜－関連ポリペプチドの全体またはその一部を、ワクチンの一部

として使用する。このようなタンパク質性のワクチンは、周知のアジュバントと共に処方され、かつ当業者には公知の十分に確立されたプロトコールに従って投与される。
更に他の態様においては、本発明の該膜－関連ポリペプチドをコードする核酸を、感染性のマイコバクテリアに含まれる野性型の遺伝子とのハイブリダイゼーションに基づく、感染の検出用の診断剤として使用できる。このような検出は、適当な診断用サンプルから抽出されたDNAの直接的なハイブリダイゼーション、または本発明の該膜－関連ポリペプチドをコードする該核酸のヌクレオチド配列を使用して増幅を誘発した、PCR増幅を含む。PCR増幅を保存領域内で開始する場合、診断サンプル中のマイコバクテリアの存在を判定できる。この診断アッセイに対して特異的な種である、非－保存領域内で該増幅を開始する場合には、感染を引き起こす特定のマイコバクテリアが決定される。
更に、本発明の膜－関連ポリペプチドは、また潜在的にマイコバクテリアによって感染された患者の血清中の抗体の存在を検出するのに利用できる。このような検出系は、ラジオイムノアッセイおよび当業者には周知のその種々の変法を含む。更に、本発明の膜－関連ポリペプチドは、生物学的サンプル中の細胞媒介免疫応答の存在を検出するのに利用することもできる。このようなアッセイ系も、当業者には周知であり、一般に該膜－関連ポリペプチドの刺激に応答したＴ細胞の、準－集団のクローン増殖を包含する。このような使用に際して、患者の体液性および／または細胞－媒介性応答が測定され、かつ該疾患に罹患中ずっと監視される。
M.ボビスBCGの免疫原タンパク抗原をコードする組み換えクローンはM.ボビスBCG DNAのゲノムライブラリーから単離されている。特に、M.ボビスBCGの４つのタンパク抗原をコードするDNAフラグメントは、E.コリ上に吸収された、TB患者由来の血清によって、M.ボビスBCG DNAのpBR322ライブラリーを精査することにより単離されている。これら４種の組み換えクローンの制限サイトマップは、マイコバクテリアの５種の免疫優性抗原のものとは異なっており（ヤング（Young）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1987,82,pp.2583-2587;ハッソン＆ヤング（Husson and Young），Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1987,84,pp.1679-1683;シニック（Shinnick）等，Infect.Immun.,1987,55,pp.1718-1721）、その結果これらのクローン化タンパク抗原が新規であることを示している。この組み換えDNAクローンの一つは、ウエスターンブロット分析によって測定された見掛けの分子量90kDを有する免疫反応性タンパク質をコードした。このクローンの挿入DNAの完全なヌクレオチド配列が決定された。このクローンはマイコバクテリアプロモータおよび推定された分子量79kDを有する761アミノ酸のタンパク質をコードするモノシストロン性ORFをもつことが分かっている。この79kDのタンパク質はS.フェカリス（faecalis）（ゾリオッツ（Solioz）等，J.Biol.Chem.,1987,262,pp.7358-7362）、E.コリ（ヘッセ（Hesse）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1984,81,pp.4746-4750）および幾つかの他の生物のイオン－移動性ATPアーゼと高い相同性を有しており、従ってBCGの推定K+ATPアーゼまたはイオン－移動性ATPアーゼを表す。コンピュータアルゴリズムを利用して、このイオン－移動性ATPアーゼが膜タンパクであると判定した。これは、ヒトにおいて病原性であるM.チューバークローシスH37Rv内で相同性をもつが、非－病原性であるM.バッカエおよびM.スメグマチス内では相同性をもたない。結果として、新規なBCG免疫原を得ることができ、これは結核および他のマイコバクテリア感染の予防、診断および治療において有用であり得る。これらは、例えばM.チューバークローシスに対する抗体を生産する個体またはM.チューバークローシスに感染した個体につき、患者をスクリーニングするための、高度に特異的な血清学的テストの開発、該疾患に対するワクチンの開発、並びに感染した個体の治療の有効性の評価において利用できる。
更に、pMBB51A挿入DNAのヌクレオチド配列に基いて、適当なオリゴヌクレオチドプライマーを、鋳型としてM.ボビスBCGまたはM.チューバークローシスH37RvDNAを使用した、PCR増幅のために利用できる。このようなPCR増幅スキームは、従って与えられたサンプル中のマイコバクテリアDNAの検出のために有用であり得る。更に、該プライマーの設計の賢明な選択により、このような増幅手順は、マイコバクテリアのDNAの分類学上の分類に適合させることが可能である。例えば、該ATP-結合サイト等の強く保存された領域を側部に配

置するプライマーを使用することにより、PCR増幅が全てのマイコバクテリア種に対して一般的となり、一方で非－保存領域由来のプライマーを使用することにより、増幅を種特異的なものとすることができる。

実施例１：M.ボビスBCGまたはM.チューバークローシスH37Rの免疫原性タンパク抗原をコードする遺伝子の単離および特徴付け

A. M.ボビスBCG DNAまたはM.チューバークローシスH37Rv DNAの組み換えDNAライブラリーの構築

M.ボビスBCGのゲノムDNAの組み換えDNAライブラリーを、抗生物質マーカー（アンピシリンおよびテトラサイクリン）および数個の固有クローニングサイトと共に、高いコピー数のプラスミドベクターであるpBR322を使用して構築した。

M.ボビスBCG細胞は対数増殖期後期の培養物から収穫し、かつ高分子量DNAを、アイゼンナッハ（Eisenach）等，J.Mol.Biol.,1986,179,pp.125-142の方法を幾分改良した方法によって単離した。BCG DNAはBamHIで完全に消化し、これらフラグメントの、pBR322の該BamHIサイトへのショットガンクローニングを実施した。このゲノムライブラリーをE.コリ菌株DHIに形質転換し、組み換え体をアンピシリン耐性かつテトラサイクリン感受性を基に計数した。この研究の目的は広いサイズ範囲の制限フラグメントを、該ライブラリーを任意の特定のサイズ範囲のDNAフラグメントに制限しないように、発生させることであった。またこのクローニング法により、マイコバクテリア抗原の発現につき選択された任意の組み換え体が、pBR322のTetプロモータではなく、寧ろマイコバクテリアプロモータからの発現を誘発するはずであることを、かなりの程度まで確実にした。

このようにして構築した該BCGライブラリーはBCG由来の2051クローンを含んでいた。同様な方法で、M.チューバークローシスH37Rv DNAのゲノムライブラリーを構築し、1100のクローンが得られた。

このBCG DNAインサートのサイズは0.9～9.5kbの範囲内であった。pBR322内に挿入された該マイコバクテリアDNAフラグメントの平均サイズは、約４kbであると見積もられた。BCGの該ゲノムサイズを$4.5X10^3$kbであるとすると（ブラッドレー（Bradley），S.G.,J.Bacteriol.,1973,113,pp.645-651;イマエダ（Imaeda），Int.J.Syst.Bacteriol.,1982,32,pp.456-458）、この平均インサートサイズをもつ約1000のクローンが、該微生物の全ゲノムを包括的に表している。

B. M.ボビスBCGおよびM.チューバークローシスH37Rvタンパク抗原をコードする組み換えDNAクローンの単離

マイコバクテリア抗原を発現する組み換え体を同定するために、適当な抗－血清で組み換えコロニーをスクリーニングするためのコロニー免疫スクリーニングアッセイ（CIA）を確立した。進行中の肺結核であると新たに診断された20名の患者から得た血清を、免疫スクリーニングで使用するためにプールした。該患者の何れも、この研究前に結核治療を受けておらず、かつその疾は全ての場合において、抗－酸性バクテリアについて正であった。プールした血清をE.コリに吸収させ、４℃にて一夜超音波照射して、E.コリ抗原に対して交差－反応性の抗体を除去し、かくして該免疫スクリーニング中のシグナル／ノイズ比を改善した。

個々の組み換えコロニーをニトロセルロース膜上で一夜成長させ、免疫スクリーニングを幾分改良を加えた上記の方法に従って実施した。これらのコロニーをクロロホルム蒸気で溶解して、クローン化マイコバクテリア抗原を放出させ、ニトロセルロース紙上に固定化した。これらの固定化された抗原は、TB血清と反応し、該抗体の結合はホースラディッシュペルオキシダーゼ－プロテインＡを使用した標準的手順によって顕在化させた。この組み換えクローンを使用して得たシグナルを、負のコントロールとして機能する、pBR322ベクターのみを含むE.コリの場合に得られたシグナルと比較して、該シグナル／ノイズ比を評価した。更に、該組み換えクローンの免疫反応性が抗－マイコバクテリア抗体によるものか、あるいは正常な血清成分との反応によるものかを確認するために、選択された組み換え体についてもう一つのCIAを、TB血清および正常ヒト血清NHS（これらはTB血清について以前に記載したものと類似の方法で、E.コリに吸収させた）を使用して実施した。選択

的にTB血清と反応し、かつNHSとは反応しないクローンのみが、疑いもなくマイコバクテリア抗原の存在を示唆するものであると考えた。この免疫スクリーニング法を使用して、マイコバクテリア抗原を発現することのできる、マイコバクテリアDNAインサートをもつ組み換えコロニーを同定する方法を以下に記載する。

第１図は、TB患者からの血清を使用した、M.ボビスBCG DNA（パネルA）またはM.チューバークローシスH37Rv DNA（パネルB）をもつ組み換えコロニーの免疫スクリーニングの結果を示す図である。これらコロニーは一夜ニトロセルロース紙上で成長させ、溶解して該クローン化マイコバクテリア抗原を放出させ、該抗体と反応させた。マイコバクテリア抗原の存在は、該組み換えクローン内の定性的シグナルによって示され、該シグナルは、pBR322ベクターのみを含むコロニーからなる負のコントロール中には存在しない。同様なアッセイを、正常なヒト血清を使用して繰り返し、該クローン化マイコバクテリア抗原の特異性を確認した。M.ボビスBCG DNAインサートをもつ51個の組み換えコロニーおよびM.チューバークローシスH37Rv DNAインサートをもつ45個の組み換えコロニーが上記手順によってスクリーニングされ、BCG起源の14クローン（パネルA）およびH37Rv起源の２クローン（パネルB）が明確な強いシグナルを示し、このことはこれらのクローンが免疫反応性をもつことを示している（第１図）。これら全てのクローンを、NHSとの反応性についてもテストした。しかしながら、NHSに対して僅かな反応性を示した３種のクローンを除き、何れのクローンもNHSに対する反応性を示さなかった。このことは、これらが選択的にTB血清と反応するマイコバクテリア抗原を発現したことを示している。かくして、この手順はマイコバクテリア抗原をコードする組み換えクローンのゆるぎない同定をもたらした。この方法を、プラスミドまたはコスミドベクター中で調製された、マイコバクテリア遺伝子バンクに一般的に適用して、少なくともイムノアッセイによる検出限界まで、E.コリ中で発現される遺伝子を同定できる。

C．免疫反応性のM.ボビスBCG DNA組み換え体の制限マッピング

TB血清を使用して単離された免疫反応性のBCG組み換えDNAクローンの４つのインサートDNAを、制限エンドヌクレアーゼによりマッピングした。第２図のパネルＢは、４つの組み換え体内のクローン化BCG DNAについて導いた、ゲノムDNA制限サイトマップを示し、ここでＡはSal I、ＢはBam HI、ＥはEco RI、ＧはBgl II、ＫはKpn I、ＰはPvu I、ＳはSac I、ＸはXho Iを表す。次いで、これらの制限サイトマップを、M.チューバークローシス／M.ボビスBCG（ヤング（Young）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1985,82,pp.2583-2587;ハッソン（Husson）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1987,84,pp.1679-1683;シニック（Shinnick）等，Infect.Immun.,1987,55,7:1718-1721）の５つの免疫優性抗原について前に作成したマップと比較した（第２図、パネルA）。パネルＡおよびＢに示された制限サイトマップは同一の縮尺で描かれているので、これら２者の間の差異は明らかである。免疫反応性BCG組み換えクローンの制限サイトマップと、M.チューバークローシス／M.ボビスBCGの以前に特徴付けされた免疫優性抗原のマップとの間には、何等類似性をもつ領域が見られない。従って、これら４つの組み換え体中の該クローン化BCG DNAインサートは新規であると結論付けることができる。

実施例II：BCGイオン－移動性ATPアーゼをコードする遺伝子の単離および特徴付け

A．新規BCG抗原の同定

該４つの免疫反応性BCGクローンの一つであるpMBB51Aは、TB血清並びにウサギ中に生じた抗－H37Rvポリクローナル抗血清を使用したウエスタンブロット分析において、Mr90kDのタンパクの存在を明らかにした（第３図）。幾つかの抗－マイコバクテリアモノクローナル抗体（TB23、TB71、TB72、TB68、TB78;エンゲルス（Engers），Infect.Immun.,1985,48,pp.603-605）または正常なヒト血清を使用したpMBB51Aの同様なウエスタンブロット分析は、この90kDの免疫反応性タンパクの存在を明らかにしなかった。このことは、pMBB51AがBCG抗原をコードし、該抗原が以前にBCG中で同定されたものとは異なり、結果として該抗原は新規なものであることを示している。

B．pMBB51Aのヌクレオチド配列の決定

この新規なBCG抗原を更に特徴付けするために、pMBB51A DNAインサートをヌクレオチド配

列決定にかけた。pMBB51A内に含まれるBamH I-BamH Iインサートを、付随的な制限酵素開裂サイトにつきマッピングした。これは、この配列内に少なくとも１個のPst Iサイトと３個のSal Iサイトが存在することが決定された。Sal I、BamH IおよびSal I、BamH IおよびPst I、並びにPst IおよびSal Iの単一および二重の消化により得られたオーバーラップフラグメントを、DNA配列分析の準備として、M13mp18およびM13mp19ベクター内でサブクローニングした。次いで、DNA配列決定を、市販品として入手可能なキット、例えばファルマーシア（Pharmacia）から入手したシーケナーゼ（Sequenase）装置およびT7装置を使用して実施した。決定された配列から導かれたオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして使用して、より大きなインサートの配列を完成させた。この配列決定中に幾つかの圧縮領域に遭遇したが、これらは該配列決定反応においてdITPを使用し、かつ反応条件を変更することによって解決された。該pMBB51AインサートDNAの完全なヌクレオチド配列を、両ストランドのdGTPおよびdITPを使用した配列決定により決定した。このpMBB51AインサートのDNA配列は、GC含有率67.1%をもち、長さが3.25kbであることが判定され、また第４図に示されている。

クローン化pMBB51Aの該3.25kbのDNA配列の決定（第４図）は、該90k DBCG抗原のアミノ酸配列の推定を可能とした。第４図において、ヌクレオチドは該pMBB51AインサートのDNAの左端から番号付けされている。

３つの全ての読み取り枠における可能なORFについてのpMBB51AインサートDNA配列の研究は、一方のストランドに761個のアミノ酸をもつポリペプチドをコードする2286bpの最長のORFの存在を明らかにした。他方のストランドは、349個のアミノ酸をもつポリペプチドをコードすることのできる1047bpのより小さなURFを有することが分かった。761個のアミノ酸をもつ長いタンパクをコードする該最長のORFは、ウエスタンブロットに見られる、見掛けの分子量90kDの該免疫反応性BCGタンパクに最も近い、79kDの推定された分子量に対応した。このタンパクの推定されたアミノ酸配列は第４図のヌクレオチド配列の下方に与えられている。

pMBB51AインサートDNA上のこのORFの位置は、何れかの側に存在する、いかなる意味のあるORFをももたないブランキングDNA配列の長いストレッチが存在するようなものである。これは、該pBR322 Tet遺伝子プロモータからのこのORFの発現を阻止し、またその代わりに、このORFはpMBB51A内のそれ自体のプロモータから発現されることを示唆した。このことは、またE.コリが、この遺伝子内の該M.ボビスBCG転写並びに翻訳開始および終止サイトを正確に利用し得ることを示唆した。

該ORFの直ぐ上流側の、E.コリの-35、-10およびシャインーダルガルノ配列と厳密に適合する調節配列（ローゼンバーグ（Rosenberg）等, Annul.Rev.Genet.,1979,13,pp.319-353）が同定された。これら３つの調節モチーフ間の間隔は全く十分に保存されている。配列決定された他のマイコバクテリアプロモータ（デール（Dale）等, Molecular Biology of the Mycobacteria,Chap.8,pp.173-198（1990））は、上記３つの領域-35、-10およびSD全てにおいて該E.コリのコンセンサス配列とは異なっているが、pMBB51A DNA調節エレメントは-35およびSD配列エレメントにおいてE.コリと最大の配列同一性の程度を示すが、各エレメントにおける単一の不一致およびプリブナウ配列における配列同一性約50%をもつ。上記特徴の全ては、明らかに該領域がpMBB51A内に含まれるマイコバクテリア遺伝子のプロモータ領域であることを示した。このBCGプロモータ配列と、典型的なE.コリプロモータ配列との間の類似性は顕著であり、かつ多くの他のマイコバクテリアプロモータとは異なり、E.コリ内におけるこのプロモータの機能的な活性を説明している。このORF中の翻訳開始コドンは位置508におけるATGであり、一方で単一の翻訳終止コドンTGAは位置2790に同定された。ステムおよびループ配座を形成し得る強力な転写終止構造がこのORFの3'領域内に同定された。かくして、このpMBB51A ORFは、オペロンではなく寧ろモノシストロン性遺伝子を表した。MBB51A遺伝子の該プロモータ領域は、E.コリ並びにマイコバクテリア中での遺伝子発現を可能とする。このプロモータ配列はE.コリ内でのマイコバクテリア遺伝子を発現させるのに有用である。更に、このプロモータ配列はマイコバクテリア中での相同性および／または非相同性遺伝子を発現させるのに利用することも可能であり

、従ってマイコバクテリア中に遺伝子発現系を発生させるためのキーエレメントを与える。

該MBB51Aタンパクの可能な生物学的機能に関する情報を導き出すために、PIRプロテインデータベースリリース（PIR Protein Database Release）20（第Ｉ表）およびジーヌバンクヌクレイックアシッドデータベース（Genebank Nucleic Acid Database）（第II表）中の入手可能な配列に対する相同性につき、リップマン＆ピアーソン（Lipman and Pearson）, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1988,85,p.2に記載のファストＡ（Fast A）プログラム一式を利用して探究するのに、このタンパクのアミノ酸配列を使用した。このMBB51Aタンパクの配列は、バクテリアから哺乳動物に至る異なる生物由来の一群のイオン－移動性ATPアーゼに対して相同性を示した。クツプル（ktuple）２による研究からの最良のスコア13が、第Ｉ表の上部パネル内に示され、またクツプル１による研究から得た最良のスコア10が下方のパネルに示されている。各場合において、MBB51Aタンパクは、S.フェカリス（faecalis）（ソリオッツ（Solioz）等, 1987）に対して、K^+輸送ATPアーゼに対して31.9%の同一性をもつ593アミノ酸の重なりにおいて最大の相同性（75.9%の相同性）を示した。次に最良の相同性は、E.コリ（ヘッセ（Hesse）等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1984,81,pp.4746-4750）のK^+輸送ATPアーゼのB-鎖について観測された（同一性24.2%をもつ397アミノ酸の重なりにおける相同性68.8%）。より低い程度の相同性も、異なる生物由来のH^+、Ca^{++}およびNa^+-ATPアーゼについて観測された。かくして、相同性研究の結果は、MBB51AタンパクがM.ボビスBCGのイオン－移動性ATPアーゼであり、かつ他のバクテリア性イオン－移動性ATPアーゼと密接に関連していることを示した。これが、マイコバクテリア中のかかるATPアーゼのクローニングおよび同定に関する最初の報告である。このBCGのイオン－移動性ATPアーゼは、他のイオン－移動性ATPアーゼとの相同性を示し、その重なり領域はS.フェカリスの場合の593アミノ酸から、L.ドノバニ（L.donovani）（メアド（Meade）等, Mol.Cell Biol.,1987,7,pp.3937-3946）の場合の82アミノ酸までのサイズ範囲に渡るが、配列同一性または保存領域の殆どは該MBB51AタンパクのC-末端側半分に局在していた。更に、MBB51AタンパクのC-末端側半分におけるアミノ酸30個をもつ領域が、これらATPアーゼの殆どを与えられており、結果としてこのことは該領域の機能的な重要性を示唆している。S.フェカリスおよびE.コリのK^+ATPアーゼとMBB51Aタンパクとの細部に渡る整合性も、数個の残基がこれら３種のATPアーゼ間で保存されており、バクテリアからヒトまでの全てのATPアーゼにおいて不変であるものを含む。

第Ｉ表：PIR プロテインデータベースに対するMBB51Aアミノ酸配列の相同性研究の結果

クツプル：２

座	簡単な定義	初期スコア	最適値
>A29576	カリウム輸送ATP アーゼ，ストレプトコッカス	547	792
>PWECBK	カリウム輸送ATP アーゼ，β－鎖-E. コリ	314	270
>A25939	プロトン輸送ATP アーゼ－アカパンカビ	168	186
>A25823	プロトン輸送ATP アーゼ－酵母	166	184
>PWRBFC	カルシウム輸送ATP アーゼ－ファストトウィッチ骨格(fast twitch skele)	152	158
>PWRBSC	カルシウム輸送ATP アーゼ－スロートウィッチ骨格(slow twitch skele)	135	157
>A25344	カリウム輸送ATP アーゼ，ラット	78	155
>RDEBHA	水銀リダクターゼ，フレキスナー赤痢菌	99	142
>RDPSHA	水銀リダクターゼ（トランスポゾンTn501）	74	124
>RGPSHA	水銀リダクターゼ，オペロン調節Ｐ	79	109
>A24639	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α	92	82
>A24414	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α	92	82
>B24862	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ β	83	82

該PIRプロテインデータベース（9124配列中に2378611残基）をファスタ（FASTA）プログラムに従って走査した。元の初期スコアの平均は27.2であり、標準偏差は6.9であった。75.6を越える初期スコアの平均を越える標準偏差は、通常の生物学的な相関性を示す有意なレベルである６である。最適値は、一般的に該配列内にギャップを導入することにより、関連タンパクの該初期スコアを改善するであろう。相関をもたない配列は、通常最適化によってそのスコアは改善されない。

クツプル：1

座	簡単な定義	初期スコア	最適値
>A29576	カリウム輸送ATP アーゼ，ストレプトコッカス	744	792
>PWECBK	カリウム輸送ATP アーゼ，β－鎖-E. コリ	386	270
>A25939	プロトン輸送ATP アーゼ－アカパンカビ	310	186
>A25823	プロトン輸送ATP アーゼ－酵母（サッカロミセス）	317	184
>B24639	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α(+	158	163
>A24639	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α ch	175	160
>C24639	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α (II	192	159
>PWRBFC	カルシウム輸送ATP アーゼ－ファストトウィッチ骨格(fast twitch skele)	240	158
>PWSHNA	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α骨格	214	158
>A24414	ナトリウム／カリウム輸送ATP アーゼ α鎖	214	158

第II表：ジーヌバンク核酸配列データベースに対するMBB51Aアミノ酸配列の相同性研究の結果

クツプル：2

座	簡単な定義	初期スコア	最適値
>STRATPK	S.フェカリス，K^+ ATP アーゼ，完全cds.	537	800
>ECOKDPABC	E.コリkdpABCオペロン(Kdp-ATPアーゼをコード)	314	270
>YSPPMAIA	S.ポンブ(pombe) H^+ ATP アーゼ，完全cds.	135	188
>NEUATPASE	アカパンカビ原形質膜ATP アーゼ，完全	133	186
>NEUATPPM	アカパンカビ原形質膜H^+ ATP アーゼ	131	186
>YSCPMAI	原形質膜ATP アーゼに対する酵母PMA1	166	184
>M17889	第２図，L.ドノバニATP アーゼのN および	166	170
>M12898	兎ファストトウィッチ骨格筋Ca^{++}ATPase	140	158
>RABATPAC	兎Ca+Mg 依存性Ca^{++}ATPase mRNA. co	142	157
>NR1MER	プラスミドNR1 水銀リダクターゼ(mer) オペロン	100	143

クツプル：1

座	簡単な定義	初期スコア	最適値
>STRATPK	S.フェカリス，K ＋ ATP アーゼ，完全cds.	744	800
>SYNCATPSB	シアノバクテリウムシネココッカス(Cyano- bacterium Synechococcus)6301 DNA for AT	379	422
>ECOKDPABC	E.コリkdpABCオペロン(Kdp-ATPアーゼをコード)	379	270
>YSPPMAIA	S.ポンブH ＋ ATP アーゼ遺伝子，完全cds.	275	188
>NEUATPASE	アカパンカビ原形質膜ATP アーゼ遺伝子，完全	311	186
>NEUATPPM	アカパンカビ原形質膜H ＋ ATP アーゼ	302	186
>YSCPMAI	原形質膜ATP アーゼに対する酵母PMA1遺伝子	317	184
>J04004	L.ドノバニカチオン輸送ATP	322	170
>M17889	第２図，L.ドノバニのヌクレオチド配列	306	170
>RATATPA2	ラットNa＋，K ＋ ATP アーゼα(+) イソ型	158	163
	接触型		

E.コリのKdpBタンパクおよび多分S.フェカリスK+ ATPアーゼは、ホスホリル化およびデホスホリル化種間の酵素の環式転位を伴う、アスパルチルホスフェート中間体を形成することが知られているE1E2-ATPアーゼの構成員である。他のATPアーゼとの類推から、該ホスホリル化Asp残基（D）（ファースト（Furst），J,Biol.Chem.,1985,260,pp.50-52）は、MBB51A ATPアーゼに内の位置443において同定された。この残基は、バクテリア乃至ヒト由来のATPアーゼに内に保存されているペンタペプチド配列DKTGTの第一の残基であり、かつ触媒サイトの必須のエレメントを形成するはずである。同様に、MBB51A ATPアーゼの位置400におけるプロリン（P）は他のATPアーゼ中の不変のアミノ酸であることが分かっており、膜の覆うドメイン内に位置しているものと予想される。このような膜埋設プロリン残基は、輸送チャンネルの調節のために必要とされる、可逆的配座変化のために要求されるものと推定されている（ブランドル（Brandl）等，Proc.NATL.Acad.Sci.U.S.A.,1986,83,pp.917-921）。更に、他のイオン－移動性ATPアーゼにおいて機能的に重要であると考えられている他の配列モチーフも、該MBB51A ATPアーゼ内に保存されていることが分かった。これらは位置521におけるGly（G）（ファーレイ＆ファーラー（Farley and Faller），J.Biol.Chem.,1985,260,pp.3899-3901）および位置646におけるAla（A）（オータ（Ohta）等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1986,83,pp.2071-2075）を含み、第５図に示されている。

該MBB51A ATPアーゼは膜－関連ATPアーゼに対して相同性であるので、MBB51Aタンパク中の該膜関連ヘリックスの特徴付けはコンピュータアルゴリズムによって実施した。ハイドロパシープロフィール（hydropathy profile）（ラオ（Rao）等，Biochem.Biophy.Acta.,1986,869,pp.197-214）を利用して、該MBB51Aタンパク内の７つの経膜ドメインを同定し、以下の第III表および第５図に示した。経膜ドメインの平均サイズは約21残基である。というのは、21残基がほぼ脂質二重層（32Å）の非－極性位置の厚みに等しいα－ヘリックスに巻かれるからである。しかしながら、経膜ドメインのこのサイズは、与えられた膜－関連タンパクの機能性によって決定した場合には、数個のアミノ酸の範囲内で幅をもつ。MBB51Aタンパク中に同定された該経膜ドメインのサイズは20～37残基の範囲にある。最初の６個の経膜ドメインは、ハイドロパシープロフィールおよび疎水性モーメントのプロ

ット両者によって示されるように、一回だけ該膜に架かる。７番目の経膜ドメインは該膜を２度横切る。これらの特徴は、位置400における膜埋設プロリン（p）と共に、イオン－移動性ATPアーゼのチャンネル輸送機能に一致し、これらタンパクの配座における可逆的変化を包含する。このような経膜ドメインは、更にこの分子の細胞内および細胞外ドメインをも画成する。第５図参照。

第III 表

第５図の経膜ドメイン	アイゼンバーグ法	ラオ&アーゴス法
1	102-122	98-125
2	129-149	127-147
3	164-184	164-185
4	199-219	198-220
5	361-381	360-382
6	387-407	387-419
7	703-723	695-732

MBB51A ATPアーゼはそのN-末端に154個の余分のアミノ酸を有する（S.フェカリス中には存在しない）にも拘らず、MBB51Aタンパクのハイドロパシープロフィールは、ほぼS.フェカリスK+ATPアーゼのプロフィールと重なり合う。このことは、これら２つのタンパク間の、広いドメイン構造の強い発展的な保存の明確な証拠となり、これら２つのタンパクが同様な三次元構造の構成をもつ可能性を高める。

ハイドロパシープロフィールおよび二次構造予測に基づき、該MBB51A ATPアーゼの模式的モデルを第５図に示した。このモデルは、膜を一回横切る少なくとも７つの経膜ドメインを含み、これらは第５図に、各アミノ酸の位置と共に示されている。このモデルは、更に該MBB51Aタンパクの細胞外および細胞内ドメインを画成する。他のイオン－移動性ATPアーゼにおいて機能的に重要であることが示されており、かつ該MBB51Aタンパク中にも保存されている残基の多くも、図示されている。勿論、位置400におけるプロリン（P）は膜埋設性であり、一方で位置443におけるアスパラギン酸（D）、位置521におけるグリシン（G）および位置646におけるアラニン（A）は細胞質に面している。

MBB51Aイオン－移動性ATPアーゼをコードする遺伝子が、ビルレント菌株M.チューバークローシスH37Rvと同様に、BCGに関連したまたは関連しない他のマイコバクテリア菌株およびM.バッカエおよびM.スメグマチスと同様の他の非－結核性、非－病原性のマイコバクテリアにおいても存在するか否かを判定するために、上記種由来のゲノムDNAとのサザーンブロットハイブリダイゼーションを、プローブとしてpMBB51A由来のBCGインサートDNAを使用して実施した。第６図に示した如く、このpMBB51AインサートDNAとハイブリッド形成可能なDNAも、M.チューバークローシスH37Rv DNA中に存在するが、M.スメグマチスおよびM.バッカエ中には存在しなかった。このことは、該pMBB51A遺伝子のM.チューバークローシスH37Rv同族体が、M.ボビスBCG DNAに見られるように、類似の遺伝子的構成をもち、3.25kbのBamH Iフラグメント上に存在することを示した。

新規なM.ボビスBCGおよび／またはM.チューバークローシスH37Rv抗原の入手可能性は、結核およびM.チューバークローシスに関連する未解決の、基本的な生化学的、免疫学的、診断学上および治療上の問題を処理することを可能とする。例えば、M.チューバークローシス特異的抗原決定基は、ヒトの集団をスクリーニングするための簡単かつ特異的な血清疫学的テストを開発するのに利用できる。このような血清学的テストは高度に特異的である。というのは、上に記載し、かつM.チューバークローシスH37Rvに対して固有のものであることが公知である方法によって決定される抗原決定基を使用するからである。このよう

な血清学的テストは、結核の初期の診断に対して有用であり、かくして初期治療並びに該疾患の感染者から他の人々への伝播を制限することが可能となる。
結核に対する耐性は、細胞媒介免疫によって与えられる。本明細書で同定した該抗原は、更に該抗原のどのセグメントがM.チューバークローシス特異的T-細胞によって認識されるかを決定するのに利用することができる。ヘルパーT-細胞によって認識されるペプチド混合物は、患者並びにその接触者の免疫学的状態を評価するのに使用する特異的皮膚テスト抗原を与える。このようなペプチドの混合物は、また候補ワクチンの免疫学的有効性を迅速に評価するのに有用である。その上、M.チューバークローシス特異的T-細胞によって認識されたペプチドは、該疾患に対するワクチンの成分となり得る。
pMBB51A DNAインサートの完全なヌクレオチド配列の知見は、マイコバクテリアゲノムDNAフラグメントのPCR増幅用の適当なプライマーを設計するのに利用できる、配列情報の豊富な源を与える。BCGの該イオン－移動性ATPアーゼは、全てのマイコバクテリア種について同一であると予想される（例えば、ATP結合サイトに関して）、しっかりと保存された配列の領域および異なるマイコバクテリア種においては異なっている、（例えば、N-末端領域に関する）配列多様化領域をもつ。この知見によれば、プライマーを該保存領域または該多様化領域の何れかに基いて設計して、与えられたサンプル中で、該ターゲットDNAがマイコバクテリア由来であるか、非－マイコバクテリア由来であるかを同定することができ、またマイコバクテリアDNAの場合には、該DNAがどのマイコバクテリア種に属するかを同定できる。
このような増幅スキームは、高感度かつ高度に特異的なPCR増幅に基く、マイコバクテリアの診断法を開発するのに有用である。該3.25kbのpMBB51A DNAインサートがM.チューバークローシスH37RvおよびM.ボビスBCG中に存在し、かつ無毒性のM.バッカエおよびM.スメグマチス（これら種間の生物学的差異の他の局面に関連をもつ）中には存在しないという観測は、ビルレンス、成長特性および代謝に現れる。
組み換えワクチンも、本発明の膜－関連ポリペプチド全体またはその一部をコードするDNAを、適当なワクチンビークルに組み込むことにより構成し得る。例えば、79kDM.ボビスBCGタンパクまたは該タンパクの一部をコードするDNA全体またはその一部を、該DNAを発現し得るワクチンビークルに組み込むことができる。このようなワクチンビークルはワクシニアウイルス等のウイルス、またはマイコバクテリア、サルモネラ、ビブリオ、バチルス、エルシニア、ボルデテラ等のバクテリアであり得、これらを投与した個体に対して長時間に渡り免疫性を付与することのできるワクチンを生成する。
該79kDBCGイオン－移動性ATPアーゼの特別な特徴は、このものが膜－結合抗原である点にある。従って、対象とする抗原エピトープ（B-細胞エピトープまたはT-細胞エピトープ）をコードする外来DNAと、該遺伝子またはその一部とを、免疫原として使用される該外来エピトープを発生するように、結合するのに該ATPアーゼを使用できる。このような結合は、MBB51Aタンパクの細胞外または細胞内ドメインに、あるいはこれら両型のドメインの組み合わせに組み込むことができる。MBB51A DNAへの免疫原性外来エピトープの組み込みは、当業者には公知の標準的組み換えDNA法によって達成される。これら方法の幾つかは、固有の制限サイト、インビトロ変移誘発および／またはPCR-関連法の利用を含む。このような便利な方法の一つは外来遺伝子が挿入された該MBB51A DNA中の位置1090における固有のNdeIサイトの使用を包含する。細胞表面上でのエピトープのグラフト化は該バクテリア細胞上に十分に露出した該エピトープによる迅速な抗体応答を誘発し、これは順にＢ細胞の直接的活性化に導く。更に、エピトープの細胞内局在化はＢ細胞記憶および有利なＴ細胞応答を誘発する。種々の病原体に対する免疫応答に関与することが知られている興味あるエピトープの例は、E.コリLTトキシン、脚および口腔疾患ウイルス、HIV、コレラトキシン等由来のエピトープを包含する。
かくして、該79kD抗原は種々の病原体に対する組み換えワクチンを設計する上で有用である。かかるワクチンは、マイコバクテリアの該79kD膜－関連タンパク全体またはその一部を発現し得る組み換えワクチンビークルを含み、該バクテリア中には細胞膜の外表面および／またはその内側に外来エピトープが発現されるように、該外来エピトープが組み込ま

れており、かくして該外来エピトープは免疫原性とされる。この目的で使用する該ワクチンビークルは、例えばBCGに対しては培養可能なマイコバクテリアであり得る。これら用途において、該BCGイオン－移動性ATPアーゼは、マイコバクテリアのシャトルベクター上に生じ、あるいはまた該免疫原性ポリペプチドの抗原性エピトープをコードする外来DNAは、該イオン－移動性ATPアーゼ遺伝子中への相同組み込みまたはランダム組み込みを介して、該マイコバクテリアゲノムに挿入することができる。このような方法は、対象とする細胞質の表面上および／またはその内部に抗原性配列を発現できる安定な組み換えマイコバクテリア菌株を生成し、これは例えば種々の感染性病原体に対する予防を可能とする。組み換え抗原の該細胞壁への攻撃は、マイコバクテリア細胞壁の高い免疫原性のためばかりか、HIV血清反応陽性の高い罹患率をもつ集団への生ワクチンの導入との関連から魅力あるものである。また、該MBB51Aタンパクに基いて、生ではない、免疫原性組み換え細胞表面サブユニットワクチンも、該生ワクチンの有用な代替品を開発することを可能とする。更に、他のバクテリア、ウイルスまたは原生動物ワクチンビークルを、かかる組み換えワクチンを生成するように形質転換できた。強力なワクチンビークルの例はワクシニアウイルス、ポックスウイルス、サルモネラ、エルシニア、ビブリオ、ボルデテラ、バチルス等を包含する。

更に、このような方法を利用して、異なる病原体の多数の予防性エピトープ／抗原の同時の発現を可能とする多価組み換えワクチンも設計できた。

等価物

当業者は、日常的な実験程度のものを利用して、本明細書に具体的に記載された特定の物質並びに成分に対する多くの等価物を認識し、もしくは確認できるであろう。かかる等価物は以下の請求の範囲内に含まれることを意図している。

配列表

(1)一般的情報

(i)出願人：マンシ，アニル（Munshi,Anil）；

カプール，アルカーナ（Kapoor,Archana）

(ii)発明の名称：マイコバクテリアの膜－関連免疫原

(iii)配列数：２

(iv)通信用住所

(A)宛名人：リチャードF.トレカルチン（Richard F.Trecartin）

(B)通り名：４エンバルカデロセンター，スート3400

(C)市名：サンフランシスコ

(D)州名：カリフォルニア

(E)国名：米国

(F)郵便番号：94111

(V)コンピュータ読み取り形式

(A)媒体型：フロッピーディスク

(B)コンピュータ：IBM PCコンパーチブル

(C)演算装置：PC-DOS/MS-DOS

(D)ソフトウエア：パテンチンリリース#1.0，バージョン#1.25

(vi)一般的出願データ

(A)出願番号：PCT/US/93/

(B)出願日：1993年、６月28日

(C)分類：

(viii)代理人情報

(A)名前：トレカルチンリチャードF.

(B)登録番号：31,801

(C)照会事件番号：FP-57004/RFT

(ix)電信情報

(A)電話番号：(415)781-1989

(B)ファックス番号：(415)398-3249
(2)SEQ ID NO:1に関する情報：
(i)配列の諸特徴
(A)長さ：3250bp
(B)型：核酸
(C)ストランド性：一本鎖
(D)トポロジー：線形
(ii)分子型：DNA（ゲノム）
(ix)特徴
(A)名称／キー：CDS
(B)位置：508・・・・・2790
(xi)配列の記載：SEQ ID NO:1

GGATCCCGCG GTCATCGATC GGGTCAAACA CCGCCTCGAC GGGTTCACGC TGGCGCCGCT
60
GTCCACCGCC GCGGGAGGTG GTGGCCGGCA GCCACGCATC TACTACGGCA CCATCCTGAC
120
CGGTGACCAA TACCTTCACT GCGAGCGCAC CCGCAACCGG CTGCACCACG AACTCGGCGG
180
TATGGCCGTC GAAATGGAAG GCGGTGCGGT GGCGCAAATC TGCGCGTCCT TCGATATCCC
240
ATGGCTGGTC ATTCGCGCGC TCTCCGATCT CGCCGGAGCC GATTCGGGGG TGGACTTCAA
300
TCGGTTTGTC GGCGAGGTGG CGGCCAGTTC GGCCCGCGTT CTGCTGCGCT TGCTGCCGGT
360
GTTGACGGCC TGTTGAAGAC GACTATCCGC CGGTGCGTTC ACCGCGTCAG GCGGCTTCGG
420
TGAGGTGAGT AATTTGGTCA TTAACTTGGT CATGCCGCCG CCGATGTTGA GCGGAGGCCA
480
CAGGTCGGCC GGAAGTGAGG AGCCACG ATG ACG GCG GCC GTG ACC GGT GAA
531
Met Thr Ala Ala Val Thr Gly Glu
1 5
CAC CAC GCG AGT GTG CAG CGG ATA CAA CTC AGA ATC AGC GGG ATG TCG
579
His His Ala Ser Val Gln Arg Ile Gln Leu Arg Ile Ser Gly Met Ser
10 15 20
TGC TCT GCG TGC GCC CAC CGT GTG GAA TCG ACC CTC AAC AAG CTG CCG
627
Cys Ser Ala Cys Ala His Arg Val Glu Ser Thr Leu Asn Lys Leu Pro
25 30 35 40

GGG GTT CGG GCA GCT GTG AAC TTC GGC ACC CGG GTG GCA ACC ATC GAC
675

Gly Val Arg Ala Ala Val Asn Phe Gly Thr Arg Val Ala Thr Ile Asp
45 50 55

ACC AGC GAG GCG GTC GAC GCT GCC GCG CTG TGC CAG GCG GTC CGC CGC
723

Thr Ser Glu Ala Val Asp Ala Ala Ala Leu Cys Gln Ala Val Arg Arg
60 65 70

GCG GGC TAT CAG GCC GAT CTG TGC ACG GAT GAC GGT CGG AGC GCG AGT
771

Ala Gly Tyr Gln Ala Asp Leu Cys Thr Asp Asp Gly Arg Ser Ala Ser
75 80 85

GAT CCG GAC GCC GAC CAC GCT CGA CAG CTG CTG ATC CGG CTA GCG ATC
819

Asp Pro Asp Ala Asp His Ala Arg Gln Leu Leu Ile Arg Leu Ala Ile
90 95 100

GCC GCC GTG CTG TTT GTG CCC GTG GCC GAT CTG TCG GTG ATG TTT GGG
867

Ala Ala Val Leu Phe Val Pro Val Ala Asp Leu Ser Val Met Phe Gly
105 110 115 120

GTC GTG CCT GCC ACG CGC TTC ACC GGC TGG CAG TGG GTG CTA AGC GCG
915

Val Val Pro Ala Thr Arg Phe Thr Gly Trp Gln Trp Val Leu Ser Ala
125 130 135

CTG GCA CTG CCG GTC GTG ACC TGG GCG GCG TGG CCG TTT CAC CGC GTT
963

Leu Ala Leu Pro Val Val Thr Trp Ala Ala Trp Pro Phe His Arg Val
140 145 150

GCG ATG CGC AAC GCC CGC CAC CAC GCC GCC TCC ATG GAG ACG CTA ATC

1011

Ala Met Arg Asn Ala Arg His His Ala Ala Ser Met Glu Thr Leu Ile

155 160 165

TCG GTC GGT ATC ACG GCC GCC ACG ATC TGG TCG CTG TAC ACC GTC TTC

1059

Ser Val Gly Ile Thr Ala Ala Thr Ile Trp Ser Leu Tyr Thr Val Phe

170 175 180

GGC AAT CAC TCG CCC ATC GAG CGC AGC GGC ATA TGG CAG GCG CTG CTG

1107

Gly Asn His Ser Pro Ile Glu Arg Ser Gly Ile Trp Gln Ala Leu Leu

185 190 195 200

GGA AGC GAT GCT ATT TAT TTC GAG GTC GCG GCG GGT GTC ACG GTG TTC

1155

Gly Ser Asp Ala Ile Tyr Phe Glu Val Ala Ala Gly Val Thr Val Phe

205 210 215

GTG CTG GTG GGG CGG TAT TTC GAG GCG CGC GCC AAG TCG CAG GCG GGC

1203

Val Leu Val Gly Arg Tyr Phe Glu Ala Arg Ala Lys Ser Gln Ala Gly

220 225 230

AGT GCG CTG AGA GCC TTG GCG GCG CTG AGC GCC AAG GAA GTA GCC GTC

1251

Ser Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ala Leu Ser Ala Lys Glu Val Ala Val

235 240 245

CTG CTA CCG GAT GGG TCG GAG ATG GTC ATC CCG GCC GAC GAA CTC AAA

1299

Leu Leu Pro Asp Gly Ser Glu Met Val Ile Pro Ala Asp Glu Leu Lys

250 255 260

GAA CAG CAG CGC TTC GTG GTG CGT CCA GGG CAG ATA GTT GCC GCC GAC

1347

Glu Gln Gln Arg Phe Val Val Arg Pro Gly Gln Ile Val Ala Ala Asp
265 270 275 280
GGC CTC GCC GTC GAC GGG TCC GCT GCG GTC GAC ATG AGC GCG ATG ACC
1395
Gly Leu Ala Val Asp Gly Ser Ala Ala Val Asp Met Ser Ala Met Thr
285 290 295
GGC GAG GCC AAA CCG ACC CGG GTG CGT CCG GGG GGG CAG GTC ATC GGC
1443
Gly Glu Ala Lys Pro Thr Arg Val Arg Pro Gly Gly Gln Val Ile Gly
300 305 310
GGC ACC ACA GTG CTT GAC GGC CGG CTG ATC GTG GAG GCG GCC GCG GTG
1491
Gly Thr Thr Val Leu Asp Gly Arg Leu Ile Val Glu Ala Ala Ala Val
315 320 325
GGC GCC GAC ACC CAG TTC GCC GGA ATG GTC CGC CTC GTT GAG CAA GCG
1539
Gly Ala Asp Thr Gln Phe Ala Gly Met Val Arg Leu Val Glu Gln Ala
330 335 340
CAG GCG CAA AAG GCC GAC GCA CAG CGA CTA GCC GAC CGG ATC TCC TCG
1587
Gln Ala Gln Lys Ala Asp Ala Gln Arg Leu Ala Asp Arg Ile Ser Ser
345 350 355 360
GTG TTT GTT CCC GCT GTG TTG GTT ATC GCG GCA CTA ACC GCA GCC GGA
1635
Val Phe Val Pro Ala Val Leu Val Ile Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly
365 370 375
TGG CTA ATC GCC GGG GGA CAA CCC GAC CGT GCC GTC TCG GCC GCA CTC
1683
Trp Leu Ile Ala Gly Gly Gln Pro Asp Arg Ala Val Ser Ala Ala Leu

380 385 390

GCC GTG CTT GTC ATC GCC TGC CCG TGT GCC CTG GGG CTG GCG ACT CCG

1731

Ala Val Leu Val Ile Ala Cys Pro Cys Ala Leu Gly Leu Ala Thr Pro

395 400 405

ACC GCG ATG ATG GTG GCC TCT GGT CGC GGT GCC CAG CTC GGA ATA TTT

1779

Thr Ala Met Met Val Ala Ser Gly Arg Gly Ala Gln Leu Gly Ile Phe

410 415 420

CTG AAG GGC TAC AAA TCG TTG GAG GCC ACC CGC GCG GTG GAC ACC GTC

1827

Leu Lys Gly Tyr Lys Ser Leu Glu Ala Thr Arg Ala Val Asp Thr Val

425 430 435 440

GTC TTC GAC AAG ACC GGC ACC CTG ACG ACG GGC CGG CTG CAG GTC AGT

1875

Val Phe Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Thr Gly Arg Leu Gln Val Ser

445 450 455

GCG GTG ACC GCG GCA CCG GGC TGG GAG GCC GAC CAG GTG CTC GCC TTG

1923

Ala Val Thr Ala Ala Pro Gly Trp Glu Ala Asp Gln Val Leu Ala Leu

460 465 470

GCC GCG ACC GTG GAA GCC GCG TCC GAG CAC TCG GTG GCG CTC GCG ATC

1971

Ala Ala Thr Val Glu Ala Ala Ser Glu His Ser Val Ala Leu Ala Ile

475 480 485

GCC GCG GCA ACG ACT CGG CGA GAC GCG GTC ACC GAC TTT CGC GCC ATA

2019

Ala Ala Ala Thr Thr Arg Arg Asp Ala Val Thr Asp Phe Arg Ala Ile

490 495 500

CCC GGC CGC GGC GTC AGC GGC ACC GTG TCC GGG CGG GCG GTA CGG GTG

2067

Pro Gly Arg Gly Val Ser Gly Thr Val Ser Gly Arg Ala Val Arg Val

505 510 515 520

GGC AAA CCG TCA TGG ATC GGG TCC TCG TCG TGC CAC CCC AAC ATG CGC

2115

Gly Lys Pro Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ser Cys His Pro Asn Met Arg

525 530 535

GCG GCC CGG CGC CAC GCC GAA TCG CTG GGT GAG ACG GCC GTA TTC GTC

2163

Ala Ala Arg Arg His Ala Glu Ser Leu Gly Glu Thr Ala Val Phe Val

540 545 550

GAG GTC GAC GGC GAA CCA TGC GGG GTC ATC GCG GTC GCC GAC GCC GTC

2211

Glu Val Asp Gly Glu Pro Cys Gly Val Ile Ala Val Ala Asp Ala Val

555 560 565

AAG GAC TCG GCG CGA GAC GCC GTG GCC GCC CTG GCC GAT CGT GGT CTG

2259

Lys Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Ala Ala Leu Ala Asp Arg Gly Leu

570 575 580

CGC ACC ATG CTG TTG ACC GGT GAC AAT CCC GAA TCG GCG GCG GCC GTG

2307

Arg Thr Met Leu Leu Thr Gly Asp Asn Pro Glu Ser Ala Ala Ala Val

585 590 595 600

GCT ACT CGC GTC GGC ATC GAC GAG GTG ATC GCC GAC ATC CTG CCG GAA

2355

Ala Thr Arg Val Gly Ile Asp Glu Val Ile Ala Asp Ile Leu Pro Glu

605 610 615

GGC AAG GTC GAT GTC ATC GAG CAG CTA CGC GAC CGC GGA CAT GTC GTC

2403

Gly Lys Val Asp Val Ile Glu Gln Leu Arg Asp Arg Gly His Val Val
620 625 630

GCC ATG GTC GGT GAC GGC ATC AAC GAC GGA CCC GCA CTG GCC CGT GCC

2451

Ala Met Val Gly Asp Gly Ile Asn Asp Gly Pro Ala Leu Ala Arg Ala
635 640 645

GAT CTA GGC ATG GCC ATC GGG CGC GGC ACG GAC GTC GCG ATC GGT GCC

2499

Asp Leu Gly Met Ala Ile Gly Arg Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala
650 655 660

GCC GAC ATC ATC TTG GTC CGC GAC CAC CTC GAC GTT GTA CCC CTT GCG

2547

Ala Asp Ile Ile Leu Val Arg Asp His Leu Asp Val Val Pro Leu Ala
665 670 675 680

CTT GAC CTG GCA AGG GCC ACG ATG CGC ACC GTC AAA CTC AAC ATG GTC

2595

Leu Asp Leu Ala Arg Ala Thr Met Arg Thr Val Lys Leu Asn Met Val
685 690 695

TGG GCA TTC GGA TAC AAC ATC GCC GCG ATT CCC GTC GCC GCT GCC GGA

2643

Trp Ala Phe Gly Tyr Asn Ile Ala Ala Ile Pro Val Ala Ala Ala Gly
700 705 710

CTG CTC AAC CCC CTG GTG GCC GGT GCG GCC ATG GCG TTC TCA TCG TTC

2691

Leu Leu Asn Pro Leu Val Ala Gly Ala Ala Met Ala Phe Ser Ser Phe
715 720 725

TTC GTG GTC TCA AAC AGC TTG CGG TTG CGC AAA TTT GGG CGA TAC CCG

2739

Phe Val Val Ser Asn Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Gly Arg Tyr Pro
730 735 740

CTA GGC TGC GGA ACC GTC GGT GGG CCA CAA ATG ACC GCG CCG TCG TCC
2787

Leu Gly Cys Gly Thr Val Gly Gly Pro Gln Met Thr Ala Pro Ser Ser
745 750 755 760

GCG TGATGCGTTG TCGGGCAACA CGATATCGGG CTCAGCGGCG ACCGCATCCG
2840

Ala

GTCTCGGCCG AGGACCAGAG GCGCTTCGCC ACACCATGAT TGCCAGGACC GCGCCGATCA
2900

CCACCGGCAG ATGAGTCAAA ATCCGCGTGG TGCTGACCGC GCCGGACAGC GCATCCACAA
2960

TCACATAGCC GGTCAGTATG GCGACGAACG CCGTCAGAAC ACCGGCCAGG CCGGCGGCGG
3020

CGCTCGGCCA TAGCGCCGCG CCCACCATGA TCACACCGAG CGCAATCGAC CACGACGTGA
3080

CTCGTTGAGC AAGTGGGTGC CGGCACCCGT CGGGTGCTGA TGGGTCAGGC CGACGTCTAG
3140

GCCAAACCCC TGCACGGTGC CCAGGGCGAT CTGCGCGATG CCCACGCACA GCAACGCCCA
3200

ACGTCGCCAG GTCATCGGTG AATGTTGCCG CCGCGGCGCC CGGCGGATCC
3250

(2)SEQ ID NO:2に関する情報：
(i)配列の諸特徴
(A)長さ：761アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：線形
(ii)分子型：タンパク質
(xi)配列の記載：SEQ ID NO:2

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

210 215 220

Ala Arg Ala Lys Ser Gln Ala Gly Ser Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ala
225 230 235 240

Leu Ser Ala Lys Glu Val Ala Val Leu Leu Pro Asp Gly Ser Glu Met
245 250 255

Val Ile Pro Ala Asp Glu Leu Lys Glu Gln Gln Arg Phe Val Val Arg
260 265 270

Pro Gly Gln Ile Val Ala Ala Asp Gly Leu Ala Val Asp Gly Ser Ala
275 280 285

Ala Val Asp Met Ser Ala Met Thr Gly Glu Ala Lys Pro Thr Arg Val
290 295 300

Arg Pro Gly Gly Gln Val Ile Gly Gly Thr Thr Val Leu Asp Gly Arg
305 310 315 320

Leu Ile Val Glu Ala Ala Ala Val Gly Ala Asp Thr Gln Phe Ala Gly
325 330 335

Met Val Arg Leu Val Glu Gln Ala Gln Ala Gln Lys Ala Asp Ala Gln
340 345 350

Arg Leu Ala Asp Arg Ile Ser Ser Val Phe Val Pro Ala Val Leu Val
355 360 365

Ile Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Trp Leu Ile Ala Gly Gly Gln Pro
370 375 380

Asp Arg Ala Val Ser Ala Ala Leu Ala Val Leu Val Ile Ala Cys Pro
385 390 395 400

Cys Ala Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala Met Met Val Ala Ser Gly
405 410 415

Arg Gly Ala Gln Leu Gly Ile Phe Leu Lys Gly Tyr Lys Ser Leu Glu
420 425 430

Ala Thr Arg Ala Val Asp Thr Val Val Phe Asp Lys Thr Gly Thr Leu
435 440 445

Thr Thr Gly Arg Leu Gln Val Ser Ala Val Thr Ala Ala Pro Gly Trp
450 455 460
Glu Ala Asp Gln Val Leu Ala Leu Ala Ala Thr Val Glu Ala Ala Ser
465 470 475 480
Glu His Ser Val Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Thr Thr Arg Arg Asp
485 490 495
Ala Val Thr Asp Phe Arg Ala Ile Pro Gly Arg Gly Val Ser Gly Thr
500 505 510
Val Ser Gly Arg Ala Val Arg Val Gly Lys Pro Ser Trp Ile Gly Ser
515 520 525
Ser Ser Cys His Pro Asn Met Arg Ala Ala Arg Arg His Ala Glu Ser
530 535 540
Leu Gly Glu Thr Ala Val Phe Val Glu Val Asp Gly Glu Pro Cys Gly
545 550 555 560
Val Ile Ala Val Ala Asp Ala Val Lys Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val
565 570 575
Ala Ala Leu Ala Asp Arg Gly Leu Arg Thr Met Leu Leu Thr Gly Asp
580 585 590
Asn Pro Glu Ser Ala Ala Ala Val Ala Thr Arg Val Gly Ile Asp Glu
595 600 605
Val Ile Ala Asp Ile Leu Pro Glu Gly Lys Val Asp Val Ile Glu Gln
610 615 620
Leu Arg Asp Arg Gly His Val Val Ala Met Val Gly Asp Gly Ile Asn
625 630 635 640
Asp Gly Pro Ala Leu Ala Arg Ala Asp Leu Gly Met Ala Ile Gly Arg
645 650 655
Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Ala Asp Ile Ile Leu Val Arg Asp
660 665 670
His Leu Asp Val Val Pro Leu Ala Leu Asp Leu Ala Arg Ala Thr Met

675 680 685

Arg Thr Val Lys Leu Asn Met Val Trp Ala Phe Gly Tyr Asn Ile Ala

690 695 700

Ala Ile Pro Val Ala Ala Ala Gly Leu Leu Asn Pro Leu Val Ala Gly

705 710 715 720

Ala Ala Met Ala Phe Ser Ser Phe Phe Val Val Ser Asn Ser Leu Arg

725 730 735

Leu Arg Lys Phe Gly Arg Tyr Pro Leu Gly Cys Gly Thr Val Gly Gly

740 745 750

Pro Gln Met Thr Ala Pro Ser Ser Ala

755 760

【図１Ａ】

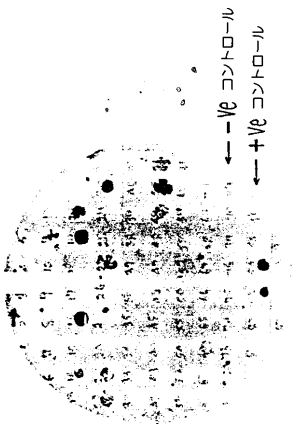


Fig. 1A

【図１Ｂ】

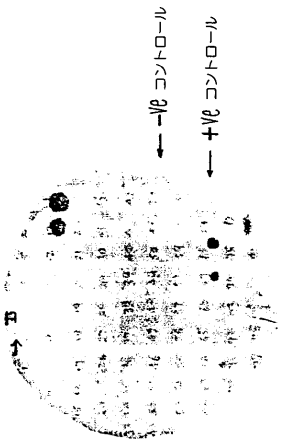


Fig. 1B

【図２Ａ】

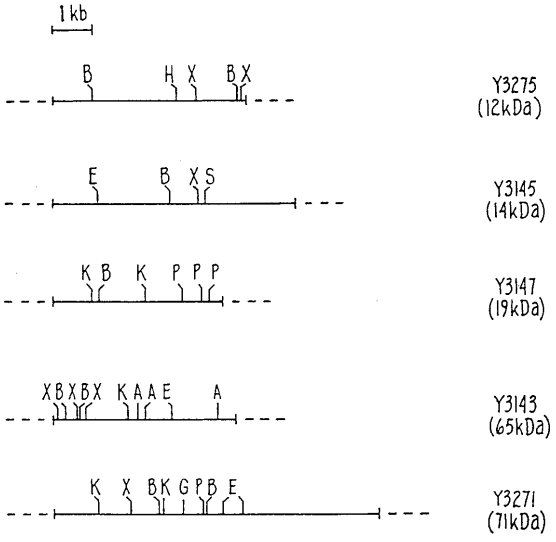


Fig. 2A

【図２Ｂ】

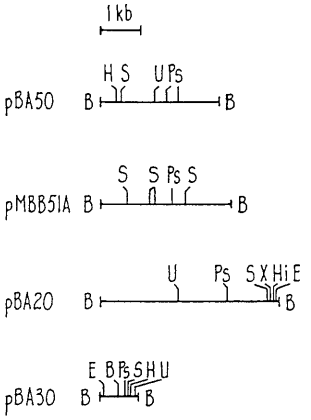


Fig. 2B

【図３Ａ】

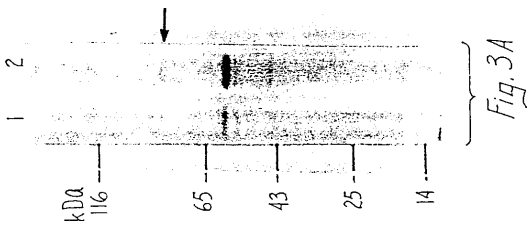


Fig. 3A

【図３Ｂ】

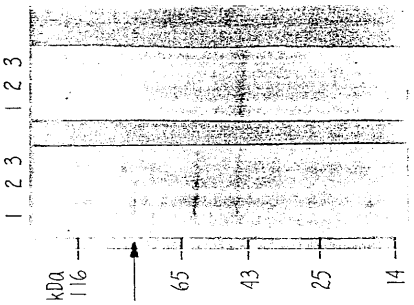


Fig. 3B Fig. 3C

【図３Ｃ】

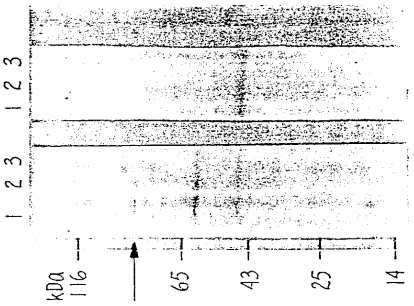


Fig. 3B Fig. 3C

【図４Ａ】

Fig. 4A

```
GGATCCCGCGGTCATCGATCGGTCAAACACCGCCTCGACGGTTCACGCTGGCGCCGCTGTCCACCGCCGCGGAGGTG
GTGGCCGGCAGCCACGCATCTACTACTACGGCACCATCCTGACCGGTGACCAGACTTCTCACTGCGAGCGCACCCGCAACCGG
CTGCACCACGAACTCGGCGTATGGCCGTCGAAATGGAAGGCGGTCGGCGTCCTTCGATATCCC
ATGGCTGGTCATTCGCGCCCTCTCCGATCTCCCCGGAGCCGATTCGGGGGTGGACTTCAATCGGTTTGTCGGCGAGGTGG

CGGCCAGTTCGGCCCCGCGTTCTGCTGCGCTTGCTGCCGGTGTTGACGGCCTGTTGAAGACGACTATCCGCCGGTGCGTTC

ACCGCGTCAGGCGGCTTCGGTGAGGTGAGTAATTTGGTCATTAACTTGGTCATGCCGCCGCCGATGTTGAGCGGAGGCCA

                                                    5/D                 508
CAGGTCGGCCGGAAGTGAGGAGCCACG ATG ACG GCG GCC GTG ACC GGT GAA CAC CAC GCG AGT GTG
                             MET Thr Ala Ala Val Thr Gly Glu His His Ala Ser Val
                              1                                                  
                                                                                 550
CAG CGG ATA CAA CTC AGA ATC AGC GGG ATG TCG TGC TCT GCG TGC GCC CAC CGT GTG GAA
Gln Arg Ile Gln Leu Arg Ile Ser Gly MET Ser Cys Ser Ala Cys Ala His Arg Val Glu
                    20                                                  600
TCG ACC CTC AAC AAG CTG CCG GGG GTT CGG GCA GCT GTG AAC TTC GGC ACC CGG GTG GCA
Ser Thr Leu Asn Lys Leu Pro Gly Val Arg Ala Ala Val Asn Phe Gly Thr Arg Val Ala
                    40                                  650
ACC ATC GAC ACC AGC GAG GCG GTC GAC GCT GCC GCG CTG TGC CAG GCG GTC CGC CGC GCG
Thr Ile Asp Thr Ser Glu Ala Val Asp Ala Ala Ala Leu Cys Gln Ala Val Arg Arg Ala
                    60                                  700
GGC TAT CAG GCC GAT CTG TGC ACG GAT GAC GGT CGG AGC GCG AGT GAT CCG GAC GCC GAC
Gly Tyr Gln Ala Asp Leu Cys Thr Asp Asp Gly Arg Ser Ala Ser Asp Pro Asp Ala Asp
                    80                                  750
CAC GCT CGA CAG CTG CTG ATC CGG CTA GCG ATC GCC GTG CTG TTT GTG CCC GTG GCC
His Ala Arg Gln Leu Leu Ile Arg Leu Ala Ile Ala Val Leu Phe Val Pro Val Ala
                   100
```

【図４Ｂ】

Fig. 4B

```
                                                                    850
GAT CTG TCG GTG ATG TTT GGG GTC GTG CCT GCC ACG CGC TTC ACC GGC TGG CAG TGG GTG
Asp Leu Ser Val MET Phe Gly Val Val Pro Ala Thr Arg Phe Thr Gly Trp Gln Trp Val
                   120                                  900
CTA AGC GCG CTG GCA CTG CCG GTC GTG ACC TGG GCG GCG TGG CCG TTT CAC CGC GTT GCG
Leu Ser Ala Leu Ala Leu Pro Val Val Thr Trp Ala Ala Trp Pro Phe His Arg Val Ala
                   140                                  950
ATG CGC AAC GCC CGC CAC CAC GCC GCC TCC ATG GAG ACG CTA ATC TCG GTC GGT ATC ACG
MET Arg Asn Ala Arg His His Ala Ala Ser MET Glu Thr Leu Ile Ser Val Gly Ile Thr
                   160                                 1000
GCC GCC ACG ATC TGG TCG CTG TAC ACC GTC TTC GGC AAT CAC TCG CCC ATC GAG CGC AGC
Ala Ala Thr Ile Trp Ser Leu Tyr Thr Val Phe Gly Asn His Ser Pro Ile Glu Arg Ser
                   180                                 1050
GGC ATA TGG CAG GCG CTG CTG GGA AGC GAT GCT ATT TAT TTC GAG GTC GCG GCG GGT GTC
Gly Ile Trp Gln Ala Leu Leu Gly Ser Asp Ala Ile Tyr Phe Glu Val Ala Ala Gly Val
                   200                                 1100
ACG GTG TTC GTG CTG GTG GGG CGG TAT TTC GAG GCG CGC GCC AAG TCG CAG GCG GGC AGT
Thr Val Phe Val Leu Val Gly Arg Tyr Phe Glu Ala Arg Ala Lys Ser Gln Ala Gly Ser
                   220                                 1150
GCG CTG AGA GCC TTG GCG GCG CTG AGC GCC AAG GAA GTA GCC GTC CTG CTA CCG GAT GGG
Ala Leu Arg Ala Leu Ala Ala Leu Ser Ala Lys Glu Val Ala Val Leu Leu Pro Asp Gly
                   240                                 1200
TCG GAG ATG GTC ATC CCG GCC GAC GAA CTC AAA GAA CAG CGC TTC GTG GTG CGT CCA
Ser Glu MET Val Ile Pro Ala Asp Glu Leu Lys Glu Gln Arg Phe Val Val Arg Pro
                   260                                 1250
GGG CAG ATA GTT GCC GCC GAC GGC CTC GTC GAC GGG TCC GCT GCG GTC GAC ATG AGC
Gly Gln Ile Val Ala Ala Asp Gly Leu Val Asp Gly Ser Ala Ala Val Asp MET Ser
                   280                                 1300
```

【図４Ｅ】

Fig.4E

```
                                                    2500
ATC GGG CGC GGC ACG GAC GTC GCG ATC GGT GCC GCC GAC ATC ATC TTG GTC CGC GAC CAC
Ile Gly Arg Gly Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Ala Asp Ile Ile Leu Val Arg Asp His
                                660
                                                2550
CTC GAC GTT GTA CCC CTT GCG CTT GAC CTG GCA AGG GCC ACG ATG CGC ACC GTC AAA CTC
Leu Asp Val Val Pro Leu Ala Leu Asp Leu Ala Arg Ala Thr MET Arg Thr Val Lys Leu
                                680
                        2600
AAC ATG GTC TGG GCA TTC GGA TAC AAC ATC GCC GCG ATT CCC GTC GCC GCT GCC GGA CTG
Asn MET Val Trp Ala Phe Gly Tyr Asn Ile Ala Ala Ile Pro Val Ala Ala Ala Gly Leu
                                700
        2650                                                            2700
CTC AAC CCC CTG GTG GCC GGT GCG GCC ATG GCG TTC TCA TCG TTC TTC GTG GTC TCA AAC
Leu Asn Pro Leu Val Ala Gly Ala Ala MET Ala Phe Ser Ser Phe Phe Val Val Ser Asn
                                720
                                                        2750
AGC TTG CGG TTG CGC AAA TTT GGG CGA TAC CCG CTA GGC TGC GGA ACC GTC GGT GGG CCA
Ser Leu Arg Leu Arg Lys Phe Gly Arg Tyr Pro Leu Gly Cys Gly Thr Val Gly Gly Pro
                                740

CAA ATG ACC GCG CCG TCG TCC GCG TGA TGCGTTGTCGGGCAACACGATATCGGGCTCAGCGGCGACCGCA
Gln MET Thr Ala Pro Ser Ser Ala TER
                                761

TCCGGTCTCGGCCGAGGACCAGAGGCGCTTCGCCACACCATGATTGCCAGGACCGCGCCGATCACCACCGGCAGATGAGT
CAAAATCCGCGTGGTGCTGACCGCGCCGGACAGCGCATCCACAATCACATAGCCGGTCAGTATGGCGACGAACGCCGTCA
GAACACCGGCCAGGCCGGCGGCGGCGCTCGGCCATAGCGCCGCGCCCACCATGATCACACCGAGCGCAATCGACCACGAC
GTGACTCGTTGAGCAAGTGGGTGCCGGCACCCGTCGGGTGCTGATGGGTCAGGCCGACGTCTAGGCCAAACCCCTGCACG
GTGCCCAGGGCGATCTGCGCGATGCCCACGCACAGCAACGCCCAACGTCGCCAGGTCATCGGTGAATGTTGCCGCCGCGG
          3250
CGCCCGGCGGATCC
```

【図４Ｃ】

Fig.4C

```
                                1400
GCG ATG ACC GGC GAG GCC AAA CCG ACC CGG GTG CGT CCG GGG GGG CAG GTC ATC GGC GGC
Ala MET Thr Gly Glu Ala Lys Pro Thr Arg Val Arg Pro Gly Gly Gln Val Ile Gly Gly
                                300
 1450                                                           1500
ACC ACA GTG CTT GAC GGC CGG CTG ATC GTG GAG GCG GCC GCG GTG GGC GCC GAC ACC CAG
Thr Thr Val Leu Asp Gly Arg Leu Ile Val Glu Ala Ala Ala Val Gly Ala Asp Thr Gln
                                320
                                                        1550
TTC GCC GGA ATG GTC CGC CTC GTT GAG CAA GCG CAG GCG CAA AAG GCC GAC GCA CAG CGA
Phe Ala Gly MET Val Arg Leu Val Glu Gln Ala Gln Ala Gln Lys Ala Asp Ala Gln Arg
                                340
                                        1600
CTA GCC GAC CGG ATC TCC TCG GTG TTT GTT CCC GCT GTG TTG GTT ATC GCG GCA CTA ACC
Leu Ala Asp Arg Ile Ser Ser Val Phe Val Pro Ala Val Leu Val Ile Ala Ala Leu Thr
                                360
                                1650
GCA GCC GGA TGG CTA ATC GCC GGG GGA CAA CCC GAC CGT GCC GTC TCG GCC GCA CTC GCC
Ala Ala Gly Trp Leu Ile Ala Gly Gly Gln Pro Asp Arg Ala Val Ser Ala Ala Leu Ala
                                380
                        1700
GTG CTT GTC ATC GCC TGC CCG TGT GCC CTG GGG CTG GCG ACT CCG ACC GCG ATG ATG GTG
Val Leu Val Ile Ala Cys Pro Cys Ala Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala MET MET Val
                                400
 1750                                                           1800
GCC TCT GGT CGC GGT GCC CAG CTC GGA ATA TTT CTG AAG GGC TAC AAA TCG TTG GAG GCC
Ala Ser Gly Arg Gly Ala Gln Leu Gly Ile Phe Leu Lys Gly Tyr Lys Ser Leu Glu Ala
                                420
                                                1850
ACC CGC GCG GTG GAC ACC GTC GTC TTC GAC AAG ACC GGC ACC CTG ACG ACG GGC CGG CTG
Thr Arg Ala Val Asp Thr Val Val Phe Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Thr Gly Arg Leu
                                440
                        1900
CAG GTC AGT GCG GTG ACC GCG GCA CCG GGC TGG GAG GCC GAC CAG GTG CTC GCC TTG GCC
Gln Val Ser Ala Val Thr Ala Ala Pro Gly Trp Glu Ala Asp Gln Val Leu Ala Leu Ala
                                460
```

【図４Ｄ】

Fig.4D

```
                                1950
GCG ACC GTG GAA GCC GCG TCC GAG CAC TCG GTG GCG CTC GCG ATC GCC GCG GCA ACG ACT
Ala Thr Val Glu Ala Ala Ser Glu His Ser Val Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Thr Thr
                                480
                        2000
CGG CGA GAC GCG GTC ACC GAC TTT CGC GCC ATA CCC GGC CGC GGC GTC AGC GGC ACC GTG
Arg Arg Asp Ala Val Thr Asp Phe Arg Ala Ile Pro Gly Arg Gly Val Ser Gly Thr Val
                                500
 2050                                                           2100
TCC GGG CGG GCG GTA CGG GTG GGC AAA CCG TCA TGG ATC GGG TCC TCG TCG TGC CAC CCC
Ser Gly Arg Ala Val Arg Val Gly Lys Pro Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ser Cys His Pro
                                520
                                                2150
AAC ATG CGC GCG GCC CGG CGC CAC GCC GAA TCG CTG GGT GAG ACG GCC GTA TTC GTC GAG
Asn MET Arg Ala Ala Arg Arg His Ala Glu Ser Leu Gly Glu Thr Ala Val Phe Val Glu
                                540
                        2200
GTC GAC GGC GAA CCA TGC GGG GTC ATC GCG GTC GCC GAC GCC GTC AAG GAC TCG GCG CGA
Val Asp Gly Glu Pro Cys Gly Val Ile Ala Val Ala Asp Ala Val Lys Asp Ser Ala Arg
                                560
                        2250
GAC GCC GTG GCC GCC CTG GCC GAT CGT GGT CTG CGC ACC ATG CTG TTG ACC GGT GAC AAT
Asp Ala Val Ala Ala Leu Ala Asp Arg Gly Leu Arg Thr MET Leu Leu Thr Gly Asp Asn
                                580
                2300
CCC GAA TCG GCG GCG GCC GTG GCT ACT CGC GTC GGC ATC GAC GAG GTG ATC GCC GAC ATC
Pro Glu Ser Ala Ala Ala Val Ala Thr Arg Val Gly Ile Asp Glu Val Ile Ala Asp Ile
                                600
 2350                                                           2400
CTG CCG GAA GGC AAG GTC GAT GTC ATC GAG CAG CTA CGC GAC CGC GGA CAT GTC GTC GCC
Leu Pro Glu Gly Lys Val Asp Val Ile Glu Gln Leu Arg Asp Arg Gly His Val Val Ala
                                620
                                                2450
ATG GTC GGT GAC GGC ATC AAC GAC GGA CCC GCA CTG GCC CGT GCC GAT CTA GGC ATG GCC
MET Val Gly Asp Gly Ile Asn Asp Gly Pro Ala Leu Ala Arg Ala Asp Leu Gly MET Ala
                                640
```

【図５】

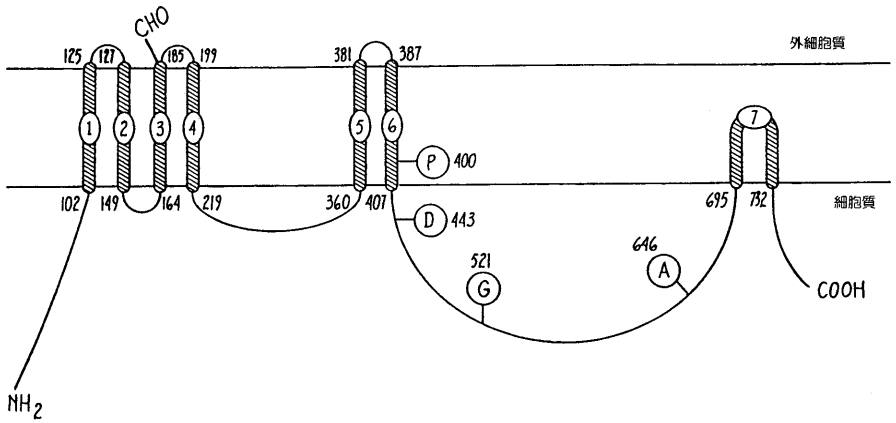


Fig. 5

【図６Ａ】

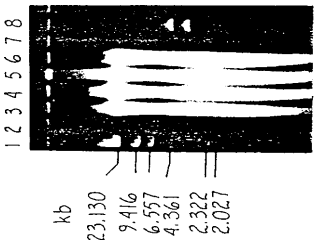


Fig. 6A

【図６Ｂ】

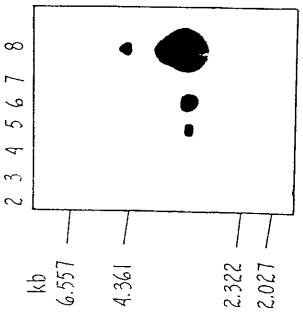


Fig. 6B

フロントページの続き

(74)代理人 100067013
弁理士 大塚 文昭
(74)代理人 100065189
弁理士 宍戸 嘉一
(74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
(72)発明者 カプール アルチャナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２２ サン ディエゴ リージェンツ ロード ８３２８ アパートメント ３ビー
(72)発明者 ムンシ アニル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２２ サン ディエゴ リージェンツ ロード ８３２８ アパートメント ３ビー

合議体
審判長 種村 慈樹
審判官 鈴木 恵理子
審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第８８／２０２７（WO, A1）
Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ（１９８５）Ｖｏｌ. ８２, ｐ. ２５８３－２５８７
Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９９０）Ｖｏｌ. ２８, Ｎｏ. ３, ｐ. ５９１－５９５