

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4219987号

(P4219987)

(45) 発行日 平成21年2月4日(2009.2.4)

(24) 登録日 平成20年11月21日(2008.11.21)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	15/00	<b>Z N A A</b>
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/195</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	14/195	
<b>C 0 7 K</b>	<b>16/12</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	16/12	
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/42</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	39/42	
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	37/04	

請求項の数 23 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-514499  
 (86) (22) 出願日 平成9年9月12日(1997.9.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP1997/003222  
 (87) 国際公開番号 W01998/012331  
 (87) 国際公開日 平成10年3月26日(1998.3.26)  
 審査請求日 平成16年3月9日(2004.3.9)  
 (31) 優先権主張番号 特願平8-271408  
 (32) 優先日 平成8年9月19日(1996.9.19)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM P-15836  
 微生物の受託番号 FERM P-15837

(73) 特許権者  
 財団法人化学及血清療法研究所  
 熊本県熊本市大窪1丁目6番1号  
 (74) 代理人  
 弁理士 青山 稔  
 (74) 代理人  
 弁理士 田村 恭生  
 (72) 発明者 徳永 英治  
 熊本県熊本市池田1丁目35番3-607号  
 (72) 発明者 坂口 正士  
 熊本県熊本市八景水谷3丁目6番89-1号  
 (72) 発明者 松尾 和夫  
 熊本県熊本市高平1丁目22-2  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモフィルス・パラガリナルム由来新規ポリペプチド及びその製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。

【請求項2】

配列表の配列番号：1で示される塩基配列の1番目から3450番目の塩基配列からなるDNAによりコードされることを特徴とするポリペプチド。

【請求項3】

配列表の配列番号：1で示される塩基配列の2212番目から6275番目の塩基配列からなるDNAによりコードされることを特徴とするポリペプチド。

【請求項4】

配列表の配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの一部であって、N末端のアミノ酸配列がアミノ酸配列の1番目から始まり、分子量が130kDaであるポリペプチド。

【請求項5】

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来のポリペプチドであって、赤血球凝集抑制抗体を誘導し及び/又は鶏伝染性コリ－ザを阻止する、請求項1ないし4のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項6】

請求項5に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、付加、あるいは置換されたアミノ酸配列からなり、赤血球凝集抑制抗体を誘導し及び/

10

20

又は鶏伝染性コリーザを阻止することを特徴とするポリペプチド。

【請求項 7】

該ポリペプチドが遺伝子組換え技術により得られる組換え型ポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする塩基配列からなることを特徴とする DNA。

【請求項 9】

配列表の配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA。

【請求項 10】

配列表の配列番号：1 に記載の塩基配列に相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、該 DNA によってコードされるポリペプチドが赤血球凝集抑制抗体を誘導し及び / 又は鶏伝染性コリーザを阻止することを特徴とする DNA。

【請求項 11】

配列表の配列番号：1 で示される塩基配列の 2 2 1 2 番目から 6 2 7 5 番目の塩基配列からなる DNA 断片 (HPG 4 . 1 k DNA 断片) 又は配列表の配列番号：1 で示される塩基配列の 1 番目から 3 4 5 0 番目の塩基配列からなる DNA 断片 (HPG 3 . 5 k DNA 断片) である、請求項 10 に記載の DNA。

【請求項 12】

請求項 8 ないし 11 のいずれかに記載の DNA を含むことを特徴とする組換え DNA 分子。

【請求項 13】

組換え DNA 分子のベクターがプラスミド、ウイルスベクター及びコスミドよりなる群から選ばれる請求項 12 に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 14】

請求項 8 ないし 11 のいずれかに記載の DNA 又は請求項 12 もしくは 13 に記載の組換え DNA 分子で形質転換した形質転換体。

【請求項 15】

形質転換体が、細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞及び植物細胞よりなる群から選ばれる宿主である請求項 14 に記載の形質転換体。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のポリペプチドを認識することを特徴とする抗体。

【請求項 17】

モノクローナル抗体である請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 18】

ポリクローナル抗体である請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 19】

請求項 14 もしくは 15 に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体に請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のポリペプチドを産生させ、ついで該ポリペプチドを精製することを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 20】

請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のポリペプチドを主成分とする鶏伝染性コリーザのワクチン。

【請求項 21】

請求項 14 もしくは 15 に記載の形質転換体を主成分とする鶏伝染性コリーザのワクチン。

【請求項 22】

請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載のポリペプチド、請求項 8 ないし 11 のいずれかに記載の DNA、請求項 12 もしくは 13 に記載の組換え DNA 分子、請求項 14 もしくは 1

10

20

30

40

50

5に記載の形質転換体又は請求項16ないし18のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とするヘモフィルス・パラガリナルムの検出方法。

【請求項23】

請求項1ないし7のいずれかに記載のポリペプチド、請求項14もしくは15に記載の形質転換体又は請求項16ないし18のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とするヘモフィルス・パラガリナルムに対する抗体の検出方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は鶏伝染性コリーザを阻止するポリペプチドに関する。さらに詳細には、鶏伝染性コリーザを引き起こす因子であるヘモフィルス・パラガリナルム由来のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする遺伝子及び該ポリペプチドを認識する抗体蛋白質に関する。本発明はさらに、該ポリペプチドの製造方法並びにワクチン、診断薬及び治療薬への利用に関する。

10

背景技術

家禽の重要な呼吸器系疾病として伝染性コリーザがある。この鶏伝染性コリーザは、ヘモフィルス・パラガリナルム (*Haemophilus paragallinarum*: 以下、HPGと称することもある)の感染によって起こる急性呼吸器伝染病であり、鼻汁の漏出、顔面の腫脹あるいは流涙を主な症状とする。鶏伝染性コリーザは、家禽の育成率の低下、産卵開始の遅延、産卵率の低下あるいは産卵停止をもたらすため、その経済的損失は大きい。従来、鶏伝染性コリーザの予防には、ヘモフィルス・パラガリナルムを培養し、回収した菌体をホルマリン、チメロサル等で不活化したワクチンが広く応用されている。しかしながら、これらのワクチンを投与した場合、接種鶏の局所に壊死病巣を形成することが報告される(松本(M. Matsumoto)および山本(R. Yamamoto)、*Avian Dis.*, 15: 109-117、1971)など、ワクチンの副作用が問題となっており、安全性の高いワクチンの開発が強く待望されている。

20

また、近年、養鶏規模の拡大に伴って飼養管理の省力化が進められており、その一環としてワクチン接種に対する省力化の要望が強く、これに応えて、数種のワクチンを混合することにより接種回数を減らすことを狙った混合ワクチンが既に開発され、野外で広く用いられている。

混合ワクチンにおいて、注射量を増やすことなくそれぞれの単味ワクチンと同等の免疫原性を得るためには、混合するそれぞれの抗原量を増やすか、あるいは、良いアジュバントを探し用いることが必要となる。しかしながら、HPGのようなグラム陰性菌は、抗原量を増やした場合には、それに伴って接種局所の腫脹のような注射反応も強まる傾向がある。従って、菌体あるいは培養上清から感染防御抗原すなわち有効な成分(コンポーネント)のみを取り出すか、遺伝子組換え技術により感染防御抗原をコードする遺伝子をクローニングし、該遺伝子を細菌、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞等に発現させ、大量に発現した発現産物を精製し、これを他のワクチンとともに適当なアジュバントと混合する等して、上記の副反応を低減することが望まれる。

30

一方、ワクチン接種の省力化の方法として、ウイルスや細菌をベクターとして使用することも試みられている。すなわち、一つの弱毒ウイルスあるいは細菌に1ないし複数の病原体の感染防御抗原をコードする遺伝子を組み込むことで多価の生ワクチンを作製するという方法である。これまでに鳥類ではベクターとしてポックスウイルスやマレック病ウイルス等を使用した研究が実施されており、鶏痘ウイルスにニューカッスル病ウイルスのHN及びF蛋白遺伝子を組み込んだウイルスベクターワクチンが実用化されている。

40

従って、これからの鶏伝染性コリーザに対する安全で有効なワクチンの開発には、コンポーネントワクチン、ベクターワクチンのいずれの場合においても、HPGの感染防御抗原を同定することが重要と考えられる。

HPGの感染防御抗原として赤血球凝集素(HA)、外膜蛋白などが報告されているが、その中でも、鶏にHPGを免疫すると赤血球凝集抑制抗体(以下、HI抗体という)が上昇し、HI抗体が高い鶏ほど感染防御能が高いことなどから、HAが最も重要な感染防御

50

抗原と考えられている(大槻(K. Otsuki)及び入谷(Y. Iritani)、Avian Dis. , 18:297-304、1974及び久米(K. Kume)ら、Jpn. J. Vet. Sci. , 46:843-850、1984)。

H P Gの血清型は凝集反応に基づいて、ページ(Page)(Am. J. Vet. Res. , 23:85-95、1962)によりA、B及びC型に、また沢田(Sawata)ら(Jpn. J. Vet. Sci. , 40:645-652、1978)により1型及び2型に型別されているが、ページのA型は沢田らの1型に、ページのC型は沢田らの2型に相当すると考えられている(久米ら、Am. J. Vet. Res. , 41:757-760、1980及び沢田ら、Am. J. Vet. Res. , 41:1901-1904、1980)。

久米らは、A型(1型)菌にはHA-L(易熱性、トリプシン感受性)、HA-HL(易熱性、トリプシン耐性)及びHA-HS(耐熱性、トリプシン耐性)の少なくとも3種類のHAが存在すること及びこれらのうち、HA-Lのみが、通常行われている新鮮鶏赤血球に対するHA活性以外に、グルタルアルデヒド固定鶏赤血球に対してもHA活性を有し、且つ、A型菌の感染防御に關与することを報告している(久米ら、Jpn. J. Vet. Sci. , 45:783-792、1983及び沢田ら、Jpn. J. Vet. Sci. , 46:21-29、1984)。また、入谷らは、A型菌にはタイプ1HA<易熱性、蛋白分解酵素感受性>及びタイプ2HA(易熱性、蛋白分解酵素耐性)の2種類のHAが存在し、このうち易熱性、蛋白分解酵素感受性で分子量約39kdのポリペプチドをサブユニットとするタイプ1HAが感染防御に關与すると報告している(山口(T. Yamaguchi)及び入谷、Jpn. J. Vet. Sci. , 42:709-711、1980及び入谷ら、Am. J. Vet. Res. , 41:2114-2118、1980)。久米らのHA-L及びHA-HLは、それぞれ入谷らのタイプ1HA及びタイプ2HAに相当すると考えられている。C型(2型)菌においても、沢田らは、易熱性、トリプシン感受性でグルタルアルデヒド固定鶏赤血球に対してHA活性を示す抗原が存在し、A型菌のHAとは抗原性を異にすると報告している(沢田ら、Am. J. Vet. Res. , 43:1311-1314、1982)。しかしながら、入谷らが報告したA型菌の産生するタイプ1HAを除いて、感染防御抗原は物質として明確に同定されていないのが現状である。

上述したように、従来のヘモフィルス・パラガリナルム菌体をチメロサル、ホルマリン等で不活化したワクチンを鶏に大量に使用した場合には、感染防御に關与する抗原以外に、菌体に由来する種々の物質が含まれているために、上記の様な副作用を生じるという問題点があった。

#### 発明の開示

本発明者らは、かかる問題点を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌の培養液から、HI抗体産生を誘導し、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌による鶏伝染性コリーザを防御する該A型菌に由来する分子量約130Kdのポリペプチドを精製することに成功した。さらに、該A型菌よりゲノムDNAライブラリーを作製し、この中から上記の130Kdポリペプチドをコードする遺伝子断片をクローニングし、これを大腸菌にて発現させ、得られた該ポリペプチドがヘモフィルス・パラガリナルムA型菌による鶏伝染性コリーザを阻止することを見い出した。また、上記の130Kdポリペプチドをコードする遺伝子断片をプローブとして用いてC型菌からも該DNA断片とハイブリダイズする遺伝子断片をクローニングし、C型菌由来のポリペプチドを発現する大腸菌をも得た。

本発明は、ヘモフィルス・パラガリナルムを病因菌とする鶏伝染性コリーザに対する、副作用の少ない、より安全で、有効なワクチン及びその製造方法を提供する。

すなわち、本発明の目的は、ヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なポリペプチド及びそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するペプチドを提供することにある。

本発明の他の目的は、ヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なポリペプチド及びそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする遺伝子及び該遺伝子を発現させるための組換えベクターを提供することにある。

本発明の更に他の目的は、上記組換えベクターで形質転換された微生物又は細胞形質転換体から、ヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なポリペプチド及びそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するポリペプチドを製造する方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、かくして得られたヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なペプチド及びそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するポリペプチドを免疫原として作製されるモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、上記のペプチド、DNA断片、形質転換体、もしくは抗体の組み合わせによるヘモフィルス・パラガリナルム及び該菌体に対する抗体を検出する方法を提供することにある。

10

本発明の更に他の目的は、ヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なポリペプチドに対する抗体を主成分とする鶏伝染性コリーザの治療剤を提供することにある。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、モノクローナル抗体（クローンHpgA 59-40、HpgA 59-180、HpgA 59-284）を鶏に受身免疫した後、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株で攻撃した成績を示した図で、あらかじめHI活性を有するモノクローナル抗体（クローンHpgA 59-40、HpgA 59-180）を投与していた群は発症時期が遅れることを示す。

図2は、モノクローナル抗体（クローンHpgA 59-33、HpgA 59-48B、HpgA 59-180）を鶏に受身免疫した後、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株で攻撃した成績を示した図で、あらかじめHI活性を有するモノクローナル抗体（クローンHpgA 59-180）を投与していた群は発症時期が遅れることを示す。

20

図3は、モノクローナル抗体（クローンHpgA 59-48A、HpgA 59-145、HpgA 59-180）を鶏に受身免疫した後、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株で攻撃した成績を示した図で、あらかじめHI活性を有するモノクローナル抗体（クローンHpgA 59-145、HpgA 59-180）を投与していた群は発症時期が遅れることを示す。

図4は、モノクローナル抗体（クローンHpgA 59-188、HpgA 59-236、HpgA 59-180）を鶏に受身免疫した後、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株で攻撃した成績を示した図で、あらかじめHI活性を有するモノクローナル抗体（クローンHpgA 59-180）を投与していた群は発症時期が遅れることを示す。

30

図5は、HI活性を有するモノクローナル抗体（クローンHpgA 59-180）をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーにより精製したHPGp130ポリペプチドをSDS-PAGE法により電気泳動した後、CBB染色した結果を示す写真である。

図6は、a) 2-メルカプトエタノール処理した精製HPGp130ポリペプチド及びヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株をSDS-PAGE法により電気泳動した後、CBB染色した結果を示す写真；及びb) 2-メルカプトエタノール処理した精製HPGp130ポリペプチド及びヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株をSDS-PAGE法により電気泳動した後、薄膜(PVDF)に転写し、精製HPGp130ポリペプチドに対するモルモット抗血清を用いて、これと反応する蛋白質を検出した結果を示す写真である。

40

図7は、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株ゲノムよりクローニングしたHPG1.2k DNA、HPG3.5k DNA、HPG4.1k DNA、HPG6.7k DNA及びHPG2.7k DNA断片の位置を示す模式図である。

図8は、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株ゲノム由来のXhoI-XbaI消化断片（HPG4.1k DNA）をプラスミドpSP72に挿入したプラスミドpSA4.1を構築し、さらに該プラスミドからのXhoI-KpnI消化断片をプラスミド

50

p T r c H i s C に挿入したプラスミド p T A 4 . 1 を構築する手順を示す模式図である。

図 9 は、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株ゲノム由来の X h o I - P s t I 消化断片 ( H P G 6 . 7 k D N A ) をプラスミド p S P 7 2 に挿入したプラスミド p S A 6 . 7 を構築し、さらに該プラスミドからの X b a I 消化断片をプラスミド p S P 7 2 に挿入したプラスミド p S A 2 . 7 を構築する手順を示す模式図である。

図 1 0 は、制限酵素 E c o R I 消化したヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌、B 型菌及び C 型菌由来ゲノム D N A 断片をアガロース電気泳動した後、薄膜 ( ハイボンド N + ) に転写し、H P G 1 . 2 k D N A をプローブとし、これとハイブリダイズする D N A 断片を検出した結果を示す写真である。

10

図 1 1 は、ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌 5 3 - 4 7 株ゲノムより、クローニングした H P G - C 1 D N A 、 H P G - C 2 D N A 、 H P G - C 3 D N A 及び H P G - C 4 D N A 断片の位置を示す模式図である。

図 1 2 は、A 型 H M T p 2 1 0 ポリペプチドの N 末端側および C 末端側アミノ酸残基をコードする塩基配列をもとに作製したプライマーを用いて、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌、B 型菌及び C 型菌由来ゲノム D N A を鋳型として P C R を行った後、得られた P C R 産物を 0 . 8 % アガロースゲル電気泳動で分析した結果を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を更に詳しく説明する。

本発明の H I 抗体産生を誘導するヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌由来のポリペプチドは、H I 活性を有するモノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより該 A 型菌の培養上清又は菌体の破砕液から調製される。

20

H I 活性を有するモノクローナル抗体 ( 以下、H I - M C A と称することもある ) は、常法の細胞融合法により、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製し、ついで、この中から H I 試験により、H I 活性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択することにより取得できる。

上記の抗体を作製する際の免疫原として用いられるヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌は、通常のヘモフィルス・パラガリナルムの培養に用いられる方法に準じて得られる。例えば 2 2 1 株は、鶏血清加鶏肉汁培地 ( 培地 1 0 0 0 m l 中、鶏肉水 3 0 0 m l 、鶏血清 1 0 m l 、ポリペプトン 5 g 、ブドウ糖 1 g 、カザミノ酸 1 g 、グルタミン酸ナトリウム 5 g 、塩化ナトリウム 5 g 、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド 0 . 0 2 5 g を含む ) 中で 3 7 ° C 、一夜振盪培養し、遠心分離することによって回収できる。

30

免疫は一般的方法により、例えば、上記のヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌をチメロサル、ホルマリン等で不活化した後、これを通常のアジュバントを併用して B A L B / c マウスに腹腔内投与、皮下投与、皮内投与あるいは静脈内投与することにより行われる。免疫原としては、菌体そのものあるいはロダン化カリウム、超音波、ヒアルロニダーゼ等で処理した菌体もしくは N - ラウロイルサルコシナトリウム、ノニデート ( Nonidet ) P - 4 0 、トリトン ( Triton ) X - 1 0 0 等の界面活性剤で処理した加工抗原であってもよい。アジュバントとしてはフロインド完全アジュバント、フロインド不完全アジュバント、水酸化アルミニウムゲル等が使用される。より具体的には以下のように行う。鶏血清加鶏肉汁培地中で培養したヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株をチメロサルで不活化した後、これを超音波処理する。得られた破砕液とフロインド完全アジュバントを混合して得たエマルジョンを B A L B / c マウスの背部皮下に投与し、その後 2 ~ 4 週間おきに同量を不完全アジュバントとともに調製したエマルジョンを背部皮下に投与する。血清抗体をチェックし、抗体価が上がっていることを確認した後、最終免疫として、更に、2 ~ 4 週間後に、超音波破砕液を静脈内投与する。

40

モノクローナル抗体を作製する際の免疫細胞としては、最終投与の 2 ~ 4 日後に摘出した脾臓細胞を用いるのが好ましい。マウスミエローマ細胞としては、例えば、N S I - A g 4 / 1 ( Eur . J . Immunol . , 6 : 5 1 1 , 1 9 7 6 ) 、 P 3 X 6 3 - A g 8 . U 1 ( Curr . Topics Microbiol . Immunol . , 8 1 : 1 , 1 9 7 8 ) 、 X 6 3 - A g 8 . 6

50

53 (J. Immunol., 123:1548, 1979)等を使用することができる。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞との融合反応はミルシュタイン (Milstein) らの方法 (Method Enzymol., 73, 3-46, 1981) に準じて行うことができる。すなわち、融合する際には、マウスミエローマ細胞に対し、1~10倍程度の脾臓細胞が用いられる。また、融合促進剤としては、分子量1,000~6,000のポリエチレングリコールが30~50% (w/v) の濃度で使用される。より具体的には、細胞融合は、約 $10^8$ 個の脾臓細胞と約 $10^7$ 個のP3X63-Ag8.U1ミエローマ細胞を用いて、予め37に加温した45%ポリエチレングリコール4,000を含むリンパ細胞の培養に通常に用いられる培地、例えば、RPMI1640培地中で行うのが好ましい。

ハイブリドーマは、未融合細胞が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間、HAT培地中で培養することにより得られる。かくして得られるハイブリドーマに対し、その培養上清を用いて、通常の限界希釈法に従い、目的とする抗体産生株の選択及びクローン化が行われる。

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌を認識する抗体を産生する株の検索は、通常使用されるELISA法、RIA法、ウエスタンブロット法等に従って行われる。上記方法に使用される抗原はヘモフィルス・パラガリナルムA型菌体の懸濁液、該菌体をロダン化カリウム、超音波、ヒアルロニダーゼ等で処理した菌体、該菌体の界面活性剤による抽出液のいずれであってもよい。

ついで、HI活性を有する抗体を産生する株が、上記ハイブリドーマの培養上清もしくは該ハイブリドーマを投与したマウスの腹水を用い、通常に行われているHI試験に従って検索される。HA抗原としては、ヘモフィルス・パラガリナルム菌体の懸濁液あるいは該菌体をロダン化カリウム、超音波、ヒアルロニダーゼ等で処理した菌体を使用される。HI試験に用いる赤血球は、0.5%新鮮鶏赤血球、グルタルアルデヒド固定1%鶏赤血球あるいはホルマリン固定1%鶏赤血球のいずれでもよいが、好ましくは、グルタルアルデヒド固定鶏赤血球が用いられる。

より具体的には、5倍量の25%カオリン溶液で処理した腹水の遠心上清をグルタルアルデヒド固定鶏赤血球の沈澱に加え、37で60分間振盪感作する。この上清の2倍階段希釈液に4赤血球凝集単位を含む221株の菌懸濁液を等量加えて混和後15分間静置する。次に、グルタルアルデヒド固定1%鶏赤血球懸濁液を加え、室温に60分間静置した後、管底像により判定する。赤血球凝集を阻止する最高希釈倍数をHI抗体価とする。

かくして得られたHI活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからの該抗体の採取には、該ハイブリドーマを大量に培養し、その培養上清から又は該ハイブリドーマに適合するマウスにこれを投与して増殖させ、その腹水から得る方法等がとられる。

モノクローナル抗体の精製は、蛋白質化学において通常使用される方法、例えば、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等を適宜選択して行えばよい。より具体的には、腹水からのモノクローナル抗体の精製は、プロテインA-セファロース (Protein A-Sepharose) CL-4B (ファルマシア製) 及びMAPS-IIマウスモノクローナル抗体精製キット (バイオ・ラッド製) を用い、製造業者のプロトコールに従うことによって達成される。

本発明のHI抗体産生を誘導するヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来のポリペプチドの精製に使用されるHI活性を有する抗体をリガンドとするアフィニティークラムは、一般的な方法、例えば、製造業者のプロトコールに従い、ハイトラップNHS-アクチベート (HiTrap NHS-Activated) カラム (ファルマシア製) に、精製した上記抗体を結合させることにより得られる。

かくして調製されたアフィニティークラムを用いることにより、該A型菌の培養上清又は菌体の破砕液から、HI抗体産生を誘導するヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来のポリペプチドを得ることができる。具体的には、221株を鶏血清加鶏肉汁培地中で37、2日間培養した上清から、高いHI抗体産生能と鶏伝染性コリーザを防御する活性を

10

20

30

40

50

有する分子量約130 Kdのポリペプチドを取得した(HPG p130と称する)。このようにして得られたポリペプチドのアミノ酸配列は、エドマン分解法など一般的な方法(エドマン(P. Edman, Acta Chem. Scand., 4: 283, 1950))により決定することができる。該ポリペプチドのN末端側アミノ酸配列を配列表の配列番号: 2に示す。

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来のポリペプチドをコードする遺伝子又はその断片のクローニングは、サムブルック(Sambrook)らが述べている一般的な方法(モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル、第2版(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、ニューヨーク、1989)に従い行うことができる。すなわち、上述した方法によりヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株を培養、回収した後、セバジーンキット(三光純薬社製)を用い、添付のプロトコールに従ってゲノムDNAを抽出・精製し、これを適当な制限酵素(好ましくは、EcoRIが使用される)で切断し、市販のクローニングベクター(例えば、gt11)に挿入し、DNAライブラリーを調製する。この中から、HI活性を有する適当な抗体と反応する抗原を発現しているクローンを選択する。HI活性を有する抗体としては、上記の方法により得られたモノクローナル抗体を含むハイブリドーマの培養上清又はマウスの腹水等が挙げられるが、好ましくは、HI活性を有するモノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーによって得られたヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来のポリペプチドで免疫した抗血清が使用される。このようにして得られた組換え gt11ファージDNA中の外来DNA断片の塩基配列は、DNAシーケンサー(例えば、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)377型)により決定することができる。また、得られた外来DNA断片の新規性は、その全塩基配列と既存のデータベース(例えば、GeneBank、EMBLなど)とのホモロジー検索を行うことにより確認できる。

例えば実施例3に示すように、DNAライブラリーからは、10個の陽性 gt11ファージが得られ、これらのファージDNAは、アガロース電気泳動法の結果から、いずれも約1.2 kbの外来DNA断片(以下、HPG1.2 k DNA断片とも称する)を含有する。その外来DNAの塩基配列は配列表の配列番号: 1に記載の1988番目から3157番目の塩基配列に相当する。

このHPG1.2 k DNA断片には、開始及び終止コドンが見い出されないので、該DNA断片は上記のヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来ポリペプチドの一部をコードしていると考えられる。該ポリペプチドの全長をコードする遺伝子は、HPG1.2 k DNA断片をプローブとし、より長鎖のDNA断片を得、該断片の塩基配列を調べ、配列内に開始コドン及び終止コドンを見い出すことにより達成される。

より具体的には、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株ゲノムDNAを1.2 kb DNA断片の内部で切断しない制限酵素(例えばHindIII)で切断した後、これをアガロース電気泳動法により、各DNA断片を分離する。DIG-DNA標識キット(ペーリンガー・マンハイム製)を用いて、ジゴキシゲニン(DIG)で標識した1.2 kb DNA断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行い、目的のDNA断片を検出する。その結果、1.2 kb DNA断片とハイブリダイズする約3.5 kbのHindIII消化DNA断片(以下、HPG3.5 k DNA断片とも称する)を得た。このHPG3.5 k DNA断片の塩基配列は、配列表の配列番号: 1に記載の1番目から3450番目の塩基配列に相当する。なお、前述のHPG p130ポリペプチドのN末端側アミノ酸配列と一致する配列を、配列表の配列番号: 1に記載の1番目から13番目のアミノ酸配列(453番目から491番目の塩基配列に相当する)に見い出した。

このHPG3.5 k DNA断片には、開始コドンは見い出されたが終止コドンが見い出されないので、さらに、DIGで標識した1.2 kb DNA断片および3.5 kb DNA断片を用いて、約4.1 kbのXhoI-XbaI消化DNA断片(以下、HPG4.1 k DNA断片とも称する)を得た。このHPG4.1 k DNA断片の塩基配列は、配

10

20

30

40

50

列表の配列番号：1に記載の2212番目から6275番目の塩基配列に相当する。さらに、DIGで標識した1.2kb DNA断片および3.5kb DNA断片を用いて、約6.7kbのXhoI-PstI消化DNA断片(以下、HPG6.7k DNA断片とも称する；この断片内には上記のHPG4.1k DNA断片が含まれる)を得た。このHPG6.7k DNA断片の塩基配列は、配列表の配列番号：1に記載の2212番目から8930番目の塩基配列に相当する。このHPG6.7k DNA断片に終止コドンが見い出された。

配列表の配列番号：1に記載の塩基配列は、全長8930塩基からなる塩基配列であり、その中に塩基番号243から翻訳され2042個のアミノ酸をコードできるオープンリーディングフレームが存在することが明らかとなった。この2042個のアミノ酸からなるポリペプチドを以下、A型HMTp210とも称する。既存のデータベース(GeneBank及びEMBL)とのホモロジー検索を行ったところ、既知の塩基配列あるいはアミノ酸配列とのホモロジーが認められなかったことから、A型HMTp210ポリペプチドは新規物質と考えられた。

10

また、配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の中に塩基番号8375から翻訳され185個のアミノ酸をコードできるオープンリーディングフレームの存在の可能性が示された。なお、この配列内に終止コドンは見い出されていない。既存のデータベース(GeneBank及びEMBL)とのホモロジー検索を行ったところ、既知の塩基配列あるいはアミノ酸配列とのホモロジーが認められなかったことから、このオープンリーディングフレームがコードするポリペプチドも新規物質と考えられた。

20

上記のヘモフィルス・パラガリナルムA型菌由来DNA断片は、これをプローブとして、血清型の異なるヘモフィルス・パラガリナルムB型菌及びC型菌由来のDNA断片、更には該DNA断片がコードするポリペプチドを取得するために使用することができる。

より具体的には、C型菌53-47株からゲノムDNAを抽出・精製し、これを適当な制限酵素(好ましくは、HindIIIが使用される)で切断し、市販のクローニングベクター(例えば、DASHII)に挿入し、DNAライブラリーを調製する。この中から、DIG標識したA型HPG3.5k DNA断片をプローブとして、クローンを選択する。実施例5に示すように、DNAライブラリーからは、10個の陽性DASHIIファージが得られ、これらのファージDNAは、アガロース電気泳動法の結果から、いずれも約13.5kbの外來DNA断片(以下、HPG-C1 DNAとも称する)を含有する。

30

このHPG-C1 DNA断片は約13.5kbとかなり大きく、そのままではプラスミドベクターにサブクローニングするのは困難であることから、HPG-C1 DNA断片を適当な制限酵素(好ましくは、XbaIが使用される)で切断し、市販のクローニングベクター(例えば、pUC119)に挿入する。その結果、約5.6kb(以下、HPG-C2 DNAとも称する)、約0.9kb(以下、HPG-C3 DNAとも称する)及び約6.9kb(以下、HPG-C4 DNAとも称する)のDNA断片を得た。HPG-C2 DNA断片の一部とHPG-C4 DNA断片の塩基配列を調べたところ、これらの断片内に開始及び終止コドンが見い出された。

配列表の配列番号：5に記載の塩基配列は、全長7486塩基からなる塩基配列であり、その中に塩基番号848から翻訳され2039個のアミノ酸をコードできるオープンリーディングフレームが存在することが明らかとなった。この2039個のアミノ酸からなるポリペプチドを以下、C型HMTp210とも称する。既存のデータベース(GeneBank及びEMBL)とのホモロジー検索を行ったところ、既知の塩基配列あるいはアミノ酸配列とのホモロジーが認められなかったことから、C型HMTp210ポリペプチドは新規物質と考えられた。

40

また、C型HMTp210ポリペプチドをコードする塩基配列とA型HMTp210ポリペプチドをコードする塩基配列のホモロジーを調べたところ、約80%のホモロジーがあること、さらに、5'側の約3.4kbの領域と3'側の約1.2kbの領域が非常にホモロジーが高いこと、2つの領域には含まれた約1.5kbの領域はホモロジーが低いことが明らかとなった。また、これらの遺伝子にコードされるポリペプチドについても、同

50

様のことが認められた。

A型HMTp210ポリペプチドをコードする塩基配列をもとに、PCRによりヘモフィルス・パラガリナルムA型菌のみならず血清型の異なるB型菌及びC型菌由来のDNA断片、更には該DNA断片がコードするポリペプチドを取得することもできる。

より具体的には、A型HMTp210ポリペプチドをコードする塩基配列をもとに、上流側のPCRプライマーとして、配列番号：3に記載の塩基配列を有する合成DNAを、下流側のPCRプライマーとして、配列番号：4に記載の塩基配列を有する合成DNAを作製した。これらのプライマーは、それぞれ5'末端にBamHI認識配列を付加させ、また、A型HMTp210ポリペプチドの翻訳領域の全長を増幅できるようにデザインした。これらのプライマーを用いてヘモフィルス・パラガリナルムA型菌の221株、083株、W株、Germany株及びGeorgia株、B型菌のSpross株及び0222株、C型菌のModesto株及び53-47株の計9株からのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。得られたPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動で分析したところ、いずれの株にも約6.1kbのサイズの増幅フラグメントが認められた。

かくして得られたDNA断片あるいはその一部を適当な発現ベクターに組み込み、これを用いて、微生物又は動物細胞を形質転換し、形質転換体を培養することにより、本発明のヘモフィルス・パラガリナルム由来のポリペプチドあるいはそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するペプチドを生産することができる。このような一部のアミノ酸配列を有するペプチドを生産する場合は、ペプチド合成機を利用することもできる。本発明のポリペプチドをコードするDNAの上流に、分泌のための微生物用又は動物細胞用の適当なシグナル配列を接続すれば、該ポリペプチドを培地中に分泌発現させることも可能である。このように分泌型に改変したDNAは、培地中に分泌した該ポリペプチドの精製を容易にする点で有用である。シグナル配列としては、大腸菌用としてpelBシグナル(レイ(S.P. Lei)ら、J. Bacteriology, 169: 4379-4383, 1987)、酵母用として因子のシグナル(ブレイク(A.J. Brake)、Yeast Genetic Engineering, p 269、バターワース、1989)、動物細胞用としてイムノグロブリンのシグナルSG-1(前田(H. Maeda)ら、Hum. Antibod. Hybridomas, 2: 124-134, 1991)、C25のシグナル(PCR国際公開番号WO94/20632)などが挙げられる。

発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルスベクター等を用いることができる。該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる微生物又は動物細胞との組み合わせにより、lac、tac、pho5、adh、SV40初期、SV40後期、アクチン等、最終的に鶏伝染性コリーザを防御する活性を有するポリペプチドが得られるのであればどのようなものでもよい。また、他の蛋白質やペプチド、例えば、ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合蛋白、プロテインA、ヒスチジンヘキサマー等との融合蛋白として発現させることもできる。マーカー遺伝子として、微生物細胞用発現ベクターを用いる場合は、宿主として大腸菌を用いる場合、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、宿主として酵母を用いる場合、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(Leu2)遺伝子などが利用される。また、動物細胞用発現ベクターを用いる場合は、アミノグリコシド3'ホストトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子などを利用できる。選択用添加物質としては、G418、ネオマイシン、メソトレキセート等が例示される。

宿主細胞の形質転換は公知の方法、例えば、塩化カルシウム法、リン酸カルシウム共沈澱法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン法、プロトプラストポリエチレン融合法、エレクトロポレーション法等が利用でき、用いる宿主細胞により適当な方法を選択すればよい。

本発明のヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規ポリペプチドあるいはそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するペプチドは、以下の方法により製造される。例えば、発現ベクターpTrcHisC(インビトロジェン(Invitrogen)社製)にA

10

20

30

40

50

型菌由来のHPG3.5k DNA断片を組み込み、これを大腸菌JM109株に導入し、形質転換を行う。形質転換細胞の中から、該ポリペプチドに対する抗体との反応性を指標とするドットプロット法により、目的の新規ポリペプチドを生産する形質転換細胞をスクリーニングする。この細胞の超音波破碎液の遠心上清で免疫された鶏は、A型菌221株の攻撃に対し、高い防御能を有する。

新規ポリペプチドの精製は、該ポリペプチドを生産する形質転換細胞を大量培養し、回収したその細胞抽出液又は培養上清から、前述した蛋白質化学において通常使用される方法を適宜選択することにより達成される。

かくして得られるヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なポリペプチドは、鶏伝染性コリーザを防御する活性を有するものである。ヘモフィルス・パラガリナルム由来の該ポリペプチド、該ポリペプチドに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体並びに上記の発現ベクターは、鶏伝染性コリーザのワクチン及び治療薬として、単独であるいは薬剤として投与可能な適当な担体、希釈液又は安定剤を添加することにより、注射剤、経口剤等の任意慣用の方法で医薬品に使用される。

上述のヘモフィルス・パラガリナルムの新規ポリペプチド及びそのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、上述した方法により、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作製するための免疫原として使用される。また、該ポリペプチド及びこれらとの結合能を有する抗体は、ウエスタンプロット法、ELISA法などの抗原及び抗体検出系に利用することができ、診断薬を構築する材料となる。また、上記の抗体を適当な担体に結合させ、これを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、上記のポリペプチドを精製することができる。

本発明によると、鶏伝染性コリーザを予防するためのヘモフィルス・パラガリナルム由来の新規なポリペプチド及び該ポリペプチドをコードする遺伝子断片並びに治療薬として使用可能なHI活性を有する抗体が提供される。

本発明者が見出したヘモフィルス・パラガリナルム由来のポリペプチドは、分子量が約130Kdで、HI抗体産生を誘導する活性を有し、ヘモフィルス・パラガリナルムによる鶏伝染性コリーザを防御するための重要な新規なポリペプチドである。該ポリペプチドをコードする遺伝子の単離、発現ベクターの構築、発現細胞の作製、上記ポリペプチドの精製法など、該ポリペプチドを実用化するための技術的な問題は本発明により解決され、従来技術に比較してより効果的なワクチンを提供することが可能になった。更に、これらは、迅速かつ簡便な鶏伝染性コリーザ診断薬を提供するための材料としても有用である。以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

#### 実施例1：モノクローナル抗体の作製及び性状

##### 1)モノクローナル抗体の作製

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株を鶏血清加鶏肉汁培地100mlに接種し、37℃で一夜振盪培養した後、遠心分離(8,000回転、20分間)により菌体を回収した。得られた菌体をPBSで遠心洗浄後、約 $5 \times 10^{10}$ 個/mlとなるように0.01%チメロサルを含むPBSに懸濁した。この懸濁液をブランソン・ソニファイアー(Branson Sonifier)350を使用して20kHzで、4分、10分間超音波にかけた(0.5秒間超音波にかけ、0.5秒間の冷却を交互に実施)。このようにして得られた超音波破碎液とフロインドの完全アジュバントとを等量ずつ混合し、油中水滴型(w/o)の状態になるまで充分混和した。このエマルジョン0.1mlずつをBALB/cマウスの背部皮下2箇所投与し、4週間後に、フロインドの不完全アジュバントで上記と同様に調製したエマルジョン0.1mlずつを背部皮下2箇所投与した。さらに18日後に超音波破碎液0.1mlを静脈内投与した。

最終投与の3日後に脾臓細胞を採取した。 $1 \times 10^8$ 個の該脾臓細胞と $1 \times 10^7$ 個のマウスミエローマ細胞P3X63-Ag8.U1をパディングにより混合し、これに予め37℃に加熱した45%ポリエチレングリコール4,000を含むRPMI1640培地を加え、細胞融合を行わせた。この融合反応後の細胞をHAT培地( $1 \times 10^{-4}$ Mヒポキサン

10

20

30

40

50

チン、 $4 \times 10^{-7}$  M アミノプテリン、 $1.6 \times 10^{-5}$  M チミジンを添加した 5 % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地) に懸濁し、細胞培養用 9 6 ウエルマイクロプレート (コーニング製) に分注後、37、5 % 炭酸ガスの条件下で培養した。

ハイブリドーマの増殖が認められたウエルについて、以下に記載する E L I S A 法を用いて、培養上清中のヘモフィルス・パラガリナルムを認識する抗体の存在の有無を検索した。上記の方法により調製したヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株の超音波破砕液を P B S で 3 0 0 倍希釈し、E L I S A 用マイクロプレート (イムロン II、ダイナテック製) のウエルに  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注し、4 で一夜放置した後、5 % スキムミルクを含む P B S (1 ウエル当たり  $200 \mu\text{l}$ ) で室温、2 時間マスキングを行った。0.05 % トゥイーン 20 を含む P B S (P B S - T) で洗浄後、5 % スキムミルクを含む P B S - T で 10 倍希釈したハイブリドーマ培養上清を  $100 \mu\text{l}$  加え、室温で 2 時間反応させた。P B S - T で洗浄後、5 % スキムミルクを含む P B S - T で 10,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス I g G (バイオ・ラッド製) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、室温で 2 時間反応させた。さらに、P B S - T で洗浄後、1 ml 当たり オルト - フェニレンジアミン二塩酸塩 (O P D、片山化学製) 6 mg 及び過酸化水素水 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3.1 % 含有、三菱瓦斯化学製)  $4.75 \mu\text{l}$  を含む 0.05 M クエン酸 - 0.1 M リン酸水素二ナトリウムバッファー (pH 5.0) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、室温で 30 分間反応させた。3 M 硫酸を  $50 \mu\text{l}$  ずつ加え、反応停止後、各ウエルの吸光度 ( $490 \text{nm}$ ) を E L I S A 用オートリーダーで測定した。

培養上清中にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌に対する抗体が認められたウエルのハイブリドーマは、さらに限界希釈法でクローニングを行い、単クローンとした。このようにして、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌に対するモノクローナル抗体を産生する株 9 クローンを得た。

## 2) モノクローナル抗体の H I 活性

これらのハイブリドーマを大量に培養し、免疫抑制剤のプリスタン (2, 6, 10, 14 - テトラメチルペンタデカン、アルドリッチ製) で前処理した B A L B / c マウスの腹腔内に投与して増殖させ、10 ~ 20 日後に産生された腹水を屠殺開腹したマウスより採取し、得られた腹水中の H I 活性を調べた。

H I 試験に用いる H A 抗原としてヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株のチメロサル不活化菌懸濁液を用い、H A 価を基に調製した。まず、V 型マイクロプレート (三光純薬製) を用い、上記の H A 抗原の 2 倍階段希釈液  $0.05 \text{ml}$  にグルタルアルデヒド固定 1 % 鶏赤血球懸濁液  $0.05 \text{ml}$  を加え、室温に 60 分間静置した後、管底像により判定した。赤血球を凝集させる最高希釈倍数を H A 価とし、このときの H A 抗原濃度を 1 単位とし、H I 試験には 4 単位になるように該 H A 抗原液を調製した。

次に、マウス腹水  $0.2 \text{ml}$  に 5 倍量の 2.5 % カオリン溶液を加えて 37 で 30 分間振盪感作し、遠心分離により上清を得た。グルタルアルデヒド固定 10 % 鶏赤血球  $2 \text{ml}$  を遠心して得られた沈澱に、このカオリン処理済の遠心上清を加え、37 で 60 分間振盪感作した。感作後、遠心により上清を得、5 倍希釈マウス腹水として H I 抗体の測定に使用した。V 型マイクロプレートを用い、この上清の 2 倍階段希釈液  $0.025 \text{ml}$  に上記の 4 赤血球凝集単位を含む 2 2 1 株のチメロサル不活化菌懸濁液を等量加えて混和後、15 分間静置した。充分感作した後、グルタルアルデヒド固定 1 % 鶏赤血球懸濁液  $0.05 \text{ml}$  を加えた。室温に 60 分間静置した後、管底像により判定した。赤血球凝集を阻止する最高希釈倍数を H I 抗体価とした。9 クローンの内 3 クローン (H p g A 59 - 40、H p g A 59 - 145、H p g A 59 - 180) のモノクローナル抗体が高い H I 活性を示した (表 1)。なお、クローン H p g A 59 - 180 は F E R M B P - 6084 として、1996 年 9 月 5 日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に出願人により寄託されている。

表 1

<u>モノクローナル抗体</u>	<u>HI抗体価</u>	
H p g A 59-33	<50	
H p g A 59-40	25,600	
H p g A 59-48A	<50	
H p g A 59-48B	<50	10
H p g A 59-145	1,600	
H p g A 59-180	12,800	
H p g A 59-188	<50	
H p g A 59-236	<50	
H p g A 59-284	<50	

## 3) モノクローナル抗体の防御活性

20

これらの抗体を含むマウス腹水 0.3 ml を一群 8 ~ 10 羽の 4 ~ 6 週齢の白色レグホン S P F 鶏の腹腔内にそれぞれ注射し、翌日にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2.2 1 株約  $10^8$  個を鼻腔内に滴下し攻撃した。対照としてマウス腹水非投与群をおき、同様な攻撃を行い、コリーザ症状（鼻汁の漏出、顔面腫脹、流涙）の有無について 10 日間観察した。あらかじめ HI 活性を有するモノクローナル抗体（以下、HI-MCA とも称する）を投与していた群は 3 クローンとも、対照群に較べて発症時期が遅れる傾向が見られた。一方、他のクローンを投与していた群は、いずれも対照群との差は認められなかった（図 1 ~ 4）。

実施例 2 : HI-MCA が認識する抗原の精製及び性状

## 1) HI-MCA の精製

30

HI-MCA (H p g A 59-180) をマウス腹水からプロテイン A - セファロース CL-4B (ファルマシア製) 及び MAPS-II マウスモノクローナル抗体精製キット (バイオ・ラッド製) を利用して、添付のプロトコールに従い精製した。まず、マウス腹水 4 ml に等量の抗体精製キットに含まれる結合バッファーを加え、0.45 ミクロンのステリベックス・フィルター (ミリポア製) で濾過後、プロテイン A - セファロース CL-4B カラム (ゲルベッドボリューム 5 ml) にかけて、結合バッファーで 280 nm の吸光度が 0.05 以下になるまで充分洗浄した。ついで、キットに含まれる溶出バッファーでカラムに結合した抗体を溶出した。溶出した抗体は、0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.2 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.3) に対して透析し、精製 HI-MCA (H p g A 59-180) 40 mg を得た。HI-MCA (H p g A 59-40) についても同様に精製し 12 mg を得た。

40

## 2) HI-MCA の担体への結合

次に、精製した HI-MCA (H p g A 59-180) をリガンドとして、ハイトラップ NHS - アクチベータッドカラム (ファルマシア製) に、添付のプロトコールに従い結合させた。まず、ハイトラップ NHS - アクチベータッドカラム (ゲルベッドボリューム 1 ml) を 1 mM 塩酸で洗浄後、これに前記の精製 HI-MCA (H p g A 59-180) 10 mg の 0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.2 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (10 ml) を室温で 30 分間循環させることにより HI-MCA を結合させた。得られた HI-MCA 結合ハイトラップカラムを、0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.5 M エタノールアミン (pH 8.3)、0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸ナトリウムバッファー

50

(pH 4.0) で交互に 3 回洗浄後、PBS で平衡化し、HI-MCA が認識する抗原の精製に供試した。

### 3) HI-MCA が認識する抗原の精製

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株の培養液から、HI-MCA をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより、抗原の精製を行った。なお、抗原の検出は、以下に記載する ELISA 法を利用して行った。

前記の精製した HI-MCA (HpgA 59-40) を 0.05 M 炭酸ナトリウムバッファ (pH 9.0) で 1.6 µg/ml の濃度に希釈し、ELISA 用マイクロプレートのウェルに入れ、4 で一夜放置した後、5% スキムミルクを含む PBS で室温、2 時間マスキングを行った。PBS-T で洗浄後、5% スキムミルクを含む PBS-T で 10 10  
 10 倍に希釈したカラム溶出液を室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、5% スキムミルクを含む PBS-T で 10,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識 HI-MCA (HpgA 59-180) を室温で 2 時間反応させた。さらに、PBS-T で洗浄後、OPD 及び過酸化水素水を含む基質液を加え室温で 30 分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識 HI-MCA (HpgA 59-180) は吉竹 (Yoshitake) らの方法 (J. Biochem., 92: 1413-1424, 1982) に準じて、前記の精製した HI-MCA (HpgA 59-180) に西洋わさびペルオキシダーゼ (東洋紡製) を結合させることにより調製した。

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株を鶏血清加鶏肉汁培地 100 ml に接種し、37 で 2 日間振盪培養した。次に 8,000 回転、20 分間の遠心により菌体を除去 20  
 した培養上清に、直ちにセリンプロテアーゼ阻害剤フェニルメチルスルホニルフルオリドを 1 mM になるように加え、0.45 ミクロンのステリベックス・フィルターにて濾過した。予め PBS で平衡化した HI-MCA 結合ハイトラップカラムに、上記の濾液 60 ml を添加後、PBS で洗浄し、280 nm の吸光度が 0.05 以下になった時点で、HI-MCA と結合する抗原を 3 M チオシアン酸ナトリウムで溶出した。HI-MCA が認識する抗原は素通り画分には認められず、ほとんどが 3 M チオシアン酸ナトリウム溶出画分に回収された。この溶出液を 50 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM トリス塩酸バッファ (pH 8.0) に対して透析した。

### 4) HI-MCA が認識する抗原の N 末端側アミノ酸分析

アフィニティークラムからの溶出液について 2-メルカプトエタノール処理後、5-20 30  
 % ポリアクリルアミドゲルを用いて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) をレムリ (Laemmli) の方法 (Nature, 227: 680-685, 1970) に準じて行い、50% メタノール-10% 酢酸で溶解した 0.25% クマジーブリアントブルー R250 (CBB) で染色を行ったところ、分子量約 130 Kd のバンドが確認できた (図 5)。そこで、このポリペプチドを HPGp130 と名付け、その N 末端側アミノ酸配列の決定を以下の方法に従って行った。

まず、該精製 HPGp130 ポリペプチドを 2-メルカプトエタノール処理後、5% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。

泳動終了後、ゲルをトランスファーバッファ (10 mM N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸、10% メタノール、pH 11) で洗浄し、あらかじめ 100% 40  
 メタノール及びトランスファーバッファの順に浸しておいたポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (ミリポア製) 上に重ね、トランス・プロット・セル (TRANS-BLOT CELL) (バイオ・ラッド製) を用いて 20 V、一夜転写を行った。転写後の PVDF 膜を水洗し、45% メタノール-10% 酢酸に溶解した 0.1% アミドブラックで 30 秒間染色後、蒸留水で脱色を行った。

染色された分子量 130 Kd のバンドを切り出し、この膜をプロテインシークエンサー (アプライド・バイオシステムズ 477A 型) を用いて分析した。N 末端側の 13 アミノ酸残基を解読した結果、そのアミノ酸配列は配列番号: 2 で示される Lys-Trp-Leu-Glu-Val-Tyr-Ser-Ser-Ser-Val-Lys-Leu-Ser 50  
 r であった。

## 5) HPGp130ポリペプチドのHI抗体産生の誘導

HPGp130ポリペプチドがHI抗体産生を誘導するかを調べた。該HPGp130ポリペプチド溶液(約40 $\mu$ g/ml)を同量のフロインドの完全アジュバントと混合して調製したエマルジョン1ml(1匹当たりHPGp130ポリペプチド約20 $\mu$ g)をモルモットの背部皮下2箇所注射し、免疫した。約3週間後に、フロインドの不完全アジュバントで上記と同様に調製したエマルジョン1mlを背部皮下2箇所注射した。さらに2週間後に、フロインドの不完全アジュバントで調製した同エマルジョンを背部皮下2箇所に追加投与し、その4週間後に採血した。前記と同様の方法で、得られた抗血清中のHI抗体価を調べたところ、高いHI抗体価(5,120倍)を有していた。このように、HPGp130ポリペプチドは、鶏伝染性コリーザの防御に深く関わりがあるといわれているHI抗体の産生を誘導することが明らかとなった。

10

## 6) 抗HPGp130ポリペプチドモルモット血清が認識するペプチド

次に抗HPGp130ポリペプチドモルモット血清が認識するポリペプチドの解析をウエスタンブロット法で調べた。まず、精製HPGp130ポリペプチド及び前述の鶏血清加鶏肉汁培地中で培養したA型菌221株を2-メルカプトエタノール処理後にSDS-PAGEを行い、泳動終了後、ゲルをトランスファーバッファー(25mMトリス、192mMグリシン、20%メタノール、pH8.3)に5分間浸し、あらかじめ100%メタノール及びトランスファーバッファーの順に浸しておいたPVDF膜上に重ね、トランスブロットSDセル(TRANS-BLOT SD CELL)(バイオ・ラッド製)を用いて7Vで1時間転写を行った。この膜を5%スキムミルクを含むPBSで4、一夜マスキングの後、PBS-Tで洗浄し、5%スキムミルクを含むPBS-Tで1,000倍に希釈した抗HPGp130ポリペプチドモルモット血清を室温で2時間反応させた。PBS-Tで洗浄後、5%スキムミルクを含むPBS-Tで2,000倍に希釈したペロオキシダーゼ標識抗モルモットIgG(ザイメット(Zymed)製)を室温で2時間反応させた。さらに、PBS-Tで洗浄後、10ml当たり、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB、同仁化学製)5mg及び過酸化水素水3 $\mu$ lを含む0.1Mトリス塩酸バッファー(pH7.5)に浸し反応させた。その結果、抗HPGp130ポリペプチドモルモット血清はHPGp130ポリペプチド及びその前駆体と考えられる分子量約160Kdのバンドを認識した(図6)。

20

## 7) HPGp130ポリペプチドの免疫原性

前記と同様の方法に従い、HPGp130ポリペプチド溶液(約40 $\mu$ g/ml)を同量のフロインドの完全アジュバントで調製したエマルジョン0.5ml(約10 $\mu$ gのHPGp130ポリペプチドを含有する)を10羽の5週齢の白色レグホンSPF鶏脚部皮下に注射し、免疫した。3週間後に、フロインドの不完全アジュバントで上記と同様に調製したエマルジョン0.5mlを脚部皮下に注射した。さらに2週間後に、フロインドの不完全アジュバントで調製した同エマルジョンを脚部皮下に追加投与し、初回免疫後7週目にヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株で攻撃した。他に対照として、水酸化アルミニウムゲル(アルミニウム量換算で0.5mg/ml)を添加した0.25%ホルマリン不活化A型菌221株(不活化前生菌数4 $\times$ 10<sup>8</sup>個/ml)0.5mlを3週間の間隔で2回免疫した群及び非免疫群をおき、同様な攻撃を行った。その結果を表2に示す。HPGp130ポリペプチドあるいはホルマリン不活化菌を免疫した群はいずれも全羽について発症防御が認められた。非免疫群では全羽発症した。

30

40

表2

免疫群	供試羽数	防御羽数	防御率(%)
精製HPGp130	10	10	100
ホルマリン不活化221株	10	10	100
非接種対照	8	0	0

50

実施例 3 : ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌由来のポリペプチド ( A 型 H M T p 2 1 0 ) をコードする遺伝子のクローニング

1 ) ゲノムライブラリーからのスクリーニング

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株を鶏血清加鶏肉汁培地 5 m l に接種し、3 7 で一夜振盪培養した後、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を P B S で遠心洗浄後、セパジーンキット ( 三光純薬製 ) を用い、添付のプロトコールに従って該菌体の D N A を抽出・精製した。これを 5 0 μ l の T E バッファー ( 1 m M E D T A を含む 1 0 m M トリス塩酸バッファー、p H 8 . 0 ) に溶解してゲノム D N A 溶液とした。次に、c D N A ラピッド・クローニング・モジュール ( rapid cloning module ) - g t 1 1 ( アマシャム製 ) を用い、添付のプロトコールに従って、制限酵素 E c o R I で消化した該ゲノム D N A 0 . 2 μ g を、同様に制限酵素 E c o R I で処理した g t 1 1 アーム 0 . 5 μ g に連結させ、さらに - D N A イン・ビトロ・パッケージング・モジュール ( in vitro packaging module ) ( アマシャム製 ) を用い、添付のプロトコールに従って、ラムダファージに導入した。得られたリコンビナントファージ液をゲノムライブラリーとした。

上記ゲノムライブラリー液を、1 0 m M 硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した大腸菌 Y 1 0 9 0 株 ( アマシャム製 ) 約 1 0 <sup>8</sup> 個に加え、3 7 で 1 5 分間吸着させた。さらに 4 5 に加温した重層用 L B 軟寒天培地 ( 1 0 0 0 m l 中、トリプトン 1 0 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 1 0 g、アンピシリン 5 0 m g、マルトース 4 g、寒天 8 g を含む、p H 7 ) を加え、L B 寒天培地 ( 1 0 0 0 m l 中、トリプトン 1 0 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 1 0 g、アンピシリン 5 0 m g、寒天 1 5 g を含む、p H 7 ) に重層し、4 2 で 3 時間インキュベートした。次に、1 0 m M イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド ( I P T G ) 水溶液に浸し、風乾したニトロセルロース膜を上記のプレートに重層し、さらに 3 7 で一夜インキュベートした。ニトロセルロース膜をプレートより剥がし、P B S - T で洗浄後、5 % スキムミルクを含む P B S で室温、2 時間マスキングを行った。以後、実施例 2 の 6 ) と同様の方法に従い、抗 H P G p 1 3 0 ポリペプチドモルモット血清、ペルオキシダーゼ標識抗モルモット I g G 及び基質を順次反応させた。これらの一連の操作により、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株由来の抗 H P G p 1 3 0 モルモット血清と特異的に反応する抗原を発現しているプラークを得た。約 5 , 0 0 0 プラークを上記イムノスクリーニングすることで 4 3 個の陽性プラークが得られた。該陽性プラークを S M バッファー ( 0 . 1 M 塩化ナトリウム、1 0 m M 硫酸マグネシウム及び 0 . 0 1 % ゼラチンを含む 5 0 m M トリス塩酸バッファー、p H 7 . 5 ) に回収し、クロロホルムを数滴加え、4 に保存した。回収した陽性プラークのうち 1 0 個について、一次スクリーニングと同様な操作で二次、三次スクリーニングを行った。

イムノスクリーニングで陽性となった組換え g t 1 1 ファージを、1 0 m M 硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した大腸菌 Y 1 0 9 0 株約 1 0 <sup>8</sup> 個に加え、3 7 で 1 5 分間吸着させた。さらに 0 . 4 % マルトース、5 m M 塩化カルシウム及びアンピシリン 5 0 μ g / m l を含む L B 液体培地 1 0 m l を加え、3 7 で一夜培養した。クロロホルムを数滴加えて溶菌させた後、遠心により未溶菌の大腸菌及びその老廃物等を除去した培養上清 5 m l に等量の 2 0 % ポリエチレングリコール 6 , 0 0 0 を含む 2 . 5 M 塩化ナトリウム水溶液を加え、氷中に 1 時間放置した後、1 0 , 0 0 0 r p m の遠心により g t 1 1 ファージを沈殿させ、フェノール処理、イソプロパノール沈澱により該ファージ D N A を回収した。得られたファージ D N A 約 1 5 0 μ g を E c o R I で消化後、0 . 8 % アガロースゲル電気泳動を行うことにより、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 2 2 1 株由来の D N A 断片を分離し、セファグラス ( S e p h a g l a s ) <sup>TM</sup> バンドプレップ・キット ( B a n d P r e p K i t ) ( ファルマシア製 ) を用い、添付のプロトコールに従って、ゲルから該 D N A 断片を溶出、回収した。1 0 個の陽性ファージから得られた D N A 断片はいずれも約 1 . 2 k b であった。そのうちの 1 個のクローン ( クローン 2 ) のファージから得られた D N A 断片 ( 以下、H P G 1 . 2 k D N A と称する ) を以下の試験に用いた。

2 ) H P G 1 . 2 k D N A 断片の塩基配列

プラスミド pUC119 (宝酒造製) を EcoRI で消化した後、5'末端リン酸をアルカリフォスファターゼ処理により除去し、開裂した pUC119 DNA をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈澱により回収した。開裂した pUC119 と上記の HPG1.2k DNA 断片を DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結し、コンピテントな大腸菌 JM109 株 (宝酒造製) を形質転換後、50 µg/ml のアンピシリンを含むサークルグロウ寒天培地 (BIO 101 製) で 37 °C、一夜培養した。寒天培地上に生育したコロニーを 50 µg/ml のアンピシリンを含むサークルグロウ培地 0.5 ml に接種し、37 °C で 5 時間培養後、アルカリ法で菌体内のプラスミドを抽出し、EcoRI で消化後、0.8% アガロースゲル電気泳動によってヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株由来の 1.2 kb DNA 断片と同じ長さの DNA 断片

10

を含む組換えプラスミドを検出することにより形質転換大腸菌を得た。得られた形質転換大腸菌を 50 µg/ml のアンピシリンを含むサークルグロウ培地で培養後、PEG 沈澱法によって菌体内の組換えプラスミド (以下、pUA1.2 と称する) を回収し、プライマーウォーキング (Primer Walking) 法により、HPG1.2k DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサー (アプライド・バイオシステムズ 377 型) を用いて解析した。その結果、1170 塩基の配列が決定された。配列番号: 1 に、後述の A 型 HMTp210 ポリペプチドの塩基配列を示すが、HPG1.2k DNA の塩基配列はこの配列の 1988 番目から 3157 番目に相当し、389 アミノ酸をコードできること、開始及び終始コдонはこの配列内に存在しないことが明らかになった。対応するアミノ酸配列も示すが、HPGp130 ポリペプチドの N 末端側アミノ酸配列に相当する配列も認められなかった。従って、HPG1.2k DNA は HPGp130 ポリペプチドの一部をコードしていると考えられた。

20

### 3) HPG3.5k DNA のクローニング

上記の HPG1.2k DNA 断片約 0.3 µg を DIG-DNA 標識キット (ベーリンガー・マンハイム製) を用い、添付のプロトコールに従って、ジゴキシゲニン (DIG) で標識した。ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株ゲノム DNA を数種の制限酵素で切断後、適当量を 0.8% アガロースゲル電気泳動にかけ、泳動後にハイボンド N+ 膜 (アマシャム製) にトランスファーした。次に上記の DIG 標識 HPG1.2k DNA をプローブとして、DIG 標識核酸検出キット (ベーリンガー・マンハイム製) を用い、添付のプロトコールに従ってサザンハイブリダイゼーションを行い、目的の DNA を検出した。その結果、HindIII で消化した約 3.5 kb 断片が DIG 標識 HPG1.2k DNA とハイブリダイズしたことから、この断片を 0.8% アガロースゲル電気泳動で各断片から分離し、セファグラス™ バンドプレップ・キットを用い、添付のプロトコールに従って、ゲルから DNA 断片を溶出、回収した。

30

一方、プラスミド pUC119 を同じく HindIII で消化した後、5'末端リン酸をアルカリフォスファターゼ処理により除去し、開裂した pUC119 DNA をフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈澱により回収した。開裂した pUC119 とヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株ゲノム由来の前記 HindIII 消化物 (約 3.5 kb) を DNA ライゲーションキット ver. 2 を用いて連結し、コンピテントな大腸菌 JM109 株を形質転換後、50 µg/ml のアンピシリンを含むサークルグロウ寒天培地

40

で 37 °C、一夜培養した。形質転換大腸菌が生育した寒天培地にハイボンド N+ 膜を載せ、コロニーをリフト後、上記の DIG 標識 HPG1.2k DNA をプローブとして、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行い、DIG 標識核酸検出キットを用いて陽性クローンを選別した。この陽性クローンを 50 µg/ml のアンピシリンを含むサークルグロウ培地で培養し、PEG 沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミド (以下、pUA3.5 と称する) を HindIII で消化後、0.8% アガロースゲル電気泳動を行うことにより、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株由来の 3.5 kb DNA 断片を分離し、セファグラス™ バンドプレップ・キットを用い、ゲルから該 DNA 断片 (以下、HPG3.5k DNA と称する) を溶出、回収した。なお、組換えプラスミド

50

で形質転換した大腸菌 U A 3 . 5 J M は F E R M B P - 6 0 8 3 とし、 1 9 9 6 年 9 月 5 日 に 工 業 技 術 院 生 命 工 学 工 業 技 術 研 究 所 ( 茨 城 県 つ く ば 市 東 1 丁 目 1 番 3 号 ) に 出 願 人 に よ り 寄 託 さ れ て い る。

#### 4 ) H P G 3 . 5 k D N A の 発 現

発現ベクター p T r c H i s C ( イ ン ビ ト ロ ジ ェ ン 製 ) を H i n d I I I で 消 化 後、 5 ' 末 端 リ ン 酸 を ア ル カ リ フ オ ス フ ァ ー ゼ 処 理 に よ り 除 去 し、 開 裂 し た p T r c H i s C D N A を フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈澱により回収した。開裂した p T r c H i s C と 上 記 の H P G 3 . 5 k D N A を D N A ラ イ ゲ ー シ ョ ン キ ャ ッ ト v e r . 2 を 用 い て 連 結 し、 コ ン ピ ー テ ン ト な 大 腸 菌 J M 1 0 9 株 を 形 質 転 換 後、 5 0 μ g / m l の ア ン ピ シ リ ン を 含 む サ ー ク ル グ ロ ウ 寒 天 培 地 で 3 7 ° C 、 一 夜 培 養 し た。 寒 天 培 地 上 に 生 育 し た コ ロ ニ ー を 5 0 μ g / m l の ア ン ピ シ リ ン を 含 む サ ー ク ル グ ロ ウ 培 地 0 . 5 m l に 接 種 し、 3 7 ° C で 5 時 間 培 養 後、 ア ル カ リ 法 で 菌 体 内 の プ ラ ス ミ ド を 抽 出 し、 H i n d I I I で 消 化 後、 0 . 8 % ア ガ ロ ー ス ゲ ル 電 気 泳 動 に よ っ て ヘ モ フ ィ ル ス ・ パ ラ ガ リ ナ ル ム A 型 菌 2 2 1 株 由 来 の 3 . 5 k b D N A 断 片 と 同 じ 長 さ の D N A 断 片 を 含 む 組 換 え プ ラ ス ミ ド を 検 出 す る こ と に よ り 形 質 転 換 大 腸 菌 を 得 た。

さ ら に、 得 ら れ た 形 質 転 換 大 腸 菌 を 5 0 μ g / m l の ア ン ピ シ リ ン を 含 む サ ー ク ル グ ロ ウ 培 地 1 m l に 接 種 し、 3 7 ° C で 3 時 間 培 養 し た 後、 I P T G ( 終 濃 度 1 m M ) を 加 え、 さ ら に 3 7 ° C で 3 時 間 培 養 し た。 培 養 液 よ り 菌 体 を 遠 心 で 集 菌 し、 P B S 5 0 μ l に 懸 濁 し た。 1 0 μ l の 菌 懸 濁 液 と 等 量 の 2 % S D S を 混 合 し、 5 分 間 煮 沸 後、 2 μ l を ニ ト ロ セ ル ロ ー ス 膜 に ス ポ ッ ト し た。 ニ ト ロ セ ル ロ ー ス 膜 を 風 乾 後、 5 % ス キ ム ミ ル ク を 含 む P B S で 4 ° C 、 一 夜 マ ス キ ン グ を 行 っ た。 以 後、 実 施 例 2 の 6 ) と 同 様 の 方 法 に 従 い、 抗 H P G p 1 3 0 ポ リ ペ プ チ ド モ ル モ ッ ト 血 清、 ベ ル オ キ シ ダ ー ゼ 標 識 抗 モ ル モ ッ ト I g G 及 び 基 質 を 順 次 反 応 さ せ た。 こ れ ら の 一 連 の 操 作 に よ り、 H P G 3 . 5 k D N A が 正 方 向 に 連 結 し た 組 換 え プ ラ ス ミ ド で 形 質 転 換 さ れ た、 抗 H P G p 1 3 0 モ ル モ ッ ト 血 清 と 特 異 的 に 反 応 す る 抗 原 を 発 現 し て い る 大 腸 菌 を 得 た。

#### 5 ) H P G 3 . 5 k - H I S ポ リ ペ プ チ ド の 免 疫 原 性

得 ら れ た 形 質 転 換 大 腸 菌 を 5 0 μ g / m l の ア ン ピ シ リ ン を 含 む サ ー ク ル グ ロ ウ 培 地 2 0 0 m l に 接 種 し、 3 7 ° C で 3 時 間 培 養 し た 後、 I P T G ( 終 濃 度 1 m M ) を 加 え、 さ ら に 3 7 ° C で 3 時 間 培 養 し た。 培 養 液 よ り 菌 体 を 遠 心 で 集 菌 し、 P B S 1 0 m l に 懸 濁 し た。 こ の 懸 濁 液 に リ ゴ チ ー ム を 1 0 0 μ g / m l に な る よ う に 加 え、 4 ° C で 1 時 間 反 応 さ せ た 後、 超 音 波 処 理 ( ブ ラ ン ソ ン ・ ソ ニ フ ェ イ ア ー 3 5 0 ) を 4 ° C で 1 0 分 間 行 い、 溶 菌 さ せ た。 遠 心 に よ り 未 破 碎 の 菌 を 除 去 し、 得 ら れ た 上 清 を 粗 H P G 3 . 5 k - H I S ポ リ ペ プ チ ド と し た。

粗 H P G 3 . 5 k - H I S ポ リ ペ プ チ ド 溶 液 と 同 量 の フ ロ イ ン ド の 完 全 ア ジ ュ バ ン ト を 充 分 混 和 し た エ マ ル ジ ョ ン 0 . 5 m l を 1 0 羽 の 8 週 齢 の 白 色 レ グ ホ ン S P F 鶏 脚 部 皮 下 に 注 射 し、 免 疫 し た。 約 3 週 間 後 に、 フ ロ イ ン ド の 不 完 全 ア ジ ュ バ ン ト で 上 記 と 同 様 に 調 製 し た エ マ ル ジ ョ ン 0 . 5 m l を 脚 部 皮 下 に 注 射 し た。 さ ら に 2 週 間 後 に、 フ ロ イ ン ド の 不 完 全 ア ジ ュ バ ン ト で 調 製 し た 同 エ マ ル ジ ョ ン を 脚 部 皮 下 に 追 加 投 与 し、 初 回 免 疫 後 7 週 目 に ヘ モ フ ィ ル ス ・ パ ラ ガ リ ナ ル ム A 型 菌 2 2 1 株 で 攻 撃 し た。 他 に 対 照 と し て、 実 施 例 2 の 7 ) と 同 様 に、 ホ ル マ リ ン 不 活 化 A 型 菌 2 2 1 株 免 疫 群 及 び 非 免 疫 群 を お き、 同 様 な 攻 撃 を 行 っ た。 そ の 結 果 を 表 3 に 示 す。 粗 H P G 3 . 5 k - H I S ポ リ ペ プ チ ド 免 疫 群 は 1 0 羽 中 7 羽 に 発 症 防 御 が 認 め ら れ た。 ホ ル マ リ ン 不 活 化 菌 を 免 疫 し た 群 で は 全 羽 発 症 防 御 し、 非 免 疫 群 は 全 羽 発 症 し た。

10

20

30

40

表3

免疫群	供試羽数	防御羽数	防御率 (%)
粗HPG3.5k-HIS	10	7	70
ホルマリン不活化221株	10	10	100
非接種対照	8	0	0

## 6) HPG3.5k DNA断片の塩基配列

HPG3.5k DNA断片の塩基配列は、前記と同様にDNAシーケンサーにより解析した。その結果、3450塩基の配列が決定された。このHPG3.5k DNA断片の塩基配列は、配列表の配列番号：1に記載の1番目から3450番目の塩基配列に相当する。なお、HPGp130ポリペプチドのN末端側アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列をコードする領域を見出した。HPG3.5k DNAからHPGp130ポリペプチドと同じフレームでオープンリーディングフレームを求めたところ、塩基番号243から翻訳され1069個のアミノ酸をコードすることが明らかとなった。該DNA断片の配列内には終止コドンはなく、HPG3.5k DNAはHPGp130ポリペプチドの一部をコードするDNAと推測された。対応するアミノ酸配列も示す。

## 7) HPG4.1k DNAのクローニング

上記のHPG3.5k DNA断片を前記と同様にDIGで標識した。次にヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株ゲノムDNAを制限酵素XhoIとXbaIで切断後、実施例3の3)と同様の方法に従い、DIG標識HPG3.5k DNAあるいはDIG標識HPG1.2k DNAをプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、DIG標識HPG3.5k DNAをプローブとした場合、約5.5kb、約4.1kbおよび約1kbのDNAが検出された。また、DIG標識HPG1.2k DNAをプローブとした場合、約4.1kbおよび約1kbのDNAが検出された。図7に示すように、HPG3.5k DNA断片内には、2箇所のXhoI切断部位が存在するため、約5.5kbのDNAは最初のXhoI切断部位より5'側の断片、約4.1kbのDNAは2番目のXhoI切断部位より3'側の断片、そして約1kbのDNAは2箇所のXhoI切断部位には含まれた断片と考えられた。そこで、約4.1kbの断片を0.8%アガロースゲル電気泳動で各断片から分離、回収した。

次に、図8に示すように、プラスミドpSP72(プロメガ(Promega)製)を同じくXhoIとXbaIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株ゲノム由来の前記XhoI-XbaI消化物(約4.1kb)を連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換大腸菌から、上記のDIG標識HPG3.5k DNAをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行い陽性クローンを選別した。

この陽性クローンを50μg/mlのアンピシリンを含むサークルグロウ培地で培養し、PEG沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。このヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株由来の約4.1kbのXhoI-XbaI消化断片(以下、HPG4.1k DNAと称する)が組み込まれたプラスミド(以下、pSA4.1と称する)をXhoIとKpnIで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行うことにより、上記のHPG4.1k DNAにプラスミドpSP72由来のXbaI-KpnI断片が付加された約4.1kbのDNA断片を分離、回収した。

## 8) HPG4.1k DNAの発現

実施例3の4)と同様の方法に従い、発現ベクターpTrcHisCをXhoIとKpnIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、上記の約4.1kbのXhoI-KpnI消化DNA断片を連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換大腸菌の中から、HPG4.1k DNAが正方向に連結した組換えプラスミドで形質転換された、抗

10

20

30

40

50

HPG p 130 モルモット血清と特異的に反応する抗原を発現している大腸菌を得た。

9) HPG 4.1 k - HIS ポリペプチドの免疫原性

得られた形質転換大腸菌を 50 µg/ml のアンピシリンを含むサークルグロウ培地 200 ml に接種し、37 °C で 3 時間培養した後、IPTG (終濃度 1 mM) を加え、さらに 37 °C で 3 時間培養した。培養液より菌体を遠心で集菌し、PBS 10 ml に懸濁した。この懸濁液にリゾチームを 100 µg/ml になるように加え、4 °C で 1 時間反応させた後、超音波処理を 4 °C で 10 分間行い、溶菌させた。遠心により未破碎の菌を除去し、得られた上清を粗 HPG 4.1 k - HIS ポリペプチドとした。

粗 HPG 4.1 k - HIS ポリペプチド溶液と同量のフロイドの完全アジュバントを充分混和したエマルジョン 0.5 ml を 10 羽の 5 週齢の白色レグホン SPF 鶏脚部皮下に注射し、免疫した。約 3 週間後に、フロイドの不完全アジュバントで上記と同様に調製したエマルジョン 0.5 ml を脚部皮下に注射した。さらに 2 週間後に、フロイドの不完全アジュバントで調製した同エマルジョンを脚部皮下に追加投与し、初回免疫後 7 週目にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株で攻撃した。他に対照として、実施例 2 の 7) と同様に、ホルマリン不活化 A 型菌 221 株免疫群及び非免疫群をおき、同様な攻撃を行った。その結果を表 4 に示す。粗 HPG 4.1 k - HIS ポリペプチド免疫群は 10 羽中 10 羽に発症防御が認められた。ホルマリン不活化菌を免疫した群では全羽発症防御し、非免疫群は全羽発症した。

10

表 4

免疫群	供試羽数	防御羽数	防御率 (%)
粗 HPG 4.1 k - HIS	10	10	100
ホルマリン不活化 221 株	10	10	100
非接種対照	10	0	0

20

10) HPG 4.1 k DNA 断片の塩基配列

HPG 4.1 k DNA 断片の HPG 3.5 k DNA 断片とオーバーラップしない部分の塩基配列、すなわち、HindIII 切断部位から XbaI 切断部位までの塩基配列を、前述と同様に、DNA シークエンサーにより解析した。その結果、2831 塩基の配列が決定された。HPG 4.1 k DNA 断片のうち解析した塩基配列は、配列表の配列番号：1 に記載の 3445 番目から 6275 番目の塩基配列に相当する。なお、該 DNA 断片の配列内には終止コドンは見い出されなかった。対応するアミノ酸配列も示す。

30

11) HPG 6.7 k DNA のクローニング

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株ゲノム DNA を XhoI と PstI で切断後、実施例 3 の 3) と同様の方法に従い、前述の DIG 標識 HPG 3.5 k DNA あるいは DIG 標識 HPG 1.2 k DNA をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、DIG 標識 HPG 3.5 k DNA をプローブとした場合、約 9.4 kb、約 6.7 kb および約 1 kb の DNA が検出された。また、DIG 標識 HPG 1.2 k DNA をプローブとした場合、約 6.7 kb および約 1 kb の DNA が検出された。前述のように、HPG 3.5 k DNA 断片内には、2 箇所の XhoI 切断部位が存在するため、約 9.4 kb の DNA は最初の XhoI 切断部位より 5' 側の断片、約 6.7 kb の DNA は 2 番目の XhoI 切断部位より 3' 側の断片、そして約 1 kb の DNA は 2 箇所の XhoI 切断部位にはさまれた断片と考えられた。そこで、約 6.7 kb の断片を 0.8% アガロースゲル電気泳動で各断片から分離、回収した。

40

次に、図 9 に示すように、プラスミド pSP72 を同じく XhoI と PstI で消化し、5' 末端を脱リン酸化後、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 221 株ゲノム由来の前記 XhoI - PstI 消化物 (約 6.7 kb) を連結し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。得られた形質転換大腸菌から、上記の DIG 標識 HPG 3.5 k DNA をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンを選別した。

50

この陽性クローンを50 µg/mlのアンピシリンを含むサークルグロウ培地で培養し、PEG沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミドを以下、pSA6.7と称する。なお、組換えプラスミドで形質転換した大腸菌SA6.7JMはBP-6081として、1997年8月27日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に出願人により寄託されている。

#### 12) HPG2.7k DNAのクローニング

得られた組み換えプラスミド(pSA6.7)に組み込まれた約6.7 kbのDNA断片(以下、HPG6.7k DNAと称する)は、前述のHPG4.1k DNA断片を含むことから、HPG6.7k DNAからHPG4.1k DNA断片を除いた約2.7 kbの断片(以下、HPG2.7k DNAと称する)のサブクローニングを行った。pSA6.7をXbaIで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行うことにより、上記のHPG2.7k DNA断片にプラスミドpSP72由来のPstI-XbaI断片が付加された約2.7 kbのDNA断片を分離、回収した。

10

次に、プラスミドpSP72を同じくXbaIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、上記の約2.7 kbのXbaI消化DNA断片を連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。さらに、得られた形質転換大病菌を50 µg/mlのアンピシリンを含むサークルグロウ培地で培養し、PEG沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミドを以下、pSA2.7と称する。

#### 13) HPG2.7k DNA断片の塩基配列

HPG2.7k DNA断片の塩基配列は、前記と同様にDNAシーケンサーにより解析した。その結果、2661塩基の配列が決定された。このHPG2.7k DNA断片の塩基配列は、配列表の配列番号：1に記載の6270番目から8930番目の塩基配列に相当する。また、該DNA断片の配列内には終止コドンが見い出された。対応するアミノ酸配列も示す。

20

配列表の配列番号：1に記載の塩基配列は、全長8930塩基からなる塩基配列であり、その中に塩基番号243から翻訳され2042個のアミノ酸をコードできるオープンリーディングフレームが存在することが明らかとなった。この2042個のアミノ酸からなるポリペプチドを以下A型HMTp210と称する。既存のデータベース(GeneBank及びEMBL)とのホモロジー検索を行ったところ、既知の塩基配列あるいはアミノ酸配列とのホモロジーが認められなかったことから、A型HMTp210ポリペプチドは新規物質と考えられた。

30

また、配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の中に塩基番号8375から翻訳され185個のアミノ酸をコードできるオープンリーディングフレームの存在の可能性が示された。なお、この配列内に終止コドンは見い出されなかった。既存のデータベース(GeneBank及びEMBL)とのホモロジー検索を行ったところ、既知の塩基配列あるいはアミノ酸配列とのホモロジーが認められなかったことから、このオープンリーディングフレームがコードするポリペプチドも新規物質と考えられた。

**実施例4：**HPG1.2k DNAとハイブリダイズするDNA断片のヘモフィルス・パラガリナルム221株以外からの検索

実施例3の1)と同様の方法に従い、A型菌の221株、083株、W株、Germany株及びGeorgia株、B型菌のSpross株及び0222株、C型菌のModesto株及び53-47株の計9株からゲノムDNAを調製した。調製したゲノムDNAを制限酵素EcoRIで切断後、実施例3の3)と同様の方法に従い、DIG標識HPG1.2k DNAをプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、血清型によってサイズが異なるものの、いずれの株にもHPG1.2k DNAとハイブリダイズする断片が検出された(図10)。

40

**実施例5：**ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌由来のポリペプチド(C型HMTp210)をコードする遺伝子のクローニング

#### 1) ゲノムライブラリーからのスクリーニング

実施例3の1)と同様の方法に従い、C型菌53-47株のゲノムライブラリーを作製し

50

た。すなわち、制限酵素 *Hind* III で消化した C 型菌 53-47 株のゲノム DNA を、*c* DNA ラピッド・クローニング・モジュール - *gt* 11 を用い、同様に制限酵素 *Hind* III で処理した DASH II (ストラタジーン (STRATAGENE) 製) アームに連結させ、さらに *-* DNA イン・ビトロ・パッケージング・モジュールを用い、ラムダファージに導入した。得られたリコンビナントファージ液をゲノムライブラリーとした。

上記ゲノムライブラリー液を、10 mM 硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した大腸菌 *XL1-Blue* MRA (P2) 株 (ストラタジーン製) 約  $10^8$  個に加え、37 °C で 15 分間吸着させた。さらに 45 °C に加温した重層用 LB 軟アガロース培地 (1000 ml 中、トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 10 g、アンピシリン 50 mg、マルトース 4 g、アガロース 8 g を含む、pH 7) を加え、LB 寒天培地に重層し、37 °C で一夜培養した。大腸菌が生育した寒天培地にハイボンド N+ 膜を載せ、ファージブランクをリフト後、前述の DIG 標識 A 型 HPG 3.5 k DNA をプローブとして、常法に従ってブランクハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンを選別した。約 1,000 ブランクを上記イムノスクリーニングすることで 37 個の陽性ブランクが得られた。得られた陽性ブランクのうち 10 個について、一次スクリーニングと同様な操作で二次、三次スクリーニングを行った。

ブランクハイブリダイゼーションで陽性となった組換え DASH II ファージを、10 mM 硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した大腸菌 *XL1-Blue* MRA 株 (ストラタジーン製) 約  $10^8$  個に加え、37 °C で 15 分間吸着させた。実施例 3 の 1) と同様の方法に従い、該ファージ DNA を回収した。得られたファージ DNA を *Hind* III で消化後、0.8% アガロースゲル電気泳動を行うことにより、ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌 53-47 株由来の DNA 断片を分離、回収した。10 個の陽性ファージから得られた DNA 断片はいずれも約 13.5 kb であった。そのうちの 1 個のクローン (クローン 1) のファージから得られた DNA 断片 (以下、HPG-C1 DNA と称する) を以下の試験に用いた。

#### 2) HPG-C1 DNA の断片化及びサブクローニング

HPG-C1 DNA は約 13.5 kb とかなり大きく、そのままではプラスミドベクターにサブクローニングするのは困難であることから、HPG-C1 DNA を数種の制限酵素で切断後、適当量を 0.8% アガロースゲル電気泳動にかけたところ、*Xba*I で消化した場合に、約 6.9 kb、約 5.6 kb 及び約 0.9 kb の DNA を検出した。

プラスミド pUC119 を *Hind* III と *Xba*I で消化し、5' 末端を脱リン酸化後、上記の HPG-C1 DNA の *Xba*I 消化物を連結し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。さらに、約 5.6 kb あるいは約 0.9 kb DNA 断片を含む組換えプラスミドで形質転換された大腸菌を培養し、PEG 沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミド (約 5.6 kb あるいは約 0.9 kb DNA 断片を含む組換えプラスミドをそれぞれ以下、pU-C2、pU-C3 と称する) を *Hind* III - *Xba*I で消化後、0.8% アガロースゲル電気泳動を行うことにより、約 5.6 kb 及び約 0.9 kb の DNA 断片 (以下、HPG-C2 DNA 及び HPG-C3 DNA と称する) をそれぞれ分離、回収した。なお、組換えプラスミド pU-C2 で形質転換した大腸菌 U-C2 JM は BP-6082 として、1997 年 8 月 27 日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に出願人により寄託されている。

また、プラスミド pUC119 を *Xba*I で消化し 5' 末端を脱リン酸化後、前述の HPG-C1 DNA の *Xba*I 消化物を連結し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。さらに、約 6.9 kb DNA 断片を含む組換えプラスミドで形質転換された大腸菌を培養し、PEG 沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミド (以下、pU-C4 と称する) を *Xba*I で消化後、0.8% アガロースゲル電気泳動を行うことにより、約 6.9 kb の DNA 断片 (以下、HPG-C4 DNA と称する) を分離、回収した。尚、組換えプラスミド pU-C4 で形質転換した大腸菌 U-C4 JM は BP-6080 として、1997 年 8 月 27 日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県

10

20

30

40

50

つくば市東1丁目1番3号)に出願人により寄託されている。

得られたDNA断片HPG-C2、HPG-C3およびHPG-C4をそれぞれハイボン  
ドN+膜にスポットした。次に前述のDIG標識HPG3.5k DNAあるいは実施例  
3の3)と同様にDIGで標識したHPG4.1k DNA、HPG2.7k DNAをプ  
ローブとして、ドットハイブリダイゼーションを行った。DIG標識HPG3.5k D  
NAあるいはHPG4.1k DNAをプローブとした場合、HPG-C4 DNAを検出  
した。また、DIG標識HPG2.7k DNAをプローブとした場合、HPG-C2 D  
NAを検出した。このことから、図11に示すように、5'側からHPG-C3、HPG  
-C4、HPG-C2の順番に並んでおり、ポリペプチドをコードしている部分は、主に  
HPG-C4にあると考えられた。

10

### 3) HPG-C4 DNA断片の塩基配列

HPG-C4 DNA断片の塩基配列は、前記と同様にDNAシーケンサーにより解析  
した。その結果、6871塩基の配列が決定された。このHPG-C4 DNA断片の塩  
基配列は、配列表の配列番号：5に記載の1番目から6871番目の塩基配列に相当す  
る。なお、A型HMTp210をコードする遺伝子と相溶性が高いことが見いだされたこと  
から、HPG-C4 DNAからA型HMTp210をコードする遺伝子と同じフレーム  
でオープンリーディングフレームを求めたところ、塩基番号848から翻訳され2008  
個のアミノ酸をコードすることが明らかとなった。しかしながら、該DNA断片の配列内  
には終止コドンは見いだされなかった。対応するアミノ酸配列も示す。

20

### 4) HPG-C2 DNA断片の一部の塩基配列

HPG-C4 DNA断片の配列内には終止コドンが見いだされなかったことから、HP  
G-C4 DNA断片より3'側のHPG-C2 DNA断片の5'側の部分の塩基配列の  
解析を行った。図11に示すように、HPG-C2 DNA断片に3箇所のアccI切断  
部位が存在し、クローニング部位であるXbaI切断部位から最初のaccI切断部位ま  
でのサイズが約0.6Kbであることがアガロースゲル電気泳動により判明したことから  
、この約0.6Kbの塩基配列を、前記と同様にDNAシーケンサーにより解析した。  
その結果、621塩基の配列が決定された。このHPG-C2 DNA断片の一部の塩基  
配列は、配列表の配列番号：5に記載の6866番目から7486番目の塩基配列に相当  
する。また、このHPG-C2 DNA断片の一部の配列内に終止コドンが見いだされた  
。対応するアミノ酸配列も示す。

30

配列表の配列番号：5に記載の塩基配列は、全長7486塩基からなる塩基配列であり、  
その中に塩基番号848から翻訳され2039個のアミノ酸をコードできるオープンリー  
ディングフレームが存在することが明らかとなった。この2039個のアミノ酸からなる  
ポリペプチドを以下、C型HMTp210と称する。既存のデータベース(GeneBank及びEMBL)とのホモロジー検索を行ったところ、既知の塩基配列あるいはアミノ  
酸配列とのホモロジーが認められなかったことから、C型HMTp210ポリペプチドは  
新規物質と考えられた。

また、C型HMTp210ポリペプチドをコードする塩基配列とA型HMTp210ポリ  
ペプチドをコードする塩基配列のホモロジーを調べたところ、約80%のホモロジーがあ  
ること、さらに、5'側の約3.4kbの領域と3'側の約1.2kbの領域が非常にホ  
モロジーが高いこと、2つの領域には含まれた約1.5kbの領域はホモロジーが低いこ  
とが明らかとなった。また、これらの遺伝子にコードされるポリペプチドについても、同  
様のことが認められた。

40

### 実施例6：A型菌、B型菌及びC型菌由来ゲノムDNAからのHMTp210遺伝子のPCR増幅

実施例3の1)と同様の方法に従い、A型菌の221株、083株、W株、Germany株及  
びGeorgia株、B型菌のSpross株及び0222株、C型菌のModesto株及び53-47  
株の計9株からゲノムDNAを調製した。また、A型HMTp210ポリペプチドをコー  
ドする塩基配列をもとに、上流側のPCRプライマーとして配列番号：3に記載の塩基配  
列を有する合成DNAを、下流側のPCRプライマーとして配列番号：4に記載の塩基配

50

列を有する合成DNAを作製した。これらのプライマーは、それぞれ5'末端にBamHI認識配列を付加させ、また、A型HMTp210ポリペプチドの翻訳領域の全長を増幅できるようにデザインした。これらのプライマーを用いて、上記の調製したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCR反応はLA PCRキットver.2(宝酒造製)を用い以下の条件、すなわち、94℃で1分間の反応の後、98℃で40秒間、60℃で10分間の反応を30サイクル行い、72℃で10分間反応させた。得られたPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動で分析したところ、いずれの株にも約6.1Kbのサイズの増幅フラグメントが認められた(図12)。

#### 実施例7：完全長のA型及びC型HMTp210ポリペプチドの発現

##### 1) A型HMTp210ポリペプチドの発現

10

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株ゲノムDNAを鋳型として、実施例6で得られたPCR産物をBamHIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、約6.1Kbの増幅フラグメントを、セファグラス™バンドプレップ・キットを用い溶出、回収した。

プラスミドpUC119をBamHIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、上記の約6.1kbの増幅フラグメントを連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。さらに、約6.1kb DNA断片を含む組換えプラスミドで形質転換された大腸菌を培養し、PEG沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミド(以下、pU-AP1と称する)をBamHIで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行うことにより、約6.1kb DNA断片(以下、HPG-AP1 DNAと称する)を分離、回収した。

20

実施例3の4)と同様の方法に従い、発現ベクターpTrcHisA(インビトロジェン製)をBamHIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、上記のHPG-AP1 DNAを連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換大腸菌の中から、HPG-AP1 DNAが正方向に連結した組換えプラスミドで形質転換された、抗HPGp130モルモット血清と特異的に反応する抗原を発現している大腸菌を得た。

##### 2) C型HMTp210ポリペプチドの発現

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌53-47株ゲノムDNAを鋳型として、実施例6で得られたPCR産物をBamHIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、約6.1Kbの増幅フラグメントを回収した。

30

プラスミドpUC119をBamHIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、上記の約6.1kbの増幅フラグメントを連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。さらに、約6.1kb DNA断片を含む組換えプラスミドで形質転換された大腸菌を培養し、PEG沈澱法によって菌体内のプラスミドを回収した。得られた組換えプラスミド(以下、pU-CP1と称する)をBamHIで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行うことにより、約6.1kb DNA断片(以下、HPG-CP1 DNAと称する)を分離、回収した。

実施例3の4)と同様の方法に従い、発現ベクターpTrcHisAをBamHIで消化し、5'末端を脱リン酸化後、上記のHPG-CP1 DNAを連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換大腸菌の中から、HPG-CP1 DNAが正方向に連結した組換えプラスミドで形質転換された、抗HPGp130モルモット血清と特異的に反応する抗原を発現している大腸菌を得た。

40

#### 配列表

配列番号：1

配列の長さ：8930

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株

50

配列

AAGCTTTTTC GGGCGATTGA AGACGGAATG TTA	60	
CTTTGGC AAGCGGTTTG AAACCTTTGA		
ACAGCTTGAA AAAGTGATTC ACGAGTACAT TCATTACTAC AACAA	80	
TGAGC GTATTCAAGT		
GAAGCTCAAA GGACTAAGCC CTGTGGAATA CAGAACTCAG TCCTTGAATG AAATTAGAAT	80	
ATAGTCTAAC TTTTGGGGC AGATCAACAC TCATTTTAA TATTAATATA GGAAAATGAT	240	
TT ATG AAT AAA GTT TTT AAA ATT AAA TAT TCT GTT GTA AAA CAA GAA	287	10
Met Asn Lys Val Phe Lys Ile Lys Tyr Ser Val Val Lys Gln Glu		
-70 -65 -60		
ATG ATT GTG GTT TCA GAG CTA GCA AAT AAT AAA GAT AAA ACA GCT AGC	335	
Met Ile Val Val Ser Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Lys Thr Ala Ser		
-55 -50 -45 -40		
CAA AAA AAC ACA CAT AAT ACT GCA TTT TTT CAA CCG CTA TTT ACA AAG	383	20
Gln Lys Asn Thr His Asn Thr Ala Phe Phe Gln Pro Leu Phe Thr Lys		
-35 -30 -25		
TGT ACA TAT CTT GCT CTT CTC ATT AAT ATC GCA CTA GGA GCA TCA TTA	431	
Cys Thr Tyr Leu Ala Leu Leu Ile Asn Ile Ala Leu Gly Ala Ser Leu		
-20 -15 -10		



Arg Gln Gly Ser Val Val Ile Gly Glu Asn Ala Lys Ser Ala Gly Asn			
125	130	135	
CAA TCT GTT TCT TTA GGG CAA AAT TCG TGG TCA AAA ACC AAT TCT ATT		911	
Gln Ser Val Ser Leu Gly Gln Asn Ser Trp Ser Lys Thr Asn Ser Ile			
140	145	150	
TCT ATT GGG GCA GGA ACC TTT GCG GAA GGA AAA TCA AGC ATT GCT ATA		959	
Ser Ile Gly Ala Gly Thr Phe Ala Glu Gly Lys Ser Ser Ile Ala Ile		10	
155	160	165	
GGG ACT GAT AAA ATA TCA GGG ACT AAG TAT AAT GAC AAA TTG CCT GCT		1007	
Gly Thr Asp Lys Ile Ser Gly Thr Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Ala			
170	175	180	185
ACT GCT TGG AAT GGA ACA GGC ACT GTT CCG AAA AAC TCC ATT TGG GAT		1055	20
Thr Ala Trp Asn Gly Thr Gly Thr Val Pro Lys Asn Ser Ile Trp Asp			
190	195	200	
ATA TTT TCT GAG TTA TAT ATG GGG AAA CAG ACT AAC GGC AGA GAT TAT		1103	
Ile Phe Ser Glu Leu Tyr Met Gly Lys Gln Thr Asn Gly Arg Asp Tyr			
205	210	215	30
GAT ACA ACT ACT CGA GAC CCT AAT AAA CCG GAG GCA TTT TAT AAA TTT		1151	
Asp Thr Thr Thr Arg Asp Pro Asn Lys Pro Glu Ala Phe Tyr Lys Phe			
220	225	230	
AGC GAT TTT AAA GGA AAA TAT GTC AAT ACC CCA ACT GCT TCA CCT ACT		1199	
Ser Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Val Asn Thr Pro Thr Ala Ser Pro Thr			
235	240	245	40
TAT GCA GGG AAA TTA GGG GCA ATT GCT CTA GGT TCC CGC ACC ATT GCC		1247	
Tyr Ala Gly Lys Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Ser Arg Thr Ile Ala			

250	255	260	265		
GCG GGG GAA ATG TCC ACC GCA GTG GGT TCG TTA GCC TTT GCA TTG GCA				1295	
Ala Gly Glu Met Ser Thr Ala Val Gly Ser Leu Ala Phe Ala Leu Ala					
	270	275	280		
GAT AGA TCC ACC GCA ATG GGG TTA CGT TCT TTT GTT GCT AAA GAC GCC				1343	
Asp Arg Ser Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Phe Val Ala Lys Asp Ala					10
	285	290	295		
GTA GGT GGA ACG GCG ATC GGG GAA GAA TCT CGA ACC TTT GCT AAA GAT				1391	
Val Gly Gly Thr Ala Ile Gly Glu Glu Ser Arg Thr Phe Ala Lys Asp					
	300	305	310		
TCC GTT GCC ATT GGT AAT AAA ACT GAA GCC TCA AAT GCT GGC TCA ATG				1439	
Ser Val Ala Ile Gly Asn Lys Thr Glu Ala Ser Asn Ala Gly Ser Met					20
	315	320	325		
GCT TAT GGT TAT AAG GCG AAA GCA GTA GGT GCG GGA GCA ATC GCA ATT				1487	
Ala Tyr Gly Tyr Lys Ala Lys Ala Val Gly Ala Gly Ala Ile Ala Ile					
	330	335	340	345	
GGG ACA GAA GTC GCA GCA GGG GCT AAA TTT AAT AGC CAT CAA ACA GGA				1535	
Gly Thr Glu Val Ala Ala Gly Ala Lys Phe Asn Ser His Gln Thr Gly					30
	350	355	360		
AAT TTA CTA CAG GAT AAT AAT GCT TAT GCT ACC TTA AAA AAT GCC GAT				1583	
Asn Leu Leu Gln Asp Asn Asn Ala Tyr Ala Thr Leu Lys Asn Ala Asp					
	365	370	375		
AAA TCA GAT GAT ACT AAA ACC GGA AAT GCG ATT ACT GTA TTT ACC CAG				1631	
Lys Ser Asp Asp Thr Lys Thr Gly Asn Ala Ile Thr Val Phe Thr Gln					40
	380	385	390		

TCT TTT GAT AAT ATG CTT ACT AAT GGA TTA CCG CTG GTA AGT GAA AAC	1679	
Ser Phe Asp Asn Met Leu Thr Asn Gly Leu Pro Leu Val Ser Glu Asn		
395 400 405		
GAA ACC TAT TTA ACG ACC TCA GCG GGA GCA ATT AAA AAA ACT GCA ACA	1727	
Glu Thr Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Gly Ala Ile Lys Lys Thr Ala Thr		
410 415 420 425		10
ACA GAC AGC AGT GCG GGG GGA GGT AAA AAT GCC ATT GCA ATT GGT AGT	1775	
Thr Asp Ser Ser Ala Gly Gly Gly Lys Asn Ala Ile Ala Ile Gly Ser		
430 435 440		
AAA ACC TTT GCC TCT AAA GCA AAT TCT GTG GCA TTA GGG AGC TAT GCC	1823	
Lys Thr Phe Ala Ser Lys Ala Asn Ser Val Ala Leu Gly Ser Tyr Ala		
445 450 455		20
TTA GCC GAT GCC CAA AAT GCC TTT GCA CTA GGT TCT TAT TCT TTT GTG	1871	
Leu Ala Asp Ala Gln Asn Ala Phe Ala Leu Gly Ser Tyr Ser Phe Val		
460 465 470		
GAA TCT TCA GCA ACA AAT ACA ATC ACA ATT GGT GTG GGA AGT TAT GCC	1919	
Glu Ser Ser Ala Thr Asn Thr Ile Thr Ile Gly Val Gly Ser Tyr Ala		
475 480 485		30
AAA GGG AAA AAC AGT TTC TTA GGG GGG ACT TGG GCA TCA ACC CTT TCA	1967	
Lys Gly Lys Asn Ser Phe Leu Gly Gly Thr Trp Ala Ser Thr Leu Ser		
490 495 500 505		
GAT CGG ACA GTT GTG CTA GGG AAT TCC ACT TCA ATT AGC TCA GGT TCT	2015	
Asp Arg Thr Val Val Leu Gly Asn Ser Thr Ser Ile Ser Ser Gly Ser		
510 515 520		40
CAG AAT GCA TTA GCA ATC GGG GTG AAT GTC TTT ATT GGT AAT GAT AGT	2063	

Gln Asn Ala Leu Ala Ile Gly Val Asn Val Phe Ile Gly Asn Asp Ser			
525	530	535	
GCT TCT TCA TTG GCA TTA GGT ATG GGT TCT ACT ATT GCG AAA AGT GCC		2111	
Ala Ser Ser Leu Ala Leu Gly Met Gly Ser Thr Ile Ala Lys Ser Ala			
540	545	550	
AAA TCC CCT GAC AGC TTA GCC ATT GGT AAA GAG GCA CGA ATT GAC GCT		2159	
Lys Ser Pro Asp Ser Leu Ala Ile Gly Lys Glu Ala Arg Ile Asp Ala		10	
555	560	565	
AAA GAT ACA GAT AAT GGT ACT TTG TAT CAG CCT CAA GTT TAT GAT GAA		2207	
Lys Asp Thr Asp Asn Gly Thr Leu Tyr Gln Pro Gln Val Tyr Asp Glu			
570	575	580	585
ACT ACT CGA GCC TTT AGA AAC TTT AAT GAA AGT AGC GAT TAT ATG CGT		2255	20
Thr Thr Arg Ala Phe Arg Asn Phe Asn Glu Ser Ser Asp Tyr Met Arg			
590	595	600	
CAA GCA ATG GCA TTA GGT TTT AAT GCT AAA GTT TCG CGT GGG GTG GGC		2303	
Gln Ala Met Ala Leu Gly Phe Asn Ala Lys Val Ser Arg Gly Val Gly			
605	610	615	30
AAA ATG GAA ACG GGG ATT AAC TCG ATG GCG ATT GGT GCT TAT GCT CAA		2351	
Lys Met Glu Thr Gly Ile Asn Ser Met Ala Ile Gly Ala Tyr Ala Gln			
620	625	630	
GCA ACT TTG CAA AAT TCC ACC GCA CTT GGG GTA GGC TCT AAA ACA GAT		2399	
Ala Thr Leu Gln Asn Ser Thr Ala Leu Gly Val Gly Ser Lys Thr Asp			
635	640	645	40
TAC ACT TGG GAA CAG TTA GAA ACC GAT CCT TGG GTA TCT GAA GGG GCA		2447	
Tyr Thr Trp Glu Gln Leu Glu Thr Asp Pro Trp Val Ser Glu Gly Ala			

650	655	660	665		
ATC AGT ATC CCA ACT TCA GGT AAA ACT GGG GTT ATC TCT GTG GGT TCA				2495	
Ile Ser Ile Pro Thr Ser Gly Lys Thr Gly Val Ile Ser Val Gly Ser					
	670	675	680		
AAA GGT TCA GAA CGT CGT ATT GTG AAT CTT GCT TCG GGT TCT TCT GAT				2543	
Lys Gly Ser Glu Arg Arg Ile Val Asn Leu Ala Ser Gly Ser Ser Asp					10
	685	690	695		
ACT GAT GCC GTG AAT GTT GCT CAG TTA AAA ACC GTT GAA GAA CGT TTC				2591	
Thr Asp Ala Val Asn Val Ala Gln Leu Lys Thr Val Glu Glu Arg Phe					
	700	705	710		
CTA TCT GAA ATT AAT TTA TTA CAA AAT GGC GGT GGG GTG AAA TAT CTC				2639	
Leu Ser Glu Ile Asn Leu Leu Gln Asn Gly Gly Gly Val Lys Tyr Leu					20
	715	720	725		
TCT GTT GAA AAA ACG AAT ATC AAT GGA CAA TCG GGG AGA GTG GCT AGC				2687	
Ser Val Glu Lys Thr Asn Ile Asn Gly Gln Ser Gly Arg Val Ala Ser					
	730	735	740	745	
CAA ATT CGT AAA GGG GAA AAT TAT GAG CGA TAT GTG AAA TTA AAA ACA				2735	
Gln Ile Arg Lys Gly Glu Asn Tyr Glu Arg Tyr Val Lys Leu Lys Thr					30
	750	755	760		
CAA TTG CTC TAT TTA GAT GCA CGA GGA AAA TTA AAT GGA GAG AAG TTT				2783	
Gln Leu Leu Tyr Leu Asp Ala Arg Gly Lys Leu Asn Gly Glu Lys Phe					
	765	770	775		
GAT CAA AAT TCA TTA AAC AAA ATT CGT GCG GTA GTG CAA GAA CTT GAA				2831	
Asp Gln Asn Ser Leu Asn Lys Ile Arg Ala Val Val Gln Glu Leu Glu					40
	780	785	790		



Val Ala Ile Gly Lys Gly Ala Thr Val Thr Ala Gly Gly Lys Pro Ser			
925	930	935	
ATT GCA TTG GGG CAA GAT TCG ACG GTT GCC AAT TCC GCA ATT AGC CGT			3311
Ile Ala Leu Gly Gln Asp Ser Thr Val Ala Asn Ser Ala Ile Ser Arg			
940	945	950	
ACA AGT TCA CCG ATG ATA AAT GGT TTA ATA TTC AAT AAT TTT GCA GGT			3359
Thr Ser Ser Pro Met Ile Asn Gly Leu Ile Phe Asn Asn Phe Ala Gly			10
955	960	965	
TCC CCT GAA ACA CTC GGT GTG TTA AGT ATC GGA ACG GCT GGG AGA GAG			3407
Ser Pro Glu Thr Leu Gly Val Leu Ser Ile Gly Thr Ala Gly Arg Glu			
970	975	980	985
CGT AAA ATT GTT AAT GTT GCA GCA GGC GAT GTT TCG CAA GCT TCT ACT			3455
Arg Lys Ile Val Asn Val Ala Ala Gly Asp Val Ser Gln Ala Ser Thr			20
990	995	1000	
GAA GCC ATT AAC GGC TCA CAG CTT TAT GCA ACG AAC TTT ATG TTG AGC			3503
Glu Ala Ile Asn Gly Ser Gln Leu Tyr Ala Thr Asn Phe Met Leu Ser			
1005	1010	1015	
AAA GTG GCT CAA TCT GTT AAG AGC AAC TTT GGT GGC AAT GTA AAT CTT			3551
Lys Val Ala Gln Ser Val Lys Ser Asn Phe Gly Gly Asn Val Asn Leu			30
1020	1025	1030	
GGC ACT GAT GGC ACA ATT ACA TTT ACA AAT ATT GGC GGC ACA GGG CAA			3599
Gly Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Ile Gly Gly Thr Gly Gln			
1035	1040	1045	
GCT ACA ATC CAC GAT GCG ATT AAT AAT GTT CTC ACT AAA GGG ATC TAC			3647
Ala Thr Ile His Asp Ala Ile Asn Asn Val Leu Thr Lys Gly Ile Tyr			40

1050	1055	1060	1065		
CTT AAA GCG GAT CAG AAT GAT CCA ACA GGA AAT CAA GGT CAG AAA GTG				3695	
Leu Lys Ala Asp Gln Asn Asp Pro Thr Gly Asn Gln Gly Gln Lys Val					
	1070	1075	1080		
GAA CTT GGT AAT GCA ATA ACG CTT TCG GCA ACA AAT CAA TGG GCG AAT				3743	
Glu Leu Gly Asn Ala Ile Thr Leu Ser Ala Thr Asn Gln Trp Ala Asn					
	1085	1090	1095		10
AAC GGC GTA AAT TAT AAA ACG AAC AAT TTA ACC ACT TAT AAT TCA CAA				3791	
Asn Gly Val Asn Tyr Lys Thr Asn Asn Leu Thr Thr Tyr Asn Ser Gln					
	1100	1105	1110		
AAT GGC ACG ATT TTA TTT GGA ATG CGT GAA GAT CCA AGT GTA AAA CAA				3839	
Asn Gly Thr Ile Leu Phe Gly Met Arg Glu Asp Pro Ser Val Lys Gln					
	1115	1120	1125		20
ATT ACA GCG GGA ACC TAT AAT ACA ACG GGT GAT GCG AAC AAT AAA AAT				3887	
Ile Thr Ala Gly Thr Tyr Asn Thr Thr Gly Asp Ala Asn Asn Lys Asn					
1130	1135	1140	1145		
CAA CTA AAT AAT ACA CTT CAA CAA ACC ACG CTT GAA GCA ACT GGG ATC				3935	
Gln Leu Asn Asn Thr Leu Gln Gln Thr Thr Leu Glu Ala Thr Gly Ile					
	1150	1155	1160		30
ACC AGT AGC GTA GGT TCA ACT AAC TAC GCT GGC TTT AGC TTA GGG GCA				3983	
Thr Ser Ser Val Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gly Phe Ser Leu Gly Ala					
	1165	1170	1175		
GAC AGC GTC ACC TTC TCG AAA GGT GGA GCT GGC ACG GTG AAA CTT TCT				4031	
Asp Ser Val Thr Phe Ser Lys Gly Gly Ala Gly Thr Val Lys Leu Ser					
	1180	1185	1190		40



Pro Ser Thr Asp Ser Asn Lys Lys Lys Thr Phe Thr Val Gly Val Asp			
1325	1330	1335	
TTC ACC GAT ACC ATT ACG GAA GGT GAC GCA ACG GAT GAT AAA AAA CTG		4511	
Phe Thr Asp Thr Ile Thr Glu Gly Asp Ala Thr Asp Asp Lys Lys Leu			
1340	1345	1350	
ACG ACT TCA AAA TCC GTT GAA AGC TAT GTC ACA AAC AAA CTC GCG AAC		4559	
Thr Thr Ser Lys Ser Val Glu Ser Tyr Val Thr Asn Lys Leu Ala Asn		10	
1355	1360	1365	
TTC TCT ACA GAT ATT TTG TTA TCG GAT GGG CGT TCT GGT AAC GCA ACA		4607	
Phe Ser Thr Asp Ile Leu Leu Ser Asp Gly Arg Ser Gly Asn Ala Thr			
1370	1375	1380	1385
ACG GCA AAT GAT GGG GTG GGT AAA CGT CGT TTG TCT GAT GGC TTT ACG		4655	20
Thr Ala Asn Asp Gly Val Gly Lys Arg Arg Leu Ser Asp Gly Phe Thr			
1390	1395	1400	
ATC AAA TCT GAA AAC TTT ACG CTA GGT TCA AAA CAA TAT AAT GGC TCT		4703	
Ile Lys Ser Glu Asn Phe Thr Leu Gly Ser Lys Gln Tyr Asn Gly Ser			
1405	1410	1415	
GAT AGC TTA GGG GTA ATG TAT GAC GAT CAA AAT GGG GTC TTT AAA TTA		4751	30
Asp Ser Leu Gly Val Met Tyr Asp Asp Gln Asn Gly Val Phe Lys Leu			
1420	1425	1430	

AGC CTA AAT ATG ACC GCA CTT ACC ACT TCA TTG GCT AAT ACT TTC GCG	4799	
Ser Leu Asn Met Thr Ala Leu Thr Thr Ser Leu Ala Asn Thr Phe Ala		
1435                      1440                      1445		
AAG TTG GAT GCC TCT AAC CTT ACT GAT GAT AGC AAT AAA GAG AAA TGG	4847	
Lys Leu Asp Ala Ser Asn Leu Thr Asp Asp Ser Asn Lys Glu Lys Trp		
1450                      1455                      1460                      1465		10
CGT ACT GCG TTG AAT GTG TAT TCA AAA ACA GAA GTA GAT GCA GAA ATT	4895	
Arg Thr Ala Leu Asn Val Tyr Ser Lys Thr Glu Val Asp Ala Glu Ile		
1470                      1475                      1480		
CAA AAA TCC AAG GTA ACA CTC ACA CCA GAT TCG GGT TTG ATC TTT GCG	4943	
Gln Lys Ser Lys Val Thr Leu Thr Pro Asp Ser Gly Leu Ile Phe Ala		
1485                      1490                      1495		20
ACC AAA CAA GCT GGG AGT GGT AAT AAC GCA GGT ATT GAT GCT GGG AAT	4991	
Thr Lys Gln Ala Gly Ser Gly Asn Asn Ala Gly Ile Asp Ala Gly Asn		
1500                      1505                      1510		
AAG AAA ATT AGT AAT GTC GCC GAT GGG GAT ATT TCT CCA ACC AGT GGT	5039	
Lys Lys Ile Ser Asn Val Ala Asp Gly Asp Ile Ser Pro Thr Ser Gly		
1515                      1520                      1525		30
GAT GTA GTG ACA GGT CGT CAG CTC TAC GCC TTA ATG CAG AAA GGT ATT	5087	
Asp Val Val Thr Gly Arg Gln Leu Tyr Ala Leu Met Gln Lys Gly Ile		
1530                      1535                      1540                      1545		
CGC GTG TAT GGT GAT GAA GTT AGT CCA ACG AAG ACT CAA ACA ACA GCA	5135	
Arg Val Tyr Gly Asp Glu Val Ser Pro Thr Lys Thr Gln Thr Thr Ala		
1550                      1555                      1560		40
CCT ACA AAT GCA AAC CCA ACT GCG ACG ACA GCA CCT ACA GCA TCT AGC	5183	

Pro Thr Asn Ala Asn Pro Thr Ala Thr Thr Ala Pro Thr Ala Ser Ser			
1565	1570	1575	
ACT CAA GGT TGG GCG ACA ACG GCG AAT ACG GCG GGT GGT GTA GCA CCA			5231
Thr Gln Gly Trp Ala Thr Thr Ala Asn Thr Ala Gly Gly Val Ala Pro			
1580	1585	1590	
GCA GGT AAT GTA GCA ACG GGG GAT ATT GCG CCG ACA CAG CCA ACA TTG			5279
Ala Gly Asn Val Ala Thr Gly Asp Ile Ala Pro Thr Gln Pro Thr Leu			10
1595	1600	1605	
CCA GAG ATG AAT ACG GCA TTG GTT GAT GAT CAC TTG GCT GTG CCG TTA			5327
Pro Glu Met Asn Thr Ala Leu Val Asp Asp His Leu Ala Val Pro Leu			
1610	1615	1620	1625
GGT GGA AGC CTC AAG ATT CAC GGA GAT CAT AAT GTG AAA ACA ACG ATT			5375
Gly Gly Ser Leu Lys Ile His Gly Asp His Asn Val Lys Thr Thr Ile			20
1630	1635	1640	
TCT GCG GAT AAT CAA GTG GGG ATT TCA TTA CAG CCA AAT ATT TCT ATT			5423
Ser Ala Asp Asn Gln Val Gly Ile Ser Leu Gln Pro Asn Ile Ser Ile			
1645	1650	1655	
GAG AAT AAC TTG GTA ATT GGT TCA AAT GAT CCT GAG AAG GCA AAA TTA			5471
Glu Asn Asn Leu Val Ile Gly Ser Asn Asp Pro Glu Lys Ala Lys Leu			
1660	1665	1670	
GCC GCA CAA GAA GGT AAT GCT TTG GTT ATC ACT AAC AAA GAT GAC GGG			5519
Ala Ala Gln Glu Gly Asn Ala Leu Val Ile Thr Asn Lys Asp Asp Gly			
1675	1680	1685	
AAT GCG GCG ATG GTC TTT AAT AAC GAG AAA AAT ATG CTT GTT CTC AGT			5567
Asn Ala Ala Met Val Phe Asn Asn Glu Lys Asn Met Leu Val Leu Ser			40

1690	1695	1700	1705		
GAT AAA GAG GCG AAA CCA AGA GTG CTT CTT GAT GGA CAA AAT GGG GCA				5615	
Asp Lys Glu Ala Lys Pro Arg Val Leu Leu Asp Gly Gln Asn Gly Ala					
	1710	1715	1720		
TTA ACT TTA GTC GGC AAT GAT GAT TCT CAA GTC ACC CTT TCC TCT AAG				5663	
Leu Thr Leu Val Gly Asn Asp Asp Ser Gln Val Thr Leu Ser Ser Lys					10
	1725	1730	1735		
AAA GGT AAA GAT ATT GAT GGA AAT GAT TTG AGC CGT CTC TCT GTG ACG				5711	
Lys Gly Lys Asp Ile Asp Gly Asn Asp Leu Ser Arg Leu Ser Val Thr					
	1740	1745	1750		
ACT GAA AGA ACA AAT GCT GAT GGG CAA CTT GAA AAA GTG GAA ACC TCA				5759	
Thr Glu Arg Thr Asn Ala Asp Gly Gln Leu Glu Lys Val Glu Thr Ser					20
	1755	1760	1765		
TTT GCT ACA ATG GAT GAT GGC TTG AAG TTC AAA GCC GAC GGG GAT AAA				5807	
Phe Ala Thr Met Asp Asp Gly Leu Lys Phe Lys Ala Asp Gly Asp Lys					
	1770	1775	1780	1785	
GTG ATT AAT AAG AAA CTT AAT GAA ACC GTT GAA ATT GTT GGT GAT GAG				5855	
Val Ile Asn Lys Lys Leu Asn Glu Thr Val Glu Ile Val Gly Asp Glu					30
	1790	1795	1800		
AAT GTG ACA ACA TCT ATT ACT GAT GAT AAT AAG GTG AAA GTT TCA CTG				5903	
Asn Val Thr Thr Ser Ile Thr Asp Asp Asn Lys Val Lys Val Ser Leu					
	1805	1810	1815		
AAT AAG AAA ATC GCG ATT GAT GAG GTT AAG ATT CCA AAT ACA GAT CCT				5951	
Asn Lys Lys Ile Ala Ile Asp Glu Val Lys Ile Pro Asn Thr Asp Pro					40
	1820	1825	1830		

GAT GCT CAA AAG GGA GAT AGC ATT GTA ATC AAC AAT GGT GGA ATC CAC	5999			
Asp Ala Gln Lys Gly Asp Ser Ile Val Ile Asn Asn Gly Gly Ile His				
1835	1840	1845		
GCA GGT AAT AAA GTG ATT ACT GGC GTT AAA GCG AGT GAT GAC CCA ACC	6047			
Ala Gly Asn Lys Val Ile Thr Gly Val Lys Ala Ser Asp Asp Pro Thr				
1850	1855	1860	1865	10
AGT GCA GTG AAT CGA GGT CAA TTA AAT ACT GTG ATT GAT AAT GTT CAA	6095			
Ser Ala Val Asn Arg Gly Gln Leu Asn Thr Val Ile Asp Asn Val Gln				
1870	1875	1880		
AAT AAT TTC AAT CAA GTT AAT CAA CGT ATT GGC GAT TTA ACA CGG GAG	6143			
Asn Asn Phe Asn Gln Val Asn Gln Arg Ile Gly Asp Leu Thr Arg Glu				
1885	1890	1895	20	
TCG CGT GCA GGT ATT GCA GGT GCA ATG GCG ACG GCA AGC CTA CAA AAT	6191			
Ser Arg Ala Gly Ile Ala Gly Ala Met Ala Thr Ala Ser Leu Gln Asn				
1900	1905	1910		
GTT GCT TTA CCA GGG AAA ACA ACG ATT TCC GTA GGT ACA GCA ACG TTC	6239			
Val Ala Leu Pro Gly Lys Thr Thr Ile Ser Val Gly Thr Ala Thr Phe				
1915	1920	1925	30	
AAA GGG GAG AAT GCT GTT GCA ATA GGG ATG TCT AGA CTC TCT GAT AAT	6287			
Lys Gly Glu Asn Ala Val Ala Ile Gly Met Ser Arg Leu Ser Asp Asn				
1930	1935	1940	1945	
GGA AAA GTA GGT ATC CGT TTA TCT GGT ATG AGT ACG AGT AAC GGA GAT	6335			
Gly Lys Val Gly Ile Arg Leu Ser Gly Met Ser Thr Ser Asn Gly Asp				
1950	1955	1960	40	
AAA GGG GCA GCA ATG AGT GTT GGA TTT AGC TTT TAGCCTTAAT CCATAAATAA	6388			

Lys Gly Ala Ala Met Ser Val Gly Phe Ser Phe

1965

1970

GCAAAAAGCG AATCACCTTT GATTCGCTTT TTTTATCAGA TTATGTGCCG TAAAACTCCG	6448	
TCCTTCAGGG CGGAGATATA AGGCACAAAC GGC GTAAGCC GTTTC AAACC TAACTAATCA	6508	
GGTGT TTGTT GTTGCTCAAT GTATTGGCGA ATAATGGAAA TTGGAGCGCC ACCACA ACTC	6568	
CCTGCAAAAT AAGACGGAGA CCAAAGCTGA TTACCCCAA GTTTTTTCG GATGTTTCGAG	6628	10
TAGTTTTTCT TCCTAATCAT TCGGCTTGAT ACACCTTTTA AACTGTTTAC AAGTG TAGAT	6688	
ACAGCCACTT TCGGTGGATA TTCCACAAGT AAATGAACAT GATCGTCTTC ACCGTCAAAT	6748	
TCAACTAATT TTGCTTTAAA ATCATTGCAG ACGCTTTCAA AAATCAATTT GAGTTCGTCT	6808	
AAAATAGCTT TCGTAAAAAC ATCACGGCGA TATTTTGTTA CAAAGACTAA GTGAACATGC	6868	
ATATTA AAAA CACAATGTCT ACCGTGCCTA ATTTCTGTTT CTTTTTGCAT AGACCAAGTG	6928	
TAAAATGTTG AAAACTTACA TTCTAAACCT TGTC AATGCA ACTACGCAA GCCTTTAAGT	6988	20
TCGAGATAAT GCCGAATGGC GAACAAAACC GTAAAATCAA GCAATTTTGC GGTGTTCTC	7048	
GTTTTGTGTT CAATCGGGCA TTGGCTTGGC AAAATGAACA ATACGGGCAA GATAACAGCT	7108	
TAAAGTTCAG TTACTACTAAA ATCGCCA ACT TGCTTCCACA ATGGAAAAAA GAATTAGTTT	7168	
GGCTAAAAGA ATGCCATTCT CAAGTGCTTC AACAGTCGCT AAAAGATCTT GAGAGTGGT	7228	
TCAAAAATTT CTTTCAGAAA CGTGCCGACT TTCCAAAATT CAAGAAAAAA GGC GTGAAAG	7288	30
AGAGCTTTTCG TTTTCCGCAA GGTGCAAAT TAGAACAGGA AAATGACCGC TTATTTTTCG	7348	
CAAAAATCGG CTGGATTTCG TATCGCAACA GCCGAGATAT CGTTGGTGAA ATCAAAAATG	7408	
TTACCGTCAG CCAAAGTGC GGTC ACTATT TTGTCAGTAT TCAA ACTGAA TTTGAGTACG	7468	
AAATCCCGAC ACATAAAGGC GGTGAAATCG GTATTGATAT GGGCGTTGCA CGTTTTGCAA	7528	
CATTGTCAAA TGGTGAATAT TTTGAACCGG TTAACGCCTT TAAAACTTAC AAAGGAAAAT	7588	
TGGCTAAACT GCAAAAGAGG CTAAAAATA AAGTAAAATT TAGCCAAAAT TGGCAGAAAT	7648	40
TAAAGGCGAA AATCGCCAAA CTGCATCATA AAATTGCTAA TTGTCGCAA GACTTCTTGC	7708	
ATCAGACTTC AAGCAAAATC AGCAAAAACC ACGCCATGAT CTATATTGAA GATTTGCAGG	7768	





鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CGCGGATCCA TGAATAAAGT TTTTAAAATT AAATATTCTG TTG 43

配列番号：4

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CGCGGATCCT TAAGGCTAAA AGCTAAATCC AACACTCAT 39

配列番号：5

配列の長さ：7486

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌53-47株

配列

TCTAGAATAT AAATCTTCAG TATCAACATA CAAGGGGCGT ATCGCATACG CCCCTGTGCT	60	
GAATTTTAC TTACAGAACA CCGTACTTTT GTTCTGTCAT TTTTGATAT TTGGGCTGAT	120	
GGCTTTTTTC TTTGGTAGTT ATAACGGGTT TCGCTCGTTG AGCGACTTAC TTTCTTTTAC	180	
ATTCCCAAAA GAAAGTAAGC AAAGAAAAGG GAACCCGACT AAATTGCTGT TCCTCATTCC	240	30
AATAAAATTT TCTTCATGAA AAGTAAGCCT GATGTTGCT TCGCTCTCGC TCGGCGTTAC	300	
TTTTCTTAAA ATTTTATTTT CATTGGGCA ATTTACACGG GAAAGGGCGA TTTTAAAAG	360	
TGCGGTGGTT TTTGAAGGAT ATTTTGTAT TTGGAAAAAT CAAGAAAATG GCTTTAGAAA	420	
ACACCTCACT TATTTAACT GTAGGTATTG CATTTTAAAT AATACAAAT TTTCTTGAAA	480	
TGATGAAATA ACCAATCAAA TTAGTCAGTT ATAAGTGGAG AACTTAAAG AAAATGATTA	540	
AATTAGGCTC ACTCATTAGA CCAGTAAGGG AATTAAAATA GTATTTTAA TTGCATTAG	600	40
TTATTAAGTG TTAGAAATTA CCTATTGCAT CAATAAATGA GGTGTTTTTA TTTGTAATCT	660	
CTAATTAATT AGAGTAGTAT TAAGTGGAGT TTTATCTTTA CTAATTAAT GGTATCACCT	720	
CTCAGAGAGG GAGAAGCAAA TTCCCCCCC CTAGAAATAC CTAATAAGAG TTACATTAAG	780	



TCA ATT GCT ATT GGT CAG GGG GCA AAA AAT GAT AAT TGG GCG ACG AGA	1273	
Ser Ile Ala Ile Gly Gln Gly Ala Lys Asn Asp Asn Trp Ala Thr Arg		
60 65 70		
TCA ATT GCT ATT GGT CAG GGG GCA AAA AAT GAA AGT ATA GCA TCA GAT	1321	
Ser Ile Ala Ile Gly Gln Gly Ala Lys Asn Glu Ser Ile Ala Ser Asp		
75 80 85		10
TCT GTG GCT ATT TCC AAC GCG ATT AAC CGT TTT AAA AAA TCT ATT GTG	1369	
Ser Val Ala Ile Ser Asn Ala Ile Asn Arg Phe Lys Lys Ser Ile Val		
90 95 100		
ATA GGT CTT AAT ACT TAT ACA CAA TTA GAT CCC CGT AGA GCT CCA GAA	1417	
Ile Gly Leu Asn Thr Tyr Thr Gln Leu Asp Pro Arg Arg Ala Pro Glu		
105 110 115 120		20
TCC CGT CAA GGT TCT GTG GTG ATT GGG GAA AAT GCG AAA AGT GCT GGG	1465	
Ser Arg Gln Gly Ser Val Val Ile Gly Glu Asn Ala Lys Ser Ala Gly		
125 130 135		
AAT CAA TCT GTT TCT TTA GGG CAA AAT GCG TGG TCA AAA ACC AAT TCT	1513	
Asn Gln Ser Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Trp Ser Lys Thr Asn Ser		
140 145 150		30
ATT TCT ATT GGG GCA GGA ACC TTT GCG GAA GGG AAA TCA ACC ATT GCT	1561	
Ile Ser Ile Gly Ala Gly Thr Phe Ala Glu Gly Lys Ser Thr Ile Ala		
155 160 165		
ATA GGG ACT GAT AAA ATA CTA GGG ACT AAT TAT AAT GAC AAA TTG CCT	1609	
Ile Gly Thr Asp Lys Ile Leu Gly Thr Asn Tyr Asn Asp Lys Leu Pro		
170 175 180		40
GCT CCT AGT TGG GAT GGA AGA ACA GGT AAG GCA CCT ACT AAT TCC ATT	1657	

Ala Pro Ser Trp Asp Gly Arg Thr Gly Lys Ala Pro Thr Asn Ser Ile		
185	190	200
TGG GAT ATA TTT TCT GAG TTA TAT ATG GGG AAA AAG ACT AAC GGC ACA		1705
Trp Asp Ile Phe Ser Glu Leu Tyr Met Gly Lys Lys Thr Asn Gly Thr		
	205	215
GAT TAT GAT GCA AAA AAA AAT GAC CGC GAT CCA AAT AAG CCA GAG GCT		1753
Asp Tyr Asp Ala Lys Lys Asn Asp Arg Asp Pro Asn Lys Pro Glu Ala		
	220	230
TTT TAT ACC TAT TCT GAT TTT AAA AGC AGA TAT GTT AAT AAC CCA AGT		1801
Phe Tyr Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Ser Arg Tyr Val Asn Asn Pro Ser		
	235	245
ACC TCT CCC ACT TAT GCC GCT AAA TTA GGG GCA ATT GCC CTA GGT TCC		1849
Thr Ser Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Ser		
	250	260
CGC ACC ATT GCT GCG GGG GAA ATG TCC ACT GCG GTC GGT TCC TTA GCC		1897
Arg Thr Ile Ala Ala Gly Glu Met Ser Thr Ala Val Gly Ser Leu Ala		
	265	280
TTT GCA TTG GCA GAT AAA TCC ACC GCA ATG GGG TTA CGT TCT TTT GTT		1945
Phe Ala Leu Ala Asp Lys Ser Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Phe Val		
	285	295
GCT AAA GAT GCC GTA GGT GGA ACG GCA ATC GGG GAA GAA TCG CGA ACC		1993
Ala Lys Asp Ala Val Gly Gly Thr Ala Ile Gly Glu Glu Ser Arg Thr		
	300	310
TTT GCT AAA GAT TCC GTT GCC ATT GGT AAT AAA ACT GAA GCC TCA AAT		2041
Phe Ala Lys Asp Ser Val Ala Ile Gly Asn Lys Thr Glu Ala Ser Asn		

315	320	325		
GCT GGC TCA ATG GCT TAT GGT TAT AAG GCG AAA GCG GTA GGT GCG GGG			2089	
Ala Gly Ser Met Ala Tyr Gly Tyr Lys Ala Lys Ala Val Gly Ala Gly				
330	335	340		
GCA ATC GCA ATT GGT GCA GAA GTC GCA GCA GGG GCT GAA TTT GAT AGC			2137	
Ala Ile Ala Ile Gly Ala Glu Val Ala Ala Gly Ala Glu Phe Asp Ser				10
345	350	355	360	
AGT CAA GCA GGA AAT TTA TTA CTA AAT AGA GGT GCT TAT GCT ACT TTA			2185	
Ser Gln Ala Gly Asn Leu Leu Leu Asn Arg Gly Ala Tyr Ala Thr Leu				
365	370	375		
AAA AGT GCC GAT AAA TCA GAT GAT ATT AAA GCT GGA GAT GCG ATT AAC			2233	
Lys Ser Ala Asp Lys Ser Asp Asp Ile Lys Ala Gly Asp Ala Ile Asn				20
380	385	390		
GTA TTT ACC CAG TTT TTT GAT AAT ATG CTT ACT CAA GGC TCA CAC CTG			2281	
Val Phe Thr Gln Phe Phe Asp Asn Met Leu Thr Gln Gly Ser His Leu				
395	400	405		
ACA TAT GAA AAT ACC ACC TAT TTA ACC ACT TCA GCA GGT GAT ATC AAG			2329	
Thr Tyr Glu Asn Thr Thr Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Gly Asp Ile Lys				30
410	415	420		
AAA ACA TTA GCT GCA GTT GGA GAT GGC GGG AAA AAT GCC ATT GCC ATT			2377	
Lys Thr Leu Ala Ala Val Gly Asp Gly Gly Lys Asn Ala Ile Ala Ile				
425	430	435	440	
GGT AAT AAA ACC TTT GCA TCT AAA GCA AAT TCT GTG GCA TTA GGG AGC			2425	
Gly Asn Lys Thr Phe Ala Ser Lys Ala Asn Ser Val Ala Leu Gly Ser				40
445	450	455		

TAT GCC TTA GCG AGT GCC CAA AAT GCC TTT GCA CTA GGT TCT TAT TCT	2473	
Tyr Ala Leu Ala Ser Ala Gln Asn Ala Phe Ala Leu Gly Ser Tyr Ser		
460 465 470		
TTA GTG TCC CCT TTA GCA GCC AAT ACA ATC GTA ATT GGT GTG GGA GGT	2521	
Leu Val Ser Pro Leu Ala Ala Asn Thr Ile Val Ile Gly Val Gly Gly		
475 480 485		10
TAT GCC ACA GGA TCA AAC AGT TTC GTA GGG GGT TCT TGG GTA TCA ACC	2569	
Tyr Ala Thr Gly Ser Asn Ser Phe Val Gly Gly Ser Trp Val Ser Thr		
490 495 500		
CTT TCA GCT CGG ACA GTT GTG CTA GGG TAT TCC GCT TCA ATT AGC TCA	2617	
Leu Ser Ala Arg Thr Val Val Leu Gly Tyr Ser Ala Ser Ile Ser Ser		
505 510 515 520		20
GAT TCT CAT GAT TCA TTA GCA ATG GGG GTG AAT GCC TTT ATT GGT AAT	2665	
Asp Ser His Asp Ser Leu Ala Met Gly Val Asn Ala Phe Ile Gly Asn		
525 530 535		
GGT AGT AAT TCT TCA TTG GCA TTA GGT ACG GGA TCT ACT ATT GCG AAA	2713	
Gly Ser Asn Ser Ser Leu Ala Leu Gly Thr Gly Ser Thr Ile Ala Lys		
540 545 550		30
AAT GCC AAA TCT CCT GAC AGC TTA GCC ATT GGT AAA GAC TCA CGA ATT	2761	
Asn Ala Lys Ser Pro Asp Ser Leu Ala Ile Gly Lys Asp Ser Arg Ile		
555 560 565		
GAC GCT AAA GAT ACA GAT AAT GGT GTT TTG TAT ACC CCT CAA GTT TAT	2809	
Asp Ala Lys Asp Thr Asp Asn Gly Val Leu Tyr Thr Pro Gln Val Tyr		
570 575 580		40
GAT GAA ACT ACT CGA GCC TTT AGA ACC TTT GAT GAA AAC AAA GAT TAT	2857	

Asp Glu Thr Thr Arg Ala Phe Arg Thr Phe Asp Glu Asn Lys Asp Tyr		
585	590	600
ATG CGT CAA GCA ATG GCA TTA GGT TTT AAT GCG AAG GTT TCG CGT GGG		2905
Met Arg Gln Ala Met Ala Leu Gly Phe Asn Ala Lys Val Ser Arg Gly		
605	610	615
AAG GGC AAA ATG GAA ACG GGG ATT AAC TCG ATG GCG ATT GGT GCT CGT		2953
Lys Gly Lys Met Glu Thr Gly Ile Asn Ser Met Ala Ile Gly Ala Arg		10
620	625	630
TCT CAA GCA ACT TTG CAA AAT TCC ACC GCA CTT GGG GTA AAC GCT AAA		3001
Ser Gln Ala Thr Leu Gln Asn Ser Thr Ala Leu Gly Val Asn Ala Lys		
635	640	645
ACA GAT TAC ACT TGG GAA CAG TTA GAA GCC GAT CCT TGG GTA TCT AAA		3049
Thr Asp Tyr Thr Trp Glu Gln Leu Glu Ala Asp Pro Trp Val Ser Lys		20
650	655	660
GGG GCA ATC AGT ATC CCA ACT TCA GGC AAA ATT GGG GTT ATC TCT GTG		3097
Gly Ala Ile Ser Ile Pro Thr Ser Gly Lys Ile Gly Val Ile Ser Val		
665	670	675
GGC TCA AAA GGC TCA GAA CGT CGT ATT GTG AAT GTT GCT TCG GGT TCT		3145
Gly Ser Lys Gly Ser Glu Arg Arg Ile Val Asn Val Ala Ser Gly Ser		30
685	690	695
CTT GAT ACC GAT GCC GTG AAT GTT GCC CAA TTA AAA ACT ATT GAA GAA		3193
Leu Asp Thr Asp Ala Val Asn Val Ala Gln Leu Lys Thr Ile Glu Glu		
700	705	710
CGT TTC CAA TCT GAA ATT GAT TTA TTA CAA AAT GGC GGT GGG GTG CAA		3241
Arg Phe Gln Ser Glu Ile Asp Leu Leu Gln Asn Gly Gly Gly Val Gln		40

715	720	725		
TAT CTC TCT GTT GAA AAA ACG AAT ATC AAT GGA GAA GCG GGG AGA GTG			3289	
Tyr Leu Ser Val Glu Lys Thr Asn Ile Asn Gly Glu Ala Gly Arg Val				
730	735	740		
GCT AGC CAA ATT CGT AAA GGG GAA AGT TAT AAG CGA TAT GTG AAA TTA			3337	
Ala Ser Gln Ile Arg Lys Gly Glu Ser Tyr Lys Arg Tyr Val Lys Leu				10
745	750	755	760	
AAA ACA CAA TTG CTC TAT TTA GAT GCA CGA AAA AAA TTA AAT GGA GAG			3385	
Lys Thr Gln Leu Leu Tyr Leu Asp Ala Arg Lys Lys Leu Asn Gly Glu				
765	770	775		
AAG TTT GAT CAA ACT TCA TTA GAC AAA ATT AGT AAG GCA GTG CAA GAA			3433	
Lys Phe Asp Gln Thr Ser Leu Asp Lys Ile Ser Lys Ala Val Gln Glu				20
780	785	790		
CTT GAA GCG GAA TAT AGT GGC GAG TTA AAA ACA ACT GCG TCA GAA CTT			3481	
Leu Glu Ala Glu Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Thr Thr Ala Ser Glu Leu				
795	800	805		
AAT AGA GTT GCA ATG CAA TTG AAT GCT GAG ACA ACT GTA AAT GAC TTC			3529	
Asn Arg Val Ala Met Gln Leu Asn Ala Glu Thr Thr Val Asn Asp Phe				30
810	815	820		
GGG AAA TTT AAT CAA TAT AAA ACG CAG ATT GAG AAT GCA ACC AAT GCG			3577	
Gly Lys Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Gln Ile Glu Asn Ala Thr Asn Ala				
825	830	835	840	
GAT TCA GAA AAA AAT GTA GGC GGC TTA TCC CCT CAA GTA ATT GCA CAG			3625	
Asp Ser Glu Lys Asn Val Gly Gly Leu Ser Pro Gln Val Ile Ala Gln				40
845	850	855		

TTA AAA GCC AAT AAT AAC TAT CTT AAT GAT GGT GCA AAA GGG CAA GAC	3673	
Leu Lys Ala Asn Asn Asn Tyr Leu Asn Asp Gly Ala Lys Gly Gln Asp		
860 865 870		
AGT ATA GCA TTT GGC TGG CAG GCA AAA ACC TCA GAA GCT AAT AAT GGA	3721	
Ser Ile Ala Phe Gly Trp Gln Ala Lys Thr Ser Glu Ala Asn Asn Gly		
875 880 885		10
TTA GCA GGG AAA CAA GCC ATT GCG ATT GGT TTC CAA GCG AAT TCT TCC	3769	
Leu Ala Gly Lys Gln Ala Ile Ala Ile Gly Phe Gln Ala Asn Ser Ser		
890 895 900		
GCT GAA AAT GCC ATT TCT ATC GGT ACG AAT TCG GAT ACC TCA ATG ACA	3817	
Ala Glu Asn Ala Ile Ser Ile Gly Thr Asn Ser Asp Thr Ser Met Thr		
905 910 915 920		20
GGG GCA GTG GCG ATT GGT AAA GGT GCA ACG GTT ACT GCG GGT GGA AAA	3865	
Gly Ala Val Ala Ile Gly Lys Gly Ala Thr Val Thr Ala Gly Gly Lys		
925 930 935		
CCT TCC ATT GCA TTG GGG CAA GAT TCG ACG GTT GCC AAT TCC GCA ATT	3913	
Pro Ser Ile Ala Leu Gly Gln Asp Ser Thr Val Ala Asn Ser Ala Ile		
940 945 950		30
AGC CGT ACA AGT TCA GTG ATG ATA AAT GGT TTA ACA TTC AAT AAT TTT	3961	
Ser Arg Thr Ser Ser Val Met Ile Asn Gly Leu Thr Phe Asn Asn Phe		
955 960 965		
GCA GGT TCC CCT GAA ACA CTC GGT GTG TTA AGT ATC GGA ACG GCT GGG	4009	
Ala Gly Ser Pro Glu Thr Leu Gly Val Leu Ser Ile Gly Thr Ala Gly		
970 975 980		40
AAA GAG CGT AAA ATT GTT AAT GTT GCA GCA GGC GAT ATT TCG CAA ACT	4057	

Lys Glu Arg Lys Ile Val Asn Val Ala Ala Gly Asp Ile Ser Gln Thr			
985	990	995	1000
TCT ACT GAA GCC ATT AAC GGC TCA CAG CTT TAT GCA ACG AAC TTT ATG			4105
Ser Thr Glu Ala Ile Asn Gly Ser Gln Leu Tyr Ala Thr Asn Phe Met			
	1005	1010	1015
TTG AAC AAA CTG GCT CAA TCC GTT AAA ACG AAT TTT GGC GGT AAT GCA			4153
Leu Asn Lys Leu Ala Gln Ser Val Lys Thr Asn Phe Gly Gly Asn Ala			10
	1020	1025	1030
AAC CTT GCC ACT GAT GGC ACA ATT ACA TTT ACA AAT ATT GGC GGC ACA			4201
Asn Leu Ala Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Thr Asn Ile Gly Gly Thr			
	1035	1040	1045
GGG CAA GAT ACA ATC CAC GAT GCG ATT AAT AAT GTT CTC ACC AAA TTG			4249
Gly Gln Asp Thr Ile His Asp Ala Ile Asn Asn Val Leu Thr Lys Leu			20
	1050	1055	1060
ATC TCG CTT TCG GCA ACA GAA GAA GAA GAA GTG GTG TCA GGG GAA GCT			4297
Ile Ser Leu Ser Ala Thr Glu Glu Glu Glu Val Val Ser Gly Glu Ala			
1065	1070	1075	1080
GTC TAT GAT GCA CTT AAA GGT GCA AAA CCA ACG GTT TCA GCA GAA GCC			4345
Val Tyr Asp Ala Leu Lys Gly Ala Lys Pro Thr Val Ser Ala Glu Ala			
	1085	1090	1095
AAC AAA GGC ATT ACT GGC TTG GTG GAT GTG GTG AAA AAA GCA AAT TCA			4393
Asn Lys Gly Ile Thr Gly Leu Val Asp Val Val Lys Lys Ala Asn Ser			
	1100	1105	1110
CCG ATC ACA GTT GAG CCT TCT ACC GAT AAC AAC AAG AAA AAA ACC TTC			4441
Pro Ile Thr Val Glu Pro Ser Thr Asp Asn Asn Lys Lys Lys Thr Phe			40

1115	1120	1125		
ACT GTC GGC TTA ATG AAA GAC ATT GAA GGG GTA AAC AGC ATT ACC TTT			4489	
Thr Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Glu Gly Val Asn Ser Ile Thr Phe				
1130	1135	1140		
GAT AAG TCA GGG CAA GAT CTA AAT CAA GTT ACG GGC AGA ATG AGC AGT			4537	
Asp Lys Ser Gly Gln Asp Leu Asn Gln Val Thr Gly Arg Met Ser Ser				10
1145	1150	1155	1160	
GCG GGT TTA ACC TTC AAA AAA GGC GAC ACA ACA AAT GGT TCA ACC ACC			4585	
Ala Gly Leu Thr Phe Lys Lys Gly Asp Thr Thr Asn Gly Ser Thr Thr				
1165	1170	1175		
ACT TTT GCA GAA GAT GGC TTA ACC ATT GAT AGC ACA ACA AAT TCT GCT			4633	
Thr Phe Ala Glu Asp Gly Leu Thr Ile Asp Ser Thr Thr Asn Ser Ala				20
1180	1185	1190		
CAA ACA AAC TTA GTG AAA GTA AGT CGT GAT GGC TTC TCG GTG AAA AAT			4681	
Gln Thr Asn Leu Val Lys Val Ser Arg Asp Gly Phe Ser Val Lys Asn				
1195	1200	1205		
GGC AGC GAT GAA AGC AAA TTA GCC TCG ACA AAA TTA TCT ATC GGT GCG			4729	
Gly Ser Asp Glu Ser Lys Leu Ala Ser Thr Lys Leu Ser Ile Gly Ala				30
1210	1215	1220		
GAA AAT GCA GAA CAC GTT GAA GTA ACT AAA TCG GGC ATA GCC TTA AAA			4777	
Glu Asn Ala Glu His Val Glu Val Thr Lys Ser Gly Ile Ala Leu Lys				
1225	1230	1235	1240	
GCG GAT AAC ACC TCC GAT AAA TCT AGC ATC ACC TTA GCC CAA GAT GCG			4825	
Ala Asp Asn Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Leu Ala Gln Asp Ala				40
1245	1250	1255		

ATT ACT CTT GCG GGG AAC GCA ACC GGA ACG GCG ATT AAA TTG ACT GGT	4873	
Ile Thr Leu Ala Gly Asn Ala Thr Gly Thr Ala Ile Lys Leu Thr Gly		
1260	1265	1270
GTT GCA GAT GGC AAC ATT ACG GTA AAT TCA AAA GAT GCG GTA AAT GGG	4921	
Val Ala Asp Gly Asn Ile Thr Val Asn Ser Lys Asp Ala Val Asn Gly		
1275	1280	1285
GGG CAG TTG CGT ACC TTA TTA GGG GTT GAT AGC GGG GCT AAA ATT GGC	4969	
Gly Gln Leu Arg Thr Leu Leu Gly Val Asp Ser Gly Ala Lys Ile Gly		10
1290	1295	1300
GGT ACT GAG AAA ACA ACG ATC AGT GAA GCC ATT TCT GAT GTG AAG CAA	5017	
Gly Thr Glu Lys Thr Thr Ile Ser Glu Ala Ile Ser Asp Val Lys Gln		
1305	1310	1315
GCT CTT ACC GAT GCG ACA TTG GCA TAT AAA GCG GAC AAT AAA AAC GGT	5065	
Ala Leu Thr Asp Ala Thr Leu Ala Tyr Lys Ala Asp Asn Lys Asn Gly		
1325	1330	1335
AAA ACA GTT AAA TTG ACT GAC GGA TTG AAT TTT ACT AGC ACG ACC AAT	5113	
Lys Thr Val Lys Leu Thr Asp Gly Leu Asn Phe Thr Ser Thr Thr Asn		
1340	1345	1350
ATT GAT GCT TCA GTG GAA GAT AAC GGT GTG GTG AAA TTC ACC TTA AAA	5161	
Ile Asp Ala Ser Val Glu Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Thr Leu Lys		
1355	1360	1365
GAT AAA TTA ACA GGC TTA AAA ACT ATC GCA ACT GAA TCT TTG AAT GCT	5209	
Asp Lys Leu Thr Gly Leu Lys Thr Ile Ala Thr Glu Ser Leu Asn Ala		
1370	1375	1380
		40

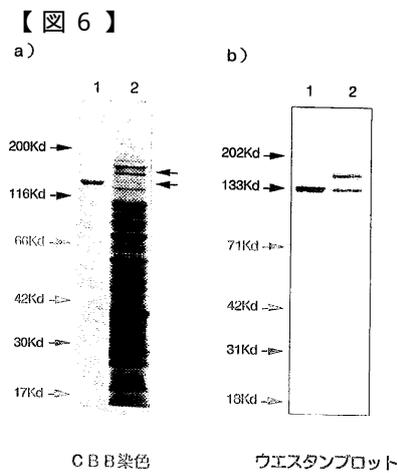
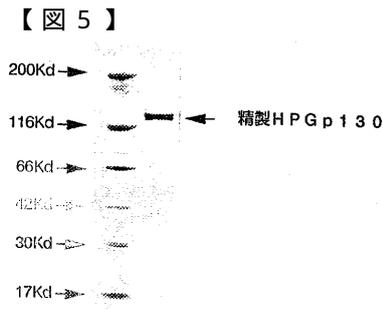
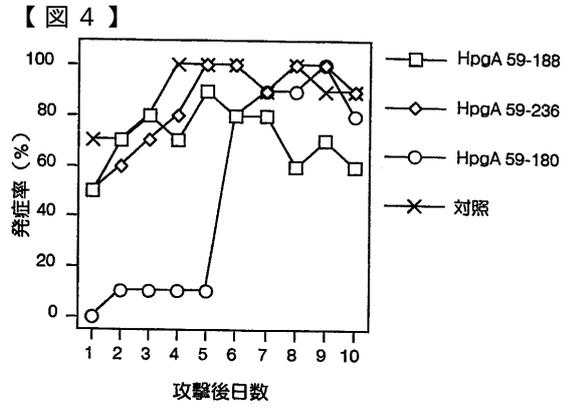
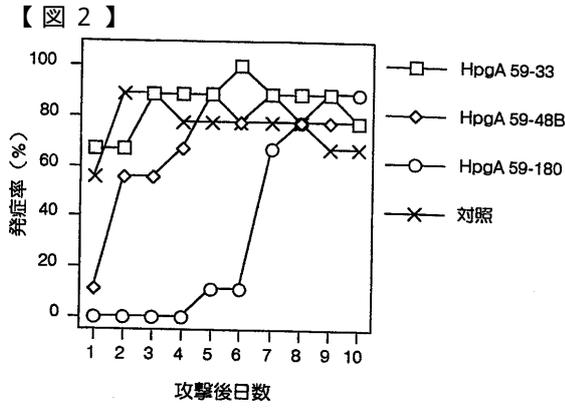
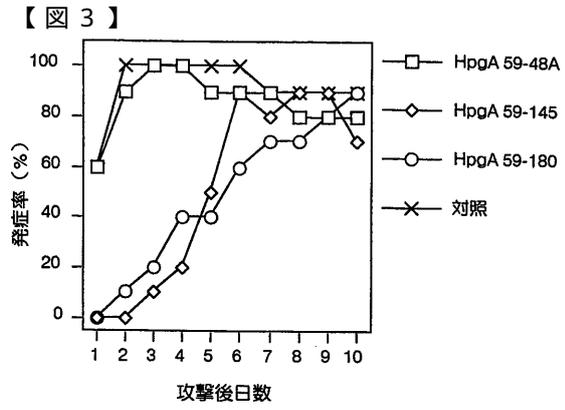
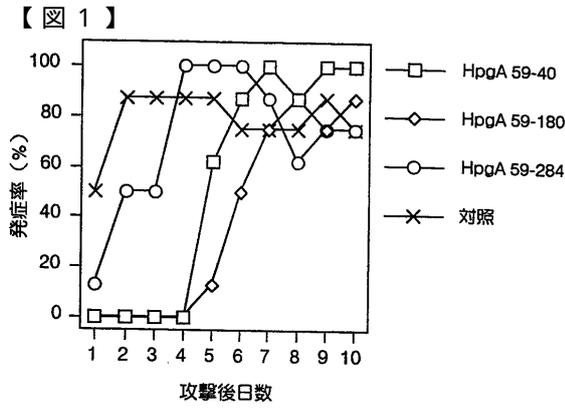
TCT CAA AAT ATC ATC GCT GGC GGT ACG GTA ACA GTG GGC GGC GAG ACA	5257	
Ser Gln Asn Ile Ile Ala Gly Gly Thr Val Thr Val Gly Gly Glu Thr		
1385                      1390                      1395                      1400		
GAG GGC ATT GTG CTA ACA AAA TCT GGC TCA GGA AAT GAC CGC ACT TTA	5305	
Glu Gly Ile Val Leu Thr Lys Ser Gly Ser Gly Asn Asp Arg Thr Leu		
1405                      1410                      1415		10
TCT TTA TCT GGT GCA GGC AAT GCA GCA ACA GAT GGC ATT AAA GTC TCT	5353	
Ser Leu Ser Gly Ala Gly Asn Ala Ala Thr Asp Gly Ile Lys Val Ser		
1420                      1425                      1430		
GGC GTG AAA GCA GGG ACG GCA GAC ACC GAT GCG GTG AAT AAA GGT CAG	5401	
Gly Val Lys Ala Gly Thr Ala Asp Thr Asp Ala Val Asn Lys Gly Gln		
1435                      1440                      1445		20
TTA GAT AAA CTT TTT AAA GCG ATC AAT GAC GCA TTA GGC ACA ACA GAT	5449	
Leu Asp Lys Leu Phe Lys Ala Ile Asn Asp Ala Leu Gly Thr Thr Asp		
1450                      1455                      1460		
TTA GCG GTA ACC AAA AAT CCA AAT CAA ACC TCT ATC TTT AAT CCG ATA	5497	
Leu Ala Val Thr Lys Asn Pro Asn Gln Thr Ser Ile Phe Asn Pro Ile		
1465                      1470                      1475                      1480		30
AAC GGC ACG GCT CCA ACC ACC TTT AAA GAC GCG GTG GAT AAA TTA ACC	5545	
Asn Gly Thr Ala Pro Thr Thr Phe Lys Asp Ala Val Asp Lys Leu Thr		
1485                      1490                      1495		
ACC GCT GTG AAT ACA GGT TGG GGA TCA AAG GTA GGT ATT TTG GCA ACA	5593	
Thr Ala Val Asn Thr Gly Trp Gly Ser Lys Val Gly Ile Leu Ala Thr		
1500                      1505                      1510		40
GGT ATT GAT GGT ATT GAT GCT GGG AAT AAG AAA ATT AGT AAT GTC GCC	5641	

Gly Ile Asp Gly Ile Asp Ala Gly Asn Lys Lys Ile Ser Asn Val Ala				
1515	1520	1525		
GAT GGG GAT ATT TCT CCA ACC AGT GGT GAT GTA GTG ACA GGT CGT CAG			5689	
Asp Gly Asp Ile Ser Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Thr Gly Arg Gln				
1530	1535	1540		
CTC TAC GCC TTA ATG CAG AAA GGT ATT CGC GTG TAT GGT GAT GAA GTT			5737	10
Leu Tyr Ala Leu Met Gln Lys Gly Ile Arg Val Tyr Gly Asp Glu Val				
1545	1550	1555	1560	
AGT CCA ACG AAG ACT CAA ACA ACA GCA CCT ACA GCA TCT AGC ACT CAA			5785	
Ser Pro Thr Lys Thr Gln Thr Thr Ala Pro Thr Ala Ser Ser Thr Gln				
1565	1570	1575		
GGT GGG GCG ACA ACG GCG AAT ACG GCG GGT GGT GTA GCA CCA GCA GGT			5833	20
Gly Gly Ala Thr Thr Ala Asn Thr Ala Gly Gly Val Ala Pro Ala Gly				
1580	1585	1590		
AAT GTA GCA ACG GGG GAT ATT GCG CCG ACA CAG CCA GCA TTG CCA GAG			5881	
Asn Val Ala Thr Gly Asp Ile Ala Pro Thr Gln Pro Ala Leu Pro Glu				
1595	1600	1605		
ATG AAA ACG GCA TTG GTT GGT GAT CAC TTG GCT GTG CCG TTA GGT GGA			5929	30
Met Lys Thr Ala Leu Val Gly Asp His Leu Ala Val Pro Leu Gly Gly				
1610	1615	1620		
AGC CTC AAG ATT CAC GGA GAT CAT AAT GTG AAA ACA ACG ATT TCT GCG			5977	
Ser Leu Lys Ile His Gly Asp His Asn Val Lys Thr Thr Ile Ser Ala				
1625	1630	1635	1640	
GGT AAT CAA GTG GGG ATT TCA TTA CAG CCA AAT ATT TCT ATT GAG AAT			6025	40
Gly Asn Gln Val Gly Ile Ser Leu Gln Pro Asn Ile Ser Ile Glu Asn				

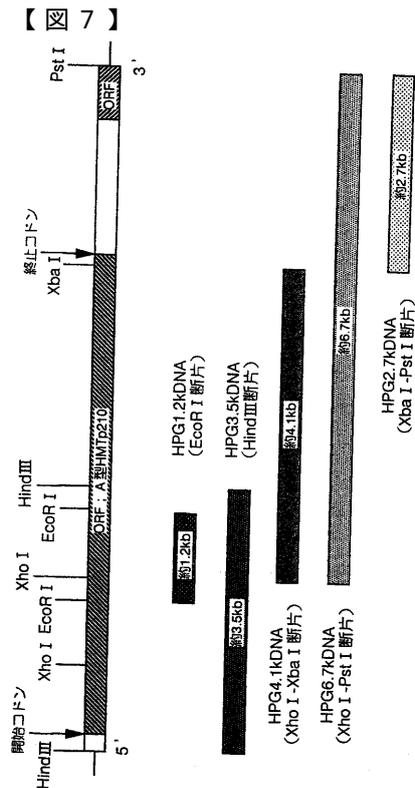
1645	1650	1655		
AAC TTG GTA ATT GGT TCA AAT AAG CCT GAG AAG GCA AAA TTA GCC GCA			6073	
Asn Leu Val Ile Gly Ser Asn Lys Pro Glu Lys Ala Lys Leu Ala Ala				
1660	1665	1670		
CAA GAA GGT AAT GCT TTG GTT ATC ACT AAC AAA GAT GAC GGG AAT GCG			6121	
Gln Glu Gly Asn Ala Leu Val Ile Thr Asn Lys Asp Asp Gly Asn Ala				10
1675	1680	1685		
GCG ATG GTC TTT AAT AAC GAG AAA AAT ATG CTT GTT CTC AGT GAT AAA			6169	
Ala Met Val Phe Asn Asn Glu Lys Asn Met Leu Val Leu Ser Asp Lys				
1690	1695	1700		
AAG GCA AAA CCA AGA GCG GTT CTT GAT GGA CAA AAT GGG GCA TTA ACT			6217	
Lys Ala Lys Pro Arg Ala Val Leu Asp Gly Gln Asn Gly Ala Leu Thr				20
1705	1710	1715	1720	
TTA GTC GGC AAT GAT GAT TCT CAA GTC ACC CTT TCC TCT AAG AAA GGT			6265	
Leu Val Gly Asn Asp Asp Ser Gln Val Thr Leu Ser Ser Lys Lys Gly				
1725	1730	1735		
AAA GAT ATT GAT GGA AAT GAT TTG AGC CGT CTC TCT GTG ACG ACT GAA			6313	
Lys Asp Ile Asp Gly Asn Asp Leu Ser Arg Leu Ser Val Thr Thr Glu				30
1740	1745	1750		
AGA ACA AAT GCT GAT GGG CAA CTT GAA AAA GTG GAA ACC TCA TTT GCT			6361	
Arg Thr Asn Ala Asp Gly Gln Leu Glu Lys Val Glu Thr Ser Phe Ala				
1755	1760	1765		
ACA ATG GAT GAT GGC TTG AAG TTC AAA GCC GAC GGG GAT AAA GTG ATT			6409	
Thr Met Asp Asp Gly Leu Lys Phe Lys Ala Asp Gly Asp Lys Val Ile				40
1770	1775	1780		

AAT AAG AAA CTT AAT GAA ACC GTT GAA ATT GTT GGT GAT GAG AAT GTG	6457	
Asn Lys Lys Leu Asn Glu Thr Val Glu Ile Val Gly Asp Glu Asn Val		
1785                      1790                      1795                      1800		
ACA ACA TCT ATT ACT GAT GAT AAT AAG GTG AAA GTT TCA CTG AAT AAG	6505	
Thr Thr Ser Ile Thr Asp Asp Asn Lys Val Lys Val Ser Leu Asn Lys		
1805                      1810                      1815		10
AAA ATC GCG ATT GAT GAG GTT AAG ATT CCA AAT ACA GAT CCT GAT GCT	6553	
Lys Ile Ala Ile Asp Glu Val Lys Ile Pro Asn Thr Asp Pro Asp Ala		
1820                      1825                      1830		
CAA AAG GGA GAT AGC ATT GTA ATC AAC AAT GGT GGA ATC CAC GCA GGT	6601	
Gln Lys Gly Asp Ser Ile Val Ile Asn Asn Gly Gly Ile His Ala Gly		
1835                      1840                      1845		20
AAT AAA GTG ATT ACT GGC GTT AAA GCG AGT GAT GAC CCA ACC AGT GCG	6649	
Asn Lys Val Ile Thr Gly Val Lys Ala Ser Asp Asp Pro Thr Ser Ala		
1850                      1855                      1860		
GTG AAT CGA GGT CAA TTA AAT ACT GTG ATT GAT AAT GTT CAA AAT AAT	6697	
Val Asn Arg Gly Gln Leu Asn Thr Val Ile Asp Asn Val Gln Asn Asn		
1865                      1870                      1875                      1880		30
TTC AAT CAA GTT AAT CAA CGT ATT GGC GAT TTA ACA CGG GAG TCG CGT	6745	
Phe Asn Gln Val Asn Gln Arg Ile Gly Asp Leu Thr Arg Glu Ser Arg		
1885                      1890                      1895		
GCA GGT ATT GCA GGT GCA ATG GCG ACG GCA AGC CTA CAA AAT GTT GCT	6793	
Ala Gly Ile Ala Gly Ala Met Ala Thr Ala Ser Leu Gln Asn Val Ala		
1900                      1905                      1910		40
TTA CCA GGG AAA ACA ACG ATT TCC GTA GGT ACA GCA ACG TTC AAA GGG	6841	

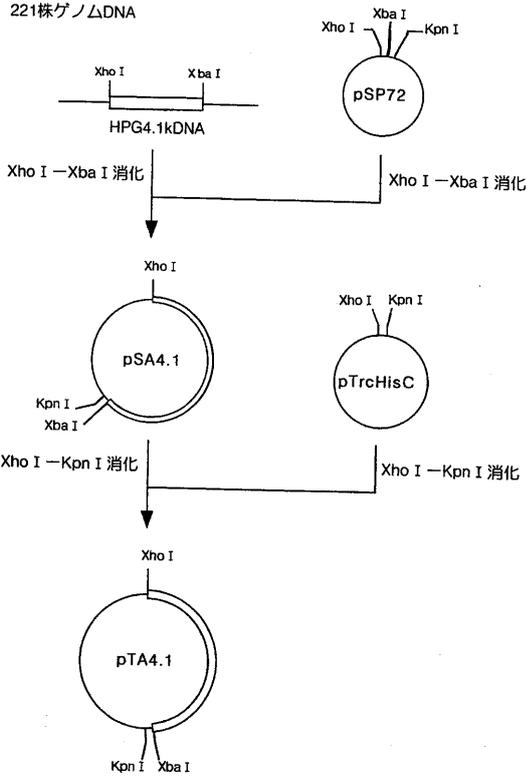




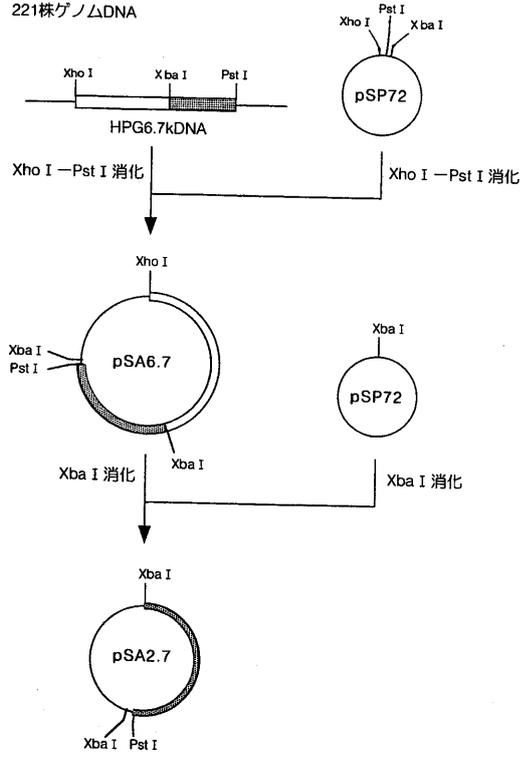
1. 精製HPG p130  
2. A型菌221株



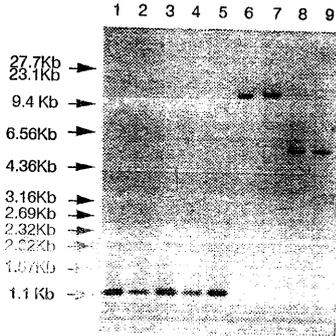
【 図 8 】



【 図 9 】

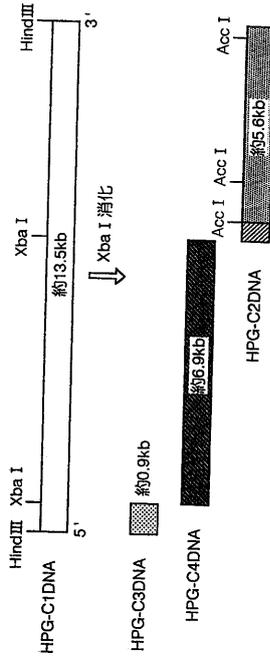


【 図 10 】

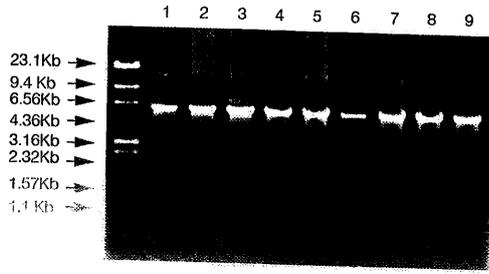


1. A型菌221株
2. A型菌083株
3. A型菌W株
4. A型菌Germany株
5. A型菌Georgia株
6. B型菌Spross株
7. B型菌0222株
8. C型菌Modesto株
9. C型菌53-47株

【 図 11 】



【 図 1 2 】



1. A型菌221株
2. A型菌083株
3. A型菌W株
4. A型菌Germany株
5. A型菌Georgia株
6. B型菌Spross株
7. B型菌0222株
8. C型菌Modesto株
9. C型菌53-47株

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	1 7 1
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
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 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D

(72)発明者 濱田 福三郎  
 熊本県菊池郡西合志町須屋 2 6 7 9 - 2

(72)発明者 時吉 幸男  
 熊本県熊本市若葉 3 丁目 1 4 番 1 9 号

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 Veterinary Microbiology 34 p.191-197 (1993)  
 Veterinary Microbiology 32(1) p.43-49 (1992)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00  
 A61K 39/42  
 A61P 31/04  
 A61P 37/04  
 C07K 14/195  
 C07K 16/12  
 C12N 1/21  
 C12P 21/00  
 C12Q 1/68  
 G01N 33/00  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq  
 PubMed  
 JMEDIus(JDreamII)  
 JSTPIus(JDreamII)