

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4443922号
(P4443922)

(45) 発行日 平成22年3月31日(2010.3.31)

(24) 登録日 平成22年1月22日(2010.1.22)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 3
請求項の数 53 (全 52 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-510809 (P2003-510809)	(73) 特許権者	504003167
(86) (22) 出願日	平成14年7月1日(2002.7.1)		フオシユグレン, アルネ
(65) 公表番号	特表2005-500837 (P2005-500837A)		スウェーデン国、エス-239 41・フ
(43) 公表日	平成17年1月13日(2005.1.13)		アルステルボ、ソテンスペーゲン・4・ベ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/001299		ー
(87) 国際公開番号	W02003/004651	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年1月16日(2003.1.16)		弁理士 川口 義雄
審査請求日	平成17年3月2日(2005.3.2)	(74) 代理人	100113332
(31) 優先権主張番号	0102410-8		弁理士 一入 章夫
(32) 優先日	平成13年7月4日(2001.7.4)	(74) 代理人	100114188
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 モラクセラ・カタラーリス由来の新規な表面露出免疫グロブリンD結合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列を有し、200kDaの見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)中で検出され得ることを特徴とする表面露出タンパク質、配列番号1のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有することを特徴とするその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、配列番号10に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性のIgD結合断片、または配列番号8に記載のアミノ酸配列を有する前記表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片。

【請求項2】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有し、配列番号10に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第1項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性のIgD結合断片、または配列番号10に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸配列の置換、欠失、挿入または付加を有し、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体。

【請求項3】

配列番号10に記載されているアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第2

項に記載の免疫原性の I g D 結合断片。

【請求項 4】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有し、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片。

【請求項 5】

配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第 4 項に記載の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片。

【請求項 6】

配列番号 2 に記載の塩基配列を有し、請求の範囲第 1 項に記載のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質をコードする DNA 配列、または、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するタンパク質をコードする前記 DNA 配列の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むことを特徴とする DNA セグメント。

10

【請求項 7】

請求の範囲第 2 項に記載の免疫原性の I g D 結合断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする DNA セグメント。

【請求項 8】

配列番号 11 に記載されており、請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性の I g D 結合断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする請求の範囲第 7 項に記載の DNA セグメント。

20

【請求項 9】

請求の範囲第 4 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする DNA セグメント。

【請求項 10】

配列番号 9 に記載されており、請求の範囲第 5 項に記載の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする請求の範囲第 9 項に記載の DNA セグメント。

【請求項 11】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有し、200 k D a の見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有することを特徴とするその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。

30

【請求項 12】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有し配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の I g D 結合断片、または配列番号 10 において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする DNA 配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。

40

【請求項 13】

請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性の I g D 結合断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする請求の範囲第 12 項に記載のプラスミドまたはファージ。

【請求項 14】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有し、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露

50

出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片、または配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し赤血球および上皮細胞に選択的に結合する能力を有する前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする DNA 配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。

【請求項 15】

請求の範囲第 5 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする請求の範囲第 14 項に記載のプラスミドまたはファージ。

【請求項 16】

請求の範囲第 1 項～第 15 項のいずれか 1 項に記載のプラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、前記タンパク質または変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片、または前記タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片を産生し得る細菌、酵母及び植物から選択されることを特徴とする非ヒト宿主。

【請求項 17】

大腸菌であることを特徴とする請求の範囲第 16 項に記載の宿主。

【請求項 18】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有し、200 kDa の見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号 1 において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片をコードする DNA 配列を含み、該 DNA 配列が別の遺伝子に融合していることを特徴とする組換え DNA 分子。

【請求項 19】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有し配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の I g D 結合断片、または配列番号 10 において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする DNA 配列を含み、該 DNA 配列が別の遺伝子に融合していることを特徴とする組換え DNA 分子。

【請求項 20】

請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性の I g D 結合断片をコードする DNA 配列を含み、該 DNA 配列が別の遺伝子に融合していることを特徴とする請求の範囲第 19 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 21】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有し配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球または上皮細胞接着性断片、または配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し赤血球もしくは上皮細胞に結合する能力を有する前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする DNA 配列を含み、該 DNA 配列が別の遺伝子に融合していることを特徴とする組換え DNA 分子。

【請求項 22】

請求の範囲第 5 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片をコードする DNA 配列を含み、該 DNA 配列が別の遺伝子に融合していることを特徴とする請求の範囲第 21 項に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 23】

請求の範囲第 18 項～第 22 項のいずれか 1 項に定義の組換え DNA 分子を含むことを

10

20

30

40

50

特徴とするプラスミドまたはファージ。

【請求項 2 4】

請求の範囲第 2 3 項に定義のプラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、細菌、酵母及び植物から選択されることを特徴とする非ヒト宿主。

【請求項 2 5】

大腸菌であることを特徴とする請求の範囲第 2 4 項に記載の宿主。

【請求項 2 6】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有し、200 kDa の見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片が請求の範囲第 1 8 項に記載の組換え DNA 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされていることを特徴とする融合タンパク質またはポリペプチド。

10

【請求項 2 7】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有し配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の I g D 結合断片、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性 I g D に結合する能力を有するその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が請求の範囲第 1 9 項に記載の組換え DNA 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされていることを特徴とする融合タンパク質またはポリペプチド。

20

【請求項 2 8】

請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性の I g D 結合断片が請求の範囲第 2 0 項に記載の組換え DNA 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされていることを特徴とする請求の範囲第 2 7 項に記載の融合タンパク質またはポリペプチド。

【請求項 2 9】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有し配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片、または配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し赤血球もしくは上皮細胞に選択的に結合する能力を有する前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が請求の範囲第 2 1 項に記載の組換え DNA 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされていることを特徴とする融合タンパク質またはポリペプチド。

30

【請求項 3 0】

請求の範囲第 5 項に記載の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片が請求の範囲第 2 2 項に記載の組換え DNA 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされていることを特徴とする請求の範囲第 2 9 項に記載の融合タンパク質またはポリペプチド。

【請求項 3 1】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有し、200 kDa の見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合もしくは可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする融合産物。

40

【請求項 3 2】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結

50

合する能力を有する請求の範囲第2項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性のIgD結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した請求の範囲第2項に記載の変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする融合産物。

【請求項33】

請求の範囲第3項に記載の免疫原性のIgD結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする請求の範囲第32項に記載の融合産物。

【請求項34】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第2項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片、または請求の範囲第2項に記載の前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする融合産物。

10

【請求項35】

請求の範囲第5項に記載の免疫原性の赤血球もしくは上皮細胞接着性断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする請求の範囲第34項に記載の融合産物。

【請求項36】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列を有し、200kDaの見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号1に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号10に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性のIgD結合断片を用いてIgDを検出する方法。

20

【請求項37】

前記表面露出タンパク質、当該タンパク質の変異体または当該タンパク質または変異体の断片が標識されていたり及び/またはマトリックスに結合している請求の範囲第36項に記載のIgDを検出する方法。

30

【請求項38】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第2項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性のIgD結合断片、または請求の範囲第2項に記載の前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてIgDを検出する方法。

【請求項39】

表面露出タンパク質の免疫原性のIgD結合断片またはその変異体が標識されていたり及び/またはマトリックスに結合している請求の範囲第38項に記載のIgDを検出する方法。

【請求項40】

膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第3項のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、または配列番号10に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体の免疫原性のIgD結合断片を用いてIgDを検出する請求の範囲第38項に記載の方法。

40

【請求項41】

表面露出タンパク質の免疫原性のIgD結合断片またはその変異体が標識されていたり及び/またはマトリックスに結合している請求の範囲第39項に記載のIgDを検出する方法。

50

【請求項 4 2】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有し、200 kDa の見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号 1 の記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合もしくは可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片を用いて I g D を分離する方法。

【請求項 4 3】

表面露出タンパク質、当該タンパク質の変異体または当該タンパク質もしくは変異体の断片が標識されていたり及び/またはマトリックスに結合している請求の範囲第 4 2 項に記載の I g D を分離する方法。

10

【請求項 4 4】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第 2 項の表面露出タンパク質の免疫原性の I g D 結合断片、または請求の範囲第 2 項に記載の前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いて I g D を分離する方法。

【請求項 4 5】

表面露出タンパク質の免疫原性の I g D 結合断片またはその変異体がマトリックスに結合している請求の範囲第 4 4 に記載の I g D を分離する方法。

20

【請求項 4 6】

膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第 3 項に記載のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾変異体の免疫原性の I g D 結合断片を用いて I g D を分離する請求の範囲第 4 4 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

モラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質またはその変異体の免疫原性の I g D 結合断片が標識されていたり及び/またはマトリックスに結合している請求の範囲 4 6 項に記載の方法。

30

【請求項 4 8】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列を有し、200 kDa の見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合もしくは可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性の I g D 結合断片の単離方法であって、

- a) 任意に EDTA の存在下で双イオン性またはノニオン性界面活性剤を添加することによりモラクセラ・カタラーリスの懸濁液を抽出するステップ、
 - b) ステップ a) からのモラクセラ・カタラーリスの I g D 結合タンパク質を含む抽出物を吸着カラムにかけるステップ、
 - c) I g D 結合タンパク質を溶離するステップ、及び
 - d) I g D 結合タンパク質を分離するステップ
- を含むことを特徴する前記方法。

40

【請求項 4 9】

界面活性剤がエンピゲン（登録商標）、n - オクチル - D - グルコシド及びトリトン X - 100 + 0.01 M EDTA からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第 4 8 項に記載の方法。

50

【請求項50】

ステップa)における界面活性剤の濃度が0.1～5%、好ましくは約3%であることを特徴とする請求の範囲第48項または第49項に記載の方法。

【請求項51】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列を有し、200kDaの見かけ分子量を有し且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、配列番号1に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸置換、欠失、挿入または付加を有し膜結合もしくは可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または配列番号10に記載のアミノ酸配列を有する前記タンパク質または変異体の免疫原性のIgD結合断片の免疫原性部分に特異的であることを特徴とする精製抗体。

10

【請求項52】

膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第3項に記載の免疫原性のIgD結合断片に特異的であることを特徴とする請求の範囲第51項に記載の精製抗体。

【請求項53】

赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有している請求の範囲第5項に記載の免疫原性または赤血球もしくは上皮細胞接着性断片に特異的であることを特徴とする請求の範囲第51項に記載の精製抗体。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) 中で検出され得、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質、前記表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、及び前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。

【背景技術】

【0002】

モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) は、長年気道において比較的無害な片利共生生物と見做されてきたグラム陰性双球菌である。現在、モラクセラ・カタラーリスは中耳炎の原因の中で3番目に多く、肺疾患を患っている成人における副鼻腔炎及び下気道感染の重大な原因菌でもある。モラクセラ・カタラーリスは健康な小児の咽頭の最も一般的な常住菌の1つでもある。

30

【0003】

20年前、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及びモラクセラ・カタラーリスは可溶性及び表面結合ヒトIgDに対して強いアフィニティを示すことが判明した(1)。IgD-結合は、インフルエンザ菌及びモラクセラ・カタラーリスによるヒトリンパ球に対する強い分裂促進効果を説明する現象である表面結合IgDとの類似相互作用に細胞レベルで類似しているようである(2-4)。インフルエンザ菌からのIgD結合外膜タンパク質(タンパク質D)を分離し、クローン化し、重要な病原性因子であることが分かった(5)。しかしながら、タンパク質Dは試験したIgDミエローマの大部分に結合せず、血清型bのカプセル化インフルエンザ菌は別のIgD受容体を発現することが示唆された(6)。

40

【0004】

初期の研究では、多種多様なモラクセラ単離物コレクション由来の外膜タンパク質(OMP)が高度の類似性を示すことが立証された(7)。研究者たちの研究の主眼は特定群のタンパク質に向けられていた。最近の研究では、Us p AまたはHMW-OMPと称される高分子量表面抗原が実際には2種のタンパク質から構成されていることが立証された。これらのタンパク質はUs p A 1及びUs p A 2と名付けられている(8, 9, 10)

50

。上記OMPの見かけ分子量はSDS-PAGE分析で測定して250kDa以上である。ギ酸で還元すると、約120~140kDaのバンドが生じたことから、UspAタンパク質が数個のモノマーサブユニットから構成されるオリゴマー複合体を形成していることが示唆された(11)。クローン化遺伝子から推定して各タンパク質の推定分子量はUspA1及びUspA2のそれぞれについて88kDa及び62kDaである。推定分子量及びSDS-PAGEを用いて測定した分子量の違いは予想される渦巻状コイル構造に起因すると考えられる(9)。

【0005】

最近の特許文献では、約200kDaの分子量を有するモラクセラ・カタラーリスの外膜タンパク質が単離された(12)。約200kDaのタンパク質をコードする配列も提供された。前記タンパク質は免疫原性であることが分かったが、それ以上の生物学的機能は記載されていなかった。更に、200kDaのタンパク質は赤血球凝集モラクセラ・カタラーリスと関連している(13, 14)。

10

【0006】

CopBは、中程度の抗原保存を示す80kDa表面露出主要OMPである。更に、OMP CDは多数の表面露出エピトープを有する46kDa高保存タンパク質であり、OMP Eは各種の異種株で検出される47kDaタンパク質である。ラクトフェリン結合(LbpA及びB)及びトランスフェリン結合(TbpA及びB)タンパク質はそれぞれ99~111kDa及び74~105kDaの分子サイズを有する。

【0007】

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のある株は、いずれも食中毒及びトキシンショック症候群(TSS)に関連するトキシンショック症候群トキシン-1(TSST-1)、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、SEB及びSECのような免疫刺激エキソトキシンを生ずる。これらのエキソトキシンはTリンパ球を高頻度で活性化する能力を有するためにスーパー抗原(SAg)と呼ばれてきた。SAgは未プロセスタンパク質としてAPC上のHLAクラスII分子に結合し、特定のTCRV鎖を発現するT細胞をオリゴクロー的に活性化する。過剰量のSAgをインビボで接触させると、強いサイトカインが産生し、トキシックショック様症候群に関連するIL-2、TNF-及びINF-が含まれる。

20

【0008】

1966年に免疫グロブリン結合細菌タンパク質の黄色ブドウ球菌タンパク質A(SpA)が初めて発見されて以来、このタンパク質の性質が徹底的に調べられた。SpAがIgGのFc部分に結合する能力は公知であるが、SpAは特定重鎖の可変領域との相互作用を表す所謂“選択的”結合のためにすべてのクラスのIgG分子のフラクションにも結合する。黄色ブドウ球菌のすべてのIgG結合能力はSpAにより媒介されると考えられてきた。しかしながら、黄色ブドウ球菌中にIg結合タンパク質をコードする第2遺伝子の存在も報告された。

30

【0009】

化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyrogenes*)及びペプトストレプトコッカス・マグヌス(*Peptostreptococcus magnus*)はIg結合細菌の他の例である。化膿連鎖球菌はタンパク質のMファミリーに属するタンパク質Hを産生し、IgGのFc領域に対して強いアフィニティーを有する。幾つかの株が発現するタンパク質はIgGではなくIgAに結合するかまたはIgGとIgAの両方に結合する。タンパク質BacまたはB-抗原はグループBストレプトコッカスのある株が発現するIgA結合タンパク質である。最後に、ペプトストレプトコッカス・マグヌスはIg軽鎖、特に軽鎖に対して高く特異的なアフィニティーを示し、よってすべてのクラスのIgと相互作用するタンパク質Lを発現する。

40

【0010】

IgDは可溶性形態及び免疫結合形態の両方で存在するユニークな免疫グロブリンである。いずれの形態も同一遺伝子によりコードされ、スプライシング産物である。すべての

50

成熟Bリンパ球は膜結合IgD及びIgMから構成されるB細胞受容体(BCR)を有する。可溶性IgDは血清Igの全量の約0.25%を占める。IgDの主要な機能は、B細胞漸増及び急速アフィニティー成熟を最適化するためにB細胞上に抗原受容体として存在すると見られる。抗原はエンドサイトーシスによりIgDを介して吸収された後細胞内劣化及びT細胞に対するMHCクラスIIでの提示が生じ、よって活性化され、サイトカインを産生する。多数のサイトカイン(例えば、インターロイキン-4)及び同時刺激分子(例えば、CD28)を含めたT細胞ヘルプが得られる。

【0011】

マクロファージ、樹枝細胞及びB細胞はすべてTリンパ球に対する抗原を提示し得るが、B細胞は表面上の抗原提示免疫グロブリンの重要性のために100倍以上有効である。免疫化を増強するための魅力的な方法はB細胞受容体に対して抗原を直接標的することである。抗-IgDモノクローナル抗体にコンジュゲートさせたウシ血清アルブミン(BSA)に対するマウス抗体応答は抗体なしにBSAを投与したときに比して100倍強いことは以前判明している。同時に、マウスミエローマ抗原を表面結合IgDに標的させた抗-IgD抗体の定常領域に導入すると、MHCクラスII上での抗原提示は最高100倍有効となる(15)。

10

【0012】

追加のT細胞ヘルプなしにIgD BCRによりB細胞を活性化することにより、実験的に耐性を誘導し得る。B細胞アネルギーを誘導することにより自己免疫疾患を治療すること、よって自己抗体の産生を抑制することも可能であろう。実際、デキストラン結合抗-IgD抗体を投与したSLE傾向マウスは自己免疫の遅い発現を示す。別の研究で、IgDを介するB細胞活性化はTヘルパー2誘導IGE応答を低下させることが判明し、このことから重篤なアレルギー患者における抗体応答をTh2応答からTh1応答へ変更することによりIGE産生を低下させる治療が示唆された。B細胞受容体IgDに対して抗原を標的することにより、刺激、トレランス及びIGE産生からの切り替えが達成される。加えて、ポリクローナル活性化が報告された。結果は使用する実験モデルに依存する。各種反復IgD-結合セグメントを含めた各種構築物により、応答を調節することができる。

20

【0013】

腫瘍特異性抗原を認識するので、T細胞は抗腫瘍応答において重大な役割を果たす。しかしながら、全身免疫抑制のためにガン患者では重要なT細胞は通常弱い活性を示す。従って、Tヘルパー細胞のトリガーは非常に有効であろう。抗原提示細胞(APC)を用いる腫瘍に対するワクチン接種が最近認められている(17)。エキソピボで腫瘍抗原(ペプチド)をパルスしたAPCを用いる免疫化プロトコルが細胞毒性T細胞に対する有効なMHCクラスII提示を誘導することが判明している。また、EBV形質転換したB細胞は腫瘍浸潤リンパ球(TLC)に対するメラノーマ抗原を提示し得ることも立証された。実験モデルでは、B細胞上に豊富にある受容体のMHCクラスII及びB7表面分子をトランスフェクトした腫瘍細胞は腫瘍ワクチン接種のための実行可能なアプローチであろうことも分かった。驚くことに、対応細胞株からの腫瘍ライゼートをパルスしたB細胞を注射したB16メラノーマ担持マウスはIFN- γ 産生T細胞が増加するために長い生存を示した。誘導したTヘルパー細胞は充実性腫瘍に対してより強い細胞毒性応答を示したことも立証された。IgDに標的したミエローマ抗原はT細胞応答を誘発するので、特定腫瘍抗原にコンジュゲートしたIgD結合細菌タンパク質を用いる示唆されているアプローチは実行可能であろう。

30

40

【0014】

体液及び細胞免疫応答をトリガーすべく抗原(例えば、微生物または特定腫瘍から誘導したペプチド)をIgD担持B細胞に標的するためには、IgD結合タンパク質またはより短いIgD結合ペプチドが非常に有用なベクターであろう。同様のアプローチ手段を有する有効な戦略の例は幾つか存在する。抗-IgDモノクローナル抗体にコンジュゲートしたウシ血清アルブミン(BSA)に対するマウスの体液性免疫応答は、BSAを単独で

50

投与したときに比較して100倍強い。最近のLundeららの文献(15)には、ミエローマ誘導ペプチドを抗-IgD Fab'断片の定常領域に取り込み、マウスに注入したとき問題の抗原に対する抗原提示は1,000倍以上効率的であることが記載されている(15)。また、コレラ毒素に融合した黄色ブドウ球菌タンパク質AのIg結合断片はコレラ毒素に対する全身及び粘膜免疫応答を10~100倍増加させる(16)。最後に、実験的に十分に規定されたB16メラノーマからなるマウス腫瘍モデルでは、エキソピボで腫瘍組織から誘導したペプチドをパルスした活性化Bリンパ球はインピボでより強い抗腫瘍応答を惹起し得、その結果生存を延長させ得る(17)。

【発明の開示】

【0015】

10

1つの態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)中で検出され得、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片、または前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。

【0016】

別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体に関する。

20

【0017】

更なる態様で、本発明は、配列番号10に記載されているアミノ酸配列を有する上記免疫原性またはIgD結合断片に関する。

【0018】

更なる態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。

【0019】

更なる態様で、本発明は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を有する上記免疫原性接着性断片に関する。

【0020】

30

1つの態様で、本発明は、配列番号2に記載されており、上記のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質をコードするDNA配列、または前記DNA配列の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むDNAセグメントに関する。

【0021】

別の態様で、本発明は、上記免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0022】

更なる態様で、本発明は、配列番号11に記載されており、上記免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0023】

40

更なる態様で、本発明は、上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0024】

更なる態様で、本発明は、配列番号9に記載されており、上記免疫原性接着性断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0025】

更なる態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片、また

50

は前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むワクチンに関する。

【 0 0 2 6 】

更なる態様で、本発明は、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むワクチン、好ましくは配列番号 1 0 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性または I g D 結合断片を含むワクチンに関する。

【 0 0 2 7 】

更に別の態様で、本発明は、上記モラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むワクチン、好ましくは配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片を含むワクチンに関する。

10

【 0 0 2 8 】

1 つの好ましい実施態様では上記ワクチンは別のワクチンと組み合わせられ、別の好ましい実施態様では上記ワクチンは別の分子の免疫原性部分と組み合わせられる。

【 0 0 2 9 】

1 つの態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

20

【 0 0 3 0 】

別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージ、好ましくは配列番号 1 0 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

【 0 0 3 1 】

更に別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージ、好ましくは配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

30

【 0 0 3 2 】

更に別の態様で、本発明は、上記したプラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、前記タンパク質または変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片、または前記タンパク質の免疫原性接着性断片を産生し得る細菌、酵母及び植物から選択される非ヒト宿主に関する。1 つの実施態様で、宿主は大腸菌である。

【 0 0 3 3 】

1 つの態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含む組換え D N A 分子に関する。

40

【 0 0 3 4 】

別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含む組換え D N A 分子、好ましくは配列番号 1 0 に記

50

載されているアミノ酸配列を有する免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を含む組換え D N A 分子に関する。

【 0 0 3 5 】

更に別の態様で、本発明は、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含む組換え D N A 分子、好ましくは配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片をコードする D N A 配列を含む組換え D N A 分子に関する。

【 0 0 3 6 】

更に別の態様で、本発明は上記融合 D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

【 0 0 3 7 】

更なる態様で、本発明は、上記プラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、細菌、酵母及び植物から選択される非ヒト宿主に関する。1 つの実施態様で、宿主は大腸菌である。

【 0 0 3 8 】

1 つの態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片が上記した組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされている融合タンパク質またはポリペプチドに関する。

【 0 0 3 9 】

更なる態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が上記組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされている融合タンパク質またはポリペプチドに関する。

【 0 0 4 0 】

更に別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を上記組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わされている融合タンパク質またはポリペプチドに関する。

【 0 0 4 1 】

更に別の態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している融合産物に関する。

【 0 0 4 2 】

更なる態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している融合産物に関する。

【 0 0 4 3 】

更に別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び

10

20

30

40

50

上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している融合産物に関する。好ましい融合産物では、配列番号10に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性またはI g D結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している。好ましい融合産物では、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している。

【0044】

1つの態様で、本発明は、場合により標識されている及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片を用いてI g Dを検出する方法に関する。

10

【0045】

更なる態様で、本発明は、場合により標識されている及び/またはマトリックスに結合していてもよい、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてI g Dを検出する方法に関する。

20

【0046】

別の態様で、本発明は、場合により標識されている及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号10に記載されているアミノ酸配列及び膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてI g Dを検出する方法に関する。

【0047】

更なる態様で、本発明は、場合によりマトリックスに結合していてもよい、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片を用いてI g Dを分離する方法に関する。

30

【0048】

更に別の態様で、本発明は、場合によりマトリックスに結合していてもよい、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてI g Dを分離する方法に関する。

【0049】

別の態様で、本発明は、場合により標識されているか及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号10に記載されているアミノ酸配列且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてI g Dを分離する方法に関する。

40

【0050】

1つの態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片

50

の単離方法に関する。前記方法は、

- a) 任意に E D T A の存在下で双イオン性またはノニオン性界面活性剤を添加することによりモラクセラ・カタラーリスの懸濁液を抽出するステップ、
 - b) ステップ a) からのモラクセラ・カタラーリスの I g D 結合タンパク質を含む抽出物を吸着カラムにかけるステップ、
 - c) I g D 結合タンパク質を溶離させるステップ、及び
 - d) I g D 結合タンパク質を分離させるステップ
- を含む。

【 0 0 5 1 】

別の実施態様で、ステップ a) における界面活性剤の濃度が 0 . 1 ~ 5 %、好ましくは 3 % である。

10

【 0 0 5 2 】

更に別の態様で、本発明は、血液から I g D を除去するために前記血液を上記表面露出タンパク質またはその上記断片を含む材料中に体外循環させることを含む自己免疫疾患の治療方法に関する。

【 0 0 5 3 】

1 つの態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片の免疫原性断片に特異的な精製抗体に関する。

20

【 0 0 5 4 】

別の態様で、本発明は、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する上記免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体に特異的である上記精製抗体に関する。

【 0 0 5 5 】

更に別の態様で、本発明は、上記免疫原性または接着性断片に対して特異的であり、赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有する上記精製抗体に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 5 6 】

M I D は、既に十分に特性づけられているモラクセラ・カタラーリスの外膜タンパク質とは同一でない。M I D は U s p A または C o p B 外膜抗原に対するモノクローナル抗体により認識されない。M I D はまた、S D S - P A G E において異なる移動パターンを有し、アミノ酸及び D N A 配列分析により示すように異なる組成を有している。M I D は推定アミノ酸配列からの M w に相当する 200 k D a バンドとして現れるが、1,000 k D a 以上の推定分子量を有するエキストラバンドとしても現れる。エキストラバンドは、天然 M I D が U s p A と同様にオリゴマー複合体であることを示している (1 1)。このことは、S e p h a c r y l S - 400 カラムからのボイド容量の直後に M I D が最高 8,000 k D a の分画範囲で溶離されるという事実によっても更に裏付けられる。M I D のアミノ酸配列はモラクセラ・カタラーリス由来の U S P A 1 及び U S P A 2 外膜タンパク質とそれぞれ 11.1%、6.7% との同一性を示す (図 7)。

30

40

【 0 0 5 7 】

最近の特許文献で、約 200 k D a の分子量を有するモラクセラ・カタラーリスの外膜タンパク質が単離された (1 2)。約 200 k D a のタンパク質をコードする配列も提供された。しかしながら、前記タンパク質配列は本出願人が提示した配列とは同一でなく、M I D との同一性は 45.9 ~ 54.4 % でしかなかった (図 7)。タンパク質が免疫原性であることは分かったが、更なる生物学的機能は明らかにされていない。更に、200 k D a のタンパク質は赤血球凝集モラクセラ・カタラーリスに関連している (1 3 , 1 4)。

【実施例】

50

【0058】

ヒトIgDに対してアフィニティーを有するモラクセラ・カタラーリスのMIDと呼ばれる新規なIgD結合タンパク質、前記表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、及び前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片の単離、精製、性質決定、クローニング及び発現について調べる。

【0059】

(材料及び方法)

細菌及びプラスミド

モラクセラ・カタラーリス菌株Bc5は本発明者らの部門の鼻咽頭スワブ培養物からの臨床単離物である。血液、鼻咽喉及び痰から単離した118個の株をスウェーデン国、デンマーク国、フィンランド国、ハンガリー国、日本国及び米国から入手した。発現のために使用した配列決定した株及びプラスミドを表Iに示す。

【0060】

【表1】

表I
本研究で使用した細菌株及びプラスミド

細菌株または プラスミド	詳細 (単離場所)	文献またはソース
<u>細胞株</u>		
DH5 α	大腸菌	Novagen
BL21DE3	大腸菌	Novagen
BBH17	モラクセラ・カタラーリス (痰)	Christensen(デンマーク)
Bc5	モラクセラ・カタラーリス (鼻咽頭)	臨床微生物部 (スウェーデン, マルメ)
NCTC 4103	モラクセラ・カタラーリス (鼻咽頭)	CCUG (スウェーデン, ゴーセンハーグ)
RH1	モラクセラ・カタラーリス(血液)	Christensen(デンマーク)
RH4	モラクセラ・カタラーリス(血液)	Christensen(デンマーク)
<u>プラスミド</u>		
pET16(b)	発現ベクター	Novagen
pET16-MID	midのORFを有 するPET16(b)	本研究

【0061】

細菌を栄養ブイヨン(英国ベーシングストーク-ハンプシャーに所在のOxoid)において一晚増殖させ、収集し、リン酸緩衝食塩液(PBS, pH7.2)において遠心することにより洗浄した。

【0062】

免疫グロブリン、血清及び他のタンパク質

Ig調製物のIgG1(), IgG1(), IgG2(), IgG2(), IgG3(), IgG3(), IgG4(), IgG4(), IgA1(), IgA1(), IgA2(), IgA2(), IgM(), IgM(), IgD(), IgD()及びIgE()はすべてヒト起源であり、英国パーミンガムに所在のThe Binding Siteから購入した。IgDミエローマ血清IgD()及びIgD()は同一会社から購入し、IgD標準血清OTRD 02/03はドイツ国マールブルクに所在のBohringwerke AGから購入した。ミエローマ血

清 I g D () A、I g D () B、I g G A、I g G B、I g G C、I g M、I g A A 及び I g A B はスウェーデン国マルメに所在の Department of Clinical Chemistry から入手した。各免疫グロブリンの濃度は製造業者に従った。

【0063】

抗体

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗 - ヒト I g D はカリフォルニア州カマリロに所在の Biosource から入手した。フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合マウス抗 - ヒト I g D、非標識家兔抗 - ヒト I g D 及び HRP 標識家兔抗 - マウス I g はデンマーク国ゲントフテに所在の Dakopatts から購入した。ヤギ抗 - ヒト I g D 及び HRP 結合家兔抗 - ヒト多価免疫グロブリンはミズーリ州セントルイトに所在の Sigma から入手した。フィコエリトリン (RPE) 結合マウス抗 - ヒト CD 3 及び CD 19 はカリフォルニア州サンノゼに所在の Becton Dickinson から入手した。マウスモノクローナル抗体 17C7 (UspA) 及び 10F3 (CopB) はテキサス州ダラスに所在のテキサス大学の微生物部門の Eric J. Hansen 博士から好意により提供された。

【0064】

抗血清

フロイント完全アジュバンド (Difco, ドイツ国ハイデルベルクに所在の Becton Dickinson) 中に乳化させた 200 µg の精製 MID (Forsgren, 2001)、組換え MID 断片または組換え UspA1 を家兔に筋肉注射して免疫化した後 18 日目と 36 日目にフロイント不完全アジュバンド中の同一用量のタンパク質を用いて追加免疫した。2 ~ 3 週後に採血した。ウェスタンブロット検査から、抗 - UspA1 ポリクローナル抗体は組換え UspA1 及び UspA2 の両方と反応した。

【0065】

SDS - PAGE 及び膜でのタンパク質の検出 (ウェスタンブロット)

SDS - PAGE を、10% Bis - Tris ゲル、ランニング (MES)、サンプル (LDS) 及び移動緩衝液からなる市販の電気泳動システムを用い、プロッティング装置 (カリフォルニア州サンジェゴに所在の Novex) を用いて実施した。簡単に説明すると、サンプルを 10 分間煮沸した後、室温においてタンパク質 I I 垂直スラブ電気泳動セル (Novex) を用いて 150 定電圧下で電気泳動した。ゲルをクーマシーブリリアントブルー R - 250 (スウェーデン国スンドビーベリーに所在の Bio - Rad) で染色した。更に、タンパク質バンドのゲルから Immobilon - P 膜 (マサチューセッツ州ベッドフォードに所在の Millipore) への電気泳動移動を 30 V で 2 ~ 3 時間実施した。移動後、Immobilon - P 膜を 5% 粉ミルク含有 0.05% ツイーン 20 を添加した PBS (PBS - ツイーン) でブロックした。PBS - ツイーンで数回洗浄した後、膜を室温において 2% 粉ミルク含有 PBS - ツイーン中で精製 I g D ミエローマタンパク質 (0.5 µg/ml, hu I g D () ミエローマ; 英国バーミンガムに所在の The Bindingsite) とインキュベートした。PBS - ツイーンで数回洗浄後同一緩衝液で 1/1000 希釈した HRP 結合ヤギ抗 - ヒト I g D を添加した。幾つかの実験では、I g D ミエローマタンパク質の代わりに他の免疫グロブリンクラスの ミエローマタンパク質を用い、第 2 層として HRP 標識抗 - ヒト多価免疫グロブリン (Sigma) を用いた。モラクセラ外膜タンパク質 UspA1、2 及び Cop B を検出するためにそれぞれマウス mAb 17C7 及び 10F3 を用いた (7, 8)。これらの実験では、第 2 層として HRP 標識家兔抗 - マウス免疫グロブリンを用いた。室温で 40 分間インキュベートし、PBS - ツイーンを用いて更に数回洗浄した後、ECL ウェスタンブロット検出試薬 (スウェーデン国ウプサラに所在の Amersham Pharmacia Biotech) を用いて展開した。ウェスタンブロットを Personal Molecular Imager FX (Bio - Rad) を用いて分析した。

10

20

30

40

50

【0066】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

ELISAを用いて免疫グロブリンD-結合タンパク質を定量した。0.1M トリスHCl (pH 9.0)で5倍数希釈したモラクセラ・カタラーリス抽出物を100 μ l容量で微量滴定プレート (F96 Maxisorb, デンマーク国ロスキレに所在のNunc-Immuno module)に添加した。このプレートを密封し、4 \times で一晩インキュベートした。プレートをPBS-ツイーンで4回洗浄した後、ブロッキング緩衝液として1.5%オボアルブミン含有PBS-ツイーンを添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、更にPBS-ツイーンで4回洗浄した。各ウェルに1.5%オボアルブミン含有PBS-ツイーン100 μ l中に0.05 μ gのIgD ()ミエローマタンパク質を添加し、室温で1時間インキュベートした後プレートをPBS-ツイーンで4回洗浄した。同一緩衝液で1/1000希釈したHRP結合ヤギ抗-ヒトIgDと1時間インキュベートし、その後PBS-ツイーンで洗浄した後、過酸化水素 (最終濃度0.002%)と混合した0.1M クエン酸カリウム溶液 (pH 4.25)中テトラメチルベンジジン (20mM)を添加した。30分後、2M 硫酸を添加して酵素反応を停止した。次いで、光学密度 (OD)を自動ELISAリーダー (Multiskan Plus, フィンランド国に所在のLabsystems)を用いて450nmで測定した。

10

【0067】

ドットプロットアッセイ

0.1M トリス-HCl (pH 9.0)中の精製MID (0.0005~0.2 μ g)を100 μ lの容量でドットプロット装置 (ドイツ国デセルに所在のSchleicher & Schuell)を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell)に手で加えた。飽和後、膜を室温において1% オボアルブミン及び5% 粉ミルク含有PBS-ツイーン中で2時間インキュベートし、PBS-ツイーンで4回洗浄した。PBS-ツイーン (100 μ l)中のヒトミエローマタンパク質 (0.5 μ g)を添加し、2時間インキュベートし、PBS-ツイーンで数回洗浄した後、1/200希釈したHRP標識抗-ヒト軽鎖 (及び) (Dakopatts)を第2抗体として使用した。ウェスタンプロットについて上記したように展開した。別の実験では、まず0.1M トリス-HCl (pH 9.0)中のヒトミエローマ血清の希釈物を100 μ lの容量で膜に適用した。飽和後、インキュベーションステップ、ブロッキングステップ及び洗浄ステップを上記したように実施した。その後、PBS-ツイーン中の[¹²⁵I]標識タンパク質MIDプローブ (5~10 \times 10⁵cpm/ml)を添加した。一晩インキュベートした後、膜をPBS-ツイーンで4回洗浄し、風乾し、-70 $^{\circ}$ CにおいてコダックX-Omatレギュラー増感スクリーン (ニューヨーク州ロチェスターに所在のEastman Kodak)を用いてコダックCEA.C X線フィルムに露出させた。

20

30

【0068】

IgD結合タンパク質の抽出

モラクセラ・カタラーリス (1~5 \times 10¹¹コロニー形成単位 (cfu)/ml)を0.1~5% Empigen (マサチューセッツ州ベッドフォードに所在のCalbiochem Novabiochem)含有0.05M トリス-HCl緩衝液 (pH 8.8)に懸濁させた。幾つかの実験では、Empigenの代わりにCHAPS (Sigma)、n-オクチル-p-D-グルコシド (スイス国ブーベンドルフに所在のBachem)またはトリトン X-100 (Sigma)を用いた。いずれの界面活性剤も0.1~5%で場合により0.01M EDTAと共に試験した。細菌懸濁液を37 $^{\circ}$ Cにおいて2時間磁気攪拌して混合した。4 $^{\circ}$ Cにおいて8000 \times gで20分間遠心後、上清を滅菌フィルター (0.45 μ m; MilliporeのSterivex-HV)を用いて濾過した。

40

【0069】

IgD結合タンパク質の精製

3% Empigen (登録商標)中のモラクセラ・カタラーリス抽出物を、0.1%

50

Emphigen (登録商標) 含有 0.05 M トリス - HCl (pH 8.8) で平衡化した Q - セファロースカラム (Amersham Pharmacia Biotech) に適用した。カラムを同一緩衝液中 0.1 M NaCl の直線勾配を用いて溶離させた。ELISA 及びウェスタンブロットで検出して多くの IgD 結合活性を示すフラクションをプールし、Spectraphor 膜チューブ (分子量カットオフ 25,000; カリフォルニア州ラゲーナヒルズに所在の Spectrum) を用いて 0.05 M トリス - HCl (pH 8.8) に対して透析し、YM100 ディスク膜 (分子量カットオフ 100,000; マサチューセッツ州ビバリーに所在の Amicon) 上で濃縮した後ゲルクロマトグラフィーにかけた。IgD 結合タンパク質のゲル濾過を、0.1% Emphigen (登録商標) 含有 0.05 M トリス - HCl (pH 8.8) で平衡化した Sephacryl S-400 高解像カラム (20 x 900 mm; Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実施した。最高の IgD 結合活性を含むフラクションを上記したように濃縮し、再度クロマトグラフィーにかけた。

10

【0070】

ペプチド開裂及びアミノ酸配列分析

0.1% Emphigen (登録商標) 含有 0.05 M トリス - HCl (pH 8.8) 中の精製 MID を 37 °C において 1:10 の酵素/タンパク質比でトリプシンまたはキモトリプシンで一晩処理した。開裂混合物を SDS - PAGE につけ、Immobilion 膜に移したペプチドバンドを自動的に配列決定したり、上記したウェスタンブロット分析にかけた。タンパク質の N 末端配列を得るために、無傷の MID を存在し得るピログルタメート基から脱ブロックするように試みた。2 つの異なるプロトコルを使用して可溶性タンパク質及び膜結合タンパク質の両方を脱ブロックした。Applied Biosystems (カリフォルニア州フォスターシティー) 470 A 気液固相シーケンサーを用いて自動化アミノ酸配列分析を実施し、遊離したアミノ酸フェニルチオヒダントイン誘導体を Applied Biosystems モデル 120 A PTH アナライザを用いてオンライン検出した。

20

【0071】

タンパク質 MID の標識

精製 MID をラクトペルオキシダーゼを用いて高比活性まで放射性ヨウ素化した ($[^{125}\text{I}]$; 英国バッキンガムシャーに所在の Amersham)。調製物はタンパク質 1 モルあたり約 0.05 モルのヨウ素を含んでいた。標準プロトコルを用いて精製 MID に FITC (Sigma) をコンジュゲートさせた。簡単に説明すると、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) 中の MID (2 mg/ml) を DMSO 中で可溶化した 0.15 µg/ml の FITC とインキュベートした。室温で 45 分間一定攪拌した後、サンプルを希釈し、PBS (pH 7.4) で予め平衡した pD10 カラム (Pharmacia Biotech) にかけた。生じた MID - FITC を結合研究のために使用した。

30

【0072】

DNA 単離及び配列決定

ゲノム DNA を表 I に示す 5 つのモラクセラ・カタラーリス株からゲノム DNA 作成キット (ドイツ国ヒルデンに所在の Qiagen) を用いて抽出した後、PCR による MID 遺伝子の増幅のための鋳型として使用した。4 つのペプチド断片のアミノ末端配列に従って縮重プライマーを合成した (表 II)。

40

【0073】

【表 2】

表 I I

プロテアーゼ消化後の十分精製したM I D由来のアミノ酸配列

ペプチド配列	プロテアーゼ
TAQANTESSIAVG	トリプシン
GNTATNFSVNSGDDNALIN	トリプシン
QGINEDNAFVKGLEK	トリプシン
PSTVKADN	キモトリプシン

10

【0074】

幾つかのPCR反応(高適合度PCRシステム;スウェーデン国ブロンマに所在のRoche)では、特定プライマーを上記した縮重プライマーと一緒に使用した。ペプチド断片の起源である遺伝子の中心領域に隣接するDNA配列を逆PCR(IPCT)を用いて単離した。簡単に説明すると、ゲノムDNAを以下の制限酵素を別々に用いて開裂した。スタートコドン単離のためにEcoRV、SphI及びPstI、ストップコドン配列を単離するためにAccI、AsuI、最後にHincII。生じた断片をそれ自体に再結紮し(Rocheの迅速DNA結紮キット)、DNAをIPCRに用いた。遺伝子のスタート及びストップコドン領域を増幅させるために、特定プライマーを設計し、長鋳型PCR(LTPCR)(Rocheの拡張長鋳型PCRシステム)で使用した。すべてのPCR産物をpPCR-Script-Amp(カリフォルニア州ラホヤに所在のStratagene)にクローン化し、Big Dye Cycle Sequencing Ready Reactionキット(英国ウォリントンに所在のApplied Biosystems)を用いて再度配列決定した。ゲノムDNAを増幅させるためのプライマーをオリゴプライマー分析ソフトウェア(Molecular Biology Insights, Cascade, Co)を用いて設計した。シグナルペプチドを、生物学的配列分析のためのシグナルP V1.1ワールドワイドウェブ予測サーバーセンター(SignalP V1.1 World Wide Web Prediction Server Center for Biological Sequence Analysis)(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)を用いて推定した。

20

30

【0075】

mid遺伝子のPCR増幅

mid遺伝子の完全6.4kbオープンリーディングフレームを鋳型としてモラクセラ・カタラーリスBc5株ゲノムDNAを用いてPCRにより増幅させた。BamHI制限酵素認識配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーは5'-cgggatccgatggccgtggcggaaatagcc-3'(プライマーA,配列番号3)及び5'-cggcgatccgaaaagtgaaaacctgcaccaactgctgc-3'(プライマーB,配列番号4)であり、6391塩基対のPCR産物を得た。BamHI消化インサートをpET16(b)に結紮し、生じたプラスミドpET16-MIDをDH5に形質転換した。クローン化PCR産物の両方の鎖を配列決定した。

40

【0076】

他のモラクセラ・カタラーリス株中の完全長mid遺伝子を試験するために、プライマーA及びBを用いた。更に、シグナルペプチドをコードする配列を狭めるために使用したプライマーはプライマーAまたは5'-tgtcagcatgtatcatttttttaaggtaaaaccaccatg-3'(プライマーC;上部スタートコドンを検出する,配列番号5)を5'-catcaattgcgatatgtctgggatcttg-3'(プライマーD;シグナルペプチドの丁度外側の保存領域に位置する,配列番号6)であり、それぞれ192塩基対及び266塩基対の長さのPCR産物(鋳型としてBc5ゲノムDNAを用いる)を得た。更に、mid遺伝子の存在を確認するために、プライ

50

マーAまたはCを5' - c t t c a c c c c a t c a g t g c c a t a g a c c - 3' (プライマーE, 配列番号7)を用い、それぞれ1355塩基対及び1429塩基対の長さの断片を得た。すべての反応で延長長鋳型PCRシステムを用い、条件は製造業者(スウェーデン国ブロンマに所在のRoche)が推奨する通りであった。

【0077】

大腸菌におけるmid遺伝子産物の発現及び細胞フラクシオン

mid遺伝子産物を発現させるために、pET16-MIDをlacUV5コントロール下でT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを含む発現宿主BL21DE3に形質転換した。2%グルコース及びアンピシリンを補充したLB培地において組換え細菌を増殖させた。0.6のOD₆₀₀で対数成長相まで細胞を増殖させた後1mM IPIGを添加することにより過剰発現させた。4時間の誘導後、細菌を標準プロトコルに従って音波処理し、生じたタンパク質をSDS-PAGEにより分析した。

10

【0078】

pET16-MID由来の組換えタンパク質の局在化を公知の浸透圧ショックにより実施した。簡単に説明すると、誘導細胞及び非誘導細胞のプロス培養物を収集し、20%スクロース含有30mM トリス-HCl (pH8)中に再懸濁した。1mMの最終濃度となるようにEDTAを添加し、溶液を室温においてゆっくり10分間攪拌した。4において10,000gで10分間遠心した後、細胞を氷冷5mM MgSO₄中に再懸濁し、氷上で10分間攪拌した。このステップ中にペリプラズムタンパク質が緩衝液中に遊離した。ペリプラズムフラクシオンを含む上清を遠心により回収した。細菌を100mg/mlの最終濃度でリゾチームにより完全に溶解させた後音波処理した。最後に、可溶性細胞質フラクシオン及び不溶性膜フラクシオンを回収した。

20

【0079】

切端MID誘導組換えタンパク質

タンパク質を作製させるための異なるサイズ及びプライマーを有する各種切端部MID断片(A~Iと称される)を図10に示す。(pET26-MID中の)モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のオープンリーディングフレーム(Forsgen et al., 2001)を鋳型として使用した。MID367-590(C)を除くすべてのMID構築物を、BamHI及びHindIII制限酵素部位を導入する特定プライマーを用いてPCRにより増殖した。断片C中の内部HindIII制限酵素部位のために、3'末端にHindIIIの代わりにXhoIを用いた。MID1616-2139(I)を除くすべてのPCR産物をpET26(ウイスコンシン州マディソンに所在のNovagen)にクローン化した。断片IをコードするPCR産物をpMAL-c2(マサチューセッツ州ビバリーに所在のNew England Biolabs)にクローン化した。推定毒性を避けるために、生じたプラスミドをまず非発現宿主の大腸菌DH5に形質転換した。その後、断片A~D、G及びHをコードするプラスミドを大腸菌BL21(DE3)に形質転換し、宿主BL21(DE3)-pLysSは断片E及びFを含むベクターのために使用した。いずれの大腸菌菌株もカナマイシンの存在下でインキュベートしたのに対して、BL21(DE3)-pLysS形質転換体を使用したときにはクロラムフェニコールをも補充した。断片IはDH₅において発現させた。細菌を中間log相まで増殖させた後1mM イソプロピル-β-D-ガラクトシド(IPTG)を導入した。3.5時間後、形質転換体を音波処理し、過剰発現タンパク質を製造業者の指示に従って精製した。ヒスチジンタグを有するかまたはマルトース結合タンパク質に融合させた、得られた組換えタンパク質をそれぞれニッケルまたはアミロースを含有する樹脂を用いて精製した。溶離タンパク質の濃度をBCAタンパク質アッセイキット(Pierce)を用いて測定した。その後、組換えタンパク質をSDS-PAGE及びウェスタンブロットにより分析した。

30

40

【0080】

赤血球凝集

ヒト赤血球を採血したばかりのヘパリン処理ヒト血液から得た。赤血球をPBS (pH

50

7.2) で2回洗浄し、最終濃度が1%となるようにPBS中に懸濁させた。栄養ブイヨクにおいて培養した細菌を遠心により収集し、洗浄し、 $1 \sim 2 \times 10^9 / \text{ml}$ までPBS中に懸濁させた。細菌及び赤血球懸濁液(それぞれ $50 \mu\text{l}$)を丸底微量滴定プレート(ノースカロライナ州ニュートンに所在のSarstedt)において混合した。幾つかの実験では、赤血球をPBS($150 \mu\text{l}$)中でMID-セファロースまたはBSA-セファロースと混合した。凝集を肉眼で観察した。

【0081】

細胞株及び接着アッセイ

肺癌細胞株A549(II型肺胞上皮細胞; CCL-185)はATCCから入手した。細胞を、10%ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン及び $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシンを補充したRPMI 1640培地(英国スコットランドのペーズリーに所在のGibco BRL, Life Technologies) (“培地”と呼ぶ)において培養した。接着実験の前日に、細胞を収集し、ゲンタマイシン非含有RPMI 1640で2回洗浄し、ゲンタマイシン非含有培地(2.0ml)中に 1×10^4 細胞/ウェルの濃度で12ウェル組織培養プレート(デンマーク国ロスキレに所在のNunc)に添加した。その後、細胞を37、5% CO_2 において一晩インキュベートした。実験日に、0.15%ゼラチン(Sigma)含有PBS中のモラクセラ・カタラーリス(約 2×10^8)を単層上に接種した。特定抗血清を用いる中和実験では、細菌を予めポリクローナル抗体(1/250希釈)とインキュベートした。4において1時間後、細菌を上皮細胞に添加した。すべての実験で、組織培養プレートを3,000gで5分間遠心し、37、5% CO_2 においてインキュベートした。30分後、感染させた単層をゆっくり振盪させながら0.15%ゼラチン含有PBSで2回洗浄して非接着細菌を除去し、トリプシン-EDTA(0.05%トリプシン, 0.5mM EDTA)で処理して単層をプラスチック支持体から遊離させた。その後、生じた細胞/細菌懸濁液を1.1%イソビタレックス、7.8%ヒト血液及び0.9%プロテオースペプトンを含む寒天プレートに接種した。2つの培地からデータを計算した。

【0082】

フローサイトメトリー分析

健康なドナーから採取したヘパリン処理血液をFicoll-Isopaque(Lymphoprep, スウェーデン国ウプサラに所在のPharmacia)の段階勾配で遠心することによりヒト末梢血リンパ球(PBL)を単離した。フローサイトメトリー分析のために、一般的な染色プロトコルをPBS緩衝液中0.5%BSA(w/v)と一緒に用いた。PBL($100 \mu\text{l}$ 中 2.5×10^5)を製造業者の指示に従って抗-CD3または抗-CD19 mAbを場合によりFITC結合抗-IgD mAbと併用して氷上で30分間標識した。ブロック実験では、リンパ球を予め抗-IgD免疫グロブリンと30分間インキュベートした。2回洗浄後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製FITC結合MIDを細胞に補充し、氷上で45分間インキュベートした。過剰の0.5%BSA含有PBSで4回洗浄後、各サンプルにつき 10^5 細胞をEPICS(登録商標)XL-MCLフローサイトメトリー(フロリダ州ハイアリーアに所在のCoulter)で分析した。適当ならば、家兎及びヤギ前免疫血清並びにマウスIgG1及びIgG2a(Dakopatts)をネガティブコントロールとして含めた。

【0083】

(結果)

MIDの抽出及び精製

MIDの可溶化は精製プロセスにおける大きな障害であった。ELISA及びウェスタンブロットで推定して、試験した数種の界面活性剤の中で3%の最終濃度のEmpigen(登録商標)及びn-オクチル-b-D-グルコシドのみがモラクセラ・カタラーリス懸濁液からMIDを効率的に可溶化した。2つの界面活性剤は同等に有効であった。トリトンX-100のみではMIDを可溶化しなかったが、トリトンX-100と0.01M EDTAはMIDを効率的に可溶化した。CHAPS単独、CHAPSとEDTAの組

10

20

30

40

50

合せまたはEDTAのみではMIDを可溶化しなかった。以下の実験では、MIDの可溶化及びその後の精製のためにEmpigen（登録商標）抽出を使用した。モラクセラ・カタラーリスのEmpigen（登録商標）抽出物をQ-セファロースカラムに適用したとき、すべてのIgD結合物質が0.05M トリス-HCl（pH8.8）中0.1% Empigen（登録商標）でカラムから溶離した。同一カラムに対して1MまでのNaCl勾配を適用してもIgD結合物質を更に溶離させることはできなかった。Q-セファロースでの分離後得られたIgD結合物質を濃縮した後、Sephacryl S-400カラムを用いて0.1% Empigen（登録商標）の存在下でゲル濾過すると抽出物が分画化した（図1）。殆どのIgD結合物質がボイド容量直後の第1ピーク中に溶離された。同一条件下で第1ピークを再クロマトグラフィーにかけることによりMIDを更に精製した。

10

【0084】

図2は、精製後MIDが2つのバンドとして現れたことを示している。第1は200kDaのバンドであり、第2は1,000kDa以上の見かけ分子量を有していた。MIDが従来公知の見かけ分子量が350~720kDaの外膜タンパク質UspA1及び2（8-10）または80kDaの分子量を有するCopBと同一でないことを確認するためにウェスタンブロット実験を実施した。モラクセラ・カタラーリスの粗なEmpigen（登録商標）抽出物またはMIDの部分精製調製物をSDS-PAGEにかけ、Immobilonフィルターに移し、モラクセラタンパク質に対する抗体及びヒトIgDを用いてブロットした。図2に示すように、MID（IgD結合により示されるように）は外膜タンパク質UspA及びCopBと同一ではない。

20

【0085】

精製MIDのアミノ末端アミノ酸配列を調べるために3つの試みを実施した。それぞれ約1000ピコモルのMIDを自動アミノ酸シーケンサーに適用した。アミノ酸フェニルチオヒダントイン誘導体が得られない限り、好ましくはシグナルMIDポリペプチド鎖のアミノ末端をブロックした。最近、エドマン分解に対する耐性をも有するモラクセラUspA1及び2がピログルタミル残基を含んでおり、これらの残基はピログルタメートアミノペプチダーゼで処理することにより除去されたことが判明した。しかしながら、モラクセラ・カタラーリスから精製したMIDまたは組換えMIDを2つの異なるプロトコル（各方法につき2回）に従ってこの酵素で処理し、エドマン分解にかけたときには、N末端アミノ酸配列は得られなかった。

30

【0086】

MIDのIgD結合性

モラクセラ・カタラーリスの粗なEmpigen（登録商標）抽出物及びSDS-PAGEにかけ、フィルターに移した高精製MIDをすべてのヒトIgクラス及びサブクラスの十分に精製した市販Ig調製物に接触させた（表III）。

【0087】

【表3】

表III

十分精製した市販ミエローマ免疫グロブリンD調製物のモラクセラ・カタラーリスの粗Empigen^(R)抽出物及び高精製MIDに対する結合特異性を示すウェスタンブロット及びドットブロット分析の要約

免疫グロブリン	粗抽出物中の 200kDa タパク質	精製MID
IgD (κ), IgD (α)	+	+
IgG1 (κ), IgG1 (α)	-	-
IgG2 (κ), IgG2 (α)	-	-
IgG3 (κ), IgG3 (α)	-	-
IgG4 (κ), IgG4 (α)	-	-
IgA1 (κ), IgA1 (α)	-	-
IgA2 (κ), IgA2 (α)	-	-
IgM (κ), IgM (α)	-	-
IgE (κ),	-	-

10

20

【0088】

2つのIgD調製物のみが図2にIgDについて示したと同様に200kDa位置でMIDバンドと相互作用した。ドットブロット実験を実施し、異なる希釈度の精製MIDを膜に添加し、その後精製ヒトミエローマタンパク質及び第2抗体を適用したとき、2つのIgDミエローマのみがMIDと相互作用した。2つのミエローマの1つが膜上でMIDの0.001 μ gほどの微量で検出された。更に、MIDとIgDの相互作用の特異性を他のドットブロット実験で放射性標識MIDを用いて確認した。図3では、MIDが4つのIgDミエローマ血清に効果的に結合することが示されている。0.03~4 μ gのIgDで明らかな反応が検出され得た。IgD標準血清(B.W.)の場合、かなりの低濃度でも反応性が見られた(示さず)。対照的に、IgG、IgA及びIgMの6種のIgミエローマ血清は4 μ gでもMIDと目に見える反応を示さなかった。

30

【0089】

ドット及びウェスタンブロットで明らかなように精製MIDはヒト可溶性IgDを特異的に誘引した(図2及び3、表III)。MIDが表面発現B細胞受容体(BCR)IgDに結合するかを調べるために、ヒト末梢血リンパ球(PBL)を単離した。FITCをMIDにコンジュゲートした後氷上でPBLと45分間インキュベートした。PBLをT細胞マーカーCD3またはB細胞特異的表面抗原CD19に対するRPE結合mAbで標識し、その後フローサイトメトリーにより分析した(図4)。驚くことに、大部分のCD19⁺リンパ球は大量のMID-FITCに結合した(図4A)のに対して、T細胞(CD3⁺リンパ球)は非特異的バックグラウンド結合しか示さなかった(図4D)。MID-FITCシグナルはIgD-ポジティブB細胞を示す抗-IgD mAbとインキュベートしたCD19⁺細胞とうまく対応していた(図4B)。IgD担持CD19⁺リンパ球に対するMID-FITC結合の特異性を更に解明するために、PBLを家兔抗-ヒトIgD免疫グロブリンフラクシオンと前沈殿させた。インキュベートし、洗浄した後、MID-FITC結合を標準プロトコルに従ってフローサイトメトリーにより分析した。前免疫した血清とインキュベートした細胞と比較して、前記抗血清はIgD BCRへの特異的MID-FITC結合をほぼ完全に抑制した。平均蛍光強度は79.2任意単位から14.6任意単位に低下した。IgDに対するヤギ免疫グロブリンでも同様の結果が得られた(データ示さず)。よって、IgD-発現B細胞は表面発現BCR IgDに対する特異的MID-FITC結合を促進した。

40

50

【 0 0 9 0 】

M I Dをコードする遺伝子のクローニング及びDNA配列分析

M I Dを起源とする4つのペプチド断片の得られたアミノ末端配列(表 I I)に従って縮重プライマーを設計し、可能性あるすべての組合せでP C Rにおいて使用した。縮重プライマー対2629+/3693-で作成した特徴的なP C R産物の推定配列を用いて特定プライマー2982+及び3692-(図5)を合成した。特定プライマーと縮重プライマー(718+及び5772-)を併用したP C R反応により、全部でM I Dをコードする遺伝子の5054bpが生じた。m i d遺伝子のコアを取り巻く隣接配列を逆P C R(I P C R)により得た。E c o R V-及びA s u I/A c c I-消化モラクセラ・カタラーリスゲノムDNAをそれぞれプライマー対2982+/945-及び3668+/120-を用いてI P C Rすると、スタートコドン領域の配列が得られた。更に、H i n c I I消化モラクセラゲノムDNAをプライマー対5898+/5511-を用いてI P C Rすると、ストップコドンを含む3'配列が得られた。モラクセラ・カタラーリスB c 5中のM I Dをコードする遺伝子の完全ヌクレオチド配列を配列番号2に示し、生じたアミノ酸配列を配列番号1に示す。2つの選択的オープンリーディングフレームが明らかとなり、アミノ酸N o . 1及び17に示す(図6参照)。その結果、m i d遺伝子産物の長さは2123または2139アミノ酸であった。推定リボソーム結合部位(A A A G)、-10(T A A T T A)及び-35(T T G A A T)に加えて、コンセンサス配列ボックスを同定した。更に、T A Aストップコドン下流の62塩基に転写停止のために必要なステム-ループ形成の可能性のある逆方向反復配列が見られた。異なるm i d遺伝子間の類似性及び同一性を調べるために、5つのO R F M I Dタンパク質の配列を分析した。4つの株で、同一性及び類似性はそれぞれ75.8%及び78.3%であった(図7)。対照的に、第5単離物(R H 4)では、僅かに低い値65.3%及び71.2%が得られた。U s p A 1との同一性及び類似性はそれぞれ5.5~11.1%及び8.3~17.9%であり、U s p A 2との同一性及び類似性はそれぞれ6.5~7.5%及び11.1~12.4%であった。

【 0 0 9 1 】

m i d遺伝子はすべてのモラクセラ・カタラーリス株中で検出され得る

P C R分析により、118個のモラクセラ・カタラーリス株中でm i d - 1遺伝子が検出されたのに対して、モラクセラ(*n e s c e r i a*)関連コントロールはネガティブであった。加えて、m i d - 1遺伝子のサイズをスタートコドン及びストップコドンを含めた遺伝子全体に及ぶプライマーを用いて確認した。

【 0 0 9 2 】

M I Dの推定アミノ酸配列の分析はU s p A 1、U s p A 2及び米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質と異なる

オープンリーディングフレームは、S D S - P A G Eにより判明した約200k D aの実験値に容易に対応する丁度220k D a以下の分子量計算値を有するタンパク質を規定した。N末端アミノ酸配列は、アミノ酸66と67の間に潜在的な開裂部位を有するシグナルペプチドの典型的な特徴を示した。シグナルペプチダーゼ開裂部位の後の第1アミノ酸が恐らくグルタミン残基であるにも関わらず、エドマン分解により配列は決定できなかった。更に、ピログルタメートアミノペプチダーゼ処理後アミノ酸配列は得られなかった。推定されるアミノ酸配列もK y t e及びD o o l i t t l eの方法による疎水性プロフィール分析にかけたところ、強疎水性である推定シグナルペプチドを除いて主に親水性を示した。M I Dの推定アミノ酸配列は米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質ともU s p A - タンパク質のアミノ酸配列とも有意に異なっている(図7及び8)。

【 0 0 9 3 】

m i d遺伝子はすべてのモラクセラ・カタラーリス株に分布している。m i d遺伝子がすべてのモラクセラ・カタラーリス株中に存在しているか否かを調べるために、オープンリーディングフレーム(O R F)の上流の保存領域及びストップコドン配列を含めた下流

の保存領域 (Forsgrenら, 2001) に基づいてプライマーを選択した。mid 遺伝子は 86 臨床単離物のすべてにおいて検出され、7 タイプの株を分析したところ、ゲノム mid DNA の長さは約 6,000 塩基対であった。遺伝子の 3' 末端から選択した配列を含むプローブを用いるサザンブロットにより、その存在が更に確認された。サザンブロット実験は、モラクセラ株は 1 つの mid 遺伝子のみを含んでいることを示した。

【0094】

大腸菌における組換え MID の発現

クローン化 mid 遺伝子が精製 IgD 結合タンパク質に相当することを確認するために、予想シグナル配列及びスタートコドンを含む遺伝子を発現ベクター pET16 (b) に T7 プロモーターのコントロール下でサブクローン化した。その後、生じた pET16 - MID を大腸菌 BL21 DE3 に形質転換し、IPTG を用いて誘導した。細菌細胞を溶解し、細分画化し、組換え MID をプローブとしてヒト IgD を用いるウェスタンブロットにより局在化させた。MID の重要な特徴は発現実験から明らかとなった (図 9)。第 1 に、誘導後 pET16 - MID を含む細胞は組換え MID を産生することができ、遺伝子の正しいリーディングフレームを確認した。第 2 に、(SDS - PAGE により示すように) 組換え MID は約 200 kDa の分子量を示し、これはアミノ酸配列から計算した 217 kDa という値に対応していた。第 3 に、IgD 結合表現型がウェスタンブロット分析により確認されたので、組換えタンパク質は実際大腸菌における mid 遺伝子産物であった。インサートなしの誘導 pET16 (b) ベクターを含む大腸菌からの総タンパク質は IgD 結合能力を示さなかった (データ示さず)。第 4 に、組換えタンパク質の細胞下局在化は、MID が細胞質及び膜フラクシオン中に均等に見られるがペリプラズムスペースには見られなかったことを示した。膜フラクシオンにおける MID の局在化はモラクセラ・カタラーリスにおける公知の外膜局在化に非常にうまく関連していた。

【0095】

IgD 結合は MID の 238 アミノ酸中に保存される

MID IgD 結合領域を詳細に調べるために、完全長 MID から誘導した 9 個の配列を pET26b (+) にクローン化し、大腸菌において発現させた。組換えタンパク質は全 MID 配列をカバーしており、それぞれの長さ及び位置は図 10 に示した通りであった。MID のアミノ酸残基 69 - 1111 または 1011 - 2139 を含む組換えタンパク質はウェスタン及びドットブロットで明らかのように IgD に結合しなかった。対照的に、タンパク質 MID902 - 1200 (タンパク質断片 F1) は IgD を誘引し、このことから MID の 1 つの IgD 結合領域が特定配列内にあったことが強く示唆された。

【0096】

IgD 結合に関与する配列を正確に特定するために、切端 MID902 - 1200 を N 末端及び C 末端で対称的に短くした (図 11)。等モル濃度の各種組換えタンパク質をモラクセラ・カタラーリスから単離した天然の完全長 MID1 - 2139 と比較した。各種組換えタンパク質を 4 倍数希釈し、膜に添加し、ヒト IgD とインキュベートした。モル基準で、本質的に保存される IgD 結合能力がアミノ酸残基 962 ~ 1200 の切端 MID タンパク質で検出された。IgD と相互作用する最短の切端タンパク質は MID985 と MID1142 の間に局在化していた (断片 F6)。N 末端を MID1000 残基に短縮したとき (断片 F4)、C 末端を MID1130 に短縮したとき (断片 F7) には IgD 結合能力はなくなった。最後に、(MID985 - 1200; F3 と比較して) より長い N 末端及びより短い C 末端を有する断片 (MID902 - 1130; F8) も製造し、分析した。しかしながら、この切端 MID は IgD と相互作用せず、結合能力はより長い C 末端に依存することが示唆された。

【0097】

特異的 MID 依存性 IgD 結合を更に特徴づけるために、IgD ELISA をベートとしてヒト IgD を用いて構築した。組換え切端 MID 断片のすべてを ELISA にかけた後、MID902 - 1200 に対する特異的家兔抗血清とインキュベートした。ELISA を HRP - 結合ヤギ抗 - 家兔ポリクローナル抗体を用いて展開した。ドットブロット

(図11)と同一のパターンが観察された。すなわち、断片F4、F7及びF8は固相IgDに誘引しなかったのに対して、他の断片は完全長MIDとは異なる程度で結合した(データ示さず)。

【0098】

最適なMID962-1200とIgDの相互作用はテトラマー構造に依存する

最適なIgD結合を得るためのテトラマー構造の必要性を解明するために、MID962-1200(F2, 配列番号10)を60または100でインキュベートした後SDS-PAGE及びウェスタンブロットにより分析した。60で予備処理後MID962-1200はモノマー及びテトラマーを形成した(図12A)。しかしながら、テトラマー構造は100で分裂し、モノマー形態となった。ウェスタンブロットで調べたときこのモノマー形態のIgDに対する結合はかなり弱かった(図12A及びB)。モノマー形態と比較したテトラマーのIgD結合能力を調べるために、MID962-1200断片(配列番号10)を60において6種の実験で分析した。熱処理したタンパク質をSDS-PAGEにかけ、IgD結合活性をウェスタンブロットにより分析した。生じたゲル及びフィルターをデンストメトリーにより分析し、モノマーのタンパク質濃度(密度)を対応のテトラマー濃度で割った。得られた値(%)はゲルに充填した総タンパク質の濃度(μg)に関連する。驚くことに、テトラマー形態に対するIgD結合をモノマー形態と比較したところ、テトラマーMID962-1200では23倍高いIgD結合が見られた(図12C)。

【0099】

モラクセラ・カタラーリスIgD結合タンパク質(MID)はヒト赤血球を凝集する

MIDの赤血球凝集における予想される関与を調べるために、MIDを発現するかまたは相変異によりmid遺伝子を切り離れた一連の臨床単離物を選択した。驚くことに、MIDを発現した21単離物のすべてがヒト赤血球を凝集したのに対して、MID-ネガティブ株(n=21)のうち4つしか赤血球細胞を凝集しなかった。赤血球凝集能力とMID発現との間にほぼ完全な相関関係が認められた。USPA1/2発現は同様であり、MID発現と無関係であった。

【0100】

この初期実験に続けて、モデル菌株モラクセラ・カタラーリスBc5(Forsgrenら, 2001)由来の精製MIDタンパク質が赤血球を凝集するか否かを調べた。細菌表面を模擬するために、MIDをセファロースビーズにコンジュゲートし、ヒト赤血球とインキュベートした。セファロースに結合したウシ血清アルブミン(BSA)をネガティブコントロールとして含めた。驚くことに、ヒト赤血球はMID-セファロースの存在下で凝集したのに対して、BSA-セファロースは赤血球と干渉しなかった(データ示さず)。

【0101】

MIDの赤血球凝集ドメインはアミノ酸残基アラニン764とセリン913の間に位置する

分子を精査し、赤血球凝集に関与した分子の特定部位を正確に定めるために、一連のmid遺伝子の切端DNA断片をクローン化し、大腸菌において組換え発現させた(図10)。家兎において切端MIDタンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し、ELISAで使用した。予備実験で、MID及びMID誘導タンパク質に対する抗体を滴定して、各抗原についてELISAで試験したときと同じ値を得た。次いで、切端MIDタンパク質の溶解赤血球への結合能力を特定抗体を適当な濃度で用いてELISAで測定した。MIDまたはMID764-913(断片E)は他の切端MIDタンパク質に比較してより高い(4~16倍)ELISA値を示した。よって、MIDの赤血球凝集構造はMIDアミノ酸残基764-913内にあるようである(配列番号8)。

【0102】

MID764-913(断片E, 配列番号8)は直接赤血球及びII型肺胞上皮細胞に結合する

10

20

30

40

50

接着としてのM I D 7 6 4 - 9 1 3の重要性を更に確認するために、M I D及び特定の切端M I D誘導タンパク質を放射性標識し、ヒト赤血球及び肺胞上皮細胞との直接結合実験で試験した(図13)。[¹²⁵I]-M I D及び[¹²⁵I]-M I D 7 6 4 - 9 1 3はいずれも赤血球に強く結合したのに対して、切端M I D断片のM I D 3 6 7 - 5 9 0(断片C)、M I D 9 0 2 - 1 2 0 0(断片F)、M I D 1 0 1 1 - 1 4 4 6(断片G)及びM I D 1 6 1 6 - 2 1 3 9(断片I)はバックグラウンドレベル以上で結合しなかった(図13A)。同時に、肺胞上皮細胞A 5 4 9も完全長[¹²⁵I]-標識M I D及び切端M I D 7 6 4 - 9 1 3の両方を誘引した(図13B)。他の断片はすべて上皮細胞に結合しなかった。これらを勘案すると、断片M I D 7 6 4 - 9 1 3(配列番号8)が哺乳動物細胞への接着を媒介する接着M I Dの重要な部分であった。

10

【0103】

完全長M I D 1 - 2 1 3 9及びM I D 7 6 4 - 9 1 3に対する抗体はモラクセラ・カタラーリスのI I型肺胞上皮細胞への接着を阻害する

I I型肺胞上皮細胞へのモラクセラ・カタラーリス接着に対する完全長M I D及びM I D 7 6 4 - 9 6 3の影響を更に分析するために、M I D発現及びM I D欠乏モラクセラ・カタラーリス株を予めM I Dに対する抗体とインキュベートした後、接着のために肺胞上皮細胞に添加した。図14に示すように、M I D発現単離物の場合完全長M I D 1 - 2 1 3 9及びM I D 7 6 3 - 9 1 3(断片E, 配列番号8)に対するポリクローナル抗体は接着を効果的に阻害した。対照的に、前免疫血清及びM I D 1 0 1 1 - 1 4 6 6(断片G)に対するp A bは殆ど接着と干渉しなかった。

20

【0104】

【表 4】

参考文献

1. Forsgren,A. and Grubb,A. (1979) Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol.* 122, 1468-1472.
2. Banck,G. and Forsgren,A. (1978) Many bacterial species are mitogenic for human blood lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 8, 347-354.
3. Calvert,J.E. and Calogeres,A. (1986) Characteristics of human B cells responsive to the T-independent mitogen *Branhamella catarrhalis*. *Immunology* 58, 37-41. 10
4. Forsgren,A., Penta,A., Schlossman,S.F. and Tedder,T.F. (1988) *Branhamella catarrhalis* activates human B lymphocytes following interactions with surface IgD and class I major histocompatibility complex antigens. *Cell. Immunol.* 112, 78-88.
5. Janson,H., Carlén,B., Cervin,A., Forsgren,A., Björk-Magnusdottir,A., Lindberg,S. and Runer, T. (1999) Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J. Infect. Dis.* 180, 737-746. 20
6. Sasaki,K. and Munson Jr.,R.S. (1993) Protein D of *Haemophilus influenzae* is not a universal immunoglobulin D-binding protein. *Infect. Immun.* 61, 3026-3031. 30
7. Helminen,M.E., Beach,R., Maciver,I., Jarosik,G., Hansen,E.J. and Leinonen,M. (1995) Human immune response against outer membrane proteins of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* determined by immunoblotting and enzyme immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 35-39.
8. Aebi,C., Maciver,I., Latimer,J.L., Cope,L.D., Stevens,M.K., Thomas,S.E., McCracken,G.H. and Hansen,E.J. (1997) A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect. Immun.* 65, 4367-4377. 40
9. Cope,L.D., Lafontaine,E.R., Slaughter,C.A., Hase-mann,C.A.Jr., Aebi,C., Henderson,F.W., McCracken,G.H.Jr and Hansen,E.J. (1999) Characterization of *Moraxella*

catarrhalis uspA1 and uspA2 genes and their encoded products. J Bacteriol 181, 4026-4034.

10. Klingman, K.L. and Murphy, T.F. (1994) Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. Infect. Immun. 62, 1150-1155.

11. WO 98/28333

12. Sasaki, K., Harkness, R.E., Loosmoore, S.M. and Klein, M.H. (1998) United States Patent 5,808,024. 10

13. Fitzgerald, M., Mulcahy, R., Murphy, S., Keane, C., Coakley, D. and Scott, T. (1997) A 200 kDa protein is associated with haemagglutinating isolates of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. FEMS Immun. Med. Microbiol. 18, 209-216.

14. Tucker, K., Plosila, L., and Samuel, J. (1994) Correlation between hemagglutination and globotetraosyl-ceramide binding by *Branhamella catarrhalis*. Abstract 117 of the 94th General meeting of the American Society for Microbiology. 20

15. Lunde E, Munthe LA, Vabo A, Sandlie I, Bogen B. (1999) Antibodies engineered with IgD specificity efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells. Nat Biotechnol. 17, 670-675.

16. Lycke N. (2001) The B-cell targeted CTA1-DD vaccine adjuvant is highly effective at enhancing antibody as well as CTL responses. Curr. Opin. Mol. Ther. 3, 37-44. 30

17. Ito O, Harada M, Takenoyama M, Tamada K, Li T, Abe K, Fujie H, Nomoto K. 1998 Vaccination with activated B cells pulsed with tumor-lysates can induce tumor-specific CD4+ T cells in vivo. Immunobiol. 199, 133-147.

【図面の簡単な説明】 40

【0105】

【図1】イオン交換クロマトグラフィー後のモラクセラ・カタラーリスからの Empigen (登録商標) 可溶性抽出物の Sephacryl S-400 カラムでのクロマトグラフィー及び再クロマトグラフィー。実線は第1クロマトグラフィーのタンパク質含量を示し、破線は第1ピークの再クロマトグラフィーを示す。Voはボイド容量である。

【図2】MIDの各種精製ステップを表すフラクションの SDS-PAGE 分析。Q-セファロースカラムでのイオン交換クロマトグラフィー後、Sephacryl S-400 カラムでの第1回及び第2回ゲル濾過後の3% Empigen (登録商標) 中の粗抽出物についてのフラクションを示す。2つのゲルを同時に流し、1つはクーマシーブルー (染色剤) で染色し、1つは Immobilon-P 膜にプロットし、ヒト IgD () 50

ミエローマタンパク質 (I g D)、抗 - U s p A (U s p) または抗 - C o p B (B) モノクローナル抗体を用いてプローブし、その後適当なホースラディッシュペルオキシダーゼ結合第 2 抗体とインキュベートした。マーカータンパク質の分子量を左側に表示する。

【図 3】各種免疫グロブリンクラスを表すヒトミエローマ血清に対する M I D の結合。すべての血清を倍数希釈 (4 ~ 0 . 3 μ g) し、ニトロセルロース膜に適用した。飽和、洗浄及びブロッキング後、[¹²⁵I] - M I D 標識プローブを添加した。一晩インキュベートし、更に洗浄した後、特異的 M I D - I g D 結合をオートラジオグラフィーにより可視化した。

【図 4】F I T C 結合 M I D に特異的に結合した I g D 担持 B 細胞。C D 1 9 + (A) または C D 3 + (D) に対する R P E 結合 m A b で染色した後 M I D - F I T C とインキュベーションした P B L を抗 - I g D - m A b (B) 及び抗 - C D 1 9 m A b とインキュベートした P B L と比較した。C D 3 + 及び抗 - I g D - m A b を用いる 2 重染色を (E) に示す。(C) では、予めヒト I g D に対する家兔免疫グロブリンフラクシオンとインキュベートした後抗 - C D 1 9 m A b 及び M I D - F I T C を添加した P B L のパネルを示す。抗体も M I D - F I T C も含まないコントロールサンプルも含める (F)。P B L をヘパリン処理したヒト血液から L y m p h o p r e p 1 ステップ勾配を用いて単離した。リンパ球 (2 . 5 × 1 0 ⁵) を適当な抗体とインキュベートし、洗浄し、更に M I D - F I T C (1 0 μ g / m l) とインキュベートした。インキュベーションはすべて氷上で実施し、最終洗浄後 P B L をフローサイトメトリーにより分析した。この特別実験では、総リンパ球集団の 6 8 % をゲーティングし、分析した。ネガティブコントロールとしてイソマッチ m A b を含めたときには細胞の 2 % 未満が標識された。前免疫した家兔血清は I g D B C R に対する M I D - F I T C の結合を殆ど阻止しなかった (示さず)。分析した 3 つの別々のドナーの内の典型的なドナーについての実験を示す。

【図 5】クローニング戦略を示す m i d 遺伝子の概略マップ。DNA 増幅のために使用したオリゴヌクレオチドプライマーを関連配列の上 (P C R) 及び下 (逆 P C R [I P C R]) の矢印で示す。表 I I に概説したアミノ酸配列に基づく縮重プライマー及び特定プライマーをそれぞれ破線及び実線で示す。

【図 6 - 1】モラクセラ・カタラーリス B c 5 由来の m i d 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 3 5 , - 1 0 領域、考えられるリボソーム結合部位 (R B S)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 N o . 1 及び 1 7 の 2 つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図 6 - 2】モラクセラ・カタラーリス B c 5 由来の m i d 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 3 5 , - 1 0 領域、考えられるリボソーム結合部位 (R B S)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 N o . 1 及び 1 7 の 2 つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図 6 - 3】モラクセラ・カタラーリス B c 5 由来の m i d 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 3 5 , - 1 0 領域、考えられるリボソーム結合部位 (R B S)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 N o . 1 及び 1 7 の 2 つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図 6 - 4】モラクセラ・カタラーリス B c 5 由来の m i d 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 3 5 , - 1 0 領域、考えられるリボソーム結合部位 (R B S)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 N o . 1 及び 1 7 の 2 つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図 6 - 5】モラクセラ・カタラーリス B c 5 由来の m i d 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 3 5 , - 1 0 領域、考えられるリボソーム結合部位 (R B S)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 N o . 1 及び 1 7 の 2 つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図 6 - 6】モラクセラ・カタラーリス B c 5 由来の m i d 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 3 5 , - 1 0 領域、考えられるリボソーム結合部位 (R B

10

20

30

40

50

S)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-7】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35,-10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-8】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35,-10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-9】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35,-10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-10】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35,-10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-11】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35,-10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図7】モラクセラ・カタラーリス菌株から単離したMIDとATCC 25238由来のUspA1及びA2との間の同一度及び類似度。同一性及び類似性はソフトウェアNeedleを用いて計算した。

【図8-1】MIDのアミノ酸配列と米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-2】MIDのアミノ酸配列と米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-3】MIDのアミノ酸配列と米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-4】MIDのアミノ酸配列と米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-5】MIDのアミノ酸配列と米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図9】組換え発現させたMIDはそのIgD結合能力を保持していた。左図はクーマシーブリリアントブルー染色したゲル、右図はヒトIgDでプローブしたウェスタンブロットを示す。天然MIDタンパク質(MID)を流し、細胞質フラクション(C)、ペリプラズマフラクション(P)及び膜フラクション(M)と比較した。左側の数字は分子量標準を指す。pET16-MIDを含む大腸菌BL21DE3をIPTGにより4時間誘導した。細胞フラクションを集め、タンパク質を平行に並べた2つのSDS-PAGEにより分離し、それぞれクーマシーブリリアントブルーで染色するかまたはImmobilon-P膜にブロットした。膜をヒトIgDでプローブした後ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合第2抗体とインキュベートした。

【図10】MID764-913(断片E)及びMID902-1200(断片F)はそれぞれ赤血球凝集及びIgD結合に関わる。一連の切端MIDタンパク質(A~Iと称する)を製造した。C末端にヒスチジンタグを含む組換えタンパク質(A~H)またはマルトース結合タンパク質に融合した組換えタンパク質(I)を大腸菌において産生し、それぞれニッケル及びアミロース樹脂カラムを用いて精製した。

【図11】MID962-1200(断片F2)は完全長MID1-2139に比較して

10

20

30

40

50

保存 I g D 結合能力を有している。等モル濃度 (2 4 0 ~ 0 . 0 6 ナノモル) の精製完全長 M I D 1 - 2 1 3 9 及び 8 個の切端 M I D 断片 (F 1 ~ F 8) をドットプロットにより I g D 結合について分析した。タンパク質 M I D 9 0 2 - 1 1 3 0 (F 8)、M I D 9 8 5 - 1 1 3 0 (F 7) 及び M I D 1 0 0 0 - 1 2 0 0 (F 4) は I g D を誘引しなかったが、他の断片はすべて I g D に結合した。複数の切端 M I D タンパク質をコードする D N A を発現ベクター p E T 2 6 b (+) にクローン化し、大腸菌において産生した。H i s タグを含む組換えタンパク質を精製し、ニトロセルロース膜にドットプロットした。この膜をヒト I g D でプローブした後、検出のために使用した第 2 H R P 結合ポリクローナル抗体でプローブした。

【図 1 2】M I D 9 6 2 - 1 2 0 0 (F 2) のテトラマー構造は最適 I g D 結合のために必須である。(A) : 6 0 で処理後 M I D 9 6 2 - 1 2 0 0 の S D S - P A G E によりモノマー及びテトラマーを分離した。1 0 0 で熱処理後モノマーのみが検出され得る。(B) : プローブとして I g D を用いる対応のウェスタンブロットはモノマーに対する弱い I g D 結合を示す。(C) : 6 種の実験でのテトラマー及びモノマーに対する平均 I g D 結合。I g D 結合はタンパク質 1 μ g 当たりの任意単位で示す。M I D 9 6 2 - 1 2 0 0 を S D S - サンプル緩衝液において 6 0 または 1 0 0 で 1 0 分間処理し、S D S - P A G E 及びウェスタンブロット分析にかけた。生じたクーマシー染色ゲル及びウェスタンブロットをデンストメトリーにより分析した。テトラマーまたはモノマーとして移動するタンパク質の % を計算し、I g D 結合能力を比較した。

【図 1 3】[^{1 2 5} I] 標識組換え M I D 7 6 4 - 9 1 3 (断片 E) は赤血球及び上皮細胞に特異的に誘引される。[^{1 2 5} I] 標識 M I D 及び一連の切端 [^{1 2 5} I] - M I D 断片 (C、E、F、G 及び I) をヒト赤血球に添加した (A)。組換え [^{1 2 5} I] 標識 M I D 断片を上皮細胞にも添加した (B)。(断片 I を除く) すべての切端 M I D タンパク質を大腸菌において産生し、ニッケル樹脂を用いて精製した。断片 I は M B P との融合タンパク質であり、よってアミロース樹脂を用いて精製した。組換えタンパク質を [^{1 2 5} I] で標識し、赤血球または上皮細胞株 A 5 4 9 に添加した。数回洗浄後、結合放射能をガンマカウンターで測定した。データを 2 回ずつ実施した 2 つの実験の平均値として示す。誤差バーは S D を指す。

【図 1 4】M I D 発現モラクセラ・カタラーリスの上皮細胞への接着はアミノ酸残基 M I D 7 6 4 - 9 1 3 (断片 E) に依存する。家兎抗 - M I D 1 - 2 1 3 9 または抗 - M I D 7 6 4 - 9 1 3 ポリクローナル抗体をコートした M I D 発現細菌で、上皮細胞への接着が前免疫血清または抗 - M I D 1 0 1 1 - 1 4 6 6 (断片 G) p A b と比較して低下していた。細菌を前免疫血清または特定の抗血清と 4 で 1 時間インキュベートした。上皮細胞に細菌を添加した後遠心し、3 7 において 3 0 分間インキュベートした。洗浄後、細胞をトリプシン - E D T A で処理し、懸濁液を血液寒天プレートにおいて平板培養した。一晚インキュベートした後コロニー形成単位をカウントした。接着率 (添加した c f u / 接着した c f u) を計算した。2 回ずつ実施した 4 つの別個の実験の平均値として示す。誤差バーは S D を指す。* * * P 0 . 0 0 1、* * P 0 . 0 1、及び * P 0 . 0 5。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> Forsgren, Arne

<120> Novel surface exposed IgD-binding protein from
Moraxella catarrhalis

<130> 2021373

<150> SE 0102410-8

<151> 2001-07-04

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2139

<212> PRT

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 1

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

10

20

30

Leu Gly Thr Met Thr Gln Ala Glu Gly His Phe Ala Asn Ala Phe Gly
 210 215 220
 Thr Arg Ala Thr Ala Lys Gly Asn Tyr Ser Leu Ala Val Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Ala Gln Ala Asn Thr Glu Ser Ser Ile Ala Val Gly Ser Asn Ala Gln
 245 250 255
 Ala Asn Gly Phe Ala Ala Thr Ala Ile Gly Gly Gly Thr Lys Ala Asp
 260 265 270
 Leu Gly Arg Ser Ile Ala Leu Gly Phe Gly Ser Gln Ile Leu Thr Lys
 275 280 285
 Glu Lys Asp Ser His Asn Asn Thr Asn Val Tyr Val Pro Gln Gly Glu
 290 295 300
 Ile Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Ala Thr Glu Asn Gly Gln Ser Pro Asn
 305 310 315 320
 Lys Val Val Asp Ile Phe Ser Ile Gly Ser Ser Ser Ile Lys Arg Lys
 325 330 335
 Ile Ile Asn Val Gly Ala Gly Ser Gln Glu Thr Asp Ala Val Asn Val
 340 345 350
 Ala Gln Leu Lys Leu Val Glu Arg Val Ala Lys Arg Gln Ile Thr Phe
 355 360 365
 Gln Gly Asp Asp Ser Asn Asn Ser Val Lys Lys Gly Leu Gly Gln Thr
 370 375 380
 Leu Thr Ile Lys Gly Gly Lys Thr Glu Thr Gly Glu Leu Thr Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Ile Gly Val Val Gln Asp Asp Asn Gly Asn Gly Leu Lys Val Lys
 405 410 415
 Leu Ala Lys Asp Leu Thr Gly Leu Thr Lys Val Ala Val Asn Gly Asn
 420 425 430
 Gly Ala Asn Asn Ala Glu Leu Leu Asn Gly Gly Leu Thr Phe Ser Thr
 435 440 445
 Ser Gly Ala Asn Ala Gly Lys Thr Val Tyr Gly Thr Asp Gly Val Lys
 450 455 460
 Phe Thr Asn Asn Thr Gly Thr Gly Thr Gly Thr Ala Ile Pro Asp Thr
 465 470 475 480
 Thr Arg Ile Thr Lys Asn Lys Ile Gly Phe Ala Gly Ala Asp Glu Gln
 485 490 495
 Val Asp Glu Ser Lys Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Leu Lys Val Gly
 500 505 510
 Thr Val Glu Ile Lys Lys Thr Gly Ile Asn Ala Gly Asn Gln Glu Ile
 515 520 525

10

20

30

Thr Lys Val Lys Ser Ala Ile Val Asp Ala Val Asn Gly Gln Ala Asn
 530 535 540
 Gln Ser Phe Val Asn Leu Leu Glu Thr Ala Gly Thr Asn Thr Asn Lys
 545 550 555 560
 Gln Asn Ser Ala Ala Thr Val Lys Asp Leu Tyr Asp Leu Ser Gln Ser
 565 570 575
 Pro Leu Thr Phe Thr Gly Asp Ser Gly Asn Val Lys Arg Lys Leu Gly
 580 585 590
 Gln Thr Leu Thr Ile Thr Gly Gly Gln Thr Lys Thr Asp Gln Leu Thr
 595 600 605
 Asp Asn Asn Ile Gly Val Val Ala Gly Thr Asn Gly Leu Thr Val Lys
 610 615 620
 Leu Ala Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Val Asn Thr Ala Thr Leu
 625 630 635 640
 Asn Ala Thr Asn Lys Val Lys Val Asp Asn Ser Thr Gly Asn Thr Ala
 645 650 655
 Glu Leu Leu Asn Asn Gly Leu Thr Phe Thr Gln Thr Thr Gly Ala Asn
 660 665 670
 Ser Gly Lys Thr Val Tyr Gly Asn Asp Gly Leu Lys Phe Thr Asn Ser
 675 680 685
 Ala Asn Lys Ala Leu Gly Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Lys Asp Gln Val
 690 695 700
 Gly Phe Ser Asn Gln Asp Gly Leu Leu Asp Glu Ser Lys Pro Tyr Leu
 705 710 715 720
 Asn Arg Glu Lys Leu Lys Val Gly Lys Ile Glu Ile Lys Asp Ser Gly
 725 730 735
 Ile Asn Ala Gly Gly Lys Ala Ile Thr Gly Leu Pro Ser Thr Leu Pro
 740 745 750
 Asn Thr Thr Tyr Thr Ala Pro Gly Val His Thr Ala Leu His Gly Ser
 755 760 765
 Thr Ile Ser Asn Asp Asp Lys Thr Arg Ala Ala Ser Ile Ala Asp Val
 770 775 780
 Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Glu Gly Asn Gly Glu Ala Val Asp Phe
 785 790 795 800
 Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn Phe Ala Asp Gly Asn Ala Thr Thr
 805 810 815
 Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asn Lys Thr Ser Lys Val Ala Tyr Asp Val
 820 825 830
 Asn Val Asp Gly Thr Thr Ile His Leu Thr Gly Thr Asn Gly Lys Lys
 835 840 845

10

20

30

Asn Gln Ile Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu Thr Thr Lys Arg Ala Lys
 850 855 860
 Gly Asn Thr Ala Thr Asn Phe Ser Val Asn Ser Gly Asp Asp Asn Ala
 865 870 875 880
 Leu Ile Asn Ala Lys Asp Ile Ala Asp Asn Leu Asn Thr Leu Ala Gly
 885 890 895
 Glu Ile Arg Thr Ala Lys Gly Thr Ala Ser Thr Ala Leu Gln Thr Phe
 900 905 910
 Ser Ile Ile Asp Glu Gln Gly Asn Asn Phe Met Val Gly Asn Leu Tyr
 915 920 925
 Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Asn Thr Ser Glu Thr Val Thr Phe Val Gly
 930 935 940
 Glu Asn Gly Ile Thr Thr Lys Val Asn Lys Gly Lys Val Lys Val Gly
 945 950 955 960
 Ile Asp Gln Thr Lys Gly Leu Thr Thr Pro Lys Leu Thr Val Gly Ser
 965 970 975
 Ser Asn Gly Lys Gly Ile Val Ile Asp Ser Lys Asp Gly Gln Asn Thr
 980 985 990
 Ile Thr Gly Leu Ser Asn Thr Leu Thr Asp Ala Thr Asn Ala Thr Thr
 995 1000 1005
 Gly His Val Ser Glu Ile Gln Gly Leu Ala Gln Gly Ala Asn Lys Thr
 1010 1015 1020
 Arg Ala Ala Ser Ile Gly Asp Val Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Gln
 1025 1030 1035 1040
 Gly Asn Gly Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn
 1045 1050 1055
 Phe Ile Asp Gly Asn Ala Thr Thr Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asp Thr
 1060 1065 1070
 Lys Gln Thr Ser Thr Val Thr Tyr Asp Val Asn Val Asp Asn Lys Thr
 1075 1080 1085
 Leu Glu Val Thr Gly Asp Lys Lys Leu Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu
 1090 1095 1100
 Thr Lys Thr Ser Ala Asn Gly Asn Ala Thr Lys Phe Ser Ala Ala Asp
 1105 1110 1115 1120
 Gly Asp Ala Leu Val Lys Ala Ser Asp Ile Ala Thr His Leu Asn Thr
 1125 1130 1135
 Leu Ala Gly Asp Ile Gln Thr Ala Lys Gly Ala Ser Gln Ala Ser Ser
 1140 1145 1150
 Ser Ala Ser Tyr Val Asp Ala Asp Gly Asn Lys Val Ile Tyr Asp Ser
 1155 1160 1165

10

20

30

Thr Asp Lys Lys Tyr Tyr Gln Ala Lys Asn Asp Gly Thr Val Asp Lys
1170 1175 1180

Thr Lys Glu Val Ala Lys Asp Lys Leu Val Ala Gln Ala Gln Thr Pro
1185 1190 1195 1200

Asp Gly Thr Leu Ala Arg Met Asn Val Lys Ser Val Ile Asn Lys Glu
1205 1210 1215

Gln Val Asn Asp Ala Asn Lys Lys Gln Gly Ile Asn Glu Asp Asn Ala
1220 1225 1230

Phe Val Lys Gly Leu Glu Lys Ala Ala Ser Asp Asn Lys Thr Lys Asn
1235 1240 1245

Ala Ala Val Thr Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Ala Gln Thr Pro Leu
1250 1255 1260

Thr Phe Ala Gly Asp Thr Gly Thr Thr Ala Lys Lys Leu Gly Glu Thr
1265 1270 1275 1280

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gln Thr Asp Thr Asn Lys Leu Thr Asp Asn
1285 1290 1295

Asn Ile Gly Val Val Ala Gly Thr Asp Gly Phe Thr Val Lys Leu Ala
1300 1305 1310

Lys Asp Leu Thr Asn Leu Asn Ser Val Asn Ala Gly Gly Thr Lys Ile
1315 1320 1325

Asp Asp Lys Gly Val Ser Phe Val Asp Ala Asn Gly Gln Ala Lys Ala
1330 1335 1340

Asn Thr Pro Val Leu Ser Ala Asn Gly Leu Asp Leu Gly Gly Lys Arg
1345 1350 1355 1360

Ile Ser Asn Ile Gly Ala Ala Val Asp Asp Asn Asp Ala Val Asn Phe
1365 1370 1375

Lys Gln Phe Asn Glu Val Ala Lys Thr Val Asn Asn Leu Asn Asn Gln
1380 1385 1390

Ser Asn Ser Gly Ala Ser Leu Pro Phe Val Val Thr Asp Ala Asn Gly
1395 1400 1405

Lys Pro Ile Asn Gly Thr Asp Asp Lys Pro Gln Lys Ala Ile Lys Gly
1410 1415 1420

Ala Asp Gly Lys Tyr Tyr His Ala Asn Ala Asn Gly Val Pro Val Asp
1425 1430 1435 1440

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Thr Asp Ala Asp Lys Leu Ala Asn Leu Ala
1445 1450 1455

Ala His Gly Lys Pro Leu Asp Ala Gly His Gln Val Val Ala Ser Leu
1460 1465 1470

Gly Gly Asn Ser Asp Ala Ile Thr Leu Thr Asn Ile Lys Ser Thr Leu
1475 1480 1485

10

20

30

Pro Gln Ile Asp Thr Pro Asn Thr Gly Asn Ala Asn Ala Gly Gln Ala
1490 1495 1500

Gln Ser Leu Pro Ser Leu Ser Ala Ala Gln Gln Ser Asn Ala Ala Ser
1505 1510 1515 1520

Val Lys Asp Val Leu Asn Val Gly Phe Asn Leu Gln Thr Asn His Asn
1525 1530 1535

Gln Val Asp Phe Val Lys Ala Tyr Asp Thr Val Asn Phe Val Asn Gly
1540 1545 1550

Thr Gly Ala Asp Ile Thr Ser Val Arg Ser Ala Asp Gly Thr Met Ser
1555 1560 1565

Asn Ile Thr Val Asn Thr Ala Leu Ala Ala Thr Asp Asp Asp Gly Asn
1570 1575 1580

Val Leu Ile Lys Ala Lys Asp Gly Lys Phe Tyr Lys Ala Asp Asp Leu
1585 1590 1595 1600

Met Pro Asn Gly Ser Leu Lys Ala Gly Lys Ser Ala Ser Asp Ala Lys
1605 1610 1615

Thr Pro Thr Gly Leu Ser Leu Val Asn Pro Asn Ala Gly Lys Gly Ser
1620 1625 1630

Thr Gly Asp Ala Val Ala Leu Asn Asn Leu Ser Lys Ala Val Phe Lys
1635 1640 1645

Ser Lys Asp Gly Thr Thr Thr Thr Thr Val Ser Ser Asp Gly Ile Ser
1650 1655 1660

Ile Gln Gly Lys Asp Asn Ser Asn Ile Thr Leu Ser Lys Asp Gly Leu
1665 1670 1675 1680

Asn Val Gly Gly Lys Val Ile Ser Asn Val Gly Lys Gly Thr Lys Asp
1685 1690 1695

Thr Asp Ala Ala Asn Val Gln Gln Leu Asn Arg Ser Thr Gln Leu Val
1700 1705 1710

Gly Ser Trp Val Met Ala Gly Asn Asp Asn Ala Asp Gly Asn Gln Val
1715 1720 1725

Asn Ile Ala Asp Ile Lys Lys Asp Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ser Asn
1730 1735 1740

Arg Thr Val Ile Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly Gly Lys Gly Asn Asn
1745 1750 1755 1760

Asp Thr Glu Lys Leu Ala Thr Gly Gly Val Gln Val Gly Val Asp Lys
1765 1770 1775

Asp Gly Asn Ala Asn Gly Asp Leu Ser Asn Val Trp Val Lys Thr Gln
1780 1785 1790

Lys Asp Gly Ser Lys Lys Ala Leu Leu Ala Thr Tyr Asn Ala Ala Gly
1795 1800 1805

10

20

30

Gln Thr Asn Tyr Leu Thr Asn Asn Pro Ala Glu Ala Ile Asp Arg Ile
 1810 1815 1820
 Asn Glu Gln Gly Ile Arg Phe Phe His Val Asn Asp Gly Asn Gln Glu
 1825 1830 1835 1840
 Pro Val Val Gln Gly Arg Asn Gly Ile Asp Ser Ser Ala Ser Gly Lys
 1845 1850 1855
 His Ser Val Ala Val Gly Tyr Lys Ala Lys Ala Asp Gly Glu Ala Ala
 1860 1865 1870
 Val Ala Ile Gly Arg Gln Thr Gln Ala Gly Asn Gln Ser Ile Ala Ile
 1875 1880 1885
 Gly Asp Asn Ala Gln Ala Thr Gly Asp Gln Ser Ile Ala Ile Gly Thr
 1890 1895 1900
 Gly Asn Val Val Ala Gly Lys His Ser Gly Ala Ile Gly Asp Pro Ser
 1905 1910 1915 1920
 Thr Val Lys Ala Asp Asn Ser Tyr Ser Val Gly Asn Asn Asn Gln Phe
 1925 1930 1935
 Thr Asp Ala Thr Gln Thr Asp Val Phe Gly Val Gly Asn Asn Ile Thr
 1940 1945 1950
 Val Thr Glu Ser Asn Ser Val Ala Leu Gly Ser Asn Ser Ala Ile Ser
 1955 1960 1965
 Ala Gly Thr His Ala Gly Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asp Gly Thr Ala
 1970 1975 1980
 Gly Thr Thr Thr Thr Ala Gly Ala Thr Gly Thr Val Lys Gly Phe Ala
 1985 1990 1995 2000
 Gly Gln Thr Ala Val Gly Ala Val Ser Val Gly Ala Ser Gly Ala Glu
 2005 2010 2015
 Arg Arg Ile Gln Asn Val Ala Ala Gly Glu Val Ser Ala Thr Ser Thr
 2020 2025 2030
 Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu Tyr Lys Ala Thr Gln Ser Ile Ala
 2035 2040 2045
 Asn Ala Thr Asn Glu Leu Asp His Arg Ile His Gln Asn Glu Asn Lys
 2050 2055 2060
 Ala Asn Ala Gly Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Ala Ser Met Pro Gln
 2065 2070 2075 2080
 Ala Tyr Ile Pro Gly Arg Ser Met Val Thr Gly Gly Ile Ala Thr His
 2085 2090 2095
 Asn Gly Gln Gly Ala Val Ala Val Gly Leu Ser Lys Leu Ser Asp Asn
 2100 2105 2110
 Gly Gln Trp Val Phe Lys Ile Asn Gly Ser Ala Asp Thr Gln Gly His
 2115 2120 2125

10

20

30

Val Gly Ala Ala Val Gly Ala Gly Phe His Phe
2130 2135

<210> 2
<211> 6889
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

```

<400> 2
aatcattacc ccccccttta tgggggatca tatgaataga atattatgat tgtatctgat 60
tattgbatca gaatggatgat gcctacgagt tgatttgggt gaatcaactct attatttggat 120
atgtttttgaa actaatcttat tgactttaaact caccatattgg ttataatttta gcataatggg 180
aggcttttttg taaaaatcac atcgcaatat tgttctactg ttactaccat gcttgaatga 240
cgatcccaat catcagattc attcaagtga tgtggtttgta tacgcatcat ttaccctaact 300
tatttcaatc gaaatgccta tgtcagcatg tatcattttt ttaaggtaaa ccaccatgaa 360
tcadactctat aaagtcactct ttaacaagc cacaggcaca tttatggccg tggcgggaata 420
tgccaaaatcc cacagcacgg ggggtagctg tgctacaggg caagttggca gtgtatgcac 480
tctgagcttt gcccggtgtg ccgctctctgc tgtcctctgt atcgggtgcga cgtcaaatgg 540
cagtgctttat gctcaacaag atcccagaca tatcgcgaatt gatggcaaca gctcgaacac 600
atcctcaggg actgcccgtg cgacaggtga tgcagccatt gctcttggty aaaatgctaa 660
tgcagagggc ggtcaagcca tgcctatcgg tagtagcaat aaaacaggtg gttagaaacgc 720
gctgaatata ggtaccgatg ccaaaggtga ggagtccatc gccatcggty gtgatgtagt 780
ggctgagggg actgcccctga ttgcccactgg tggatgatgac ttacatttgt gggatgaacc 840
aaataagcaa aagttcctcg acccaaaagt taaagaattg attttaaaac atcaagaatt 900
aaacaacata tacaactgct ctgatggtag tccctaaaga tatttttgcg catacgcaa 960
gggacacgccc agtattgcac taggaaacct gacacagggc gagggctcatt ttgccaacgc 1020
ctttgggtaca cgggcaacag ctaaaggcaa ctattccttg gcagtgggty ttaccgcca 1080
agccaacaca gaatcttcaa tgcctgttgg ttctaattgca caagctaacy ggtttgcagc 1140
gacagccatt ggtggaggta ctaaagctga tttgggtcga agcatagccc taggttttgg 1200
ttctcagatc ctactaagg agaaggatag tcataacaat accaatgtct atgtaccaca 1260
aggtgaaata ttagaagagc ggtataaagc caccgaaaac ggtcagctgc ctaataaggt 1320
agtggatata ttttccattg gtagtagctc tatcaaacgt aaaatcatca atgtcggtyc 1380
gggttctcag gagaccgatg cggatcaatgt ggcacagctt aaattgtyg agcggtygty 1440
taagcgtcaa attacttttc aggtgatga tagcaataat agcgtaaaaa aaggtttggg 1500
tcagacttta actattaaag gtggtaaaac agagaccggt gaactaacgy aaaataacat 1560
cggtygtgta caagatgata atggtaatgg tctgaaagty aaacttgct aagatctgac 1620
tgglttgacc aaggttgtag taaatggtaa tggtygctaac aacgcccagc tactaaacgy 1680
tggcttgacc ttttctgacat caggtgccc aacagcgcac acggtctatg gcactgatgy 1740
ggtgaagttt actaataata caggaacaggy aacaggaacy gcaataccgy acactactcy 1800
tattaccaaa aataaaatgy gctttgctgy ggctgatgaa caagtygatg aaagcaaac 1860
ttatcttgac aacgaaaagc taaaagtyg cacagtygag attaaaaaa ctggcatcaa 1920
tgcaggyaat caagaaatta ccaaggtcaa atctgcccatt gtygatgcyg ttaatggaca 1980
agcaaatcaa agcttttyga acctctaga aacagcaggy acaaacacca acaaacaaaa 2040
ctctgcccgc acggttaaag acbtatacga cctatcacia tcaccgctga cctttacaggy 2100
tgatagcgyt aacgtytaaga gaaaactggy tcagacttta accatcacag gcggacaaac 2160
aaagaccgat caattaaccg acaataacat cggtytygty gcagtyacta atggyctaac 2220
cgytaaacct gctaaaactt taaacagtyt tactgaagty aatcaggyta cattaaacgy 2280
caccaataaa gtyaagtyat ataatagtyt tygtyaatag ctygaattat taaacaatgy 2340
tttaaccttt acccaaaaa caggygcaaa ttcaggytaa accgtctatg gcaatgatgy 2400
cttgaagtyt actaatagty ctaataaagc acttygccc acaacttaca tcaccaaga 2460
tcaagtygty ttagcaatc aagatgyctt acttygatgaa agcaaacgyt atcttaaccg 2520
agaaaagcta aaagtygtyt aaatgygat taaagacagty ggcattaatg caggygtyta 2580
agccatcaca gyactgccc caacactgcy caacactacc tatactgcy ctygcytyga 2640
tactgcyta catggycagty caattcttaa cgcagcaaaa accgtygccc ccagtyatcy 2700
cgyatgyct aacgcaggyt ttaacttyga aggyaatgyt gaagcgytyt acttytyctc 2760
cacttyatgac accgtycaact tygcccagty caatgcccacc accgtyaagty taacttyatg 2820
taacaaaaac agtyaagtyg ctyatgytyt caatgytyt gtytaacca tctatctaac 2880
aggyactaat gtycaagaaaa accaaatgy ctytaaaaa accacactgy ccacaaaaac 2940
tyctaaagty aatacagca ctaatttyt tytytaactct gtygatgaca atgcccctat 3000
taacgcaaaa gacatcgyc acaactcaa caccctagct gtygaaatcy gcaccgcaaa 3060

```

10
20
30
40

```

aggcacagca agcaccgccc tacaaacctt ctctattatt gatgaacaag gtaataactt 3120
tatggctcgg aaacctttact ctgggttatga cacctcaaat acctctgaga ccgtcacctt 3180
tgtaggtgaa aacggcatta ccaccaaggt aaataaaggt aaagtcaaag ttggtattga 3240
ccaaacccaaa ggcttaacca cgcctaagct gaccgtgggt agtagtaatg gcaaaggcat 3300
tgtcattgac agtaaaagatg gtcaaaatac catcacagga ctaagcaaca ctctaaccga 3360
tgcaccacaac gcaacaacag ggcatgtcag tgaatccag ggcttggcac aaggtgcaaa 3420
caaaaaccgt gccgcagca ttgggtgatgt actaaacgca ggctttaact tgcaaggcaa 3480
tggtgaggcc aaagactttg tctccactta tgacaccgtc aactttatcg atggcaatgc 3540
caccaccgct ggagtgacc atgatgacac gaaacagacc agcacagtaa cttatgatgt 3600
caatgtggat aataaaaccc ttgaagtgac aggcgataaa aaacttggcg tcaaaaccac 3660
cacactgacc aaaaacagtg ctaatggtaa tgcaaccaaa tttagtgcog ccgatggcga 3720
tgcccttght aaagccagtg atatcgccac ccacttaaat accttggctg ggcacatcca 3780
aaccgcccana ggagcaagcc aagcaagcag ctcaagcaagc tatgtggatg ctgatggcaa 3840
caaggctcctc tatgacagta ccgataagaa gtactatcaa gccaaaaatg atggcacagt 3900
tgataaaacc aaagaagtgt ccaaagacaa actggctcggc caagcccaaa ccccgatggg 3960
cacattggct cgaatgaatg tcaaatcagt cattaacaaa gaacaagtaa atgatgcaaa 4020
taaaaagcaa ggcatcaacg aagcaaacgc ctttgttaaa ggacttgaaa aagccgcttc 4080
tgataacaaa accaaaaatg atgcaaaagg cgtgtctttt gtaaatgcog ttgcccnaac 4140
accgctgacc tttgcagggg atacaggcac aacggctaaa aaactgggog agactttgac 4200
catcaaaaggt gggcaaacag acaccaataa gctaaccgat aataacatcg gtgtggtagc 4260
aggtaactgt ggcttcactg tcaaaacttg caaagaccta accaatctta acagcgttaa 4320
tgcaggtgat gatggtaaa atgacaaaagg cgtgtctttt gtagacgcaa acggtcnaagc 4380
caaaagcaaac acccctgtgc taagtgcnaa tgggctggac ctgggtggca aacgcatcag 4440
taacatcggc gcagctgttg atgataacga tgcggtgaac ttttaagcagt ttaatgaagt 4500
tgccaaaaacg gtcaacaacc taacaacca aagtaactca ggtgcgtcat tgccctttgt 4560
agtaaacggat gccaatggca agcccatcaa tggcacccat gacaagccc aaaaagccat 4620
caagggcgcc gatggtaaa atatcacgc caacgccaac ggctacctg tggacnaaga 4680
tggcaacccc atcacogtg cggacnaact tgccaatctg gcagctcatg gcaaacccc 4740
tgtgcagggt catcaagtgg tggcaagcct aggcggcaac tcagatgcca tcaccctaac 4800
caacatcaag tccactttgc cacaattga cacacnaac acaggtaatg ccaatgcagg 4860
gcaagcccaa agtctccca gctatcagc agcacagcaa agtaatgctg ccagtgctaa 4920
agatgtgcta aatgtaggct ttaacttgc gaccaatcac aatcaagtgg actttgtcaa 4980
agcctatgat accgtcaact ttgtcaatgg tacaggtgoc gacatcacia gcgtgcgtag 5040
tgctgatggc acgatgagta acatcacct caacaccgoc ttagcagcga ccgatgatga 5100
tggcaatgtg cttatcaag ccaaaagatg taagttctac aaagcagacg acctcatgcc 5160
aaaaggctca ctaaaagcag gcaaatcagc cagtgatgoc aaaaactcnaa ctgggtctaa 5220
ccttgtcaac ccaatgctg gtaaaggcag tacagggcat gcagtgctc ttaataactt 5280
atcaaaagcg gtattttaa ccaagatgg tacaactact accacagtaa gctctgatgg 5340
catcagtatc caaggcaag ataacagcaa catcacccca agcaagatg ggctgaaagt 5400
aggcggtaag gtcatcagca atgtgggtaa aggcacnaaa gacacogacg ctgccaatgt 5460
acaacagtta aaccgaaagta cgcnaactgt tgggtcttgg gtaatggctg gtaatgataa 5520
cgctgacggc aatcaggtaa acattgccc catcaaaaa gaccnaaatt caggttcatc 5580
atctaaccgc actgtcatca aagcaggcac ggtacttggc ggtaaaaggta ataacgatac 5640
cgaaaaactt gccactggtg gtgtacaagt gggcgtggat aaagacggca acgctaaccg 5700
cgatttaagc aatgtttggg tcaaaaccca aaaagatggc agcaaaaaag cctgtctcgc 5760
cacttataac gcgcaggtc agaccaacta tttgacnaac aaccccgcag aagccattga 5820
cagaataaat gaacaaggta tccgcttctt ccatgtcaac gatggcaatc aagagccctg 5880
ggtacaaggg cgtaaccgca ttgactcaag tgccctcaggc aagcactcag tggcggctcg 5940
ttataaggcc aaggcagatg gtgaagccgc cgttgcataa ggcagacnaa cccaagcagg 6000
caaccaatcc atcgccatcg gtgataaccg acaagccaca ggcgatcaat ccatcgccat 6060
cggtaacaggc aatgtggtag caggtaaagca ctctgggtgc atcggcagac caagcactgt 6120
taaggctgat aacagttaca gtgtgggtaa taacaaccag tttaccgatg ccaactcagac 6180
cgatgtcttt ggtgtgggca ataacatcac cgtgacggaa agtaactcgg ttgccttagg 6240
ttcaaaactc gccactcagtg caggcacaca cgcaggcaca caagccnaaa aatctgacgg 6300
cacagcaggt acaaccacca cagcaggtgc aacaggtacg gttaaaggct ttgctggaca 6360
aacggcgggt ggtgcggctc ccgtgggtgc ctccaggtgt gaacgcogta tccnaaatgt 6420
ggcagcaggt gaggctcagtg ccaccagcac cgatcggctc aatggtagcc agttgtanaa 6480
agccaccnaa agcattgcca acgcaaccnaa tgagcttgac catcgtatcc accnaaacga 6540
aaataaagcc aatgcaggga tttcatcagc gatggcagtg gcgtccatgc cacaagccca 6600
cattcctggc agatccatgg ttaccggggg tattgcacc cacaaccgctc aaggtgcgg 6660
ggcagtgggg ctgtcgaagc tgtcggataa tggctcaatg gtaattnaaa tcaatggltc 6720

```

10

20

20

30

40

agccgatacc caaggccatg taggggcagc agttggtgca ggttttctact ttttaagccat 6780
 aaatcgcaag attttactta aaaatcaatc tcaccatagt tgtataaaac agcatcagca 6840
 tcagtcatat tactgatgct tgatggtttt tattacttaa accatttta 6889

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 3
 cgggatccga tggccgtggc ggaatatgcc 30

<210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

10

<400> 4
 cgcggatccg aaaagtgaaa acctgcacca actgctgc 38

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 5
 tgcagcatg tatcattttt ttaaggtaaa ccaccatg 38

20

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 6
 catcaattgc gatatgtctg ggatccttg 28

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

30

<400> 7
 cttcacccca tcagtccat agacc 25

<210> 8
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 8
 Ala Leu His Gly Ser Thr Ile Ser Asn Asp Asp Lys Thr Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Ile Ala Asp Val Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Glu Gly Asn Gly
 20 25 30

40

Glu Ala Val Asp Phe Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn Phe Ala Asp
 35 40 45

Gly Asn Ala Thr Thr Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asn Lys Thr Ser Lys
 50 55 60

Val Ala Tyr Asp Val Asn Val Asp Gly Thr Thr Ile His Leu Thr Gly
 65 70 75 80

Thr Asn Gly Lys Lys Asn Gln Ile Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu Thr
 85 90 95

Thr Lys Arg Ala Lys Gly Asn Thr Ala Thr Asn Phe Ser Val Asn Ser
 100 105 110

Gly Asp Asp Asn Ala Leu Ile Asn Ala Lys Asp Ile Ala Asp Asn Leu
 115 120 125

Asn Thr Leu Ala Gly Glu Ile Arg Thr Ala Lys Gly Thr Ala Ser Thr
 130 135 140

Ala Leu Gln Thr Phe Ser
 145 150

10

<210> 9
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

20

<400> 9
 gcactacatg gcagtacaat ttctaacgac gacaaaaccc gtgcccgcag tatcgccgat 60
 gtgctaaacg caggctttaa cttggaaggt aatggggaag cggttgactt tgtctccact 120
 tatgacaccg tcaactttgc cgatggcaat gccaccaccg ctaaggtaac ttatgataac 180
 aaaaccagta aagtggcgta tgatgtcaat gtggatggta caaccattca tctaacaggc 240
 actaatggca agaaaaacca aattggcgta aaaaccacca cactgaccac aaaacgtgct 300
 aaaggtaata cagcaactaa ttttagtggt aactctgggt atgacaatgc ccttattaac 360
 gccaaagaca tcgccgacaa bctaaacacc ctactctgggt aaattcgcac cgccaaaggc 420
 acagcaagca ccgccctaca aaccttctct 450

<210> 10
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

30

<400> 10
 Asp Gln Thr Lys Gly Leu Thr Thr Pro Lys Leu Thr Val Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Gly Ile Val Ile Asp Ser Lys Asp Gly Gln Asn Thr Ile
 20 25 30

Thr Gly Leu Ser Asn Thr Leu Thr Asp Ala Thr Asn Ala Thr Thr Gly
 35 40 45

His Val Ser Glu Ile Gln Gly Leu Ala Gln Gly Ala Asn Lys Thr Arg
 50 55 60

Ala Ala Ser Ile Gly Asp Val Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Gln Gly
65 70 75 80

Asn Gly Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn Phe
85 90 95

Ile Asp Gly Asn Ala Thr Thr Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asp Thr Lys
100 105 110

Gln Thr Ser Thr Val Thr Tyr Asp Val Asn Val Asp Asn Lys Thr Leu
115 120 125

Glu Val Thr Gly Asp Lys Lys Leu Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu Thr
130 135 140

Lys Thr Ser Ala Asn Gly Asn Ala Thr Lys Phe Ser Ala Ala Asp Gly
145 150 155 160

Asp Ala Leu Val Lys Ala Ser Asp Ile Ala Thr His Leu Asn Thr Leu
165 170 175

Ala Gly Asp Ile Gln Thr Ala Lys Gly Ala Ser Gln Ala Ser Ser Ser
180 185 190

Ala Ser Tyr Val Asp Ala Asp Gly Asn Lys Val Ile Tyr Asp Ser Thr
195 200 205

Asp Lys Lys Tyr Tyr Gln Ala Lys Asn Asp Gly Thr Val Asp Lys Thr
210 215 220

Lys Glu Val Ala Lys Asp Lys Leu Val Ala Gln Ala Gln Thr Pro
225 230 235

10

20

<210> 11
<211> 717
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 11
gaccaaacca aaggcttaac caccgctaag ctgaccgtgg gtagtagtaa tggcaaaggc 60
attgtcattg acagtaaaga tggcctaaaat accatcacag gactaagcaa cactctaacc 120
gatgccacca acgcaacaac agggcatgtc agtgaatcc agggcttggc acaagggtgca 180
aacaaaaccc gtgccgccag cattgggtgat gtactaaacg caggctttaa cttgcaaggc 240
aatgggtgaag ccaaagactt tgtctccact tatgacaccg tcaactttat cgatggcaat 300
gccaccaccg ctaaggtgac ctatgatgac acgaaacaga ccagcacagt aacttatgat 360
gtcaatgtgg ataataaaac ccttgaagtg acaggcgata aaaaacttgg cgtcaaaaacc 420
accacactga ccaaaacaag tgctaattgg aatgcaacca aatttagtgc cgccgatggc 480
gatgcccttg ttaaagccag tgatatcgcc acccatctaa ataccttggc tggcgacatc 540
caaaccgcca aaggagcaag ccaagcaagc agctcagcaa gctatgtgga tgetgatggc 600
aacaaggta tctatgacag taccgataag aagtactatc aagccaaaaa tgatggcaca 660
gttgataaaa ccaaagaagt tgccaaagac aaactggtcg cccaagccca aaccoca 717

30

【 図 1 】

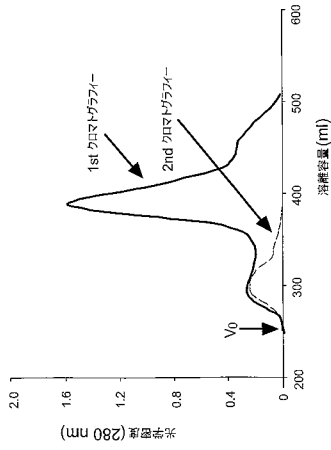


Fig 1

【 図 2 】

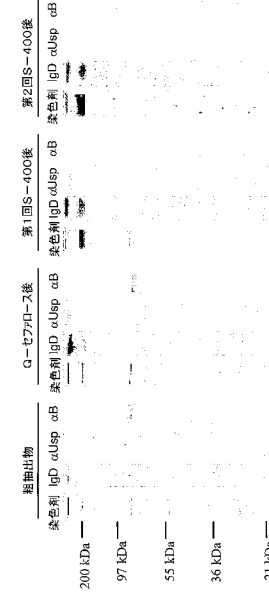


Fig 2

【 図 3 】

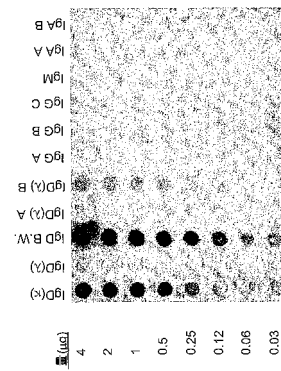


Fig 3

【 図 4 】

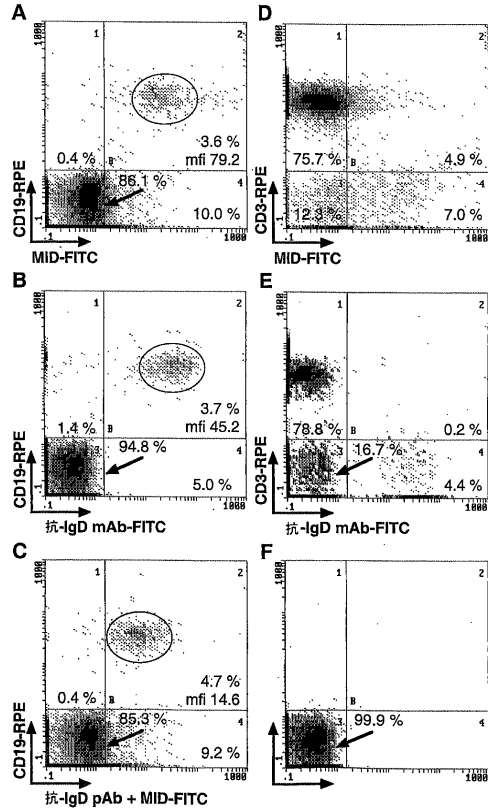


Fig 4

【 図 5 】

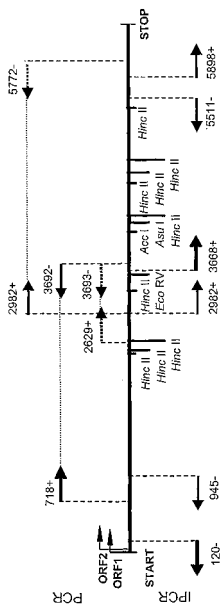


Fig 5

【 図 6 - 1 】

-250
 ACTCTATTATTGATATGTTTTGAAACTAATCTATTGACTTAAATCACCATATGGTTATAAT
 TTAGCATAAATGGTAGGCTTTTTGAAAAATCACATCGCAATATTGTTCTACTGTACTACCA
 -35
 TGCCTGAATGACGATCCCAATCATCAGATTCCATCAAGTGATGTGTTGTATACGCATCATT
 -10
 TACCCTAATTAATTCATCGAAATGCCTATGTCAGCATGTATCATTTTTTAAGGTAAACCA
 rbs
 1/1 31/11
 CC ATG AAT CAC ATC TAT AAA GTC ATC TTT AAC AAA GCC ACA GGC ACA
Met asn his ile tyr lys val ile phe asn lys ala thr gly thr
 61/21
 TTT ATG GCC GTG GCG GAA TAT GCC AAA TCC CAC AGC ACG GGG GGT
phe Met ala val ala glu tyr ala lys ser his ser thr gly gly
 91/31 121/41
 AGC TGT GCT ACA GGG CAA GTT GGC AGT GTA TGC ACT CTG AGC TTT
ser cys ala thr gly gln val gly ser val cys thr leu ser phe
 151/51
 GCC CGT GTT GCC GCG CTC GCT GTC CTC GTG ATC GGT GCG ACG CTC
ala arg val ala ala leu ala val leu val ile gly ala thr leu
 181/61 211/71
 AAT GGC AGT GCT TAT GCT CAA CAA GAT CCC AGA CAT ATC GCA ATT
asn gly ser ala tyr ala gln gln asp pro arg his ile ala ile
 241/81
 GAT GGC AAC AGC TCG AAC ACA TCC TCA GGC ACT GCC CGT GCG ACA
asp gly asn ser ser asn thr ser ser gly thr ala arg ala thr
 271/91 301/101
 GGT GAT CGA GCC ATT GCT CTT GGT GAA AAT GCT AAT GCA GAG GGC
gly asp arg ala ile ala leu gly glu asn ala asn ala glu gly
 331/111
 GGT CAA GCC ATC GCC ATC GGT AGT AGC AAT AAA ACA GGT GGT AGA
gly gln ala ile ala ile gly ser ser asn lys thr gly gly arg
 361/121 391/131
 AAC GCG CTG AAT ATA GGT ACC GAT GCC AAA GGT GAG GAG TCC ATC
asn ala leu asn ile gly thr asp ala lys gly glu glu ser ile
 421/141
 GCC ATC GGT GGT GAT GTA GTG GCT GAG GGT ACT GCC TCG ATT GCC
ala ile gly gly asp val val ala glu gly thr ala ser ile ala
 451/151 481/161
 ATC GGT GGT GAT GAC TTA CAT TTG TGG GAT GAA CCA AAT AAG CAA
ile gly gly asp asp leu his leu trp asp glu pro asn lys gln

Fig 6

【 図 6 - 2 】

511/171
 AAG TTC CTC GAC CCA AAA GTT AAA GAA TTG ATT TTA AAA CAT CAA
 lys phe leu asp pro lys val lys glu leu ile leu lys his gln
 541/181 571/191
 GAA TTA AAC AAC ATA TAC AAA CTG CCT GAT GGT AGT CCT CAA AGA
 glu leu asn asn ile tyr lys leu pro asp gly ser pro gln arg
 601/201
 TAT TTT CGC ACA TAC GCA AAG GGA CAC GCC AGT ATT GCA CTA GGA
 tyr phe arg thr tyr ala lys gly his ala ser ile ala leu gly
 631/211 661/221
 ACC ATG ACA CAG GCA GAG GGT CAT TTT GCC AAC GCC TTT GGT ACA
 thr met thr gln ala glu gly his phe ala asn ala phe gly thr
 691/231
 CGG GCA ACA GCT AAA GGC AAC TAT TCC TTG GCA GTG GGT CTT ACC
 arg ala thr ala lys gly asn tyr ser leu ala val gly leu thr
 721/241 751/251
 GCC CAA GCC AAC ACA GAA TCT TCA ATC GCT GTT GGT TCT AAT GCA
 ala gln ala asn thr glu ser ser ile ala val gly ser asn ala
 781/261
 CAA GCT AAC GGG TTT GCA GCG ACA GCC ATT GGT GGA GGT ACT AAA
 gln ala asn gly phe ala ala thr ala ile gly gly gly thr lys
 811/271 841/281
 GCT GAT TTG GGT CGA AGC ATA GCC CTA GGT TTT GGT TCT CAG ATC
 ala asp leu gly arg ser ile ala leu gly phe gly ser gln ile
 871/291
 CTT ACT AAG GAG AAG GAT AGT CAT AAC AAT ACC AAT GTC TAT GTA
 leu thr lys glu lys asp ser his asn asn thr asn val tyr val
 901/301 931/311
 CCA CAA GGT GAA ATA TTA GAA GAG CGG TAT AAA GCC ACC GAA AAC
 pro gln gly glu ile leu glu glu arg tyr lys ala thr glu asn
 961/321
 GGT CAG TCG CCT AAT AAG GTA GTG GAT ATA TTT TCC ATT GGT AGT
 gly gln ser pro asn lys val val asp ile phe ser ile gly ser
 991/331 1021/341
 AGC TCT ATC AAA CGT AAA ATC ATC AAT GTC GGT GCG GGT TCT CAG
 ser ser ile lys arg lys ile ile asn val gly ala gly ser gln
 1051/351
 GAG ACC GAT GCG GTC AAT GTG GCA CAG CTT AAA TTG GTG GAG CGG
 glu thr asp ala val asn val ala gln leu lys leu val glu arg

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 3 】

1081/361 1111/371
 GTG GCT AAG CGT CAA ATT ACT TTT CAG GGT GAT GAT AGC AAT AAT
 val ala lys arg gln ile thr phe gln gly asp asp ser asn asn
 1141/381
 AGC GTA AAA AAA GGT TTG GGT CAG ACT TTA ACT ATT AAA GGT GGT
 ser val lys lys gly leu gly gln thr leu thr ile lys gly gly
 1171/391 1201/401
 AAA ACA GAG ACC GGT GAA CTA ACC GAA AAT AAC ATC GGT GTG GTA
 lys thr glu thr gly glu leu thr glu asn asn ile gly val val
 1231/411
 CAA GAT GAT AAT GGT AAT GGT CTG AAA GTT AAA CTT GCT AAA GAT
 gln asp asp asn gly asn gly leu lys val lys leu ala lys asp
 1261/421 1291/431
 CTG ACT GGT TTG ACC AAG GTT GCA GTA AAT GGT AAT GGT GCT AAC
 leu thr gly leu thr lys val ala val asn gly asn gly ala asn
 1321/441
 AAC GCC GAG CTA CTA AAC GGT GGT CTG ACC TTT TCG ACA TCA GGT
 asn ala glu leu leu asn gly gly leu thr phe ser thr ser gly
 1351/451 1381/461
 GCC AAT GCA GGC AAA ACG GTC TAT GGC ACT GAT GGG GTG AAG TTT
 ala asn ala gly lys thr val tyr gly thr asp gly val lys phe
 1411/471
 ACT AAT AAT ACA GGA ACA GGA ACA GGA ACG GCA ATA CCC GAC ACT
 thr asn asn thr gly thr gly thr gly thr ala ile pro asp thr
 1441/481 1471/491
 ACT CGT ATT ACC AAA AAT AAA ATT GGC TTT GCT GGG GCT GAT GAA
 thr arg ile thr lys asn lys ile gly phe ala gly ala asp glu
 1501/501
 CAA GTT GAT GAA AGC AAA CCT TAT CTT GAC AAC GAA AAG CTA AAA
 gln val asp glu ser lys pro tyr leu asp asn glu lys leu lys
 1531/511 1561/521
 GTT GGC ACA GTT GAG ATT AAA AAA ACT GGC ATC AAT GCA GGT AAT
 val gly thr val glu ile lys lys thr gly ile asn ala gly asn
 1591/531
 CAA GAA ATT ACC AAG GTC AAA TCT GCC ATT GTT GAT GCA GTT AAT
 gln glu ile thr lys val lys ser ala ile val asp ala val asn
 1621/541 1651/551
 GGA CAA GCA AAT CAA AGC TTT GTG AAC CTT CTA GAA ACA GCA GGC
 gly gln ala asn gln ser phe val asn leu leu glu thr ala gly
 1681/561
 ACA AAC ACC AAC AAA CAA AAC TCT GCC GCC ACG GTT AAA GAC TTA
 thr asn thr asn lys gln asn ser ala ala thr val lys asp leu

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 4 】

1711/571 1741/581
TAC GAC CTA TCA CAA TCA CCG CTG ACC TTT ACA GGT GAT AGC GGT
tyr asp leu ser gln ser pro leu thr phe thr gly asp ser gly
1771/591
AAC GTT AAG AGA AAA CTG GGT CAG ACT TTA ACC ATC ACA GGC GGA
asn val lys arg lys leu gly gln thr leu thr ile thr gly gly
1801/601 1831/611
CAA ACA AAG ACC GAT CAA TTA ACC GAC AAT AAC ATC GGT GTG GTA
gln thr lys thr asp gln leu thr asp asn asn ile gly val val
1861/621
GCA GGT ACT AAT GGC TTA ACC GTT AAA CTT GCT AAA ACT TTA AAC
ala gly thr asn gly leu thr val lys leu ala lys thr leu asn
1891/631 1921/641
AGT CTT ACT GAA GTT AAT ACG GCT ACA TTA AAC GCC ACC AAT AAA
ser leu thr glu val asn thr ala thr leu asn ala thr asn lys
1951/651
GTT AAG GTA GAT AAT AGT ACT GGT AAT ACG GCT GAA TTA TTA AAC
val lys val asp asn ser thr gly asp thr ala glu leu leu asn
1981/661 2011/671
AAT GGT TTA ACC TTT ACC CAA ACA ACA GGT GCA AAT TCA GGT AAA
asn gly leu thr phe thr gln thr thr gly ala asn ser gly lys
2041/681
ACC GTC TAT GGC AAT GAT GGC TTG AAG TTT ACT AAT AGT GCT AAT
thr val tyr gly asn asp gly leu lys phe thr asn ser ala asn
2071/691 2101/701
AAA GCA CTT GGC GGC ACA ACT TAC ATC ACC AAA GAT CAA GTT GGT
lys ala leu gly gly thr thr tyr ile thr lys asp gln val gly
2131/711
TTT AGC AAT CAA GAT GGC TTA CTT GAT GAA AGC AAA CCG TAT CTT
phe ser asn gln asp gly leu leu asp glu ser lys pro tyr leu
2161/721 2191/731
AAC CGA GAA AAG CTA AAA GTT GGT AAA ATT GAG ATT AAA GAC AGT
asn arg glu lys leu lys val gly lys ile glu ile lys asp ser
2221/741
GGC ATT AAT GCA GGT GGT AAA GCC ATC ACA GGA CTG CCC TCA ACA
gly ile asn ala gly gly lys ala ile thr gly leu pro ser thr
2251/751 2281/761
CTG CCC AAC ACT ACC TAT ACT GCA CCT GGC CTG CAT ACT GCA CTA
leu pro asn thr thr tyr thr ala pro gly val his thr ala leu
2311/771
CAT GGC AGT ACA ATT TCT AAC GAC GAC AAA ACC CGT GCC GCC AGT
his gly ser thr ile ser asn asp asp lys thr arg ala ala ser

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 5 】

2341/781 2371/791
ATC GCC GAT GTG CTA AAC GCA GGC TTT AAC TTG GAA GGT AAT GGT
ile ala asp val leu asn ala gly phe asn leu glu gly asn gly
2401/801
GAA GCG GTT GAC TTT GTC TCC ACT TAT GAC ACC GTC AAC TTT GCC
glu ala val asp phe val ser thr tyr asp thr val asn phe ala
2431/811 2461/821
GAT GGC AAT GCC ACC ACC GCT AAG GTA ACT TAT GAT AAC AAA ACC
asp gly asn ala thr thr ala lys val thr tyr asp asn lys thr
2491/831
AGT AAA GTG GCG TAT GAT GTC AAT GTG GAT GGT ACA ACC ATT CAT
ser lys val ala tyr asp val asn val asp gly thr thr ile his
2521/841 2551/851
CTA ACA GGC ACT AAT GGC AAG AAA AAC CAA ATT GGC GTA AAA ACC
leu thr gly thr asn gly lys lys asn gln ile gly val lys thr
2581/861
ACC ACA CTG ACC ACA AAA CGT GCT AAA GGT AAT ACA GCA ACT AAT
thr thr leu thr thr lys arg ala lys gly asn thr ala thr asn
2611/871 2641/881
TTT AGT GGT AAC TCT GGT GAT GAC AAT GCC CTT ATT AAC GCC AAA
phe ser val asn ser gly asp asp asn ala leu ile asn ala lys
2671/891
GAC ATC GCC GAC AAT CTA AAC ACC CTA GCT GGT GAA ATT CGC ACC
asp ile ala asp asn leu asn thr leu ala gly glu ile arg thr
2701/901 2731/911
GCC AAA GGC ACA GCA AGC ACC GCC CTA CAA ACC TTC TCT ATT ATT
ala lys gly thr ala ser thr ala leu gln thr phe ser ile ile
2761/921
GAT GAA CAA GGT AAT AAC TTT ATG GTC GGT AAC CTT TAC TCT GGT
asp glu gln gly asn asn phe met val gly asn leu tyr ser gly
2791/931 2821/941
TAT GAC ACC TCA AAT ACC TCT GAG ACC GTC ACC TTT GTA GGT GAA
tyr asp thr ser asn thr ser glu thr val thr phe val gly glu
2851/951
AAC GGC ATT ACC ACC AAG GTA AAT AAA GGT AAA GTC AAA GTT GGT
asn gly ile thr thr lys val asn lys gly lys val lys val gly
2881/961 2911/971
ATT GAC CAA ACC AAA GGC TTA ACC ACG CCT AAG CTG ACC GTG GGT
ile asp gln thr lys gly leu thr thr pro lys leu thr val gly
2941/981
AGT AGT AAT GGC AAA GGC ATT GTC ATT GAC AGT AAA GAT GGT CAA
ser ser asn gly lys gly ile val ile asp ser lys asp gly gln

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 6 】

2971/991 3001/1001
AAT ACC ATC ACA GGA CTA AGC AAC ACT CTA ACC GAT GCC ACC AAC
asn thr ile thr gly leu ser asn thr leu thr asp ala thr asn
3031/1011
GCA ACA ACA GGG CAT GTC AGT GAA ATC CAG GGC TTG GCA CAA GGT
ala thr thr gly his val ser glu ile gln gly leu ala gln gly
3061/1021 3091/1031
GCA AAC AAA ACC CGT GCC GCC AGC ATT GGT GAT GTA CTA AAC GCA
ala asn lys thr arg ala ala ser ile gly asp val lys asn ala
3121/1041
GGC TTT AAC TTG CAA GGC AAT GGT GAA GCC AAA GAC TTT GTC TCC
gly phe asn leu gln gly asn gly glu ala lys asp phe val ser
3151/1051 3181/1061
ACT TAT GAC ACC GTC AAC TTT ATC GAT GGC AAT GCC ACC ACC GCT
thr tyr asp thr val asn phe ile asp gly asn ala thr thr ala
3211/1071
AAG GTG ACC TAT GAT GAC ACG AAA CAG ACC AGC ACA GTA ACT TAT
lys val thr tyr asp asp thr lys gln thr ser thr val thr tyr
3241/1081 3271/1091
GAT GTC AAT GTG GAT AAT AAA ACC CTT GAA GTG ACA GGC GAT AAA
asp val asn val asp asn lys thr leu glu val thr gly asp lys
3301/1101
AAA CTT GGC GTC AAA ACC ACC ACA CTG ACC AAA ACA AGT GCT AAT
lys leu gly val lys thr thr thr leu thr lys thr ser ala asn
3331/1111 3361/1121
GGT AAT GCA ACC AAA TTT AGT GCC GCC GAT GGC GAT GCC CTT GTT
gly asn ala thr lys phe ser ala ala asp gly asp ala leu val
3391/1131
AAA GCC AGT GAT ATC GCC ACC CAT CTA AAT ACC TTG GCT GGC GAC
lys ala ser asp ile ala thr his leu asn thr leu ala gly asp
3421/1141 3451/1151
ATC CAA ACC GCC AAA GGA GCA AGC CAA GCA AGC AGC TCA GCA AGC
ile gln thr ala lys gly ala ser gln ala ser ser ala ser
3481/1161
TAT GTG GAT GCT GAT GGC AAC AAG GTC ATC TAT GAC AGT ACC GAT
tyr val asp ala asp gly asn lys val ile tyr asp ser thr asp

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 7 】

3511/1171 3541/1181
AAG AAG TAC TAT CAA GCC AAA AAT GAT GGC ACA GTT GAT AAA ACC
lys lys tyr tyr gln ala lys asn asp gly thr val asp lys thr
3571/1191
AAA GAA GTT GCC AAA GAC AAA CTG GTC GCC CAA GCC CAA ACC CCA
lys glu val ala lys asp lys leu ala gln ala gln thr pro
3601/1201 3631/1211
GAT GGC ACA TTG GCT CGA ATG AAT GTC AAA TCA GTC ATT AAC AA
asp gly thr leu ala arg met asn val lys ser val ile asn lys
3661/1221
GAA CAA GTA AAT GAT GCC AAT AAA AAG CAA GGC ATC AAC GAA GAC
glu gln val asn asp ala asn lys lys gln gly ile asn glu asp
3691/1231 3721/1241
AAC GCC TTT GTT AAA GGA CTT GAA AAA GCC GCT TCT GAT AAC AAA
asn ala phe val lys gly leu glu lys ala ala ser asp asn lys
3751/1251
ACC AAA AAC GCC GCA GTA ACT GTG GGT GAT TTA AAT GCC GTT GCC
thr lys asn ala ala val thr val gly asp leu asn ala val ala
3781/1261 3811/1271
CAA ACA CCG CTG ACC TTT GCA GGG GAT ACA GGC ACA ACG GCT AAA
gln thr pro leu thr phe ala gly asp thr gly thr thr ala lys
3841/1281
AAA CTG GGC GAG ACT TTG ACC ATC AAA GGT GGG CAA ACA GAC ACC
lys leu gly glu thr leu thr ile lys gly gly gln thr asp thr
3871/1291 3901/1301
AAT AAG CTA ACC GAT AAT AAC ATC GGT GTG GTA GCA GGT ACT GAT
asn lys leu thr asp asn asn ile gly val val ala gly thr asp
3931/1311
GGC TTC ACT GTC AAA CTT GCC AAA GAC CTA ACC AAT CTT AAC AGC
gly phe thr val lys leu ala lys asp leu thr asn leu asn ser
3961/1321 3991/1331
GTT AAT GCA GGT GGC ACC AAA ATT GAT GAC AAA GGC GTG TCT TTT
val asn ala gly gly thr lys ile asp asp lys gly val ser phe
4021/1341
GTA GAC GCA AAC GGT CAA GCC AAA GCA ACC ACC CCT GTG CTA AGT
val asp ala asn gly gln ala lys ala asn thr pro val leu ser
4051/1351 4081/1361
GCC AAT GGC CTG GAC CTG GGT GGC AAA CGC ATC AGT AAC ATC GGT
ala asn gly leu asp leu gly gly lys arg ile ser asn ile gly

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 8 】

4111/1371
 GCA GCT GTT GAT GAT AAC GAT GCG GTG AAC TTT AAG CAG TTT AAT
 ala ala val asp asp asn asp ala val asn phe lys gln phe asn
 4141/1381
 GAA GTT GCC AAA ACG GTC AAC AAC CTA AAC AAC CAA AGT AAC TCA
 glu val ala lys thr val asn asn leu asn asn gln ser asn ser
 4201/1401
 GGT GCG TCA TTG CCC TTT GTA GTA ACC GAT GCC AAT GGC AAG CCC
 gly ala ser leu pro phe val val thr asp ala asn gly lys pro
 4231/1411
 ATC AAT GGC ACC GAT GAC AAG CCC CAA AAA GCC ATC AAG GGC GCC
 ile asn gly thr asp asp lys pro gln lys ala ile lys gly ala
 4291/1431
 GAT GGT AAA TAC TAT CAC GCC AAC GCC AAC GGC GTA CCT GTG GAC
 asp gly lys tyr tyr his ala asn ala asn gly val pro val asp
 4321/1441
 AAA GAT GGC AAC CCC ATC ACC GAT GCG GAC AAA CTT GCC AAT CTG
 lys asp gly asn pro ile thr asp ala asp lys leu ala asn leu
 4381/1461
 GCA GCT CAT GGC AAA CCC CTT GAT GCA GGT CAT CAA GTG GTG GCA
 ala ala his gly lys pro leu asp ala gly his gln val val ala
 4411/1471
 AGC CTA GGC GGC AAC TCA GAT GCC ATC ACC CTA ACC AAC ATC AAG
 ser leu gly gly asn ser asp ala ile thr leu thr asn ile lys
 4471/1491
 TCC ACT TTG CCA CAA ATT GAC ACA CCA AAC ACA GGT AAT GCC AAT
 ser thr leu pro gln ile asp thr pro asn thr gly asn ala asn
 4501/1501
 GCA GGG CAA GCC CAA AGT CTG CCC AGC CTA TCA GCA GCA CAG CAA
 ala gly gln ala gln ser leu pro ser leu ser ala ala gln gln
 4561/1521
 AGT AAT GCT GCC AGT GTC AAA GAT GTG CTA AAT GTA GGC TTT AAC
 ser asn ala ala ser val lys asp val leu asn val gly phe asn
 4591/1531
 TTG CAG ACC AAT CAC AAT CAA GTG GAC TTT GTC AAA GCC TAT GAT
 leu gln thr asn his asn gln val asp phe val lys ala tyr asp
 4651/1551
 ACC GTC AAC TTT GTC AAT GGT ACA GGT GCC GAC ATC ACA AGC GTG
 thr val asn phe val asn gly thr gly ala asp ile thr ser val

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 9 】

4681/1561
 CGT AGT GCT GAT GGC ACG ATG AGT AAC ATC ACC GTC AAC ACC GCC
 arg ser ala asp gly thr met ser asn ile thr val asn thr ala
 4741/1581
 TTA GCA GCG ACC GAT GAT GAT GGC AAT GTG CTT ATC AAA GCC AAA
 leu ala ala thr asp asp asp gly asn val leu ile lys ala lys
 4771/1591
 GAT GGT AAG TTC TAC AAA GCA GAC GAC CTC ATG CCA AAC GGC TCA
 asp gly lys phe tyr lys ala asp asp leu met pro asn gly ser
 4831/1611
 CTA AAA GCA GGC AAA TCA GCC AGT GAT GCC AAA ACT CCA ACT GGT
 leu lys ala gly lys ser ala ser asp ala lys thr pro thr gly
 4861/1621
 CTA AGC CTT GTC AAC CCC AAT GCT GGT AAA GGC AGT ACA GGC GAT
 leu ser leu val asn pro asn ala gly lys gly ser thr gly asp
 4921/1641
 GCA GTG GCT CTT AAT AAC TTA TCA AAA GCG GTA TTT AAA TCC AAA
 ala val ala leu asn asn leu ser lys ala val phe lys ser lys
 4951/1651
 GAT GGT ACA ACT ACT ACC ACA GTA AGC TCT GAT GGC ATC AGT ATC
 asp gly thr thr thr thr thr val ser ser asp gly ile ser ile
 5011/1671
 CAA GGC AAA GAT AAC AGC AAC ATC ACC CTA AGC AAA GAT GGG CTG
 gln gly lys asp asn ser asn ile thr leu ser lys asp gly leu
 5041/1681
 AAT GTA GGC GGT AAG GTC ATC AGC AAT GTG GGT AAA GGC ACA AAA
 asn val gly gly lys val ile ser asn val gly lys gly thr lys
 5101/1701
 GAC ACC GAC GCT GCC AAT GTA CAA CAG TTA AAC CGA AGT ACG CAA
 asp thr asp ala ala asn val gln gln leu asn arg ser thr gln
 5131/1711
 CTT GGT GGC TCT TGG GTA ATG GCT GGT AAT GAT AAC GCT GAC GGC
 leu val gly ser trp val met ala gly asn asp asn ala asp gly
 5191/1731
 AAT CAG GTA AAC ATT GCC GAC ATC AAA AAA GAC CCA AAT TCA GGT
 asn gln val asn ile ala asp ile lys lys asp pro asn ser gly
 5221/1741
 TCA TCA TCT AAC CGC ACT GTC ATC AAA GCA GGC ACG GTA CTT GGC
 ser ser ser asn arg thr val ile lys ala gly thr val leu gly
 5281/1761
 GGT AAA GGT AAT AAC GAT ACC GAA AAA CTT GCC ACT GGT GGT GTA
 gly lys gly asn asn asp thr glu lys leu ala thr gly gly val

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 10 】

5311/1771
 CAA GTG GGC GTG GAT AAA GAC GGC AAC GCT AAC GGC GAT TTA AGC
 gln val gly val asp lys asp gly asn ala asn gly asp leu ser
 5371/1791
 AAT GTT TGG GTC AAA ACC CAA AAA GAT GGC AGC AAA AAA GCC CTG
 asn val trp val lys thr gln lys asp gly ser lys lys ala leu
 5401/1801
 CTC GCC ACT TAT AAC GCC GCA GGT CAG ACC AAC TAT TTG ACC AAC
 leu ala thr tyr asn ala ala gly gln thr asn tyr leu thr asn
 5461/1821
 AAC CCC GCA GAA GCC ATT GAC AGA ATA AAT GAA CAA GGT ATC CGC
 asn pro ala glu ala ile asp arg ile asn glu gln gly ile arg
 5491/1831
 TTC TTC CAT GTC AAC GAT GGC AAT CAA GAG CCT GTG GTA CAA GGG
 phe phe his val asn asp gly asn gln glu pro val val gln gly
 5551/1851
 CGT AAC GGC ATT GAC TCA AGT GCC TCA GGC AAG CAC TCA GTG GCG
 arg asn gly ile asp ser ser ala ser gly lys his ser val ala
 5581/1861
 GTC GGT TAT AAG GCC AAG GCA GAT GGT GAA GCC GCC GTT GCC ATA
 val gly tyr lys ala lys ala asp gly glu ala ala val ala ile
 5641/1881
 GGC AGA CAA ACC CAA GCA GGC AAC CAA TCC ATC GCC ATC GGT GAT
 gly arg gln thr gln ala gly asn gln ser ile ala ile gly asp
 5671/1891
 AAC GCA CAA GCC ACA GGC GAT CAA TCC ATC GCC ATC GGT ACA GGC
 asn ala gln ala thr gly asp gln ser ile ala ile gly thr gly
 5731/1911
 AAT GTG GTA GCA GGT AAG CAC TCT GGT GCC ATC GGC GAC CCA AGC
 asn val val ala gly lys his ser gly ala ile gly asp pro ser
 5761/1921
 ACT GTT AAG GCT GAT AAC AGT TAC AGT GTG GGT AAT AAC AAC CAG
 thr val lys ala asp asn ser tyr ser val gly asn asn asn gln
 5821/1941
 TTT ACC GAT GCC ACT CAG ACC GAT GTC TTT GGT GTG GGC AAT AAC
 phe thr asp ala thr gln thr asp val phe gly val gly asn asn
 5851/1951
 ATC ACC GTG ACC GAA AGT AAC TCG GTT GCC TTA GGT TCA AAC TCT
 ile thr val thr glu ser asn ser val ala leu gly ser asn ser

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 11 】

5911/1971
 GCC ATC AGT GCA GGC ACA CAC GCA GGC ACA CAA GCC AAA AAA TCT
 ala ile ser ala gly thr his ala gly thr gln ala lys lys ser
 5941/1981
 GAC GGC ACA GCA GGT ACA ACC ACC ACA GCA GGT GCA ACA GGT ACG
 asp gly thr ala gly thr thr thr thr ala gly ala thr gly thr
 6001/2001
 GTT AAA GGC TTT GCT GGA CAA AGC GCG GTT GGT GCG GTC TCC GTG
 val lys gly phe ala gly gln thr ala val gly ala val ser val
 6031/2011
 GGT GCC TCA GGT GCT GAA CGC CGT ATC CAA AAT GTG GCA GCA GGT
 gly ala ser gly ala glu arg arg ile gln asn val ala ala gly
 6091/2031
 GAG GTC AGT GCC ACC AGC ACC GAT GCG GTC AAT GGT AGC CAG TTG
 glu val ser ala thr ser thr asp ala val asn gly ser gln leu
 6121/2041
 TAC AAA GCC ACC CAA AGC ATT GCC AAC GCA ACC AAT GAG CTT GAC
 tyr lys ala thr gln ser ile ala asn ala thr asn glu leu asp
 6181/2061
 CAT CGT ATC CAC CAA AAC GAA AAT AAA GCC AAT GCA GGG ATT TCA
 his arg ile his gln asn glu asn lys ala asn ala gly ile ser
 6211/2071
 TCA GCG ATG GCG ATG GCG TCC ATG CCA CAA GCC TAC ATT CCT GGC
 ser ala met ala met ala ser met pro gln ala tyr ile pro gly
 6271/2091
 AGA TCC ATG GTT ACC GGG GGT ATT GCC ACC CAC AAC GGT CAA GGT
 arg ser met val thr gly gly ile ala thr his asn gly gln gly
 6301/2101
 GCG GTG GCA GTG GGA CTG TCG AAG CTG TCG GAT AAT GGT CAA TGG
 ala val ala val gly leu ser lys leu ser asp asn gly gln trp
 6361/2121
 GTA TTT AAA ATC AAT GGT TCA GCC GAT ACC CAA GGC CAT GTA GGG
 val phe lys ile asn gly ser ala asp thr gln gly his val gly
 6391/2131
 GCA GCA GTT GGT GCA GGT TTT CAC TTT TAA GCCATAAATCGC
 ala ala val gly ala gly phe his phe ストップ
 AGATTTTACTTAAARAATCAATCTCACCATAGTTGTATAAAACAGCATCA

逆方向復単位 6505
 GCATCAGTCATATTACTGATGCTTGATGGTTTTTATTACTTAAACCAATTTTA

Fig 6 (つづき)

【 図 7 】

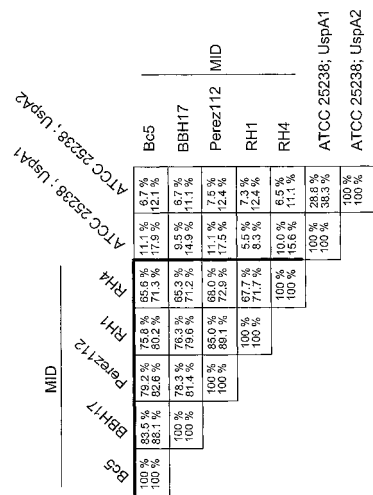


Fig 7

【 図 8 - 1 】

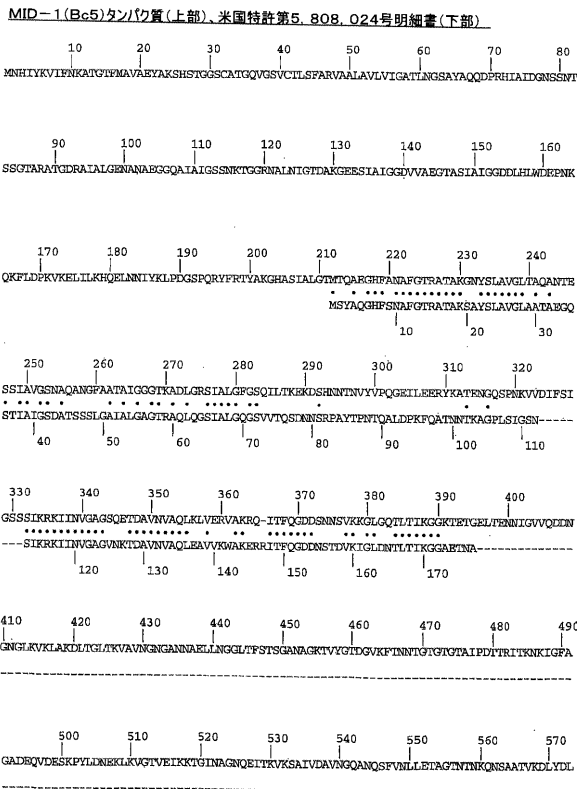


Fig 8

【 図 8 - 2 】

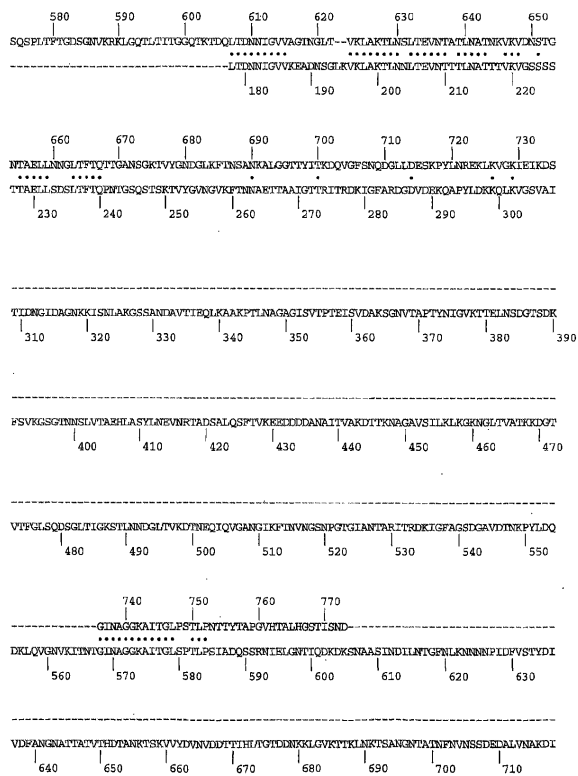
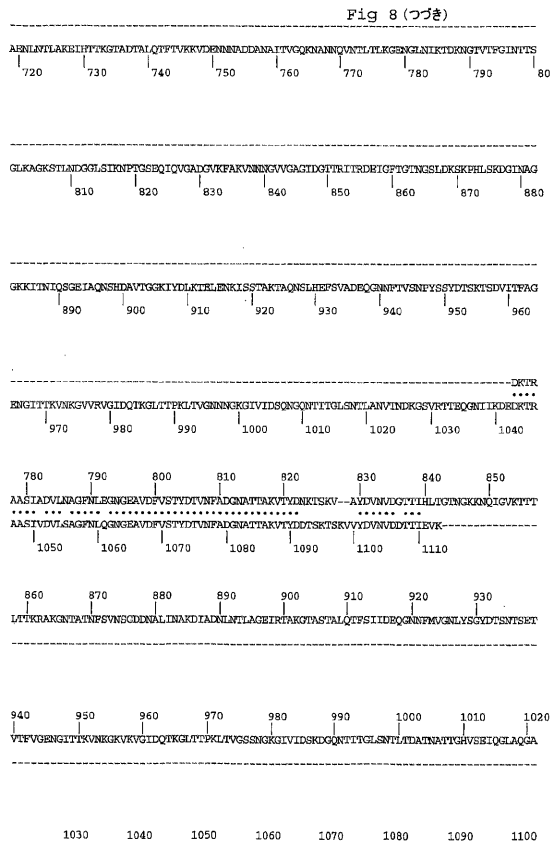
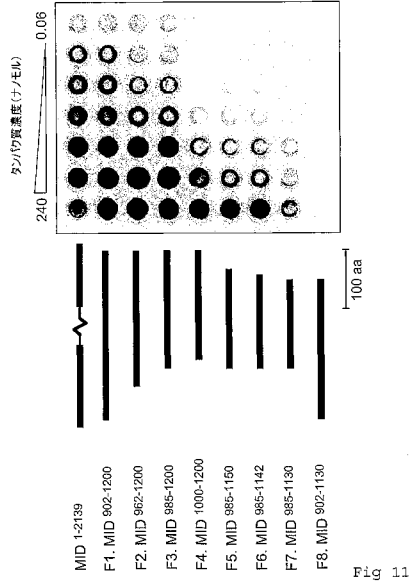


Fig 8 (つぎ)

【 図 8 - 3 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

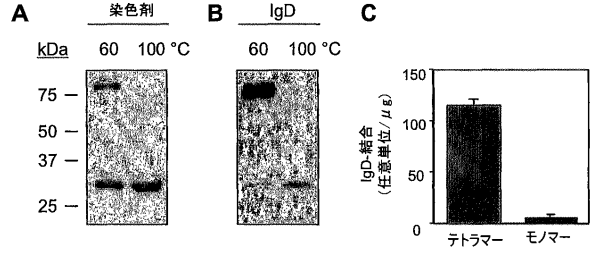


Fig 12

【 図 1 3 】

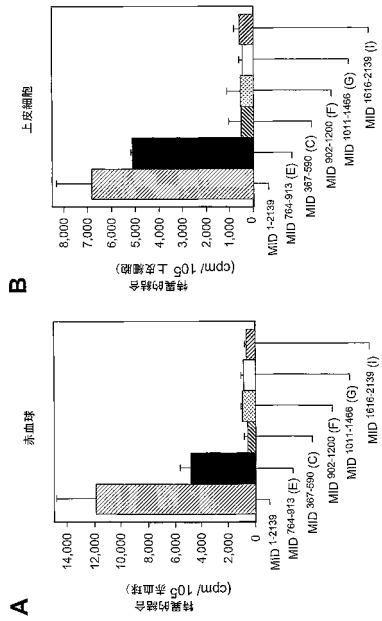


Fig 13

【 図 1 4 】

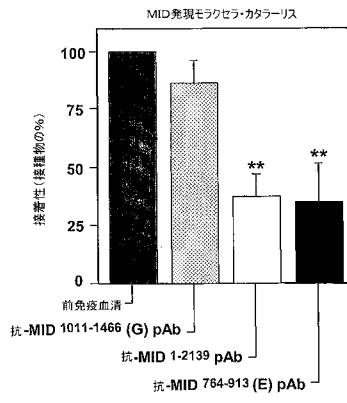


Fig 14

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00
C 0 7 K	16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/12
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	1/22 (2006.01)	C 0 7 K	1/22
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 N

- (72)発明者 フオシユグレン, アルネ
スウェーデン国、エス - 2 3 9 4 1・フアルステルボ、ソテンスペーゲン・4・ペー
- (72)発明者 リエスベック, クリステイアン
スウェーデン国、エス - 2 1 6 2 1・マルメ、フイーシユパンスガータン・2
- (72)発明者 ヤンソン, ホーカン
スウェーデン国、エス - 2 2 3 5 3・ルンド、トレドゴーツガータン・6・ペー

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 国際公開第01/007619 (WO, A1)
J. Immunol. (Aug 2001) vol.167, no.4, p.2112-2120
FEMS Immunol. Med. Microbiol. (1997) vol.18, no.3, p.209-216
Cell. Immunol. (1988) vol.112, no.1, p.78-88
Infect. Immun. (1989) vol.57, no.10, p.2938-2941

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00-15/90
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	来自粘膜莫拉氏菌的新型表面暴露的免疫球蛋白D结合蛋白		
公开(公告)号	JP4443922B2	公开(公告)日	2010-03-31
申请号	JP2003510809	申请日	2002-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	霍师鱼格伦·阿恩		
申请(专利权)人(译)	Fuoshiyuguren, 阿恩		
当前申请(专利权)人(译)	Fuoshiyuguren, 阿恩		
[标]发明人	フオシユグレンアルネ リエスベツククリステイアン ヤンソンホーカン		
发明人	フオシユグレン,アルネ リエスベツク,クリステイアン ヤンソン,ホーカン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C07K16/12 C07K19/00 C07K1/22 C12P21/02 G01N33/53 A61K35/14 A61K39/00 A61P37/06 C07K14/21 C12N15/31		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/00 C07K14/212 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.103 C12N7/00 C07K16/12 C07K19/00 C07K1/22 C12P21/02.C G01N33/53.N		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	0102410 2001-07-04 SE		
其他公开文献	JP2005500837A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种表面暴露的蛋白质，其可以在卡他莫拉氏菌中检测到，具有如SEQ ID NO：1所述的氨基酸序列，表观分子量为200kDa，并且具有选择性结合膜结合或可溶性IgD的能力。所述表面暴露蛋白的免疫原性或IgD结合片段，以及所述表面暴露蛋白的免疫原性和粘附性片段。还描述了DNA片段，疫苗，质粒和噬菌体，非人宿主，重组DNA分子和植物，融合蛋白和多肽以及融合产物。还公开了一种检测IgD的方法，一种分离IgD的方法，一种分离卡他莫拉氏菌的表面暴露蛋白的方法以及一种用于治疗自身免疫疾病的方法。

本研究で使用了細菌株及びプラスミド

細菌株または プラスミド	詳細 (単離場所)	文献またはソース
細胞株		
DH5α	大腸菌	Novagen
BL21DE3	大腸菌	Novagen
BBH17	モクセラ・カタール (痰)	Christensen(デノンマーク)
Bc5	モクセラ・カタール (鼻咽頭)	臨床微生物部 (スウェーデン, マルメ)
NCTC 4103	モクセラ・カタール (鼻咽頭)	CCUG (スウェーデン, ヨーゼンホルム)
RH1	モクセラ・カタール(血液)	Christensen(デノンマーク)
RH4	モクセラ・カタール(血液)	Christensen(デノンマーク)
プラスミド		
pET16(b)	発現ベクター	Novagen
pET16-MID	midのORFを有するPET16(b)	本研究