

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 169787

(P2001 - 169787A)

(43)公開日 平成13年6月26日(2001.6.26)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 39/106	
A 6 1 K 38/00			48/00	
		39/106	A 6 1 P 31/04	171
		48/00	C 0 7 K 14/205	
A 6 1 P 31/04	171		16/12	

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 67数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 320736(P2000 - 320736)

(22)出願日 平成12年10月20日(2000.10.20)

(31)優先権主張番号 60/160922

(32)優先日 平成11年10月22日(1999.10.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 イヴレット・リー・ロージー

アメリカ合衆国コネチカット州06340,グロ

トン,イースタン・ポイント・ロード,ファ

イザー・セントラル・リサーチ

(74)代理人 100089705

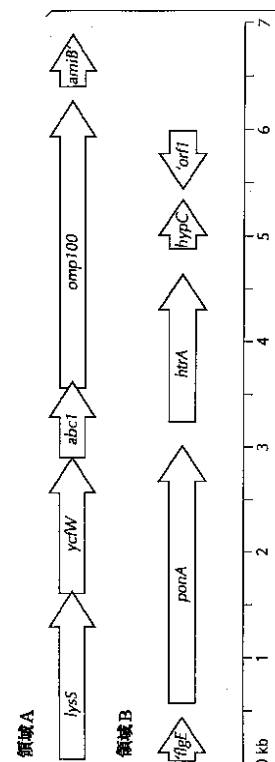
弁理士 社本 一夫 (外5名)

(54)【発明の名称】 ローソニア・イントラセルラリスタンパク質、および関連の方法および材料

(57)【要約】

【課題】 ローソニア・イントラセルラリスタンパク質、および関連の方法および材料を提供すること。

【解決手段】 単離されたポリペプチド分子は、L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列、その配列の実質的な部分または相同配列を含む。関連ポリペプチド、免疫原性組成物および検定法を記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリヌクレオチド分子であって、

(a) L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列；

(b) 該L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしている該ヌクレオチド配列の実質的な部分であるヌクレオチド配列；および

(c) (a)または(b)のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む上記単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項2】 前記L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしている前記ヌクレオチド配列を含む請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項3】 約nt165～約nt1745の配列番号：1の読み取り枠、約nt3031～約nt3738の配列番号：1の読み取り枠、約nt3695～約nt6385の配列番号：1の読み取り枠、約nt252～約nt2690の配列番号：2の読み取り枠、約nt2891～約nt4315の配列番号：2の読み取り枠、および約nt4581～約nt4829の配列番号：2の読み取り枠から成る群より選択される読み取り枠から成るヌクレオチド配列を含む請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項4】 プロモーター活性を有する且つ約nt2691～約nt2890の配列番号：2内で見出される20ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子またはその補体。

【請求項5】 請求項1に記載のポリヌクレオチド分子を含む組換え体ベクター。

【請求項6】 ponA遺伝子を含有するプラスミドpER432(ATCC受託番号PTA-635)、htrA遺伝子を含有するプラスミドpER434(ATCC受託番号PTA-636)、hypC遺伝子を含有するプラスミドpER436(ATCC受託番号PTA-637)、lysSおよびycfW遺伝子を含有するプラスミドpT068(ATCC受託番号PTA-2232)、ycfWおよびabc1遺伝子を含有するプラスミドpER438(ATCC受託番号PTA-638)、およびOmp100遺伝子を含有するプラスミドpER440(ATCC受託番号PTA-639)から成る群より選択されるプラスミドから成る請求項5に記載の組換え体ベクター。

【請求項7】 請求項5に記載の組換え体ベクターを含む形質転換された宿主細胞。

【請求項8】 請求項7に記載の形質転換された宿主細胞によって生産されるポリペプチド。

【請求項9】 ローソニア遺伝子を変化させるのに用いることができるポリヌクレオチド分子を含む遺伝子構築物であって、(a) htrA、ponA、hypC、lysS、ycfW、abc1またはomp100遺伝子のヌクレオチド配列と他の点では同様である、またはそれに相同のヌクレオチド配列と他の点では同様であるヌクレオチド配列、または該ヌクレオチド配列の実質的な部分を含むが、そのヌクレオチド配列が、該htrA、ponA、hypC、lysS、ycfW、abc1またはomp100遺伝子を変化させうる一つまたはそれ以上の突然変異を更に含むポリヌクレオチド分子；または(b) 該htrA、ponA、hypC、lysS、ycfW、abc1またはomp100遺伝子のORFにその場(in situ)で自然に隣接しているヌクレオチド配列、または該隣接する配列に相同のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み；(a)または(b)の遺伝子構築物を用いたローソニア細胞の形質転換が、該htrA、ponA、hypC、lysS、ycfW、abc1またはomp100遺伝子を変化させるようにある上記遺伝子構築物。

【請求項10】 請求項9に記載の遺伝子構築物を含む形質転換された細胞。

【請求項11】 単離されたポリペプチドであって、(a) L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質；

(b) 該L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c) 該L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質の実質的な部分、または該L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有する該ポリペプチドの実質的な部分から成るポリペプチド；

(d) 別のタンパク質またはポリペプチドに融合した(a)、(b)または(c)のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質；および(e) (a)、(b)、(c)または(d)のタンパク質またはポリペプチドの類似体または誘導体から成る群より選択される該ポリペプチド。

【請求項12】 前記L・イントラセルラリスタンパク質が、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8および配列番号：102から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する請求項11に記載の単離された

ポリペプチド。

【請求項13】 挿入された、欠失したまたは置換された1～10個のアミノ酸を有する、それらの組合せを含めた前記L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質から成るポリペプチドを含む請求項11に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項14】 抗ローソニア抗体と特異的に反応性であるHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のエピトープを含む実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項15】 請求項1に記載のポリヌクレオチド分子によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項16】 L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質と特異的に反応する単離された抗体。

【請求項17】 請求項10に記載の形質転換された細胞を含む弱毒化生ワクチン。

【請求項18】 請求項10に記載の形質転換された細胞を死滅した形で含む死菌ワクチン。

【請求項19】 請求項11に記載のポリペプチドの免疫学的有効量を薬学的に許容しうる担体との組合せで含む免疫原性組成物。

【請求項20】 請求項11に記載のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子の免疫学的有効量を薬学的に許容しうる担体との組合せで含む免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ローソニア・イントラセルラリス(Lawsonia intracellularis)に由来するタンパク質に関し、関連のタンパク質、核酸および免疫原性組成物を包含する。それら免疫原性組成物は、ブタなどの感受性動物のL・イントラセルラリス感染の予防において特に有用である。それらタンパク質、フラグメントおよび核酸も、診断薬として用いることができる。

【0002】

【従来の技術】商業的に飼育されているブタは、ブタ繁殖性腸症(PPE)と集合的に称される広範囲の腸疾患または症候群に感受性である。これら疾患には、腸腺腫複合症(Barker I.K. ら, 1985, "Pathology of Domestic Animals," 第3版, 2巻, 1-237頁中, K.V.F. Jobbら監修(Academic Press: オランダ))、ブタ腸腺腫症(PIA)、壊死性腸炎(Rowland A.C. ら, 1976, Veterinary Record 97:178-180)、繁殖性出血性腸症(Love, R.J. ら, 1977, Veterinary Record 100:47

3)、限局性回腸炎(Jonsson, L. ら, 1976, Acta Veter 50

inaria Scandinavica 17:223-232)、出血性腸症候群(O'Neil, I.P.A., 1970, Veterinary Record 87:742-747)、ブタ繁殖性腸炎およびカンピロバクター(Campylobacter)種によって起こる腸炎(Straw, B.E., 1990, Journal of American Veterinary Medical Association 197:355-357)が含まれる。

【0003】PPEの一つの主な種類は、非出血性であり、ブタ腸腺腫症(PIA)によって現れる。この型のPPEは、しばしば、成長遅滞および軽い下痢を引き起こす。もう一つ重要な種類のPPEは、出血性である。それは、致死性であることが多く、繁殖性出血性腸症(PHE)によって現れ、その場合、遠位小腸内腔は、充血した状態になる。

【0004】ブタのPPEは、商業的に最も重要であるが、PPEは、ハムスター(Stills, H.F., 1991, Infection and Immunology 59:3227-3236)、フェレット(Foxら, 1989, Veterinary Pathology 26:515-517)、モルモット(Elwellら, 1981, Veterinary Pathology 18:136-139)、ウサギ(Schodebら, 1990, Veterinary Pathology 27:73-80)および若干の鳥類(Masonら, 1998)の飼育においても問題である。

【0005】PPEを引き起こす微生物は、カンピロバクター様細菌“L・イントラセルラリス”である(McOrist Sら, 1995, International Journal of Systematic Bacteriology 45:820-825)。この微生物は、回腸共生生物イントラセルラリスとしても知られている(Stills, 1991, 上記)。ブタのPPE様疾患は、カンピロバクターの他の種によって引き起こされることもありうる(Gebhartら, 1983, American Journal of Veterinary Research 44:361-367)。

【0006】L・イントラセルラリスは、感染した動物の絨毛の細胞質中および腸陰窩細胞中で認められ、そこで、構造的不規則および腸細胞増殖を引き起こす。絨毛および腸陰窩のような膿瘍形態は、分岐した状態になり且つ炎症性細胞で満たされる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】現行のPPE制御は、抗細菌化合物の使用に頼っている。しかしながら、L・イントラセルラリス感染を制御するそれに代わる手段が要求される。

【0008】国際特許出願第PCT/AU96/00767号には、ワクチンとして有用であるL・イントラセルラリスのポリペプチドおよび免疫原性組成物が記載されている。しかしながら、L・イントラセルラリス感染への抵抗性を与える更に別の組成物が要求される。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、単離されたポリヌクレオチド分子であって、

(a) L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp

100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列；
 (b)そのL・イントラセルラリスHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の実質的な部分であるヌクレオチド配列；および
 (c)(a)または(b)のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む上記単離されたポリヌクレオチド分子に関する。

【0010】もう一つの態様において、本発明は、これらポリヌクレオチド分子を含む組換え体ベクターに
 10 関し、その組換え体ベクターの発現が、上記のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質またはポリペプチドに融合した担体または融合パートナーを含む融合タンパク質を生じるような担体または融合パートナーをコードしているものが含まれる。本発明は、これら組換え体ベクターを含む形質転換された宿主細胞およびこのような形質転換された宿主細胞によって生産されるポリペプチドも包含する。

【0011】もう一つの態様において、本発明は、単離
 20 されたポリペプチドであって、

(a)L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質；

(b)そのL・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c)そのL・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質の実質的な部分、またはそのL・
 30 イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチドの実質的な部分から成るポリペプチド；

(d)別のタンパク質またはポリペプチドに融合した(a)、(b)または(c)のタンパク質またはポリペ
 プチドを含む融合タンパク質；および

(e)(a)、(b)、(c)または(d)のタンパク質またはポリペプチドの類似体または誘導体から成る群
 40 より選択される上記単離されたポリペプチドに関する。

【0012】本発明は、更に、プロモーター活性を有する且つ約nt2691～約nt2890の配列番号：2内で見出される20ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0013】本発明は、更に、これらポリペプチドのいずれかを製造する方法であって、組換え体発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞を培養し、その細胞培養から発現されたポリペプチドを回収することを含む上記方法に関する。そのベクターは、ポリペプチドのい
 50

れかをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み、そのヌクレオチド配列は、一つまたはそれ以上の調節因子と機能的に結合している。培養は、ポリペプチドの発現を導きうる条件下で行われる。

【0014】なおもう一つの態様において、本発明は、上記のL・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質またはポリペプチドのいずれかと特異的に反応する単離された抗体に関する。

【0015】本発明はまた、本発明のタンパク質、ポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチドの免疫学的有効量を薬学的に許容しうる担体との組合せで含む免疫感作用組成物に関する。本発明は、L・イントラセルラリス感染に対してPPE感受性動物を免疫感作する方法であって、その動物に免疫感作用組成物を投与することを含む上記方法を包含する。

【0016】本発明はまた、L・イントラセルラリスによって引き起こされるまたは悪化する疾患状態に対してPPE感受性動物を免疫感作するためのキットであって、上記のタンパク質、ポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチドの内1種類の免疫学的有効量が中に入っている容器を含む上記キットに関する。本発明はまた、L・イントラセルラリス、L・イントラセルラリス特異的なアミノ酸またはヌクレオチド配列、または抗L・イントラセルラリス抗体の存在を検出するためのキットであって、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体が中に入っている容器を含む上記キットに関する。

【0017】発明の詳細な記述

本明細書中に引用される特許、特許出願および公報は全て、本明細書中にそのまま援用される。

【0018】ポリヌクレオチド分子

本発明の単離されたポリヌクレオチド分子は、ローソニアのいずれの種または菌株にも由来するヌクレオチド配列を有することができるが、好ましくは、イントラセルラリス種に由来する。本発明を実施するのに用いるための病原性ローソニア菌株または種は、下記の単離技術を用いて、感染した動物の器官、組織または体液から単離することができる。

【0019】本明細書中で用いられるように、“ポリヌクレオチド分子”、“ポリヌクレオチド配列”、“コーディング配列”、“読み取り枠(ORF)”等の用語は、DNAおよびRNA分子双方を示すためのものであり、それは一本鎖かまたは二本鎖でありうるし、しかも、1種類またはそれ以上の原核性配列、cDNA配列、エクソンおよびイントロンを含めたゲノムDNA配列、および化学合成されたDNAおよびRNA配列、並びにセンス鎖および対応するアンチセンス鎖双方を含むことがありうる。本明細書中で用いられるように、“ORF”という用語は、終止コドンを含く介在させること

なく、ローソニアHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードするのに必要な最小限のヌクレオチド配列を意味する。

【0020】本明細書中に開示されるポリヌクレオチド分子およびオリゴヌクレオチド分子の製造および操作は、当該技術の範囲内であり、特に、Maniatisら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールド・スプリング・ハーバー, NY; Ausubelら、1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrookら、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールド・スプリング・ハーバー, NY; Innisら(監修), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., サン・ディエゴ; および Erlich(監修), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, ニューヨーク並びにこれら文献の全改訂版に記載の組換え技術によって行うことができる。

【0021】配列番号: 1および2に示されるヌクレオチド配列並びにそれらの実施的な部分の本明細書中での意味は、Central Research, イースタン・ポイント・ロード, グロートン, CTのPfizer Inc. によって、American Type Culture Collection, 12301 パークローン・ドライブ, ロックビル, MD, 20852に寄託された大腸菌(E.coli) Top10細胞中に含有される次のプラスミド中に存在するような該当するヌクレオチド配列およびそれらの実質的な部分をそれぞれ示すためのものでもある。

【0022】ponA遺伝子を含有する、ATCC受託番号PTA-635として1999年9月9日に寄託されたpER432; htrA遺伝子を含有する、ATCC受託番号PTA-636として1999年9月9日に寄託されたpER434; hypC遺伝子を含有する、ATCC受託番号PTA-637として1999年9月9日に寄託されたpER436; ycfWおよびabc1遺伝子を含有する、ATCC受託番号PTA-638として1999年9月9日に寄託されたpER438; Omp100遺伝子を含有する、ATCC受託番号PTA-639として1999年9月9日に寄託されたpER440; およびlysSおよびycfW遺伝子を含有する、ATCC受託番号PTA-2232として2000年7月14日に寄託されたpT068。

【0023】更に、配列番号: 3~9および配列番号: 102に示されるアミノ酸配列並びにそれらの実施的な部分およびペプチドフラグメントの本明細書中での意味は、特に断らない限り、上に挙げたプラスミド中に存在するヌクレオチド配列をコードしている該当するタンパク質によってコードされている該当するアミノ酸配列並

びにそれらの実施的な部分およびペプチドフラグメントをそれぞれ示すためのものでもある。

【0024】HtrA関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L・イントラセルラリス由来のHtrAタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのHtrAタンパク質は、配列番号: 7のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のHtrAをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、htrA遺伝子の読み取り枠(ORF)のヌクレオチド配列である約nt2891~約nt4315の配列番号: 2のヌクレオチド配列、およびプラスミドpER434(ATCC受託番号PTA-636)のHtrAをコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0025】本発明は、更に、本発明のHtrAをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。HtrA関連ポリヌクレオチド分子を論及するのに用いられる場合の“相同”という用語は、(a)本発明の前述のHtrAをコードしているポリヌクレオチド分子の一つと同様のタンパク質をコードしている; または(b)L・イントラセルラリスHtrAタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、少なくとも中程度のストリンジェントな条件下において、すなわち、0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中において65 でフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーションおよび0.2xSSC/0.1%SDS中において42 で洗浄すること(Ausubelら(監修), 1989, Current Protocols In Molecular Biology, 1巻, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. ニューヨーク, 2.10.3頁を参照されたい)においてハイブリッド形成する、しかも本発明の実施において有用であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を意味する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリスHtrAタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下において、すなわち、0.5M NaHPO₄、7%SDS、1mM EDTA中において65 でフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーションおよび0.1xSSC/0.1%SDS中において68 で洗浄すること(Ausubelら、1989, 上記)においてハイブリッド形成し、しかも本発明の実施において有用である。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約nt2891

~約nt4315である配列番号：2のHtrAをコードしているORFから成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。上記のように、本明細書中の相同ポリヌクレオチド分子の意味は、このような分子の補体を示すためのものでもある。

【0026】本明細書中で用いられるように、ポリヌクレオチド分子は、そのポリヌクレオチド分子を、ポリメラーゼ連鎖反応のような標準的な増幅技術を用いてローソニア特異的ポリヌクレオチド分子を増幅させるのに用いることができる、またはローソニアに感染した動物由来の体液若しくは組織試料中のローソニア特異的ポリヌクレオチドの存在を検出する診断薬として用いることができる場合、またはそのポリヌクレオチド分子が、下記のように本発明の実施において有用であるポリペプチドをコードしている場合、“本発明の実施において有用”である。

【0027】本発明のHtrAをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、大腸菌、ネズミチフス菌 (*S.typhimurium*)、*C.ジジュニ* (*jejuni*)、インフルエンザ菌 (*H.influenzae*)、マルタ熱菌 (*B.melitensis*)、ウシ流産菌 (*B.abortus*)、トラコーマクラミジア (*C.trachomatis*)、エルジニア・エンテロコリチカ (*Y.enterocolitia*)、リケッチア属 (*Rickettsia*)、*B.ブルグドルフェリ* (*burgdorferi*) および枯草菌 (*B.subtilis*) などの細菌から記載されてきたポリヌクレオチド分子が含まれない。配列番号：2によってコードされるL・イントラセルラリスHtrAタンパク質は、*B.アポルタス*HtrAタンパク質と39.6%のアミノ酸配列同一性を有する。そのL・イントラセルラリスタンパク質は474残基長さであるが、*B.アポルタス*タンパク質は513残基長さである。L・イントラセルラリスタンパク質は、インフルエンザ菌のそれと35.4%一致する。

【0028】本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt2891~約nt4315である配列番号：2の分子との50%を超える、より好ましくは、約90%を超える、なおより好ましくは、約95%を超える、そして最も好ましくは、約99%を超える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLASTNアルゴリズム (GenBank, National Center for Biotechnology Information) の使用によって決定される。

【0029】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスHtrAタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を超える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリスタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの70%を越

え、もう一つの実施態様において、その配列は90%を越え、そしてもう一つの実施態様においては、約98%を超える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスHtrAタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0030】なおもう一つの実施態様において、L・イントラセルラリスHtrAタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、約nt2891~約nt4315である配列番号：2の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1~50個、より好ましくは、1~25個、そして最も好ましくは、1~5個のヌクレオチドを有する。

【0031】本発明は、更に、L・イントラセルラリスHtrAタンパク質と相同であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。L・イントラセルラリスHtrAタンパク質と相同であるポリペプチドを論及するのに本明細書中で用いられるように、“相同”という用語は、他の点ではL・イントラセルラリスHtrAタンパク質のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるが、得られたポリペプチドが本発明の実施において有用である限りにおいて、その1個またはそれ以上のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換されているポリペプチドを意味する。保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において周知である。このような置換を行う規則には、特に、Dahof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., ワシントン, D.C., 5巻, 補遺3によって記載されたものが含まれる。より具体的には、保存的アミノ酸置換は、側鎖の酸性度、極性または嵩高性に関するアミノ酸ファミリー内で一般的に起こるものである。遺伝子にコードされるアミノ酸は、概して、(1) 酸性 = アスパラギン酸、グルタミン酸; (2) 塩基性 = リシン、アルギニン、ヒスチジン; (3) 非極性 = アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン; および (4) 非荷電極性 = グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニンおよびチロシンの4群に分けられる。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは一緒に、芳香族アミノ酸としても分類される。いずれか特定の基内の1個またはそれ以上の置換、例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンで、またはアスパラギン酸をグルタミン酸で、またはトレオニンをセリンで、または任意の他のアミノ酸残基を構造的に関連したアミノ酸残基、例えば、側鎖の同様の酸性度、極性、嵩高性またはそれらのいくつかの組合せの類似性を有するアミノ酸残基での置換は、概して、そのポリペプチドの機能または免疫原性に有意的作用を有するであろう。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：7と少なくとも約50%、より好ましくは、少なく

とも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0032】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1~10個、より好ましくは、1~5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスHtrAタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：7のHtrA配列の代わりに保存的に置換された1~5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0033】本明細書中で用いられるように、ポリペプチドは、ローソニアに免疫応答を示した動物からの血液、血清または他の体液試料中のローソニア特異的抗体の存在を検出する診断試薬としてそのポリペプチドを用いることができる場合、“本発明の実施において有用”である。そのポリペプチドはまた、それをを用いてローソニアに対する動物の免疫応答を引き起こすことができるならば有用である。

【0034】本発明は、更に、本発明の前述のローソニアHtrA関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的な部分から成るポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書中で用いられるように、HtrA関連ポリヌクレオチド分子の“実質的な部分”とは、HtrA関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列より少ないものから成るが、HtrA関連ポリヌクレオチド分子の少なくとも5%、より好ましくは、少なくとも約10%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約20%、そして最も好ましくは、少なくとも約50%のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を意味し、それは本発明の実施において有用である。このようなポリヌクレオチド分子には、例えば、HtrAタンパクのペプチドフラグメントをコードしているポリヌクレオチド分子が含まれる。

【0035】前述のHtrA関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にHtrA ORFに隣接するものまたはL・イントラセルラリスのその場(in situ)の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、約nt2691~約nt2890および約nt4316~約nt4580の配列番号：2に示されるヌクレオチド配列またはそれらの実質的な部分を含む。

【0036】PonA関連ポリヌクレオチド分子
本発明は、L・イントラセルラリス由来のPonAタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのPonAタンパク質は、配列番号：6のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様におい

て、本発明のPonAをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約nt252~約nt2690の配列番号：2のヌクレオチド配列(PonA遺伝子の読み取り枠(ORF)のヌクレオチド配列)、およびプラスミドpER432(ATCC受託番号PTA-635)のPonAをコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0037】本発明は、相同という用語がHtrA関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のPonAをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリスPonAタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約nt252~約nt2690の配列番号：2のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0038】本発明のPonAをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、ナイセリア・フラベセンス(*Neisseria flavescens*)、淋菌(*N.gonorrhoeae*)および髄膜炎菌(*N.meningitidis*)のPonAタンパク質をコードしている既知のポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0039】本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt252~約nt2690である配列番号：2の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより好ましくは、約95%を越える、そして最も好ましくは、約99%を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLASTNアルゴリズム(GenBank, National Center for Biotechnology Information)の使用によって決定される。

【0040】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスPonAタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリスタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を越え、もう一つの実施態様においては約98%を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスPonAタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0041】なおもう一つの実施態様において、L・イ

ントラセルラリスPonAタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：2の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～50個、より好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0042】本発明は、更に、相同という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、L・イントラセルラリスPonAタンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：6と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも約95%の配列同一性を有する。

【0043】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスPonAタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：6のPonA配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0044】本発明は、更に、実質的な部分という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアPonA関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0045】前述のPonA関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にponA ORFに隣接するものまたはL・イントラセルラリスのその場(in situ)の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、約nt126～約nt251および約nt2691～約nt2890の配列番号：2に示されるヌクレオチド配列またはそれらの実質的な部分を含む。

【0046】HypC関連ポリヌクレオチド分子
本発明は、L・イントラセルラリス由来のHypCタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのHypCタンパク質は、配列番号：8のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のHypCをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約nt4581～約nt4829の配列番号：2のヌクレオチド配列、およびプラスミドpER436(ATCC受託番号PTA-637)のHypCをコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0047】本発明は、相同という用語がHtrA関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のHypCをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリスHypCタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約nt4581～約nt4829の配列番号：2のORFから成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0048】本発明のHypCをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、デスルフォビブリオ・ギガス(Desulfovibrio gigas)およびリゾビウム・レグミノサルム(Rizobium leguminosarum)のHypCまたはHypDタンパク質をコードしているポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0049】本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt4581～約nt4829である配列番号：2の分子との50%を超える、より好ましくは、約90%を超える、なおより好ましくは、約95%を超える、そして最も好ましくは、約99%を超える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLASTNアルゴリズム(GenBank, National Center for Biotechnology Information)の使用によって決定される。

【0050】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスHypCタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を超える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリスHypCタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を超え、もう一つの実施態様においては約98%を超える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスHypCタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0051】なおもう一つの実施態様において、L・イントラセルラリスHypCタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：2の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～50個、より好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0052】本発明は、更に、相同という用語がHtr

Aタンパクに関して上に相応して記載されているように、L・イントラセルラリスHypCタンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：8と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも約95%の配列同一性を有する。

【0053】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1~10個、より好ましくは、1~5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスHypCタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：8のHypC配列の代わりに保存的に置換された1~5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0054】本発明は、更に、実質的な部分という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアHypC関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0055】前述のHypC関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にhypC ORFに隣接するものまたはL・イントラセルラリスのその場(in situ)の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、約nt4316~約nt4580および約nt4380~約nt4911の配列番号：2に示されるヌクレオチド配列またはそれらの実質的な部分を含む。

【0056】LysS関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L・イントラセルラリス由来のLysSタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのLysSタンパク質は、配列番号：102のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のLysSをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、lysS遺伝子のヌクレオチド配列の約nt165~約nt1745の配列番号：1のヌクレオチド配列、およびプラスミドpT068(ATCC受託番号PTA-2232)のLysSをコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0057】本発明は、相同という用語がHtrA関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のLysSをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分

子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリスLysSタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジントな条件下において、約nt165~約nt1745の配列番号：1のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0058】本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt165~約nt1745の配列番号：1の分子との50%を越える、より好ましくは、約90%を越える、なおより好ましくは、約95%を越える、そして最も好ましくは、約99%を越える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLAST Nアルゴリズム(GenBank, National Center for Biotechnology Information)の使用によって決定される。

【0059】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスLysSタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリスLysSタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を越え、もう一つの実施態様においては約98%を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスLysSタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0060】なおもう一つの実施態様において、L・イントラセルラリスLysSタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：1の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1~50個、より好ましくは、1~25個、そして最も好ましくは、1~5個のヌクレオチドを有する。

【0061】本発明は、更に、相同という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、L・イントラセルラリスLysSタンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：102と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも約95%の配列同一性を有する。

【0062】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1~10個、より好ましくは、1~5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスLysSタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコー

ドしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：102のLysS配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0063】本発明は、更に、実質的な部分という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアLysS関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0064】前述のLysS関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にLysS ORFに隣接するものまたはL・イントラセルラリスの現場の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができる。

【0065】YcfW関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L・イントラセルラリス由来のYcfWタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのYcfWタンパク質は、配列番号：30のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のYcfWをコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、YcfW遺伝子のヌクレオチド配列の約nt1745～約nt3028の配列番号：1のヌクレオチド配列、およびプラスミドpER438(ATCC受託番号PTA-638)とpT068(ATCC受託番号PTA-2232)のYcfWをコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0066】本発明は、相同という用語がHtrA関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のYcfWをコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリスYcfWタンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約nt1745～約nt3028の配列番号：1のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0067】本発明の分子の相同ヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt1745～約nt3028の配列番号：1の分子との50%を超える、より好ましくは、約90%を超える、なおより好ましくは、約95%を超える、そして最も好ましくは、約99%を超える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLAST

Nアルゴリズム(GenBank, National Center for Biotechnology Information)の使用によって決定される。

【0068】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスYcfWタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を超える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリスYcfWタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90%を超え、もう一つの実施態様においては約98%を超える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスYcfWタンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0069】なおもう一つの実施態様において、L・イントラセルラリスYcfWタンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：1の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～50個、より好ましくは、1～25個、そして最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する。

【0070】本発明は、更に、相同という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、L・イントラセルラリスYcfWタンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：3と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0071】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスYcfWタンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：3のYcfW配列の代わりに保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0072】本発明は、更に、実質的な部分という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアYcfW関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0073】前述のYcfW関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にycfW ORFに隣接するものまたはL・イントラセルラリスのその場(in situ)の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができる。

【0074】ABC1関連ポリヌクレオチド分子

本発明は、L・イントラセルラリス由来のABC1タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのABC1タンパク質は、配列番号：4のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のABC1をコードしている単離されたポリヌクレオチド分子は、約nt3031~約nt3738の配列番号：1のヌクレオチド配列(ABC1遺伝子の読み取り枠(ORF)のヌクレオチド配列)、およびプラスミドpER438(ATCC受託番号PTA-638)のABC1をコードしているORFのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0075】本発明は、相同という用語がHtrA関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明のABC1をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリスABC1タンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約nt3031~約nt3738である配列番号：1のORFから成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0076】本発明のABC1をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、ナイセリア・フラベセンス、淋菌および髄膜炎菌のABC1タンパク質をコードしているポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0077】本発明の分子のヌクレオチド配列は、好ましくは、約nt3031~約nt3738の配列番号：1の分子との50%を超える、より好ましくは、約90%を超える、なおより好ましくは、約95%を超える、そして最も好ましくは、約99%を超える配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性は、BLASTNアルゴリズム(GenBank, National Center for Biotechnology Information)の使用によって決定される。

【0078】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスABC1タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約50%を超える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリスABC1タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの90

%を超え、もう一つの実施態様においては約98%を超える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリスABC1タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0079】なおもう一つの実施態様において、L・イントラセルラリスABC1タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：1の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1~50個、より好ましくは、1~25個、そして最も好ましくは、1~5個のヌクレオチドを有する。

【0080】本発明は、更に、相同という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、L・イントラセルラリスABC1タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：1と少なくとも約50%、より好ましくは、少なくとも約70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0081】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1~10個、より好ましくは、1~5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスABC1タンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：4のABC1配列の代わりに保存的に置換された1~5個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0082】本発明は、更に、実質的な部分という用語がHtrAタンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニアABC1関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0083】前述のABC1関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然にabc1 ORFに隣接するものまたはL・イントラセルラリスのその場(in situ)の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、配列番号：1に示される隣接するヌクレオチド配列を含む。

【0084】Omp100関連ポリヌクレオチド分子
本発明は、L・イントラセルラリス由来のOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、そのOmp100タンパク質は、配列番号：5のアミノ酸配列を有する。更に好ましい実施態様において、本発明のOmp100をコードしている単

離されたポリヌクレオチド分子は、約 nt 3695 ~ 約 nt 6385 の配列番号：1 のヌクレオチド配列 (Omp 100 遺伝子の読み取り枠 (ORF) のヌクレオチド配列)、およびプラスミド pER440 (ATCC 受託番号 PTA-639) の Omp 100 をコードしている ORF のヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0085】本発明は、相同という用語が HtrA 関連ポリヌクレオチド分子に関して上に相応して定義されているように、本発明の Omp 100 をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に“相同”であるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド分子を更に提供する。好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体に、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する。より好ましい実施態様において、その相同ポリヌクレオチド分子は、高ストリンジェントな条件下において、約 nt 3695 ~ 約 nt 6385 である配列番号：1 の ORF から成る群より選択されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリッド形成する。

【0086】本発明の Omp 100 をコードしているポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列に相同であるヌクレオチド配列を有する本発明のポリヌクレオチド分子には、GenBank データベースに挙げられる次のタンパク質、大腸菌の YaeT (Accn. U70214 または AE000127)；フレクスナー赤痢菌 (Shigella flexneri) の Oma90 (Accn. AF120927)；髄膜炎菌の Omp85 (Accn. AF021245)；インフルエンザ菌 (D15) の D15 (Accn. U60834)；パストツレラ・マルトシダ (Pasteurella multocida) の Oma87 (Accn. U60439) のいずれかをコードしているポリヌクレオチド分子が含まれない。

【0087】本発明の分子のヌクレオチド配列は、好ましくは、約 nt 3695 ~ 約 nt 6385 の配列番号：1 の分子との 50% を越える、より好ましくは、約 90% を越える、なおより好ましくは、約 95% を越える、そして最も好ましくは、約 99% を越える配列同一性を有する相同配列を含み、その配列同一性は、BLAST N アルゴリズム (GenBank, National Center for Biotechnology Information) の使用によって決定される。

【0088】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さの約 50% を越える相同配列を有する。もう一つの実施態様において、その配列は、L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の長さ

の 90% を越え、もう一つの実施態様においては約 98% を越える。なおもう一つの実施態様において、相同配列を有する単離されたポリヌクレオチドは、L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質をコードしている配列と長さが等しい。

【0089】なおもう一つの実施態様において、L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質をコードしている配列と相同であるヌクレオチド配列は、配列番号：5 の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された 1 ~ 50 個、より好ましくは、1 ~ 25 個、そして最も好ましくは、1 ~ 5 個のヌクレオチドを有する。

【0090】本発明は、更に、相同という用語が HtrA タンパクに関して上に相応して記載されているように、L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質と“相同”であるポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい実施態様において、相同ポリペプチドは、配列番号：5 と少なくとも約 50%、より好ましくは、少なくとも約 70%、そしてなおより好ましくは、少なくとも約 90% の配列同一性、そして最も好ましくは、少なくとも約 95% の配列同一性を有する。

【0091】もう一つの実施態様において、ポリヌクレオチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた 1 ~ 10 個、より好ましくは、1 ~ 5 個のアミノ酸を有する L・イントラセルラリス Omp 100 タンパク質から成る単離されたポリペプチドをコードしている。この実施態様のより具体的な例において、そのポリヌクレオチドは、配列番号：5 の Omp 100 配列の代わりに保存的に置換された 1 ~ 5 個のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドをコードしている。

【0092】本発明は、更に、実質的な部分という用語が HtrA タンパクに関して上に相応して記載されているように、本発明の前述のローソニア Omp 100 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの“実質的な部分”から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0093】前述の Omp 100 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかのヌクレオチド配列に加えて、本発明のポリヌクレオチド分子は、自然に omp 100 ORF に隣接するものまたは L・イントラセルラリスの現場の遺伝子より選択されるヌクレオチド配列を更に含むことができる、或いは、から成ることができ、配列番号：1 に示される隣接するヌクレオチド配列を含む。

【0094】プロモーター配列
本発明は、プロモーター活性を有する且つ約 nt 2691 ~ 約 nt 2890 の配列番号：2 内で見出される 20 ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子またはその補体にも関する。下記の実施例で更に論じられるように、ローソニア配列のこの領域は、htrA 遺伝子の温度反応性プロモーターを含有す

ることが確認されている。好ましい実施態様において、そのポリヌクレオチドは、約nt 2797～nt 2829の配列を含む。

【0095】本発明は、約nt 2691～約nt 2890の配列番号：2内で見出される20ヌクレオチドを越えるヌクレオチド配列の補体に、中程度のストリンジェントな条件下および、より好ましくは、高ストリンジェントな条件下においてハイブリッド形成する、プロモーター活性を有するオリゴヌクレオチドにも関する。好ましくは、プロモーター活性を有するそのオリゴヌクレオチドは、中程度のストリンジェントな条件下または高ストリンジェントな条件下において、約nt 2797～nt 2829の配列を含むポリヌクレオチドの補体にハイブリッド形成する。もう一つの実施態様において、本発明は、約nt 2691～約nt 2890である配列番号：2の配列に関して、挿入された、欠失したまたは置換された1～25個、最も好ましくは、1～5個のヌクレオチドを有する、プロモーター活性を有するオリゴヌクレオチドを包含する。

【0096】本発明のプロモーター活性を有する機能的配列は、L・イントラセルラリスの宿主細胞中若しくは任意の他のローソニア種の宿主細胞中におけるまたは任意の他の適当な宿主細胞中における本発明の遺伝子のいずれかまたは他の遺伝子若しくはコーディング配列の組換え体発現の制御を含めた種々の目的に有用である。このような他の遺伝子またはコーディング配列は、天然でありうるかまたは組換え体宿主細胞に異種でありうる。そのプロモーター配列は、当該技術分野において知られているような標準的な組換え技術を用いて特定の遺伝子またはコーディング配列に融合させることができるので、そのプロモーター配列は、“機能的結合”が下記に定義されているように、それらと機能的に結合している。プロモーターを用いることにより、組換え体発現系は、例えば、ローソニアまたは他の細菌の遺伝子の発現を調節することができる化合物および転写因子についてスクリーニングするように構築し且つ用いることができる。更に、このようなプロモーター構築物は、ローソニア、大腸菌または他の適当な宿主細胞において異種ポリペプチドを発現させるのに用いることができる。

【0097】オリゴヌクレオチド分子

本発明は、更に、本発明の前述のポリヌクレオチド分子のいずれか一つにハイブリッド形成する、または本発明の前述のポリヌクレオチド分子のいずれか一つの補体であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチド分子を提供する。このようなオリゴヌクレオチド分子は、好ましくは、少なくとも約10ヌクレオチド長さ、より好ましくは、約15～約30ヌクレオチド長さであり、そして高ストリンジェントな条件下において、すなわち、6×SSC/0.5%ピロリン酸ナトリウム中において、約1

4塩基オリゴについては約37で、約17塩基オリゴについては約48で、約20塩基オリゴについては約55で、そして約23塩基オリゴについては約60で洗浄することにおいて前述のポリヌクレオチド分子の一つまたはそれ以上にハイブリッド形成する。本発明のより長いオリゴヌクレオチド分子のための他のハイブリダイゼーション条件は、標準的な技法を用いて当業者が決定することができる。好ましい実施態様において、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、本発明の前述のポリヌクレオチド分子の少なくとも一つの一部に相補的である。

【0098】本発明のオリゴヌクレオチド分子は、例えば、鑑別疾病診断において用いるためのローソニア特異的ポリヌクレオチド分子の増幅におけるプライマーとして、または遺伝子調節において有用なアンチセンス分子として作用させることを含めた種々の目的に有用である。適当に設計されたプライマーは、脳組織、肺組織、腸組織、胎盤組織、血液、脳脊髄液、糞便、粘液、尿、羊水等を含めた動物の組織または体液の試料中のローソニア特異的ポリヌクレオチド分子の存在を検出するのに用いることもできる。オリゴヌクレオチド分子は、ローソニア微生物と特異的に反応するが、これは、概して、十分な長さの配列を用いることによって達成される。特異的増幅産物の生産は、ローソニア感染の診断を支持しうるが、増幅産物の欠如は、感染していないことを示すことができる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅を行う方法は、特に、Innisら(監修), 1995, 上記; および Erlich(監修), 1992, 上記に記載されている。当該技術分野において知られている他の増幅技術、例えば、リガーゼ連鎖反応は、代わりに用いることができる。本明細書中に開示されているポリヌクレオチド分子の配列は、ローソニアの他の種若しくは菌株または他の細菌細胞から相同遺伝子を単離する場合に用いるためのプライマーを設計するのに用いることもできる。

【0099】具体的ではあるが、本発明を実施するのに有用なオリゴヌクレオチド分子の非制限実施態様には、配列番号：10～101から成る群より選択されるオリゴヌクレオチド分子およびそれらの補体が含まれる。

【0100】組換え体発現系

40 クローニングベクターおよび発現ベクター

本発明は、更に、クローニングベクター、発現ベクター、それらベクターのいずれかを含む形質転換された宿主細胞、および新規菌株またはそれらに由来する細胞系を含めた、本発明のポリヌクレオチド分子のいずれかをクローニングするおよび発現させる方法および組成物を包含する。好ましい実施態様において、本発明は、L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を含む組換え体ベクターを提供する。

具体的な実施態様において、本発明は、ponA遺伝子を含有するプラスミドpER432(ATCC受託番号PTA-635)、htrA遺伝子を含有するプラスミドpER434(ATCC受託番号PTA-636)、hypC遺伝子を含有するプラスミドpER436(ATCC受託番号PTA-637)、lysSおよびycfW遺伝子を含有するプラスミドpT068(ATCC受託番号PTA-2232)、ycfWおよびabc1遺伝子を含有するプラスミドpER438(ATCC受託番号PTA-638)、およびOmp100遺伝子を含有するプラスミドpER440(ATCC受託番号PTA-639)を提供する。本発明は、本発明のポリペプチドを得るのに用いられる組換え体ベクターおよび形質転換された細胞も包含する。

【0101】本発明の組換え体ベクター、特に、発現ベクターは、好ましくは、本発明のポリヌクレオチド分子のコーディング配列が、ポリペプチドを生産するためのそのコーディング配列の転写および翻訳に必要な一つまたはそれ以上の調節因子と機能的に結合しているように構築される。本明細書中で用いられるように、“調節因子”という用語には、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、およびポリヌクレオチドコーディング配列の発現を誘導するおよび/または調節するのに役立つ当該技術分野において知られている他の因子をコードするヌクレオチド配列が含まれるが、それらに制限されるわけではない。更に、本明細書中で用いられるように、そのコーディング配列は、一つまたはそれ以上の調節因子と“機能的に結合”して、その場合、それら調節因子は、コーディング配列の転写またはそのmRNAの翻訳を効果的に調節し且つ可能にする。

【0102】適当な調節因子と機能的に結合している特定のコーディング配列を含有する組換え体ベクターを構築する方法は当該技術分野において周知であり、これらを用いて本発明を実施することができる。これら方法には、in vitro 組換え技術、合成技術および in vivo 遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatis ら、1989、上記；Ausubel ら、1989、上記；Sambrook ら、1989、上記；Innis ら、1995、上記；および Erlich、1992、上記に記載された技術を参照されたい。

【0103】特定のコーディング配列を含有する組換え体バクテリオファージDNA、プラスミドDNAおよびコスミドDNA発現ベクターを含めた、本発明のHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100コーディング配列を発現するのに用いることができる種々の発現ベクターは、当該技術分野において知られている。本発明のポリヌクレオチド分子を含有するように遺伝子操作することができる典型的な原核性発現ベクタープラスミドには、特に、pUC8、pUC9、pBR322およびpBR329(Bior

ad Laboratories,リッチモンド,CA)、pPLおよびpKK223(Pharmacia,ピスカタウェイ,NJ)、pQE50(Qiagen,チャツワース,CA)、およびpGEM-T EASY(Promega,マディソン,WI)が含まれる。本発明のポリヌクレオチド分子を含有するように遺伝子操作することができる典型的な真核性発現ベクターには、特に、エクジソン誘導性哺乳動物発現系(Invitrogen,カールズバット,CA)、サイトメガロウイルスプロモーター-エンハンサーに基づく系(Promega,マディソン,WI;Stratagene,ラ・ホヤ,CA;Invitrogen)およびバキュロウイルスに基づく発現系(Promega)が含まれる。

【0104】これらおよび他のベクターの調節因子は、強度および特異性が異なることがありうる。用いられる宿主/ベクター系に依存して、多数の適当な転写因子および翻訳因子のいずれかを用いることができる。例えば、哺乳動物細胞系においてクローニングする場合、哺乳動物細胞のゲノムから単離されるプロモーター、例えば、マウスメタロチオネインプロモーター、またはこれら細胞中で成長するウイルスからの、例えば、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターまたはモロニーマウス肉腫ウイルス長末端反復配列を用いることができる。組換えDNA技術または合成技術によって得られるプロモーターは、挿入される配列を転写させるのに用いることもできる。更に、ある種のプロモーターからの発現は、メタロチオネインプロモーターの特定の誘導物質、例えば、亜鉛イオンおよびカドミウムイオンの存在下において増加することがありうる。転写調節領域すなわちプロモーターの非制限例には、特に、細菌については、galプロモーター、T7プロモーター、TACプロモーター、左右プロモーター、trpおよびlacプロモーター、trp-lac融合プロモーター等；酵母については、ADH-Iおよび-IIプロモーター、GPKプロモーター、PGIプロモーター、TRPプロモーター等のような解糖酵素プロモーター；そして哺乳動物細胞については、SV40初期および後期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーターが含まれる。本発明は、更に、ローソニア、大腸菌または他の適当な宿主において本発明のコーディング配列のいずれかを発現させるのに用いることができる、L-イントラセルラリスのhtrA遺伝子のプロモーターのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0105】特異的開始シグナルは、挿入されるコーディング配列の十分な翻訳にも必要である。これらシグナルには、典型的に、ATG開始コドンおよび隣接した配列が含まれる。それ自体の開始コドンおよび隣接した配列を含めた本発明のポリヌクレオチド分子を適当な発現ベクター中に挿入する場合、追加の翻訳調節シグナルは必要でないことがありうる。しかしながら、コーディング配列の一部だけを挿入する場合、ATG開始コドン

を含めた外因性翻訳調節シグナルを必要とすることがありうる。これら外因性翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、天然および合成両方の様々な源から入手することができる。更に、開始コドンは、インサート全体のインフレーム翻訳を確実にするために、コーディング領域の読み枠と同相でなければならない。

【0106】本発明のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質を発現するであろう発現ベクターも構築することができる。このような融合タンパク質は、例えば、ローソニアタンパク質に対する抗血清を生じさせるために、ローソニアタンパク質の生化学的性状を研究するために、異なった免疫学的または機能的性状を示すローソニアタンパク質を遺伝子操作するために、または組換えによって発現されるローソニアタンパク質の識別若しくは精製を助けるためにまたは安定性を向上させるために用いることができる。可能な融合タンパク質発現ベクターには、*-*ガラクトシダーゼおよび

【0107】融合タンパク質は、発現されるタンパク質の精製を助けるのに有用でありうる。非制限実施態様において、例えば、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100 - マルトース結合融合タンパク質は、アミロース樹脂を用いて精製することができ; HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100 - グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質は、グルタチオン-アガロースビーズを用いて精製することができ; そしてHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100 - ポリヒスチジン融合タンパク質は、二価のニッケル樹脂を用いて精製することができる。或いは、担体タンパク質またはペプチドに対する抗体を、融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製に用いることができる。例えば、単クローン性抗体の標的エピトープをコードするヌクレオチド配列は、発現されるエピトープが本発明のローソニアタンパク質に融合されるように、調節因子と機能的に結合している発現ベクター中に遺伝子操作し且つ配置することができる。非制限実施態様において、親水性マーカープепチドであるFLAGTMエピトープ標識(International Biotechnologies Inc.)をコードするヌクレオチド配列は、HtrA、PonA、HypC、

LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端に相当する地点の発現ベクター中に、標準的な技法によって挿入することができる。次に、発現されるHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質-FLAGTMエピトープ融合産物を、商業的に入手可能な抗FLAGTM抗体を用いて検出し且つアフィニティー精製することができる。

【0108】発現ベクターは、特異的プロテアーゼ切断部位をコードするポリリンカー配列を含有するように遺伝子操作することもできるので、発現されるローソニアタンパク質は、特異的プロテアーゼを用いた処理によって担体領域または融合パートナーから解放されうる。例えば、融合タンパク質ベクターは、特に、トロンピンすなわちXa因子切断部位をコードしているヌクレオチド配列を含むことができる。

【0109】ローソニアコーディング配列と同じ読み枠から上流のおよび中のシグナル配列は、発現されるタンパク質の輸送および分泌を支配するように、既知の方法によって発現ベクター中に遺伝子操作することができる。シグナル配列の非制限例には、特に、因子、免疫グロブリン、外膜タンパク質、ペニシリナーゼおよびT細胞受容体からのものが含まれる。

【0110】本発明の組換え体ベクターを用いて形質転換されるまたはトランスフェクションされる宿主細胞の選択を助けるために、そのベクターは、受容体遺伝子産物または他の選択可能マーカ-のコーディング配列を更に含むように遺伝子操作することができる。このようなコーディング配列は、好ましくは、上記のように調節因子と機能的に結合している。本発明を実施する場合に有用である受容体遺伝子は、当該技術分野において周知であり、特に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、グリーン蛍光タンパク質、ホタルルシフェラーゼおよびヒト成長ホルモンをコードしているものを含む。選択可能マーカ-をコードしているヌクレオチド配列は、当該技術分野において周知であり、抗生物質または抗代謝産物への耐性を与える遺伝子産物をコードするもの、または栄養要求性を与えるものが含まれる。このような配列の例には、特に、チミジンキナーゼ活性、またはメトトレキセート、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、ゼオシン(zeocin)、ピリメタミン、アミノグリコシドまたはハイグロマイシンへの耐性をコードするものが含まれる。

【0111】宿主細胞の形質転換

本発明は、更に、本発明のポリヌクレオチド分子または組換え体ベクターを含む形質転換された宿主細胞、およびそれらに由来する細胞株を提供する。本発明の実施において有用な宿主細胞は、真核性細胞または原核性細胞でありうる。このような形質転換された宿主細胞には、特に、組換え体バクテリオファージDNA、プラスミド

DNAまたはコスミドDNAベクターを用いて形質転換された細菌、または組換え体ベクターを用いて形質転換された酵母のような微生物、または組換え体ウイルスベクター、例えば、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞のような動物細胞、または組換え体ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスまたはワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞が含まれるが、それらに制限されるわけではない。例えば、大腸菌の菌株、例えば、ATCC、ロックビル、MD、米国から（受託番号31343）またはGIBCO BRL、ゲイサーズバーグ、MDから入手可能なDH5 菌株などを用いることができる。真核性宿主細胞には、酵母細胞が含まれるが、哺乳動物、例えば、特に、マウス、ハムスター、乳牛、サルまたはヒトの細胞株からの細胞も有効に用いることができる。本発明の組換え体タンパク質を発現させるのに用いることができる真核性宿主細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、ATCC受託番号CCL-61）、NIHスイスマウス胚細胞NIH/3T3（例えば、ATCC受託番号CRL-1658）およびMadin-Darby ウシ腎（MDBK）細胞（ATCC受託番号CCL-22）が含まれる。トランスフェクションされた細胞は、染色体組込みによってまたはエピソームによって本発明のポリヌクレオチドを発現することができる。

【0112】本発明の組換え体ベクターは、好ましくは、細胞の実質的に均一な培養の1種類またはそれ以上の宿主細胞中に形質転換されるまたはトランスフェクションされる。そのベクターは、概して、既知の技法によって、例えば、特に、プロトプラスト形質転換、リン酸カルシウム沈降、塩化カルシウム処理、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、組換えられたウイルスとの接触によるトランスフェクション、リボソームに媒介されるトランスフェクション、DEAE-デキストラントランスフェクション、形質導入、接合または微量発射衝撃（microprojectile bombardment）などによって宿主細胞中に導入される。形質転換細胞の選択は、組換え体発現ベクターと結合した選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性を発現する細胞について選択することによるなどの標準法によって行うことができる。

【0113】発現ベクターが宿主細胞中に導入されたら、宿主細胞ゲノム中またはエピソームによる本発明のポリヌクレオチド分子の組込みおよび保持は、標準的な技法によって、例えば、サザンハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、逆転写酵素PCR（rt-PCR）を含めたPCR分析、または予想されるタンパク質産物を検出する免疫学的検定によって確認することができる。本発明のポリヌクレオチド分子を含有するおよび/または発現する宿主細胞は、(i) DNA-DNA、DNA-RNAまたはRNA-アンチセンスRNAハイ

ブリダイゼーション；(ii) “マーカー” 遺伝子機能の存在を検出すること；(iii) 宿主細胞中の特異的mRNA転写物の発現によって測定される転写レベルを評価すること；または(iv) 当該技術分野において知られているように、例えば、免疫検定によって成熟ポリペプチド産物の存在を検出することを含めた当該技術分野において周知である少なくとも四つの一般的なアプローチのいずれかによって識別することができる。

【0114】組換え体ポリペプチドの発現および精製
本発明のポリヌクレオチド分子が適当な宿主細胞中に安定して導入されたら、その形質転換された宿主細胞をクローン増殖させ、そして得られた細胞を、コードされているポリペプチドの最大生産をもたらす条件下で成長させる。このような条件には、典型的に、形質転換された細胞を高密度まで成長させることが含まれる。発現ベクターが誘導性プロモーターを含む場合、適当な誘導条件、例えば、温度シフト、栄養素の消耗、無償性誘導物質（例えば、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）などの炭水化物の類似体）の添加、過剰の代謝副産物の蓄積等のような条件を必要に応じて用いて発現を誘導する。

【0115】ポリペプチドが宿主細胞内に保持されている場合、それら細胞を採取し、溶解させ、そしてその産物を、タンパク質分解を最小限にする当該技術分野において知られている抽出条件下において、例えば、4度またはプロテアーゼインヒビターの存在下でまたはその両方などにおいてその溶解物から実質的に精製するまたは単離する。ポリペプチドが宿主細胞から分泌される場合、消耗した栄養培地を簡単に集め、そこからポリペプチドを実質的に精製するまたは単離することができる。

【0116】ポリペプチドは、細胞溶解物または培地から、必要に応じて次の方法、すなわち、硫酸アンモニウム沈降、サイズ分画、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、密度遠心分離およびアフィニティークロマトグラフィーの一つまたはそれ以上が含まれるがそれらに制限されるわけではない標準法を用いて実質的に精製するまたは単離することができる。そのポリペプチドが生物学的活性を欠いている場合、それは、例えば、サイズ、またはポリペプチド特異的抗体との反応性に基いて、または融合標識の存在によって検出することができる。本発明の実施において用いるためには、そのポリペプチドは、培養液中に分泌されているようにまたは細胞溶解物中に存在するように未精製の状態でありうるが、好ましくは、そこから実質的に精製されまたは単離される。本明細書中で用いられるように、ポリペプチドは、そのポリペプチドが特定の標品中の少なくとも約20wt%のタンパク質を構成している場合、“実質的に精製”されている。更に、本明細書中で用いられるように、ポリペプチドは、そのポリペプチドが特定の標品中の少なくとも約80wt%のタンパク質を構成している

場合、“単離”されている。本発明のもう一つの実施態様において、そのタンパク質は、その天然の対応物がL・イントラセルラリス細胞溶解物の標品中で通常見出されるよりも少なくとも約1000x高い濃度で標品中に存在する。

【0117】ポリペプチド

したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる実質的に精製されたまたは単離されたポリペプチドを包含する。非制限実施態様において、そのポリペプチドは、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100のL・イントラセルラリスタンパク質である。好ましい実施態様において、L・イントラセルラリスHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質は、配列番号：3～8または配列番号：102のアミノ酸配列を有する。もう一つの実施態様において、それらポリペプチドは、他のローソニアタンパク質を実質的に含まない。

【0118】本発明は、更に、“相同”という用語がポリペプチドに関して上に定義されているように、前述のL・イントラセルラリスタンパク質のいずれかに相同であるポリペプチドを提供する。本発明のタンパク質に相同である本発明のポリペプチドには、本明細書中に記載の非ローソニアタンパク質のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれない。本発明のポリペプチドは、一つの実施態様において、ローソニアタンパク質との70%を越える、より好ましくは、約90%を越える、そして最も好ましくは、約95%を越えるアミノ酸配列同一性を有し、その配列同一性は、BLASTPアルゴリズム(GenBank, NCBI)の使用によって決定される。

【0119】もう一つの実施態様において、そのポリペプチドは、挿入された、欠失したまたは置換された、それらの組合せを含めた1～10個、より好ましくは、1～5個のアミノ酸を有するL・イントラセルラリスHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質から成る。この実施態様のより具体的な例において、単離されたポリペプチドは、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のアミノ酸配列中に保存的に置換された1～5個のアミノ酸を有する。

【0120】本発明は、更に、本発明の前述のポリペプチドのいずれか一つの実質的な部分から成るポリペプチドを提供する。本明細書中で用いられるように、本発明のポリペプチドの“実質的な部分”または“ペプチドフラグメント”とは、対応する完全長さポリペプチドの完全なアミノ酸配列より少ないアミノ酸配列から成るが、そのアミノ酸配列の少なくとも約5%、より好ましくは、少なくとも約20%、なおより好ましくは、少なくとも約50%、そして最も好ましくは、少なくとも約9

5%を含むポリペプチドを意味し、それは本発明の実施において有用である。特に好ましいのは、免疫原性である、すなわち、対応する完全長のローソニアポリペプチドに対して特異的に反応する抗体の生産をもたらす免疫応答を引き起こすことができるペプチドフラグメントである。

【0121】もう一つの実施態様において、本発明のポリペプチドは、抗ローソニア抗体と特異的に反応性であるHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質のエピトープを含む。そのエピトープは、好ましくは、そのタンパク配列の8個を越える、より好ましくは、12個を越える、そして最も好ましくは、20個を越えるアミノ酸である。

【0122】本発明は、更に、当該技術分野において知られている担体または融合パートナーに融合した本発明のポリペプチドのいずれかを含む融合タンパク質を提供する。

【0123】本発明は、更に、上記のポリペプチドのいずれかを製造する方法であって、組換え体発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞を培養し、その組換え体発現ベクターは、特定のポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み、そのポリヌクレオチド分子は、ポリペプチドの発現をもたらす条件下において一つまたはそれ以上の調節因子と機能的に結合して、そして発現されたポリペプチドを細胞培養物から回収することを含む上記方法を提供する。

【0124】ポリペプチドの使用

充分な純度の本発明のポリペプチドが得られたら、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸配列分析、免疫学的活性、生物学的活性等を含めた標準法によってそれを特性決定することができる。そのポリペプチドを、親水性分析(例えば、Hopp および Woods, 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:3824 を参照されたい)または類似のソフトウェアアルゴリズムを用いて更に特性決定して、疎水性および親水性領域を決定することができる。構造分析は、特異的二次構造をとるポリペプチドの領域を決定するように行うことができる。X線結晶学(Engstrom, 1974, Biochem.Exp.Biol. 11:7-13)、計算機モデル化(Fletterick および Zoller (監修), 1986, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, コールド・スプリング・ハーバー, NY中)および核磁気共鳴(NMR)などの生物物理学的方法は、ポリペプチドと他の推定上の相互作用性タンパク質/受容体/分子との可能な相互作用部位を地図に示し且つ研究するのに用いることができる。これら研究から得られる情報を用いて、欠失突然変異体およびワクチン組成物を設計することができるし、そしてそのポリペプチドの生物学的機能を in vi

vo で特異的に阻止しうる治療的または薬理的化合物を設計するまたは選択することができる。

【0125】本発明のポリペプチドは、PPE感受性動物をPPEから保護するワクチン組成物の成分として；または例えば、ELISA検定などの標準的な技法を用いて、動物からの血液または血清試料中のローソニア特異的抗体についてスクリーニングするための診断用試薬として；または例えば、ウェスタンブロット検定のような標準的な技法を用いて、動物からの細胞、組織または体液試料中のローソニア特異的タンパク質についてスクリーニングするための診断用試薬として有用である多クローン性または単クローン性抗体を下記のように生じさせる抗原としてを含めた種々目的に有用である。

【0126】ポリペプチドの類似体および誘導体

本発明のポリペプチドは、その生物学的または免疫学的特性を向上させるようにまたは他の点では変化させるようにタンパク質レベルで修飾することができる。ポリペプチドの一つまたはそれ以上の化学修飾は、次のいずれか、すなわち、ポリペプチドの1個またはそれ以上のアミノ酸を、例えば、カルバゼートまたは第三中心を生じるように、該当するD-アミノ酸、アミノ酸類似体またはアミノ酸模擬体で置換すること；または、例えば、トリプシン、キモトリプシン、パパインまたはV8プロテアーゼを用いたタンパク質分解切断、またはNaBH₄または臭化シアンを用いた処理、またはアセチル化、ホルミル化、酸化または還元等のような特異的修飾が含まれるがそれらに制限されるわけではない既知の技法を用いて行って、そこから類似体を製造することができる。或いは、または更に、本発明のポリペプチドは、遺伝子組換え技術によって修飾することができる。

【0127】本発明のポリペプチドは、アセチル基、硫黄橋架け基、グリコシル基、脂質およびリン酸塩が含まれるがそれらに制限されるわけではない1個またはそれ以上の化学基のそれへの結合によって、および/または本発明の別のポリペプチド、または別のタンパク質、例えば、血清アルブミン、スカシガイのヘモシアニンまたは商業的に活性化されたBSAなど、またはポリアミノ酸（例えば、ポリリシン）、または多糖（例えば、セファロース、アガロース、または修飾または非修飾セルロース）への結合によって誘導体化することができる。このような結合は、好ましくは、そのポリペプチドのアミノ酸側鎖および/またはN末端若しくはC末端における共有結合による。このような結合反応を行う方法は、当該タンパク質化学分野において周知である。

【0128】請求の範囲に記載の発明を実施する場合に有用な誘導体には、例えば、ポリエチレングリコールのような水溶性ポリマーが本発明のポリペプチドまたはその類似体若しくは誘導体に結合することによって、そのポリペプチドの免疫原性を少なくとも一部分は維持しながら、追加の望ましい性状を与えているものも含まれ

る。これら追加の望ましい性状には、例えば、水溶液中での増加した溶解性、増加した貯蔵安定性、タンパク質分解脱水への増加した耐性および増加した *in vivo* 半減期が含まれる。本発明のポリペプチドへの結合に適した水溶性ポリマーには、ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマーが含まれるがそれらに制限されるわけではなく、ここにおいて、それらホモポリマーおよびコポリマーは、非置換であるかまたは、アルキル基、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖、ポリビニルエチルエーテルおよび、-ポリ[2-ヒドロキシエチル]-DL-アスパルトアミドで一方の末端に置換されている。ポリエチレングリコールが特に好ましい。ポリペプチドの水溶性ポリマー結合体を製造する方法は、当該技術分野において周知であり、特に、米国特許第3,788,948号；米国特許第3,960,830号；米国特許第4,002,531号；米国特許第4,055,635号；米国特許第4,179,337号；米国特許第4,261,973号；米国特許第4,412,989号；米国特許第4,414,147号；米国特許第4,415,665号；米国特許第4,609,546号；米国特許第4,732,863号；米国特許第4,745,180号；欧州特許(E P)第152,847号；E P 98,110号；および日本国特許第5,792,435号に記載されており、それら特許は本明細書中に援用される。

【0129】抗体

本発明は、更に、本発明のポリペプチドに対して向けられる単離された抗体を提供する。好ましい実施態様において、抗体は、既知の方法を用いて、L・イントラセルラリスからのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質に対して生じさせることができる。ブタ、乳牛、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジまたはマウスより選択される種々の宿主動物は、部分的に若しくは実質的に精製されたまたは単離されたL・イントラセルラリスタンパク質を用いて、または上に記載されているようなその同族体、融合タンパク質、実質的な部分、類似体または誘導体を用いて免疫感作することができる。下記のようなアジュバントは、抗体産生を促進するのに用いることができる。

【0130】多クローン性抗体は、免疫感作された動物の血清から得られ且つ単離され、抗原に対する特異性について標準的な技法を用いて調べることができる。或いは、単クローン性抗体は、培養中の連続的継代細胞系によって抗体分子を産生させる任意の技法を用いて製造し且つ単離することができる。これらには、Kohler および Milstein (Nature, 1975, 256:495-497) によって最初に記載されたハイブリドーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor ら, 1983, Immunology Today 4:7

2; Cote ら, 1983, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:2026-2030); および E B V - ハイブリドーマ技術 (Cole ら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Allan R.Liss, Inc., 77-96頁) が含まれるがそれらに制限されるわけではない。或いは、単鎖抗体の産生について記載された技法 (例えば、米国特許第 4, 946, 778 号を参照されたい) を、L・イントラセルラリス抗原特異的単鎖抗体を生じるように適応することができる。これら公報は、本明細書中に援用される。

【0131】本発明のポリペプチドに特異的な結合部位を含有する抗体フラグメントは、本発明の範囲内にも包含され、既知の技法によって生じさせることができる。このようなフラグメントには、自然のままの抗体分子のペプシン消化によって生じることができる F (a b ')₂ フラグメント、およびその F (a b ')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生じることができる F a b フラグメントが含まれるがそれらに制限されるわけではない。或いは、F a b 発現ライブラリーを構築して (Huse ら, 1989, Science 246:1275-1281)、L・イントラセルラリスタンパク質への所望の特異性を有する F a b フラグメントの迅速な識別を可能にすることができる。

【0132】単クローン性抗体および抗体フラグメントの産生および単離の技術は、当該技術分野において周知であり、特に、Harlow および Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory に、および J.W.Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, ロンドンに更に記載されており、それらは本明細書中に援用される。

【0133】**ローソニア遺伝子の標的突然変異**
本発明のポリヌクレオチド分子の開示に基づいて、ローソニア h t r A、p o n A、l y s S、y c f W、h y p C、a b c 1 または o m p 1 0 0 遺伝子 (その遺伝子を、以下、“ローソニア遺伝子”と称する) を無能力にするまたはそれ以外の場合は突然変異させる場合に用いるための遺伝子構築物を製造することができる。そのローソニア遺伝子は、適当に設計される遺伝子構築物を用いて突然変異させることができる。例えば、ローソニア遺伝子は、(a) ローソニア遺伝子のコーディング配列または調節配列の全部または一部分を欠失する; または (b) ローソニア遺伝子のコーディング配列または調節配列の全部または一部分を別のヌクレオチド配列で置き換える; または (c) ローソニア遺伝子のコーディング配列または調節配列中に、ローソニアからのまたは異種源からのヌクレオチド配列を含むことができる 1 個またはそれ以上のヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド分子、またはポリヌクレオチド分子を挿入する; または (d) (a)、(b) および (c) のいくつかの組合せを行うように機能する本発明の遺伝子構築物を用いて突

然変異させることができる。或いは、構築物を用いて、ローソニア遺伝子の発現またはそのコードされているタンパク質の安定性を変化させることができる。

【0134】ローソニア遺伝子が突然変異しているローソニア細胞は、例えば、その遺伝子の突然変異が、突然変異した遺伝子を有するローソニア細胞の病原性を、そのように遺伝子が突然変異していない同じローソニア菌株の細胞と比較して減少させる場合、および無能力にされた遺伝子を有するこのようなローソニア細胞をワクチン組成物中で、特に、修飾生ワクチン中で用いて、P P E に対する動物の防御応答を誘導するまたはその誘導に寄与することができる場合、本発明の実施において有用である。好ましい実施態様において、その突然変異は、ローソニア遺伝子を部分的にまたは完全に無能力にする、またはローソニア遺伝子によってコードされるタンパク質を部分的にまたは完全に無能力にするのに役立つ。この場合、ローソニア遺伝子またはタンパク質は、タンパク質産物が生産されていない (例えば、遺伝子が欠失している) かまたは、その通常の生物学的機能をもはや有することができない若しくはその通常の細胞の場所にもはや輸送され得ないタンパク質産物が生産される、またはその通常の生物学的機能は有するが、有意に低下した速度で生産物が生産される場合、部分的にまたは完全に無能力にされていると考えられる。ローソニア遺伝子が突然変異しているローソニア細胞は、その遺伝子の発現またはそのコードされるタンパク質の安定性を増加させるのにも有用である。病原性ローソニア菌株の細胞の病原性を検出可能に減少させる突然変異は、特に有用である。本発明は、本発明のタンパク質およびポリペプチドを発現する細胞が構成的突然変異体である場合、このような細胞も包含する。

【0135】非制限実施態様において、本発明の遺伝子構築物は、野生型遺伝子のコーディング配列またはそのプロモーター若しくは他の調節領域、またはその一部分を、例えば、突然変異したコーディング配列若しくは突然変異した調節領域またはその一部分のような別のヌクレオチド配列で置き換えることによって、野生型ローソニア遺伝子を突然変異させるのに用いられる。このような遺伝子構築物中で用いるための突然変異したローソニア遺伝子配列は、誤りがちの (error-prone) P C R の使用またはカセット突然変異誘発を含めた種々の既知の方法のいずれかによって生じることができる。例えば、オリゴヌクレオチドに支配された突然変異誘発は、野生型ローソニア遺伝子のコーディング配列またはプロモーター配列を一定方法で変化させるのに、例えば、その配列内の特定の地点にフレームシフトまたは終止コドンを導入するのに用いることができる。或いは、または更に、本発明の遺伝子構築物中で用いるための突然変異したヌクレオチド配列は、そのコーディング配列またはプロモーター配列の 1 個またはそれ以上のヌクレオチド、

オリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子の挿入または欠失によって、またはそのコーディング配列またはプロモーター配列の一部分の、1個またはそれ以上の別のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子を用いた置換によって製造することができる。このようなオリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子は、任意の天然に存在する源から得ることができるまたは合成でありうる。挿入されるまたは欠失する配列は、ローソニア遺伝子の読み枠を簡単に破壊するのに役立つし、または選択可能マーカーのような異種遺伝子産物を更にコードすることができる。

【0136】或いは、または更に、ランダム突然変異誘発を用いて、本発明の遺伝子構築物中で用いるための突然変異したローソニア遺伝子配列を生じることができる。ランダム突然変異誘発は、任意の適当な技法によって、例えば、ローソニア遺伝子を有する細胞を紫外線またはx線に、またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジン、スルホン酸エチルメタン、亜硝酸またはナイトロジェンマスタードのような化学的突然変異誘発物質に暴露した後、特定の遺伝子に突然変異を有する細胞について選択することなどによって行うことができる。突然変異誘発技術の概説については、例えば、Ausubel, 1989, 上記を参照されたい。

【0137】本発明の実施において有用である修飾されたローソニア細胞を生じる突然変異は、ORF中、プロモーター配列または他の調節領域中、または遺伝子若しくはORFを天然に含むまたは遺伝子の発現若しくはそのコードされるタンパク質の安定性を变化させる任意の他の配列中を含めたローソニア遺伝子中のどこでも起こりうる。このようなローソニア細胞には、ローソニア遺伝子によって通常コードされるタンパク質の修飾型が生産される、またはローソニア遺伝子によって通常コードされるタンパク質が生産されない突然変異体が含まれ、ヌル(null)、条件的、構成的または漏出性の突然変異体でありうる。

【0138】或いは、本発明の遺伝子構築物は、ローソニア遺伝子またはORFにその場(in situ)で自然に隣接するヌクレオチド配列を含むことができ、遺伝子それ自体のコーディング領域からのヌクレオチド配列を一部分だけ含むまたは全く含まない。このような遺伝子構築物は、例えば、ローソニア遺伝子全体またはORFを欠失するのに有用であると考えられる。

【0139】一つの実施態様において、本発明の遺伝子構築物は、ローソニア遺伝子を無能力にするのに用いることができるポリヌクレオチド分子であって、(a) L. イントラセルラリスからのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列と他の点では同様であるヌクレオチド配列を有するが、その

ヌクレオチド配列が、一つまたはそれ以上の無能力にする突然変異を更に含むポリヌクレオチド分子；または(b) ローソニア遺伝子のORFに現場で自然に隣接するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含むものを含む。ローソニア菌株の細胞中にいったん形質転換されたら、その遺伝子構築物のポリヌクレオチド分子は、相対的組換えによって特定のローソニア遺伝子に特異的に集中し、それによって、その遺伝子若しくはその一部分を置換するかまたはその遺伝子中に挿入される。この組換え現象の結果として、その特定のローソニア菌株にとって他の点では本来のローソニア遺伝子が無能力にされる。

【0140】もう一つの実施態様において、遺伝子構築物は、例えば、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質を構成的に発現することまたは過発現することによって発現を变化させる突然変異に用いられる。このような突然変異は、例えば、宿主細胞を衰弱させるのに有用でありうる。その構築物は、タンパク質の安定性を増加させる突然変異を用いて、例えば、宿主細胞を弱毒化することもできる。

【0141】相対的組換えによる標的遺伝子突然変異に関して、その遺伝子構築物は、好ましくは、上記のような突然変異したヌクレオチド配列を含む環状かまたは線状のプラスミドである。非制限実施態様において、突然変異した配列の少なくとも約200ヌクレオチドを用いて、相対的組換えのための特定の標的ローソニア遺伝子に本発明の遺伝子構築物を特異的に向けるが、より短いヌクレオチド長さも有効でありうる。更に、そのプラスミドは、好ましくは、破壊される天然のローソニア遺伝子の調節因子配列と機能的に結合しているローソニアゲノム中に挿入されるように構築される、リポーター遺伝子産物または他の選択可能マーカーをコードしている追加のヌクレオチド配列を含む。本発明の実施において用いることができるリポーター遺伝子は、当該技術分野において周知であり、特に、CAT、グリーン蛍光タンパク質およびβ-ガラクトシダーゼをコードしているものが含まれる。選択可能マーカーをコードしているヌクレオチド配列も、当該技術分野において周知であり、抗生物質または抗代謝産物への耐性を与える遺伝子産物をコードするもの、または栄養要求性を与えるものが含まれる。このような配列の例には、ピリメタミン耐性、またはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(アミノグリコシドへの耐性を与える)、またはハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(ハイグロマイシンへの耐性を与える)をコードするものが含まれる。

【0142】本発明の遺伝子構築物を生じるのに用いることができる方法は、当該技術分野において周知であり、特に、Maniatisら, 1989, 上記; Ausubelら, 1989, 上記; Sambrookら, 1989, 上記; Innisら, 1995,

上記；および Erlich, 1992, 上記に記載のような、in vitro 組換え技術、合成技術および in vivo 遺伝子組換えが含まれる。

【0143】ローソニア細胞は、既知の技法にしたがって、例えば、エレクトロポレーションなどによって本発明の遺伝子構築物を用いて形質転換することができるしまたはトランスフェクションすることができる。形質転換細胞の選択は、その構築物と結合した選択可能マーカーを発現する細胞について選択することなどによる標準的な技法を用いて行うことができる。満足すべき組換え現象が起こっているおよび特定の標的遺伝子に変更されている形質転換細胞の識別は、サザンブロット分析、または特定のタンパク質をコードしている mRNA 転写物が無いことを検出するノーザンブロット分析などによる遺伝分析によって、または例えば、免疫学的分析、減少した病原性のような新規表現型の出現、PCR 検定またはそれらのいくつかの組合せで確認されるような特定のタンパク質を欠いている細胞によって行うことができる。

【0144】更に別の非制限実施態様において、本発明の遺伝子構築物は、ローソニアからのまたは動物に感染する別の病原体からの別の遺伝子またはコーディング領域を更に含むことができ、その遺伝子またはコーディング領域は、本発明の修飾されたローソニア生細胞を用いたワクチン接種によって動物において別々の且つ異なった防御免疫応答を誘導するまたはその誘導に寄与するのに有用な抗原をコードしている。この追加の遺伝子またはコーディング領域は、修飾されたローソニア生細胞からのコードされる抗原の分泌をもたらし、それによって、ワクチン接種された動物の免疫系に抗原を提示させるシグナル配列を含有するように更に遺伝子操作することができる。

【0145】本発明は、したがって、htrA、ponA、hypC、lysS、ycfW、abc1またはomp100遺伝子が突然変異している修飾されたローソニア生細胞を提供する。更に、本発明は、修飾されたローソニア生細胞を製造する方法であって、(a)本発明の遺伝子構築物を用いてローソニア細胞を形質転換し；(b)その遺伝子構築物によってhtrA、ponA、hypC、lysS、ycfW、abc1またはomp100遺伝子が突然変異している形質転換された細胞を選択し；そして(c)工程(b)の細胞の中から、PPE感受性動物をPPEから防御するワクチン中で用いることができる細胞を選択することを含む上記方法を提供する。本発明は、このような修飾されたローソニア細胞から製造される死滅細胞組成物も包含する。

【0146】ローソニア細菌の培養

本発明において用いるためのローソニア細菌は、例えば、Joens ら, 1997, Am.J.Vet.Res. 58:1125-1131; Lawson ら, 1993, Journal of Clinical Microbiology 3

1:1136-1142; および McOrist ら, 1995, 上記に記載の方法を用いて、invitro で培養し且つ維持することができる。

【0147】抗ローソニアワクチン

本発明は、更に、本発明のタンパク質またはポリペプチドの免疫学的有効量および薬学的に許容しうる担体を含む、PPEに対するワクチンを提供する。好ましい実施態様において、そのワクチンは、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100のL-イントラセルラリスタンパク質を含む。

【0148】本発明は、更に、本発明の1種類またはそれ以上のポリヌクレオチド分子の免疫学的有効量および薬学的に許容しうる担体を含む、PPEに対するワクチンを提供する。好ましい実施態様において、そのワクチンは、L-イントラセルラリスHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を含む。

【0149】本発明は、更に、本発明の修飾されたローソニア細菌の免疫学的有効量および薬学的に許容しうる担体を含む、PPEに対するワクチンを提供する。一つの実施態様において、本発明のワクチン中で用いるための修飾されたローソニア細胞は、HtrA⁻、PonA⁻、HypC⁻、LysS⁻、YcfW⁻、ABC1⁻またはOmp100⁻表現型を発現するL-イントラセルラリス生細菌である。或いは、本発明のワクチンは、失活している本発明のこのような修飾されたローソニア細胞のいずれかを含むことができる。修飾されたローソニア細胞の失活は、二元エチレンイミン(BEI)またはプロピオラクトンまたはホルムアルデヒドなどを用いた化学的処理による、凍結融解または熱処理による、または細胞のホモジナイゼーションによる、或いはこれら種類の技法の組合せによることを含めた当該技術分野において知られているいずれの技法を用いても行うことができる。均一化され修飾されたローソニア細胞から製造されるワクチンは、未分画の細胞ホモジネートそのままかまたはその免疫学的に有効な部分画分から成りうる。

【0150】本明細書中で用いられるように、“免疫学的有効量”という用語は、PPE感受性動物種のメンバーに投与された場合、1回投与後かまたは多数投与後に、PPEに対する防御応答を誘導することができる抗原、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または修飾された細胞の量を意味する。

【0151】“防御応答を誘導することができる”という句は、ワクチン接種された動物をPPEから防御するのに役立つ抗体かまたは細胞または両方に媒介される免疫応答を含めたワクチン接種に反応した動物の任意の免疫に基づく応答の誘導または促進を含むように本明細書中において広義に用いられる。本明細書中で用いられる

“ 防御応答 ” および “ 防御する ” という用語は、P P E の完全な予防またはローソニアによる感染の完全な予防のみならず、このような病原体による感染度または率の任意の検出可能な減少、または例えば、ワクチン接種された動物において同種のワクチン接種されていない感染動物と比較される、1種類またはそれ以上の組織で形成される病変の形成速度若しくは絶対数または他の動物への伝染の任意の検出可能な減少を含めた、その病原体による感染によって生じる疾患または任意の症状若しくは状態の重症度の任意の検出可能な減少も意味する。

【0152】更に好ましい実施態様において、本発明のワクチンは、P P E 感受性動物をP P E および場合により、その動物を苦しめることがありうる1種類またはそれ以上の他の疾患または病理学的状態から防御する組合せワクチンであり、その組合せワクチンは、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または修飾されたローソニア細胞を含む第一成分の免疫学的有効量；その第一成分とは異なり、しかもP P E 感受性動物を苦しめることがありうる疾患または病理学的状態に対する防御応答を誘導することができるまたはその誘導に寄与すること

【0153】組合せワクチンの第二成分は、当該技術分野において知られているように、P P E かまたは適切な種のメンバーを苦しめることがありうる疾患または病理学的状態に対する防御応答を誘導するまたはその誘導に寄与する能力に基づいて選択される。特定の種におけるワクチン組成物中で有用である抗原性成分は、組合せワクチンの第二成分として用いることができる。このような抗原性成分には、レプトスピラ属 (*Leptospira*) 種、カンピロバクター属 (*Campylobacter*) 種、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・スイス (*Streptococcus suis*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*) 種、クレブシエラ属 (*Klebsiella*) 種、サルモネラ属 (*Salmonella*) 種、ロタウイルス、コロナウイルス、狂犬病、パストツレラ・ヘモリテイカ (*Pasteurella hemolytica*)、パストツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、クロストリジウム属 (*Clostridia*) 種、破傷風トキソイド、大腸菌、クリプトスポリジウム属 (*Cryptosporidium*) 種、アイメリア属 (*Eimeria*) 種、トリコモナス属 (*Trichomonas*) 種、セルブリナ (ブラキスピラ) ・ヒオディセンテリエ (*Serpulina (Brachyspira) hyodysenteriae*)、アクチノバチルス・プレウロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、アクチノバチルス・スイス (*Actinobacillus suis*)、ブタコレラ菌 (*Salmonella choleraesuis*)、ブタ丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、レプトスピラ属 (*Leptospira*) 種、スタフィロコッカス・ヒイクス (*Staphylococcus hyicus*)、ヘモフィルス

・パラスイス (*Haemophilus parasuis*)、気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、ブタの生殖および呼吸症候群ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタ免疫欠損ウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ブタのバルボウイルス、脳心筋炎ウイルス、コロナウイルス、仮性狂犬病ウイルス、シルコウイルスおよび他の真核性寄生物から成る群より選択される病原体に対する防御を与えるものが含まれるがそれらに制限されるわけではない。

【0154】一つの実施態様において、本発明の組合せワクチンは、本発明のタンパク質またはポリペプチドの免疫学的有効量、本発明のポリヌクレオチド分子の免疫学的有効量、および本発明の修飾されたローソニア細胞の免疫学的有効量から成る群より選択される2種類またはそれ以上の成分の組合せを含む。

【0155】本発明のワクチンは、例えば、下記のようなアジュバントまたはサイトカインを含めた1種類またはそれ以上の追加の免疫調節性成分を更に含むことができる。

【0156】本発明は、更に、P P E に対するワクチンを製造する方法であって、免疫学的有効量の本発明のL・イントラセルラリスタンパク質またはポリペプチド、またはポリヌクレオチド分子、または修飾されたローソニア細胞を、P P E 感受性動物への投与に適した形で薬学的に許容しうる担体と組み合わせることを含む上記方法を提供する。好ましい実施態様において、そのタンパク質は、L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100であり、ポリヌクレオチド分子は、好ましくは、L・イントラセルラリスのHtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含み、そして修飾されたローソニア細胞は、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1またはOmp100表現型を有する。

【0157】本発明の修飾されたローソニア生細胞を含むワクチンは、そのローソニア細胞を培地中に遊離した状態かまたは哺乳動物宿主細胞中に残した状態で含有する培養液のアリコートを用いて製造することができるし、P P E 感受性動物に直接的にまたは濃縮した形で投与することができる。或いは、修飾されたローソニア生細胞は、当該技術分野において知られているものより選択される且つ選択された投与経路に適当な免疫調節性物質を用いてまたは用いることなく、薬学的に許容しうる担体と組み合わせることができ、好ましくは、そこで、ワクチン組成物中の修飾されたローソニア生細胞の少なくともある程度の生存度が維持される。

【0158】本発明のワクチン組成物は、標準的な緩衝剤、安定化剤、希釈剤、保存剤および/または可溶化剤

のような薬学的に許容しうる担体を含むように承認された慣例にしたがって製剤化することができるし、徐放を容易にするように製剤することもできる。希釈剤には、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロール等が含まれる。等張性のための添加剤には、特に、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトールおよびラクトースが含まれる。安定化剤には、特に、アルブミンが含まれる。調整生ワクチンを製剤する場合に特に有用であるものを含めた適当な他のワクチン用ビヒクルおよび添加剤は、知られているしまた 10 は当業者に明らかであろう。例えば、本明細書中に援用される Remington's Pharmaceutical Science, 第18巻, 1990, Mack Publishing を参照されたい。

【0159】本発明のワクチンは、更に、例えば、特にアジュバントまたはサイトカインのような1種類またはそれ以上の追加の免疫調節性成分を含むことができる。本発明のワクチン中で用いることができるアジュバントの非制限例には、RIBIアジュバント系(Ribi Inc., ハミルトン, MT)、ミョウバン、水酸化アルミニウムゲルのようなミネラルゲル、水中油エマルジョン、油 20 中水エマルジョン、例えば、フロイントの完全および不完全アジュバントなど、Block コポリマー(CytRx, アトランタ, GA)、QS-21(Cambridge Biotech Inc., ケンブリッジ, MA)、SAF-M(Chiron, エメリービル, CA)、AMPHIGEN(登録商標)アジュバント、サポニン、Quil Aまたは他のサポニン画分、モノホスホリルリピドA、Avridine リピド-アミンアジュバント、およびコレラ菌(Vibrio cholera)毒素および大腸菌不安定毒素などのタンパク質アジュバント 30 が含まれる。本発明のワクチン中で有用な水中油エマルジョンの具体的な非制限例には、修飾されたSEAM62およびSEAM1/2製剤が含まれる。修飾SEAM62は、5%(v/v)スクアレン(Sigma)、1%(v/v)SPAN(登録商標)85デタージェント(ICI Surfactants)、0.7%(v/v)TWEEN(登録商標)80デタージェント(ICI Surfactants)、2.5%(v/v)エタノール、200μg/ml Quil A、100μg/ml コレステロールおよび 40 0.5%(v/v)レシチンを含有する水中油である。修飾SEAM1/2は、5%(v/v)スクアレン、10%(v/v)SPAN(登録商標)85デタージェント、0.7%(v/v)TWEEN80デタージェント、2.5%(v/v)エタノール、100μg/ml Quil Aおよび50μg/ml コレステロールを含む水中油である。ワクチン中に含まれる他の免疫調節性物質には、例えば、1種類またはそれ以上のインターロイキン、インターフェロンまたは他の既知のサイトカインが含まれる。ワクチンが修飾されたローソニア生細胞を含む場合、アジュバントは、好ましくは、得られたワクチン製剤がその修飾されたローソニア生細胞の生存率 50

を少なくともある程度維持するその能力に基づいて選択される。

【0160】ワクチン組成物がポリヌクレオチド分子を含む場合、そのポリヌクレオチド分子は、DNAかまたはRNAでありうるが、DNAが好適であり、そして好ましくは、当該技術分野において知られているように、組換え体プラスミドまたはウイルスベクターのような発現ベクター構築物中で、PPEから防御されるPPE感受性動物に投与される。組換え体ウイルスベクターの例には、組換え体アデノウイルスベクターおよび組換え体レトロウイルスベクターが含まれる。ワクチン製剤は、DNAプラスミドに基づくベクターのような非ウイルスDNAベクターも含むことができる。ポリヌクレオチド分子は、脂質と結合して、例えば、リポソームまたはコクレート(cochleates)のようなDNA-脂質複合体を形成してよい。例えば、国際特許公開WO93/24640号を参照されたい。

【0161】DNAワクチン中のワクチン物質として有用な発現ベクターは、好ましくは、当該技術分野において知られているように、例えば、プロモーター配列などの真核性細胞中でのローソニアコーディング配列の発現に必要な一つまたはそれ以上の転写調節因子と機能的に結合している1種類またはそれ以上の抗原性ローソニアタンパク質をコードしているヌクレオチド配列、またはそのようなヌクレオチド配列の実質的な部分を含む。好ましい実施態様において、その調節因子は、例えば、RSVまたはCMVからのウイルスプロモーターのような強力なウイルスプロモーターである。このような発現ベクターには、好ましくは、クローニングのための細菌の複製起点および原核性選択可能マーカー遺伝子、および発現されるmRNAの適切な終結を確実にするポリアデニル化配列も含まれる。発現されるタンパク質の細胞分泌を支配するように、シグナル配列も含まれる。

【0162】DNAワクチン中のワクチン物質として有用な発現ベクターの必要条件は、特に、米国特許第5,703,055号、米国特許第5,580,859号、米国特許第5,589,466号、国際特許公開WO98/35562号、および Ramsay ら, 1997, Immunol. Cell Biol. 75:360-363; Davis, 1997, Cur. Opin. Biotech. 8:635-640; Maniackan ら, 1997, Critical Rev. Immunol. 17:139-154; Robinson, 1997, Vaccine 15(8):785-787; Lai および Bennett, 1998, Critical Rev. Immunol. 18:449-484; および Vogel および Sarver, 1995, Clin. Microbiol. Rev. 8(3):406-410 を含めた種々の科学公報に更に記載されている。

【0163】ワクチン組成物が修飾されたローソニア生細胞を含む場合、そのワクチンは、冷却して、凍結させてまたは凍結乾燥させて貯蔵することができる。ワクチン組成物が、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または失活した修飾されたローソニア

細胞を代わりに含む場合、そのワクチンは、適当な希釈剤を用いて投与前に再水和される冷却した、凍結したまたは凍結乾燥した状態で貯蔵することができる。

【0164】本発明のワクチンは、場合により、抗原の徐放のために製剤化することができる。このような徐放性製剤の例には、例えば、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-コグリコール酸)、メチルセルロース、ヒアルロン酸、コラーゲン等のような生体適合性ポリマーの組成物との組合せの抗原が含まれる。薬物デリバリービヒクル中の分解性ポリマーの構造、選択および使用は、本明細書中に援用される A.Dombら, 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3:279-292 を含めたいくつかの公報に概説されてきた。医薬製剤中のポリマーを選択し且つ使用する場合に更に別の指針は、本明細書中にも援用される M.Chasin および R.Langer (監修), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", *Drugs and the Pharmaceutical Science*, 45巻, M.Dekker, NY の本文中で見出されうる。或いは、または更に、その抗原は、投与および効力を改善するようにマイクロカプセルに封入することができる。抗原をマイクロカプセルに封入する方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、いずれも本明細書中に援用される米国特許第 3,137,631号; 米国特許第 3,959,457号; 米国特許第 4,205,060号; 米国特許第 4,606,940号; 米国特許第 4,744,933号; 米国特許第 5,132,117号; および国際特許公開 WO95/28227号に記載された技法が含まれる。

【0165】リポソームも、抗原を徐放させるのに用いることができる。リポソーム製剤を製造するおよび使用する方法に関する詳細は、特に、いずれも本明細書中に援用される米国特許第 4,016,100号; 米国特許第 4,452,747号; 米国特許第 4,921,706号; 米国特許第 4,927,637号; 米国特許第 4,944,948号; 米国特許第 5,008,050号; および米国特許第 5,009,956号で見出されうる。

【0166】本発明は、更に、PPE に対して PPE 感受性動物にワクチン接種する方法であって、本発明のワクチンの免疫学的有効量を動物に投与することを含む上記方法を提供する。好ましくは、そのワクチンは、例えば、皮下かまたは筋肉内注射によって非経口投与される。しかしながら、ワクチンはまた、腹腔内または静脈内注射によって、または例えば、経口、鼻腔内、直腸、腔内、眼内を含めた他の経路によってまたは経路の組合せによっても、そして当該技術分野において知られている遅延放出装置によっても投与することができる。当業者は、最適のワクチン投与経路を決定し、その選択された投与経路にしたがってワクチン組成物に許容しうる製剤を確認することができる。

【0167】有効な用量は、低用量の抗原を用いて開始

した後、その作用を監視しながら用量を増加させる慣用的な手段によって決定することができる。動物当たりの最適用量を決定する場合、多数の因子が考慮されうる。これらの内の主なものは、動物の種、体格、年齢および全身状態、その動物における他の薬物の存在、動物がワクチン接種される特定のローソニア菌株のビルレンス等である。実際用量は、好ましくは、他の動物の研究による結果の考察後に選択される。

【0168】本発明のワクチン中の本発明のタンパク質またはポリペプチドの投与量は、好ましくは、約 $1 \mu\text{g}$ ~ 約 10mg 、より好ましくは、約 $50 \mu\text{g}$ ~ 約 1mg 、そして最も好ましくは、約 $100 \mu\text{g}$ ~ 約 0.5mg である。本発明のワクチン中の本発明のローソニアポリヌクレオチド分子の投与量は、好ましくは、約 $50 \mu\text{g}$ ~ 約 1mg である。本発明のワクチン中の本発明の修飾されたローソニア細胞の投与量は、好ましくは、細胞約 1×10^3 ~ 約 1×10^8 個/ml、より好ましくは、細胞約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 個/ml である。適当な用量寸法は、約 0.1ml ~ 約 10ml 、より好ましくは、約 1ml ~ 約 5ml である。これら抗原の投与量は、本発明の組合せワクチンにも当てはまる。組合せワクチンの第二成分が、本発明のローソニアタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは修飾された細胞以外の抗原である場合、組合せワクチン中で用いるための第二成分の投与量は、当該技術分野において知られているように、その第二成分の前のワクチン使用から決定することができる。

【0169】本発明のワクチンは、動物、特に、ブタを PPE から防御するのに有用である。そのワクチンは、ハムスター、フェレット、モルモット、シカおよびウシ、ウマおよび鳥類の種が含まれるがそれらに制限されるわけではないいずれか適当な動物に投与することができる。本発明のワクチンは、例えば、特に PPE の発生のタイミング等を含めたいくつかの因子に依って、特定の動物の生存中のいずれかの時期に投与することができる。ワクチンは、離乳期の若しくはより若い動物に、またはより成熟した動物に投与することができる。有効なタンパク質は、一次ワクチン接種だけを必要とすることがありうるし、または 1 回またはそれ以上のブースターワクチン接種も必要であることがありうる。適切な免疫防御が得られているかどうかを検出する一つの方法は、ワクチン接種後の動物における血清交換および抗体力価を確認することである。ワクチン接種のタイミングおよびブースターを行うとすればその回数は、好ましくは、全ての適切な因子の分析に基づいて獣医によって決定され、そのいくつかは上に記載されている。

【0170】一つの実施態様において、本発明のタンパク質またはポリペプチド、例えば、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1または Omp100 の L-イントラセルラリスタンパク質、また

はそれらの組合せは、1 ml の緩衝溶液中に 100 μg のポリペプチド、およびアジュバントとして 25 μg の大腸菌不安定毒素を含有する製剤中で投与される。その製剤は、例えば、ブタの筋肉内に、5～7日齢で投与され、14日後に再投与される。

【0171】本発明は、更に、PPE に対して PPE 感受性動物にワクチン接種するためのキットであって、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド分子または修飾されたローソニア細胞、またはそれらの組合せの免疫学的有効量を有する容器を含む上記キットを提供する。そのキットは、場合により、薬学的に許容しうる担体または希釈剤を有する第二容器を含むことができる。好ましい実施態様において、そのポリペプチドは、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1 または Omp100 の L-イントラセルラリスタンパク質であり；ポリヌクレオチド分子は、好ましくは、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1 または Omp100 の L-イントラセルラリスタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有し、そして修飾されたローソニア細胞は、好ましくは、HtrA、PonA、HypC、LysS、YcfW、ABC1 または Omp100 表現型を発現する生細胞または不活化細胞である。

【0172】本発明は、L-イントラセルラリス、L-イントラセルラリス特異的のアミノ酸またはヌクレオチド配列、または抗 L-イントラセルラリス抗体の存在を検出するキットであって、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体を含有するキットにも関する。そのキットは、例えば、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体に結合した、またはそのタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体に結合する残基に結合した酵素、蛍光または放射性標識を含めた本発明のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体を検出する手段も含有しうる。

【0173】次の実施例は、本発明を単に詳しく説明するものであり、発明の範囲を制限するものではない。

【0174】

【実施例】実施例 1：L-イントラセルラリス染色体領域 A の分子クローニング

DNA の単離および DNA ライブラリーの構築
 鋳型 DNA を、実験的に L-イントラセルラリスに感染したブタの回腸から単離されたブタ腸粘膜から精製した。均一化された腸粘膜からの DNA 精製は、(1) Nollau らの方法 (Nollau ら, 1996, Bio Techniques 20: 784-788) または (2) DNA のフェノール抽出および酢酸ナトリウム-エタノール沈降によって行われた。

L-イントラセルラリス遺伝子配列のクローニングを容易にするために、いくつかのゲノムライブラリーを構築した。これらライブラリーを、制限 DNA フラグメント

の 5' および 3' 末端への既知の配列 (Vectorette IITM, Genosys Biotechnologies, Inc., ザ・ウッドランズ, TX) の連結によって特異的に修飾した。VectoretteTMライブラリーは、L-イントラセルラリスに感染したブタ粘膜 DNA 抽出物のアリコート、制限エンドヌクレアーゼ HindIII、EcoRI、DraI または HpaI を用いて 37 °C で一晩別々に消化することによって構築された。次に、その反応を、追加の新しい制限酵素を用いて止め、2 mM ATP、2 mM DTT の最終濃度に調整した。VectoretteTMテーリング (tailing) を、3 ピコモルの適当な適合した VectoretteTMリンカー (HindIII VectoretteTM: HindIII で消化された DNA; EcoRI; EcoRI で消化された DNA; Blunt: DraI、HpaI で消化された DNA) を加えた T₄ DNA リガーゼ (400 U) の添加によって行った。その混合物を 20 °C、60 分間；および 37 °C、30 分間で 3 サイクルインキュベートして、テーリング反応を完了させた後、水を用いて 200 μl に調整し、-20 °C で貯蔵した。

【0175】LysS、YcfW、ABC1 および Omp100 タンパク質をコードしているゲノム領域 A の分子クローニング

ゲノム領域 A (図 1 に示される) の識別は、ゲノムウォーキングおよびファージライブラリースクリーニング処理によって行われた。HindIII、EcoRI、DraI および HpaI の VectoretteTMライブラリーのスクリーニングは、細胞壁自己消化に関する細菌 N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼと相関の L-イントラセルラリスからの遺伝子 (amiB) に隣接して位置する DNA フラグメントを得るように行われた。オリゴヌクレオチドプライマー ER159 (配列番号: 37)、ER161 (配列番号: 38) および ER162 (配列番号: 39) は、amiB のヌクレオチド配列に基づいて設計された。3 種類全部のプライマーを、この領域内の (-) 鎖を結合するように設計して、AmiB をコードしている遺伝子の上流に位置する DNA の増幅を可能にした。

【0176】omp100 遺伝子のフラグメントのポリメラーゼ連鎖増幅には、オリゴヌクレオチド ER159 (配列番号: 37)、ER161 (配列番号: 38) および ER162 (配列番号: 39) を、VectoretteTM特異的プライマー (ER70) (配列番号: 33) と組み合わせ、1 × PCR Buffer II (Perkin Elmer)、1.5 mM MgCl₂、各 200 μM のデオキシ NTP、各 50 ピコモルのプライマーおよび 2.5 U AmpliTaqTM Gold (Perkin Elmer) 熱安定性ポリメラーゼを含有する 50 μl の反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA 鋳型として 4 μl の VectoretteTMライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性 (95 °C、9 分間)；40 サイクルの変性 (95

° 30秒間)、アニーリング(65° 30秒間)および重合(72° 2.5分間);続いて72°で7分間の最終伸長で行った。

【0177】増幅された産物を、1.2%アガロースゲル(Sigma)上での分離によって可視化した。ER159かまたはER162をVectorette™特異的プライマーER70と組み合わせて用いた場合、約2.5kbの産物が、HpaI Vectorette™ライブラリーの増幅によって生じた。このフラグメントは、AmiBをコードしているL.イントラセルラリス遺伝子の直ぐ上流の1.9kb領域であった。そのPCR産物を、JETsorb™キット(GENOMED, Inc., Research Triangle Park, NC)を用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1 Topo(Invitrogen, カールズバット, CA)中にクローン化してプラスミドpER393を生じた。そのインサートを、ベクター特異的プライマーを用いて部分的に配列決定した。得られた配列は、BLASTxアルゴリズム(Altschulら, 1990, J.Mol.Biol. 215:403-10)によって分析され、GenBank データベース中の約85kDaタンパク質に類似したタンパク質を部分的にコードすることが示された。髄膜炎菌、インフルエンザ菌およびパスツレラ・マルトシダからの報告されたタンパク質は、それぞれ、Omp85、防御表面抗原D15およびOma87であった。

【0178】この部分遺伝子フラグメントの新たに識別された配列(Omp100タンパクのC末端の2/3をほぼコードしている)に基づいて、特異的プライマーER174(配列番号:46)およびER175(配列番号:47)を、PCR増幅によるVectorette™ライブラリーの2回目のスクリーニングによって追加の5'フランキング配列を得るように設計した。オリゴヌクレオチドER174(配列番号:46)およびER175(配列番号:47)を、プライマーER70(配列番号:33)と組み合わせて、1xPCR Buffer II(Perkin Elmer)、1.5mM MgCl₂、各200μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5U AmpliTaq™ Gold(Perkin Elmer)熱安定性ポリメラーゼを含有する50μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として2μlのVectorette™ EcoRIおよびDraIライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性(95° 9分間);35サイクルの変性(95° 30秒間)、アニーリング(62° 30秒間)および重合(72° 2.5分間);続いて72°で7分間の最終伸長で行った。

【0179】PCRによるEcoRIおよびDraIのVectorette™ライブラリーのスクリーニング(ER174かまたはER175をER70と組み合わせて用いる)は、EcoRI Vectorette™ライブラリーからの

約1.4kbフラグメントの満足すべき増幅を生じた。そのPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1 Topo中にクローン化してプラスミドpER394を生じた。ER175およびベクター特異的プライマーを用いるpER394内のインサート両末端の配列分析は、このフラグメントが、pER394内のフラグメントインサートと隣接していた(例えば、オーバーラップしていた)ことを確証し、omp100遺伝子の5'末端の決定を可能にした。この分析は、輸送体タンパク質のATP結合カセット(ABC)スーパーファミリーと相同の追加の部分ORFの存在も示した。したがって、コードされる部分タンパク質をABC1と称した。【0180】この部分遺伝子フラグメントの新たに識別された配列(ABC1タンパクのC末端の1/2をほぼコードしている)に基づいて、特異的プライマーER188(配列番号:55)を、PCR増幅によるVectorette™ライブラリーの3回目のスクリーニングによって追加の5'フランキング配列を得るように設計した。オリゴヌクレオチドER188(配列番号:55)を、プライマーER70(配列番号:33)と組み合わせて、1xPCR Buffer II、1.5mM MgCl₂、各200μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5U AmpliTaq™ Gold熱安定性ポリメラーゼを含有する50μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として4μlのVectorette™ HindIII、DraIおよびHpaIライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性(95° 9分間);30サイクルの変性(95° 30秒間)、アニーリング(60° 30秒間)および重合(72° 2.5分間);続いて72°で7分間の最終伸長で行った。

【0181】PCRによるHindIII、DraIおよびHpaIのVectorette™ライブラリーのスクリーニング(ER188をER70と組み合わせて用いる)は、HindIII Vectorette™ライブラリーからの約0.8kbフラグメントの満足すべき増幅を生じた。そのPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1 Topo中にクローン化してプラスミドpER395を生じた。ER188およびベクター特異的プライマーを用いるpER395内のインサート両末端の配列分析は、このフラグメントが、pER394内のフラグメントインサートと隣接していた(例えば、オーバーラップしていた)ことを確証し、abc1遺伝子の5'末端の決定を可能にした。追加の部分ORFは、そのabc1遺伝子の5'上流で確認された。そのコードされるタンパク質を、多数の細菌で見出される保存タンパク質であるYcfWとの相同性に基づいて、YcfWと称した。

【0182】ycfW ORFの残りの部分をコードし

ている領域は、L・イントラセルラリスゲノムDNAの部分T s p 5 0 9 1消化によって生じた Lambda Z A P Express™ファージライブラリーをスクリーニングすることによって得られた。そのファージライブラリーを、1 0 mM Mg S O₄、I P T GおよびX - G a lの存在下においてX L 1 - Blue M R F ' 大腸菌細胞上にプレートイングした。透明なプラークを採取し、ファージインサートを、Expand Long Template P C R System™を供給者 (Boehringer Mannheim, インディアナポリス, I N) によって提示のように用いて増幅させた。T 3 およびT 7 ファージ特異的プライマーを、変性 (9 4 ° 2 分間) ; 2 5 サイクルの変性 (9 4 ° 1 0 秒間)、アニーリング (5 0 ° 3 0 秒間) および重合 (6 8 ° 6 分間) ; 続いて6 8 ° で7 分間の最終伸長から成るP C R 条件で用いた。得られたP C R 産物を、T 3 およびT 7 プライマーを用いて最終配列決定し、B L A S T x 分析によって GenBank データベース中の遺伝子と比較した。クローンA 2 1 と称される一つのファージは、前に識別されたy c f W、A B C 1 およびo m p 1 0 0 D N A 配列にオーバーラップした2 . 8 k b を包含する約 6 . 1 k b インサートを含有した。したがって、このクローンは、Y c f W タンパクのN 末端をコードしているD N A 配列を決定するのに用いられた。追加のO R F は、y c f W 遺伝子の上流で確認された。この遺伝子は、いくつかのリシル - t R N A シンテターゼとの相同性を有し且つl y s S と称されるタンパクをコードしていた。

【0 1 8 3】a b c 1 遺伝子のC 末端部分およびo m p 1 0 0 の予備のヌクレオチド配列は、p E R 3 9 3 およびp E R 3 9 4 内のインサートを配列決定することによって得られた。Y c f W のC 末端の1 4 1 アミノ酸部分およびA B C 1 のアミノ末端部分をコードしている予備ヌクレオチド配列は、p E R 3 9 5 内のインサートを配列決定することによって得られた。y c f W 遺伝子のN 末端およびl y s S をコードしている予備ヌクレオチド配列は、ファージクローンA 2 1 中に含有されたインサートであるP C R 産物を配列決定することによって得られた。予備配列決定に用いられたプライマーには、p E R 3 9 3 に関するE R 1 5 9 (配列番号: 3 7)、E R 1 6 9 (配列番号: 4 1)、E R 1 7 0 (配列番号: 4 2)、E R 1 7 6 (配列番号: 4 8) およびE R 1 7 7 (配列番号: 4 9) ; p E R 3 9 4 に関するE R 1 7 5 (配列番号: 4 7)、E R 1 8 5 (配列番号: 5 2)、E R 1 8 6 (配列番号: 5 3) およびE R 1 8 7 (配列番号: 5 4) ; p E R 3 9 5 に関するE R 1 8 8 (配列番号: 5 5) ; およびファージクローンA 2 1 に関するE R 2 4 6 (配列番号: 9 7)、E R 2 5 4 (配列番号: 9 8)、E R 2 5 5 (配列番号: 9 9)、E R 2 5 6 (配列番号: 1 0 0) およびE R 2 5 7 (配列番号: 1 0 1) の他に、ベクター特異的前進M 1 3、逆M 1

3、ファージT 3 およびT 7 のプライマーが含まれた。【0 1 8 4】L・イントラセルラリス領域A を包含するサブゲノムD N A フラグメントの特異的P C R 増幅プラスミドp E R 3 9 3、p E R 3 9 4、p E R 3 9 5 およびファージクローンA 2 1 中に含有されるゲノムフラグメントからのクローニングおよび予備配列決定の結果を用いて、オーバーラップサブゲノムフラグメントの特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、L・イントラセルラリスに感染したブタ粘膜D N A 抽出物から直接的に設計した。D N A 抽出は、上記の方法にしたがって行った。このアプローチは、大腸菌中での遺伝子フラグメントのクローニング中に起こる可能性がある突然変異のために、配列決定用人工産物の導入を省略する要求に基づいて好適である。l y s S と、y c f W のN 末端の3 / 4 に隣接するオリゴヌクレオチドE R 2 4 6 (配列番号: 9 7) およびE R 2 5 4 (配列番号: 9 8) ; a b c 1 遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドE R 2 2 9 (配列番号: 7 3) およびE R 2 0 6 (配列番号: 6 6) ; およびo m p 1 0 0 遺伝子に隣接するE R 2 3 1 (配列番号: 7 5) およびE R 2 3 2 (配列番号: 7 6) を用いて、この領域を粘膜D N A 抽出物から特異的に増幅させた。l y s S 遺伝子は、5 0 μ l の最終試料容量中に鋳型としての2 μ l の粘膜D N A 抽出物、1 x P C 2 緩衝液 (Ab Peptide, Inc.)、各2 0 0 μ M のd N T P、各5 0 ピコモルのプライマー、7 . 5 U K l e n T a q 1 および0 . 1 5 U クローン化P f u 熱安定性ポリメラーゼを含有するP C R 反応中で増幅した。増幅条件は、9 4 ° で5 分間の変性後、3 0 サイクルの変性 (9 4 ° 1 分間)、アニーリング (5 5 ° 3 0 秒間) および重合 (7 2 ° 3 分間) から成った。7 2 ° で7 分間の最終伸長は、標的の2 . 6 k b 領域の増幅を完全にした。a b c 1 遺伝子は、5 0 μ l の最終試料容量中に鋳型としての1 μ l の粘膜D N A 抽出物、1 x P C 2 緩衝液、各2 0 0 μ M のd N T P、各5 0 ピコモルのプライマー、7 . 5 U K l e n T a q 1 および0 . 1 5 U クローン化P f u 熱安定性ポリメラーゼを含有する3 重P C R 反応中で増幅した。増幅条件は、9 5 ° で5 分間の変性後、3 3 サイクルの変性 (9 4 ° 1 分間)、アニーリング (5 8 ° 3 0 秒間) および重合 (7 2 ° 8 0 秒間) から成った。7 2 ° で1 0 分間の最終伸長は、標的遺伝子領域の増幅を完全にした。o m p 1 0 0 遺伝子は、5 0 μ l の最終試料容量中に鋳型としての2 μ l の粘膜D N A 抽出物、1 x P C 2 緩衝液、各2 0 0 μ M のd N T P、各5 0 ピコモルのプライマー、7 . 5 U K l e n T a q 1 および0 . 1 5 U クローン化P f u 熱安定性ポリメラーゼを含有する4 重P C R 反応中で増幅した。増幅条件は、9 4 ° で5 分間の変性後、3 5 サイクルの変性 (9 4 ° 3 0 秒間)、アニーリング (6 0 ° 3 0 秒間) および重合 (7 2 ° 3 分間) から成った。7 2 ° で7 分間の最終伸長は、標的遺伝子領域の増幅を完全にし

た。増幅後、適宜、試料をそれぞれプールし、特定の産物をアガロースゲル電気泳動によって精製後、ABI自動DNAシーケンサー(Lark Technologies, Inc., ヒューストン, TX)においてDyeDeoxy™終結反応を用いる直接配列分析を行った。

【0185】合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、L.イントラセルラリスからの増幅産物の両DNA鎖を配列決定した。配列分析に用いられるプライマーには、AP58.1(配列番号:26)、AP58.2(配列番号:27)、AP59.1(配列番号:28)、AP59.2(配列番号:29)、AP59.3(配列番号:30)、AP59.4(配列番号:31)、AP59.5(配列番号:32)、ER159(配列番号:37)、ER169(配列番号:41)、ER170(配列番号:42)、ER175(配列番号:47)、ER176(配列番号:48)、ER177(配列番号:49)、ER185(配列番号:52)、ER186(配列番号:53)、ER187(配列番号:54)、ER188(配列番号:55)、ER205(配列番号:65)、ER206(配列番号:66)、ER217(配列番号:71)、ER229(配列番号:73)、ER230(配列番号:74)、RA138(配列番号:79)、RA139(配列番号:80)、RA140(配列番号:81)、AP182.1(配列番号:83)、AP182.2(配列番号:84)、AP182.3(配列番号:85)、AP182.4(配列番号:86)、AP182.5(配列番号:87)、AP182.6(配列番号:88)、AP182.7(配列番号:89)、AP182.8(配列番号:90)、AP182.9(配列番号:91)、AP182.10(配列番号:92)、AP182.11(配列番号:93)、AP182.12(配列番号:94)、AP182.13(配列番号:95)、AP182.14(配列番号:96)、ER246(配列番号:97)、ER254(配列番号:98)、ER255(配列番号:99)、ER256(配列番号:100)およびER257(配列番号:101)が含まれた。

【0186】L.イントラセルラリスゲノム領域Aのヌクレオチド配列を配列番号:1に挙げる。この領域内にコードされるLysS、YcfW、ABC1およびOmp100タンパク質の推定上のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号:102、配列番号:3、配列番号:4および配列番号:5に示す。

【0187】領域Aによって規定されるL.イントラセルラリス遺伝子および遺伝子産物の分子分析amiB遺伝子上流で確認されたL.イントラセルラリス染色体領域Aは、LysS、YcfW、ABC1およびOmp100と称されるタンパク質をコードしている(図1)。これら遺伝子は、同じDNA鎖によってコードされ、極めて接近して配列している。この体制は、

これら遺伝子がオペロン的一部分でありうるし、LysS/YcfWおよびABC1/Omp100の場合に翻訳共役していると考えられることを示唆している。LysS ORFは、非定型TTG開始コドンから開始すると考えられ、配列番号:1のヌクレオチド165~1745から伸長すると考えられる。この遺伝子は、約60,628ダルトンの理論分子量を有するLysS(配列番号:102)と称される推定上の526アミノ酸タンパク質をコードしている。YcfW ORFは、報告された配列(配列番号:1)のヌクレオチド1745~3028から伸長する。この遺伝子は、約46,957ダルトンの理論分子量を有するYcfW(配列番号:3)と称される推定上の427アミノ酸タンパク質をコードしている。abc1 ORFは、配列番号:1のヌクレオチド3031~3738から伸長し、約25,618ダルトンの理論分子量を有する推定上の235アミノ酸タンパク質ABC1(配列番号:4)をコードしている。更に下流であるが44ヌクレオチドによってこのORFにオーバーラップしているのは、更に別の大きい読み取り枠である。このORFはomp100と称されたが、配列番号:1のヌクレオチド3695~6388から伸長する。そのomp100遺伝子は、Omp100(配列番号:5)と称された推定上の896アミノ酸タンパク質をコードしている。Omp100タンパク質は、約101,178ダルトンの理論分子量を有する。

【0188】L.イントラセルラリスLysSタンパク質のリシル-tRNAシンテターゼとの類似性LysSタンパク質の推定上のアミノ酸配列(配列番号:102)を、BLASTpアルゴリズム(Altschul, S.F.ら, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)によってGenBankに報告された他のタンパク質と比較し、CLUSTALWアルゴリズム(Thompson, J.D.ら, 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680)によって整列させた。図9に示されるように、この分析は、LysSが、細胞質リシル-tRNAシンテターゼファミリーのメンバーとの類似性を有するというを示した。L.イントラセルラリスLysSタンパク質は、バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus)からのリシル-tRNAシンテターゼタンパク質(Accn:AB012100)と47%の同一性を有する。その細胞質の場所と一致して、このタンパク質の予想されるN末端付近には、分泌シグナル配列が確認されなかった。

【0189】L.イントラセルラリスYcfWおよびABC1タンパク質の他の仮定のタンパク質との類似性YcfWタンパク質は、約40~45kDaの寸法の保存される仮定のタンパク質のファミリーと一定の相同性を有する。このファミリーのメンバーは、膜貫通タンパク質または膜内在性タンパク質であることが報告されている。このファミリーからの典型的なタンパク質の構造

予想比較は、TMPred (EMBnet - European Molecular Biology Network; <http://www.ch.embnet.org/index.html>) を用いて行われた。そのTMPredプログラムは、膜に広がる領域およびそれらの配向の予測を行う。そのアルゴリズムは、天然に存在する膜貫通タンパク質のデータベースであるTMbaseの統計分析に基づく。(Hofmann & Stoffel, 1993, Biol.Chem. Hoppe-Seyler 347:166)。この分析は、このタンパク質ファミリー内の相同性が、そのタンパク質のC末端付近に集まった三つの強力な膜貫通ドメインを有することを示している。本発明者は、このファミリーを代表するものの極めてカルボキシル末端にある4個のアミノ酸(LRYE)のところに極めて十分に保存されたドメインに注目してきた。そのC末端領域は多数の膜貫通ドメインを含有するが、先端のC末端は高度に保存されるという知見は、相同タンパク質のYcfWファミリーのこの領域に関係した普遍的機能的必要条件を示唆している。配列番号: 3 に示されるL・イントラセルラリスYcfWタンパク質は、先端のC末端アミノ酸(LRYE)の他に、3個のC末端膜貫通ドメインも含有する。上の3個のカルボキシルドメインの他に、TMPred分析は、YcfWタンパク質の残基19~44が、膜貫通領域を形成していると考えられることを示している。YcfWのアミノ末端は、既知の分泌シグナル配列上で操作される(trained)ネットワークを用いるPSORT(6.4バージョン)計算機アルゴリズムによっても調べられる。この分析は、残基29~45が、切断できないシグナル配列(D.J.McGeoch, Virus Research, 3:271,1985 およびG.von Heijne, Nucl.Acids Res., 14:4683,1986)として作用すると考えられる膜貫通領域(P.Kleinら, 1985, Biochim.Biophys.Acta, 815:468)を形成すると考えられることを示している。図2に示されるように、その427アミノ酸のL・イントラセルラリスYcfWタンパク質は、発疹チフスリケッチア(Rickettsia prowazekii)からの415残基の仮定のタンパク質(Accn.AJ235272)と32%の同一性を有する。

【0190】ABC1タンパク質の推定上のアミノ酸配列(配列番号: 4)を、BLASTpアルゴリズムによってGenBankに報告された他の既知のタンパク質と比較した。特に十分に保存される領域(GASGSGK S)は、ABC1のアミノ末端付近で確認された。この領域は、ABC型輸送体中に存在するヌクレオチド結合モチーフA(Pループ)に相当する。それらABC型タンパク質は、広範囲の細胞機能を有するタンパク質の極めて大きいスーパーファミリーから成る。これらタンパク質の大部分は、ヌクレオチド結合モチーフ内の局所相同性に基づいてABC型タンパク質として分類され、概して、細胞輸送機能に関与していると考えられる。図3は、約45%同一のアミノ酸残基を有する大腸菌からの

YcfV(Accn.AE000212)の列と一緒にABC1の列を示す。大腸菌YcfVタンパク質は、有望なABC型輸送体タンパク質である。

【0191】L・イントラセルラリスOmp100タンパク質の85kDaタンパク質との類似性

Omp100のアミノ末端の検討は、アミノ酸1~25が疎水性であり且つ正に荷電していることを示し、それはシグナル配列の特徴を示している(von Heijm, 1985, J.Mol.Biol. 184:99-105)。既知のシグナル配列上で操作されるネットワークを用いるSignalP(1.1バージョン)計算機アルゴリズム(Nielsen,H.ら, 1997, Prot.Engneering, 10:1-6; <http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>)は、アミノ酸25と26との間の最も可能性のある切断部位を予測した。したがって、アミノ酸1~25は、外膜局在化過程にOmp100から除去されると考えられる。Omp100のC末端アミノ酸は、外膜タンパク質の正しい局在と一致する特徴であるフェニルアラニン残基であると考えられる(Struyve,M., 1991, J.Mol.Biol. 218:141-148)。

【0192】Omp100タンパク質の推定上のアミノ酸配列(配列番号: 5)を、BLASTpアルゴリズム(Altschul,S.F.ら, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)によってGenBankに報告された他の既知のタンパク質と比較し、CLUSTAL Wアルゴリズム(Thompson,J.D.ら, 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680)によって整列させた。図4に示されるように、この分析は、Omp100が、GenBankデータベース中の約85kDaタンパク質(U70214と称される)と一定の類似性を有することを示した。大腸菌からのOmp100およびこの仮定のタンパク質(YaeT, Accn.U70214またはAE000127)のC末端の列は、これらタンパク質が約23%同一の残基を有することを示している。他の報告されたタンパク質には、特に、フレクスナー赤痢菌(Omp90)、髄膜炎菌(Omp85)、インフルエンザ菌(D15)およびパスツレラ・マルトシダ(Omp87)から識別されたものが含まれる。アミノ酸1~139を含めたNH₂末端部分は、いずれの既知のタンパク質とも並列しない。コードされるOmp100タンパク質のアミノ酸1~200を包含する領域だけを用いるBLASTpアルゴリズムを用いたGenBankの追加の検索では、いずれの既知のOmp85様タンパク質も検出できなかった。このデータは、Omp100のアミノ末端部分がL・イントラセルラリスに全く特有であることを示している。

【0193】実施例2: L・イントラセルラリス染色体領域Bの分子クローニング

PonA, HtrA, HypCおよびORF1タンパク質をコードしているゲノム領域Bの分子クローニングゲノム領域B(図1に示される)の識別は、ゲノムA領域の識別について記載されたのと同様のゲノムウォーク

ング処理によって行われた。HindIII、EcoRI、DraIおよびHpaIのVectorette™ライブラリーのスクリーニングは、他の細菌の鞭毛フックタンパク質と相同のタンパク質をコードするL・イントラセルラリスからの遺伝子flgEに隣接して位置するDNAフラグメントを得るように行われた。オリゴヌクレオチドプライマーER142（配列番号：34）、ER153（配列番号：35）およびER158（配列番号：36）は、flgEの3'の既知のヌクレオチド配列に基づいて設計された。3種類全部のプライマーを、この領域内の(+)鎖を結合するように設計して、FlgEをコードしている遺伝子の下流に位置するDNAの増幅を可能にした。

【0194】ponA遺伝子のフラグメントのポリメラーゼ連鎖増幅には、オリゴヌクレオチドER142（配列番号：34）、ER153（配列番号：35）およびER158（配列番号：36）を、Vectorette™特異的プライマー（ER70）（配列番号：33）と組み合わせて、1xPCR Buffer II、1.5mM MgCl₂、各200μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5U AmpliTaq™ Gold 熱安定性ポリメラーゼを含有する50μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として4μlのVectorette™ライブラリーを用いて行った。増幅アニーリング温度、伸長時間およびサイクル数は、実験間で異なり、次の範囲にわたって行われた。変性（95° 9分間）；35～40サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（50～60° 30秒間）および重合（72° 2.5～3分間）；続いて72° で7分間の最終伸長。

【0195】増幅された産物を、1.2%アガロースゲル上での分離によって可視化した。ER158（配列番号：36）を Vectorette™特異的プライマーER70と組み合わせて用いた場合、約1.2kbの産物が、DraI Vectorette™ライブラリーの増幅によって生じた。この産物の特異的増幅をもたらす条件には、変性（95° 9分間）；40サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（60° 30秒間）および重合（72° 2.5分間）；続いて72° で7分間の最終伸長が含まれた。このフラグメントは、FlgEをコードしているL・イントラセルラリス遺伝子の直ぐ下流の1.4kb領域であった。そのPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1 Topo 中にクローン化してプラスミドpER390を生じた。そのインサートを、ER70およびER158プライマーを用いて部分的に配列決定した。得られた配列は、BLASTxアルゴリズム (Altschul, S.F. ら, 1990) によって分析され、GenBank データベース中のペニシリン結合タンパク質のアミノ末端半分に類似したポリペプチドをコードすることが

示された。

【0196】この部分遺伝子の新たに識別された配列に基づいて、プライマーER163（配列番号：40）を、Vectorette™ライブラリーの2回目のスクリーニングによって追加の3'フランキング配列を得るように設計した。オリゴヌクレオチドER163（配列番号：40）を、プライマーER70（配列番号：33）と組み合わせて、1xPCR Buffer II、1.5mM MgCl₂、各200μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5U AmpliTaq™ Gold熱安定性ポリメラーゼを含有する50μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として2μlのVectorette™HindIII、EcoRIおよびHpaIライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性（95° 9分間）；30サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（62° 30秒間）および重合（72° 1.5分間）；続いて72° で7分間の最終伸長で行った。

【0197】HindIII Vectorette™ライブラリーから2.7kbフラグメントを増幅させた。そのPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1 Topo中にクローン化してプラスミドpER392を生じた。ベクター特異的プライマーを用いるクローン化されたインサート両末端の配列分析は、このフラグメントが、pER390内のフラグメントインサートと隣接していたことを確認した。この分析は、セリンプロテアーゼのHtrAタンパク質ファミリーのNH₂末端の400残基にほぼ相当する追加の部分ORFの存在も示した。したがって、コードされる部分タンパク質をHtrAと称した。

【0198】3回目のゲノムウォーキングを行って、htrA ORF内の更に別の配列を決定した。特異的プライマーER173（配列番号：45）を、pER392内のインサートの3'末端付近の既知の配列に基づいて設計した。オリゴヌクレオチドER173（配列番号：45）を、プライマーER70（配列番号：33）と組み合わせて、上記のような50μlの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として2μlのVectorette™DraIおよびHpaIライブラリーを用いて行った。増幅（変性（95° 9分間）；35サイクルの変性（95° 30秒間）、アニーリング（62° 30秒間）および重合（72° 2.5分間）；続いて72° で7分間の最終伸長）は、DraIライブラリーから0.3kbフラグメントを生じた。そのPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、pCR2.1 Topo 中にクローン化し、そしてそのインサートの両末端について、ベクター特異的プライマーを用いて配列決定した。配列およびBLASTxの分析は、htrA ORFがそのクロ

ーン化されたフラグメントの3'末端によってオープンの状態のままであることおよび追加の10アミノ酸が、コードされるHtrAタンパク質の末端の前に残っていると考えられることを示した。

【0199】最終回のゲノムウォーキングを行って、htrA ORFおよび3'フランキング領域の残り部分を決定した。特異的プライマーER189(配列番号:56)を、htrA ORFの3'末端付近の既知の配列に基づいて設計した。オリゴヌクレオチドER189(配列番号:56)を、プライマーER70(配列番号:33)と組み合わせて、上記のような50 μ lの反応中において用いた。多数の単純反応を、DNA鋳型として4 μ lのVectorette™HindIII、EcoRIおよびHpaIライブラリーを用いて行った。増幅は、次のように、すなわち、変性(95°9分間);30サイクルの変性(95°30秒間)、アニーリング(60°30秒間)および重合(72°2.5分間);続いて72°で7分間の最終伸長で行った。増幅は、EcoRIライブラリーから約1kbフラグメントを生じた。そのPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、pCR2.1 Topo中にクローン化してpER396を生じた。ベクター特異的プライマーを用いるpER396内のインサート両末端の配列分析は、htrA遺伝子の3'末端の決定を可能にした。追加の小さいORFは、htrA遺伝子の下流で確認された。コードされるタンパク質は、他の細菌で見出されるHypCタンパク質との相同性に基づいて、HypCと称された。hypCから更に下流は、orf1と称される更に別の部分ORFであり、それは反対のDNA鎖によってコードされる。この切断された177アミノ酸ポリペプチドをORF1と称した。

【0200】ponA、htrA、hypC遺伝子、およびorf1遺伝子のC末端部分の予備ヌクレオチド配列は、pER390、pER392およびpER396内のインサートを配列決定することによって得られた。予備配列決定に用いられたプライマーには、pER390に関するER193(配列番号:59)およびER194(配列番号:60);pER392に関するER171(配列番号:43)、ER172(配列番号:44)、ER178(配列番号:50)、ER179(配列番号:51)、ER190(配列番号:57)およびER191(配列番号:58);およびpER396に関するER195(配列番号:61)およびER196(配列番号:62)の他に、ベクター特異的前進M13および逆M13プライマーが含まれた。

【0201】L.イントラセルラリス領域Bを包含するサブゲノムDNAフラグメントの特異的PCR増幅プラスミドpER390、pER392およびpER396中に含有されるゲノムフラグメントからのクローニングおよび予備配列決定の結果を用いて、オーバーラッ

ブサブゲノムフラグメントの特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、L.イントラセルラリスに感染したブタ粘膜DNA抽出物から直接的に設計した(DNA抽出については、上記の方法を用いた)。このアプローチは、大腸菌中での遺伝子フラグメントのクローニング中に起こる可能性がある突然変異のために、配列決定用人工産物の導入を省略する要求に基づいて好適である。ponA遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドER228(配列番号:72)およびER190(配列番号:57);htrA遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドER207(配列番号:67)およびRA134(配列番号:78);およびhypC遺伝子に隣接するオリゴヌクレオチドER189(配列番号:56)およびER196(配列番号:62)を用いて、この領域を粘膜DNA抽出物から特異的に増幅させた。これらフラグメントの端点はオーバーラップし、それによって、隣接しているサブゲノムDNAフラグメントの特異的増幅後、独特のオーバーラップDNAフラグメントそれぞれに存在する末端ヌクレオチド配列を比較することによる引き続きの確認を可能にした。したがって、最終配列は、完全なL.イントラセルラリスゲノム領域Bである。

【0202】オーバーラップするponA、htrAおよびhypC遺伝子領域を、50 μ lの最終試料容量中に鋳型としての1 μ lの粘膜DNA抽出物、1xPC2緩衝液(Ab Peptide, Inc.)、各200 μ MのdNTP、各50ピコモルのプライマー、7.5U Klen Taq1および0.15Uクローン化Pfu熱安定性ポリメラーゼをそれぞれ含有する3重PCR反応中で増幅した。ponAの増幅条件は、95°で5分間の変性後、33サイクルの変性(95°30秒間)、アニーリング(62°30秒間)および重合(72°3分間)から成った。htrAの増幅条件は、94°で5分間の変性後、33サイクルの変性(95°30秒間)、アニーリング(58°30秒間)および重合(72°3分間)から成った。hypCの増幅条件は、94°で5分間の変性後、33サイクルの変性(95°30秒間)、アニーリング(62°30秒間)および重合(72°80秒間)から成った。72°で7分間の最終伸長は、標的の遺伝子領域それぞれの増幅を完全にした。増幅後、試料をそれぞれ別々にプールし、特定の産物をアガロースゲル電気泳動によって精製後、ABI自動DNAシーケンサー(Lark Technologies, Inc., ヒューストン, TX)においてDyeDeoxy™終結反応を用いる直接配列分析を行った。

【0203】合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、L.イントラセルラリスからの増幅産物の両DNA鎖を配列決定した。配列分析に用いられるプライマーには、AP55.1(配列番号:10)、AP55.2(配列番号:11)、AP55.3(配列番号:1

2)、AP55.4(配列番号:13)、AP55.5(配列番号:14)、AP55.6(配列番号:15)、AP55.7(配列番号:16)、AP55.8(配列番号:17)、AP55.9(配列番号:18)、AP55.10(配列番号:19)、AP55.11(配列番号:20)、AP56.1(配列番号:21)、AP56.2(配列番号:22)、AP56.3(配列番号:23)、AP57.1(配列番号:24)、AP57.2(配列番号:25)、ER158(配列番号:36)、ER163(配列番号:40)、ER171(配列番号:43)、ER172(配列番号:44)、ER173(配列番号:45)、ER178(配列番号:50)、ER179(配列番号:51)、ER189(配列番号:56)、ER190(配列番号:57)、ER191(配列番号:58)、ER193(配列番号:59)、ER194(配列番号:60)、ER195(配列番号:61)、ER196(配列番号:62)、ER203(配列番号:63)、ER204(配列番号:64)、ER207(配列番号:67)、ER208(配列番号:68)、ER213(配列番号:69)、ER228(配列番号:72)、RA133(配列番号:77)、RA134(配列番号:78)およびRA171(配列番号:82)が含まれた。

【0204】L.イントラセルラリスゲノム領域Bのヌクレオチド配列を配列番号:2に挙げる。この領域内にコードされるPonA、HtrA、HypCおよびORF1タンパク質の推定上のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号:6、配列番号:7、配列番号:8および配列番号:9に示す。

【0205】領域Bによって規定されるL.イントラセルラリス遺伝子および遺伝子産物の分子分析

flgE遺伝子の下流で確認されたL.イントラセルラリス染色体領域Bは、PonA、HtrA、HypC、および部分“ORF1”タンパク質と称されるタンパク質をコードしている(図1)。flgE ORFの一部は、ここで与えられ、ヌクレオチド1~125から伸長する(配列番号:2)。ponA ORFは、配列番号:2のヌクレオチド252~2690から伸長し、約90,263ダルトンの理論分子量を有する推定上の812アミノ酸タンパク質PonA(配列番号:6)をコードしている。別のインフレーム翻訳開始コドンは、ヌクレオチド276に存在し、それは、用いられる場合、約89,313ダルトンの理論分子量を有する僅かに小さい804アミノ酸タンパク質をコードすると考えられる。htrA ORFは、配列番号:2のヌクレオチド2981~4315から伸長し、約50,478ダルトンの理論分子量を有する推定上の474アミノ酸タンパク質HtrA(配列番号:7)をコードしている。小さいhypCORFは、配列番号:2のヌクレオチド4581~4829から伸長し、約8,888ダルトンの理

論分子量を有する推定上の82アミノ酸タンパク質HypC(配列番号:8)をコードしている。更に下流で且つ反対の配向で転写されるのは、更に別の読み取り枠である。このORFは“orf1”と称されたが、配列番号:2の3'末端のヌクレオチド4912~5445から伸長する。このORFは、配列番号:2の3'末端によってオープンの状態のままであり、したがって、約20,345ダルトンの理論分子量を有する切断されたタンパク質のC末端の177アミノ酸をコードしている。図8に示されるように、コードされるORF1タンパク質(配列番号:9)は、メタノコッカス・ヤナシイ(Methanococcus jannaschii)ゲノムからの遺伝子“MJ1123”(Accn.U67555)によってコードされる205アミノ酸の仮定のタンパク質と一定の相同性を有する。

【0206】L.イントラセルラリスHypCタンパク質のヒドロゲナーゼ成熟タンパク質との類似性

HypCタンパク質は、ヒドロゲナーゼ成熟タンパク質のhyp/hupファミリーとの相同性を有する。ヒドロゲナーゼは、分子水素の可逆酸化を触媒し、水素が酸化されるまたは生じる多数の適切な嫌気性過程に関与している(Adams,M.W.W.,ら,1990,Biochem.Biophys.Acta 594:105-176)。HypCタンパク質は、大腸菌における触媒活性なヒドロゲナーゼイソ酵素の成熟に必要である。この過程におけるHypCの正確な役割はまだ知られていないが、ヒドロゲナーゼ成熟は、ニッケル挿入、タンパク質折りたたみ、C末端タンパク質分解プロセッシング、膜組込みおよび還元的活性化を伴う(Lutz,S.,ら,1991,Mol.Microbiol. 5:123-135;Przybyla,A.E.,ら,1992,FEMS Microbiol.Rev. 88:109-136)。HypCタンパク質は、デスルフォピブリオ・ギガス82アミノ酸HynDタンパク質(Accn.AJ223669,図7に示される)に41%一致し、リゾビウム・レグミノサルムからの75アミノ酸HypCタンパク質に39%一致する。

【0207】L.イントラセルラリスPonAタンパク質のペニシリン結合タンパク質との類似性

ponA ORFは、約90,263ダルトンの理論分子量を有する推定上の812アミノ酸タンパク質をコードしている。別のインフレームメチオニンコドンが存在し、それは、約89,313ダルトンの理論分子量を有する僅かに小さい804アミノ酸タンパク質をコードしている。類似のインフレームメチオニンコドンは、他の特性決定されたponA ORF中で確認されている。例えば、ナイセリア・フラベセンス(Accn.AF087677)、淋菌(Accn.U72876)および髄膜炎菌(Accn.U80933)からのPonA同族体は、それぞれ8個、6個および6個のコドンによって隔てられたアミノ末端インフレームメチオニンコドンを含有する。L.イントラセルラリスと同様、ナイセリ

ア類の *ponA* 遺伝子は、認識できないリボソーム結合部位が先行するので、真の開始メチオニンの予測は更に複雑である。淋菌 FA19 *PonA* タンパク質の N 末端配列決定は、次のメチオニンが、この菌株における好ましい出発部位であることを示した (Ropp ら, 1997, *J. Bacteriol.* 179:2783-2787)。上流のメチオニンコドンは、L-イントラセルラリスからのコードされる *PonA* タンパク質の推定上の開始部位として用いられた。【0208】*PonA* タンパク質の構造予測は、TMPred を用いて行われた。その TMPred プログラムは、膜に広がる領域およびそれらの配向の予測を行う (K. Hofmann & W. Stoffel, 1993. *TmBase - A database of membrane spanning proteins segments.* *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347:166)。この分析は、*PonA* が、そのタンパク質の NH₂ 末端に強力な膜貫通ドメインを有することを示す。*PonA* のアミノ末端は、既知のシグナル配列上で操作されるネットワークを用いる PSORT (6.4 バージョン) 計算機アルゴリズムによっても調べられた。この分析は、残基 16 ~ 32 が、切断できないシグナル配列 (D.J. McGeoch, *Virus Research*, 3: 271, 1985 および G. von Heijne, *Nucl. Acids Res.*, 14: 4683, 1986) として作用すると考えられる膜貫通領域 (P. Klein ら, 1985, *Biochim. Biophys. Acta*, 815:468) を形成すると考えられることを示している。したがって、*PonA* のアミノ末端は、細菌の内膜にタンパク質を固定すると考えられ、それは、他のペニシリン結合タンパク質の局在化の方法と似ている。【0209】*PonA* タンパク質は、他の細菌で識別されるクラス A 高分子質量ペニシリン結合タンパク質 (PBP) との相同性を有する。ペニシリン結合タンパク質は、ペプチドグリカン合成の最終段階に関与する細菌の細胞質膜タンパク質である。それらクラス A タンパク質は、概して、グリカン鎖を重合するグリコシルトランスフェラーゼおよびこれら鎖をそれらのペプチド側鎖によって架橋するトランスペプチダーゼの 2 種類の酵素活性を示す。これらの反応は、細胞質膜の外表面でかまたは更に外側で触媒されるので、ペプチドグリカン合成に関与するタンパク質の主要部分は、ペリプラズム中に局在している。*PonA* タンパク質の推定上のアミノ酸配列 (配列番号: 6) を、BLASTp アルゴリズム (Altschul, S.F. ら, 1997, 上記) によって GenBank に報告された他のタンパク質と比較し、CLUSTAL W アルゴリズム (Thompson ら, 1994, 上記) によって整列させた。図 5 に示されるように、この分析は、*PonA* が、ナイセリア・フラベセンス (Accn. AF087677) からのペニシリン結合タンパク質に最も似ていることを示した。*PonA* は、クラス A 高分子質量 PBP に特有の特徴を有する。アミノ酸 124 ~ 134 (RQGGSTITQQV) を含めた配列は、全てのクラス A 高分子質量 PBP 中で見出される QGAST ボックス

(Popham ら, 1994, *J. Bacteriol.* 176:7197-7205) として知られる高度に保存される共通アミノ酸配列に相当する。*PonA* の C 末端側の半分内に、ペニシロイルセリントランスフェラーゼスーパーファミリーの全メンバー中に高度に保存される三つの領域が見出される。これら領域には、残基 507 ~ 510 の活性部位セリンを含有する SXXK 四分子 (SAFK)、残基 565 ~ 567 の SXN 三分子 (SRN) および残基 688 ~ 691 の KTS)G 四分子 (KTG) が含まれる。これらモチーフは、折りたたまれたタンパク質中で互いに近づけられて、 β -ラクタム抗生物質と相互作用するトランスペプチダーゼドメイン活性部位ポケットを形成すると考えられる。

【0210】L-イントラセルラリス *HtrA* タンパク質のペリプラズムセリンプロテアーゼタンパク質との類似性

HtrA のアミノ末端の検討は、アミノ酸 1 ~ 26 が疎水性であり且つ正に荷電していることを示し、それはシグナル配列の特徴を示している (von Heijm, 1985, *J. Mol. Biol.* 184:99-105)。既知のシグナル配列上で操作されるネットワークを用いる PSORT 計算機アルゴリズム (Nakai, K., 1991, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 11:95-110) は、残基 1 ~ 26 が典型的なシグナル配列として機能すると考えられることを示し、アミノ酸 26 と 27 との間の最も可能性のある切断部位を予測する。したがって、アミノ酸 1 ~ 26 は、成熟過程中に *HtrA* から除去されると考えられる。

【0211】*HtrA* タンパク質の推定上のアミノ酸配列 (配列番号: 7) を、BLASTp アルゴリズム (Altschul, S.F. ら, 1997, 上記) によって GenBank に報告された他の既知のタンパク質と比較し、CLUSTAL W アルゴリズム (Thompson, J.D. ら, 1994, 上記) によって整列させた。この分析は、ペリプラズムセリンプロテアーゼの大きい *HrtA* / *DegP* ファミリーに属する *HtrA* を示した。報告されるタンパク質には、特に、大腸菌、ネズミチフス菌、カンピロバクター・ジジュニ (*Campylobacter jejuni*)、インフルエンザ菌、マルタ熱菌 (*Brucella melitensis*)、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*)、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*)、エルジニア・エンテロコロリティカ (*Yersinia enterocolitica*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) から識別されるものが含まれる。ある場合には、*HtrA* 同族体は、熱ショックタンパク質と称され、高温での細菌の生存または細胞内病原体の生存に必要であることが欠失分析によって示されてきた。他の場合には、*HtrA* 同族体は温度によって生じないが、他の生理学的ストレスにตอบสนองして発現される。いくつかの *HtrA* 同族体は、セリンプロテアーゼ活性を有することが示されており、多くの場合、細菌ビルレンスおよび

ノまたは細胞内生存に、例えば、高温、過酸化水素、酸化および浸透圧ストレスへの耐性に重要である。

【0212】*L. イントラセルラリス* HtrAタンパク質と緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (Accn. # U32853) からの最も類似した相対物との整列は、それら二つのタンパク質が、40%一致するアミノ酸残基を有することを示す(図6に示される)。*L. イントラセルラリス* HtrAタンパク質と他のセリンプロテアーゼとの整列に基づき、ヒスチジン-109、アスパラギン酸-143および活性部位セリン-217を含めた特に十分に保存される残基は、細菌および哺乳動物のセリンプロテアーゼ中に高度に保存される残基の触媒性三分子を形成すると考えられる。多数のHtrA同族体は、カルボキシル末端RGDモチーフを含有するが、他はRGNモチーフを含有することが示されている。*L. イントラセルラリス* HtrAタンパク質は、残基458~460に類似のモチーフを含有する(RNG)。RGDモチーフは、哺乳動物接着性タンパク質の細胞結合部位として識別されている(Ruoslanti, E. ら, 1986, *Cell* 44:517-518)。セリンプロテアーゼのHtrA/De20 gPファミリーは、一定範囲のストレス応答中におよび*L. イントラセルラリス*による感染中に生じ、HtrAの表面発現は、ストレス応答機序の一部として起こりうる。他の細胞内熱ショックタンパク質は、生理学的ストレス条件下で表面に発現された状態になることが示されており、接着性因子として関係している(Ensgraber, M. ら, 1992, *Infect. Immun.* 60:3072-3078 および Hartmann, E. ら, *Infect. Immun.* 65:1729-1733)。

【0213】HtrAプロモーター領域の分析および温度に応じた誘導

*L. イントラセルラリス*領域Aおよび領域Bの遺伝子配置は、それらのコードされるタンパク質の間の遺伝子間スペーシングの程度に関して異なる。領域Aとは異なり、領域B内のORFは、より遠く離れている。例えば、flgE、ponA、htrAおよびhypC遺伝子は、それぞれの読み取り枠の間が約125、200および265ヌクレオチドによって隔てられている。HtrAの直ぐ上流の200bp領域は、特に、いくつかのHtrAタンパク質同族体が、温度、酸化および浸透圧ストレスを含めた多数の異なる環境シグナルに応じて生じることが分かっている。プロモーター領域を見つけるためにより詳細に検討された。HtrAの上流の配列番号: 2のヌクレオチド配列の検討は、ヌクレオチド2797~2802(TTGATA; -35領域)およびヌクレオチド2824~2829(TATAAT; -10領域)にほぼ位置するプロモーターを示した。これら二つの六量体は、21ヌクレオチドスペースによって隔てられ、共通の70型プロモーターにほぼ完全な相同性を有する。他のプロモーター因子はこの領域中に存在することができ、種々の環境シグナルに応じてHtrA

発現を調節する。プラスミドpER434は、HtrA ORFおよびHtrAプロモーター領域を含有し、30かまたは37で成長する大腸菌宿主細胞に温度依存性表現型を与える。したがって、HtrAの上流の領域は、温度に応じた可能性のある機能的プロモーターとして認識されうる。したがって、HtrAプロモーターを用いて、温度に応じて大腸菌および他の微生物における異種タンパクの発現を機能的に調節することは可能ではなくである。他の環境因子に応じて発現を調節する他のプロモーター因子の存在は、それら他のシグナルを用いて発現を調節することを可能にすると考えられる。

【0214】実施例3: プラスミドの製造および寄託材料

*L. イントラセルラリス*領域Aを包含するDNAフラグメント含有プラスミドlysS、ycfW、abc1およびomp100遺伝子を示す*L. イントラセルラリス*ゲノム領域を含有するプラスミドを製造した。lysS遺伝子とycfW遺伝子の一部分とを包含する2.6kbフラグメントを、プライマーER246(配列番号: 97)およびER254(配列番号: 98)を用いて増幅させ、ycfW遺伝子の一部分および完全なabc1遺伝子フラグメントを包含する0.87kbフラグメントを、プライマーER229(配列番号: 73)およびER206(配列番号: 66)を用いて増幅させた。これらフラグメントは、実施例1に記載のように、“*L. イントラセルラリス*領域Aを包含するサブゲノムDNAフラグメントの特異的PCR増幅”の下で増幅した。それら2.6kbおよび0.87kb DNAフラグメントを、スピノクロマトグラフィー(QIAquickTM)を用いた抽出によって単離し、PCR2.1 TopoのTAクローニング部位中に挿入した。ベクター特異的配列決定用プライマーを用いた単純配列伸長反応は、クローン化されたフラグメントの端点を確認し、そしてプラスミドpT068中のlysSおよびycfW並びにプラスミドpER438中のycfWおよびABC1をコードしている遺伝子が、ラクトースプロモーターに相対して反対の配向にあることを示した。

【0215】omp100遺伝子を含有する2.97kb DNAフラグメントを、PCRによって特異的5'および3'プライマーER187(配列番号: 54)およびER170(配列番号: 42)を用いて増幅させた。PCR反応は、三重に行われ、50μlの最終試料容量中に鋳型としての1μl DNA抽出物、1×PCR Buffer II、1.5mM MgCl₂、各200μMのデオキシNTP、各50ピコモルのプライマーおよび2.5U AmpliTaq Gold 熱安定性ポリメラーゼを含有した。増幅条件は、95°で9分間の変性後、33サイクルの変性(95° 30秒間)、アニーリング(62° 30秒間)および重合(72° 3分間)から成った。72°で7分間の最終伸長は、標的遺伝子領域の増幅を完

全にした。増幅後、三重の試料をそれぞれプールし、その特定の生産物を、スピנקロマトグラフィー(QIAquick™)を用いた抽出によって単離し、pCR2.1TopoのTAクローニング部位中に、ラクトースプロモーターに相対して反対の配向で挿入した。このプラスミド構築物をpER440と称した。

【0216】プラスミドpER438およびpER440を、大腸菌TOP10細胞(Invitrogen, カールズバット, CA)中に導入した。得られたPz438およびPz440と称される菌株を、1999年9月9日にATCC(10801 University Blvd, マナッサス, VA, 20110, 米国)に寄託し、受託番号PTA-638およびPTA-640をそれぞれ付与された。プラスミドpT068を大腸菌TOP10細胞中に導入し、得られた菌株を2000年7月14日にATCCに寄託し、受託番号PTA-2232を付与された。

【0217】L.イントラセルラリス領域Bを包含するDNAフラグメント含有プラスミドponA、htrAおよびhypC遺伝子を示すL.イントラセルラリスゲノム領域を含有するプラスミドを製造した。それらponA、htrAおよびhypC遺伝子フラグメントを、上の実施例2の“L.イントラセルラリス領域Bを包含するサブゲノムDNAフラグメントの特異的PCR増幅”と題する項目に記載のように、ponA遺伝子に隣接するプライマーER228(配列番号:72)およびER190(配列番号:57); htrA遺伝子に隣接するプライマーER207(配列番号:67)およびRA134(配列番号:78); およびhypC遺伝子に隣接するプライマーER189(配列番号:56)およびER196(配列番号:62)を用いて増幅させた。得られたponA含有2.98kbフラグメントを、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1Topo中にクローン化してプラスミドpER432を生じた。得られたhtrA含有1.72kbフラグメントを、スピנקロマトグラフィー(QIAquick™)を用いた抽出によって単離し、pCR2.1TopoのTAクローニング部位中に挿入してプラスミドpER434を生じた。hypCと、ORF1のC末端の94アミノ酸をコードしている追加の隣接するヌクレオチドを含有する得られた0.98kbフラグメントを、スピנקロマトグラフィー(QIAquick™)を用いた抽出によって単離し、pCR2.1TopoのTAクローニング部位中に挿入してプラスミドpER436を生じた。ベクター特異的配列決定用プライマーを用いた単純配列伸長反応は、クローン化されたフラグメントの端点を確認し、そしてPonAおよびHypCをコードしている遺伝子が、ラクトースプロモーターに相対して反対の配向にあることを示した。HtrA遺伝子を、ラクトースプロモーターに相対して同じ配向でクローン化した。このようなプ

ラスミドを含有する細胞は、37で不安定な表現型を示し、それは、30で成長を維持した場合に軽減された。

【0218】プラスミドpER432、pER434およびpER436を、大腸菌TOP10細胞(Invitrogen, カールズバット, CA)中に導入した。得られたPz432、Pz434およびPz436と称される菌株を、1999年9月9日にATCC(10801 University Blvd, マナッサス, VA, 20110, 米国)に寄託し、受託番号PTA-635、PTA-636およびPTA-637をそれぞれ付与された。

【0219】実施例4:組換え体HtrAおよびOmp100タンパク質の大腸菌での発現

プラスミド発現ベクター

組換え体HtrAおよびOmp100の製造に用いられる発現ベクターは、pET-28b(+)(Novagen, Inc., マディソン, WI)であった。HtrAおよびOmp100タンパク質のコーディング配列を、L.イントラセルラリスに感染したブタ粘膜DNA抽出物から増幅させた。それらPCR産物を、JETsorb™キットを用いるアガロースゲル電気泳動にしたがって精製し、そしてpCR2.1Topo中にクローン化して、プラスミドpRL001(HtrA)およびpER415(Omp100)を生じた。HtrA ORFを増幅させるのに用いられた特異的PCRプライマーには、ER208(配列番号:68)およびRA133(配列番号:77)が含まれた。プライマーER208は、NdeI部位(CATATG)を導入するように設計されたが、HtrAシグナル配列を欠失していた。pRL001中に存在するHtrA挿入を、NdeIおよびEcoRIを用いた消化後、pET-28b(+)中にサブクローン化した。得られたpER405と称される発現プラスミドを、挿入されるフラグメントの5'および3'両末端において配列決定し、ベクターにコードされる6xHisリーダーとのインフレイム融合をコードすることを確認した。したがって、コードされるタンパク質の推定のアミノ末端配列は、ベクターによってコードされる配列MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM、その直後の、HtrA読み取り枠のアラニン-27で開始する配列ALPNFVPから成った。

【0220】Omp100 ORFを増幅させるのに用いられた特異的PCRプライマーには、ER216(配列番号:70)およびRA138(配列番号:79)が含まれた。プライマーER216は、NcoI部位(CCATGG)を導入するように設計されたが、Omp100シグナル配列を欠失していた。更に、ER216は、本明細書中に援用されるSungら, 1986, Proc.Nat.Hl.Acad.Sci. USA 83:561-565; Sungら, 1987, Meth.Enzymol. 153:385-389; および米国特許第5,460,954号からの情報に基づいて、組換え体タンパク質を

タンパク質分解から保護する“保護ペプチド”と称されるリーダーペプチドを規定した。アミノ酸配列MGTTT TTTTSLから成る保護ペプチドは、ER216の5'近位ヌクレオチド配列によってコードされた。pER415中に存在するOmp100インサートを、NcoIおよびEcoRIを用いた消化後、pET-28b(+)中にサブクローン化した。得られたpRL029と称される発現プラスミドを、挿入されるフラグメントの5'および3'両末端において配列決定し、保護ペプチドリーダーとのインフレーム融合をコードすることを確認した。したがって、コードされるタンパク質の推定の5'末端配列は、ER216の5'近位ヌクレオチド配列によって規定される配列MGTTTTTTTSL、その直後の、Omp100読み取り枠のアラニン-26で開始する配列ASKDDPSIVから成った。

【0221】組換え体タンパク質の発現

組換え体HtrAおよびOmp100をそれぞれコードしている、pET-28b(+)に基づく発現ベクターpER405およびpRL029を、発現宿主大腸菌BL21(DE3)中に導入した。この発現宿主は、IPTG誘導ファージT7プロモーターによって推進されるクローン化遺伝子の高レベル転写を可能にする遺伝子型F⁻, ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm(DE3)(Novagen, Inc.)を有する。それら大腸菌の形質転換細胞を、5L BioFlowTM3000発酵槽(New Brunswick Scientific, エディソン, NJ)中の50 μg/ml 硫酸カナマイシンを含有するSB#2培地(2.4%酵母エキス, 1.2%トリプトン, 0.5% K₂HPO₄, 0.25% KH₂PO₄, 0.14% MgSO₄)中において30~37 °Cで、A₆₂₅が2.5~30.1になるまで増殖させた。組換え体タンパク質発現は、1mM IPTGを用いた1~4.5時間の誘導後に得られた。

【0222】組換え体HtrAを発現する大腸菌の湿潤細胞を、10,000psi(2工程)でのホモジナイゼーションによって溶解させた後、遠心分離した。そのペレットはHtrAを含有し、それを、5:4比である2xRIPA/TETを用いて洗浄した。2xRIPAは、20mMトリス(pH7.4)、0.3M NaCl、2.0%デオキシコール酸ナトリウムおよび2%(v/v)Igepal CA-630TM(Sigma)である。TETは、0.1Mトリス(pH8.0)、50mM EDTAおよび2%(v/v)トリトンX-100である。次に、洗浄したペレットを、8M尿素、10mMトリス、0.1M NaH₂PO₄、pH7.0中に溶解させた。溶解したタンパク質を、8M尿素、10mMトリ*

*ス、0.1M NaH₂PO₄、pH7.0中で2倍に希釈し、Ni-NTAカラム(QIAGEN, サンタ・クラリタ, CA)上加えた。所望のタンパク質を、このカラムから、8M尿素、10mMトリス、0.1M NaH₂PO₄、pH4.5へのpHの減少によって溶出させた。最後にプールされた画分を、4MグアニジンHCl、50mMトリス、pH6.5に対して透析し、次の工程では、2MグアニジンHCl、25mMトリス、pH6.5に透析した。最終生成物を、0.22 μM濾過によって濾過した。タンパク質濃度は、SDS-PAGEによる70%の推定目視純度で0.56 mg/mlであった。

【0223】組換え体Omp100を発現する大腸菌の湿潤細胞を、DNA分解を容易にするために、リゾチーム、および BenzonaseTM(BenzonaseTM(EM Industries, Inc., ホーソーン, ニューヨーク))の存在下の音波処理を用いて溶解させた後、遠心分離した。そのペレットはOmp100を含有し、それを、2M尿素、50mMトリス、10mM EDTA、25mM DTT、1% Zwittergent 3-14を用いて2回洗浄した。そのペレットを、6M尿素、50mMトリス(pH8.0)を用いて再懸濁させた後、遠心分離した。そのペレットを、5:4比である2xRIPA/TETを用いて洗浄し、次に、その洗浄されたペレットを、8M尿素、50mMトリス(pH8.0)中に溶解させた。25mM DTTをその溶解したタンパク質に加え、8M尿素、25mM DTT、50mMトリス(pH8.0)を用いて2:1に更に希釈した。希釈された溶解タンパク質を、8M尿素、25mM DTT、50mMトリス(pH8.0)を用いて平衡されたQ-セファロースカラム上加えた。組換え体Omp100は、8M尿素、25mM DTT、50mMトリス(pH8.0)中の0~1M NaClの直線勾配で溶離した。プールされた画分を、6MグアニジンHCl、10mM DTT、50mMトリス(pH8.0)に対して透析し、次の工程では、4MグアニジンHCl、6.7mM DTT、33.3mMトリス(pH8.0)に透析した。最終生成物を、0.22 μM濾過によって濾過し、-70 °Cで凍結させた。次に、精製されたOmp100タンパク質を融解させ、遠心分離し(16,000rpm, 60分間)、そしてその上澄みに再度0.22 μM濾過を施して、不溶性粒子および凝集物を除去した。タンパク質濃度は、SDS-PAGEによる80%の推定目視純度で1.08 mg/mlであった。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Products Inc.
<120> LAWSONIA INTRACELLULARIS
PROTEINS, AND RELATED METHODS
AND MATERIALS

<130> PC10589A
<140>
<141>
<160> 102
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 6617
<212> DNA
<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 1
ggggaacgct acttaactta agttggtggt tatc
taaaca aaaccataca gtcaagcttt 60
ttatttttca agactcattt tatcttcttg acta
tcaagc tcttttgac taccgcta 120
taaatataga atacgcctta attgtattac tgga
gaagca ttcatgata cagaaaaaa 180
aatctcatcc cccaattaa ttagctacca agtc
acctca tgtatcttat tttaaacctc 240
tgcttgagag ccttgagaa aaaaatgagc ttaa
tgaagt tatcaaaaac tgtgtagtaa 300
aatcctgtga gcttttagac tcaggaattc ctct
ctacc agatgagttc gttaaagagc 360
attatgctgg tatgcttctg gctgaatag aagc
ctatag tgcatctgaa ctgaaatcac 420
tagacgaaat tttgcttgt gctggacgta ttat
ctctct ccggtcattt ggtaaagtaa 480
tattctttca tatcatggat agaagcggtc gcat
tcaatg ttatgcatct cgtgaaaata 540
tgggagaaga agcatttagt acattcaaaa agtt
tgatat tggtagacatt gttggtgta 600
atggaaaact tttccgtaca aaaatgggag aatt
aactct caactgctcc actatcacat 660
tattagctaa gtccttccgt tctttaccag aaaa
acataa tggccttact aacatagaac 720
ttaggtatcg ccagcgatat atagatctta ttgt
taatcc taaaacaaga gatattctta 780
gaaagcgtag taaaattatt catgaaatta gagg
attctt agaagaaaat ggctttatag 840
aagtagaaac acctattctt caacctattc cagg
tggtagc aatggcgcgt ccatttacta 900
cacataataa tgcaatggat atgacccttt atat
gcgcat tgctcctgaa ctctatttaa 960
agcggcttct tgttgggtgt tttgaaaac tatt
tgaatt aaatcgtagc ttccgtaatg 1020
aaggaatctc tatccaacat aatccagaat ttac
catgtg tgaattttac tgggcctatg 1080
caacatatct agatcttatg gaacttacag aaga
aatgtt tgcataacctt acaaaaaaaaa 1140
tctgtggtac tatgactata tcttaccag gaaa
tacaat cgattttaca cctgggacat 1200
ggcaaaaata tacatttcat gagtctcttg aaaa
aattgg tgggcattct ccagagtttt 1260

tgacacttct cttgcattta cttctcttaa tgca
gcaaga gaacttcttg gactacctca 2460
caattatatt tctggaatag aagtcagat tcat
gatgtg tatcaagcaa attatcac 2520
aaaccaactg caacaagagt taggtcataa tttt
tctgta cgaagctgga tggatatgaa 2580
tgcaaatita tttgcagcac ttaagcttga aaaa
attgga atgtttatta tattagctat 2640
ggttgttctc attggttctt tttctattgt taca
acatta attatgcttg taatggaaaa 2700
aacaagagat attgctattc taacctccat gggg
gctaca agccaaatga tccgtcgtat 2760
tttcatttta caaggaacta ttattggtat tgta
ggaact ttgctaggtt atctacttgg 2820
aattactctt gcacttttat tgcagaaata tcaa
ttcatt aaacttcccc ctgggtata 2880
tacaatagat cacttgccag tattacttaa ttgg
ctagat atattcatta ttggtacttc 2940
tgccatgcta ctatgttttt ttgctactct ctac
cctgcc catcaagcgg ctcgactaca 3000
gcctattgaa ggattaaggt acgagtaaaa atgt
cacaat atctattaga aatatagta 3060
aacagtatg acagtccttc tgaacctatt tgtg
tcttac ataaaataaa tctttctata 3120
gctcacggag aatcattagc tattattggt gcat
ctggtt ctgggaaatc aaccctattg 3180
catatccttg gagcattaga tatacctct tctg
gcaactg tgttatttaa taataaaaat 3240
ttaagtcata tgggcccaaa tgaaaaagca tgct
ttcgta ataaactact gggatttatt 3300
ttccaatttc acaacttact tccagaattc tctg
ctgaag aaaatgttgc aatgaaagct 3360
cttattgctg gtataccaaa aaagaaagct ctic
tgcttg cacgagaagc acttggtagt 3420
gtaggacttg aaaataaata ccatcacaga ataa
caatgt tgtcaggagg tgaacgtcaa 3480
cgtgtagcca tagctagagc tattttatta gaac
cccaag ttcttcttgc agatgaacca 3540
acaggcaacc ttgatcaaaa aacaggtgaa caca
ttgcca atcttctaat ctacttaat 3600
aaaactttta atataactct tattgtagtc acac
ataata atgatattgc ccattctatg 3660
ggacgctgcc ttgagctgaa gtccggagat ctac
atgaca aaacgcctga atatatctt 3720
tctactgtta ctgtgtaata tactttattg taat
ataata gccaatgctg ctcaaaaga 3780
cgatccttct attgtggttc tcccatttca aatt
aatggc tcatcaaatg atgaagatt 3840
acaaacagaa ctaccaatgc ttcttgcaac tgca
ttaaag aataagggat ttctgtcat 3900
ccctaataaa tctgcattaa atcttctata taaa
caaaa atctccaac ttaatatctc 3960
tactgcaaaa aaggtagctc acaactcca tgct

tggtgttgg tactcaacac attctaaatt tgg
gtttca ggaagtatct cagaaagaaa 5460
cttatgggga aaaggttata ttttaagat tga
ggtttt atttctagta agtcatcttc 5520
tcttgatctt tctttacca atcctcgtgt ttat
gataca gactttggct ttagtaataa 5580
catttatacg ctacgagatg aatgggatga ctic
cgtaaa aaaacttatg gagataccat 5640
acgtctatct caccctatag gagaatattc atct
atcttt gttggctatc gaattgatca 5700
atatcgtcta tatgatattc catctacagc acca
cgctct tatcttgact atcaaggga 5760
aaatatttct agttagtaaa gtgggtgttt tact
ttgat tctacagaca gtcgtgagag 5820
accatctaaa gggcatattg caaaactaat tgtt
gaatat ggaggtggg gtccttgggg 5880
taatgataac tcttcaagc caattgctga acta
caagga tttactcaa tttcaagaag 5940
taaaaacat ataatacatt ggcgtacacg tgca
ggtgca gcttataaga atagtaaaaa 6000
acctgtgcca gtatttgacc gatTTTTat tgg
ggtata gatagtatta gaggatatga 6060
tacagaagat ctgacacaa aagatcctcg cttt
ggagat gaaattggg gtgataggat 6120
ggcttttctt aacctagat atatttggac attc
cagcca gagctaggtc ttgcattagt 6180
tccattctat gacataggat tccaaacaga ttct
gtacaa acttctaacc cattctctaa 6240
actcaacaa tcatatggcc ttgaacttcg ctgg
cgttca ccaatgggag atttgcgatt 6300
tgctatggt ataccactca ataaaaatgt tagt
ggcaaa aaaactcgtg gtagatttga 6360
atTTTcaatg gggcaattct tctaataaca taat
ataact cataaaataa gagatactat 6420
aaatttaaag atgagagggt caggagccg cccc
ataaaa atgttgttat gccataacta 6480
ctgcactagg aatagatga atataacata ttct
cttcaa tgcaagcatg agcaacatca 6540
ttgtcgaca agccattgca atTTTatcca atta
tattta ttggaaaaa ctgTTatgga 6600
tacctatcct agcttac
6617

<210> 2

<211> 5445

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 2

ctaacgtaga catgagcaga gaaatggtta atat
gattat tattcaacgt ggttttcaga 60
tgaatagtaa atctgttaca acagcagaca caat
gctaca aaaagcactt gaactaaagc 120

ttagtaaagt tagtcaagaa ggtgcagaag tatt
ccttag tagcatttat aaagggtttg 1440
ttagttaga gactatgggt tgggcacgta aacc
taatcc agaagttcga tcagcttatt 1500
gtgctcctat caaagatgca cgtagtgttt taaa
tcctgg agatattata tgggtatctg 1560
gagttggccc agactctaca cataggtata gtic
taaaac actagatact tctaaaccta 1620
ttcctttagc tcttcaacag ttaccacaaa tcca
aggagc attaatttct atagagccaa 1680
atacaggcga tgtgatagct atgattggtg gtta
tgagtt tggaaagagc caatttaata 1740
gagctgtaca ggcaatgagg caaccaggtt ctgc
atttaa gccaatgtga tactctgcag 1800
cacttgatca tgattataca tctgcaacta tggg
gcttga tgcacctata gtagaattta 1860
tggaaagtgg ggatatttgg agaccaggtta atta
cgaaaa aaatttttaa ggaccaatgt 1920
tatttagcaa tgctcttgca ctttcaagaa attt
atgtac agtaagaatt gcacagtcta 1980
taggattacc tgctgttatt gaaagagcta aggc
tttagg attaatggt aatttccctg 2040
aatttttttc tattagttaa ggtgcagttg aagt
aactcc tattcgtctt gtaaatgcct 2100
atacagcatt tgcaaatggt ggtaacttag ccac
gccacg gtttattctt tctattaaag 2160
attctaataa tactgttatt taccgccagg aaat
agaaca acatcctgtt atttaccac 2220
agaatgcgta tattatggct tcaactattaa aaaa
tgttgt taatattggt acagcaagaa 2280
aagcaaaagt acttgagcgt cctctagcag gaaa
gacagg aactacaaat ggggagcatg 2340
atgcatgggt tattggattt acaccctatc ttgt
tacagg tgtttatgtt ggtaatgac 2400
atccacagac attaggtaaa gatggcacag gtgc
tgttgc tgctcttctt atttttacag 2460
aatattcaaa agtagtattg aaaaaatac ctga
aagtga ctttctgtt cctgatggga 2520
ttacttttgc ttcaatagat actcagacag ggaa
tagagc aactgctaat agtaccaata 2580
gtgttgattt acctttttat gtaggtacag ttcc
agaata tttgatagt aaagataatg 2640
aggtaatac tattgaacgt ggtgaggatt tatt
aaaaca atttttttaa ccatttttat 2700
gtagctgatt ataaaaatgg agtttgttac atat
tttttg ttatcattat cataagttat 2760
atztatatac tcaaatattg aggcaagtta gtat
ccttga taatatttca taagagctag 2820
atztatataa tacgtttatc ttatttttaa tccc
taatta ttcaaggttg atagttttaa 2880
ggagagttat atgttttga agttaaaggt gata
atatgc ataactctta tgtttattat 2940
aactgtggtt ccaacaattg cagaaagtgc cttt

ctttttata gtttgagctt gtttagagga tatt
 aatact atttttatct atcaatttta 4440
 taaataatat gttaggatat aagaaaagga taaa
 atgatt ttcatagata tagttattgt 4500
 attccatata gttactaatt attatgtgat acaa
 gaggggt aaaagtttgt taaaataat 4560
 atagaataaa ggataagttg atgtgtcatg ctat
 ccctgt aaaagttatt gaactgttgg 4620
 ataagatat tattcgtgct acggttggcg atag
 tacaac aatattgact gtttcaggta 4680
 tgttacttcc agaaccagta actggttgag atta
 tattat tgtgcatgct ggatttgcta 4740
 tacataaact ggaggcaact gaagctgaag aaag
 tttacg gttattcaga gagctttcta 4800
 ttgccgttgg tgatacacct aatttttaat tatt
 aatcta attaatagat aaagtagtta 4860
 gatacagtaa aagaaaaata ctagataggt gcaa
 tgaatt tttagttatt attatttgtt 4920
 agttctatta tgttgaatag tgcttgttgc ttca
 ggactt aatgcattat atacatttac 4980
 tgcttgttct tttgctttga gaagtaaagg agtc
 agtgtg ggctttgggc gtttttcaat 5040
 acgcattcca acgtatgtcc ctataggaaa agaa
 agaata atacggttaa gtttagacca 5100
 tgaagagggt acatccaag tacgcttagg acct
 agtaaa gtagagcgac aataaattct 5160
 acattcagga taaagctgct ttgtagacg aata
 agttgc caaggactca cccattgact 5220
 gtcttttttt ggttttttat gaagcagctg taat
 gtacta ttaatgatat gatttataga 5280
 ccatttattt gtgaatcaa caataatacc atca
 gatgca acacgaaatg ctctgctaa 5340
 aatttttttt ggatcttcaa catattctaa aata
 gtcact aatgatgcgt agttaaact 5400
 ttcacttca aatggaagat catctaaggc acct
 aattgg aattc 5445

<210> 3

<211> 427

<212> PRT

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 3

Met Lys Phe Glu Leu Phe Ile Ala Leu His
 Tyr Leu Phe Ala Arg Arg

1 5 10

15

Lys Gln Ala Phe Ile Tyr Leu Ile Ser Leu
 Met Ser Ile Leu Gly Val

20 25

30

Ala Ile Gly Val Ala Ser Leu Val Val Val
 Leu Gly Val Tyr Asn Gly

35 40

45

Phe Thr Ile Asp Ile Arg Asp Lys Ile Leu
 Gly Ala Asn Ala His Ile

Thr Gly Ile Phe His Thr Gly Met Phe Glu			
Tyr Asp Thr Ser Leu Ala			
210	215	220	
Phe Thr Ser Leu Asn Ala Ala Arg Glu Leu			
Leu Gly Leu Pro His Asn			
225	230	235	2
40			
Tyr Ile Ser Gly Ile Glu Val Ser Ile His			
Asp Val Tyr Gln Ala Asn			
	245	250	255
Tyr Ile Thr Asn Gln Leu Gln Gln Glu Leu			
Gly His Asn Phe Ser Val			
	260	265	270
Arg Ser Trp Met Asp Met Asn Ala Asn Leu			
Phe Ala Ala Leu Lys Leu			
	275	280	285
Glu Lys Ile Gly Met Phe Ile Ile Leu Ala			
Met Val Val Leu Ile Gly			
290	295	300	
Ser Phe Ser Ile Val Thr Thr Leu Ile Met			
Leu Val Met Glu Lys Thr			
305	310	315	3
20			
Arg Asp Ile Ala Ile Leu Thr Ser Met Gly			
Ala Thr Ser Gln Met Ile			
	325	330	335
Arg Arg Ile Phe Ile Leu Gln Gly Thr Ile			
Ile Gly Ile Val Gly Thr			
	340	345	350
Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Gly Ile Thr Leu			
Ala Leu Leu Leu Gln Lys			
	355	360	365
Tyr Gln Phe Ile Lys Leu Pro Pro Gly Val			
Tyr Thr Ile Asp His Leu			
370	375	380	
Pro Val Leu Leu Asn Trp Leu Asp Ile Phe			
Ile Ile Gly Thr Ser Ala			
385	390	395	4
00			
Met Leu Leu Cys Phe Phe Ala Thr Leu Tyr			
Pro Ala His Gln Ala Ala			
	405	410	415

Gly Ser Val Gly Leu Glu Asn Lys Tyr His
His Arg Ile Thr Met Leu

130 135 140

Ser Gly Gly Glu Arg Gln Arg Val Ala Ile
Ala Arg Ala Ile Leu Leu

145 150 155 1
60

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

165 170 175

Lys Thr Gly Glu His Ile Ala Asn Leu Leu
Ile Ser Leu Asn Lys Thr

180 185 190

Phe Asn Ile Thr Leu Ile Val Val Thr His
Asn Asn Asp Ile Ala His

195 200 205

Ser Met Gly Arg Cys Leu Glu Leu Lys Ser
Gly Asp Leu His Asp Lys

210 215 220

Thr Pro Glu Tyr Ile Ser Ser Thr Val Thr
Val

225 230 235

<210> 5

<211> 896

<212> PRT

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 5

Met Thr Lys Arg Leu Asn Ile Phe Leu Leu
Leu Leu Leu Cys Asn Ile

1 5 10 15

Leu Tyr Cys Asn Ile Ile Ala Asn Ala Ala
Ser Lys Asp Asp Pro Ser

20 25 30

Ile Val Val Leu Pro Phe Gln Ile Asn Gly
Ser Ser Asn Asp Glu Glu

35 40 45

Leu Gln Thr Glu Leu Pro Met Leu Leu Ala
Thr Ala Leu Lys Asn Lys

50 55 60

Gly Phe Arg Val Ile Pro Asn Lys Ser Ala
Leu Asn Leu Leu Tyr Lys

65 70 75 80

Gln Asn Ile Ser Gln Leu Asn Ile Ser Thr
Ala Lys Lys Val Ala Gln

Leu Leu Val Phe Thr Val Gln Glu Lys Pro
 Lys Ile Thr Asp Val Val
 225 230 235 2
 40
 Val Gln Gly Ser Lys Ala Val Ser Ile Asp
 Asn Ile Leu Ala Ala Met
 245 250 255

 Ser Ser Lys Lys Gly Ser Val Ile Ser Asp
 Arg Leu Leu Ser Gln Asp
 260 265 270

 Ile Gln Lys Ile Thr Asp Leu Tyr Arg Lys
 Glu Gly Tyr Tyr Leu Ala
 275 280 285

 Glu Val Asn Tyr Glu Ile Lys Glu Lys Glu
 Asn Thr Ser Ser Ala Thr
 290 295 300

 Leu Leu Leu Thr Val Asn Glu Gly Lys Lys
 Leu Tyr Ile Lys Asp Val
 305 310 315 3
 20
 Arg Ile Glu Gly Leu Glu Thr Ile Lys Ala
 Lys Thr Leu Lys Lys Glu
 325 330 335

 Leu Ala Leu Thr Glu Arg Asn Phe Leu Ser
 Trp Phe Thr Gly Thr Gly
 340 345 350

 Val Leu Arg Glu Glu Tyr Leu Glu Arg Asp
 Ser Ile Ala Ile Ser Ala
 355 360 365

 Tyr Ala Met Asn His Gly Tyr Val Asp Ile
 Gln Val Ala Ser Pro Glu
 370 375 380

 Val Thr Phe Asn Glu Lys Gly Ile Val Ile
 Thr Phe Arg Val Lys Glu
 385 390 395 4
 00
 Gly Lys Arg Tyr Lys Ile Gly Lys Ile Asp
 Phe Lys Gly Asp Leu Ile
 405 410 415

 Glu Thr Asn Glu Gln Leu Leu Lys Val Thr
 Lys Ile Asp Asp His Lys
 420 425 430

 Asn Tyr Glu Gln Tyr Phe Ser Leu Ser Val

Gly Phe Ser Asn Asn Ile Tyr Thr Leu Arg
 Asp Glu Trp Asp Asp Phe
 625 630 635 6
 40
 Arg Lys Lys Thr Tyr Gly Asp Thr Ile Arg
 Leu Phe His Pro Ile Gly
 645 650 655

Glu Tyr Ser Ser Ile Phe Val Gly Tyr Arg
 Ile Asp Gln Tyr Arg Leu
 660 665 670

Tyr Asp Ile Pro Ser Thr Ala Pro Arg Ser
 Tyr Leu Asp Tyr Gln Gly
 675 680 685

Lys Asn Ile Ser Ser Val Val Ser Gly Gly
 Phe Thr Phe Asp Ser Thr
 690 695 700

Asp Ser Arg Glu Arg Pro Ser Lys Gly His
 Ile Ala Lys Leu Ile Val
 705 710 715 7
 20
 Glu Tyr Gly Gly Gly Gly Leu Gly Gly Asn
 Asp Asn Phe Phe Lys Pro
 725 730 735

Ile Ala Glu Leu Gln Gly Phe Tyr Ser Ile
 Ser Arg Ser Lys Asn His
 740 745 750

Ile Ile His Trp Arg Thr Arg Ala Gly Ala
 Ala Tyr Lys Asn Ser Lys
 755 760 765

Lys Pro Val Pro Val Phe Asp Arg Phe Phe
 Ile Gly Gly Ile Asp Ser
 770 775 780

Ile Arg Gly Tyr Asp Thr Glu Asp Leu Ala
 Pro Lys Asp Pro Arg Phe
 785 790 795 8
 00
 Gly Asp Glu Ile Gly Gly Asp Arg Met Ala
 Phe Leu Asn Leu Glu Tyr
 805 810 815

Ile Trp Thr Phe Gln Pro Glu Leu Gly Leu
 Ala Leu Val Pro Phe Tyr
 820 825 830

65	70	75	80
Ser Glu Met Ser Pro Phe Leu Pro Lys Ala			
Phe Leu Ala Ala Glu Asp			
	85	90	95
Ala Glu Phe Tyr Glu His Glu Gly Val Asn			
Pro Leu Ala Ile Ile Arg			
	100	105	110
Ala Phe Leu Ile Asn Leu Gln Ser Gly Thr			
Thr Arg Gln Gly Gly Ser			
	115	120	125
Thr Ile Thr Gln Gln Val Ile Lys Arg Leu			
Leu Leu Ser Pro Glu Arg			
	130	135	140
Ser Tyr Glu Arg Lys Ile Lys Glu Ala Ile			
Leu Ala Tyr Arg Leu Glu			
145	150	155	1
60			
Lys Tyr Leu Ser Lys Asp Glu Ile Leu Thr			
Ile Tyr Leu Asn Gln Thr			
	165	170	175
Phe Leu Gly Ala His Ser Tyr Gly Val Glu			
Ala Ala Ala Arg Thr Tyr			
	180	185	190
Phe Ala Lys His Ala Lys Asp Leu Ser Leu			
Ala Glu Cys Ala Leu Leu			
	195	200	205
Ala Gly Leu Pro Gln Ala Pro Ser Arg Tyr			
Asn Pro Tyr Lys Asp Pro			
	210	215	220
Glu Ala Ala Lys Ile Arg Gln Arg Tyr Ala			
Leu Arg Arg Leu His Asp			
225	230	235	2
40			
Val Gly Trp Ile Thr Gln Ala Glu Tyr Glu			
Glu Ala Leu Gln Glu Pro			
	245	250	255
Leu Tyr Phe Ser Ser Met Lys Glu Gly Leu			
Gly Ala Glu Ser Ser Trp			
	260	265	270
Tyr Met Glu Glu Val Arg Lys Gln Leu Val			
Ser Phe Leu Ser Lys Glu			
	275	280	285

465	470	475	4
80			
Val Ile Ala Met Ile Gly Gly Tyr Glu Phe			
Gly Lys Ser Gln Phe Asn			
	485	490	495
Arg Ala Val Gln Ala Met Arg Gln Pro Gly			
Ser Ala Phe Lys Pro Ile			
	500	505	510
Val Tyr Ser Ala Ala Leu Asp His Asp Tyr			
Thr Ser Ala Thr Met Val			
	515	520	525
Leu Asp Ala Pro Ile Val Glu Phe Met Glu			
Ser Gly Asp Ile Trp Arg			
	530	535	540
Pro Gly Asn Tyr Glu Lys Asn Phe Lys Gly			
Pro Met Leu Phe Ser Asn			
545	550	555	5
60			
Ala Leu Ala Leu Ser Arg Asn Leu Cys Thr			
Val Arg Ile Ala Gln Ser			
	565	570	575
Ile Gly Leu Pro Ala Val Ile Glu Arg Ala			
Lys Ala Leu Gly Phe Asn			
	580	585	590
Gly Asn Phe Pro Glu Phe Phe Ser Ile Ser			
Leu Gly Ala Val Glu Val			
	595	600	605
Thr Pro Ile Arg Leu Val Asn Ala Tyr Thr			
Ala Phe Ala Asn Gly Gly			
	610	615	620
Asn Leu Ala Thr Pro Arg Phe Ile Leu Ser			
Ile Lys Asp Ser Asn Asn			
625	630	635	6
40			
Thr Val Ile Tyr Arg Gln Glu Ile Glu Gln			
His Pro Val Ile Ser Pro			
	645	650	655
Gln Asn Ala Tyr Ile Met Ala Ser Leu Leu			
Lys Asn Val Val Asn Ile			
	660	665	670
Gly Thr Ala Arg Lys Ala Lys Val Leu Glu			
Arg Pro Leu Ala Gly Lys			

1	5	10	15
Ile Thr Val Val Pro Thr Ile Ala Glu Ser			
Ala Leu Pro Asn Phe Val			
	20	25	30
Pro Leu Val Lys Asp Ala Ser Lys Ala Val			
Val Asn Ile Ser Thr Glu			
	35	40	45
Lys Lys Ile Pro Arg Gly Arg Thr Glu Phe			
Pro Met Glu Met Phe Arg			
	50	55	60
Gly Leu Pro Pro Gly Phe Glu Arg Phe Phe			
Glu Gln Phe Glu Pro Lys			
65	70	75	80
Gly Pro Asp Ser Gln Ile His Lys Gln Arg			
Ser Leu Gly Thr Gly Phe			
	85	90	95
Ile Ile Ser Ser Asp Gly Tyr Ile Val Thr			
Asn Asn His Val Ile Glu			
	100	105	110
Gly Ala Asp Ser Val Arg Val Asn Leu Glu			
Gly Thr Ser Gly Lys Glu			
	115	120	125
Glu Ser Leu Pro Ala Glu Val Ile Gly Arg			
Asp Glu Glu Thr Asp Leu			
	130	135	140
Ala Leu Leu Lys Val Lys Ser Lys Asp Ser			
Leu Pro Tyr Leu Ile Phe			
145	150	155	1
60			
Gly Asn Ser Asp Thr Met Glu Val Gly Glu			
Trp Val Leu Ala Ile Gly			
	165	170	175
Asn Pro Phe Gly Leu Gly His Thr Val Thr			
Ala Gly Ile Leu Ser Ala			
	180	185	190
Lys Gly Arg Asp Ile His Ala Gly Pro Phe			
Asp Asn Phe Leu Gln Thr			
	195	200	205
Asp Ala Ser Ile Asn Pro Gly Asn Ser Gly			
Gly Pro Leu Ile Asn Met			
	210	215	220
Ser Gly Gln Val Val Gly Ile Asn Thr Ala			
Ile Met Ala Ser Gly Gln			
225	230	235	2
40			

Gly Leu Leu Val Val Ser Val Glu Pro Asn
 Lys Pro Ala Ser Glu Ala
 405 410 415

Gly Ile Arg Glu Gln Asp Ile Ile Leu Ser
 Ala Asn Leu Lys Pro Leu
 420 425 430

Gln Ser Ala Asp Asp Leu Ala Asn Ile Ile
 Cys Gly Asp Ala Lys Lys
 435 440 445

Lys Gly Val Ile Met Leu Gln Leu Gln Arg
 Asn Gly Gln Thr Phe Phe
 450 455 460

Lys Thr Leu Ser Leu Thr Glu Asp Ser Asn

465 470
 <210> 8
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Lawsonia intracellularis

<400> 8
 Met Cys His Ala Ile Pro Val Lys Val Ile
 Glu Leu Leu Asp Asn Asp
 1 5 10 15
 Ile Ile Arg Ala Thr Val Gly Asp Ser Thr
 Thr Ile Leu Thr Val Ser
 20 25 30

Gly Met Leu Leu Pro Glu Pro Val Thr Val
 Gly Asp Tyr Ile Ile Val
 35 40 45
 His Ala Gly Phe Ala Ile His Lys Leu Glu
 Ala Thr Glu Ala Glu Glu
 50 55 60
 Ser Leu Arg Leu Phe Arg Glu Leu Ser Ile
 Ala Val Gly Asp Thr Pro
 65 70 75 80

Asn Phe

<210> 9
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Lawsonia intracellularis

<400> 9
 Glu Phe Gln Leu Gly Ala Leu Asp Asp Leu
 Pro Phe Glu Asp Glu Ser

130

135

140

Thr Pro Leu Leu Leu Lys Ala Lys Glu Gln

Ala Val Asn Val Tyr Asn

145

150

155

1

60

Ala Leu Ser Pro Glu Ala Thr Ser Thr Ile

Gln His Asn Arg Thr Asn

165

170

175

Lys

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 10

agagtctggg ccaactccag

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 11

tacaccctat cttgttacag

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 12

aacttgccctc aatatttgag

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 13

tccatctcta gcaagaactg

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 14

ttcttgcccta ccgtctagag

20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 17
aatgaggcaa ccaggttctg
 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 18
attaccaaca taaacacctg
 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 19
caaggatact aactgcctc
 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 20
atttcttgaa agtgcaagag
 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 21
tcctgctgat aaggctggc
 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 22
aatcttgaa ggtacctcag
 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<211> 19
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 25
acaagcagc tttatcctg
19

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 26
ttcatttggg cccatgatgac
20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 27
cagaataaca atgttgcag
20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 28
attacgcctt gctgatggag
20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 29
tcgaattgat caatcgtc
20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 30
agtatatttg gacattccag
20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<211> 25
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 33
caacgtggat ccgaattcaa gcttc
 25

<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 34
ctatctatta taggactaat aggtc
 25

<210> 35
<211> 29
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 35
ggatgaaaca gggtatcagc ttgacatg
 29

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 36
ggctcttatt tttgggttag tagag
 25

<210> 37
<211> 31
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 37
cagcatcaga aactgtgaaa gaatgtttg c
 31

<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 38
ggatatttag ttatgacaga ttg
 23

<210> 39
<211> 24
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 39

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 41

ccttaaagta acaaaaattg atgac
26

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 42

gtaagctagg ataggtatcc
20

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 43

ggtgcttgat gcacctatag ta
22

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 44

tgccatacta cttgggatag cg
22

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 45

gtcaccaga atctttacca ggtgctc
27

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 46

gtttcaagtc cttcaattcg gacatc
26

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Lawsonia intracellularis

<400> 47

gttttagctt ttattgttc aagtcc

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 49

gagtttagag aatgggtag

20

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 50

ttggtacagc aagaaaagca a

21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 51

atctgaagaa atgattaac c

21

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 52

actaaaatat cctaattccc

20

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 53

ttgagctaaa tattgctgta ac

22

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 54

tgccattct atgggacgct g

21

<210> 55

<211> 29

<212> DNA

<213> *Lawsonia intracellularis*

<400> 55

ggtataccag caataagagc tttcattgc

agtttgtaa ggcacttct g
21

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 58
gaaagtgact ttctgttcc
20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 59
ttagtgctc attcttatgg
20

<210> 60
<211> 18
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 60
tcctttcaa cctgtcgc
18

<210> 61
<211> 22
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 61
gatacaagag ggtaaaagt tg
22

<210> 62
<211> 22
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 62
cttattcgtc taacaaagca gc
22

<210> 63
<211> 32
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 63
cgaccatgga acaggttatc agctttgaca tg
32

<210> 64

cgaccatggc acaatatcta ttagaaaata tag
33

<210> 66
<211> 34
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 66
gggtctagac gttattacac agtaacagta gaag
34

<210> 67
<211> 30
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 67
aagccatggt agctgattat aaaatggag
30

<210> 68
<211> 31
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 68
caccatatgg ccttaccaaa cttgtaccc c
31

<210> 69
<211> 27
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 69
caatcctggg aatgctggg gtccatt
27

<210> 70
<211> 62
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 70
ggccatgggt accaccacca ccaccacctc tctg
gcttca aaagacgatc cttctattgt 60
gg
2

<210> 71
<211> 35
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 71
ggccatggct tcaaaagacg atccttctat tgtg
g 35
<210> 72

<210> 74
<211> 28
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 74
ccataactac tgcactagga aatagatg
28

<210> 75
<211> 27
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 75
gccattcta tgggacgctg ccttgag
27

<210> 76
<211> 27
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 76
gtaagctagg ataggtatcc ataacag
27

<210> 77
<211> 33
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 77
ggctctagag ttagtgcta tcttcagtta aag
33

<210> 78
<211> 32
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 78
ggctctagag tattaatata cctctaaca gc
32

<210> 79
<211> 33
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 79
ggctctagag ttattagaag aattgcccc ttg
33

<210> 80
<211> 57
<212> DNA

<210> 82
<211> 22
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 82
tacaaaatta acaataaaat ac
22

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 83
agaatgtatg atatcctctc
20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 84
aggtattgga attgatcgac
20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 85
ggagagtgga gagatatcag
20

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 86
ctaaactctt tgaccttgac
20

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 87
aaagtttgta ggtatatctc
20

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 90
tccagaattt accatgtgtg
 20

<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 91
gatatgtgc ataggcccag
 20

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 92
atagtatccc ataccatgac
 20

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 93
tgcataacat tgaatgcgac
 20

<210> 94
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 94
ctttaaatag agttcaggag
 20

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

<400> 95
atagtatccc ataccatgac
 20

<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> Lawsonia intracellularis

Lys His Asn Gly Leu Thr Asn Ile Glu Leu
 Arg Tyr Arg Gln Arg Tyr
 180 185 190

Ile Asp Leu Ile Val Asn Pro Lys Thr Arg
 Asp Ile Phe Arg Lys Arg
 195 200 205

Ser Lys Ile Ile His Glu Ile Arg Ala Phe
 Leu Glu Glu Asn Gly Phe
 210 215 220

Ile Glu Val Glu Thr Pro Ile Leu Gln Pro
 Ile Pro Gly Gly Ala Met
 225 230 235 2
 40

Ala Arg Pro Phe Thr Thr His Asn Asn Ala
 Met Asp Met Thr Leu Tyr
 245 250 255

Met Arg Ile Ala Pro Glu Leu Tyr Leu Lys
 Arg Leu Leu Val Gly Gly
 260 265 270

Phe Glu Lys Leu Phe Glu Leu Asn Arg Ser
 Phe Arg Asn Glu Gly Ile
 275 280 285

Ser Ile Gln His Asn Pro Glu Phe Thr Met
 Cys Glu Phe Tyr Trp Ala
 290 295 300

Tyr Ala Thr Tyr Leu Asp Leu Met Glu Leu
 Thr Glu Glu Met Phe Ala
 305 310 315 3
 20

Tyr Leu Thr Lys Lys Ile Cys Gly Thr Met
 Thr Ile Ser Tyr Gln Gly
 325 330 335

Asn Thr Ile Asp Phe Thr Pro Gly Thr Trp
 Gln Lys Tyr Thr Phe His
 340 345 350

Glu Ser Leu Glu Lys Ile Gly Gly His Ser 72

【図面の簡単な説明】
 【図1】図1は、Lys S、355 f W、A B C 1 および
 Omp 1 0 0 タンパク質をコードしている遺伝子を含有
 する遺伝子クラスターAの配列およびSEP Gln Tyr His
 r AおよびHy p Cのタンパク質をコードしている遺伝子
 370 375

クラスターBの配列を示す。
 【図2】図2は、Y c f Wアミノ酸配列の列を、GenBan
 k データベースの検索で見出される最も類似した配列と
 一緒に示す。
 【図3】図3は、A B C 1アミノ酸配列の列を、GenBan
 380

Thr Thr Asp Lys Ile Gly Lys Leu Gln Ala

k データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図4】図4は、Omp100アミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図5】図5は、PonAアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図6】図6は、HtrAアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と*10

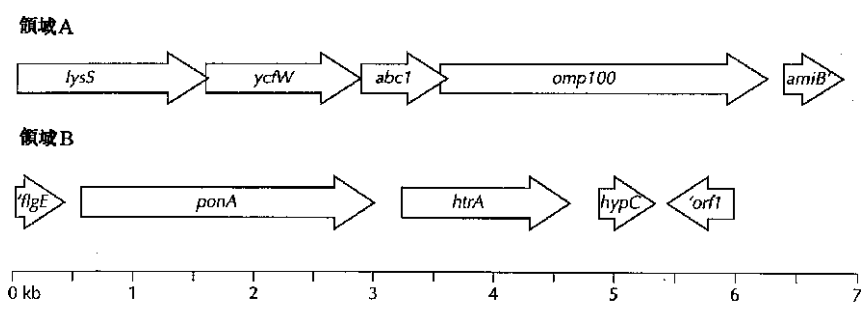
*一緒に示す。

【図7】図7は、HypCアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図8】図8は、Orf1アミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図9】図9は、LysSアミノ酸配列の列を、GenBank データベースの検索で見出される最も類似した配列と一緒に示す。

【図1】



【図2】

Li_Ycfw	---MKFELFIALHYLFARRKQAFIYLLSLMSILGVAIGVASLVVVVLGVYNGFTIDIRDKI	57
AJ235272	MINNNSFNIAFRYFRACKNEKFSVSIIAAFSLVGVMIQVAALIVVMSVMNGPHLELTKNI	60
	:*	
Li_Ycfw	LGANAHIITGNFDSPIIEPTSFTQLSTTSMLSQNALIILNKLQQTSAIIGATPFIYAEC	117
AJ235272	IGLNGDIVINRQGDN-----IDNVEEIKTTLKQDVVKHVTYIAHGQALALGK-----	158
	:* * . * . * . : * . : . * : * . * : : . : : : * : . .	
Li_Ycfw	MISSPHGVKGLILRGIDPSSAQNVISMLSHLTKGNLEDLIPKVLGTPDGIIIGNELAQRL	177
AJ235272	---SNN--SGVLVKGIKLNDSLNRNGIFKNVNFSGFDNFHGKNV-----IALGEQLASNL	158
	* : . * : : * : : : : . * : : : * : * : : * : : * : : * . .	
Li_Ycfw	NVTIGSRVLLSPTGQKTSSTGFPRIPLIVTGIFHTGMFEYDTSLAFTSLNAARELLGL	237
AJ235272	GVTVGEKLRILISPSNVSTAFGSIIPRSKEFQIIAIFNSGMYDYDLTTILMPLTAAQNFLSL	218
	. * : * . : : * . * . * : * * : : : . * : : * : * : * : : . * . * : : * . *	
Li_Ycfw	PHYTISGIEVSIHDVYQANYITNQLQOELGHNFVRSWMDMNANLFAALKLEKIGMFII	297
AJ235272	G-NDINSIEINSLDPQAI TYSYKIQSLGPNLYVFNWKTLSQFLSALAVERTAMFTIL	277
	* * . * . * . * * * : : * . * * * : * * * : * : * : : * : * : * * * *	
Li_Ycfw	AMVVLIGSFSIVTTLIMLVMEKTRDIAILTSMGATSQMIRRIIFILQGTIIGIVGTLGYYL	357
AJ235272	SLIITVAAFNIIISNLFMLVKDKTSDIAILRTMGASTQIMVIFIYNGMFIGLGLTTLGVI	337
	: : : : . : * . * : : * . * * * * * * * * * : : * * * * * * * * * * * *	
Li_Ycfw	LGITLALLLQKYQ-----FIKLPVGVYTIIDHLPVLLNWLDFIIGTSAMLLCFFATL	409
AJ235272	LGVTFSYNIQTIKNYLERITGIKIFEAAIYFLYSLPSKVKTDDIILITSLSIILCFLATI	397
	** . * . : * . : : : . : * : * * : : * * * : * : : * * * * * *	
Li_Ycfw	YPAHQAAARLQPIEGLRYE	427
AJ235272	YPSYRASKLNPVDALRYE	415
	** : : * . * : : * . * * * *	

【図3】

```

Li_ABC1 MSQYLLLENIVKQYDSPSEPICVLHKINLSIAHGESLAIIGASGSGKSTLLHLLGALDIPS 60
AE000212 ---MQCDNLCKRYQEGSVQTDVHLHNVSFVSGEGEMMAIVGSSGSGKSTLLHLLGGLDTPT 57
          :*: *:*. *      ***: :*: :*. ** :*: :*:*****:*. * * *
Li_ABC1 SGTVLFNNKNLSHMGPNKACFRNKLLGFIFQFHLLPEPSAENVAMKALIAGIPKKA 120
AE000212 SGDVIFNGQFMSKLSAAKAELRNQKLGFIYQFHLLPDPFTALENVAMPLLIIGKKKPAEI 117
          ** *:*. : :*: :. * * :*: :*: :*: :*: :*: :*: * * * * *
Li_ABC1 LLLAREALGVSGLNKYHHRITMLSGGERQRVATARAILLEPQVLLADEPTGNLDQKTGE 180
AE000212 NSRALEMLKAVGLDHRANHRPSELGGERQRVATARALVNNPRLVLADEPTGNLDARNAD 177
          * * * :*: : : * * : *****: : : : : : : : : : : : :
Li_ABC1 HIANLLISLNKTFNITLIVVTHNNDIAHSMGRCLELKSGLDLDKTPPEYISSTVTV 235
AE000212 SIFQLLGELELNRLQGTAFVTVTHDLQAKRMSRQLEMRDGRLELAEKSLMGAE--- 228
          * :* * :* * : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

【図6】

```

Li_HtrA MFCKLKVIICITLMFIITVVPTIAESALPNFVPLVKDASKAVVNISTEKKIPR--GRTE 57
U32853 -MHTLKRCMAAMVALLALSLAMTARAELPDTPLVEQASPAVVNISTRQKLPDRAMARGQ 59
          : : * * : : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA FPMEMFRGLPPGFERFFEQFEPKGPDSQIHKQR--SLGTGFISSDGYIVTNNHVIEGA 114
U32853 LSIPLDEGLPPMFRDFLERSIPQVPRNPRGQREAQSLGSGFIISNDGYILTNHVVADA 119
          : : : : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA DSVRVNLEGTSGKEESLPAEVIGRDEETDLALLKVSKRDSLPLYLIFGNSDTMEVGEWVLA 174
U32853 DEILVRLSDRS--E--HKAKLIGADPRSDVAVLKIEAKN-LPTLKLGDNSKLVGEWVLA 174
          * : * : * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA IGNPFGLGHTVTAGILSAKGRDIHAGPPDNFLQTDASINPGNSGGPLINMSGQVVGINTA 234
U32853 IGSFPGFDHSVTAGIVSAKGRSLENEYSVVFIQTDVAINPGNSGGPLLNQGEVVGINSQ 234
          * * : * * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA IMAS-G--QGIGFAIPSSMADRIIEQLKTNKKVSTGWIGVTIQDVTNTAKALGLSQAKG 291
U32853 IFRSGGFMLSFSAIPIDVALNVADQLKAGKGVSTGWLGVVIQEVNKDLAESFGLDKPSG 294
          * : : * * * : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA ALVGSVVPDGPADKAGLVGDIVTQADGKQIDSASSLLKAIATKPPFSVVKLVWRDGS 351
U32853 ALVAQLVEDGPAKAGLQVGDVILSLNGQSINESADLPHLVGNMKGPGDKINLDVIRNGQR 354
          * * * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA KDISITLGER---KTTSSQKQSSPESLPGALGLSVRPLTQEEESKSFVVKLGIGLLVSV 407
U32853 KSLSMVAGSLPDDDEEIASMGAPGAERSSNRLGVTVADLTAEQRKSLDIQG--GVVIKEV 402
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA EPNKPASEAGIREQDIILSANLPLQSADDLANIICGDAKKKGVIMLQLQRNGQTFKTL 467
U32853 Q-DGPAAVIGLRPGDVITHLDNKAVTSTKVFADVAKALPKNR-SVSMRVLRQGRASFITF 470
          : : * * : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Li_HtrA SLTEDSN 474
U32853 KLAE--- 474
          * : *

```


【図5】

Li_PonA	-MKQVISFDMKKFFLNIVIFCFGIILLSIIGLIGLYFWVSRDLPNITKLNDRPALVTTV	59
AF087677	MIKKIITTCMG---LNGLALFGVGLIAITLV-----TYPKLP SLDLQHYKPKLPLTI	52
	:*::*: * ** : **:*::* . .**.:*::* * * *:	
Li_PonA	LARDGTLIGYIYREKRFLIPLSEMSPFLLPKAFLAAEDAIFYHEGVNPLAIRAFLINLQ	119
AF087677	YSSDGQVIGVYGEQRREFTKIDDFPKILKDAVIAAEDKRFYDHWGVDVWGVARAVIGNVM	112
	: ** :** .:.* : .:.. :* .*.***** .**:* ** : .: **.: *	
Li_PonA	SGTTRQGGSTITQVVIKRLLLSPERSYERKIKEAILAYRLEKYLKDEILTIYLNQTFLG	179
AF087677	AGGVQSGASTITQVAKNFYLSERSFTRKFNEALLAYKIEQSLSKDKILELYFNQIYLG	172
	:* .:.*.***** * .: **.***:*::*:*:*:*:*:*:*: **.*** :*:*:*:**	
Li_PonA	AHSYGVEAAARTYFAKHAKDLSLAECALLAGLPQAPSRYPYKDEAAKIRQRYALRLRH	239
AF087677	QRAYGFASAAQTYFNKNVNDLTLAEAAMLAGLPKAPSAYNPIVNPRAKLRQAYILNML	232
	:**.* **:*** * .:***:***.*:*****:*** ** * ** **:* **:* * * .:.	
Li_PonA	DVGWITQAEYEALQEPLYFSSMKEGLGAESSWYMEVVRKQVLSFSLKENISQYGVIVLPL	299
AF087677	EEGMITLQQRDQALKEELHYERFVNIDQSALYVAEMARQEL--F-----E-K	277
	: * ** : .:*** * * .: .: .: .: .: * .:*:* *	
Li_PonA	YGEDALYELGFTIQTAMPQALVAYDVLNRNGLENFSK---RQGWKGP I EHSSTMIQHY	356
AF087677	YGEDA-YTQGFVYTTVDTAHQRVATEALRKLVRNFRGSSYRGAENYIDLKSDNVEET	336
	***** * **.:*:* . * ** .:***: * .**.: :* .: * : .* .:.	
Li_PonA	LENATFTPEKLDGGAWAKAIVSKVSEGAEVFLSSIYKGFVSVETMGWARKPNPEVRSAY	416
AF087677	VSQYLSTLYTVD--KMIPAVVLEASRKGVIQLPSGRKVTLNNHALGFA-----ARAVN	388
	:. : * .:* * : * : * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
Li_PonA	CAPIKDARSVLNPGDIWVSGVGPDPSTHRYSSKTLDTSKPIPLALQQLPQIQGALISIEP	476
AF087677	NEKMGDDR--IRRGSVIRVKGSG-D-----TFTVVQEPLLQCALVSLDA	429
	: * * .: .:* * * * * .: .: * * :***:*:..	
Li_PonA	NTGDVIAMIGGYEFGKSQFNRAVQAMRQPGSAFKPIVYSAALDHDYTSATMVLDAPIVEF	536
AF087677	KTGAVRALVGGYDYHSKTFNRATQAMRQPGSTFKPFIYSAALAKGMTASTMINDAPISLP	489
	:** * * .:***.: . *****.*****.***:***** .: .:*:**: ****	
Li_PonA	ME--SGDIWRPGNYEKNFKGPMFLFSNALALSRNLCTVRIAQSIGLPAVIERAKALGFNGN	594
AF087677	GKGANGKAWNPKNSDGRYAGYITLRQALTASKNMVSIKILMSIGIGYAQQYIQRFGPKPS	549
	: .* .* * * : : * : :***: *:*: :** ***: .: : :**:	
Li_PonA	-FPEFFSISLGAVEVTPIRLVNAYTAFANGGNLATPRFILSIKDSNN-TVIYRQIEIQHP	652
AF087677	EIPASLSMALGAGETPLRIAEGYSVFANGGYKVS AHVIDKIYDSQGRRLRAQMQLVAGE	609
	:* .*:*** * **:*:.*:***** .:.* * **.: *	
Li_PonA	---VISPQNAYIMASLLKNVNVNIGTARKAKVLERP-LAGKTGTNGEHDWAFIGFTPYL	707
AF087677	NAPQAI DPRNAYIMYKIMQDVVRVGTARGAATLGRSDIAGKTGTNDNKDAWVGFNPNV	669
	:* .:***** .:..*:*:***** * * * .:*****.:***:* * *	
Li_PonA	VTGVYVGNHPQTLGKDTGAVAALPIFTEYSKVVLLKYPESDFVDPDGI TFASIDTQTG	767
AF087677	VTAVYIGFDKPRSMGRAGYGTIAVPVWVEYIGFALKGTSVKPMKAPEGVVTNGGEVYMR	729
	.* * * .:.*: * * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
Li_PonA	NRATANS---TNSVLP-----FYVGTVPEYFDKSDNEVNTIERGED	806
AF087677	ERMTTSSDLALDNSGIRPRPTQPARRAVPNENRRRAESNTAPAREBDET PVLPSNTGNN	789
	:* **.* ** : * .: * * :* .: * .: * .: * .: *	
Li_PonA	---LLKQFF	816
AF087677	NRQQLDSL	798
	* .:.*	

【図8】

```

Li_ORF1 -----
U67555  MNVFDKYAEEYDKWFDENEIYKSEIEALKRHHPKGRGLEIGVGTGRFAKPNKIKGVDI 60

Li_ORF1 -----EFQLGALDDLPFEDESFNYSALVTILEVVEDPKKILAEAFRVASDG- 46
U67555  SKEMAKIAEKRGIKVIIAKGEDLFPKDEBDFPLINTVLEFAENPKKMIIEAKRVLKRGG 120
      . . . :***:*:* : : *:*:*:*:* : * * * . *

Li_ORF1 ~IIVGFTNKWSINHIINSTLQLLHKKPKKDSQWVSPWQLIRLTKQLYPECRIYCRSTLLG 105
U67555  KIIIGIIDRDSFLLGKMYEKKQKSK-FYKDANFLSAKEVIEMLKELG-----FKN 169
      **:* : : * : . : * **:::* : : * : * *

Li_ORF1 PKRTWDVTSWSKLNRIILSFPIG--TYVGMRIEKRPKPTLTPLLKAKEQAVNVYNALS 153
U67555  IKATQTIKFKEIDKVDKVEKGEYGGGFVAISAKI----- 205
      * * : . . * : : : . * : * : *

Li_ORF1 PEATSTIQHNRTNK 177
U67555  -----

```

【図9】

```

Li_LysS LIQKKKSHPPKIKLATKSPHVSYFKPLLES LAEKNELNFKVKNVVKSCLELDGGIPLYPD 60
AB012100_LysS -----MSHEELNDQLVRREKLLKIEELGVDVDFPK 30
      . :***: : : * : : : * : .

Li_LysS EFVKEHYAGMLRAEYAYSASELESLEI PACAGRIISLRSFGKVIFFHIMDRSGRIQCY 120
AB012100_LysS RFERTHKAELFELYGDLKKELEEQLEVAVAGRIMTKRGMKAGFAHIQDVTGQIQY 90
      . * : * * * * * * . *** : * **::* : * : * * * : * * *

Li_LysS ASRENMGEAEFSTFKKFDIGDIVGVNGKLFRTKMGELTLNCSITITLLAKSFRSLPEKHNG 180
AB012100_LysS VRQDDVGEQQYELFKISDLGDIVGVRGIMPKTRVGELSIKVSSYEFLTKALRPLPEKYHG 150
      . :***: . . * * :***:* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Li_LysS LTNIELRYRQRYLDLIVNPKTRDIFRKRKIIHEIRAPLEENGFIIEVETPILQPIPGGAM 240
AB012100_LysS LKDIQRVQRVYLDLIMNPESKKTFFITRSLIQSMRRYLDHSHGYLEVETPMHAVAGGAA 210
      * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Li_LysS ARPFTTHNNDMTLYMRIAPELYLKRLLVGGFELKLFELNRSFRNEGISIQHNPEFTMCE 300
AB012100_LysS ARPFI THHNDMTLYMRIAEIHLKRLIVGGLEKVEIGRVRNEGISTRHNPEFTMLE 270
      * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Li_LysS FYWAYATYLDLMBELTEMPAYLTKKICGTMTISYQGNITDFTPGTWQKYPFHESELEKIGG 360
AB012100_LysS LYEAYADFRDIMKLTENLHAHATEVLGTTKIYQGEHLVDLTP-EWRRHLMVDAIKEYVVG 329
      : * * * : * : * : * : * : : : * * . * * : * : * * * : : : : *

Li_LysS HSFPEYNNFEKVS EYI KEHGEKVLITDKIGKLOAKLFDLDVENKLIQPTFLYHYPTDISP 420
AB012100_LysS VDFWRQMSDEARELAKEHGEVEVAPHMTPFGHIVNEFFEQKVEDKLIQPTFLYGHVBEISP 389
      * . . * * * * . . : : : : : * : * : * : * : * : * : * : *

Li_LysS LSKKNKDNPEVTDRELFITAGREIANAFSELNDFIDQRLRFEEQVLEKARGDEEACPMDE 480
AB012100_LysS LAKKNPDDPRFTDRFELFIVGREHANAFTELNDFIDQRFEEQVLEKARGDEEACPMDE 449
      * : * * * * * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : *

Li_LysS DYLRALVEGMPFAAGEGIGIDRLVMLLTDSPSIREVILFPLLRTER 526
AB012100_LysS DFLEALEVGMPTGGLGIGVDRVMLLTDSPSIRDVLLFPQMRHK- 494
      * : * : * * * * * : * * * : * * * * * : * * * : * : * : *

```

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テラコード [*] (参考)
C 0 7 K	14/205	C 1 2 N	1/15
	16/12		1/19
C 1 2 N	1/15		1/21
	1/19	G 0 1 N	33/53
	1/21		33/569
G 0 1 N	5/10	C 1 2 P	21/02
	33/53		21/08
// C 1 2 P	21/02	(C 1 2 P	21/02)
	21/08	C 1 2 R	1:19)
(C 1 2 P	21/02	C 1 2 N	15/00
	C 1 2 R	A 6 1 K	37/02
	1:19)	C 1 2 N	5/00
			Z N A A
			A

专利名称(译)	细胞内劳森菌蛋白，及相关方法和材料		
公开(公告)号	JP2001169787A	公开(公告)日	2001-06-26
申请号	JP2000320736	申请日	2000-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	イヴレットリーロージー		
发明人	イヴレット・リー・ロージー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/106 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/205 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/31 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/19 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/522 A61K2039/523 A61K2039/53 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/205 C07K2319/00		
FI分类号	A61K39/106 A61K48/00 A61P31/04.171 C07K14/205 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/569.F C12P21/02.C C12P21/08 C12R1/19 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA04 4B064/DA13 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/DA42 4C084/NA14 4C084/ZC612 4C085/AA03 4C085/BA20 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/160922 1999-10-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供胞内劳森菌蛋白，以及相关的方法和材料。分离的多肽分子是编码胞内劳森氏菌的HtrA，PonA，HypC，LysS，YcfW，ABC1或Omp100蛋白的核苷酸序列，该序列的主要部分或同源物。包含一个数组。描述了相关的多肽，免疫原性组合物和测定法。

