

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 515340

(P2003 - 515340A)

(43)公表日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		39/00	J 4 B 0 2 4
39/00		48/00	4 B 0 6 3
48/00		A 6 1 P 31/04	171 4 B 0 6 4
A 6 1 P 31/04	171	C 0 7 K 14/30	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 62数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 542536(P2001 - 542536)

(86)(22)出願日 平成12年11月24日(2000.11.24)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月28日(2002.5.28)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/11798

(87)国際公開番号 W001/040471

(87)国際公開日 平成13年6月7日(2001.6.7)

(31)優先権主張番号 99123676.1

(32)優先日 平成11年11月29日(1999.11.29)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
オランダ国、6824・ベー・エム・アーネム、
フェルペルウエヒ・76

(72)発明者 フレイ、ヨット・ジヨウアキム
スイス国、ツエー・ハー - 3012・ベルン、
シュライナーベーク・9

(72)発明者 ニコレ、ジー・ジャツク
スイス国、ツエー・ハー - 3074・ブレムガ
ルテン、ホーシュタレンベーク・14

(72)発明者 アブド、イー・エル・モスタファ
スイス国、ツエー・ハー - 3007・ベルン、
ツィーグラ-シュトラ-セ・36

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C の抗原性タンパク質 L p p Q、その調製および使用

(57)【要約】

本発明はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C のタンパク質 L p p Q、該タンパク質をコードする D N A、タンパク質および D N A の調製方法、D N A を含んでなるベクター、ベクターを含んでなる宿主細胞、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C を検出するための免疫学的方法におけるタンパク質の使用、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C を検出するための遺伝学的方法における D N A の使用、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスに対するワクチンを調製するためのタンパク質および D N A の使用、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C に対向する抗体を免疫学的に検出する方法およびマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C を検出するための P C R 法、L p p Q またはその部分に特異的なモノクローナル抗体並びにマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス S C での感染を検出するための診断キットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表5に示すアミノ酸配列(LppQ前駆体、配列番号:25)またはその部分を含んでなるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのタンパク質。

【請求項2】 表5に示すアミノ酸配列(配列番号:25)により特徴づけられるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQ前駆体タンパク質。

【請求項3】 その部分が表7(成熟LppQ、配列番号:27)または表9(LppQN'、配列番号:29)に示すアミノ酸配列により特徴づけられる請求項1に記載のタンパク質。

【請求項4】 表7で示すアミノ酸配列(配列番号:27)により特徴づけられるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの成熟LppQタンパク質。

【請求項5】 表9に示すアミノ酸配列(LppQN';配列番号:29)により特徴づけられるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの成熟LppQタンパク質のN末端ハーフ。

【請求項6】 該配列が2ないし12個のヒスチジン残基により先行および/または後続される請求項1ないし5のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項7】 タンパク質がリポタンパク質である請求項1ないし6のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項8】 請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項9】 表5(1ppQ前駆体遺伝子、配列番号:24)、表6(1ppQ*、配列番号:26)、または表8(1ppQ*N'、配列番号:28)に示すDNA配列により特徴づけられる請求項8に記載のDNA。

【請求項10】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの直接的または間接的に検出するための診断方法における請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項11】 診断方法が免疫学的方法であって、イムノブロットィング

、血清学的試験およびE L I S Aからなる群から選択される請求項10に記載の使用。

【請求項12】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cに対するワクチンの調製のための請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質、または請求項8または9のいずれかに記載のDNAの使用。

【請求項13】 マーカーワクチンとして使用するための、細胞がL p p Qタンパク質の合成能を欠く、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cの生、弱毒化または不活性化細胞の調製のための請求項8または9のいずれかに記載のDNAの使用。

【請求項14】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cの検出方法における請求項8または9のいずれか一項に記載のDNAの使用。

【請求項15】 検出方法がP C R法およびハイブリダイゼーション法からなる群から選択される請求項14に記載の使用。

【請求項16】 請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質を発現するための請求項8または9のいずれか一項に記載のDNAの使用。

【請求項17】 請求項8または9のいずれかに記載のDNAを含んでなるベクター、とりわけp J F F m a L P 4 8 - M u H i s 1 (t h e E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s , S a l i s b u r y , W i l t s h i r e S P 4 0 J G . 英国、に寄託、寄託番号：9 9 0 8 1 0 2 5)。

【請求項18】 請求項17に記載のベクターまたは請求項8または9のいずれかに記載のDNAを含んでなる宿主細胞。

【請求項19】

(a) 請求項17に記載のベクターを適当な宿主細胞に導入する；

(b) 請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養する；および

(c) 工程(b)のタンパク質を宿主細胞または上澄から単離する請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質の調製方法。

【請求項20】

- (a) マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのゲノムDNAのDNAライブラリーを適当なファージにクローン化する；
- (b) 工程(a)のファージを用いて適当な宿主細胞を感染させる；
- (c) 宿主細胞をマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに感染した哺乳動物の血清でスクリーニングする；
- (d) 陽性クローンを選別し、精製する；および
- (e) 工程(d)のファージのゲノムDNAを単離する、表5のDNA配列(配列番号：25)により特徴づけられたDNAの調製方法。

【請求項21】

- (a) 表5(配列番号：24)のDNA配列に示す特徴づけられるDNAおよび表3(配列番号：1ないし4および6ないし21)に示す適当なプライマーセットを重複伸長PCR(overlap extension PCR:OE-PCR)に適用して第1のPCR産物を得る；
- (b) 工程(a)のOE-PCRの第1のPCR産物を、望ましい変異数のために要求される1回またはそれ以上のOE-PCRに適用し、最終PCR産物を得る；および
- (c) 最終PCR産物を単離する、表6(1ppQ^{*}、配列番号：26)、または表8(1ppQ^{*}N[']、配列番号：28)のDNA配列で特徴づけられるDNAの調製方法。

【請求項22】

- (a) 請求項1ないし7のいずれか一項に記載のタンパク質を適当な膜にブロッキングする；
- (b) 膜を該体液と共にインキュベートする；
- (c) 膜を標識したコンジュゲートと共にインキュベートする；
- (d) コンジュゲートの抗体とおよび請求項1ないし5および7のいずれかに記載のタンパク質に対する体液からの抗体との複合体を検出するために呈色反応を開始する、動物の体液中の請求項1ないし5および7のいずれか一項に記載のタンパク質に対する抗体を検出する方法。

【請求項23】 体液が血清および気管支液からなる群から選択され、膜が

ニトロセルロースまたはナイロン膜であり、コンジュゲートがアルカリ性ホスファターゼで標識されている請求項22に記載の方法。

【請求項24】

(a) マイクロタイタープレートを請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質で被覆する；

(b) マイクロタイタープレートを該体液と共にインキュベートする；

(c) マイクロタイタープレートを標識したコンジュゲートと共にインキュベートする；および

(d) コンジュゲートの抗体とおよび請求項1ないし5および7のいずれかに記載のタンパク質に対する体液からの抗体との複合体を検出するために呈色反応を開始する、動物の体液中の請求項1ないし5および7のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体の検出方法。

【請求項25】 体液が血清および気管支液からなる群から選択され、コンジュゲートがアルカリ性ホスファターゼで標識されている請求項24に記載の方法。

【請求項26】

(a) 表5(LppQ前駆体遺伝子、配列番号：24)に記載のDNAを検出するための適当なPCRプライマー対を試験すべきサンプルと共にPCR反応において使用する；および

(b) PCR反応後、予想されるPCR産物の存在を上記適当なPCTプライマー対で検査する、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCを検出する方法。

【請求項27】 適当なPCRプライマー対が表3に示すプライマーMMMSCO5-7(配列番号：22)およびMMMSCO5-6(配列番号：23)からなる群から選択される請求項26に記載の方法。

【請求項28】 請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質に特異的なモノクローナル抗体。

【請求項29】 請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質および/または少なくとも1つの請求項28に記載の抗体が適当な容器に含まれている診

断キット。

【請求項30】 請求項1ないし7のいずれかに記載のタンパク質または請求項8または9のいずれかに記載のDNAを含んでなるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCによる感染に対するワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明はおおむね動物用医薬品および家畜の生産の分野にある。より具体的には本発明はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC (*Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC*)のタンパク質LppQおよび該タンパク質をコードするDNAに関する。本発明はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス小コロニー型(SC)感染の血清学的検出、牛肺疫(CBPP)の病因物質、およびいずれかの型のワクチンの設計、とりわけワクチン接種した動物から感染動物を区別するためのマーカーワクチンに関する。特異的リポタンパク質LppQ、とりわけそのN末端抗原性部分を組換えペプチドとして発現し、CBPPの血清検出のための特異的抗原として使用する。

【0002】

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス小コロニー型(SC)により引き起こされる牛肺疫(CBPP)は蓄牛および野牛に影響する重篤な疾患である。CBPPはその地域に膨大な経済的損失をもたらし、ザ・オフィス・インターナショナル・デス・エピオズーティーズ(the Office International des Epizooties: OIE)により、最も深刻な伝染性動物疾患(これらの疾患にはその撲滅のために国際的な特別な規制が必要とされる)が含まれる、リスト「A」の疾患であると明言された。

【0003】

CBPPは19世紀の間にほとんどの大陸で撲滅されたが、アフリカの地域では残存した。厳密な衛生制御措置にかかわらず、欧州では1980年から再発し、従って、動物の健康および家畜生産に深刻な脅威と考えられている(ter Laak(1992): NicholasおよびBashiruddin(1995); Provostら(1987); Egwuら(1996))。

【0004】

血清学診断法はCBPP制御のための最も重要な手段である。いくつかの血清学的試験がこの50年間に報告されており、スライド凝集反応、補体結合反応(CF)(CampbellおよびTurner(1953))、寒天ゲル沈殿

(GourlayおよびShifrine(1965))、酵素結合イムノソルベントアッセイ、受身赤血球凝集反応、ウェスタンブロットおよびドットブロット(Nicholasら(1996))などがある。補体結合反応(CF)試験は現在最も広く用いられている血清学診断試験(Nicholasら(1996))であり、疾患の急性期で特異的で鋭敏であると考えられている。しかしながら、CF試験は慢性感染動物の約70%しか検出されないと報告されており、感染初期の無症状の動物は検出されないようである(Provostら(1987))。加えて、CF試験の特異性に関する問題が経験されている;CBPPが存在しない地域でのウシのモニター観察サンプルの最近の分析から有意数の偽陽性の結果が認められた(Starkら、(1995b);Starkら(1995a))。最近、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの80kDaの抗原の特異的エピトープを検出するモノクローナル抗体に基づく、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの血清学診断のための競合ELISAが開発された(LeおよびThiaucourt(1998))。今のところ、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC感染の血清学検出のためのマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC特異的抗原も、簡便な試験、例えば非競合間接的固相ELISA(抗体捕捉)も現在存在しない。間接ELISAでは、抗原調製物の品質が試験の特異性および感受性の決め手となる。マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの全細胞抗原または抽出物は近縁のマイコプラズマと交差反応する多くの抗原を含有し、使用することができない。本発明の一部は、血清学試験のための抗原としてマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの単一の特異的リポタンパク質を使用することからなる。

【0005】

今のところワクチンはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの弱毒化株を基盤とし、生ワクチンとして使用されている。しかしながらこれらのワクチンでは感染ウシからワクチン接種したウシを識別できず、ワクチン接種を使用する制御および撲滅プログラムでの主要な妨害となっている。

【0006】

最近Abdoら(1998)が、ウェスタンブロットおよび補体結合法を用

いてアフリカ株 Afade (the European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, 英国、に寄託、寄託番号: 99081024) およびヨーロッパ株 L2 で実験的に感染させたウシの気管支洗浄液および血清で、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC のマニホールド抗原の一連の免疫反応を分析した。分子量 110、95、85、80、72、62、48 および 39 kDa のいくつかの共通の優性な免疫原性抗原が同定された。マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC に非常に近縁であるマイコプラズマの多くの株が公知であるので、同定された免疫原性抗原のいくつかはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC に特異的であるか疑問視された。しかしながら、ここで驚くべきことに、前記した 48 kDa のタンパク質がマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC に特異性を有し、後記するように当業者が本発明の態様を開発することが可能になった。

【0007】

本発明はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC に特異的である LppQ と称するリポタンパク質抗原の発見および、例えば非競合性間接的固相 ELISA またはいずれかのその他の血清学的試験方法における特異的抗原としてペプチドを使用することによりマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC 感染を血清学的に検出するための特異的抗原としてのその使用またはこのタンパク質の一部、とりわけ、ペプチドの N 末端ハーフの使用である。本発明は抗原の発現のための、またはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC の遺伝学的同定または検出における使用のための、またはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC に対するいずれかの型のワクチンの設計および製造のための LppQ の遺伝子配列を包含する。これは LppQ 生合成を欠くマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC 株の構築によるマーカーワクチンの設計、成分として LppQ を用いるワクチンの形成、および LppQ の遺伝子配列を用いるワクチン接種方法 (例えば DNA ワクチン) を包含する。

【0008】

本発明はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス SC のメンバーの特異的

タンパク質およびその対応する遺伝子、並びにマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCで感染した動物の特異的血清学的検出のための遺伝子配列データを提供する。LppQと称するタンパク質はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのリポタンパク質である。その対応する遺伝子lppQはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのAfade株からクローン化された。

【0009】

lppQの遺伝子配列およびタンパク質LppQの対応するアミノ酸配列を表5に示す。

【0010】

遺伝子lppQは、PG1型株中に存在し、またPCRにより決定されるように、ヨーロッパおよびアフリカのマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの試験されたすべての単離株中に存在する(表1参照)。

【0011】

組換え大腸菌(E.coli)株およびその他の遺伝子発現系でlppQを発現するために、遺伝子配列を変異させてUGAをUGG_{trp}に変化させた。点変異誘発により全部で9個のUGAコドンがUGG_{trp}に変化しなければならなかった。3個の合成遺伝子を構築した。

【0012】

全lppQ遺伝子をコードするが、大腸菌およびその他の遺伝子発現のための宿主により容易に読み取られるユニバーサル遺伝子コードを含有するlppQ* (表6)。lppQ*遺伝子を含有するプラスミドはpJFFmaLP48 - MuHis1 (the European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP40 JG, 英国、に寄託、寄託番号: 99081025)である。

【0013】

LppQの、N'末端の、抗原性の部分LppQN'をコードするlppQ*N'。lppQ*N'はユニバーサル遺伝子コードを含有する(表8)。lppQ*N'遺伝子を含有するプラスミドはpJFFLP48 - 11である。

【0014】

LppQの、C'末端部分LppQC'をコードするlppQ*C'。lppQ*C'はユニバーサル遺伝子コードを含有する(表10)。lppQ*C'を含有するプラスミドはpJFFmaLppQ-Ctermである。

【0015】

前記したプラスミドに存在する3個の合成遺伝子の発現は発現ベクターpETHIS-1を用いて達成された。プラスミドpETHIS-1はジーンバンク/EMBL受け入れ番号AF012911にて利用可能である。プラスミドpETHIS1を構築し、誘導可能なT₇-RNAポリメラーゼ遺伝子を含有する特殊化大腸菌宿主細胞、例えば大腸菌BL21(DE3)株(F-, ompT, r-(B), m-(B), lambda DE3, i21, lacI, lacUV5 lacZ, T₇-RNA-pol.(溶原性), int'),におけるN末端ヒスチジンヘキサマーおよび/またはC末端ヒスチジンデカマーとの融合タンパク質の発現を可能にした。ポリヒスチジンテール化LppQ-HisペプチドをNiキレートクロマトグラフィーにより精製した。

【0016】

LppQのN'末端部分はこのリポタンパク質の抗原性部分である。これはイムノブロット実験により示され、その結果を表12に示す。組換えLppQ-His全長に対するウサギ抗血清は組換えN末端LppQN'-Hisおよび組換えC末端LppQC'-Hisの双方並びに全長LppQ-Hisタンパク質を認識した(表12、パネル1)。1992年からイタリアで発生したCBPPのマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに感染した雌ウシの血清は、このタンパク質の組換えN末端ペプチド、LppQN'-Hisおよび全長LppQ-Hisと強く反応したが、C末端部分LppQC'-Hisとは反応しなかった(表12、パネル2)。実験的感染からの血清を用いて同じ観察結果が得られた。感染初期の血清(表12、パネル4)および後期の血清によりLppQN'に対する強い反応が示された(表12、パネル5)。感染前の動物から採集された対照血清では反応は認められなかった(表12、パネル3)。

【0017】

LppQ、とりわけこのタンパク質のN末端部分LppQN'はマイコプラズ

マ・ミコイデス亜種ミコイデスSC感染の初期のおよび持続性のある抗原マーカーである。これはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC2つの異なる株、アフリカ株A f a d eおよびヨーロッパ株L2で対照実験感染させたウシの血清を用いたイムノブロット実験により示される(Abdora(1998))。実験的に接触感染した動物の血清ではL p p Q N ' - H i sに対して初期の、強い、持続性のある応答が示された(表13)。ヨーロッパ株L2で接触感染した雌ウシの典型的な血清は、L p p Q N ' - H i sを含有するイムノブロットで、同時に標準CF試験の最初の陽性タイターを伴って、接触感染後92日から始まり、接触感染後224日まで持続する明確なシグナルを示した(表13、パートA)。このとき、標準CF試験のタイターは2ヶ月以上検出限界を下回っていた(Abdora(1998))。アフリカ株A f a d eで感染した雌ウシの典型的な血清は、同時に最初の明確な陽性CF力価を伴って、接触感染後28日に強いシグナルを示し、接触感染後134日まで持続した(表13、パートB)。このとき標準CF試験の力価は3週間以上検出限界を下回っていた(Abdora(1998))。

【0018】

L p p QのN末端部分(L p p Q N ')はマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの特異的抗原である。マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのPG1型株の全細胞で免疫したウサギの血清はイムノブロットでL p p Q N ' と強く反応したが、マイコプラズマの近縁であるマイコプラズマ・ミコイデスクラストまたはマイコプラズマ・プトレファシエンスの全細胞で免疫したウサギの血清は同一条件下でL p p Q N ' - H i sとの反応は示さなかった。加えて、マイコプラズマ・ボビスに陽性であるがCBPPではないスイス・ウシの血清はL p p Q N ' - H i sとの反応を示さなかった(表14)。

【0019】

L p p QのN末端部分(L p p Q N ' - H i s)は、大腸菌J F 1 9 7 9株[BL21(DE3)(F-,ompT,r-(B),m-(B),lambda DE3,i21,lacI,lacUV5lacZ,T₇-RNA-pol.(溶原性),int⁺)/pJFFLP48-11Ap^R]に存在するプラスミドp

JFFLP48-11から多量に製造される。LppQN'-HisをNiキレートクロマトグラフィーにより塩酸グアニジウム可溶化細胞から直接精製する。JF1979株の培養物50mlから2mgの精製LppQN'-Hisタンパク質が得られた。LppQN'ペプチドまたはその誘導体を製造するためにその他の発現系を用いることができる。

【0020】

CBPPについてマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのキャリアーについて動物をスクリーニングするのに有用な、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC感染について血清学的試験キット、例えばイムノロットまたは非競合間接的固相ELISAまたはいずれかその他の抗体検出法、の作製に本発明を適用する。

【0021】

「免疫学的検出系」とは動物の血清中のマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの特異的成分に対する抗体を検出する方法を意味し、例えばイムノロット(表12参照)およびELISA(表2参照)などがある。これらの方法をマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC感染の血清診断に用いる。LppQN'-Hisで被覆したマイクロタイタープレートを用いるELISA試験の例を表2に示す。LppQN'-Hisで被覆したマイクロタイタープレートに基づくELISAは、とりわけ感染後後期に採集した血清ではCF試験よりも著明に鋭敏であった(表2の結果を参照)。

【0022】

lppQ遺伝子を用いてマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの遺伝子検出のための系を設計することができる。マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに対するlppQ遺伝子の特異性を表1に示すが、これはlppQが異なる大陸および国から並びに異なる時代に単離されたマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC株全てに存在したことを示している。このlppQ遺伝子は、その他のマイコプラズマ、とりわけ表現型および抗原的に極めて近縁の動物マイコプラズマでは見出されなかった。

【0023】

本発明をより明確に説明するために、本発明のいくつかの態様のリストを以下に提示する。このリストは、本発明をこれらの態様のみに制限するものではない。

【0024】

A. 本発明の1つの態様は、表5 (L p p Q前駆体、配列番号：25) に示すアミノ酸配列を含んでなるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのタンパク質またはその部分であり、ここでその部分は表7 (成熟L p p Q、配列番号：27) または表9 (L p p Q N'、配列番号：29) に示すアミノ酸配列により特徴づけられるのが好ましい。また本発明の態様はL p p Q前駆体、成熟L p p Qタンパク質およびL p p QのN末端ハーフ (L p p Q N') である。

【0025】

B. 本発明の別の態様は、A項記載のタンパク質の配列が2ないし12個のヒスチジン残基で先行および/または後続され、好ましくは各々、6個のヒスチジン残基で先行され、および/または10個のヒスチジン残基で後続されたA項で記載するタンパク質である。

【0026】

C. 本発明のさらなる態様は、リポタンパク質である、A項で記載されたタンパク質である。本発明の別の態様は、糖タンパク質である、A項で記載されたタンパク質である。かかる糖タンパク質はD項で記載されるDNAを真核細胞宿主で発現させて得ることができる。

【0027】

D. A、BまたはC項で記載されるタンパク質をコードするDNAもまた本発明の態様であり、表5 (l p p Q前駆体遺伝子、配列番号：24)、表6 (l p p Q*、配列番号：26)、または表8 (l p p Q* N'、配列番号：28) に示されるDNA配列により特徴づけられるのが好ましい。DNAはゲノムDNA、cDNAまたは人工DNAでよい。

【0028】

E. 本発明の1つの態様は、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCを直接的または間接的に検出するための診断法におけるA、BまたはC項に記載

のタンパク質の使用であって、ここで診断法は免疫学的方法であり、イムノブロットィング、血清学的試験およびE L I S Aなる群から選択されるのが好ましい。

【0029】

F . 本発明の別の態様は、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cによる感染に対するワクチンの調製のためのA、BまたはC項に記載のタンパク質、またはD項に記載のDNAの使用であり、ワクチンそのものであり、およびマーカーワクチンとして使用するためのマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cの生、弱毒化または不活性化細胞を調製するためのD項に記載のDNAの使用であって、ここで該細胞はL p p Qリポタンパク質を合成する能力を欠いている。

【0030】

G . マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cの検出法におけるD項に記載のDNAもまた本発明の態様であって、ここで検出法はP C Rおよびハイブリダイゼーション法からなる群から選択されるのが好ましい。

【0031】

H . 本発明のさらなる態様は、A、BまたはC項に記載のタンパク質を発現するための、D項に記載のDNA、該DNAを含んでなるベクター、および該ベクターまたは該DNAを含んでなる宿主細胞の使用である。

【0032】

I . 本発明のさらなる態様は、
(a) D項に記載のDNAを含んでなるベクターを適当な宿主細胞に導入する
;
(b) 該タンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養する ; および
(c) 工程 (c) のタンパク質を宿主細胞または上澄から単離する、A、BまたはC項に記載のタンパク質を調製するための方法である。

【0033】

J . 表5のDNA配列 (配列番号 : 25) により特徴づけられたDNAの調製方法もまた本発明の態様であって、ここで、

- (a) マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのゲノムDNAのDNAライブラリーを適当なファージにクローン化する；
- (b) 工程(a)のファージを用いて適当な宿主細胞を感染させる；
- (c) 宿主細胞をマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに感染した哺乳動物の血清でスクリーニングする；
- (d) 陽性クローンを選別し、精製する；および
- (e) 工程(d)のファージのゲノムDNAを単離する。

【0034】

K. 本発明のさらなる態様は、

- (a) 表5(配列番号:24)のDNA配列により特徴づけられるDNAおよび表3(配列番号:1ないし4および6ないし21)による適当なプライマーセットを重複伸長PCR(overlap extension PCR:OE-PCR)に適用して第1のPCR産物を得る；
- (b) 工程(a)のOE-PCRの第1のPCR産物を、望ましい変異数に要求されるように1回またはそれ以上のOE-PCRに適用し、最終PCR産物を得る；および
- (c) 最終PCR産物を単離する、表6(1ppQ^{*}、配列番号:26)、または表8(1ppQ^{*}N'、配列番号:28)のDNA配列で特徴づけられるDNAの調製方法である。

【0035】

L. 動物の体液中のA、BまたはC項に記載のタンパク質に対する抗体を検出する方法もまた本発明の1つの態様であり、ここで、

- (a) A、BまたはC項に記載のタンパク質を適当な膜にブロッティングする；
- (b) 膜を該体液と共にインキュベートする；
- (c) 膜を標識したコンジュゲートと共にインキュベートする；
- (d) コンジュゲートの抗体とおよびこのタンパク質に対する体液からの抗体との複合体を検出するために呈色反応を開始する。好ましくは、ここで体液を血清および気管支液から選択し、膜はニトロセルロースまたはナイロン膜であり、

コンジュゲートはアルカリ性ホスファターゼで標識されている。

【0036】

M. 本発明の別の態様は、

(a) マイクロタイタープレートにA、BまたはC項に記載のタンパク質でコーティングする；

(b) マイクロタイタープレートを該体液と共にインキュベートする；

(c) マイクロタイタープレートを標識したコンジュゲートと共にインキュベートする；および

(d) コンジュゲートの抗体およびタンパク質に対して指向する体液からの抗体の複合体を検出するために呈色反応を開始する、動物の体液中のA、BまたはC項に記載のタンパク質に対する抗体の検出方法である。好ましくは、ここで体液を血清および気管支液から選択し、膜はニトロセルロースまたはナイロン膜であり、コンジュゲートはアルカリ性ホスファターゼで標識されている。

【0037】

N. さらに、本発明の態様は、

(a) 表5(LppQ前駆体、配列番号：24)に示すDNAを検出するための適当なPCRプライマー対を試験すべきサンプルと共にPCR反応において使用する；および

(b) PCR後、予想されるPCR産物の存在を適当なPCTプライマー対で検査する、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCを検出する方法である。好ましくは、ここで、適当なPCRプライマー対を表3に示すプライマーMMSC05-7(配列番号：22)およびMMSC05-6(配列番号：23)からなる群から選択する。

【0038】

O. 本発明のさらなる態様は、A、BまたはC項に記載のタンパク質に特異的なモノクローナル抗体である。

【0039】

P. 本発明の別の態様は、A、BまたはC項に記載のタンパク質および/または少なくとも1つのO項に記載の抗体が適当な容器に含まれている診断キットで

ある。

【0040】

前記で列挙した本発明のいくつかの態様を以下でさらに詳細に記載する。

【0041】

本発明はまたLppQフラグメントおよび変種をも包含する。慣用される逆遺伝子技術により、すなわちアミノ酸配列に基づいて遺伝子配列を設計するかまたは慣用される遺伝子スプライシング技術により、本発明に従ってLppQ変種とみなされるポリペプチドを製造できる。例えば位置指定変異誘発またはオリゴヌクレオチド指定変異誘発に関する技術によりLppQ変種を製造できる。「クローン化DNAの変異誘発」、Current Protocols in Molecular Biology, 8.0.3. 以下参照(Ausubelら、編(1989)) (「Ausubel」)。

【0042】

本発明に含まれるその他のLppQ変種は、LppQの一部、またはそのフラグメントに対応する分子、または、LppQの一部を含んでなるが、天然のポリペプチドと一致しない、単独で存在する場合も、また別にキャリアーに結合している場合も、双方共にLppQの免疫原性活性を示す分子である。この種のLppQ変種は天然の分子の実際のフラグメントを表すか、またはデノボもしくは組換え的に合成されたポリペプチドであり得る。

【0043】

さらに別の態様では、このタンパク質のアミノ酸配列変種を調製する。これらは、例えば、このタンパク質が同定された微生物の集団内の天然の変化により生じるタンパク質のマイナー配列変種であり得、または別の微生物に見出されるこのタンパク質のホモログであり得る。これらは、また、タンパク質中で天然では生じないが、これらは宿主に投与されたとき免疫応答を引き出すのに十分に類似している配列でもあり得る。配列変種を位置指定変異誘発の標準的な方法により調製することができる。

【0044】

このタンパク質のアミノ酸配列変種は置換、挿入、または欠失変種でよい。欠

失変種は免疫原活性に必須ではないもともとのタンパク質の1つまたはそれ以上の残基を欠損している。別の一般的な型の欠失変種は分泌シグナル配列、またはタンパク質に細胞の特定の部分に結合するように指示するシグナル配列を欠損する変種である。

【0045】

置換変種は、典型的には、タンパク質内の1つまたはそれ以上の部位においてあるアミノ酸が別のアミノ酸に置換されており、1つまたはそれ以上のタンパク質の特性、例えばタンパク質分解性切断に対する安定性、を調節するように設計されている。置換は保存的であるのが好ましく、すなわち、あるアミノ酸が類似の形態および荷電のあるアミノ酸と置換される。保存置換は当該分野で公知であり、例えば：アラニンをセリンに；アルギニンをリジンに；アスパラギンをグルタミンまたはヒスチジンに；アスパラギン酸をグルタミン酸に；システインをセリンに；グルタミンをアスパラギンに；グルタミン酸をアスパラギン酸に；グリシンをプロリンに；ヒスチジンをアスパラギンまたはグルタミンに；イソロイシンをロイシンまたはバリンに；ロイシンをバリンまたはイソロイシンに；リジンをアルギニン、グルタミン、またはグルタミン酸に；メチオニンをロイシンまたはイソロイシンに；フェニルアラニンをチロシン、ロイシンまたはメチオニンに；セリンをスレオニンに；スレオニンをセリンに；トリプトファンをチロシンに；チロシンをトリプトファンまたはフェニルアラニンに；およびバリンをイソロイシンまたはロイシンに置換することが含まれる。

【0046】

挿入変種には、融合タンパク質、例えばタンパク質の迅速な精製を可能にするために使用されるものなどが含まれる。その他の挿入変種には、別のアミノ酸がタンパク質のコード配列内に導入されているものなどが含まれ得る。これらは、典型的には、前記した融合タンパク質よりも小さい挿入であり、例えばプロテアーゼ切断部位を壊すために導入される。

【0047】

別の態様では、タンパク質をコードする遺伝子の部分を組換え宿主において発現させる実験的手法によりタンパク質の主要な抗原決定基を同定し、得られたタ

ンパク質を宿主動物を免疫誘発から保護する能力に関して試験する。例えば、PCRを用いてタンパク質のC末端の連続した長いフラグメントを欠損した様々なタンパク質を調製できる。次いでこれらのタンパク質の各々の免疫活性から、この活性に必須であるこのタンパク質のフラグメントまたはドメインを同定する。次いで各々の反復で少数のアミノ酸しか除去しないさらなる実験により、タンパク質の抗原決定基の位置決定が可能になる。

【0048】

本発明のタンパク質を調製するための別の態様はペプチドミミックの使用である。このミミックは、タンパク質の2次構造のエLEMENTを擬似するペプチド含有分子である。例えば、Johnsonら(1993)を参照。ペプチドミミックの使用を支持する原理は、タンパク質のペプチドバックボーンが、主に分子相互作用、例えば抗体および抗原の相互作用を可能にするようにアミノ酸側鎖が位置するように存在することである。本発明のペプチドミミックタンパク質を宿主に投与した場合、もともとの宿主細胞タンパク質の認識に至る免疫応答を引き出すであろう。

【0049】

従って、成功するようなペプチドミミックの概念の適用は、非常に抗原性が高いことが知られているタンパク質内のターンの擬似に主に主眼がおかれる。本発明のタンパク質内の適当なターン構造は前記のようなコンピューターに基づくアルゴリズムにより予測できよう。Johnsonら(前出)に報告されたように、ひとたびこのターンのアミノ酸構成成分が決定されると、アミノ酸側鎖の必須ELEMENTの類似の空間配向を達成するようにミミックを構築することができる。次いでワクチンとして使用するようにミミックをキャリアタンパク質とコンジュゲート形成することができる。

【0050】

別の態様では、コンピューター配列分析を用いて組換えタンパク質の予測される主要抗原決定エピートープの位置が決定される。この分析を実施できるソフトウェアは市販により容易に入手でき、例えばMacVector(IBM New Haven, CT)などがある。ソフトウェアは典型的には、タンパク質の表

面に特徴的に見出され、従って抗原決定基として作用する可能性がある親水性配列を位置決定するための標準的なアルゴリズム例えばK y t e / D o o l i t t l eまたはH o p p / W o o d s法を使用する。ひとたびこの分析が行われると、少なくとも抗原決定基の必須の特徴を含み、ワクチンで使用できるポリペプチドを調製できる。標準的な方法により、例えばP C Rクローニング法を用いてこれらの抗原決定基をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入することができる。

【0051】

組換えポリペプチドの代替として、抗原決定基に対応する合成ペプチドを調製することができる。かかるペプチドは少なくとも6個のアミノ酸残基長であり、およそ35個の残基を含むことができ、これは自動ペプチド合成器、例えばA p p l i e d B i o s y s t e m s (F o s t e r C i t y , C A)より入手できる合成器のほぼ上限の長さである。ワクチンにおいてこのように小さなペプチドを使用する場合は、典型的にはペプチドを免疫原性キャリアタンパク質、例えばB型肝炎表面抗原とコンジュゲート形成させる必要がある。このコンジュゲート形成を行う方法は当該分野で公知である。

【0052】

本発明はまたワクチンにも関する。とりわけ好ましい態様では、ワクチンはA、B、またはC項に記載されるタンパク質またはそのフラグメントを、担体またはアジュバント、この場合マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cに対してウシを免疫するための適当な補助物質と組み合わせて含んでなる。

【0053】

しかしながら、より一般的には、本発明のワクチンは感受性の哺乳動物を免疫することを意図している。ウシの種に加えてマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cに感受性の哺乳動物には、小型および大型の反芻動物などがある。

【0054】

この抗原は、許容される程度に精製した後（一般的には全ペプチドまたはタンパク質の50%を超える）、次いでワクチンの形態で投与され得る。本発明の好ましい態様では、免疫される動物はウシである。適切であるときには、全細胞を

ワクチンに使用できる。例えば組換え抗原を発現するSf9細胞またはCHO細胞を直接生または死菌の形態で使用して抗原を宿主動物に投与できる。また別に、本発明の抗原をコードする核酸配列を含有する生ウイルスをワクチンにおいて使用することができる。

【0055】

このワクチンは、アジュバントと称する多くの異なる物質のいずれかを含むことができ、これはワクチン接種された動物の免疫系の適当な部分を刺激することが知られている。動物のワクチン接種に適したアジュバントには、非限定例としては油乳濁液、例えばフロイント完全または不完全アジュバント（家畜での使用には適していない）、Marcol 52: Montanide 888（MarcolはEssoの商標であり、MontanideはSEPPIC、Parisの商標である）、スクアランまたはスクアレン、Adjuvant 65（ピーナッツ油、モノオレイン酸マンナイドおよびモノステアリン酸アルミニウムを含有する）、鋳物ゲル、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウムおよびミョウバン、界面活性剤、例えばヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リゾレシチン、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、N,N-ジオクタデシル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびプルロニック・ポリオール、ポリアニオン、例えばピラン、硫酸デキストラン、ポリアクリル酸およびカルボポール、ペプチドおよびアミノ酸、例えばムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシンおよびトレハロース・ジミコレートなどがある。

【0056】

本発明の抗原、発現産物および/または合成ポリペプチドをリポソームもしくはその他のマイクロキャリアーに組み込んだ後、または多糖類、タンパク質またはポリマーとコンジュゲート形成した後、またはQuil-Aと組み合わせて「Isocomes」（免疫刺激複合体）を形成して投与することもできる。

【0057】

投与経路、投与量、および注射頻度は全て当該分野の通常の技術を用いて最適化できる因子である。典型的には、初回ワクチン接種の数週間後、1回またはそ

れ以上の「ブースター」ワクチン接種を行う。その基本的な効果は活発な細胞性および体液性免疫応答の産生である。

【0058】

C B P P に対して哺乳動物を免疫する方法は、有効量の上記免疫原を哺乳動物に投与することからなる。投与は当該分野で公知のいずれかの方法がある。本発明に従って、適当な免疫応答を産生するよう企図され得るまたは示し得るいずれかの免疫経路を用いることができるが、皮下投与が好ましい。適当な投与形態には、非経口、皮内もしくは筋肉内注射または経口、鼻腔もしくは直腸内投与がある。

【0059】

本発明はまた天然 L p p Q、L p p Q フラグメント、組み換え L p p Q、または L p p Q 変種に対する抗体および抗血清にも関する。適当な宿主において標準的なワクチン接種計画を用いてかかる抗体および抗血清を上昇させる。アジュバントを伴うまたは伴わない少なくとも1つの本発明の抗原またはワクチンで宿主をワクチン接種させて免疫応答を生じさせる。例えば産生された抗体のレベルを測定することにより、標準的な E L I S A 法を用いて免疫応答をモニター観察できる。

【0060】

好ましい態様では、宿主としてウシを用いてポリクローナル抗血清の産生を行う。宿主を定期的に出血させ、標準的な方法により、例えばプロテイン A およびプロテイン G クロマトグラフィーにより血液から抗体分画を精製する。また別の態様では、宿主はマウスであり、標準的な手段によりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製する。Current Protocols in Immunology, Coliganら、2.5.章(1991)参照。次いで標準的な手段によりハイブリドーマ細胞からモノクローナル抗体を調製する。

【0061】

本発明はまた適当な容器に A、B または C 項に記載のタンパク質および好ましくは前記した抗体の少なくとも1つが含まれる診断キットにも関する。

【0062】

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCを検出するための診断キットは、既知濃度の本発明の抗原の陽性対照標準と一緒に、少なくとも1つの前記で調製した抗体を提供することにより調製される。1つの態様では、抗原陽性対照は組換えLppQまたはLppQN'である。キット様式は標準的な診断様式、例えばELISA様式に適合させる。

【0063】

ここで本発明のいくつかの具体例を実施例の助けでより詳細に説明するが、これらに制限するものではない。

【0064】

実施例1：LppQの同定

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCで感染したウシにおける体液および気管支免疫応答を調べるために、アフリカ株Afedeまたはヨーロッパ株L2に実験的に接触感染したウシの連続収集した血清および気管支洗浄液をイムノプロットングにより分析した(Abdora(1998))。分子量110、95、85、80、72、62、48および39kDaのいくつかの共通の優性な免疫原性抗原を同定した。この実験により、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのアフリカクラスタの参考株であるAfade株(Chengら(1995))、またはヨーロッパクラスタの参考株であるL2株(Chengら(1995))のいずれかで感染したウシの血清および気管支洗浄液で、その他の免疫反応の中でも、48kDaのタンパク質に対する初期および持続性免疫反応が示された。これにより、同一の血清を用いて、遺伝的および抗原的に最もマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに近縁であるマイコプラズマの抗原のイムノプロット分析により、48kDaがマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに特異的であることが示される(表1)。従って牛肺疫(CBPP)の血清検出のための本開発および/またはCBPPに対するワクチン成分の開発のための、特異的で、優性で持続性のある抗原の候補物質として48kDa抗原を選択する。

【0065】

実施例2：lppQ遺伝子の同定およびクローニング

ZAP-express (商標)ベクター (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 中にクローン化したマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの、Sau3AI消化したゲノムDNAを用いて作製した遺伝子ライブラリーを構築することによりリポタンパク質をコードするlppQ遺伝子をクローン化し、続いて「Gigapack gold」パッケージングキット (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いて、組換えファージに適合し得る大腸菌株をインビトロパッケージングおよび感染させた。遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための標準的な方法 (Ausbellら (1990)) を用いてマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC Afade株で実験的に感染させたウシの血清でファージブランクをスクリーニングした (Abdoら (1998))。ZAP-express (商標)ベクター (Stratagene) の製造者のプロトコルに従って、f1ヘルパーファージを用いていくつかのファージクローンをファグミドに形質転換した。ABI Prism 310型遺伝子分析器 (Applied Biosystems / Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn. USA) およびDNA配列アセンブリ・ソフトウェアSequencher 3.0 (GeneCode, Ann Arbor, MI, USA) を用いていくつかのクローンのDNA配列を決定し、隣接配列を得た。1個のクローン、プラスミドpJFFma5が記載された (Hayashi (1990)) パラメーターにより決定される48kDaの特徴的なリポタンパク質をコードするORFを示した。48kDaをコードする遺伝子をLppQと称した (表5)。

【0066】

実施例3：lppQ遺伝子の9個のコドンの変異誘発

マイコプラズマ特異的UGA_{trp}コドンユニバーサルUGG_{trp}コドンと交換するために、Urbanら (1997) により記載される方法により、表3に列挙するオリゴヌクレオチドプライマーおよび鋳型としてプラスミドpJFFma5のクローン化lppQ遺伝子を用いてlppQ遺伝子の位置指定変異誘発を行った。UGG_{trp}コドンで変異誘発した遺伝子をlppQ*と称する (表6)。

【0067】

実施例4：ポリヒスチジンテイル化LppQペプチドを発現するプラスミドの構築

ポリヒスチジンテイル化LppQ(LppQ-Hisと称する)を発現するプラスミドpJFFmaLP48-MuHis1を以下のように構築した。前記したように得られた変異誘発されたlppQ*遺伝子(表6)を、オリゴヌクレオチドプライマーP48EcoR1およびP48B7r(表3)並びにPwoポリメラーゼを用いるPCR増幅のための鋳型として使用した。増幅された遺伝子をEcoR1およびBamH1を用いる制限酵素消化に供し、続いて対応する消化されたクローニング/発現ベクターpETHIS-1に連結した。LppQN'-Hisと称する、LppQのポリヒスチジンテイル化N'-末端ハーフを発現するプラスミドpJFFLP48-11を以下のように構築した：前記のように得られた変異誘発されたlppQ*遺伝子(表6)をオリゴヌクレオチドプライマーMMMLP481およびMMMLP484(表3)並びにPwoポリメラーゼを用いるPCR増幅のための鋳型として使用した。増幅された遺伝子フラグメントlppQ*N'(表8)を制限酵素Nde1およびBamH1で消化し、続いて発現ベクターpETHIS-1の対応するクローニング部位に連結した。

【0068】

LppQC'-Hisと称する、LppQのポリヒスチジンテイル化C末端ハーフを発現するプラスミドpJFFmaLppQ-Ctermを以下のように構築した。前記したように得られた変異誘発されたlppQ*遺伝子(表6)をオリゴヌクレオチドプライマーP48B1fおよびP48B7r(表3)並びにPwoポリメラーゼを用いるPCR増幅のための鋳型として使用した。lppQ*C'と称する増幅された遺伝子をEcoR1およびBamH1を用いる制限酵素消化に供し、続いてEcoR1およびBamH1消化された発現ベクターpETHIS-1の対応するクローニング部位に連結した。

【0069】

実施例5：特殊化された大腸菌におけるポリヒスチジntag化タンパク質の発現

上記3個のポリヒスチジンテイル化LppQペプチドを発現するために、大腸菌株BL21(DE3)(Stratagene)をプラスミドpJFFmaLP48-MuHis1、pJFFLP48-11、またはpJFFmaLppQ-Cterm(表4)で形質転換した。指数増殖期の中間で細胞培養物をIPTGで誘導、およびBraunら(1999)により詳細に記載されたNi²⁺キレートクロマトグラフィーを用いて精製により、ポリヒスチジンテイル化ペプチドの発現および続いて精製が行われた。

【0070】

実施例6：イムノプロットのプロトコル

Ausbelら(1990)に記載されるようにイムノプロットを実施した。記載されたように(Abdora(1998))実験的に感染させた動物の血清および気管支洗浄液を用いた。精製した組換えタンパク質(200µg/ml)を等容量のSDSサンプルバッファー(0.06M Tris HCl、pH6.8、2%SDS、10%グリセロール、2%β-メルカプトエタノール、0.025%ブロムフェノールブルー)と混合し、5分間煮沸した。SDS-PAGEポリアクリルアミドゲルにより、5ないし15%のグラジエントポリアクリルアミドゲルを用いて抗原を分離し、次いで孔径0.2µmのニトロセルロース膜(Bio-Rad)にブロッティングした。次いでミルクバッファーを用いて室温(r.t.)で1時間膜をブロックし、乾燥し、細片に切断した。細片を血清サンプルと共に室温で1時間インキュベートし、TBS(100mM Tris HCl、pH7.5、150mM NaCl)で3回洗浄した。次いで細片をアルカリ性ホスファターゼ標識コンジュゲートと共に室温で1時間インキュベートし、これをミルクバッファーで希釈した。使用したコンジュゲートはa)1:5000に希釈したモノクローナル抗体(Mab)抗ウシIgG(Sigma #A7554)、b)1:2000に希釈したポリクローナルAb抗ウサギまたは抗マウスIgG(Kirkegaard and Perry Gaithersberg, MD, 米国)であった。全ての細片をTBSバッファーで3回洗浄した。アルカリ性バッファー中0.3mg/ml Nitroblue tetrazolium(NBT)(Boehringer Mannheim, Ma

nnheim, ドイツ)、0.15mg 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(BCIP)(Boehringer Mannheim)で呈色反応を開始し、蒸留水で停止した。

【0071】

実施例7：マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCを検出するための特異的な系としての、遺伝子lppQに基づくPCR法

lppQ遺伝子に基づくマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC生物の同定を可能にする特異的PCR法を開発した。特異的プライマーMMSCO5-7およびMMSCO5-6(表3)を開発した。特異的PCRパラメーターは：変性94、30秒間；アニーリング48、30秒間；伸長72、1分間；35サイクルである。このPCRは全世界で最も離れた場所で生じた、試験したマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの全ての株から特異的1304bpフラグメントを増幅した。その他の近縁のマイコプラズマ生物では(表1)同一条件下で増幅は観察されなかった。

【0072】

実施例8：免疫学的検出系

精製された組換えLppQN'-His(N末端ペプチド)をJF1979株から製造し、続いてNiキレートクロマトグラフィーにより精製した(図6)。精製したLppQN'-Hisをマイクロタイタープレート(ウェルあたり1µg)を被覆するために用いた。被覆は、標準的な方法(NicolletおよびMartel(1996))により、被覆炭酸塩バッファー(0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH9.6)中10µg/ml LppQ 100µlを用いて行った。被覆したマイクロタイタープレート(ウェルあたり1µgのLPPQN'を含有)を用いて、異なる国のCBPPを有するウシを含む数匹のウシの血清、健常ウシの血清、実験的に感染させたウシの血清、および標準的なCF試験で偽陽性の結果が得られた血清を含む健常ウシの血清で間接的ELISAを実施した。このELISAの予備的データを表2に示す。このデータには、LppQN'-Hisに基づくELISA試験がCBPPの動物またはマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに感染した動物の特異的で感受性のある血清診断に適していることが

示されている。

【0073】

【表1】

文献

Abdo, E-M., Nicolet, J., Miserez, R., Goncalves, R., Regalla, J., Griot, C., Bensaide, A., Krampe, M. and Frey, J.: Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet.Microbiol.* 59 (1998) 109-122.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K: *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc. (1990) New York.

Braun, M., Kuhnert, P., Nicolet, J., Burnens, A.P., and Frey, J. (1999) Cloning and characterization of two bistructural S-layer-RTX proteins from *Campylobacter rectus*. *J. Bacteriol.* 181: 2501-2506.

Campbell, A.D. and Turner, A.W.: *Studies on contagious pleuropneumonia of cattle. IV. An improved complement-fixation test.* *Aust.Vet.J.* 29 (1953) 154-163.

Cheng, X., Nicolet, J., Poumarat, F., Regalla, J., Thiauoucourt, F., and Frey, J. (1995) Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology* 141:3221-3228.

Coligan *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Eds. John Wiley, New York, 1991) ch. 2.5

Egwu, G.O., Nicholas, R.A.J., Ameh, J.A. and Bashiruddin, J.B.: *Contagious Bovine Pleuropneumonia: An Update.* *Vet.Bull.* 66 (1996) 875-888.

Gourlay, R.N. and Shifrine, M.: *Comparison between methods of antigen preparation and the use of adjuvant in the delayed allergic skin reaction in contagious bovine pleuropneumonia.* *J.Comp.Pathol.* 75 (1965) 375-380.

Hayashi, S, Wu Hc.: *Lipoproteins in bacteria: J.Bioenerg. biomembr.* 22(3): (1990) 451-471.

Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto *et al.*, Eds., (Chapman and Hall, New York, 1993)

Le, G.C. and Thiaucourt, F.: A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet. Microbiol.* 60 (1998) 179-191.

Nicholas, R.A.J. and Bashiruddin, J.B.: *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): The agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the "*Mycoplasma mycoides* cluster". *J.Comp.Pathol.* 113 (1995) 1-27.

Nicholas, R.A.J., Santini, F.G., Clark, K.M., Palmer, N.M.A., DeSantis, P. and Bashiruddin, J.B.: A comparison of serological tests and gross lung pathology for detecting contagious bovine pleuropneumonia in two groups of Italian cattle. *Vet.Rec.* 139 (1996) 89-93.

Nicolet J. and Martel, J.L.: ELISA in large animals. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. II. J.G: Tully and S. Razin (eds.). (1996) pp 105-113. Academic Press, San Diego, New York.

Provost, A., Perreau, P., Breard, A., Le Goff, C., Martel, J.L. and Cottew, G.S.: Contagious bovine pleuropneumonia. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 6 (1987) 625-679.

Stark, K.D.C., Vicari, A., Kihm, U. and Nicolet, J.: Surveillance of contagious bovine pleuropneumonia in Switzerland. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14 (1995a) 621-629.

Stark, K.D.C., Vicari, A., Tontis, A. and Nicolet, J.: Epidemiological Investigations of Contagious Bovine Pleuropneumonia in Switzerland. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.* 137 (1995b) 92-100.

ter Laak, E.A.: Contagious bovine pleuropneumonia. A review. *Vet.Quart.* 14 (1992) 104-110.

Urban, A., Neukirchen, S. and Jaeger, K.E: A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one- step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* 25(11) (1997), 2227-2228.

【 0 0 7 4 】

【表 2】

表 1. マイコプラズマの株

種	株	コレクション	起源	年	宿主	
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	PG1	NCTC		1931	ウシ/タイプ株	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	2059	LPG	Spain	1984	ウシ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	B773/125	LNV	Portugal	1991	ウシ/精液	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	C305	LNV	Portugal	1993	ヤギ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	O326	LNV	Portugal	1993	ヒツジ/乳	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	P02	CIRAD	France	1980	ウシ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	2022	LPB	France	1984	ウシ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	L2	IVBEE	Italy	1993	ウシ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	402	LPB	Italy	1990	ウシ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	6479	LPB	Italy	1992	ウシ/肺	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	Afade	CIRAD	Chad	1968	ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	Fatick	CIRAD	Senegal	1968	ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	B17	CIRAD	Chad	1967	コブウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	9050-529/1	CIRAD	Ivory Coast	1990	ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	91130	CIRAD	Ctr. Afric. Rep.	1991	ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	94111	CIRAD	Rwanda	1994	ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	95014	CIRAD	Tanzania	1995	ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	T1/44	CIRAD	Tanzania	1952	ウシ/ワククチン株	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	T1/Sr50	CIRAD	Tanzania	1952	ウシ/ワククチン株	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	KH ₃ J	CIRAD	Sudan	1940	ウシ/ワククチン株	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	Gladysdale	AAHL	Australia		ウシ	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	V5	AAHL	Australia	1965	ウシ/ワククチン株	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> SC	Y-goat	NCTC	Australia		ヤギ/タイプ株	+
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> LC	152/93	FVLP	Gran Canaria	1993	ヤギ	-
<i>M. mycoides</i> subsp <i>Mycoides</i> LC	LC8065	CIRAD	France		ウシ	-

<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides</i> LC	D2482/91	IVBBE	Switzerland	ヤギ	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides</i> LC	8794-Inde	CIRAD	India	ヤギ	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides</i> LC	PG3	NCTC		ヤギ/タイプ株	-
<i>M. mycoides</i> Subsp. Capri	N108	CIRAD	Nigeria		-
<i>M. mycoides</i> Subsp. Capri	capri L	CIRAD	France	ヤギ	-
<i>M. mycoides</i> Subsp. Capri	9139/11-91	CIRAD	Turkey		-
<i>M. mycoides</i> Subsp. Capri	PG50	NCTC	Australia	ウシ/参照株	-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group 7	G5415	NVI	Portugal	ウシ	-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	CP291	NVI	Portugal	ヤギ	-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	PAD3186	BVVG	India	ヤギ/乳	-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	FRD424	BVVG	India	ヤギ/乳	-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	Calf1	NVI	Nigeria		-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	D318b	NVI	Germany		-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	C2306	NVI	Portugal		-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	D424	NVI	Germany		-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	QR1/92	NVI	Australia		-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	4055	NVI	France		-
<i>Mycoplasma</i> sp. bovine group	B144P	NVI	USA		-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Capricolum</i>	Calif.Kid	NCTC	California	ヤギ/タイプ株	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Capricolum</i>	174/87	CIRAD	Greece	ヒツジ	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Capripneumoniae</i>	F38	NCTC	Kenya	ヤギ/タイプ株	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Capripneumoniae</i>	9081-487p	CIRAD	Oman	ヤギ	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Capripneumoniae</i>	Gabes	CIRAD	Tunisia	ヤギ	-
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	NCTC		ヤギ/タイプ株	-
<i>M. agalactiae</i>	PG2	NCTC		ヤギ/タイプ株	-
<i>M. bovis</i>	PG45	NCTC		ウシ/タイプ株	-

•AAHL, Australian Animal Health Laboratory, Geelong, Vic., Australia; BVVG, Jena, Germany; CIRAD, CIRAD-EMVT, Montpellier, France; FVLP, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas, Spain; IVBBE, Institute for Veterinary Bacteriology, University of Berne, Switzerland; LNV, Laboratorio Nacional de Veterinaria, Lisboa, Portugal; LPB, Laboratoire de Pathologie Bovine; Lyon, France; NCTC, National Collection of Type Cultures, PHLS, London, UK; NVI, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden.

1 p p QをPCRにより、および/またはプロットハイブリダイゼーションにより測定した。

【0075】

【表3】

表2
LppQN' ELISA (CBPP)

健康ウシ (スイス)		CBPPのウシ (ホルトガル)		CBPPのウシ (イタリア)		実験的に感染させたウシ				
エリザ	0.017	0.117	0.022	0.093	1.085	0.517	1.244	0.563	1.059	1.599
CFTタイター	Nd	nd	nd	Nd	1/160	1/10	1/320	1/1280	1/640	1/640

L2株で感染させた実験的感染雌ウシ502番の血清のELISA (Abdoら (1998))

接種後日 ²⁾	64	70	92	100	105	112	119	126	169	196	224
エリザ ¹⁾	0.116	0.108	0.111	0.145	3.245	2.106	4.000	4.000	1.274	0.607	2.004
CFTタイター	<1:10	<1:10	1:20	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:20	1:20	1:20

nd : 測定されなかった

1) OD405の読み

2) 接触感染後の日数

●抗原 : LppQN' His (Hisターク精製抗原)

●抗原濃度 : 10µg/ml (飽和レベル)

●血清希釈 : 1:100

●コンジュゲート : Mab抗体IgGヘルオキシダーゼ標識 (Bommeli (登録商標))

●コンジュゲート希釈 : 1:200 (製造者の指示に従う)

【0076】

【表4】

表3

名前	配列 (5'---- 3')	配列番号	温度 ^A	用途 ^B	構築 ^C
MMMLP481	<u>Cgccaatg</u> CCATTAGTTGTTGTTTCATGTAAG	1	54°C	SDM, C	2
MMMLP482	TCTTGTTTTTGCCACTCATTITTTG	2	54°C	SDM	
MMMLP483	CAAAAAATGAGTGGCAAAACAAGA	3	54°C	SDM	
MMMLP484	<u>Cgggatcc</u> CCAATTTGATAAACTTGATTAAGT	4	54°C	SDM, C	2
P48B1f	<u>Aacgaattc</u> AGTTTTATCAAATTGGAATACAGAAAAT	5	55°C	SDM, C	3
P48B1r	CATTTGCTGTTTTCCAGCTCGATAAATC	6	55°C	SDM	
P48B2f	GTGATTATCGAGCTGGAAAACAGCAAATG	7	55°C	SDM	
P48B2r	CATTACTTACATTCCAACCTCGAAATATCTT	8	55°C	SDM	
P48B3f	AAGATATTTCCGAGTTGGAATGTAAGTAATG	9	55°C	SDM	
P48B3r	ATATTTTTTAGATTCCAATCTGAAAGTGAT	10	55°C	SDM	
P48B4f	ATCACTTTCAGATTGGAATCTAAAAAATAT	11	55°C	SDM	
P48B4r	CTTTTGATACATCCCAATCTAAAGACTTAT	12	55°C	SDM	
P48B5f	ATAAGTCTTTAGATTGGGATGTATCAAAAG	13	55°C	SDM	
P48B5r	TTTGAAACATTCCAATTAGTTATATTTTG	14	55°C	SDM	
P48B6f	TCAAAATATAACTAATTGGAATGTTTCAAAT	15	55°C	SDM	
P48B6r	ACATTATCAACTCTCCAATTTTTTATATCT	16	55°C	SDM	
P48B7f	AGATATAAAAAATTTGGAGAGTTGATAATGTA	17	55°C	SDM	
P48B7r	<u>Cgggatcc</u> TACATTTTTTACATTCCAACCTGAAATATC	18	55°C	SDM, C	1 & 3
P48BFB	GTTTTATCAAATTGGAATACAGAAAATGTA	19	55°C	SDM	
P48FAL	TACATTTTCTGTATTCCAATTTGATAAAAC	20	55°C	SDM	
P48 EcoRI	<u>Gcagaattc</u> CCATTAGTTGTTGTTTCATGTAAG	21	55°C	SDM, C	1
MMMSCO5-7	CTCTGAGAGGGAATAATG	22	48°C	D	
MMMSCO5-6	CAACCAAAGGCATCAATG	23	48	D	

小文字イタリック文字はクローニングのための制限酵素認識部位（下線部）を作るために加えられたヌクレオチドを示す。

A) PCR増幅のためのアニーリング温度

B) SDM=位置指定変異誘発、C=クローニング、D=検出

C) 1=pJFFmaLP48-MuHis1にクローン化された *lppQ**

2=pJFFLP48-11にクローン化された *lppQ*N'*

3=pJFFmaLP48-Q-にクローン化された *lppQ*C'*

【0077】

【表5】

表4

株	宿主株	プラスミド	ペプチド
JF2124	BL21(DE3)	pJFFmaLP48-MuHis1	LppQ-His
JF1979	BL21(DE3)	pJFFLP48-11	LppQN'-His
JF2199	BL21(DE3)	in pJFFmaLppQ-Cterm	LppQC'-His
JF1943	XL1-blue	pJFFma5	Non (野生型遺伝子)

【0078】

【表6】

表5

lppQ 遺伝子のヌクレオチド配列およびリポタンパク質 *LppQ* のアミノ酸配列

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC; *Afade* 株
 遺伝子 *lppQ*、リポタンパク質 *Q* ; コーディング配列
 遺伝子コドン: マイコプラズマ (注意: UGAはトリプトファンである)

ATGAAAAATAAACATATCAGTCTACTAGCAAAACTTGAAGTTTTATTTTCTGTTACATCA

M K N K H I S L L A K L E V L F S V T S

CTTCCATTAGTTGTTGTTTCATGTAAAACTTCAAATTTTAATAACAATAAACCTAATAAT

L P L V V V S C K T S N F N N N K P N N

AATCAACAAAAAAGAGCAAGTAAGTAAATTTGATATTTCAAGTTTTAAAGATAAAATT

N Q Q K K E Q V S K I D I S S F K D K I

GAACCAAAAAATGAGTGACAAAAACAAGATGTTTTACAAGCATTACTAAAAATAAAAGGG

E P K N E W Q K Q D V L Q A L L K I K G

CTAGATAAATTAAC TCAAAATGATTTTAATTTTAATATTAAGAAAGCTAATTTATTACGT

L D K L T Q N D F N F N I K K A N L L R

AATGGACAATTGATAATTAAATCTAAAGACGATTCTAAAATTATAAAAGGTGAACTAAGT
N G Q L I I K S K D D S K I I K G E L S

TTAGAAATTAAAAACTAAATAGAGTTAAAAAGTTGAAACAAAATATAATGATACTAGA
L E I K K L N R V K K V E T K Y N D T R

ACTGAGGTTTTAGTAATTGGTTATGATGAAAATGGAAAATTTCTGGGTTTGCTCAAAC
T E V L V I G Y D E N G K I S G F A Q T

GTTAAAAAGTTCCTGAAAACTACCAGAAGAAATTATTAGTCTAGAGCGTGCTTTTTTA
V K K V P E K L P E E I I S L E R A F L

AAAAATAATTCTGATAAAATTGAAAATCTTGATAAATGGGACACATCTAATATAGTAAGT
K N N S D K I E N L D K W D T S N I V S

ATGTCTTCAATGTTTCAACAAGCTAGAACTTTAATCAAGTTTTATCAAATTGAAATACA
M S S M F Q Q A R N F N Q V L S N W N T

GAAAATGTAAGTATGAATTATATGTTTGATGGTGCAACTAAATTCAATAGTGATTTA
E N V T D M N Y M F D G A T K F N S D L

TCGAGCTGAAAAACAGCAAATGTAAAACTATGAGAAGTATGTTTAGTGACACAAAACAA
S S W K T A N V K T M R S M F S D T K Q

TTAATCAAGATATTTTCGAGTTGAAATGTAAGTAATGTTAAAAATATGAAAAATATGTTT
F N Q D I S S W N V S N V K N M K N M F

TATCGAGCTGAAAAATTTAATAAATCACTTTCAGATTGAAATCTAAAAAATATACAAGAA
Y R A E K F N K S L S D W N L K N I Q E

CTAGACCATATGTTTTTTGGTGCTTCTGAATTTAATAGCGATATCTTCAAACATAAAAAAT

L D H M F F G A S E F N S D I F K L K N

AATCTAGTAACTGATATGCGTTATATGTTTTTTCAAGCTAAAAAATTTAATAAGTCTTTA

N L V T D M R Y M F F Q A K K F N K S L

GATTGAGATGTATCAAAGTAGTTAATATGGATAGTATGTTTAATGGTGCTCATGATTTT

D W D V S K V V N M D S M F N G A H D F

AATCAAATATAACTAATTGAAATGTTTCAAATGTTAAACTATGAGAAGTATGTTTAGT

N Q N I T N W N V S N V K T M R S M F S

GACACAAAACAATTTAATCAAGATATAAAAAATTGAAGAGTTGATAATGTAAGTATGATG

D T K Q F N Q D I K N W R V D N V T D M

GACCGTATGTTTCAAATGCACTAAGTTTTTAATAAAGATATTTCAAGTTGAAATGTAAAA

D R M F Q N A L S F N K D I S S W N V K

AATGTAAAATCATATGATGCCTTTGGTTGACACATAAAAAAGAATTTAAACCTTTATTT

N V K S Y D A F G W H I K K E F K P L F

GAAAAAATAATAAG (SEQ ID NO: 24)

E K N N K (SEQ ID NO: 25)

【0079】

【表7】

表6

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQ (成熟LppQ) をコードする合成遺伝子 / p p Q* のヌクレオチド配列

TGTAAAACTT CAAATTTTAA TAACAATAAA CCTAATAATA ATCAACAAAA
 AAAAGAGCAA GTAAGTAAAA TTGATATTC AAGTTTTTAA GATAAAATTG
 AACCAAAAA TGAGTGGCAA AAACAAGATG TTTTACAAGC ATTACTAAAA
 ATAAAAGGGC TAGATAAATT AACTCAAAAT GATTTTAATT TTAATATTA
 GAAAGCTAAT TTATTACGTA ATGGACAATT GATAATTAAA TCTAAAGACG
 ATTCTAAAAT TATAAAAGGT GAACTAAGTT TAGAAATTAA AAAACTAAAT
 AGAGTTAAAA AAGTTGAAAC AAAATATAAT GATACTAGAA CTGAGGTTTT
 AGTAATTGGT TATGATGAAA ATGGAAAAAT TTCTGGGTTT GCTCAAACCTG
 TTAAAAAAGT TCCTGAAAAA CTACCAGAAG AAATTATTAG TCTAGAGCGT
 GCTTTTTTAA AAAATAATTC TGATAAAATT GAAAATCTTG ATAAATGGGA
 CACATCTAAT ATAGTAAGTA TGTCTTCAAT GTTCAACAA GCTAGAAACT
 TTAATCAAGT TTTATCAAAAT TGGAATACAG AAAATGTAAC TGATATGAAT
 TATATGTTTG ATGGTGCAAC TAAATTCAAT AGTGATTTAT CGAGCTGGAA
 AACAGCAAAT GTAAAACTA TGAGAAGTAT GTTTAGTGAC ACAAACAAT
 TTAATCAAGA TATTCGAGT TGGAATGTAA GTAATGTTAA AAATATGAAA
 AATATGTTTT ATCGAGCTGA AAAATTTAAT AAATCACTTT CAGATTGGAA
 TCTAAAAAAT ATACAAGAAC TAGACCATAT GTTTTTTGGT GCTTCTGAAT
 TTAATAGCGA TATCTTCAA CTAAAAAATA ATCTAGTAAC TGATATGCGT
 TATATGTTTT TTCAAGCTAA AAAATTTAAT AAGTCTTTAG ATTGGGATGT
 ATCAAAAGTA GTTAATATGG ATAGTATGTT TAATGGTGCT CATGATTTTA
 ATCAAAATAT AACTAATTGG AATGTTTCAA ATGTTAAAAC TATGAGAAGT
 ATGTTTAGTG ACACAAAACA ATTTAATCAA GATATAAAAA ATTGGAGAGT
 TGATAATGTA ACTGATATGG ACCGTATGTT TCAAAATGCA CTAAGTTTTA
 ATAAAGATAT TTCAAGTTGG AATGTAAAAA ATGTA (SEQ ID NO: 26)

太字／イタリック文字はユニバーサルUGG Trpコドンを得るために誘導された点変異誘発を示す。

【0080】

【表8】

表7

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQ (成熟LppQ)の
アミノ酸配列

CKTSNFFNNKPNNNQKKEQVSKIDISSFKDKIEPKNEWQKQDVLQALLK
IKGLDKLTQNDFFNFKKANLLRNGQLIKSKDDSKI IKGELSLEIKKLN
RVKKVETKYNDTRTEVLVIGYDENGKISGFAQTVKKVPEKLP EEIISLER
AFLKNNSDKIENLDKWDTSNIVSMSMFQQARNFNQVLSNWNTENVTD MN
YMGD GATKFNSDLSSWKTANVKTMRSMFSDTKQFNQDISSWNVSNVKNMK
NMFYRAEKFNKSLSDWNLKNIQELDHMFFGASEFNSDIFKLKNNLVTD MR
YMFFQAKKFNKSLDWDVSKVVNMDSMFNGAHDFNQNI TNWNVSNVKTMR S
MFSDTKQFNQDIKNWRVDNVTDMDR MFQNALSFNKDISSWNVKNV

(SEQ ID NO: 27)

【0081】

【表9】

表8

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQN'
(LppQのN末端部分)をコードする合成遺伝子LppQ*N'の
ヌクレオチド配列

TGTA AAACTT CAAATTTTAA TAACAATAAA CCTAATAATA ATCAACAAAA
AAAAGAGCAA GTAAGTAAAA TTGATATTTT C AAGTTTTAAA GATAAAATTG
AACCAAAAAA TGAGTGGCAA AAACAAGATG TTTTACAAGC ATTACTAAAA
ATAAAAGGGC TAGATAAATT AACTCAAAAT GATTTTAATT TTAATATTAA
GAAAGCTAAT TTATTACGTA ATGGACAATT GATAATTAAA TCTAAAGACG
ATTCTAAAAT TATAAAAGGT GAACTAAGTT TAGAAATTAA AAACTAAAT
AGAGTTAAAA AAGTTGAAAC AAAATATAAT GATACTAGAA CTGAGGTTTT
AGTAATTGGT TATGATGAAA ATGGAAAAAT TTCTGGGTTT GCTCAA ACTG
TTAAAAAAGT TCCTGAAAAA CTACCAGAAG AAATTATTAG TCTAGAGCGT
GCTTTTTTAA AAAATAATTC TGATAAAATT GAAAATCTTG ATAAATGGGA
CACATCTAAT ATAGTAAGTA TGTCTTCAAT GTTTCAACAA GCTAGAAACT
TTAATCAAGT TTTATCAAAAT TGGAATACAG AAAATGTA (SEQ ID NO: 28)

太字ノイタリック文字はユニバーサルUGG_{Trp}コドンを得るために
誘導された点変異誘発を示す。

【0082】

【表10】

表9

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQN'
(LppQのN末端部分)のアミノ酸配列

CKTSNFFNNKPNNNQQKKEQVSKIDISSFKDKIEPKNEWQKQDVLQALLK
IKGLDKLTQNDNFNFKKANLLRNGQLIIKSKDDSKI IKGELSLEIKKLN
RVKKVETKYNDTRTEVLVIGYDENGKISGFAQTVKKVPEKLP EEIISLER
AFLKNNSDKIENLDKWDTSNIVSMSSMFQQARNFNQVLSNWNTENV

(SEQ ID NO: 29)

【0083】

【表11】

表10

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQC'
(LppQのC末端部分)をコードする合成遺伝子LppQ*C'の
ヌクレオチド配列

GTTTTATCAA ATTGGAATAC AGAAAATGTA ACTGATATGA ATTATATGTT
TGATGGTGCA ACTAAATTCA ATAGTGATTT ATCGAGCTGG AAAACAGCAA
ATGTAAAAAC TATGAGAAGT ATGTTTAGTG ACACAAAACA ATTTAATCAA
GATATTTTCGA GTTGGAAATGT AAGTAATGTT AAAAATATGA AAAATATGTT
TTATCGAGCT GAAAAATTTA ATAAATCACT TTCAGATTGG AATCTAAAAA
ATATACAAGA ACTAGACCAT ATGTTTTTTG GTGCTTCTGA ATTTAATAGC
GATATCTTCA AACTAAAAA TAATCTAGTA ACTGATATGC GTTATATGTT
TTTTCAAGCT AAAAAATTTA ATAAGTCTTT AGATTGGGAT GTATCAAAAG
TAGTTAATAT GGATAGTATG TTTAATGGTG CTCATGATTT TAATCAAAT
ATAACTAATT GGAATGTTTC AAATGTTAAA ACTATGAGAA GTATGTTTAG
TGACACAAA CAATTTAATC AAGATATAAA AAATTGGAGA GTTGATAATG
TAACTGATAT GGACCGTATG TTTCAAAATG CACTAAGTTT TAATAAAGAT
ATTTCAAGTT GGAATGTAAA AAATGTA (SEQ ID NO: 30)

太字/イタリック文字はユニバーサルUGG_{Trp}コドンを得るために
誘導された点変異誘発を示す。

【0084】

【表12】

表11

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQC'
(LppQのC末端部分)のアミノ酸配列

VLSNWNTENVTDNMNYMFDGATKFNSDLSSWKTANVKTMRSMFSDTKQFNQ
DISSWNVSNVKNMKNMFYRAEKFNKSLSDWNLKNIQELDHMFFGASEFNS
DIFKLLKNNLVTDMRYMFFQAKKFNKSLDWDVSKVVNMDSMFNGAHDNFQN
ITNWNVSNVKTMRSMFSDTKQFNQDIKNWRVDNVTDMDRMFQNALSFNKD
ISSWNVKNV (SEQ ID NO: 31)

【0085】

【表13】

表12

マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQのN'部分
およびC'部分の抗原性

1: ウサギ抗LppQ-His (1:1000)

C	N	F
+	+	+

2: CBPPウシ血清イタリア (1:100)

C	N	F
-	+	+

3 : 雌ウシ血清#511 (1:100) 接触感染前28日*

C	N	F
-	-	-

4 : 雌ウシ血清#511 (1:100) 接触感染後28日*

C	N	F
-	+	+

5 : 雌ウシ血清#511 (1:100) 接触感染後134日*

C	N	F
-	+	+

抗原:

C: LppQC'-His 1 μ g
 N: LppQN'-His 1 μ g
 F: LppQ-His全長 0.3 μ g

*実験的感染、Abdoら(1998)

【0086】

【表14】

表13

組換えLppQN'-Hisとマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス
SCL2株およびAfade株(CBPP)に接触感染した動物から
連続的に収集した血清との血清学的反応性

ヨーロッパ株L2との実験的感染

接触感染後日数	64	70	92	100	105	112	119	126	169	196	224
動物 #502	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注意：動物#502は、CF試験では感染後92日以前は
血清学的に陰性であった(Abdora(1998))。

B. アフリカ株Afaでの実験的感染

接触感染後日数	-28	-7	7	21	28	35	49	77	98	126	134
動物 #511	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

注意：動物#511はCF試験では21日および
それ以前は陰性であり、28日にはわずかに陽性(1/20)であった
(Abdora(1998))。

イムノプロット条件：抗原：1 μ g LppQ/イムノプロット
血清希釈：1：100
方法：Abdora(1998)参照

【0087】

【表15】

表14

近縁の動物マイコプラズマとの交差反応の不在下の
 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに対する
 LppQN'の血清学的特異性

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LppQN'-His	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LppQN'-His 1 μ gを含有するイムノブロットをウサギ過免疫血清
 またはウシの血清と反応させた。

- 1 : マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSC (PG1) に対する
 ウサギ血清 (1 : 1000)
- 2 : マイコプラズマ種ポバイン gr. 7 (PG50) に対する
 ウサギ血清 (1 : 1000)
- 3 : マイコプラズマ・カプリコラム亜種カプリコラム (Calif kid)
 に対するウサギ血清 (1 : 1000)
- 4 : マイコプラズマ・ミコイデス亜種カプリ (PG3) に対する
 ウサギ血清 (1 : 1000)
- 5 : マイコプラズマ・カプリコラム亜種カプリコニューモニア (F38)
 に対するウサギ血清 (1 : 1000)
- 6 : マイコプラズマ・プトリファシエンスに対する
 ウサギ血清 (1 : 1000)
- 7 : マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスLC (Y-goat)
 に対するウサギ血清 (1 : 1000)
- 8 : マイコプラズマ・ポビス (#68) に陽性であるウシ血清 (1 : 50)
- 9 : マイコプラズマ・ポビス (#4488/64) に陽性である
 ウシ血清 (1 : 50)
- 10 : マイコプラズマ・ポビス (#9/369) に陽性である
 ウシ血清 (1 : 50)
- 11 : マイコプラズマ・ポビス (#58/58) に陽性である
 ウシ血清 (1 : 50)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

5 <110> AKZO Nobel N.V.
 <120> Antigenic protein LppQ of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC, its preparation and use

10 <130> OL1-99PRIO
 <160> 31
 <170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides

20 <221> primer_bind
 <222> (1)..(33)
 <400> 1
 25 cgccatagtc cattagttgt tgtttcatgt aaa 33
 <210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 30 <213> Mycoplasma mycoides
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(25)

35 <400> 2
 ttttgttttt gccactgatt ttttg 25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 40 <213> Mycoplasma mycoides
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(25)

45 <400> 3
 caaaaaatga qtggcaaaaa caaga 25
 <210> 4
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides

50 <221> primer_bind
 <222> (1)..(34)

55 <400> 4
 ccggatccc aatttgataa aacttgatta aagt 34
 <210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides

60 <221> primer_bind

65 <221> primer_bind

```

<222> (1)..(37)
<400> 5
5 aacgaattca gttttatcaa attggaatac agaaaat 37
<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
10 <221> primer_bind
<222> (1)..(28)
<400> 6
15 cattttgctgt tttccagctc gataaatc 28
<210> 7
<211> 30
<212> DNA
20 <213> Mycoplasma mycoides
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)
25 <400> 7
gtgatttate gagctggaaa acagcaaattg 30
<210> 8
<211> 30
30 <212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)
35 <400> 8
cattaacttac attccaactc gaaatatctt 30
<210> 9
<211> 30
40 <212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
<221> primer_bind
45 <222> (1)..(30)
<400> 9
50 aaqatatttc gagttggaat gtaagtaatg 30
<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
55 <221> primer_bind
<222> (1)..(30)
<400> 10
60 atatttttta gattccaatc tgaaagtgat 30
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
65 <221> primer_bind

```

```

<222> (1)..(30)

<400> 11
atcactttca gattggaatc taaaaaatat
5
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
10
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)

<400> 12
cttttgatac atcccaatct aaagacttat
15
<210> 13
<211> 30
<212> DNA
20
<213> Mycoplasma mycoides

<221> primer_bind
<222> (1)..(30)

25
<400> 13
ataaqtcttt agattgggat gtatcaaaaq
30
<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides

<221> primer_bind
<222> (1)..(29)
35
<400> 14
tttgaaacat tccaattagt tatatcttg
40
<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides

<221> primer_bind
<222> (1)..(31)
45
<400> 15
tcaaaatata actaattgga atgtttcaaa t
50
<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides

55
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)

<400> 16
acattatcaa ctctccaatt ttttatatct
60
<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Mycoplasma mycoides
65
<221> primer_bind

```

<222> (1)..(31)
 <400> 17
 5 agatataaaa aattggagag ttgataatgt a 31
 <210> 18
 <211> 38
 <212> DNA
 10 <213> Mycoplasma mycoides
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(38)
 <400> 18
 15 cggatccta cattttttac attccaactt gaaatata 38
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Mycoplasma mycoides
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)
 25 <400> 19
 gttttatcaa attggaatac agaaaatgta 30
 <210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 30 <213> Mycoplasma mycoides
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)
 35 <400> 20
 tacattttct gtattccaat ttgataaaac 30
 <210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides
 40 <221> primer_bind
 <222> (1)..(33)
 <400> 21
 45 gcagaattcc cattagttgt tgtttcatgt aaa 33
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides
 50 <221> primer_bind
 <222> (1)..(19)
 <400> 22
 55 actctgagag ggaataatg 19
 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 60 <213> Mycoplasma mycoides
 65

```

<221> primer bind
<222> (1)..(18)

<400> 23
5 caaccacaagg catcaatg 18

<210> 24
<211> 1335
<212> DNA
10 <213> Mycoplasma mycoides

<221> gene
<222> (1)..(1335)

15 <400> 24
atgaaaaata aacatatcag tctactagca aaacttgaag ttttattttc tgttacatca 60
cttccattag ttgtttgttc atgtaaaact tcaaatttta ataacaataa acctaataat 120
aatcaacaaa aaaaagagca agtaagtaaa attgatattt caagttttaa agataaaatt 180
gaaccaaaaa atgagtgaca aaaacaagat gttttacaag cattactaaa aataaaaagg 240
20 ctagataaat taactcaaaa tgattttaatt ttttaatta agaaagctaa ttfattacgt 300
aatggacaat tgataaattaa atctaaagac gattctaaaa ttataaaaagg tgaactaagt 360
ttagaaatta aaaaactaaa ttagagttaaa aaagtggaaa caaaatataa tgatactaga 420
actgaggttt tagtaattgg ttagatgtaa aatggaaaaa tttctgggtt tgcctcaact 480
gttaaaaaag ttctctgaaa actaccagaa gaaattatta gtctagagcg tgccttttta 540
25 aaaaataatt ctgataaaat tgaaaatcct gataaatggg acacatctaa tataqtaagt 600
atgtcttcaa tgtttcaaca agctagaaac ttttaatacaag ttttatcaaa ttgaaataca 660
gaaaatgtaa ctgatatgaa ttatatgttt gatggtgcaa cttaattcaa tagtgattta 720
tcgagctgaa aaacagcaaa tgtaaaaact atgagaagta tgtttagtga cacaaaacaa 780
tttaatacaag atatttcgag ttgaaatgta agtaatgta aaaaatgaa aaatatgttt 840
tategagctg aaaaatttaa taatcacctt tcagattgaa atctaaaaaa tatacaagaa 900
30 ctagaccata tgttttttgg tgcctctgaa ttttaatagcg atatcttcaa actaaaaaat 960
aatctagtaa ctgatatgag ttatatgttt tttcaagcta aaaaatttaa taagtcttta 1020
gattgagatg tatcaaaagt agttaatatg gatagtatgt ttaatggtgc tcatgatttt 1080
aatcaaaaa taactaattg aaatgtttca aatgttaaaa ctatgagaag tatgtttagt 1140
35 gacacaaaac aatttaataca agatataaaa aattgaagag ttgataatgt aactgatatg 1200
gaccgatgtt tcaaaaatgc actaagtttt aataaagata tttcaagttg aaatgtaaaa 1260
aatgtaaaat catatgatgc ctttqgttga cacataaaaa aagaatttaa acctttattt 1320
gaaaaaata ataag 1335

40 <210> 25
<211> 445
<212> PRT
<213> Mycoplasma mycoides

45 <221> PEPTIDE
<222> (1)..(445)

<400> 25
50 Met Lys Asn Lys His Ile Ser Leu Leu Ala Lys Leu Glu Val Leu Phe
1 5 10 15
Ser Val Thr Ser Leu Pro Leu Val Val Val Ser Cys Lys Thr Ser Asn
20 25 30
55 Phe Asn Asn Asn Lys Pro Asn Asn Asn Gln Gln Lys Lys Glu Gln Val
35 40 45
Ser Lys Ile Asp Ile Ser Ser Phe Lys Asp Lys Ile Glu Pro Lys Asn
50 55 60
60 Glu Trp Gln Lys Gln Asp Val Leu Gln Ala Leu Leu Lys Ile Lys Gly
65 70 75 80
65 Leu Asp Lys Leu Thr Gln Asn Asp Phe Asn Phe Asn Ile Lys Lys Ala
85 90 95

```

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

Ile Ile Ser Leu Glu Arg Ala Phe Leu Lys Asn Asn Ser Asp Lys Ile
 145 150 155 160

5 Glu Asn Leu Asp Lys Trp Asp Thr Ser Asn Ile Val Ser Met Ser Ser
 165 170 175

Met Phe Gln Gln Ala Arg Asn Phe Asn Gln Val Leu Ser Asn Trp Asn
 180 185 190

10 Thr Glu Asn Val Thr Asp Met Asn Tyr Met Phe Asp Gly Ala Thr Lys
 195 200 205

15 Phe Asn Ser Asp Leu Ser Ser Trp Lys Thr Ala Asn Val Lys Thr Met
 210 215 220

Arg Ser Met Phe Ser Asp Thr Lys Gln Phe Asn Gln Asp Ile Ser Ser
 225 230 235 240

20 Trp Asn Val Ser Asn Val Lys Asn Met Lys Asn Met Phe Tyr Arg Ala
 245 250 255

Glu Lys Phe Asn Lys Ser Leu Ser Asp Trp Asn Leu Lys Asn Ile Gln
 260 265 270

25 Glu Leu Asp His Met Phe Phe Gly Ala Ser Glu Phe Asn Ser Asp Ile
 275 280 285

30 Phe Lys Leu Lys Asn Asn Leu Val Thr Asp Met Arg Tyr Met Phe Phe
 290 295 300

Gln Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Leu Asp Trp Asp Val Ser Lys Val
 305 310 315 320

35 Val Asn Met Asp Ser Met Phe Asn Gly Ala His Asp Phe Asn Gln Asn
 325 330 335

Ile Thr Asn Trp Asn Val Ser Asn Val Lys Thr Met Arg Ser Met Phe
 340 345 350

40 Ser Asp Thr Lys Gln Phe Asn Gln Asp Ile Lys Asn Trp Arg Val Asp
 355 360 365

45 Asn Val Thr Asp Met Asp Arg Met Phe Gln Asn Ala Leu Ser Phe Asn
 370 375 380

Lys Asp Ile Ser Ser Trp Asn Val Lys Asn Val
 385 390 395

50 <210> 28
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides

55 <221> gene
 <222> (1)..(588)

60 <400> 28
 tgtaaaactt caaatTTTaa taacaataaa cctaataata atcaacaaaa aaaagagcaa 60
 gtaagtaaaa ttgatatttc aagTTTTaaa gataaaaattg aaccaaaaaa tgagtggcaa 120
 aaacaagatg tttacaagc attactaaaa ataaaagggc tagataaatt aactcaaat 180
 gattTTaatt ttaatattaa gaaagctaatt ttattacgta atggacaatt gataattaaa 240
 tctaaagacg attctaaaat tataaaaagggt gaactaagtt tagaaattaa aaaactaaat 300
 65 agagttaaaa aagttgaaac aaaatataat gatactagaa ctgaggTTTT agtaattggt 360
 tatgatgaaa atggaaaaat ttctgggttt gctcaaaactg ttaaaaaagt tcttgaaaaa 420

ctaccagaag aaattattag tctagagcgt gcttttttaa aaaataattc tgataaaatt 480
 gaaaatcttg ataaatggga cacatcfaat atagtaagta tctcttcaat gtttcaacaa 540
 gctagaaaact ttaatcaagt tttatcaaat tggataacag aaaatgta 588

5 <210> 29
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma mycoides

10 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(196)

<400> 29
 Cys Lys Thr Ser Asn Phe Asn Asn Asn Lys Pro Asn Asn Asn Gln Gln
 15 1 5 10 15
 Lys Lys Glu Gln Val Ser Lys Ile Asp Ile Ser Ser Phe Lys Asp Lys
 20 20 25 30
 Ile Glu Pro Lys Asn Glu Trp Gln Lys Gln Asp Val Leu Gln Ala Leu
 25 35 40 45
 Leu Lys Ile Lys Gly Leu Asp Lys Leu Thr Gln Asn Asp Phe Asn Phe
 50 55 60
 25 Asn Ile Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg Asn Gly Gln Leu Ile Ile Lys
 65 70 75 80
 Ser Lys Asp Asp Ser Lys Ile Ile Lys Gly Glu Leu Ser Leu Glu Ile
 30 85 90 95
 Lys Lys Leu Asn Arg Val Lys Lys Val Glu Thr Lys Tyr Asn Asp Thr
 100 105 110
 35 Arg Thr Glu Val Leu Val Ile Gly Tyr Asp Glu Asn Gly Lys Ile Ser
 115 120 125
 Gly Phe Ala Gln Thr Val Lys Lys Val Pro Glu Lys Leu Pro Glu Glu
 130 135 140
 40 Ile Ile Ser Leu Glu Arg Ala Phe Leu Lys Asn Asn Ser Asp Lys Ile
 145 150 155 160
 Glu Asn Leu Asp Lys Trp Asp Thr Ser Asn Ile Val Ser Met Ser Ser
 45 165 170 175
 Met Phe Gln Gln Ala Arg Asn Phe Asn Gln Val Leu Ser Asn Trp Asn
 180 185 190
 50 Thr Glu Asn Val
 195

55 <210> 30
 <211> 627
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma mycoides

60 <221> gene
 <222> (1)..(627)

<400> 30
 gttttatcaa attggaatac agaaaatgta actgatatga attatatggt tgatggtgca 60
 actaaattca atagtgattt atcgagctgg aaaacagcaa atgtaaaaac tatgagaagt 120
 65 atgttttagtg acacaaaaca atttaataca gatatttcga gttggaatgt aagtaatggt 180
 aaaaatatga aaaatatggt ttatcgagct gaaaaatta ataaatcact ttcagattgg 240

```

aatctaaaaa atatacaaga actagaccat atgttttttg gtgcttctga atttaaatgc 300
gatatcttca aactaaaaaa taatctagta actgatatgc gttatatgtt ttttcaagct 360
aaaaaattta ataagtcttt agattgggat gtatcaaaag tagttaatat ggatagtatg 420
tttaaatggtg ctcatgattt taatcaaaa ataaactaatt ggaatgtttc aaatgttaaa 480
5 actatgagaa gtatgttttag tgacacaaaa caatttaate aagatataaa aaattggaga 540
gttgataatg taactgatat ggaccgtatg tttcaaaaatg cactaagttt taataaaagat 600
atctcaagtt ggaatgtaaa aaatgta 627

<210> 31
10 <211> 209
    <212> PRT
    <213> Mycoplasma mycoides

    <221> PEPTIDE
15 <222> (1)..(209)

    <400> 31
Val Leu Ser Asn Trp Asn Thr Glu Asn Val Thr Asp Met Asn Tyr Met
   1           5           10
20 Phe Asp Gly Ala Thr Lys Phe Asn Ser Asp Leu Ser Ser Trp Lys Thr
   20           25           30
25 Ala Asn Val Lys Thr Met Arg Ser Met Phe Ser Asp Thr Lys Gln Phe
   35           40           45
    Asn Gln Asp Ile Ser Ser Trp Asn Val Ser Asn Val Lys Asn Met Lys
   50           55           60
30 Asn Met Phe Tyr Arg Ala Glu Lys Phe Asn Lys Ser Leu Ser Asp Trp
   65           70           75
    Asn Leu Lys Asn Ile Gln Glu Leu Asp His Met Phe Phe Gly Ala Ser
   85           90           95
35 Glu Phe Asn Ser Asp Ile Phe Lys Leu Lys Asn Asn Leu Val Thr Asp
   100          105          110
40 Met Arg Tyr Met Phe Phe Gln Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Leu Asp
   115          120          125
    Trp Asp Val Ser Lys Val Val Asn Met Asp Ser Met Phe Asn Gly Ala
   130          135          140
45 His Asp Phe Asn Gln Asn Ile Thr Asn Trp Asn Val Ser Asn Val Lys
   145          150          155
    Thr Met Arg Ser Met Phe Ser Asp Thr Lys Gln Phe Asn Gln Asp Ile
   165          170          175
50 Lys Asn Trp Arg Val Asp Asn Val Thr Asp Met Asp Arg Met Phe Gln
   180          185          190
55 Asn Ala Leu Ser Phe Asn Lys Asp Ile Ser Ser Trp Asn Val Lys Asn
   195          200          205
    Val

```

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年12月7日(2001.12.7)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 配列番号：25に示すアミノ酸配列またはその抗原性部分を含んでなるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス小コロニー(SC)のタンパク質。

【請求項2】 配列番号：25に示すアミノ酸配列を含むことを特徴とするマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのLppQ前駆体タンパク質。

【請求項3】 上記部分が、配列番号：27または配列番号：29に示すアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項4】 配列番号：27に示すアミノ酸配列を含むことを特徴とするマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの成熟LppQタンパク質。

【請求項5】 配列番号：29に示すアミノ酸配列を含むことを特徴とするマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの成熟LppQタンパク質のN末端ハーフ。

【請求項6】 タンパク質がリポタンパク質である請求項1ないし5のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項7】 請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項8】 配列番号：24、配列番号：26、または配列番号：28に示すDNA配列を含むことを特徴とする請求項7に記載のDNA。

【請求項9】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCの直接的または間接的に検出するための診断方法における請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項10】 診断方法が免疫学的方法であって、イムノブロッティング、血清学的試験およびE L I S Aからなる群から選択される請求項9に記載の使用。

【請求項11】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cにより引き起こされた疾病に対するワクチンの調製のための請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質、または請求項7または8のいずれかに記載のDNAの使用。

【請求項12】 マーカーワクチンとして使用するための、細胞がL p p Qタンパク質の合成能を欠く、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cの生、弱毒化または不活性化細胞の調製のための請求項7または8のいずれかに記載のDNAの使用。

【請求項13】 マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスS Cの検出方法における請求項7または8のいずれか一項に記載のDNAの使用。

【請求項14】 検出方法がP C R法およびハイブリダイゼーション法からなる群から選択される請求項13に記載の使用。

【請求項15】 請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質を発現するための請求項7または8のいずれか一項に記載のDNAの使用。

【請求項16】 請求項7または8のいずれかに記載のDNAを含んでなる、より好ましくはp J F F m a L P 4 8 - M u H i s 1 (t h e E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s , S a l i s b u r y , W i l t s h i r e S P 4 0 J G . 英国、に寄託、寄託番号：99081025)であるベクター。

【請求項17】 請求項16に記載のベクターまたは請求項7または8のいずれかに記載のDNAを含んでなる宿主細胞。

【請求項18】

(a) 請求項16に記載のベクターを適当な宿主細胞に導入する；

(b) 請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養する；および

(c) 工程(b)のタンパク質を宿主細胞または上澄から単離する請求項1な

いし6のいずれかに記載のタンパク質の調製方法。

【請求項19】

- (a) マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCのゲノムDNAのDNAライブラリーを適当なファージにクローン化する；
- (b) 工程(a)のファージを用いて適当な宿主細胞を感染させる；
- (c) 宿主細胞をマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCに感染した哺乳動物の血清でスクリーニングする；
- (d) 陽性クローンを選別し、精製する；および
- (e) 工程(d)のファージのゲノムDNAを単離する、配列番号：25のDNA配列を含むことを特徴とするDNAの調製方法。

【請求項20】

- (a) 配列番号：24のDNA配列を含むことを特徴とするDNAおよび配列番号：1ないし4および6ないし21に示すプライマーセットを重複伸長PCR (overlap extension PCR: OE-PCR) に適用して第1のPCR産物を得る；
- (b) 工程(a)のOE-PCRの第1のPCR産物を、望ましい変異数のために要求される1回またはそれ以上のOE-PCRに適用し、最終PCR産物を得る；および
- (c) 最終PCR産物を単離する、配列番号：26、または配列番号：28のDNA配列を含むことを特徴とするDNAの調製方法。

【請求項21】

- (a) 請求項1ないし6のいずれか一項に記載のタンパク質を適当な膜にブロッキングする；
- (b) 膜を該体液と共にインキュベートする；
- (c) 膜を標識したコンジュゲートと共にインキュベートする；
- (d) コンジュゲートの抗体とおよび請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質に対する体液からの抗体との複合体を検出するために呈色反応を開始する、動物の体液中の請求項1ないし6のいずれか一項に記載のタンパク質に対す

る抗体を検出する方法。

【請求項22】

(a) マイクロタイタープレートを請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質で被覆する；

(b) マイクロタイタープレートを該体液と共にインキュベートする；

(c) マイクロタイタープレートを標識したコンジュゲートと共にインキュベートする；および

(d) コンジュゲートの抗体とおよび請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質に対する体液からの抗体との複合体を検出するために呈色反応を開始する、動物の体液中の請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体の検出方法。

【請求項23】

(a) 配列番号：24に記載のDNAを検出するためのPCRプライマー対を試験すべきサンプルと共にPCR反応において使用する；および

(b) PCR反応後、予想されるPCR産物の存在を上記PCRプライマー対で検査する、マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCを検出する方法。

【請求項24】 上記PCRプライマー対が配列番号：22および配列番号：23のプライマーからなる群から選択される請求項23に記載の方法。

【請求項25】 請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質に特異的なモノクローナル抗体。

【請求項26】 請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質および/または少なくとも1つの請求項25に記載の抗体が適当な容器に含まれている診断キット。

【請求項27】 請求項1ないし6のいずれかに記載のタンパク質または請求項7または8のいずれかに記載のDNAを含んでなるマイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデスSCによる感染に対するワクチン。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					International Application No. PCT/EP 00/11798	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C12N15/31	C07K14/30	A61K48/00	A61K39/02	C12Q1/68	
	G01N33/569	C12N15/70	C12N1/21	C07K16/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
B. FIELDS SEARCHED						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)						
IPC 7	C12N	C07K	A61K	C12Q	G01N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
EMBL, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	EL-MOSTAFA ABDO ET AL.: "Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony type" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 59, no. 2,3, 16 January 1998 (1998-01-16), pages 109-122, XP000982360 cited in the application abstract page 113, paragraph 3 page 119, paragraph 3 -page 120, paragraph 3; figure 1 --- -/--					1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents:						
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
27 February 2001				09/03/2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer Montero Lopez, B		

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/11798

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EL-MOSTAFA ABDO ET AL.: "Antigenic and genetic characterization of lipoproteinLppQ from Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC" CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 7, no. 4, July 2000 (2000-07), pages 588-595, XP000982373 the whole document	1-30
P, X	& DATABASE EMBL 'Online! Entry AF072716, 24 January 2000 (2000-01-24) FREY J. ET AL.: "Mycoplasma mycoides mycoides SC membrane associated lipoprotein precursor" Database accession no. AF072716 the whole document	1-30
A	ROSARIO GONCALVES ET AL.: "Antigen heterogeneity among Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC isolates: discrimination of major surface proteins" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 63, 28 August 1998 (1998-08-28), pages 13-28, XP000982361 abstract page 17, paragraph 1 page 18, paragraph 2 -page 25, paragraph 3	1-30
A	XAOXING CHENG ET AL.: "Characterization of the gene for an immunodominant 72 kDa lipoprotein of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony type" MICROBIOLOGY, vol. 142, 1996, pages 3515-3524, XP000982523 the whole document	1-30
A	DATABASE EMBL 'Online! Entry MCAAW, 19 August 1994 (1994-08-19) BORK P. ET AL.: "M. capricolum DNA for CONTIG MCAAW" Database accession no. Z33359 XP002161528 the whole document	1-30

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 0 7 K	14/30	C 0 7 K	16/12	4 C 0 8 4
	16/12	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15		1/19	4 C 0 8 6
	1/19		1/21	4 H 0 4 5
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 Q	1/48	Z
C 1 2 P	21/02		1/68	A
C 1 2 Q	1/48	G 0 1 N	33/53	Z
	1/68			D
G 0 1 N	33/53			M
				N
			33/566	
			33/569	F
	33/566		33/577	B
	33/569		33/58	Z
	33/577	C 1 2 P	21/08	
	33/58	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08		5/00	A
Fターム(参考)	2G045 AA28 BB20 CA26 CB21 DA12			
	DA13 DA14 DA20 DA36 FB01			
	FB02 FB03 FB04 FB07 HA16			
	4B024 AA01 AA11 AA13 BA31 CA03			
	HA01 HA14 HA15			
	4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ43 QR08			
	QR32 QR62 QS25 QS33 QS34			
	4B064 AG27 AG31 CA19 CC24 DA01			
	DA13 DA15			
	4B065 AB01 BA02 CA45 CA46			
	4C084 AA13 MA52 MA59 MA60 MA66			
	NA14 ZB352			
	4C085 AA03 AA08 BA48 BB11 BB23			
	CC07 EE01 GG03 GG04 GG05			
	GG08 GG10			
	4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04			
	NA14 ZB35			
	4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA55			
	CA11 DA76 DA86 EA31 EA50			
	EA52 FA74			

专利名称(译)	Mycoplasma mycoides亚种Mycoides SC的抗原蛋白LppQ, 其制备和用途		
公开(公告)号	JP2003515340A	公开(公告)日	2003-05-07
申请号	JP2001542536	申请日	2000-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	フレイヨツトジヨウアキム ニコレジージャツク アブドイーエルモスタファ		
发明人	フレイ,ヨツト・ジヨウアキム ニコレ,ジー・ジャツク アブド,イー・エル・モスタファ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/711 A61K39/00 A61K39/02 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/30 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12N15/70 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/30 A61K39/00 A61K2039/521 A61K2039/522 A61K2039/53		
FI分类号	A61K31/711 A61K39/00.J A61K48/00 A61P31/04.171 C07K14/30 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/48.Z C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.N G01N33/566 G01N33/569.F G01N33/577.B G01N33/58.Z C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB07 2G045/HA16 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA03 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/BA48 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC07 4C085/EE01 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA55 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	1999123676 1999-11-29 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是支原体支原体亚种Mycoides SC的蛋白质LppQ, 编码该蛋白质的DNA, 该蛋白质和DNA的制备方法, 包含该DNA的载体, 包含该载体的支原体支原体亚种。蛋白质在检测免疫学方法中的用途, DNA在检测支原体支原体亚种SC的遗传方法中的使用, 蛋白质用于制备抗支原体支原体亚种疫苗的蛋白质和DNA的使用, 用于免疫学检测抗支原体支原体Mycoides SC的抗体的方法和PCR方法用于检测支原体支原体Mycoides SC的抗体, 对LppQ或其一部分具有特异性的单克隆抗体和 我的椰干 丝状涉及一种用于在亚种蕈状SC检测感染的诊断试剂盒。

表1. マイコプラズマの株

種	株	コリネバクテリウム	産地	年	宿主
M. mycoides subsp. Mycoides SC	PE1	W70	Spain	1931	ウシ/ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	2693	U75	Spain	1934	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	8770/125	U75	Portugal	1931	ウシノコ/豚
M. mycoides subsp. Mycoides SC	C365	U75	Portugal	1933	ヤギノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	C326	U75	Portugal	1933	ヒツジノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	702	CFM40	France	1930	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	2022	UP	France	1934	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	12	1962	Italy	1933	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	402	UP	Italy	1930	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	649	UP	Italy	1932	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	Atade	CFM0	Chad	1938	ウシ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	Patrick	CFM0	Senegal	1938	ウシ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	317	CFM0	Chad	1967	ウシノコ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	9165-520/1	CFM0	Ivory Coast	1991	ウシ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	91130	CFM0	Ctr. Afric. Rep.	1991	ウシ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	9411	CFM0	Rwanda	1994	ウシ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	95014	CFM0	Tanzania	1995	ウシ
M. mycoides subsp. Mycoides SC	7144	CFM0	Tanzania	1992	ウシ/ウシノコ/豚
M. mycoides subsp. Mycoides SC	7118/540	CFM0	Tanzania	1992	ウシ/ウシノコ/豚
M. mycoides subsp. Mycoides SC	ALJ	CFM0	Sudan	1990	ウシ/ウシノコ/豚
M. mycoides subsp. Mycoides SC	6149/54/16	ALJ	Australia	ウシ	
M. mycoides subsp. Mycoides SC	16	ALJ	Australia	1985	ウシ/ウシノコ/豚
M. mycoides subsp. Mycoides SC	16/2/3	WCT	Australia		
M. mycoides subsp. Mycoides LC	162/30	7U2	Cote d'Ivoire	1992	ヤギノコ
M. mycoides subsp. Mycoides LC	1288/6	CFM0	France		ウシ