

(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2002 - 306169

(P2002 - 306169A)

(43)公開日 平成14年10月22日(2002.10.22)

(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 39/00	J 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00		39/39	4 B 0 6 3
39/39		48/00	4 B 0 6 4
48/00		A 6 1 P 31/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/04			171 4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 44 O L (全 32数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 101364(P2001 - 101364)

(22)出願日 平成13年3月30日(2001.3.30)

(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 ケンドール ウェイン キング

アメリカ合衆国,コネチカット 06340,グロ

ートン,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 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイコプラズマ属の *Mycoplasma hyopneumoniae* の mhp3 遺伝子の核酸
およびタンパク質ならびにそれらの使用

(57)【要約】

【課題】 *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp3遺伝子の核
酸及びそれによりコードされるタンパク質の提供。

【解決手段】 本発明は、*Mycoplasma hyopneumoniae*に
よる感染により引き起こされる疾患の予防及び治療する
ためのワクチンにおいて使用されるmhp3によりコードさ
れる新規のアポタンパク質抗原に関する。さらに；本発
明は、上記抗原の組換えによる製造方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたない、前記タンパク質。

【請求項2】 配列番号4の少なくとも50の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項4】 配列番号4を含むアミノ酸配列を有する、請求項3に記載のタンパク質。

【請求項5】 単離されたタンパク質である、請求項1, 2, 3又は4に記載のタンパク質。

【請求項6】 融合タンパク質である、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項7】 前記融合タンパク質がチオレドキシン(thioredoxin)融合タンパク質である、請求項6に記載のタンパク質。

【請求項8】 請求項1, 2, 3又は4に記載のタンパク質、及び医薬として許容される担体を含む組成物。

【請求項9】 アジュバントをさらに含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエ(*Mycoplasma hyopneumoniae*)P46, P65, P97、及びP102から成る群から選ばれる少なくとも1のポリペプチドをさらに含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項11】 その免疫原性タンパク質が、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたない、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体。

【請求項12】 その免疫原性タンパク質が、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたない、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体。

【請求項13】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における病気又は失調を治療又は予防する方法であって、マイコプラズマ・ヒオニューモニエに特異的な細胞性又は体液性応答の上昇を顕出するために十分な量で、(i)配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸配列Trp Asp Lys Gluがその後に続く脂肪酸でアシル化されたシステインをもたないもの、及び(ii)医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を上記動物に投与することを、

前記方法。

【請求項14】 前記タンパク質が、配列番号4の少なくとも50の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における病気又は失調を治療又は予防する方法であって、マイコプラズマ・ヒオニューモニエに特異的な細胞性又は体液性応答の上昇を顕出するために十分な量で、(i)配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列を有する抗原性又は免疫原性タンパク質、及び(ii)医薬として許容される担体を含むワクチン製剤を、上記動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項16】 前記タンパク質が、配列番号4を含むアミノ酸配列を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記動物がブタである、請求項13, 14, 15又は16に記載の方法。

【請求項18】 配列番号2の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コード内にコードする単離又は精製DNA又はその相補物。

【請求項19】 前記タンパク質が、配列番号2の少なくとも50の連続したアミノ酸を含む配列を有する、請求項18に記載のDNA。

【請求項20】 前記DNAが、配列番号1の少なくとも90の連続したヌクレオチドを含む配列を有する、請求項18に記載のDNA。

【請求項21】 配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質をユニバーサル遺伝子コード内にコードするDNA又はその相補物。

【請求項22】 前記タンパク質が、配列番号4の少なくとも50の連続したアミノ酸を含む配列を有する、請求項21に記載のDNA。

【請求項23】 前記DNAが、配列番号3の少なくとも90の連続したヌクレオチドを有する、請求項21に記載のDNA。

【請求項24】 異種プロモーターに作用可能な状態で連結された、請求項22に記載のDNA。

【請求項25】 原核細胞内で活性な複製起点をさらに含む、請求項24に記載のDNA。

【請求項26】 真核細胞内で活性な複製起点をさらに含む、請求項24に記載のDNA。

【請求項27】 請求項24に記載の単離DNAを含む宿主細胞。

【請求項28】 前記細胞が大腸菌(*E. coli*)BL21であり、そして前記DNAが、発現ベクターpBAD/Thio-TOPOである、請求項27に記載の宿主細胞。

【請求項29】 apo-Mhp3又はその断片の製造方法であって、apo-Mhp3が発現される条件下で請求項27に記載の

細胞を培養し、そして(ii)上記タンパク質を回収する、を含む、前記方法。

【請求項30】 前記タンパク質が、可溶性形態で回収される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 前記タンパク質が、不溶性の形態で回収される、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における病気又は失調を治療又は予防する方法であって、マイコプラズマ・ヒオニューモニエに特異的な細胞性又は体液性応答の上昇を顕出させるために十分な量で、(i)請求項20に記載のDNA、及び(ii)医薬として許容される担体を含むワクチン製剤を、上記動物に投与することを、含む、前記方法。

【請求項33】 前記動物がブタである、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 配列番号2の少なくとも5の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質をマイコプラズマ遺伝子コード内にコードするDNA又はその相補物に、PCRのためのストリジェント条件下で、ハイブリダイズする、15-40ヌクレオチドの断片を含む単離DNA。

【請求項35】 前記ハイブリダイゼーションが、M. hyopneumoniaeに特異的である、請求項34に記載の単離DNA。

【請求項36】 配列番号2の少なくとも30の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コード内にコードするDNA又はその相補物に、フィルター・ハイブリダイゼーションのための高ストリンジェンシー条件下で、ハイブリダイズする、少なくとも90ヌクレオチドの断片を含む単離DNA。

【請求項37】 配列番号2の少なくとも5の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コード内にコードするDNAに、PCRのためのストリジェント条件下でハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレオチドの断片を含む第1の単離DNA、並びに配列番号2の少なくとも5の連続したアミノ酸の配列を有するタンパク質をマイコプラズマ遺伝子コード内に、コードするDNAに相補的なDNAに、PCRのためのストリジェント条件下でハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレオチドの断片を含む第2の単離DNAを、少なくとも1の容器内に含むキットであって、上記キットがM. hyopneumoniae感染の診断に有用であることを示す宣言文を含む、前記キット。

【請求項38】 前記ハイブリダイゼーションがM. hyopneumoniaeに特異的である、請求項37に記載のキット。

【請求項39】 前記ハイブリダイゼーションがM. hyopneumoniaeに特異的であり、かつ、前記キットが、M. hyopneumoniae感染の診断に有用であることを示す宣言文を含む、請求項34に記載の単離DNAを、少なくとも1の容器内に含むキット。

【請求項40】 配列番号4の少なくとも30の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質、及び前記キットがM. hyopneumoniae感染の診断に有用であることを示す宣言文を、少なくとも1の容器内に含むキット。

【請求項41】 抗-ブタ第2抗体をさらに含む、請求項40に記載のキット。

【請求項42】 前記第2抗体が、比色計測反応を触媒する酵素にコンジュゲートされる、請求項41に記載のキット。

【請求項43】 前記酵素が、アルカリ・ホスファターゼと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼから成る群から選ばれる、請求項42に記載のキット。

【請求項44】 比色計測アッセイのための試薬をさらに含む、請求項42に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】 [技術分野] mhp3は、マイコプラズマ属のマイコプラズマ・ヒオニューモニエ(Mycoplasma hyopneumoniae)のタンパク質をコードする。本発明は、mhp3のヌクレオチドおよびタンパク質に関する。本発明はさらに、マイコプラズマ属のMycoplasma hyopneumoniaeによる感染によって引き起こされる疾患を防止し、治療するためにワクチンに用いるためのmhp3によりコードされる新規のアポタンパク質抗原に、そしてこのような抗原の組換え的産生のための方法に関する。

【0002】 [発明の背景] マイコプラズマ属のMycoplasma hyopneumoniae(M. hyopneumoniae)は、ブタの動物地方病マイコプラズマ肺炎を引き起こす細菌病原である。動物地方病マイコプラズマ肺炎は、貧飼料要求率、発育停止、ならびに二次肺感染に対する素因を生じる慢性疾患である。M. hyopneumoniaeは、気道を通して、そして雌ブタ-子ブタ伝播により容易に伝播され、養豚場で大いに流行する。米国のブタ群の約99%が感染し、1991年の概算によれば年間約3億ドルをブタ産業は失っている。

【0003】 M. hyopneumoniaeを検出するための簡単な検査はなく、感染に対する有効な手段もない。M. hyopneumoniaeの検出のための検査は、M. hyopneumoniaeに対して向けられる抗体の他のブタマイコプラズマ種との交差反応性により妨害されてきた。ワクチン分野はほとんどの部分に関して、M. hyopneumoniaeの補助膜または全細胞調製物によっており、これらは有意の免疫応答を引き出していない。さらに、M. hyopneumoniaeのクローニングおよび組換え発現は、ワクチン中の商業的使用のための十分に防御的であるタンパク質の生成に失敗している。

【0004】 適切なワクチンがないために、動物地方病マイコプラズマ肺炎は、感染動物の早期検出および隔離によって大いに阻止されてきた。抗生物質によるM. hyopneumoniae感染動物の治療は、感染経路の縮小にかなっ

ており、限定的成功を収めている。したがって、感染の防止または治癒によるこの疾患の蔓延防止手段を見出すことは大いに必要である。防止のためのアプローチは、免疫感作である。したがって、ワクチン処方物中に用いるためにin vitroで多量の抗原性M. hyopneumoniaeタンパク質またはペプチドを産生する能力は、予防的ワクチンの開発を大きく前進させる。

【0005】国際特許出願W096/28472は、分子量46~48、52~54、60~64、72~75、90~94および110~114キロダルトンのM. hyopneumoniaeの6つのタンパク質抗原種を同定し、52~54、60~64および72~75キロダルトン抗原の部分タンパク質配列、ならびに46~48キロダルトン抗原の全長ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を開示する。本明細書中で以後P46と呼ばれる46~48キロダルトン抗原は、部分ペプチド配列についてのFauldsおよびLeeの開示に基づいて確定した場合、米国特許第5,252,328号(Faulds)の44キロダルトン抗原およびLee(Lee et al., 1996, J. Chromatogr. A. 737:273-279)に記載された48キロダルトン抗原に対応する。P46をコードする遺伝子、即ちp46は、Futo等(1995; J. Bacteriol. 177:1915-1917)によりクローン化された。後に、同一グループは、in vitro発現遺伝子生成物が、他のマイコプラズマ種との交差反応性を伴わないM. hyopneumoniae感染の抗体応答を診断するのに有用であることを示した(Futo et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683)。Futo等が記載したp46遺伝子の配列および診断的使用は、欧州特許公告0 475 185A1にも開示されている。

【0006】W096/28472の60~64キロダルトン抗原の部分ペプチド配列は、P102と呼ばれるタンパク質と有意の相同性を有する(下記参照)。さらに、本抗原は、Faulds(米国特許第5,252,328号)が開示した64キロダルトン抗原と有意の相同性を有する。W096/28472の72~75キロダルトン抗原は、WiseとKim(1987, J. Bacteriol, 169:5546-5555および米国特許第5,788,962号)が開示した65キロダルトンタンパク質に対応し、本明細書中では以後P65と呼ばれる。

【0007】本明細書中で以後Mhp3と呼ばれる52~54キロダルトン抗原は、WiseとKim(1987, J. Bacteriol, 169:5546-5555)が記載した50キロダルトン内在性膜タンパク質および/またはFaulds(米国特許第5,252,328号)が開示した52キロダルトンタンパク質種に対応し得る。52~54キロダルトン抗原は、本明細書中では以後MHP3と呼ばれる。W096/28472は、成熟タンパク質の、そして内部臭化シアン断片のアミノ末端の配列を開示する。

【0008】W096/28472の90~94キロダルトン抗原は、以下に記載されるHsu等が開示した付着因子p97に対応し得る。W096/28472はさらに、60~64キロダルトン抗原、P46またはP65とMhp3の組合せを用いたワクチン試験の結果を開示する。予防接種は、M. hyopneumoniae感染からの有意の防御を引き出した。

【0009】科学文献および特許文献中には、M. hyopneumoniaeの外膜タンパク質に関する多数の報告がある。例えば、WiseとKim(1987, J. Bacteriol, 169:5546-5555)は、p70,p65(P65、同上)、p50およびp44と命名されたM. hyopneumoniaeには4つの内在性膜タンパク質種が存在し、そして後者3つは共有脂質結合により修飾されて、強力な体液性免疫応答を誘導するという報告をする。免疫応答の防御作用は、検査されなかった。P65タンパク質をコードする遺伝子がクローン化され、その配列、ならびに、例えばワクチンおよび診断におけるそれらの使用は米国特許第5,788,962号に記載されている。

【0010】国際特許公告W091/15593は、105、90、85、70および43キロダルトンという見掛けの分子量のM. hyopneumoniaeの5つのタンパク質を開示する。85キロダルトンタンパク質(タンパク質C)をコードする遺伝子の全長配列が、他の4つのタンパク質をコードする部分ヌクレオチド配列と同様に提供された。タンパク質Cを用いたワクチン試験は、被験動物にM. hyopneumoniaeに対する「有意の」防御をもたらした。

【0011】米国特許第5,252,328号(Faulds)は、免疫反応性M. hyopneumoniaeタンパク質のアミノ末端配列、36、41、44、48、64、68、74.5、79、88.5、96および121キロダルトンである分子量を開示する。電気泳動移動度に基づいて同定されたが、しかしタンパク質配列が開示されなかった他のタンパク質は、22.5、34および52キロダルトンという見掛けの分子量を有した。米国特許第5,252,328号はワクチン処方物におけるこれらのタンパク質の使用を提案する一方で、ワクチン試験の結果は報告していない。

【0012】国際特許公告W095/09870は、宿主の上気道上皮の繊毛への付着に關与するマイコプラズマ内在性膜タンパク質であるM. hyopneumoniae付着因子の精製のための生化学的方法を開示する。W095/09870は、例えばワクチンおよび診断におけるこれらのタンパク質の検定および使用も提案する。しかしながら、付着因子遺伝子のクローニングは、p97と呼ばれる遺伝子がクローニングされ、本明細書中で以後「P97」と呼ばれるその生成物がM. hyopneumoniae感染ブタの気道内の繊毛細胞と結合する生物体の能力にある役割を演じることが示されるまで、報告されなかった(Hsu et al., 1997, J. Bacteriol. 179:1317-1323)。King等(1997; Vaccine 15:25-35)による研究論文は、P97の変異株である124キロダルトン付着因子Mhp1を開示した。しかしながら、GST-Mhp1融合タンパク質を用いてM. hyopneumoniaeに対してブタに予防接種する試みは、動物地方病マイコプラズマ肺炎に対する統計学的に有意の防御を生じなかった。P97の94キロダルトン変異体は、Wilton等(1998, Microbiology 144:1931-1943)により同定された。さらに、p97遺伝子は、約102キロダルトンの予測分子量を有するP102と

呼ばれる二次タンパク質もコードするオペロンの一部であることが示された (Hsu et al., Gene 214:13-23)。MinionとHsuは、国際特許公告W099/26664でワクチン中のP102の使用を示唆しているが、しかしワクチン試験は報告していない。

【0013】[発明の要約]本発明は、*M. hyopneumoniae* mhp3遺伝子のヌクレオチドおよびタンパク質を包含する。本発明は、*M. hyopneumoniae*による感染によって引き起こされる疾患を防止および治療するためにワクチン中に用いるためのmhp3遺伝子によりコードされる新規のアポタンパク質抗原も包含する。アポ-Mhp3の組換え産生のための方法も提供される。

【0014】本発明は、配列番号2で記述されるようなアミノ酸配列を包含するポリペプチド、または少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸から成るそのあらゆる断片、ならびに製薬上許容可能な担体を含有するワクチン処方物を提供する。ある実施態様では、ワクチンはさらに、少なくとも1つのその他の免疫原性または抗原性ポリペプチドを含有するが、この場合、その他のポリペプチドはウイルス、細菌または寄生生物起源であり得る。好ましい実施態様では、ワクチンはさらに、*M. hyopneumoniae* P46、P65、P97およびP102から成る群から選択される少なくとも1つのポリペプチド、ならびにその断片、変異体および誘導体を含有する。

【0015】本発明は、配列番号4に対応するアミノ酸配列を包含する抗原性または免疫原性ポリペプチド、あるいはそのあらゆる誘導体、変異体または断片を含有するワクチン処方物を提供する。好ましい実施態様では、抗原性または免疫原性ポリペプチドは、好ましくは発現ベクター-pBAD/Thio-TOPO中でクローニングすることによりチオレドキシ融合タンパク質として発現され、そして大腸菌BL21菌株により産生される。非常に好ましい実施態様では、ワクチンはさらに、*M. hyopneumoniae* P46、P65、P97およびP102から成る群から選択される少なくとも1つのポリペプチド、ならびにその断片、変異体および誘導体を含有する。

【0016】本発明は、*M. hyopneumoniae*による感染によって引き起こされる動物における疾患または障害を治療または防止する方法であって、*M. hyopneumoniae*特異的細胞性または体液性応答の増大を引き出すのに十分な量で、配列番号2に対応するアミノ酸配列を包含する抗原性または免疫原性ポリペプチド、またはそのあらゆるアポ誘導体、変異体または断片、ならびに製薬上許容可能な担体を含有するワクチン処方物を被験者に投与することを包含する方法を提供する。好ましい実施態様では、アミノ酸配列は配列番号4で記述されるようなものである。別の好ましい実施態様では、動物はブタである。

【0017】本発明はさらに、*M. hyopneumoniae*の検出のためのキットを提供する。一実施態様では、キットは、*M. hyopneumoniae* Mhp3タンパク質に対する循環抗体の検出のための試薬を提供する。別の実施態様では、キットは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、またはハイブリダイゼーション法による*M. hyopneumoniae*の検出のための試薬を提供する。本発明は、配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluをもたず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンをもたないものを提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4の少なくとも50の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。他の態様においては、上記タンパク質は融合タンパク質である。さらなる態様においては、上記融合タンパク質は、チオレドキシ融合タンパク質である。本発明は、配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列をもつタンパク質をも提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4を含むアミノ酸配列を有する。本発明は、単離タンパク質である、上記タンパク質の中のいずれかを提供する。本発明は、上記タンパク質の中のいずれか及び医薬として許容される担体を含有する組成物をも提供する。1の態様においては、上記組成物は、さらに、アジュバントを含む。他の態様においては、上記組成物は、さらに、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ(*Mycoplasma hyopneumoniae*) P46、P65、P97、及びP102から成る群から選ばれる少なくとも1つのポリペプチドを含む。本発明は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体であって、その免疫原性タンパク質が、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluを有さず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンを有さないものを提供する。本発明は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質、又はその断片、変異体又は誘導体であって、その免疫原性タンパク質が、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluを有さず、かつ、C-末端ホモセリン・ラクトンを有さないものを提供する。本発明は、マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる疾患又は失調を治療又は予防する方法であって、上記動物に、(i)配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質であって、脂肪酸アシル化システイン、その後のアミノ酸配列Trp Asp Lys Gluを有さないもの、及び(ii)医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ特異的細胞性又は体液性応答における上昇を顕出するために十分な量で、投与することを包含する前記方法を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4の少なくとも50連続アミノ

酸を含むアミノ酸配列を有する。本発明は、マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における疾患又は失調を治療又は予防する方法であって、上記動物に、(i) 配列番号4の少なくともアミノ酸1-30を含むアミノ酸配列を有する抗原性又は免疫原性タンパク質、及び(ii) 医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ特異的細胞性又は体液性応答における上昇を顕出するために十分な量で、投与することを前記方法を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4を含むアミノ酸配列を有する。上記の方法の中のいずれかの1態様においては、上記動物はブタである。本発明は、配列番号2の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質を、マイコプラズマの遺伝子コードにおいて、コードする単離又は精製されたDNA、又はその相補体を提供する。1態様においては、上記タンパク質は、配列番号2の少なくとも50の連続アミノ酸を含む配列を有する。他の態様においては、上記DNAは、配列番号1の少なくとも90の連続ヌクレオチドを含む配列を有する。本発明は、配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質を、ユニバーサル遺伝子コードにおいて、コードするDNA、又はその相補体を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、配列番号4の少なくとも50の連続アミノ酸を含む配列を有する。他の態様においては、上記DNAは、配列番号3の少なくとも90の連続ヌクレオチドを含む配列を有する。他の態様においては、上記DNAは、異種プロモーターに作用可能な状態で連結される。本発明においては、異種プロモーターに作用可能な状態で連結されたDNAは、単離DNAである。さらに他の態様においては、上記DNAの中のいずれか1は、さらに、原核細胞内で活性な複製起点を含む。他の態様においては、上記DNAの中のいずれか1は、さらに、真核細胞内で活性な複製起点を含む。本発明は、異種プロモーターに作用可能な状態で連結された上記DNAの中のいずれかを含む宿主細胞を提供する。1の態様においては、上記宿主細胞はE. coli BL21であり、そして上記DNAは、発現ベクター-pBAD/Thio-TOP0である。本発明は、アポ-Mhp3又はその断片の製法であって、(i) アポ-Mhp3が発現される条件下で上記細胞を培養し、そして(ii) 上記タンパク質を回収する、を含む前記製法を提供する。1の態様においては、上記タンパク質は、可溶性形態で回収される。他の態様においては、上記タンパク質は、不溶性形態で回収される。本発明は、マイコプラズマ・ヒオニューモニエによる感染により引き起こされる動物における疾患又は失調を治療し又は予防する方法であって、上記動物に、(i) 上記DNAの中のいずれか、及び(ii) 医薬として許容される担体、を含むワクチン製剤を、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ特異的細胞性

又は体液性応答における上昇を顕出するために十分な量で、投与することを前記方法を提供する。1の態様においては、上記動物はブタである。本発明は、15~40ヌクレオチドの断片を含む単離DNAであって、その断片が、PCRのためのストリンジント条件下、配列番号2の少なくとも5の連続アミノ酸から成る配列を有するタンパク質を、マイコプラズマの遺伝子コードにおいてコードするDNA又はその相補体に、ハイブリダイズする、前記単離DNAを提供する。1の態様においては、上記ハイブリダイゼーションは、*M. hyopneumoniae*に特異的である。本発明は、少なくとも90ヌクレオチドの断片を含む単離DNAであって、その断片が、フィルター・ハイブリダイゼーションのための高ストリンジント条件下、配列番号2の少なくとも30の連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマの遺伝子コードにおいて、コードするDNA又はその相補体に、ハイブリダイズする、前記単離DNAを提供する。本発明は、少なくとも1の容器内に、少なくとも15ヌクレオチドから成る断片を含む第1単離DNAであって、その断片が、PCRのためのストリンジント条件下、配列番号2の少なくとも5の連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマの遺伝子コードにおいてコードするDNAに、ハイブリダイズする前記第1単離DNA、並びに少なくとも15ヌクレオチドから成る断片を含む第2単離DNAであって、その断片が、PCRのためのストリンジント条件下、配列番号2の少なくとも5の連続アミノ酸を有するタンパク質を、マイコプラズマの遺伝子コードにおいて、コードするDNAに相補的なDNAに、ハイブリダイズする前記第2単離DNAを含むキットであって、前記キットが、そのキットがM. ヒオニューモニエ感染の診断のために有用であることを示す言及を含む、前記キットを提供する。1の態様においては、上記ハイブリダイゼーションは、M. ヒオニューモニエに特異的である。他の態様においては、上記キットは、上記単離DNAの中のいずれかを少なくとも1の容器内に含み、ここで上記ハイブリダイゼーションがM. ヒオニューモニエに特異的であり、そして上記キットが、そのキットがM. ヒオニューモニエ感染の診断のために有用であることを示す言及を含む。本発明は、少なくとも1の容器内に、配列番号4の少なくとも30の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するタンパク質、及びそのキットがM. ヒオニューモニエ感染の診断のために有用であることを示す言及を含む、前記キットを提供する。1の態様においては、上記キットは、さらに、抗-ブタ第2抗体を含み、そしてさらなる態様においては、上記第2抗体は、比色計測反応を触媒する酵素に結合される。さらなる態様においては、上記酵素は、アルカリ・ホスファターゼ及びホースラディッシュ・ペルオキシダーゼから成る群から選ばれ、そして他のさらなる態様においては、上記キットは、さ

らに、比色計測アッセイのための試薬を含む。

【0018】[略語および定義]種名の前の略字M.は、マイコプラズマ属を示す。「組換え型mhp3」という用語は、普遍的遺伝子コードでのMhp3抗原をコードする核酸を指す。「M. hyopneumoniae mhp3」とは、M. hyopneumoniae遺伝子コードでのMhp3をコードする核酸を指す。M. hyopneumoniaeにおいては、コドンTGAは翻訳停止コドンというよりむしろトリプトファン残基を示す。したがって、組換え型mhp3遺伝子は、TGAコドンの代わりにTGGコドンを有することによりM. hyopneumoniae 10 mhp3と異なる。

【0019】「Mhp3」という用語は、mhp3遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。アポタンパク質という用語は、例えば、脂質部分の受容体として機能するアミノ酸の欠失または突然変異により前記の脂質部分を欠いているタンパク質を示す。「ORF」という用語は、「オープン・リーディング・フレーム」、即ち遺伝子のコード領域を示す。

【0020】核酸およびポリペプチドに関する「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウ全体の2つ 20の最適整列配列を比較することにより確定されるが、この場合、最適アラインメントは最高序列相手を提供し、被験配列または参照配列への付加または欠失を導入し得る。同一性パーセンテージは、所定位置の被験および参照配列で同一であるアミノ酸のパーセンテージを算出することにより確定される。最適配列アラインメントおよび同一性パーセンテージは、筆算で、または好ましくはコンピューター算法、例えばTBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、GAP、BESTFITおよびCLUSTALWにより確定され得るが、これらに限定されない(Altschulet al., 1990, 30 J. Mol. Biol. 215(3):403-10; Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-8; Thompson, et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-80; Devereux et al., 1984, Nuc. Acids. Res. 12:387-395; Higgins, et al., 1996, Methods Enzymol 266:383-402)。

【0021】好ましくは、デフォルトパラメーターで設定されたNCBI Blast Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)を用いて、配列同一性のパーセンテージを確定する。異種という用語は、プロモーターを説明するた 40めに本明細書中で用いる場合には、プロモーターが、それが制御する発現のオープン・リーディング・フレームに対して生来でないことを示す。

【0022】「単離タンパク質」という用語は、単離タンパク質が少なくとも50重量%を構成するタンパク質の組成物を示す。さらに好ましくは、組成物は約95%、最も好ましくは99重量%の単離タンパク質を包含する。「可溶性形態で回収される」という用語は、タンパク質またはポリペプチドが前記のタンパク質またはポリペプチドを発現する細胞の細胞質から取り戻されることを示 50

す。

【0023】「不溶性形態で回収される」という用語は、タンパク質またはポリペプチドが前記のタンパク質またはポリペプチドを発現する細胞中に存在する封入体から取り戻されることを示す。「機能的に等価」とは、本明細書中で用いる場合、Mhp3に特異的な抗体により認識され得るタンパク質、即ち内在性Mhp3タンパク質と実質的に同様の免疫学的応答を引き出し得るタンパク質を指す。したがって、機能的に等価のタンパク質に対して生じる抗体も、Mhp3を認識する。

【0024】「免疫原性」という用語は、特にタンパク質またはポリペプチドに対して向けられる免疫応答を引き出すタンパク質またはポリペプチドの能力を示す。「抗原性」という用語は、抗体により免疫特異的にタンパク質またはポリペプチドに結合されるタンパク質またはポリペプチドの能力を指す。「防御」または「防御する」とは、ワクチンに関して本明細書中で用いる場合には、ワクチン中に用いられる抗原(単数または複数)が由来する生物体により引き起こされる疾患の症状をワクチンが防止または低減することを意味する。

【0025】「抗体」という用語は、本明細書中で用いる場合、抗原と結合し得るイムノグロブリン分子を指す。抗体は、ポリクローナル混合物またはモノクローナルであり得る。抗体は、天然供給源から、または組換え供給源から得られる無傷イムノグロブリンであり得るし、無傷イムノグロブリンの免疫反応性部分であり得る。抗体は、種々の形態で、例えばFv、Fab'、F(ab')₂で、ならびに一本鎖で存在し得る。重鎖および軽鎖に関する遺伝子が単一コード配列に併合される一本鎖抗体も、用いられ得る。

【0026】「有効量」という用語は、それが投与される被験者における免疫応答を引き出すのに十分なmhp3ヌクレオチドまたはMhp3ポリペプチドの量を指す。免疫応答は、細胞性および/または体液性免疫の誘導を包含し得るが、これらに限定されない。「M. hyopneumoniae感染を治療または防止する」とは、M. hyopneumoniae細菌の複製を阻害し、M. hyopneumoniae伝播を阻害し、またはM. hyopneumoniaeがその宿主中にそれ自体を確立するのを阻止し、そしてM. hyopneumoniae感染により引き起こされる疾患の症状を軽減することを意味する。処置は、細菌負荷の低減、肺感染の低減および/または食物摂取および/または増殖の増大が認められる場合には、療法的であると考えられる。

【0027】「医薬として許容できる担体」とは、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げない、化学的不活性な、そしてそれが投与される被験者に対して有毒でない担体媒質を指す。「治療薬」という用語は、細菌感染またはそれにより引き起こされる疾患の治療に手を貸すあらゆる分子、化合物または治療物質、好ましくは抗菌剤を指す。

【0028】[発明の詳しい説明]本明細書中に記載したように、本発明人は、タンパク質と共有結合する脂質鎖によってM. hyopneumoniaeの形質膜に結合されると考えられるMhp3をコードするM. hyopneumoniae遺伝子を発見し、特性化した。本発明は、信号鎖および脂質修飾に必要な信号を欠くMhp3タンパク質を発現し、したがってM. hyopneumoniaeによる感染によって引き起こされる疾患に対するワクチンにそしてその治療に用いるためのMhp3の有効且つ高収率発現を可能にする組換え手段を提供する。

【0029】したがって、本発明は、M. hyopneumoniae mhp3によりコードされるタンパク質およびそのヌクレオチド配列を包含する。本発明はさらに、真正細菌および真核性宿主、例えばそれぞれ大腸菌およびバキュロウイルスにおけるこのようなタンパク質の発現に適した普遍的遺伝子コードでこのようなタンパク質をコードする核酸を包含する。

【0030】本発明はさらに、配列番号4の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸から成る配列を有するタンパク質、ならびに普遍的遺伝子コードでこのようなタンパク質をコードする核酸を包含する。本発明はさらに、本発明のタンパク質および/または抗体を用いたM. hyopneumoniaeにより引き起こされる疾患の治療のための方法を包含する。

【0031】本発明はさらに、Mhp3タンパク質を含有するワクチン処方物を包含する。ある実施態様では、ワクチン処方物は、P46、P65、P97およびP102から成る群から選択される単離タンパク質、ならびにその断片、変異体および誘導体を含有する。開示を分かり易くするために、本発明の詳細な説明を以下のいくつかの項に分形質転換、本発明の特徴、実施態様または用途を記載または説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0032】mhp3のヌクレオチド配列

本発明は、mhp3遺伝子のヌクレオチド配列を包含する。それらの例には、他のM. hyopneumoniae種に見出され得るのと同様のMhp3の種変異体をコードするヌクレオチド配列が含まれる。本発明の好ましい実施態様は、脂肪酸鎖の共有負荷によっては修飾されず、したがって膜局在化されないアミノ切頭化形態のMhp3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を包含する。本発明の好ましい実施態様の様式では、Mhp3のアミノ末端に対応するmhp3の5'欠失は、Mhp3のアミノ酸2~29をコードするヌクレオチド配列を包含する。本実施態様の他の様式では、mhp3の5'欠失は最初の30、31~32または33~40アミノ酸に対応する。

【0033】本発明は、マイコプラズマ遺伝子コードにおいて、配列番号2の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸を包含するアミノ酸配列を有す

るタンパク質をコードする単離または精製DNA、またはその相補体を提供する。本発明は、配列番号1の少なくとも90連続ヌクレオチドを包含する配列を有するDNA、またはその相補体も提供する。

【0034】本発明はさらに、配列番号4の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸を包含するアミノ酸配列を有するタンパク質を、普遍的遺伝子コードでコードするDNA、またはその相補体を提供する。本発明はさらに、配列番号3の配列を有するDNAを提供する。

【0035】本発明はさらに、15~40ヌクレオチドの断片を包含する単離DNAを提供するが、この断片は、PCRのための緊縮条件(下記と同様)下で、配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードでコードするDNAまたはその相補体とハイブリダイズする。好ましい実施態様では、ハイブリダイゼーションはM. hyopneumoniaeに特異的である。本明細書中で用いる場合、「M. hyopneumoniaeに特異的なハイブリダイゼーション」とは、M. hyopneumoniaeゲノムとの、しかし関連するマイコプラズマ種、例えばM. hyorhinis、M. flocculare、M. mycoidesなどからのゲノムとではない選択的ハイブリダイゼーションを示す。

【0036】本発明はさらに、少なくとも90ヌクレオチドの断片を包含する単離DNAを提供するが、この断片は、フィルターハイブリダイゼーションのためのストリンジент(緊縮)条件(下記と同様)下で、配列番号2の少なくとも30連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードでコードするDNAまたはその相補体とハイブリダイズする。

【0037】特定の実施態様では、mhp3核酸(例えば、配列番号1、配列番号3または配列番号5で記述されるような配列を有する)と、またはその相補体と、またはmhp3誘導体または類似体をコードする核酸と、またはその相補体と、低緊縮条件下で、ハイブリダイズ可能である核酸が提供される。例として、90ヌクレオチドに及びハイブリダイゼーションの領域のための低緊縮の条件を用いる手法を以下に示す(Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792も参照)。DNAを含有するフィルターを、35%ホルムアミド、5X SSC、50mMトリスHCl(pH7.5)、5mMEDTA、0.1%PVP、0.1%フィコール、1%BSAおよび500µg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中で40分で6時間、前処理する。以下の変更を加えた同一溶液中で、ハイブリダイゼーションを実行する:0.02%PVP、0.02%フィコール、0.2%BSA、100µg/mlサケ精子DNA、10%(wt/vol)硫酸デキストランおよび5~20X10⁶cpm³²P-標識化プローブを用いる。フィルターを、ハイブリダイゼーション混合物中で40分で18~20時

間インキュベートし、次に、2XSSC、25 mMトリス-HCl (pH7.4)、5 mM EDTAおよび0.1% SDSを含有する溶液中で55 で1.5時間洗浄する。洗浄溶液を新鮮な溶液と取り換えて、60 でさらに1.5時間インキュベートする。フィルターを吸取り乾燥して、オートラジオグラフィ処理に曝露する。必要な場合には、フィルターを65~68 で1/3時間洗浄して、フィルムに再曝露する。用い得る低緊縮のその他の条件は、当業界で周知である(例えば、雑種ハイブリダイゼーションに用いられる)。

【0038】別の特定の実施態様では、高緊縮条件下で、mhp3核酸またはその相補体とハイブリダイズ可能な核酸が提供される。例として、90ヌクレオチドに及ぶハイブリダイゼーションの領域のための高緊縮の条件を用いる手法を以下に示す。DNAを含有するフィルターの予備ハイブリダイゼーションを、6XSSC、50 mMトリスHCl (pH7.5)、1 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSAおよび500 µg/ml変性サケ精子DNAから成る緩衝液中で、65 で8時間~一夜、実行する。100 µg/ml変性サケ精子DNAおよび5~20X10⁶ cpm³²P-標識化プローブを含有する予備ハイブリダイゼーション混合液中で、65 で48時間、フィルターをハイブリダイズする。フィルターの洗浄は、2XSSC、0.01% PVP、0.01% フィコールおよび0.01% BSAを含有する溶液中で37 で1時間実施する。この後に、0.1XSSC中で50 で45分間洗浄した後、オートラジオグラフィ処理する。

【0039】用い得るその他の高緊縮条件は、核酸の性質(例えば、長さ、GC含量等)およびハイブリダイゼーションの目的(検出、増幅等)によっており、当業界で周知である。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)における約15~40塩基のオリゴヌクレオチドの相補配列との緊縮ハイブリダイゼーションは、以下の条件下で実行される: 50 mM KClの塩濃度、10 mMトリス-HClの緩衝液濃度、1.5 mMのMg²⁺濃度、7~7.5のpHおよび55~60 のアニリング温度。

【0040】別の特定の実施態様では、中等度緊縮条件下で、mhp3核酸またはその相補体とハイブリダイズ可能な核酸が提供される。このような緊縮のための適切な条件の選択は、当業界で周知である(例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York参照; Ausubel et al., ed s., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, (c)1987-1997, Current Protocols, (c)1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.も参照)。

【0041】mhp3コード化タンパク質の誘導体および類似体をコードする核酸、ならびにmhp3アンチセンス核酸が付加的に提供される。容易に明らかであるように、本

明細書中で用いる場合、「mhp3コード化タンパク質の断片または一部をコードする核酸」は、説明済みのmhp3コード化タンパク質の断片または一部だけをコードし、連続配列としてのmhp3コード化タンパク質の他の連続部分をコードしない核酸を参照しながら構築される。

【0042】好ましい特定の実施態様では、ハイブリダイゼーション後、洗浄条件は以下の通りである。各膜は、40 mMリン酸ナトリウム、pH7.2、5% SDS、1 mM EDTA、0.5%ウシ血清アルブミン中で45 で2回、各30分間洗浄され、その後リン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で4回、各々30分間洗浄されて、その後、各膜は、低、中または高緊縮ハイブリダイゼーション条件に関して以下に記載するように別様に処理される。低緊縮ハイブリダイゼーションに関しては、膜はそれ以上洗浄されない。中緊縮ハイブリダイゼーションに関しては、膜はさらに、40 mMリン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で55 で4回、各々30分間の洗浄を施される。高緊縮ハイブリダイゼーションに関しては、低緊縮に関する洗浄後、膜はさらに、40 mMリン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で55 で4回、各々30分間の洗浄を施された後、リン酸ナトリウム、pH7.2、1% SDS、1 mM EDTA中で65 で4回、各々30分間の洗浄を施される。

【0043】mhp3コード化タンパク質およびポリペプチド

本発明は、組換えMhp3タンパク質を提供する。一実施態様では、タンパク質は、配列番号4の少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50または少なくとも100の連続アミノ酸から成るアミノ酸配列を有し、脂肪酸部分と共有結合しない。さらに別の実施態様では、タンパク質は単離タンパク質である。本発明は、このようなMhp3タンパク質を含有する組成物も提供する。ある特定の実施態様では、組成物はMhp3タンパク質および製薬上許容可能な担体、またはMhp3タンパク質およびアジュバントを含有する。別の特定の実施態様では、組成物は、*M. hyopneumoniae*の少なくとも1つのその他のタンパク質、例えばP64、P65、P97またはP102を含有するが、これらに限定されない。その他の実施態様では、組成物は、Mhp3タンパク質、ならびに*M. hyopneumoniae*ポリペプチドでなく、好ましくはウイルス、細菌または寄生生物ポリペプチドである少なくとも1つのその他の免疫原性または抗原性ポリペプチドを含有する。このような組成物は、混合ワクチンとして有益である。

【0044】さらに、ワクチン調製に用いるための本発明のMhp3タンパク質は、実質的に純粋であるかまたは均質である。当業者に周知の方法、例えば標本のポリアクリルアミドゲル電気泳動とその後の染色ゲル上での単一ポリペプチドバンドの可視化を用いて、タンパク質純度

または均質性を確定し得る。HPLCまたは当業界で周知のその他の同様の方法を用いて、より高度の分解能が確定され得る。

【0045】本発明は、これらのタンパク質をコードする組換えヌクレオチド配列を発現する宿主細胞から典型的には精製されるポリペプチドを包含する。このようなタンパク質精製は、当業界で周知の種々の方法により成し遂げられ得る。一実施態様では、本発明のMhp3タンパク質は、例えばチオレドキシンの融合タンパク質として発現される。その結果生じる組換え融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーにより精製され得る。その実施態様の一様式では、Mhp3タンパク質は異種部分から切り離されて、実質的に純粋なMhp3タンパク質標本を生じる。その他の方法も用い得る(例えば、"Methods in Enzymology", 1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and Practice", 1982, Springer-Verlag, New Yorkに記載された技法を参照)。

【0046】発現系

本発明は、mhp3タンパク質の切頭型および全長形態の療法を発現するために用いられ得る発現系、即ち真核細胞性および原核細胞性発現ベクターの両方を包含する。本発明の好ましい実施態様では、核酸は配列番号3の配列を有し、配列番号2の残基30-444を含有する配列番号4のタンパク質をコードする。M. hyopneumoniaeのTGAコドンは、TGGコドンに変えられている。

【0047】種々の宿主発現ベクター計は、本発明の抗原タンパク質配列を発現するために利用され得る。このような宿主発現系は、それにより当該コード配列が産生され、その後精製されうるビヒクルを表すが、しかし適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合に、in-situで本発明のmhp3遺伝子生成物を示す細胞を表す。これらの例としては、微生物、例えばmhp3コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌、枯草菌); mhp3遺伝子生成物コード配列を含有する組換え酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌(例えば、サッカロミセス属、ピチア属); mhp3コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えばバキューロウイルス)に感染した昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV、タバコモザイクウイルス、TMV)に感染した、あるいはmhp3コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系; あるいは哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)、または哺乳類ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含有する組換え発現構築物を

保有する哺乳類細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3)が挙げられるが、それらに限定されない。

【0048】好ましい実施態様では、発現系は細菌系である。多数の発現ベクターは、有益には、発現されているmhp3生成物に関して意図される使用によって選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるものである場合、Mhp3の製剤組成物の精製のために、またはMhp3に対する抗体を生じるためには、例えば、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を指図するベクターが望ましい。好ましくは、ベクターは、誘導可能な遺伝子発現を指図するプロモーターを含有する。適切なベクターとしては、融合タンパク質が産生されるように、lacZコード領域を有する枠内でmhp3コード配列が別々にベクターに結紮され得る大腸菌発現ベクターpUR278(Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791); pINベクター(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509); mhp3コード配列が枠内で多数の(例えば6つの)ヒスチジン残基と融合され得るpETベクター(Studier and Mofatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg et al., 1987, Gene 6:125-135; ベクターはNovagen, Madison, Wisconsinから入手可能である); これを用いてMhp3がアラビノース誘導性タンパク質の制御下で発現され得るpBADベクター(Guzman et al., 1995, J. Bact. 177:4121-4130)が挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクター(Promega Corporation)も、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を用いて融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために用いられ得る。概して、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着とその後の遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化標的遺伝子生成物がGST部分から放出され得るように、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含有するよう設計される。mhp3配列は、発現ベクター中にクローン化され、細菌株中で発現され得る。本実施態様の好ましい様式では、細菌株は、ベクターからのタンパク質発現が30では抑制されるがしかし42では活性であるよう、温度感受性レプレッサーを含有するLW14である。非常に好ましい実施態様では、ベクターMhp3は、普通は不溶性であるタンパク質の溶解性を促進するチオレドキシ融合タンパク質として発現される。チオレドキシ融合タンパク質は、好ましくは、Mhp3コード配列をpBADベクターpBAD/Thio-TOPO(Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)に結紮することにより発現される。本実施態様の非常に好ましい様式では、チオレドキシ融合タンパク質は、大腸菌BL21菌株中で発現される。その他のベクターが用いられ得

るが、それらは当業者には既知である。

【0049】Mhp3抗体

本発明によれば、mhp3コード化タンパク質ならびにそれらの誘導体および類似体が免疫原として用いられて、このような免疫原を免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。Mhp3に対するポリクローナル抗体の産生のためには、当業界で既知の種々の手法が用いられ得る。抗体の産生のために、天然Mhp3タンパク質、または合成バージョン、またはその誘導体の注入により種々の宿主動物、例えばウサギ、マウス、ラット等（これらに限定されない）が免疫感作され得る。宿主種によって免疫学的応答を増大するために、種々のアジュバントが用いられ得る（例えば、ワクチンの調製に用いられるもの）。

【0050】mhp3コード化タンパク質配列またはその類似体に向けられるモノクローナル抗体の調製のために、培養中の連続細胞株による抗体分子の産生を提供するあらゆる技法が用いられ得る。例えば、KohlerとMilsteinにより最初に開発されたハイブリドーマ法（Kohler and Milstein 1975, Nature 256:495-497）、ならびにトリオマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72）およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ法（Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）。本発明のさらに別の実施態様では、モノクローナル抗体は、最新技法を利用して無菌動物中で産生され得る（例えば、PCT/US90/02545参照）。本発明によれば、ヒト抗体が用いられ、ヒトハイブリドーマを用いることにより（Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030）、またはヒトB細胞をin vitroでEBVウイルスで形質転換することにより（Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96）得られる。実際、本発明によれば、mhp3コード化タンパク質に特異的なマウス抗体分子からの遺伝子を適切な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」（Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454）の産生のために開発された技法が用いられ得る。このような抗体は本発明の範囲内である。

【0051】本発明によれば、一本鎖抗体の産生に関して記載された技法（米国特許第4,946,778号）は、mhp3遺伝子生成物特異的一本鎖抗体を産生するために適応され得る。本発明のさらに別の実施態様は、Fab'発現ライブラリー（Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281）の構築に関して記載された技法を利用して、mhp3コード化タンパク質、誘導体または類似体に対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速且つ

容易な同定を可能にする。

【0052】イディオタイプ分子を含有する抗体断片は、既知の技法により生成され得る。例えば、このような断片としては、抗体分子のペプチド真消化により産生され得るF(ab')₂断片、F(ab')₂断片のジスルフィド橋を還元することにより生成され得るFab'断片、パパインおよび還元剤で抗体分子を処理することにより生成されるFab断片、ならびにFv断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】抗体の産生に際しては、当業界で既知の技法（例えば、酵素結合イムノソルベント検定またはELISA）により、所望の抗体に関するスクリーニングが成し遂げられ得る。例えば、mhp3コード化タンパク質の特定のドメインを認識する抗体を選択するために、このようなドメインを含有するMhp3断片と結合する物質に関して生成されたハイブリドーマが検定され得る。一次Mhp3同族体を特異的に結合するがしかし異なるMhp3同族体は特異的に結合しない抗体の選択のためには、一次Mhp3同族体との陽性結合および二次Mhp3同族体との結合の欠乏を基礎にして選択が成され得る。

【0054】mhp3コード化タンパク質のドメインに特異的な抗体も提供される。mhp3コード化タンパク質のエピトープに特異的な抗体も提供される。前記の抗体は、本発明のmhp3コード化タンパク質配列の局在化および活性に関連する当業界で既知の方法、例えば適切な生理学的標本中、診断方法、免疫療法等におけるそのレベルの測定に用いられ得る。

【0055】mhp3キット

本発明はさらに、M. hyopneumoniaeの検出のためのキットを提供する。一実施態様では、キットは、M. hyopneumoniae Mhp3タンパク質に対する循環抗体の検出のための試薬を提供する。ある実施態様では、キットは、M. hyopneumoniae感染の診断にキットが有用であることを示す一文を包含する。最低限、キットは少なくとも1つの容器中に、配列番号4の少なくとも30連続アミノ酸を包含するアミノ酸を有するタンパク質を含有する。本実施態様の一様式では、キットはさらに、抗ブタ二次抗体を包含する。本実施態様の好ましい様式では、二次抗体は、比色反応を触媒する酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼに接合される。本実施態様のさらに別の様式では、キットはさらに比色検定のための試薬を包含する。

【0056】別の実施態様では、キットは、M. hyopneumoniae核酸の検出のための試薬を提供する。本実施態様の一様式では、キットはM. hyopneumoniae核酸のPCR検出のための試薬を提供し、少なくとも1つの容器中に、配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードで、コードするDNAと緊縮条件下でハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの断片を含有する一次単離DN

A、ならびに配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードで、コードするDNAと相補的なDNAと緊縮条件下でハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの断片を含有する二次単離DNAを包含する。本実施態様の別の様式では、キットは、M. hyopneumoniaeゲノムの検出のためのハイブリダイゼーションベースの方法を提供し、少なくとも1つの容器中に、配列番号2の少なくとも5連続アミノ酸の配列を有するタンパク質を、マイコプラズマ遺伝子コードで、コードするDNAと緊縮条件下でハイブリダイズする少なくとも15ヌクレオチドの断片を含有する単離DNA、または前記のDNAの相補体を包含し、この場合、ハイブリダイゼーションはM. hyopneumoniaeに特異的である。本明細書中で用いる場合、「M. hyopneumoniaeに特異的なハイブリダイゼーション」とは、M. hyopneumoniaeゲノムに対しては選択的ハイブリダイゼーションであるが関連マイコプラズマ種、例えばM. hyorhinis、M. flocculare、M. mycoidea等からのゲノムに対してはそうでないハイブリダイゼーションを示す。

【0057】ワクチン処方物および投与方法

本発明のMhp3タンパク質抗原は大量に産生され得るため、このようにして産生され、精製された抗原は、ワクチン調製に用途を有する。Mhp3タンパク質は、例えば予防接種された、または感染した可能性がある被験動物からの体液の標本中で、抗原に対する抗体の存在を検出し、したがって動物の免疫応答をモニタリングするかおよび/または感染を診断するためのイムノアッセイにおける効用を有する。

【0058】活性成分として免疫原性ポリペプチドを含有するワクチンの調製は、当業者には既知である。

ワクチン効能の確定

Mhp3抗原の免疫効力は、Mhp3抗原を、単独でまたは少なくとも1つのその他のポリペプチドと組合せてもちいて、免疫感作後に被験動物における免疫応答をモニタリングすることにより、または当業界で既知のあらゆるイムノアッセイの使用により、確定され得る。好ましい実施態様では、前記のその他のポリペプチドは、M. hyopneumoniae P46、P65、P97およびP102タンパク質から成る群から選択される。体液性（抗体）応答および/または細胞媒介性免疫の生成は、免疫応答の指標と解釈され得る。

【0059】ワクチンの導入方法としては、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内または免疫感作のあらゆるその他の標準経路が挙げられる。被験対象の免疫応答は、種々のアプローチ：例えば、既知の技法、例えばイムノソルベント検定（ELISA）、イムノプロット、放射性免疫沈降等により検定されるような、Mhp3抗原に対して結果的に生じる免疫血清の反応性により、あるいはMhp3抗原が抗原性または免疫原性を示

す場合には、M. hyopneumoniaeによる感染からの免疫感作宿主の防御および/または免疫感作宿主におけるM. hyopneumoniaeによる感染のための症状の軽減により分析され得る。

【0060】ワクチン処方物

本発明のワクチンは、組換えMhp3および/またはその断片、変異体および誘導体を包含する。ある実施態様では、本発明のワクチンはMhp3および少なくとも1つのその他の抗原性M. hyopneumoniaeポリペプチドを包含する。Mhp3と組合せて用いるための適切な抗原性ポリペプチドとしては、P46、P65、P97およびP102タンパク質および/または前記のポリペプチドの断片、変異体および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。ワクチンの非Mhp3ポリペプチド、例えばP46、P65、P97およびP102タンパク質ならびにそれらの断片、変異体および誘導体は、M. hyopneumoniae培養から精製されるか、または組換え的に発現され得る。

【0061】このようなワクチンの適切な調製物としてはさらに、液体溶液または懸濁液として注射可能なものが挙げられる。注射前の液体中の溶液に、または懸濁液に適した固体形態も調製され得る。調製物は、乳化もされ得る。活性免疫原成分はしばしば、製薬上許容可能で且つ活性成分と相溶性であるアジュバントと混合される。

【0062】有効アジュバントの例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：水酸化アルミニウム、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン。

【0063】アジュバントの効能は、Mhp3ポリペプチドエピトープを含有する免疫原性ポリペプチドに対して向けられる抗体の誘導を測定することにより確定され得るが、抗体は、種々のアジュバントから成るワクチン中のこのポリペプチドの投与に起因する。ポリペプチドは、中性または塩形態としてワクチン中に処方され得る。製薬上許容可能な塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基を用いて生成される）、ならびに無機酸、例えば塩酸、リン酸、あるいは有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸等を用いて生成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基を用いて生成される塩は、無機塩基、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは鉄、ならびに有機塩基、例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等からも得られる。

【0064】本発明のワクチン処方物を導入するため

に、多数の方法が用いられ得る。これらの例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：経口、皮内、筋肉内、腹腔内、皮下、鼻腔内経路、ならびに乱切による方法（例えば、二分岐針を用いて皮膚の上層を引っ掻く）。ワクチンが投与される被験者は、好ましくは動物、最も好ましくはブタである。

【0065】本発明のワクチン処方物は、有効免疫感作量のMhp3タンパク質および製薬上許容可能な担体を包含する。ワクチン調製物は、有効免疫感作量の1つ又はそれ以上の抗原および製薬上許容可能な担体を包含する。製薬上許容可能な担体は当業界では周知であって、その例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張水性緩衝液およびそれらの組合せ。このような許容可能な担体の一例は、1つ又はそれ以上の安定剤、例えば安定化、加水分解化タンパク質、ラクトース等を含有する生理学的平衡化培地である。担体は、好ましくは滅菌性である。処方物は、投与様式に適合すべきである。

【0066】特定の実施態様では、本発明の凍結乾燥Mhp3ポリペプチドが一次容器中に提供される。二次容器は、50%グリセリン、0.25%フェノールおよび防腐剤（例えば、0.005%プリリアントグリーン）の水性溶液から成る稀釈物を包含する。ワクチン調製物としての精製抗原の使用は、標準方法により実行され得る。例えば、精製タンパク質（単数または複数）は適切な濃度に調整され、あらゆる適切なワクチンアジュバントを用いて処方され、そして使用のために包装されるべきである。適切なアジュバントとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：無機質ゲル、例えば水酸化アルミニウム；界面活性物質、例えばリゾレシチン；グリコシド、例えばサポニン誘導體、例えばクイルA；ブルロニックポリオール；ポリアニオン；非イオン性ブロックポリマー、例えばブルロニックF-127（B. A.S.F., USA）；ペプチド、鉱油、例えばモンタニドISA-50（Seppic, Paris, France）、油乳濁液、例えば鉱油、例えばBayolF/Arlacel Aおよび水の乳濁液、または植物油、水および乳化剤、例えばレシチンの乳濁液；ミョウバン、およびMDP。免疫原は、リポソーム中に混入され得るし、あるいは多糖および/またはワクチン処方物中に用いるためのその他のポリマーと接合され得る。組換え抗原がハプテン、即ちそれがコグネイト抗体と選択的に反応し得る場合に抗原性であるが、しかし免疫応答を引き出し得ない場合には免疫原性でない分子である場合には、ハプテンは担体または免疫原性分子と共有結合し得る。例えば、血清アルブミンのような大型タンパク質は、それと結合するハプテンに免疫原性を付与する。ハプテン-担体は、ワクチンとして用いるために処方され得る。

【0067】有効用量（免疫感作量）の本発明のワクチ

ンは、モデル被験系から得られる用量-反応曲線から推定され得る。本発明は、本発明のワクチン処方物の1つ又はそれ以上の成分を包含する1つ又はそれ以上の容器から成る製剤パックまたはキットも提供する。したがって本発明は、動物を免疫感作し、あるいは動物における種々の疾患または障害を治療または防止する方法であって、有効免疫感作量の本発明のワクチンを動物に投与することを包含する方法を提供する。

【0068】本発明のワクチンにより生成される抗体の使用

本発明のMhp3タンパク質を用いた免疫感作により抗原に対して生成される抗体は、診断的イムノアッセイ、受動免疫療法および抗イデオタイプ抗体の生成に潜在的用途を有する。生成された抗体は、当業界で既知の標準技法（例えば、イムノアフィニティークロマトグラフィー、遠心分離、沈降等）により単離され、診断的イムノアッセイに用いられ得る。抗体は、治療および/または診断の進行をモニタリングするためにも用いられ得る。当業界で既知のあらゆるイムノアッセイ系、例えば上記で列挙したものは、この目的のために用いられ得る。これらの例としては、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、プレシピチン反応、ゲル拡散プレシピチン反応、免疫拡散検定、凝集検定、補体結合検定、免疫放射定量測定、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイおよび免疫電気泳動検定を用いた競合的および非競合的検定系が挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】本発明のワクチン処方物は、異種生物体に対して向けられる予備生成抗体の投与により宿主の短期防御が成し遂げられる受動免疫療法に用いるための抗体を生成するためにも用いられ得る。免疫感作手法では、用いられる免疫減の量および免疫感作スケジュールは、当業界の医師により確定され、そして被験者の免疫応答および抗体力価を参照して投与される。

【0070】包装

組成物は、所望により、活性成分を含有する1つ又はそれ以上の単位投与形態を包含し得るパックまたは計量分配装置中に存在し得る。パックは、例えば金属またはプラスチック箔、例えばブリスターパックを包含し得る。パックまたは計量分配装置は、投与のための使用説明書を添付され得る。相溶性製剤担体中に処方される本発明の化合物を包含する組成物も調整され、適切な容器に入れられ、そして指示条件の処置のためにラベルを貼られる。

【0071】〔実施例〕

M. hyopneumoniae染色体DNAの単離
遠心分離（6000gで4で10分間）により細胞を収穫し、リン酸塩緩衝化食塩水中に懸濁し、そして0.1容積の10%硫酸ドデシルナトリウムの付加により溶解するDybvig

とAldereteの方法 (Plasmid, 20:33-41; 1988) により、*M. hyopneumoniae*からのゲノムDNAを単離した。トリス-HClで飽和させたフェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコール(25:24:1)の混合物を用いて、溶解物を抽出した。クロロホルムで水性相を抽出し、0.1容積の3 M酢酸ナトリウムと2容積の氷冷エタノールの付加により核酸を沈降させた。-20 °Cで1時間のインキュベーション後、微小遠心分離器中での10分間の遠心分離により、核酸を回収した。20 µgのRNアーゼA/mlを含有する水中に拡散を再懸濁し、標本を-20 °Cで保存した。

【0072】*M. hyopneumoniae* mhp3の分子クローニング

Mhp3の予め同定された部分アミノ酸配列(配列番号7~9)(国際特許公告W096/28472)を基礎にして、変性オリゴヌクレオチドプライマーKWK40、KWK41、KWK42、KWK43、KWK42RCおよびKWK43RC(配列番号10~15)を生かし、合成した(Genosys Biotechnologies, Inc.; The Woodlands, TX)。1 X PCR緩衝液(Perkin Elmer; Foster City, CA)、2.0 mM MgCl₂、1 µMの各プライマー、400 µMの各デオキシ-NTPおよび2.5 UのAmpli Taq金(Perkin Elmer)を含有する50 µlの反応容量物中のこれらのプライマーの種々の組合せを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実行した。増幅のための条件は、94 °Cで2分間の変性、その後の25回の変性(94 °Cで1分間)、アニーリング(56 °Cで1分間)および重合(72 °Cで1分間)で構成された。プライマーKWK41(配列番号11)およびKWK42RC(配列番号14)を用いて、長さ約250bpの断片を、410 ngの*M. hyopneumoniae*232株染色体DNAを用いて増幅した(継代数n=5)。断片を、CR2.1-TOPO(Invitrogen; Carlsbad, CA)のTAクローニング部位にサブクローニングした。結紮生成物を大腸菌TOP10細胞(Invitrogen)中で形質転換した。ジデオキシヌクレオチド鎖末端シーケンシング(Advanced Genetic Analysis Center; St. Paul, MN)およびアガロースゲル電気泳動後の制限エンドヌクレアーゼ消化により、クローニングを確認した。

【0073】DNAのコア領域と側接する配列を増幅するために用いられる方法である逆PCR(Ochman, H., Medhora, M.M., Garza, D., and Hartl, D.L., 1990, In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Academic Press, San Diego, CA)を用いて、Mhp3をコードする遺伝子の残りの5'および3'末端をクローニングした。以下の制限エンドヌクレアーゼ: AluI, BamHI, EcoRV, EcoRI, HaeIII, HincII, HindII, NdeI, PvuII, Sau3AI, SpeI, SspI, XbaIを用いて、未切断DNAを1回消化することにより、*M. hyopneumoniae* 232株(継代数n=5)染色体DNA断片のプールを生成した。消化後、結紮により断片を環化し、前記の250 bp断片からの配列を基礎にして設計されたオリゴヌクレオチ

ドプライマーRAC3(配列番号16)およびRAC4(配列番号17)を用いてPCR処理を施した。これらのプライマーによる増幅は、以下のように実行した: 94 °Cで2分間変性、その後、40回の変性(94 °Cで1分間)、アニーリング(55 °Cで1分間)および重合(72 °Cで2分間)。SspI消化染色体DNAプールは、約600 bpの断片を産生し、これをpCR2.1-TOPO中でサブクローニングした。クローン化断片の配列分析は、遺伝子の5'末端を同定した。mhp3の3'末端に対応するさらに別の配列を得るために、この配列を基礎にしてオリゴヌクレオチドRAC7(配列番号18)およびRAC8(配列番号19)を消化した。これらのプライマーを用いた増幅のための条件は、94 °Cで9分間の変性、その後の40回の変性(94 °Cで30秒間)、アニーリング(50 °Cで30秒間)および重合(72 °Cで1分間)で構成された。SpeI消化DNAプールを鋳型として用いた場合、多数の生成物(250 bp~>1 kb)が増幅された。断片の混合物をpCR2.1-TOPO中でクローニングした。クローン化された最大断片(~1.2 kb)の配列分析は、さらなる3'配列データを提供した。このデータから、オリゴヌクレオチドRAC12(配列番号20)およびRAC15(配列番号23)を消化し、鋳型としてHindIII-消化DNAプールを用いたPCR増幅のために用いられるよう合成した。パラメーターは、94 °Cで9分間の変性、その後の40回の変性(94 °Cで30秒間)、アニーリング(55 °Cで30秒間)および重合(72 °Cで2分間)+最終重合工程(72 °Cで7分間)で構成された。長さ約600 bpの断片を増幅し、pCR2.1-TOPO中でクローニングして、シーケンシングした。得られたデータは、Mhp3をコードする遺伝子内の付加的3'配列を提供した。鋳型としてHincII-消化DNAプールを用いて、RAC12(配列番号20)およびRAC15(配列番号23)に関するさらなるPCR増幅を実行した。増幅のための条件は、94 °Cで9分間の変性、その後の35回の変性(94 °Cで1分間)、アニーリング(55 °Cで1分間)および重合(72 °Cで3分間)+最終重合工程(72 °Cで7分間)であった。長さ約700 bpの断片を増幅し、pCR2.1-TOPO中でクローニングした。クローン化断片のシーケンシングは新規の3'配列データを生じ、それには、ポリペプチドのカルボキシル末端をコードするものが含まれた。

【0074】前記の予備シーケンシングからの結果を用いて、低継代数(n=4)*M. hyopneumoniae*232株染色体DNAから直接、mhp3遺伝子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設計した。PCR増幅とその後のクローニング工程で生じる可能性のある突然変異による配列人工物の導入を避けるために、試験で直接、これらの生成物をシーケンシングした。

【0075】mhp3遺伝子と側接する合成オリゴヌクレオチドを用いて、染色体DNAからの開放読取り枠(ORF)を特定的に増幅した。PCR増幅は3通り実行し、50 µlの最終標本用量中に1 µMの各プライマー-Mhp3-U1

(配列番号31)およびMhp3-D(配列番号33)、360 ngの精製染色体DNA、1 x PCR緩衝液(Ab Peptides, Inc.; St. Louis, MO)、200 μMの各dNTP、7.5UのKlen Taq1(Ab Peptides, Inc.)および0.15 Uのクローン化Pfu(Stratagene; La Jolla, CA)熱安定性ポリメラーゼを含有した。増幅のための条件は、94 で5分間の変性、その後の25回の変性(94 で30秒間)、アニリング(55 で30秒間)および重合(72 で3分、45秒)+最終重合工程(72 で7分間)で構成された。増幅後、3通りの標本をプールし、回転クロマトグラフィー(QIAquik(商標)PCR精製キット、Qiagen; Santa Clarita, CA)を用いた抽出により、特定の生成物を精製した。次に、ABI自動DNAシーケンサー(Lark Technologies Inc., Houston, TX)上でのDyeDeoxy末端反応を用いて、プールした混合物に直接配列分析を施した。

【0076】合成オリゴヌクレオチドプライマー(配列番号16~28, 31および33)を用いて、*M. hyopneumoniae*232株からの増幅生成物の両DNA鎖をシーケンシングした。mhp3遺伝子およびこの領域内でコードされるMhp3タンパク質のヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号1および配列番号2中に存在する。mhp3ORFは配列番号1のヌクレオチド97-1452から伸びて、49,775ダルトンという理論的分子量を有する451アミノ酸タンパク質(配列番号2)をコードする。コード化ポリペプチドは、8つのトリプトファン残基を含有し得る。このうち7つは、多数のマイコプラズマ種におけるこのアミノ酸の付加に関して特定することが知られているTGAコドン(mRNAではUGA)によりコード化される(Dybvig, K., 1990, Ann. Rev. Microbiol. 44:81-104; Yamao, F., Muto, A., Kawachi, Y., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:2306-2309)。コード化タンパク質のアミノ末端は、原核生物信号配列に特徴的な特性を有すると思われる(von Heijne, G., 1985, J. Mol. Biol. 184:99-105; Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. およびvon Heijne, G., 1997, Protein Engineering, 10:1-6)が、しかし切断の正確なサイズは目下分からない。コード化タンパク質(配列番号2)の位置29のシステイン残基は、スルフヒドリル結合脂肪酸の付加によるプロセッシング後に修飾されて、Mhp3リポタンパク質を作製すると考えられる(Razin, S., Yogen, D., and Naot, Y., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1094-1156)。

【0077】Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)プログラム(Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)を用いて、mhp3ORFを既存のヌクレオチドおよびタンパク質データベースと比較した場合、それが最大相同を共有するエントリーは、*M. arginini* (GenBank寄託番号D16674)からのAg 234-5タンパク質であった。これら2つのポリペプチドをCLUSTAL W(Thomps

n, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., 1994, Nucl. Acids Res., 22:4673-4680)を用いて整列させると、Mhp3およびAg 234-5タンパク質間に36.2%のアミノ酸同一性が認められる(図1)。Ag 234-5をコードする遺伝子は最初は*M. arginini*に存在すると同定された(Ushio, S., Iwaki, K., Tanai, M., Ohta, T., Fukuda, S., Sugimura, K. and Kurimoto, M., 1995, Microbiol. Immunol. 39:395-400)が、近年の証拠は、この遺伝子が実際には*M. hyorhinis*から得られることを明示した(Droesse, M., Wise, K.S., 1998, Abstract E20, 12th International Organisation of Mycoplasma Conference, Sydney, AU)。それらの研究では、Ag 234-5は、PCR、サザンブロットハイブリダイゼーションおよびウエスタンブロット分析により確定した場合、他のマイコプラズマ、例えば*M. hyopneumoniae*の間には保存されないと結論された。

【0078】University of Wisconsin Genetics Computer GroupからのSTEMLOOPプログラム(Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O., 1984, Nuc. Acids Res. 12:387-395)を用いて、mhp3ORFの、特に配列番号1のヌクレオチド1519-1550の下流で配列が同定され、これはおそらくはステムループ構造を形成し得る。ステムは、4つの塩基ループにより分けられる14塩基逆反復により形成され得る。この構造の実におよび考え得る機能は、目下不明である。

【0079】付加的ORFは、配列番号5で示されるDNA断片によってもコードされる。このORFは、遺伝子mhp3からの反対鎖上に存在し、配列番号1のヌクレオチド602からヌクレオチド1に延びる。この予測ORFは、22,528ダルトンの理論的分子量を有する、「ORF1」と呼ばれ、配列番号6で表される少なくとも200アミノ酸のタンパク質をコードする。Mhp3および「ORF1」は反対鎖上にコードされるが、しかし各コドンの第三塩基(「ゆらぎ」位置)は、それらの間で共通である。したがって、「ORF1」中のあらゆる特定のアミノ酸コドンのゆらぎ塩基は、Mhp3遺伝子中の特定のアミノ酸をコードする反対鎖に共有される。2つのタンパク質に関する共有コドン配列のこの独特の整列は、理論では、Mhp3および「ORF1」に関するコドンゆらぎ位置での遺伝的浮動の衝撃を最小にし、両コード化タンパク質の保存を最大にする。

【0080】プラスミドの調製および寄託物質
アメリカ培養細胞コレクション(ATCC)による保管のために、mhp3遺伝子断片を調製した。前記と同様に特異的5'および3'プライマーMhp3-U1(配列番号31)およびMhp3-D(配列番号33)を用いた3通りのPCR反応からのプール混合物を、回転クロマトグラフィー(QIAquik(商標))による抽出によって単離し、pCR2.1-TOPOTAのクローニング部位に挿入した。ベクター特異的シーケンシングプライマーを用いた単一配列延長反

応は、増幅化1,692塩基対断片の終点を確証し、Mhp3をコードする遺伝子がラクトースプロモーターに対して反対配向であることを明示した。このプラスミド構築物はpER427と呼ばれ、大腸菌TOP10細胞 (Invitrogen, Carisbad, CA) に導入された。その結果生じた菌株をPz427と名付けた。

【0081】mhp3遺伝子の部位特異的突然変異誘発

大腸菌内での発現のためのMhp3をコードするDNAの調製は、推定リーダーをコードする配列および脂肪酸付着部位、システイン29の除去ならびにTGGコドンへの6つのTGAコドンの変換によるM. hyopneumoniae mhp3遺伝子の修飾を要する。シグナルペプチドをコードする配列を欠く遺伝子の増幅のために用いられるオリゴヌクレオチドプライマーを、RAC23 (配列番号29) およびRAC24 (配列番号30) と名付けた。M. hyopneumoniae23株 (継代数n = 5) 染色体DNAからの断片の増幅のための条件は、94 で9分間の変性、その後の25サイクルの、変性 (94 で1分間)、アニーリング (50 で1分間)、および重合 (72 で2分間)、プラス最終重合工程 (72 で7分間) であった。増幅断片をpCR2.1-TOPO中にクローン化した。クローニングの確証は、シーケンシングおよび制限エンドヌクレアーゼ消化、その後のゲル電気泳動によった。上記クローン化断片の5'末端の配列は、開始メチオン残基をコードし、次に、上記コードされたポリペプチドの位置29のシステイン残基の後のアミノ酸であるトリプトファン残基をコードする (配列番号2参照)。その3'末端においては、野生型ヌクレオチド配列 (配列番号1) 内に塩基変化が導入され、これはクローニング目的のための制限部位を作り出した。これは、野生型ポリペプチドのカルボキシ末端の2アミノ酸配列Asn-Leu (配列番号4) により置換されたLys-Asn (配列番号2) をもたらした。追加のヌクレオチドが、野生型遺伝子に比べて RAC24プライマー (配列番号30) 内に存在したが、上記PCR産物中には存在しなかった。オリゴヌクレオチド RAC23 (配列番号29) と RAC24 (配列番号30) はそれらの5'末端付近にそれぞれ合成制限部位NdeIおよびXbaIを含入して、さまざまなプラスミドへの上記遺伝子のクローニングを促した。それぞれの制限酵素による切断を促すために、追加のヌクレオチド (RAC23 (配列番号29) に関しては6 ; RAC24 (配列番号30) に関しては7) をも、各プライマーの5'末端に付加した。

【0082】一旦、シグナルペプチドをコードする配列が除去されると、6つの内部TGAコドンが遺伝子内に残った。大腸菌内での全長ポリペプチドの発現を可能にするために、オリゴヌクレオチド推定in vitro突然変異誘発により、これらをTGGコドンに変換した。プラスミドpCR2.1-TOPO:mhp3を大腸菌CJ236株 (dut⁻ung⁻) 内に形質転換した。上記プラスミドを含む細胞へのヘルパーファージR408の添加は、ウラシル含有一本鎖 (ss)

DNAを有するファージ粒子の産生をもたらした。これらの粒子を単離し、そして抽出および沈降によりssDNAを精製した。鋳型としての上記DNA、オリゴヌクレオチドMhp3-2M、Mhp3-3M、Mhp3-4M、Mhp3-5M、Mhp3-6M、Mhp3-7M (配列番号35~40)、ならびにMutaGene System (BioRad Laboratories; Hercules, CA) からの試薬を用いて、突然変異誘発を実行した。上記ssDNA、オリゴヌクレオチドおよびアニーリング緩衝液を混合し、そして70 に加熱した後、1時間かけて30まで冷却した。T4DNAリガーゼ、T7DNAポリメラーゼおよび合成緩衝液を添加することにより、上記相補鎖の合成を実施した。上記混合物を氷上で5分間、次に室温で5分間、その後37 で30分間インキュベートした。その結果生じた二本鎖DNA分子をDH5 UltraComp細胞 (Gibco BRL; Gaithersburg, MD) 内に形質転換させた。クローンを増殖させ、そしてシーケンシングにより所望の突然変異に関してスクリーニングした。このやり方で、全突然変異 (TGA > TGG) を確証した。さらに、不注意に、A > Gトランジションが起き、これは、オリゴヌクレオチドMhp3-2M (配列番号35) の配列による、野生型遺伝子 (配列番号1) のヌクレオチド388に対応する。これは、野生型Mhp3 (配列番号2) のアミノ酸残基98でのセリン (AGT) から、組換え体Mhp3 (配列番号4) のアミノ酸残基70でのグリシン (GGT) への変更をもたらした。

【0083】上記の変更から生じた組換え体mhp3遺伝子 (上記の不注意によるA > Gトランジションを含むかまたは含まない) を、配列番号3に示し、そして (アミノ酸残基70にグリシンを含む) 上記組換えmhp3遺伝子によりコードされるオープン・リーディング・フレームを配列番号4に示す。

発現ベクターおよび発現宿主株中への組換えmhp3遺伝子のクローニング

組換えタンパク質発現のために、シグナルペプチドをコードする配列を欠く突然変異mhp3遺伝子 (配列番号3) をpBAD/Thio-TOPO発現プラスミド (Invitrogen) 中でクローン化した。この構築物を直接、発現宿主大腸菌BL21中で形質転換させた。適切なプラスミドを含有するクローンが同定された。

【0084】組換えMhp3タンパク質の発現

チオレドキシン - Mhp3融合を発現する大腸菌BL21形質転換体の凍結作業溶液を解氷させて、以下のものを含有するRWLDM/D vi限定培地中に1:5000稀釈で植え付けた: K_2HPO_4 (6 g/l)、 KH_2PO_4 (3 g/l)、 $(NH_4)_2SO_4$ (5 g/l)、NaCl (2 g/l)、0.2 ml $CaCl_2$ (15 g/l)、0.4 ml $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (5 g/l)、0.4 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (480 g/l)、 $ZnCl_2$ (6.5 g/l)、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ (12 g/l)、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (5 g/l)、 $CuSO_4$ (1.5g/l)、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (2 g/l)、 H_3BO_3 (0.5 g/l) および37% HC

1 (5 ml/l)。カルベニシリンも付加して、濃度を125 $\mu\text{g/ml}$ とした。A₆₂₅が10~20になるまで、5リットル作業容積BioFlow 3000発酵器 (New Brunswick Scientific; Edison, NJ) 中で、37 で供給 - バッチ条件 (50% デキストロース) 下で培養を増殖させた。

【0085】5リットル発酵物からの組換えチオレドキシン - Mhp3を発現する大腸菌BL21形質転換体の湿潤細胞を遠心分離により収穫し、リン酸塩緩衝化食塩水中に再懸濁した。細胞を機械的に溶解した。遠心分離後、ペレットを捨てた。上清をイオン交換カラムに通して、NaCl 10 勾配を用いて溶出した。上記融合タンパク質を含有する画分を、プ - ルし、透析してNaClを除去し、そして0.2 μm フィルターを用いてフィルター滅菌した。この調製物を、ワクチン接種試験のために使用する。

【0086】組換えMhp3の免疫学的特徴付け

先に記載したように調製した組換えチオレドキシン - Mhp3のタンパク質濃度を、BCA Protein Assay キット (Pierce) を使用して測定した。簡単に言えば、各サンプルを、滅菌、脱イオン、蒸留水 (dd H₂O) 中、1/10, 1/20, 1/40、と1/80に希釈した。BSA(タンパク質標準) 20 を、200~800 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にわたる濃度に希釈した。20 μl 容量のサンプル又は標準を、96ウェル・マイクロタイター・プレート内に3連で添加し、そして試薬A中に1/50に希釈した試薬B 200 μl を、各ウェルに添加した。上記プレートを30分間37 でインキュベートした。サンプルの吸光度を560nm で測定した。各サンプルについてのタンパク質濃度をBSA 標準曲線を使用して外挿により計算した。

【0087】組換えMhp3のアリコート (タンパク質負荷は可変であった) と、M. hyopneumoniae、Myoplasma hyorhinis、及びMycoplasma mycoides 亜種mycoidesの全バクテリア細胞溶解産物を、10 μl の最終容量まで再懸濁させ、そして10 μl の2倍還元サンプル・バッファー (Owl Scientific) を添加した。サンプルを 100 で10分間加熱し、そして全容量を、100ウェル、1.5mm 厚、10% Tris-グリシン・ゲル (Novex)の別個のウェルにロードした。染色されない、広いレンジの分子量マーカー (Novex)も含まれた。

【0088】SDS-PAGEにより分離されたタンパク質を、1時間、100mA の一定電流でPVDF膜 (Owl Scientific) 40 に移した。このプロットを、緩やかに攪拌しながら、室温で1時間、TBS(TBST) 中5%スキム・ミルク粉末及び0.5%Tween 20から成るブロッキング・バッファー中でインキュベートした。このブロッキング・バッファーを除去し、そして上記膜をTBSTで5分間1回洗浄した。1次抗体を、M. hyopneumoniae株232 を用いた実験的接種の後にブタから得た。希釈血清を上記膜に添加し、その後室温で1時間インキュベートした。アルカリ・ホスファターゼ・コンジュゲート・プロテインG抗体 (Pierce) を希釈し、上記の洗浄された膜に添加し、そして室

温で1時間インキュベートした。この膜を、TBSTで洗浄し、そして基質BCIP/NBT(Kirkegaard and Perry Laboratories)を上記膜に添加し、そして好適な色反応が顕色されるまでインキュベートした。次に、この膜を水で濯いで、上記反応を停止させ、そして室温で乾燥させた。

【0089】M. hyopneumoniaeで実験的に接種されたブタからの血清は、60kDa のバンドが同定されたとき、精製された組換え発現Mhp3を認識しなかった (図2)。これは、組換えタンパク質が、全細胞M. hyopneumoniae生物にブタを晒すことに対する応答において生成された抗体により認識されたエピトープを発現したということを示唆する。

【0090】ワクチン候補としての組換えMhp3の効力をテストするための動物試験

M. hyopneumoniaeにより引き起こされる病気又はM. hyopneumoniaeに対する先のワクチン接種の履歴をもたない健康な雑種ブタ (生後約12~16日) を得た。動物を、担架 (litter) により群にランダムに割り当てた。ブタを、試験の開始前最短で5日間、放置して順応させた。動物を“0”日目の筋中経路 (IM; 左の首の筋肉) により適当な実験ワクチン 1 μl でワクチン接種した。このとき、ブタは生後約19~23日であった。最初のワクチン接種後約2~3週間目に、ブタは、上記の適当な実験ワクチンの第2の1ml投与量 (IM; 右の首の筋肉) を受容する。全てのブタを、接種後の兆候、例えば、嘔吐、抑うつ、下痢、運動失調 - 筋肉協調運動失調、呼吸の増加、又は震えについて (1時間まで又は保証される場合)、詳しく観察する。

【0091】第2のワクチン接種後約2~4週間目に、約 5.0×10^8 の変色単位/ml(ccu/ml) を含むM. hyopneumoniae株の生有毒肺ホモジェネート・カルチャーの1ml / 鼻孔を鼻孔内接種した。全ての接種された動物は、接種後約4週間目に検死解剖した。肺を摘出し、そしてM. hyopneumoniae感染に帰される特徴的な病変について徹底的に評価した。個々の肺病変等級は、画像分析により決定されるであろう。肺組織のバイアス・サンプルを、バクテリアの単離(ccu/gの組織)、組織病理学、及びIFA のために、各接種動物から得ることができる。

【0092】微生物の寄託

以下の微生物株を、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VAに、1999年9月9日に寄託し、そして以下の受託番号が割り当てられている:

微生物	受託番号
Pz427	PTA-634

本発明は、本明細書中に記載した特定の態様により範囲が限定されてはならない。実際、本明細書に記載したものに加えて本発明のさまざまな修正・変更は、以上の説明及び添付図面から当業者に明らかになるであろう。このような修正・変更は、添付の請求の範囲内にあること

が意図される。

【0093】特許出願、特許、及び刊行物を含むさまざまな引用文献が本明細書中に引用されるか、これらの開

<110> Pfizer Products Inc.
 <120> NUCLEIC ACIDS AND PROTEIN
 S OF THE MYCOPLASMA PNEUMONIAE
 mhp3 GENE AND USES THEREOF
 <130> B015655
 <141> 2001-03-30
 <160> 41
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1692
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 1
 gtttttgaat ataatagaaa atgtaaaata aaaa
 ttaatt tattaataaaa taattgaaag 60
 tcatcgtaat taaaacaatt aattaggaga acaa
 ctatga aaaaaaagat aaaatgaaat 120
 aaatttcttg gcttaggctt agtttttccg cttt
 cagcaa tcgcgacaat ctctgccgga 180
 tgttgggata aagaacaac taaagaagaa aat
 cagccg ataatacaaaa taagcaaatc 240
 actgatgtct caaaaatttc aggactagt aatg
 aacgaa aatccgaaat tatggccgca 300
 aaagctgatg caaacaaca ttttgggcta aata
 tggcaa ttgtaaccgc tggtggaacg 360
 gtaaatgata attcatitaa ccaatcaagt tgag
 aggcaa ttcaacaact tggcgctctt 420
 actggagggtg agattacttc agtagatagt tcaa
 ctgctg aacttgaagg aaaatatagc 480
 tcaattgcta ataccaacaa aaatgittga gtac
 tttctg gttttcaaca cggatgatgcg 540
 ttcacaagat gattaaaaat cctgaaaat aagc
 aattat ttactgaaaa aaatattatc 600
 atactcggaa ttgactgaac tgatactgaa aatg
 taattc caacaggtcg atataat 660
 ttaacctata aaactgaaga agccggatga ctg
 caggat atgcgaatgc ttcctttttg 720
 gcaaaaaaat tccaagtga tccaactaaa agat
 cagcaa ttgttatcgg tggtgggatt 780
 tcgccagctg taactgattt tctcgtgggt tacc
 tagccg gaattaaagc ttgaaatcta 840
 aaaaattctg ataaaaaac aaagataaca actg
 ataaaa tcgagataaa tcttgggttt 900
 gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga ctg
 aacaaa ttgcttcaaa agataaacct 960
 tcaaacctat tagctgtcgc tggaccactt actg
 aaattt tctcggatat aatcgcaaac 1020
 caaaatgatc gttatctcat tgggtttgac accg
 accaat cacttgttta taaaaaac 1080

示を、全体としてここに本明細書に援用する。

【0094】
 【配列表】

1	5	10	15
Phe Pro Leu Ser Ala Ile Ala Thr Ile Ser			
Ala Gly Cys Trp Asp Lys			
	20	25	30
Glu Thr Thr Lys Glu Glu Lys Ser Ala Asp			
Asn Gln Asn Lys Gln Ile			
	35	40	45
Thr Asp Val Ser Lys Ile Ser Gly Leu Val			
Asn Glu Arg Lys Ser Glu			
	50	55	60
Ile Met Ala Ala Lys Ala Asp Ala Asn Lys			
His Phe Gly Leu Asn Met			
65	70	75	80
Ala Ile Val Thr Ala Gly Gly Thr Val Asn			
Asp Asn Ser Phe Asn Gln			
	85	90	95
Ser Ser Trp Glu Ala Ile Gln Gln Leu Gly			
Ala Leu Thr Gly Gly Glu			
	100	105	110
Ile Thr Ser Val Asp Ser Ser Thr Ala Glu			
Leu Glu Gly Lys Tyr Ser			
	115	120	125
Ser Leu Ala Asn Thr Asn Lys Asn Val Trp			
Val Leu Ser Gly Phe Gln			
	130	135	140
His Gly Asp Ala Phe Thr Arg Trp Leu Lys			
Ile Pro Glu Asn Lys Gln			
145	150	155	1
60			
Leu Phe Thr Glu Lys Asn Ile Ile Ile Leu			
Gly Ile Asp Trp Thr Asp			
	165	170	175
Thr Glu Asn Val Ile Pro Thr Gly Arg Tyr			
Ile Asn Leu Thr Tyr Lys			
	180	185	190
Thr Glu Glu Ala Gly Trp Leu Ala Gly Tyr			
Ala Asn Ala Ser Phe Leu			
	195	200	205
Ala Lys Lys Phe Pro Ser Asp Pro Thr Lys			
Arg Ser Ala Ile Val Ile			
	210	215	220
Gly Gly Gly Ile Ser Pro Ala Val Thr Asp			
Phe Ile Ala Gly Tyr Leu			
225	230	235	2
40			
Ala Gly Ile Lys Ala Trp Asn Leu Lys Asn			
Ser Asp Lys Lys Thr Lys			
	245	250	255
Ile Thr Thr Asp Lys Ile Glu Ile Asn Leu			
Gly Phe Asp Val Gln Asp			
	260	265	270
Thr Ser Thr Lys Glu Arg Leu Glu Gln Ile			

405 410 415
 Ala Glu Glu Val Arg Lys Thr Leu Glu Ile
 Pro Glu Met Pro Asp Lys
 420 425 430
 Gln Pro Asp Lys Gln Gln Glu Ser Leu Asp
 Lys Leu Ile Thr Asp Ile
 435 440 445
 Asn Lys Asn

450

<210> 3

<211> 1263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: mhp3

manipulated for in vitro expressio

n

<400> 3

atgtgggata aagaacaac taaagaagaa aaat
 cagccg ataatacaaaa taagcaaatac 60
 actgatgtct caaaaatttc aggactagtt aatg
 aacgaa aatccgaaat tatggccgca 120
 aaagctgatg caaacaaca ttttgggcta aata
 tggcaa ttgtaaccgc tggatgaacg 180
 gtaaatgata attcatttaa ccaatcargt tggg
 aggcaa ttcaacaact tggcgcctctt 240
 actggagggtg agattacttc agtagatagt tcaa
 ctgctg aactgaagg aaaatatagc 300
 tcaattgcta ataccaacaa aaatgtttgg gtac
 tttctg gttttcaaca cggatgatg 360
 ttcaacaagat ggttaaaaat ccctgaaaat aagc
 aattat ttactgaaaa aaatattatc 420
 atactcggaa ttgactggac tgatactgaa aatg
 taattc caacaggtcg atatattaat 480
 ttaacctata aaactgaaga agccggatgg ctg
 caggat atgcgaatgc ttctttttg 540
 gcaaaaaaat tccaagtga tccaactaaa agat
 cagcaa ttgttatcgg tggatgggatt 600
 tcgccagctg taactgattt tatcgctggt tatc
 tagccg gaattaaagc ttggaatcta 660
 aaaaattctg ataaaaaac aaagataaca actg
 ataaaa tcgagataaa tcttgggttt 720
 gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga ctg
 aacaaa ttgcttcaaa agataaacct 780
 tcaaacactat tagctgtcgc tggaccactt actg
 aaattt tctcggatat aatcgcaaac 840
 caaatgatc gttatctcat tggatgtgac accg
 accaat cacttgttta taaaaaacct 900
 aaaaataaat tttcacctc aattttgaaa aatt
 taggtt actccgtttt cagcgttctt 960
 agtgatttat ataccaaaaa atcaaatca agaa
 atttag ccgctttga atttgtaaa 1020

	35		40		45				
Gly	Leu	Asn	Met	Ala	Ile	Val	Thr	Ala	Gly
Gly	Thr	Val	Asn	Asp	Asn				
	50				55				60
Ser	Phe	Asn	Gln	Ser	Gly	Trp	Glu	Ala	Ile
Gln	Gln	Leu	Gly	Ala	Leu				
	65				70				75
									80
Thr	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Ser
Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Glu				
				85					90
Gly	Lys	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ala	Asn	Thr	Asn
Lys	Asn	Val	Trp	Val	Leu				
				100					105
Ser	Gly	Phe	Gln	His	Gly	Asp	Ala	Phe	Thr
Arg	Trp	Leu	Lys	Ile	Pro				
				115					120
Glu	Asn	Lys	Gln	Leu	Phe	Thr	Glu	Lys	Asn
Ile	Ile	Ile	Leu	Gly	Ile				
	130								135
Asp	Trp	Thr	Asp	Thr	Glu	Asn	Val	Ile	Pro
Thr	Gly	Arg	Tyr	Ile	Asn				
	145								150
	60								155
Leu	Thr	Tyr	Lys	Thr	Glu	Glu	Ala	Gly	Trp
Leu	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asn				
				165					170
Ala	Ser	Phe	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser
Asp	Pro	Thr	Lys	Arg	Ser				
				180					185
Ala	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Ile	Ser	Pro
Ala	Val	Thr	Asp	Phe	Ile				
				195					200
Ala	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Trp
Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Asp				
	210								215
Lys	Lys	Thr	Lys	Ile	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile
Glu	Ile	Asn	Leu	Gly	Phe				
	225								230
	40								235
Asp	Val	Gln	Asp	Thr	Ser	Thr	Lys	Glu	Arg
Leu	Glu	Gln	Ile	Ala	Ser				
				245					250
Lys	Asp	Lys	Pro	Ser	Thr	Leu	Leu	Ala	Val
Ala	Gly	Pro	Leu	Thr	Glu				
				260					265
Ile	Phe	Ser	Asp	Ile	Ile	Ala	Asn	Gln	Asn
Asp	Arg	Tyr	Leu	Ile	Gly				
	275								280
Val	Asp	Thr	Asp	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Thr
Lys	Thr	Lys	Asn	Lys	Phe				
				290					295
									300
Phe	Thr	Ser	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Gly	Tyr

<211> 602
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 5
 atgataatat ttttttcagt aaataattgc ttat
 tttcag ggatttttaa tcatcttggt 60
 aacgcacac cgtgttgaac accagaaagt actc
 aaacat tttgttgggt attagcaagt 120
 gagctatatt ttccttcaag ttcagcagtt gaac
 tatcta ctgaagtaat ctcacctcca 180
 gtaagagcgc caagtgttg aatgcctct caac
 ttgatt ggttaaatga attatcattt 240
 accgttccac cagcggttac aatgccata tta
 gcccaa aatgtttgtt tgcacagct 300
 tttgcggcca taatttcgga ttttcgttca ttaa
 ctagtc ctgaaatatt tgagacatca 360
 gtgatttgct tattttgatt atcggctgat tttt
 ctctt tagttgtttc tttatcccaa 420
 catccggcag agattgtcgc gattgctgaa agcg
 gaaaaa ctaagcctaa gccaagaaat 480
 ttatttcatt ttatcttttt tttcatagtt gttc
 tcctaa ttaattgttt taattacgat 540
 gactttcaat tattttttaa taaattaatt tta
 ttttac attttctatt atattcaaaa 600

ac
 02

6

<210> 6
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 6
 Met Ile Ile Phe Phe Ser Val Asn Asn Cys
 Leu Phe Ser Gly Ile Phe
 1 5 10 15
 Asn His Leu Val Asn Ala Ser Pro Cys Trp
 Lys Pro Glu Ser Thr Gln
 20 25 30
 Thr Phe Leu Leu Val Leu Ala Ser Glu Leu
 Tyr Phe Pro Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ala Val Glu Leu Ser Thr Glu Val Ile Ser
 Pro Pro Val Arg Ala Pro
 50 55 60
 Ser Cys Trp Ile Ala Ser Gln Leu Asp Trp
 Leu Asn Glu Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Thr Val Pro Pro Ala Val Thr Ile Ala Ile
 Phe Ser Pro Lys Cys Leu
 85 90 95
 Phe Ala Ser Ala Phe Ala Ala Ile Ile Ser

<400> 7
 Ala Gly Xaa Trp Ala Lys Glu Thr Thr Lys
 Glu Glu Lys Ser
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:
 Oligonucleotide
 <400> 8
 Ala Trp Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:
 Oligonucleotide
 <400> 9
 Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn
 Asp Asn Lys Pro Asn Gln
 1 5 10 15
 Trp Val Arg Lys Tyr
 20
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:
 Oligonucleotide
 <400> 10
 tgytgrgcn argaracnac naargargar
 30
 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:
 Oligonucleotide
 <400> 11
 tgttgagcwa aagaacwac waaagaagaa
 30
 <210> 12
 <211> 27

<400> 12
tgrgtnacng cngaygnac ngtnaay
27

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:
Oligonucleotide

<400> 13
tgagtwacwg cwgatggwac wgtwaat
27

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:
Oligonucleotide

<400> 14
ritnacngtn ccrtcngcng tnacyc
26

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:
Oligonucleotide

<400> 15
attsacsgts ccatcsgcsg tsactc
26

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:
Oligonucleotide

<400> 16
tttgagacat cagtattg c
21

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial

gataaaatgg aataaatttc ttgg
24

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:

Oligonucleotide

<400> 35

caggttggga ggcaattcaa c
21

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:

Oligonucleotide

<400> 36

caaaaatggt tgggtacttt ctgg
24

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:

Oligonucleotide

<400> 37

cacaagatgg ttaaaaatcc c
21

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:

Oligonucleotide

<400> 38

ggaattgact ggactgatac tg
22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:

Oligonucleotide

<400> 40

taaagcttgg aatctaaaaa attc

24

<210> 41

<211> 457

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyorhinis

<400> 41

Met Asn Phe Lys Lys Ser Leu Leu Phe Leu

Thr Gly Thr Ile Ser Thr

1 5 10 15

Val Ala Ser Val Ala Thr Phe Val Ser Cys

Gly Glu Thr Asp Lys Glu

20 25 30

Gly Lys Ile Ile Arg Ile Phe Asp Asn Ser

Phe Val Lys Asp Arg Gln

35 40 45

Ala Glu Ile Glu Lys Ala Lys Asn Phe Asp

Phe Asn Thr Val Leu Leu

50 55 60

Thr Ala Gly Gly Thr Val Gln Asp Lys Ser

Phe Asn Gln Ser Ile Trp

65 70 75 80

Glu Ala Val Leu Glu His Tyr Asp Gln Ile

Glu Lys Thr Thr Asn Leu

85 90 95

Asp Arg Val Ser Gln Glu Thr Asn Asn Gln

Ser Glu Leu Ile Gly Lys

100 105 110

Tyr Lys Asn Phe Leu Asn Gly Asn Lys Asn

Val Trp Ile Leu Thr Gly

115 120 125

Phe Gln Gln Gly Gln Glu Phe Pro Lys Phe

Leu Lys Gln Thr Asp Ser

130 135 140

Asn Gly Lys Lys Tyr Ser Asp Leu Leu Ala

Glu Lys Lys Val Ile Ile

145 150 155 1

60

Val Ala Val Asp Trp Asp Leu Ser Lys Glu

Asp Lys Asp Leu Ile Lys

165 170 175

Ala Gly His Phe Ile Ser Leu Leu Tyr Lys

Thr Glu Glu Ala Gly Phe

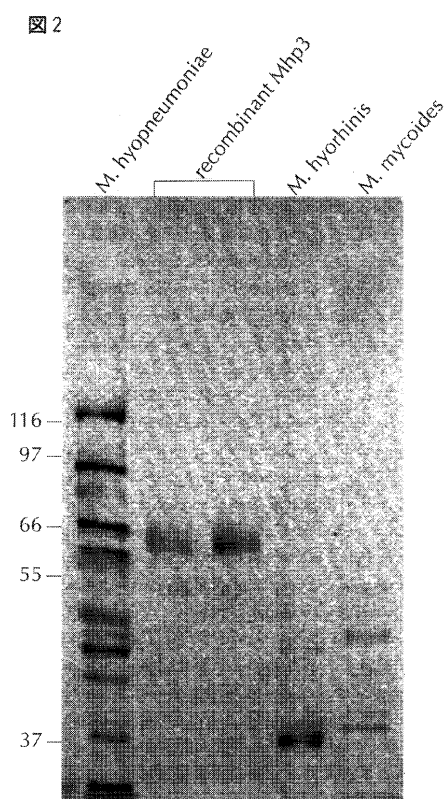
180 185 190

Ile Ala Gly Tyr Ala Ser Ser Lys Phe Leu

Ala Tyr Lys Phe Pro Asn

195 200 205

【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード ⁸ (参考)
A 6 1 P 31/04	1 7 1	C 0 7 K 14/30	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/30		19/00	4 H 0 4 5
19/00		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53			M
		33/566	
		33/569	F
		C 1 2 R 1:19	
/(C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:19)			

(72)発明者 レベッカ アン マドゥーラ
アメリカ合衆国, コネチカット 06340,
グロートン, 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

(72)発明者 イブレット リー ロージー
アメリカ合衆国, コネチカット 06340,
グロートン, 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

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA01 CA03
CA09 DA06 EA04 GA11 GA19
HA14

4B063 QA01 QA07 QA18 QA19 QQ03
QQ06 QQ42 QQ52 QQ58 QR32
QR55 QS10 QS16 QS25 QS34
QX02

4B064 AG01 AG31 CA02 CA19 CC24
CE06 CE11 DA01 DA15

4B065 AA26X AA37Y AB01 BA02
BD15 BD17 CA24 CA43 CA46

4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08
BA19 BA20 BA21 BA22 CA04
CA21 CA53 ZB351 ZC541
ZC611

4C085 AA03 BA48 BB11 CC07 CC21
DD62 EE01 EE05 FF02 FF14
FF17

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA11 EA20 EA29 FA74
GA10 GA23

专利名称(译)	支原体属猪肺炎支原体mhp 3基因的核酸和蛋白质及其用途		
公开(公告)号	JP2002306169A	公开(公告)日	2002-10-22
申请号	JP2001101364	申请日	2001-03-30
[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	ケンドールウェインキング レベッカアンマドゥーラ イブレットリーロージー		
发明人	ケンドール ウェイン キング レベッカ アン マドゥーラ イブレット リー ロージー		
IPC分类号	H02K37/04 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/30 C07K19/00 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12Q1/68 C12R1/19 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 H02K37/14		
CPC分类号	H02K37/14 A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/53 C07K14/30		
FI分类号	A61K39/00.J A61K39/39 A61K48/00 A61P31/04 A61P31/04.171 C07K14/30 C07K19/00 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.F C12R1/19 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS10 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE06 4B064/CE11 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA37Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BD15 4B065/BD17 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/CA21 4C084/CA53 4C084/ZB351 4C084/ZC541 4C084/ZC611 4C085/AA03 4C085/BA48 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/FF02 4C085/FF14 4C085/FF17 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/EA20 4H045/EA29 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA23		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供猪肺炎支原体Mhp3基因的核酸和由此编码的蛋白质。本发明涉及由mhp3编码的新型载脂蛋白抗原，用于预防和治疗由猪肺炎支原体感染引起的疾病的疫苗。本发明还涉及通过重组产生上述抗原的方法。

图 2

