

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514041

(P2005-514041A)

(43) 公表日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/005	A 6 1 K 39/005		4 B O 6 3
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02		4 B O 6 5
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/04		4 C O 8 5
A 6 1 K 39/085	A 6 1 K 39/085		4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 75 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-558505 (P2003-558505)	(71) 出願人	504265514
(86) (22) 出願日	平成15年1月13日 (2003. 1. 13)		イーデー・レリースタット・インステイテ
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月23日 (2004. 8. 23)		ユート・フオール・デイルホウデライ・
(86) 国際出願番号	PCT/NL2003/000020		エイ・デイルゲゾントハイト・ペー・ペー
(87) 国際公開番号	W02003/058248		ー
(87) 国際公開日	平成15年7月17日 (2003. 7. 17)		オランダ国、エヌ・エルー 8 2 1 9 ・ペー
(31) 優先権主張番号	02075089. 9		・ハー・レリースタット、エーデルヘルト
(32) 優先日	平成14年1月11日 (2002. 1. 11)		ウエヒ・1 5
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミコバクテリウム・パラツベルクローシス感染の診断薬及びワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ミコバクテリウム・アピウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列、前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部、前記核酸配列またはその一部を含むDNA断片、組換えDNA分子、生組換えキャリア及び宿主細胞に関する。本発明はまた、前記配列によりコードされるミコバクテリウム・アピウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性部分に関する。本発明は更に、前記核酸配列及びその一部、前記核酸配列またはその一部を含むDNA断片、組換えDNA分子、生組換えキャリア及び宿主細胞、タンパク質またはその免疫原性部分、並びに前記タンパク質またはその免疫原性部分に対する抗体を含むワクチンに関する。また、本発明はワクチン中及びワクチンの作成のための前記タンパク質の使用に関する。更には、本発明は診断薬またはワクチン接種の目的のための前記核酸配列、タンパク質または抗体の使用に関する。本発明は前記ワクチンの作成方法にも関する。最後に、本発明は前記核酸、タンパク質または前記タンパク質に対する抗体を含む診断キットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 5 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) タンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、9 kD ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 2】

配列番号 3 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、14 kD ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 3】

配列番号 1 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、28 kD ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 4】

配列番号 7 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、47 kD ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 5】

配列番号 9 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 6】

配列番号 11 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 7】

配列番号 13 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 8】

配列番号 15 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 9】

配列番号 17 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 85 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 10】

5.60 から 6.15 の P I を有する 60 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 11】

4.20 から 4.75 の P I を有する 33 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部。

【請求項 12】

請求項 1 から 11 に記載の核酸配列を含む D N A 断片。

10

【請求項 13】

機能的に連結したプロモーターの制御下で請求項 1 から 11 項記載の核酸配列または請求項 12 項に記載の D N A 断片を含む組換え D N A 分子。

【請求項 14】

請求項 1 から 11 に記載の核酸配列、請求項 12 に記載の D N A 断片または請求項 13 に記載の組換え D N A 分子を含む生組換えキャリア。

【請求項 15】

請求項 1 から 11 に記載の核酸配列、請求項 12 に記載の D N A 断片、請求項 13 に記載の組換え D N A 分子または請求項 14 に記載の生組換えキャリアを含む宿主細胞。

【請求項 16】

配列番号 6 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とする 9 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

20

【請求項 17】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とする 14 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 18】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とする 28 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

30

【請求項 19】

配列番号 8 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とする 47 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 20】

配列番号 10 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 21】

配列番号 12 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

40

【請求項 22】

配列番号 14 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 23】

配列番号 16 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜

50

種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 24】

配列番号 18 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94% の配列相同性を有することを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 25】

5.60 から 6.15 の P I を有するミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス 60 k D タンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 26】

4.20 から 4.75 の P I を有するミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス 33 k D タンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。 10

【請求項 27】

請求項 1 から 11 に記載の核酸配列によりコードされることを特徴とする請求項 16 から 26 に記載のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片。

【請求項 28】

ワクチン中に使用するための請求項 16 から 26 に記載のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片、或いは請求項 1 から 11 に記載の核酸配列。

【請求項 29】

ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染撲滅用ワクチンを製造するための請求項 1 から 11 に記載の核酸配列、請求項 12 に記載の DNA 断片、請求項 13 に記載の組換え DNA 分子、請求項 14 に記載の生組換えキャリア、請求項 15 に記載の宿主細胞、または請求項 16 から 26 に記載のタンパク質またはその免疫原性断片の使用。 20

【請求項 30】

少なくとも 1 つの請求項 16 から 26 に記載のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片に加えて医薬的に許容され得る担体を含むことを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を撲滅するためのワクチン。 30

【請求項 31】

請求項 1 から 11 に記載の核酸配列、請求項 12 に記載の DNA 断片、請求項 13 に記載の組換え DNA 分子、請求項 14 に記載の生組換えキャリアまたは請求項 15 に記載の宿主細胞に加えて医薬的に許容され得る担体を含むことを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を撲滅するためのワクチン。

【請求項 32】

請求項 16 から 26 に記載のタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片に対する抗体に加えて医薬的に許容され得る担体を含むことを特徴とするミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を撲滅するためのワクチン。

【請求項 33】

アジュバントを含むことを特徴とする請求項 30 から 32 に記載のワクチン。 40

【請求項 34】

ウシに対して病原性のウイルスまたは微生物から誘導した追加抗原、前記抗原に対する抗体または前記抗原をコードする遺伝情報を含むことを特徴とする請求項 30 から 32 に記載のワクチン。

【請求項 35】

ウシに対して病原性のウイルスまたは微生物がウシヘルペスウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス、パラインフルエンザ 3 型ウイルス、ウシパラミクソウイルス、口蹄疫ウイルス、パストレラ・ヘモリチカ、ウシ呼吸器合胞ウイルス、タイレリア種、バベシア種、トリパノソーマ種、アナプラズマ種、ネオスポラ・カニヌム、スタフィロコッカス・アウ 50

レウス、ストレプトコッカス・アガラクチエ、マイコプラズマ、エシェリヒア・コリ、エンテロバクター、クレブシエラ、シトロバクター及びストレプトコッカス・ダイスガラクチエからなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 4 に記載のワクチン。

【請求項 3 6】

請求項 1 から 1 1 に記載の核酸配列、請求項 1 2 に記載の DNA 断片、請求項 1 3 に記載の組換え DNA 分子、請求項 1 4 に記載の生組換えキャリア、請求項 1 5 に記載の宿主細胞、請求項 1 6 から 2 6 に記載のタンパク質または請求項 1 6 から 2 6 に記載のタンパク質に対する抗体を医薬的に許容され得る担体と混合することを含む請求項 3 0 から 3 5 に記載のワクチンの作成方法。

【請求項 3 7】

請求項 1 から 1 1 に記載の核酸配列またはそのプライマー、請求項 1 6 から 2 6 に記載のタンパク質またはその免疫原性断片、または請求項 1 項から 2 6 に記載のタンパク質と反応性の抗体及び適当な検出手段を含む診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス (Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis) タンパク質をコードする核酸配列、前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部、前記核酸配列またはその一部を含む DNA 断片、組換え DNA 分子、生組換えキャリア及び宿主細胞に関する。本発明はまた、前記配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性部分に関する。本発明は更に、前記核酸配列及びその一部、前記核酸配列またはその一部を含む DNA 断片、組換え DNA 分子、生組換えキャリア及び宿主細胞、タンパク質またはその免疫原性部分、及び前記タンパク質またはその免疫原性部分に対する抗体を含むワクチンに関する。また、本発明はワクチン中及びワクチンの作成のための前記タンパク質の使用に関する。更には、本発明は診断薬またはワクチン接種の目的のための前記核酸配列、タンパク質または抗体の使用に関する。本発明は前記ワクチンの作成方法にも関する。最後に、本発明は前記核酸、タンパク質または前記タンパク質に対する抗体を含む診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

ミコバクテリウム属の細菌はグラム陽性抗酸性微生物である。この属には、多数の重要なヒト及び動物病原体が含まれている。その中には、現在世界中で食肉及び乳製品業界において非常に多大な経済的損失を招く反芻動物の病気につながる慢性肉芽腫感染である傍結核症またはヨーネ病の原因菌であるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスがある。世界中で家畜の群の大部分 (20 ~ 70%) が感染している。ヨーロッパでの毎年の推定損失は約 GBP 207 / 乳牛である。米国での毎年の推定損失は約 15 億米国ドルである (N. B. Harris 及び R. G. Barletta, *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 489 - 512 (2001))。

【0003】

ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスは、反芻動物における明白な病原性に加えて、最も一般的に遠位回腸及び結腸に影響を及ぼすだけでなく口から肛門及び肛門周囲部分までの胃腸管の任意の部分でも起こり得るヒトの非特異的慢性経壁炎症性疾患であるクローン病の原因であると疑われている (P. Quirke, *Gut*, 45: 755 - 760 (2001)); 「クローン病とパラツベルクローシスの可能性ある関係 (Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis)」, ヨーロッパ委員会, D - G 健康及び消費者の保護 (D-G Health and Consumer Protection), 2000年3月21日付の動物健康及び動物福祉に関する科学委員会の報告書 (Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare)。クローン病の重大な問題の1つは

10

20

30

40

50

この病気の治療法がない事実である。この病気の状態は、いったんかかると一生そのまま、死亡率が高くなる。

【0004】

低温殺菌乳中に予期せずにミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスのより高熱耐性の株が存在していることに加えて、その株がクローン病の発生に關与していると疑われることから、人口に対する潜在的な健康影響に關する関心が増えつつある。この最近の予期せぬ所見はN. Sung及びM. T. Collins, Appl. Environm. Microbiol., 64:999-1005(1998)に記載されている。この問題に対する意識が高まると、傍結核症をコントロール及び根絶するのに有効な診断薬及びワクチンの開発に対する緊急性が再び生じた。

10

【0005】

ミコバクテリウム・アビウム(*Mycobacterium avium*)はミコバクテリウムの大部分を占め、3つの亜種、すなわちにミコバクテリウム・アビウム亜種アビウム(*avium*)、ミコバクテリウム・アビウム亜種シルバチウム(*silvaticum*)及びミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに分類され得る。ミコバクテリウム・アビウム亜種アビウムは土壌及び健康に見える動物を含めた自然環境、鳥類及び動物に広く分布している。ミコバクテリウム・アビウム亜種アビウム単離物は日和見病原体であり、通常免疫低下宿主において感染及び病気を生じさせる。ミコバクテリウム・アビウム亜種アビウム株104の完全ゲノム配列が現在決定されている。ミコバクテリウム・アビウム亜種シルバチウムはシカにおいて傍結核症に似た病気を生じさせ得る。多くの反芻動物は6ヶ月齢前でもミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに感染するが、病気は通常少なくとも2歳以降になってからしか発症しない。この間細菌は宿主細胞の内部で生存していると考えられるが、細菌が糞便中に検出されるようになる期間胃腸管の内腔で感染の細胞外エピソードも起こる(感染の後期段階では頻度が高くなる)。現在利用されているミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する(免疫)診断薬の感度、特に初期または不顕性感染の検出に關する感度は比較的low、従って前記診断薬は病気コントロールのためのツールとして有効でない。家畜の群を病気から守るのに有効であると一部考えられている全細胞ミコバクテリアワクチンが使用されるが、このワクチンはウシ結核症の免疫診断を本質的に干渉し、病気の伝染を抑制しない。今までにミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの幾つかの抗原成分が同定された。既に公開されているミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの抗原分子は糖脂質及び小型実験動物で生じた本質的に単一特異性早期血清を用いて同定されたタンパク質抗原からなる。細胞壁糖脂質分子リポアラビノマンナン(LAM)は細菌が放出する細胞濾液に対するモノクローナル抗体により認識することにより同定され、その後血清診断的ELISAの開発のために精製され、使用された(Muthariaら, Infect. Immun., 65:387-394(1997); Jarkら, Vet. Microbiol., 51:189-198(1997))。加えて、分子量14kD(Olsenら, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8:797-801(2001))、18kD(バクテリオフェリチン; Elsaghierら, Clin. Exp. Immunol., 90:503-508(1992))、19kD(AhpD; Olsenら, Infect. Immun., 68:801-808(2000))、24kD(p24BCD; Elsaghierら, Clin. Exp. Immunol., 90:503-508(1992))、30kD(p30; Burrelsら, Vet. Immunol. Immunopathol., 45:311-320(1995))、34kD(Gillotら, J. Bact., 175:4930-4935(1993); DeKeselら, J. Clin. Microbiol., 31:947-954(1993); Coetsierら, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 5:446-451(1998))、34.5kD(Muthariaら, Infect. Immun., 65:387-394(1997))、35kDタンパク質(Dheenadhayalan及びChang, 未公開データ)、38kD(Elsaghierら, Clin. E

20

30

40

50

x p . Immunol . , 90 : 503 - 508 (1992))、44 . 3 kD (Mutharriař , Infect . Immun . , 65 : 387 - 394 (1997))、45 kD (Ahpc ; Olsenř , Infect . Immun . , 68 : 801 - 808 (2000))、65 kD (hsp65 ; Koetsř , Vet . Immunol . Immunopath . , 70 : 105 - 115 (1999))、70 kD (hsp70 ; Stevensonř , Nucleic Acids Res . , 19 : 4552 (1991) ; Koetsř , Vet . Immunol . Immunopathol . , 70 : 105 - 115 (1999))を有するタンパク質抗原、及びスーパーオキシドジムスターゼ分子 (Mulleradř , FEMS Immunol . Med . Microbiol . , 34 : 81 (2002))が同定され、部分的に特徴づけられた。これらの幾つかし
 か診断薬またはワクチンの開発のために評価されていない (34 kD ; Coetsierř , Clin . Diagn . Lab . Immunol . , 5 : 446 - 451 (1998))。従って、現在の診断薬及びワクチンは依然としてかなり粗な抗原物質をベースとしている。リポアラビノマンナン (Mutharriař , Infect . Immun . , 65 : 387 - 394 (1997) ; Jarkř , Vet . Microbiol . , 57 : 189 - 198 (1997))及び34 kD抗原 (Gilotř , J . Bact . , 175 : 4930 - 4935 (1993) ; DeKeselř , J . Clin . Microbiol . , 31 : 947 - 954 (1993) ; Coetsierř , Clin . Diagn . Lab . Immunol . , 5 : 446 - 451 (1998))は診断薬及びワクチンへの使用のためにDE19621488及びWO9216628に記載されている。
 幾つかの他の分子が診断薬、ワクチン及び治療薬中に使用されている。挿入配列ISM-1 (EPO288306及びUS5225324)、マイコバクテリアDAP分子 (US9523226)、36 kD抗原 (US5776692)、可溶性抗原調製物 (RU2118538)、鉄還元能力を有する細胞外タンパク質 (DE19728834)及びアシラーゼ (国際特許出願公開第9949054号パンフレット)上でコードされるタンパク質が存在する。

【発明の開示】

【0006】

本発明の目的は、哺乳動物、より具体的にはヒト及びウシにおけるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの病原作用に対する保護を与えることができるポリペ
 プチドを提供することである。更に、多数の前記ポリペプチド及び前記ポリペプチドに対
 する抗体が有効な診断ツールを提供する。

【0007】

今や驚くことに、先ず9種のポリペプチドが発現ライブラリーにおいて特異的に同定され、単離され、2つの追加ポリペプチドがプロテオミクスで同定され、これらの各ポリペ
 プチドは、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する免疫応答を誘
 導でき、ワクチン成分として適当であることが知見された。

【0008】

本発明者らは、前記ポリペプチドが単独でまたは相互に組み合わせてワクチン成分として使用され得、哺乳動物、より具体的にはヒト及びウシにおけるミコバクテリウム・アビ
 ウム亜種パラツベルクローシス感染に対する保護を与えるために実際寄与し、ミコバクテ
 リウム・アビウム亜種パラツベルクローシスにより生ずるダメージを減らすのを助けるこ
 とを知見した。

【0009】

本発明のワクチン成分 (該ワクチン成分をコードする遺伝子) 及び診断ツールを検出する
 ために3種のアプローチを使用した。これらのアプローチは実施例により詳細に記載され
 ている。1つのアプローチでは、発現ライブラリー中で免疫反応性ミコバクテリウム・
 アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする遺伝子を検出するために非常
 に特異的な抗血清を使用している。使用した抗血清は、この抗血清がミコバクテリウム・
 アビウム亜種パラツベルクローシスに長期間感染したウシから得た点で発現ライブラリー

のスクリーニングのために通常使用されている抗血清と異なる。更に、前記抗血清はミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに自然に感染したことが判明しているが、結核、ブルセラ症またはロイコーシスに感染した病歴のないウシから採取した。このことは、スクリーニングに使用するための試験血清を得る前の約2年以内の少なくとも2つの糞便サンプルがミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス陽性であったという所見及び傍結核を引き起こし、パラツベルクローシス抗原と交差反応する菌に対する抗体または他の免疫応答が本質的にないという所見から明らかであった。こうして採取した血清はミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス抗原に対する免疫スクリーニングにおいて非常に有用である。なぜならば、前記血清は関連ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスペプチド断片に対して非常に広く反応性であるのに対して、傍結核、ブルセラ症またはロイコーシスを引き起こす病原体との特異的反応性を本質的に全くまたは非常に少ししか示さないからである。

10

【0010】

このアプローチにより、コード配列が下記するように配列番号1、3及び5に示される3つの新規な免疫原性タンパク質の所見が得られた。

【0011】

今回、第1タンパク質をコードする遺伝子をクローン化し、配列決定し、免疫原性決定基を含む遺伝子の核酸配列は配列番号1に示されている。完全長遺伝子は28kDの分子量を有するタンパク質(配列番号2に示す)をコードする。

【0012】

当業界で公知のように、多くの異なる核酸配列が1つの同一タンパク質をコードし得る。この現象は通常アミノ酸をコードする各トリプレットの第2及び特に第3塩基におけるゆらぎとして公知である。この現象により、同一タンパク質をコードする2つの核酸配列に非相同が生じ得る。よって、原則として、70%くらいの低い配列相同性を有する2つの核酸配列は1つの同一タンパク質をコードし得る。

20

【0013】

従って、本発明の第1実施態様の1形態は、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸の一部に関し、前記核酸配列またはその一部は配列番号1に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも85%の相同性を有する。

30

【0014】

免疫原性断片の概念を以下に定義する。免疫原性断片をコードする核酸配列の長さは通常少なくとも18ヌクレオチド、しばしば21ヌクレオチドであるが、好ましくは24、27、30、33、更には36ヌクレオチドである。

【0015】

ポリアクリルアミドゲルでのゲル電気泳動で測定される本発明のすべてのタンパク質の分子量は、当業界でしばしば経験する分子量測定のみならずの変動のためにある程度異なり得る。よって、本発明のタンパク質の分子量は理論分子量 ± 5 kDであると解釈されるべきである。

40

【0016】

好ましくは、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は、配列番号1に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の相同性を有する。

【0017】

より好ましくは、相同性レベルは98%、99%、更には100%である。

【0018】

ヌクレオチド相同性レベルは、www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

50

t / b l 2 s e q / b 1 2 . h t m l に見つけることができるサブプログラム “ B L A S T N ” を選択することによりコンピュータプログラム “ B L A S T 2 S E Q U E N C E S ” を用いて測定することができる。このプログラムについては、T a t i a n a A . T a t u s o v a , T h o m a s L . M a d d e n , F E M S M i c r o b i o l . L e t t e r s , 1 7 4 : 2 4 7 - 2 5 0 (1 9 9 9) を参照されたい。使用するパラメータはデフォルトパラメータである：整合についてのリワード + 1 ; 非整合についてのペナルティ - 2 ; オープンギャップ 5 ; 拡張ギャップ 2 ; ギャップ x _ d r o p o f f 5 0 。

【 0 0 1 9 】

配列番号 1、または下記する配列番号 3、5、7、9、10、13、15 または 17 に示す配列に相補的なヌクレオチド配列、或いは本発明の配列のタンデムアレーを含むヌクレオチド配列も本発明の範囲内である。 10

【 0 0 2 0 】

この実施態様の別の形態は、配列番号 3 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも 85% の同一性を有する、14 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【 0 0 2 1 】

好ましくは、本発明の 14 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号 3 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 93%、より好ましくは 95% の同一性を有する。 20

【 0 0 2 2 】

より好ましくは、同一性レベルは 98%、99%、更には 100% である。

【 0 0 2 3 】

前記実施態様の更に別の形態は、配列番号 5 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも 85% の同一性を有する、9 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。 30

【 0 0 2 4 】

好ましくは、本発明の 9 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号 5 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 93%、より好ましくは 95% の同一性を有する。

【 0 0 2 5 】

より好ましくは、同一性レベルは 98%、99%、更には 100% である。 40

【 0 0 2 6 】

免疫学的に重要なポリペプチドを検出するために使用される別のアプローチは、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質に対する高特異的モノクローナル抗体の使用に基づいていた。このアプローチは上記したミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する特定抗血清を用いるアプローチよりも高い特異性を有するという利点を有する。前記したモノクローナル抗体を用いると、更に 6 個の免疫原性ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質が同定、単離された。

【 0 0 2 7 】

従って、この実施態様の別の形態は、配列番号 7 に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも 85% の同一性 50

を有する、47kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【0028】

好ましくは、本発明の47kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号7に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0029】

より好ましくは、同一性レベルは98%、99%、更には100%である。

【0030】

この実施態様の別の形態は、配列番号9に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【0031】

好ましくは、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号9に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0032】

より好ましくは、同一性レベルは98%、99%、更には100%である。

【0033】

この実施態様の別の形態は、配列番号11に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【0034】

好ましくは、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号11に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0035】

より好ましくは、同一性レベルは98%、99%、更には100%である。

【0036】

この実施態様の別の形態は、配列番号13に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【0037】

好ましくは、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号13に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0038】

より好ましくは、同一性レベルは98%、99%、更には100%である。

10

20

30

40

50

【0039】

この実施態様の別の形態は、配列番号15に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも85%の相同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【0040】

好ましくは、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号15に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の相同性を有する。

10

【0041】

より好ましくは、相同性レベルは98%、99%、更には100%である。

【0042】

この実施態様の別の形態は、配列番号17に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも85%の相同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部に関する。

【0043】

好ましくは、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列または前記タンパク質の免疫原性断片をコードする前記核酸配列の一部は配列番号17に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子の核酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは93%、より好ましくは95%の相同性を有する。

20

【0044】

より好ましくは、相同性レベルは98%、99%、更には100%である。

【0045】

ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスのプロテオームの注意深い分析に基づく第3のアプローチにより、2つの新規ワクチン成分が検出された。このアプローチは2D-ゲルでの免疫原性タンパク質の同定に基づく。このアプローチの利点は、発現ライブラリーで見つかっていないか同定されていないタンパク質が今回ワクチン成分として明確に同定できる点で他のアプローチよりも有利である。方法の詳細は実施例2に記載する。

30

【0046】

よって、本発明の別の実施態様は、5.60~6.15のPIを有する60kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質に関する。このタンパク質は、図1B及びDにおいて約5スポットの水平列(例えば2D-ゲル電気泳動用サンプルの調製により誘導される各種翻訳後修飾またはアーチファクトを表すイソ型の小さな違いによる)として目に見える。

【0047】

更に、別の実施態様は、4.20~4.75のPIを有する33kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質に関する。このタンパク質は、図1A及びDにおいて約3スポットの水平列(例えば2D-ゲル電気泳動用サンプルの調製により誘導される各種翻訳後修飾またはアーチファクトを表すイソ型の小さな違いによる)として目に見える。

40

【0048】

上記タンパク質が今回明確に同定されたので、これらのタンパク質を配列決定することができる。例えば、最初の15N末端アミノ酸は当業界で公知の一般的手順に従って決定され得る。N末端配列決定は例えば現在市販されており、ルーチンのタンパク質配列決定を専門としている会社により実施されている。その後、前記タンパク質をコードする遺伝

50

子が縮重プローブを用いて容易に決定し得る。これらの技術は当業界で公知である。

【0049】

本発明は新規なミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする核酸配列を開示しているので、今回初めて前記タンパク質を十分量得ることが可能である。これは、例えば本発明の前記タンパク質またはその免疫原性断片をコードする遺伝子の全部または一部を発現させるべく発現系を用いることにより実施され得る。よって、核酸配列に関する実施態様のより好ましい形態では、本発明は本発明の核酸配列を含むDNA断片に関する。DNA断片は本発明の核酸配列に対する担体として機能するヌクレオチドである。前記DNA断片は、例えば本発明の核酸配列がクローン化されるプラスミドであり得る。前記DNA断片は以下に記載するように例えばプライマーとして使用するためのDNAの量を増加させるために、DNAワクチン接種目的のため、及び本発明の核酸配列を発現させるために有用である。

10

【0050】

核酸配列を発現させるための必須要件は、核酸配列がプロモーターの制御下にあるように前記核酸配列に機能的に連結した適当なプロモーターである。当業者に自明のように、プロモーターの選択はタンパク質発現のための宿主細胞として使用される細胞において遺伝子転写できる真核、原核またはウイルスプロモーターにも及ぶ。よって、前記実施態様のより好ましい形態は、本発明のDNA断片及び/または核酸配列を含む組換えDNA分子に関し、前記核酸配列は機能的に連結したプロモーターの制御下にある。これは、例えば一般的な分子生物学技術を用いて得ることができる(Maniatis/Sambrook (J. Sambrookら, 「分子クローニング: 実験マニュアル (Molecular cloning: a laboratory manual)」, ISBN 0-87969-306-6 (1989))

20

【0051】

機能的に連結したプロモーターは、該プロモーターに連結している核酸配列の転写をコントロールし得るプロモーターである。前記プロモーターは、発現のために使用される細胞において機能するならば本発明の新規遺伝子の天然プロモーターまたはミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの別のプロモーターであり得る。宿主細胞が細菌の場合、使用され得る有用な発現制御配列には、Trpプロモーター及びオペレーター (Goeddelら, Nucl. Acids Res., 8: 4057 (1980)); lacプロモーター及びオペレーター (Changら, Nature, 275: 615 (1978)); 外膜タンパク質プロモーター (K. Nakamura及びM. Inouge, EMBO J., 1: 771-775 (1982)); バクテリオファージラムダプロモーター及びオペレーター (E. Remautら, Nucl. Acids Res., 11: 4677-4688 (1983)); -アミラーゼ (枯草菌) プロモーター及びオペレーター; 転写配列及び選択宿主細胞に適合する他の発現強化及び制御配列が含まれる。宿主細胞が酵母の場合、有用な発現制御配列には例えば -交配因子が含まれる。昆虫細胞の場合、バキュロウイルスの多面体またはp10プロモーターが使用され得る (G. E. Smithら, Mol. Cell. Biol., 3: 2156-65 (1983))。宿主細胞が脊椎動物起源の場合、有用な発現制御配列の例には (ヒト) サイトメガロウイルス前初期プロモーター (B. Seedら, Nature, 329: 840-842 (1987)); E. F. Fynanら, PNAS, 90: 11478-11482 (1993); J. B. Ulmerら, Science, 259: 1745-1748 (1993)); ラウス肉腫ウイルスLTR (RSV; G. M. Gormanら, PNAS, 79: 6777-6781 (1982)); 上掲のFynanら; 上掲のUlmerら); MPSV LTR (Staceyら, J. Virology, 50: 725-732 (1984)); SV40前初期プロモーター (J. Spragueら, J. Virology, 45: 773 (1983)); SV-40プロモーター (P. W. Bermanら, Science, 222: 524-527 (1983)); メタロチオネインプロモーター (R. L. Brinsterら, Nature, 296: 39-42 (1982)); 熱シヨ

30

40

50

ックプロモーター (Voellmyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4949-53 (1985)); Ad2の主要後期プロモーター及び - アクションプロモーター (Tangら, Nature, 356:152-154 (1992))が含まれる。調節配列にはターミネーター及びポリアデニル化配列も含まれる。使用され得る配列の中には、公知のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40ポリアデニル化配列、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) ターミネーター及びポリアデニル化配列がある。

【0052】

細菌、酵母、真菌、昆虫及び脊椎動物発現系は非常に頻繁に使用される系である。前記系は当業界で公知であり、通常例えば米国カリフォルニア州パロアルト、ファビアン・ウェイに所在の Clontech Laboratories, Inc. から入手し得る。前記した発現系の次には、寄生虫ベースの発現系が魅力的な発現系である。前記系は、例えば仏国特許出願公開第2714074号明細書及び米国特許出願第08/043109号明細書 (S. Hoffman及びW. Rogers, 1993年12月1日付け公開) に記載されている。

10

【0053】

本発明のこの実施態様の更に好ましい形態は、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片をコードする核酸配列、本発明のDNA断片または本発明の組換えDNA分子を含む生組換えキャリア (LRC) に関する。前記LRCは追加遺伝子情報 (この場合には、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片をコードする核酸配列) がクローン化されている微生物またはウイルスである。前記LRCに感染したウシはキャリアの免疫原に対してだけでなく、例えば1つ以上の本発明の新規なミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質遺伝子のような遺伝コードが更にLRCにクローン化されるタンパク質の免疫原性部分に対しても免疫応答を生ずる。

20

【0054】

細菌性LRCとして、当業界で公知の弱毒化サルモネラ株が非常に魅力的に使用され得る。また、生組換えキャリア寄生虫は例えばA. N. Vermeulen, Int. Journ. Parasitol., 28:1121-1130 (1998) に記載されている。更に、LRCウイルスは核酸配列を標的細胞に運ぶ方法として使用され得る。生組換えキャリアはベクターウイルスとも称される。ベクターとしてしばしば使用されるウイルスは、ワクシニアウイルス (Panicalliら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927 (1982))、ヘルペスウイルス (欧州特許出願公開第0473210号明細書) 及びレトロウイルス (D. Valerioら, S. J. Baum, K. A. Dicke, E. Lotzova及びD. H. Pluznik編, 「今日の実験的血液学 (Experimental Haematology today) - 1988」, p. 92-99, ニューヨークに所在のSpringer Verlag (1989) 発行) である。

30

【0055】

当業界で公知のインビボ相同組換えの技術は、宿主動物において本発明の挿入核酸配列の発現を誘導し得る組換え核酸配列を選択した細菌、寄生虫またはウイルスのゲノムに導入するために使用される。

40

【0056】

本発明のこの実施態様の最後の形態は、本発明のタンパク質をコードする核酸配列、前記核酸配列を含むDNA断片、または機能的に連結したプロモーターの制御下で前記核酸配列を含む組換えDNA分子を含む宿主細胞に関する。この形態は本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片をコードする核酸分子を含む生組換えキャリアを含む宿主細胞にも関する。宿主細胞は細菌起源、例えば大腸菌、枯草菌及びラクトバシラス種の細胞とpBR322のような細菌ベースのプラスミド、pEXシリーズ、pETシリーズまたはpGEXシリーズのような細菌発現ベクター、またはバクテリオファージの組み合わせであり得る。宿主細胞は真核起源のもの

50

、例えば酵母特異的ベクター分子との組合せの酵母細胞；高級真核細胞、例えばベクターまたは組換えバキュロウイルスと組合せた昆虫細胞（Luckowら，Bio-technology，6：47-55（1988））；例えばTi-プラスミドベースベクターまたは植物ウイルスベクター（K.A.Bartonら，Cell，32：1033（1983））と組み合わせた植物細胞；哺乳動物細胞、例えば適当なベクターまたは組換えウイルスを含むHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCrandell-Feline腎臓細胞であり得る。

【0057】

本発明の別の実施態様は、本発明の新規なミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

10

【0058】

免疫原性断片の概念を以下に定義する。

【0059】

この実施態様の1形態は、配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列相同性を有する、28kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

【0060】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に97%、98%、99%、更には100%である。

20

【0061】

本発明の配列番号2及び下記する配列番号4、6、8、10、12、14、16及び18に示すミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質の免疫原性断片は、好ましくは少なくとも6、より好ましくは好ましい順に7、8、9、10、12、15、20、30、更には40アミノ酸の長さを有する。

【0062】

この実施態様の更に好ましい形態は、配列番号1に示す核酸配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【0063】

上記したように、細菌は宿主細胞内で生存するが、胃腸管の内腔における感染の細胞外エピソードも起こる。このことは、細胞性及び抗体媒介免疫応答が疾患に対する十分な防御において役割を果たすことを意味している。実施例に示すように、T細胞応答及びB細胞応答の両方をチェックする検査が本発明のタンパク質のワクチン成分としての価値を調べるために使用される。

30

【0064】

本発明の別の形態は、配列番号4に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列相同性を有する、14kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

40

【0065】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に97%、98%、99%、更には100%である。

【0066】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号3に示す核酸配列によりコードされる14kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【0067】

本発明の更に別の形態は、配列番号6に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列相

50

同性を有する、9 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

【0068】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に97%、98%、99%、更には100%である。

【0069】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号5に示す核酸配列によりコードされる9 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【0070】

本発明の別の形態は、配列番号8に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列同性を有する、47 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

【0071】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に97%、98%、99%、更には100%である。

【0072】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号7に示す核酸配列によりコードされる47 k D ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【0073】

本発明の別の形態は、配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

【0074】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に97%、98%、99%、更には100%である。

【0075】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号9に示す核酸配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【0076】

また、本発明の別の形態は、配列番号12に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

【0077】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に97%、98%、99%、更には100%である。

【0078】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号11に示す核酸配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【0079】

また、本発明の別の形態は、配列番号14に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは好ましい順に94%、95%、更には96%の配列同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に 97%、98%、99%、更には 100% である。

【 0 0 8 1 】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号 13 に示す核酸配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【 0 0 8 2 】

また、本発明の別の形態は、配列番号 16 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは好ましい順に 94%、95%、更には 96% の配列相同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

10

【 0 0 8 3 】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に 97%、98%、99%、更には 100% である。

【 0 0 8 4 】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号 15 に示す核酸配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

【 0 0 8 5 】

また、本発明の別の形態は、配列番号 18 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは好ましい順に 94%、95%、更には 96% の配列相同性を有する、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及びその免疫原性断片に関する。

20

【 0 0 8 6 】

より好ましくは、相同性レベルは好ましい順に 97%、98%、99%、更には 100% である。

【 0 0 8 7 】

本発明の更に別の好ましい形態は、配列番号 17 に示す核酸配列によりコードされるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性断片に関する。

30

【 0 0 8 8 】

タンパク質相同性のレベルは www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html に見つけることができるサブプログラム "BLAST P" を選択することによりコンピュータープログラム "BLAST 2 SEQUENCES" を用いて測定することができる。このプログラムについては、Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Letters, 174: 247-250 (1999) を参照されたい。使用するマトリックス: "blosum 62"。使用するパラメーターはデフォルトパラメーターである: オープンギャップ 11; 拡張ギャップ 1; ギャップ x_ドロップオフ 50

40

【 0 0 8 9 】

本発明に包含される特定タンパク質に関して、各ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシ株間に天然変異が存在し得ると理解される。これらの変異は全配列中のアミノ酸の違いにより、前記配列中のアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位または付加により示され得る。本質的に生物学的及び免疫学的活性を変化させないアミノ酸置換は、例えば Neurathら, 「タンパク質(Proteins)」, ニューヨークに所在の Academic Press (1979年) 発行に記載されている。関連アミノ酸間のアミノ酸置換または進化中にしばしば起こる置換は、特に Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val である (例えば、M. D. Dayhoff, 「タン

50

パク質配列及び構造の図表集(Atlas of protein sequence and structure)」, 第5巻, 補遺3, ワシントン・ディー・シーに所在のNat. Biomed. Res. Found. (1978年)発行)。他のアミノ酸置換には、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val及びAla/Gluが含まれる。この情報に基づいて、Lipman及びPearsonはタンパク質を迅速に高感度で比較し(Science, 227:1435-1441(1985))、相同タンパク質間の機能類似性を決定する方法を開発した。本発明の例示実施態様のアミノ酸置換並びに欠失及び/または挿入を有する変異は、生じたタンパク質がその免疫反応性を保持している限り本発明の範囲である。これは、異なる圃場単離物から単離した本発明のミ
10
コバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質が約70%の相同性レベルを有しているが同一のタンパク質が同一の免疫学的特性で表されることの説明である。ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染に対してまたは少なくとも前記感染の発症に対して免疫応答を誘導し得るタンパク質を与える本発明の特定タンパク質のアミノ酸配列の変異は“本質的に免疫原性に影響を及ぼさない”と見做される。

【0090】

タンパク質を例えばワクチン接種の目的または抗体を作成するために使用する場合、前記タンパク質は必ずしも全タンパク質として使用する必要がない。そのまま或いはKLHのような担体にカップリングさせたときにタンパク質に対する免疫応答を誘導し得るタンパク質の断片、いわゆる免疫原性断片を使用することも可能である。「免疫原性断片」
20
は脊椎動物宿主において免疫応答を誘導し得る能力を維持した完全長タンパク質の断片を指し、例えばB細胞またはT細胞エピトープを含む。簡単に言えば、免疫原性断片は本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質に対する免疫原性応答を誘導し得る断片である。この場合、各種技術が抗原断片(決定基)をコードするDNA断片を簡単に同定するために利用し得る。Geysenら(国際特許出願公開第84/03564号パンフレット;同第86/06487号パンフレット;米国特許第4,833,092号明細書;Proc.Natl.Acad.Sci.,81:3998-4002(1984);J.Imm.Meth.,102:259-274(1987))が記載している方法、所謂PEPSCAN方法がエピトープ(タンパク質の免疫学的に重要な領域)を検出するための実施が容易で迅速な十分に確立された方法である。この方法
30
は世界中で使用されており、当業者に公知である。この(実験的)方法は特にB細胞及びT細胞エピトープを検出するために適している。また、タンパク質をコードする遺伝子の配列が与えられているならば、コンピューターアルゴリズムにより現在公知のエピトープとの配列及び/または構造の一致に基づいて免疫学的に重要なエピトープとして特定タンパク質断片を設計することができる。これらの領域の決定は、Hoop及びWood'sの親水性基準(Proc.Natl.Acad.Sci.,78:38248-3828(1981))及びChou及びFastmanの二次構造アスペクト(Advances in Enzymology,47:45-148(1987);米国特許第4,554,101号明細書)の組合せに基づく。T細胞エピトープも同様にBerzofskyの両親媒性基準(Science,235:1059-1062(1987);米国特許
40
出願第07/005,885号明細書)を用いてコンピューターにより配列から予測され得る。要約した概説は、一般的原理についてはShan Luら,Tibtech,9:238-242(1991)、マラリアエピトープについてはGoodら,Science,235:1059-1062(1987)、概説についてはLu,Vaccine,10:3-7(1992)、HIVエピトープについてはBerzofsky,The FASEB Journal,5:2412-2418(1991)に見つけられる。免疫原性断片は通常少なくとも6、より一般的には7~8アミノ酸、好ましくは8以上、例えば9、10、12、15、更には20以上のアミノ酸の長さを有する。よって、前記断片をコードする核酸配列は少なくとも18、より一般的には24、好ましくは27、30、36、45、更には60核酸の長さを有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 1 】

従って、本発明の別の実施態様の1形態は、上記した本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片の少なくとも1つに加えて医薬的に許容され得る担体を含むミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を撲滅するためのワクチンに関する。

【 0 0 9 2 】

本発明の別の実施態様は、ワクチン中に使用するための本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片に関する。

【 0 0 9 3 】

本発明の更に別の実施態様は、ワクチン、より具体的にはミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を撲滅するワクチンを作成するための本発明の核酸配列、DNA断片、組換えDNA分子、生組換えキャリア、宿主細胞、或いはタンパク質またはその免疫原性断片の使用に関する。

10

【 0 0 9 4 】

本発明のワクチンの1つの作成方法は、細菌を増殖後、その細菌または上清からミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片を生化学的に精製することを含む。しかしながら、この方法ではワクチンを作成するのに非常に時間がかかる。

【 0 0 9 5 】

従って、ワクチン中に本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその免疫原性断片をコードする遺伝子の発現産物を使用することが非常に便利である。これは、ワクチン成分として好適な9個の新規なミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列が本発明で提供されたので今回初めて可能となった。

20

【 0 0 9 6 】

上記した遺伝子の発現産物をベースとするワクチンは、本発明のタンパク質またはその免疫原性断片を下記する医薬的に許容され得る担体と混合することにより容易に作成され得る。

【 0 0 9 7 】

或いは、本発明のワクチンは、本発明のタンパク質またはその免疫原性断片を発現し得る上記した生組換えキャリアを含み得る。例えばサルモネラキャリアまたはウイルスキャリア（例えば、ヘルペスウイルスベクター）をベースとするようなワクチンはミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの感染の自然な様式により良く似ているのでサブユニットワクチンよりも有利である。更に、免疫化のためには組換えキャリアを低量しか必要としないので自己増殖も有利である。

30

【 0 0 9 8 】

ワクチンは、本発明のタンパク質またはその免疫原性断片を含む上記した宿主細胞をベースとし得る。

【 0 0 9 9 】

本発明のワクチンは、例えば死滅全細菌ワクチン及び生弱毒化ワクチンに比して更に有利である。全細胞をベースとするワクチンはすべての抗原決定基、すなわち細菌上に存在するすべてのエピトープに対する抗体を誘導する。従って、前記ワクチンに対して生ずる抗体パネルはフィールド感染後生ずる抗体パネルに匹敵する。その結果、動物が感染しているのかワクチン接種されたかを区別することは不可能である。ワクチン成分として本発明のタンパク質またはその免疫原性断片、すなわち全細菌のサブユニットを使用すると、ワクチン接種された動物のみが投与したサブユニットに対する抗体を生ずるという利点がある。疑われる動物の抗体パネルをワクチン接種した動物及びフィールド感染動物の抗体パネルと比較さえすれば、その動物がフィールド感染しているかまたはワクチン接種されているかが分かる。以下に詳細に説明する検査のために、簡単なELISA検査が十分である。1つ以上のサブユニットをベースとするワクチンはマーカーワクチンとして公知で

40

50

ある。これらのワクチンはフィールド感染を区別し得る点でマークされる。マーカーワクチンの概念を以下に詳細に検討する。

【0100】

非常に魅力的なマーカーワクチンは配列番号6に示す配列を有する9kDタンパク質またはその免疫原性断片をベースとするワクチンである。その理由は、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する抗体とミコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)に対する抗体との交差反応性が比較的高レベルであるからである。ミコバクテリウム・ボビスはウシ結核の原因菌である。この細菌に他の動物種も感染させる。更に、この病気は人畜共通性感染症であり、ヒトに伝染し得る。世界保健機構(WHO)は1990~1999年のヒト型結核菌(TB)の罹患者及び死亡者はそれぞれ8800万人及び3000万人であり、多くは発展途上国の症例である。(ミコバクテリウム・ボビスにより生ずる)人畜共通性感染TBは、サーベイランス及び管理活動がしばしば不十分であったりまたはないので、感染の多くの疫学及び公衆衛生がかなり未知のままである多くの発展途上国の動物に存在する。

10

【0101】

ミコバクテリウム・ボビスが他の動物に接触伝染性であることがミコバクテリウム・ボビスの根絶が試みられている理由の1つである。この目的を達成するのに必要な手段の1つはウシPPD-DTH検査のような診断検査でミコバクテリウム・ボビス陽性であると判明したウシを根絶することである。上記したように、感染の原因に関係なくミコバクテリウム・ボビスとミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する血清の交差反応性のために本試験で陽性と判明した動物が根絶される。

20

【0102】

よって、本発明のサブユニットワクチンによるワクチン接種とミコバクテリウム・ボビスまたはミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスのいずれかによるフィールド感染を明確に区別し得る診断検査は非常に貴重なツールであろう。

【0103】

本発明の作用効果の1つは、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質がPPD検査でミコバクテリウム・ボビスと交差反応を示さないことが判明したことである。配列番号6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質が上記タンパク質に属する。

30

【0104】

従って、この実施態様の好ましい形態は配列番号6に示すタンパク質またはその免疫原性断片を含むワクチンに関する。

【0105】

上記したマーカー目的のために使用し得る特性を必須としないワクチンを望むならば、本発明の他のタンパク質、または65kDまたは70kD熱ショックタンパク質またはその免疫原性断片を添加することが有利である。前記配合ワクチンにより、単一ワクチンに比してワクチンの効果が高められる。より好ましい実施態様では、本発明のワクチンは9kDタンパク質及び1つ以上の本発明の他のタンパク質、または熱ショックタンパク質またはその免疫原性断片を含む。

40

【0106】

上記したワクチンはすべて能動的ワクチン接種に寄与し、すなわち宿主の防御系をトリガーする。或いは、抗体は例えば家兎において生じ得るか、または下記する抗体産生細胞株から得ることができる。その後、前記抗体はワクチン接種/防御しようとする哺乳動物に対して投与され得る。このワクチン接種方法の受動的ワクチン接種は哺乳動物が既に感染しているときに選択されるワクチン接種であり、自然免疫応答をトリガーするのに時間を要しない。突然高感染圧や免疫低下者になりがちな哺乳動物にワクチン接種するための好ましい方法でもある。この場合投与された本発明のタンパク質またはその免疫原性断片に対する抗体はミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスと干渉することがある。このアプローチはミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス発生を低

50

下または停止する点で有利である。よって、本発明のこの実施態様の他の形態は、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片に対する抗体に加えて医薬的に許容され得る担体を含むミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシ感染を撲滅するためのワクチンに関する。

【0107】

本発明の更に別の実施態様は、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質または前記タンパク質の免疫原性断片に対する抗体に関する。

【0108】

本発明の抗体を大規模に作成する方法も当業界で公知である。前記方法は、ファージディスプレイのために糸状菌における本発明のタンパク質をコードする遺伝情報(の断片)のクローン化を利用している。この技術は、<http://aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html>で“糸状菌ファージディスプレイ”の欄の“抗体エンジニアリングファージ”、及びR. Corteseら, Trends Biotech., 12:262-267(1994); T. Clackson及びJ. A. Wells, Trends Biotechnol., 12:173-183(1994); J. D. Marks, J. Biol. Chem., 267:16007-16010(1992); G. Winterら, Annu. Rev. Immunol., 12:433-455(1994)及びM. Littleら, Biotech. Adv., 12:539-555(1994)の文献に記載されている。前記ファージはその後ラクダ重鎖抗体を発現するラクダ発現ライブラリーをスクリーニングするために使用される(S. Muyldermans及びM. Lauwereys, Journ. Molec. Recogn., 12:131-140(1999)及びM. A. Ghahroudiら, FEBS Letters, 414:512-526(1997))。所望抗体を発現するライブラリーからの細胞は複製され得、その後抗体の大規模発現のために使用され得る。

【0109】

更に別の実施態様は、本発明の抗体及び医薬的に許容され得る担体を混合することを含む本発明のワクチンの作成方法に関する。

【0110】

ワクチン接種の別の効率的な方法は当該抗原をコードするDNAを直接ワクチン接種することである。タンパク質をコードするDNAを用いる直接ワクチン接種は多種類のタンパク質で成功している。例えば、Donnellyら, The Immunologist, 2:20-26(1993)を参照されたい。より具体的には、DNAワクチン接種によるミコバクテリウム・アビウムに対する防御はM. Valaz-Fairclothら, Infect. & Immun., 67:4243-4250(1999)に記載されている。このワクチン接種方法はミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質感染に対してウシをワクチン接種するために非常に魅力的である。よって、本発明のこの実施態様の他の形態は、医薬的に許容され得る担体と共に本発明のタンパク質またはその免疫原性断片をコードする核酸配列を含むワクチン、前記核酸配列を含むDNA断片を含むワクチンまたは本発明の組換えDNA分子を含むワクチンに関する。好ましくは、9kDタンパク質またはその免疫原性断片をコードし、配列番号5に記載されている核酸配列は上記した理由でワクチン接種のために使用される。より好ましくは、前記配列が上記した本発明の別のタンパク質またはその免疫原性断片をコードする配列と組み合わせられる。

【0111】

本発明のDNAワクチン中に使用するのに適したDNAプラスミドの例は細菌、真核及び酵母宿主細胞のための慣用のクローニングプラスミドまたは発現プラスミドであり、前記プラスミドの多くが市販されている。前記プラスミドの公知例はpBR322及びpcDNA3(Invitrogen)である。本発明のDNA断片または組換えDNA分子はヌクレオチド配列のタンパク質発現を誘導し得なければならない。DNA断片または組

換えDNA分子は1つ以上の本発明のヌクレオチド配列を含み得る。更に、DNA断片または組換えDNA分子は他のヌクレオチド配列、例えば非メチル化CpGジヌクレオチドを有する免疫刺激オリゴヌクレオチドまたは他の抗原性タンパク質または補助サイトカインをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【0112】

本発明のワクチン中に使用される本発明のヌクレオチド配列または本発明のヌクレオチド配列を含むDNAプラスミドは好ましくは転写調節配列に作動的にリンクさせて、裸のまままたはデリバリーシステムに封入され得る。

【0113】

好適なデリバリーシステムは脂質ベシクル、イスコム(iscom)、デンドロマー、ニオソム、微粒子(特にキトサンベースの微粒子)、多糖類マトリックス等であり、これらは以下に記載するように当業界で公知である。サルモネラ種のような弱毒化生細菌及び上記したヘルペスウイルスベクターのような弱毒化生ウイルスもデリバリーシステムとして非常に好適である。

10

【0114】

この実施態様の別の形態は本発明の組換えDNA分子を含むワクチンに関する。

【0115】

DNAワクチンは、例えば無針注射器を用いるような皮内投与により容易に投与され得る。この投与方法により、DNAがワクチン接種しようとする動物の細胞に直接デリバリーされる。10pg~1000µgの範囲のDNAの量でよい結果が得られる。特にDNAが自己増殖性の場合少量で十分である。好ましくは、微生物中1~100µgの量が使用される。

20

【0116】

更なる実施態様において、本発明のワクチンは更に1つ以上のウシ病原性生物及びウイルス由来の抗原、前記抗原に対する抗体またはその抗原をコードする遺伝情報及び/または医薬用成分、例えば抗生物質をも含む。勿論、前記した抗原、抗原に対する抗体または遺伝情報はミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス起源を持ち、例えば別のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス抗原であり得る。別のウシ病原性生物またはウイルスから選択される抗原、抗体または遺伝情報であってもよい。前記生物及びウイルスをウシヘルペスウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス、パラインフルエンザ3型ウイルス、ウシパラミクソウイルス、口蹄疫ウイルス、パスツレラ・ヘモリチカ、ウシ呼吸器合胞ウイルス、タイレリア種、バベシア種、トリパノソーマ種、アナプラズマ種、ネオスポラ・カニヌム(Neospora caninum)、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・アガラクチエ、マイコプラズマ、大腸菌、エンテロバクター、クレブシエラ、シトロバクター及びストレプトコッカス・ダイスガラクチエ(Streptococcus dysgalactiae)からなる群から選択することが好ましい。

30

【0117】

上記したように、本発明の1つ以上のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をベースとするワクチンはマーカーワクチンとしても非常に好適である。マーカーワクチンは、ワクチン接種哺乳動物と圃場感染哺乳動物を例えば野生型感染により誘導される抗体パネルと異なる特徴的な抗体パネルに基づいて区別できるワクチンである。異なる抗体パネルは、例えば野生型ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス上に存在する免疫原性タンパク質がワクチン中に存在していないときに誘導される。その場合、宿主はワクチン接種後前記タンパク質に対する抗体を産生しない。よって、本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質をベースとするワクチンは特定タンパク質に対する抗体しか誘導しないのに対して、野生型、生弱毒化または不活化全ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスをベースとするワクチンはすべてまたは殆どのタンパク質に対する抗体を誘導する。

40

【0118】

本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質を除く他の

50

ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質を含むウェル及び1つ以上の本発明の精製ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質のみを含むウェルを有する簡単なELISA検査は、ウシ由来の血清を検査し、そのウシが本発明のタンパク質ワクチンをワクチン接種したのかまたはミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスフィールド感染しているかを区別するのに十分である。

【0119】

本発明のワクチンはすべて医薬的に許容され得る担体を含む。医薬的に許容され得る担体の例は滅菌水または滅菌生理的塩類溶液であり得る。より複雑な形態では、担体は例えば緩衝液であり得る。

【0120】

ワクチンの作成方法は、本発明のタンパク質またはその免疫原性断片及び/または前記タンパク質またはその免疫原性断片に対する抗体及び/または核酸配列及び/または本発明のDNA断片、組換えDNA分子、生組換えキャリアまたは宿主と医薬的に許容され得る担体を混合することを含む。

【0121】

本発明のワクチンは、好ましくは免疫刺激物質、所謂アジュバントをも含む。一般的にアジュバントは宿主の免疫応答を非特異的にブーストする物質からなる。多数のアジュバントが当業界で公知である。ウシワクチン中に頻繁に使用されているアジュバントの例はムラミルジペプチド、リポポリサッカライド、数種のグルカン及びグリカン、Carbopol (登録商標) (ホモポリマー) である。前記ワクチンは所謂ベヒクルをも含み得る。ベヒクルは共有結合以外でタンパク質に結合する化合物である。前記ベヒクルはいずれも当業界で公知のバイオマイクロカプセル、マイクロアルギネート、リポソームまたはマクロゾルである。マイクロ粒子、特にキトサンを主成分とするマイクロ粒子が特に経口ワクチン接種に使用する場合ワクチンベヒクルとして非常に好適である。

【0122】

抗原を部分的に埋め込む特定形態のベヒクルはいわゆるISCOM (欧州特許出願公開第109,942号明細書、同第180,564号明細書、同第242,380号明細書) である。加えて、ワクチンは1つ以上の好適な界面活性剤または乳化剤、例えばSpanまたはTweenを含み得る。

【0123】

好ましくは、抗原は容易に入手し得且つ家畜及び/またはヒトへの使用のために登録されているアジュバンド、例えば水酸化アルミニウム、Th2様調節アジュバントと併用される。

【0124】

防御を改善するためにプラスミドの内部または外部にGpGオリゴヌクレオチド配列を付加することも好ましい。

【0125】

多くの場合、ワクチンは例えば分解傾向タンパク質を分解から保護するため、ワクチンの寿命を延長させるため、または凍結乾燥効率を高めるために安定剤と混合されている。有用な安定剤は、例えばSPGA (Bovar nikら, J. Bacteriology, 59:509 (1950)); 炭水化物、例えばソルビトール、マンニトール、トレハロース、スターチ、スクロース、デキストランまたはグルコース; タンパク質、例えばアルブミンまたはカゼイン、またはその分解産物; 及び緩衝液、例えばアルカリ金属リン酸塩である。また、ワクチンは生理学的に許容され得る希釈剤中に懸濁され得る。言うまでもなく、アジュバンドを添加したり、ベヒクル化合物または希釈剤を添加したり、タンパク質を乳化または安定化させる他の方法も本発明に包含される。

【0126】

本発明のタンパク質またはその免疫原性断片をベースとする本発明のワクチンは非常に好適には1~100µg - タンパク質/動物の量で投与され得るが、原則としてより少量も使用可能である。100µg以上の用量は免疫学的に非常に好適であるが、商業的には

10

20

30

40

50

余り魅力的でない。

【0127】

生弱毒化組換えキャリア、例えば上記したLRC-ウイルス、寄生虫及び細菌をベースとするワクチンは感染中に自己増殖するので非常に低量で投与され得る。よって、細菌及びウイルスに対する非常に好適な量は $10^3 \sim 10^9$ CFU/PFUである。

【0128】

本発明のワクチンは、例えば皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、または粘膜表面に（例えば、口腔または鼻内に）投与され得る。

【0129】

病気を効果的に防御するためには、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を迅速且つ正しく診断することが重要である。よって、本発明の別の目的はミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染を検出するのに適した診断ツールを提供することである。 10

【0130】

本発明の核酸配列、タンパク質及び抗体も診断薬中に使用するのに適している。従って、本発明の別の実施態様は、診断薬中に使用するための本発明の核酸配列、タンパク質及び抗体に関する。

【0131】

本発明の核酸配列またはその断片はウシにおけるミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの存在を検出するために使用され得る。ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに感染した哺乳動物から採取されるサンプルは本発明のタンパク質をコードする核酸配列を含めた前記細菌に由来する核酸物質を含む。前記核酸配列は本発明の核酸配列とハイブリダイズする。本発明の核酸配列と反応性の核酸配列を検出するのに好適な方法にはハイブリダイゼーション技術が含まれ、この中にはPCR技術及びNASBA技術が含まれるが、これらに限定されない。よって、本発明の核酸配列はPCR及び/またはNASBA技術に使用するためのプローブ及びプライマーを作成するために使用され得る。 20

【0132】

ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの検出用診断検査キットは、例えば検査しようとするウシから単離したミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスを前記ツールと反応させることができるツールを含み得る。前記ツールは、例えば本発明の核酸配列をベースとする特定プローブまたは（PCR-）プライマー（プライマー断片とも称される）である。ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの遺伝情報が動物中に存在しているならば、この情報は例えば特定PCR-プライマーに特異的に結合し、例えばcDNA合成後PCR反応で増幅されるようになるであろう。その後、PCR反応産物はDNAゲル電気泳動で容易に検出され得る。一般的なPCR教書に、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスDNAとの選択的PCR反応のためのプライマーの長さを決定する方法が記載されている。少なくとも12ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有するプライマー断片が多くの場合に使用されているが、15以上のヌクレオチド、好ましくは18ヌクレオチドのプライマーがある程度より選択的である。特に、少なくとも20ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの長さを有するプライマーは非常に一般的に適用され得る。PCR技術はDieffenbach及びDreksler, 「PCRプライマー、実験マニュアル(PCR primers, a laboratory manual)」, ISBN 0-87969-447-5 (1995) に包括的に記載されている。 30 40

【0133】

少なくとも12、好ましくは15、より好ましくは18、更には好ましくは好ましい順に20、22、25、30、35または40ヌクレオチドの長さを有する本発明の核酸配列または前記核酸配列のプライマーであって、前記核酸配列またはその一部が配列番号1、3、5、7、9、11、13、15または17に示す核酸配列と少なくとも70%相同 50

性を有するものも本発明の一部である。前記プライマーは、少なくとも12ヌクレオチドの長さを有し且つ配列番号1、3、5、7、9、11、13、15または17に示す核酸配列と少なくとも70%、より好ましくは80%、85%、90%、95%、98%、99%、更には100%の相同性を有すると解される。前記核酸配列は、該配列がコードするDNAの量を高めるためにPCR反応またはハイブリダイゼーション反応においてプライマー断片として使用され得る。これにより、診断ツール、例えば上記したミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスを検出するための診断ツールとして使用するための特定核酸配列のプロットを迅速に増幅または検出することができる。

【0134】

遺伝材料に関する別の検査は、例えば唾液から得た後、典型的DNA精製にかけ、放射能または色素標識プライマー断片を用いる典型的なハイブリダイゼーションにかけたミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス材料に基づいている。色標識及び放射能標識した断片は通常検出手段と称される。PCR反応及びハイブリダイゼーション反応はいずれも当業界で公知であり、例えばManiatis/Sambrook(J.Sambrookら、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular cloning: a laboratory manual)」, ISBN 0-87969-306-6)に記載されている。

10

【0135】

従って、本発明の1実施態様は、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス核酸配列を検出するための診断検査キットに関する。前記検査キットは本発明の核酸配列またはそのプライマー断片を含む。

20

【0136】

本発明の特定ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質の抗原物質の検出に基づき、よってミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染の検出に適した診断検査キットは、例えば一般的なELISA検査を含み得る。前記検査の1例では、ELISAプレートのウェルの壁を本発明のタンパク質に対する抗体で被覆する。試験しようとする材料とインキュベート後、標識した抗-ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス抗体をウェルに添加する。その後、発色反応により、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス由来の抗原材料の存在が示される。

【0137】

従って、本発明の更に別の実施態様は、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの抗原材料を検出するための診断検査キットに関する。この検査キットは本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体を含む。

30

【0138】

本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質の血清中の検出に基づく、よってミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス感染の検出に適した診断検査キットは、例えば一般的なELISA検査を含み得る。前記検査では、ELISAプレートのウェルの壁を本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質タンパク質で被覆してもよい。試験しようとする材料とインキュベート後、前記タンパク質に対する標識抗体をウェルに添加する。その後、発色反応しなければ、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する抗体の存在が示される。

40

【0139】

従って、本発明の更に別の実施態様は、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する抗体を検出するための診断検査キットに関する。前記検査キットは本発明のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質またはその断片を含む。

【0140】

イムノアッセイの設計は変更し得る。例えば、イムノアッセイは競合または直接反応に基づき得る。更に、プロトコルは固体支持体を使用しても、または多孔性材料を使用してもよい。抗体-抗原複合体の検出は標識抗体の使用を含み得る。標識の例は酵素、蛍光分

50

子、化学蛍光分子、放射活性分子または染料分子であり得る。サンプル中の本発明のタンパク質と反応性の抗体を検出するための適当な方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、イムノフルオレッセンス検査 (IFT) 及びウェスタンブロット分析が含まれる。

【0141】

例えば上記したように発現される本発明のタンパク質またはその免疫原性断片は、ポリクローナル、単特異的またモノクローナル抗体またはその誘導体であり得る抗体を作成するために使用され得る。ポリクローナル抗体を所望するときには、ポリクローナル血清を産生及び加工するための技術は当業界で公知である (例えば、Mayer 及び Walter 編, 「細胞及び分子生物学における免疫化学的方法 (Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology)」, ロンドンに所在の Academic Press (1987年) 発行)。本発明のタンパク質または本発明のその免疫原性断片に反応性のモノクローナル抗体は当業界で公知の方法 (Kohler 及び Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975)) により近交系マウスを免疫化することにより作成され得る。

10

【0142】

ミコバクテリウム・アビウム亜種アビウムがミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスと非常に高い相同性を有していることが判明した。ミコバクテリウム・アビウム亜種アビウムはかなり高い頻度でブタで見られ、更に高い頻度でヒト、特に HIV 陽性のような免疫欠乏ヒトでみられる。

20

【0143】

従って、上記した本発明のタンパク質はブタ及びヒトの両方においてミコバクテリウム・アビウム亜種アビウムに対するワクチン接種目的及びブタ及びヒトにおいて診断目的で同様に使用され得る。

【実施例 1】

【0144】

発現ライブラリーのスクリーニング

診断薬、治療薬及びワクチン中に使用するためのミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス中の抗原を同定し、特徴づけるために、ゲノム発現ライブラリーを Triple Ex 発現ベクターを用いて Clontech マニュアル (pT3003-1) 及び Stratagene Gigapack III Gold Packaging マニュアルに従って構築した。簡単に説明すると、ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス株 316F から単離した細菌ゲノム DNA を Tsp509I で部分消化し、スクロース勾配遠心により得た 2.5 キロベース対の平均サイズの断片を EcoRI 消化した脱リン酸化 Triple Ex アームに連結させた。パッケージング反応を Gigapack III Gold Packaging Extract 及び宿主株大腸菌 XL1 Blue (Clontech (S0924)) を用いて実施した。ライブラリーを平板培養後、約 10^6 フェージブランクの免疫スクリーニングを 1) ポジティブウシ血清 (3869 と呼ぶ) 及び 2) 特異的抗 - ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスモノクローナル抗体を用いて実施した。この結果、125 個のポジティブ Triple Ex 組換え体を選択された。これらの 125 個のポジティブフェージ組換え体のうち 117 個が Clontech マニュアル (PT3003-1) に記載されているプロトコルを用いてプラスミド (pTriple Ex) 組換え体にうまく変換された。

30

40

【0145】

117 個の pTriple Ex 組換え体の DNA 配列決定により、これらの組換え体はそれぞれ異なる抗原性タンパク質またはその断片を発現する複数の抗原グループに分類される。配列番号 2、4 及び 6 は血清 3869 を用いて単離した組換え体中に認められ、配列番号 8 は FabG4 に対するモノクローナル抗体を用いて単離した組換え体中に認められ、配列番号 10、12、14、16 及び 18 は 5 個のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの抗原分子に対する 5 個のモノクローナル抗体 (13.67.1A、

50

10.65.3B、13.67.2A、10.32.3B及び10.66.4B)を用いて単離した組換え体中に認められた。ミコバクテリアゲノム情報を含む各種データベースに対するBlast検索により、更に複数の抗原性ポリペプチド及びそのコード化遺伝子が特徴付けられた。配列番号19及び21中に認められ、記載されているhsp65及びhsp70熱ショックタンパク質抗原を除いて、上記した抗原断片はいずれもミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスに対する上記した既知の抗原の中でミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス関連抗原またはその形態として同定されなかった。

【実施例2】

【0146】

関連タンパク質を同定するためのプロテオミクスアプローチ

a) サンプル作成

ワトソン・リード培地中のミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス316Fの培養物から遠心により細胞を収集した。細胞ペレットをPBS(PBS 40ml中10gのペレット)で1回洗浄し、-80で5mlずつ保存した。融解後、各サンプルを冷(4)PBS(100ml)で2回洗浄し、冷PBS(5ml)中に懸濁した。プロテイナーゼ阻害剤(ペプスタチン 12.5ug、ロイペプチン 25ug、Pefabloc(商品名)SC 125ug、アプロチニン 5ug)を添加し、懸濁液を氷上Branson音波装置250を用い、100%出力及び50%間隔で10分間音波処理した。その後Ureum(9M)、DTT(70mM)及びトリトンX-100(2%)を添加し、溶液を時々振とうさせながら室温において30分間保持した。その後、懸濁液を16において5,000gで15分間、16において100,000gで30分間遠心した。次いで、生じたサンプルをPlusOne-2-Dクリーンアップキット(Amersham Biosciences)を用いて製造業者のプロトコルに従って処理して、微量の塩、多糖類、核酸及び脂質を除去した。サンプルのタンパク質濃度をRCDCプロテインアッセイ(Bio-Rad Laboratories)を用いて測定し、サンプルを2D-PAGEまで-80で保存した。通常、2D-PAGEの後に銀染色または免疫ブロッティングを実施するときには約100ugのタンパク質サンプルを用い、2D-PAGEの後にクーマシーブリリアントブルー染色を実施するときには最高1500ugのタンパク質サンプルを用いた。

【0147】

b) 2D-PAGE

等電点電気泳動(IEF)をEttan IPGphor等電点電気泳動システム(Amersham Biosciences)において製造業者のプロトコルに従ってセラミック製ストリップホルダーを用いてIPGphorストリップ及びIEFを再水和して実施した。典型的には、1.4mg DTT及び0.5% ul IPG緩衝液を含有する再水和緩衝液中にタンパク質サンプル(450ul)を添加した後20においてインキュベーションO/Nを実施することにより24cmストリップを再水和し、タンパク質負荷した。その後、IEFを製造業者の指示に従って実施した。IEF後、ストリップを二次元PAGEまで-20において保存し得る。二次元PAGEのために、140mg DTTを含有する平衡緩衝液(14ml)中室温において15分間振とうした後、350mg ヨードアセタミドを含有する平衡緩衝液(15ml)中室温において15分間振とうすることによりストリップを平衡化した。次いで、ストリップをカソード緩衝液中に短時間浸した後二次元PAGEにかけた。電気泳動はEttan Dalttwelve大型フォーマット垂直システムを製造業者(Amersham Biosciences)の指示に従って用い、12.5% Ettan Dalt IIGel(26x20cm、厚さ1mm)中で実施した。銀染色のために、ゲルを40% エタノール、10% 酢酸溶液中で固定し、プラスワン銀染色キット(Amersham Biosciences)を用いて染色した。クーマシーブリリアントブルー染色のために、ゲルをPhast Gel Blue R(Amersham Biosciences)を製造業者の指示

10

20

30

40

50

に従って用いて染色した。免疫ブロッティングのために、タンパク質を *Trans-Blot SD* 半ドライ電気泳動移動セル (Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell) (Bio-Rad Laboratories) を製造業者の指示に従って用いてニトロセルロース (Nitrocellulose BA85; Schleicher and Schuell) に移した。タンパク質スポットのモノクローナルまたはポリクローナル抗体による認識は、5% スキムミルク、ホースラディッシュペルオキシラーゼにコンジュゲートした家兎抗 - マウスまたは抗 - ウシ抗体、並びに基質としてペルオキシド、TMB 及び DONS を含む PBS 緩衝液を用いて一般的プロトコルを用いて実施した。

【0148】

結果：

図1に示すように、このアプローチにより2つの免疫学的に高度に関連するタンパク質を検出できた。1つのタンパク質は5.60~6.15のPIを有する60kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質である。これは図1B及びDにおいて約5個の水平列として目に見える。他のタンパク質は4.20~4.75のPIを有する33kDミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスタンパク質である。これは図1A及びDにおいて約3個の水平列として目に見える。

【実施例3】

【0149】

14kDタンパク質、9kDタンパク質、Hsp70及びHsp65のワクチン接種または感染ヤギ由来のT細胞による認識

実験的にミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスを感染させたヤギ由来の末梢血におけるT細胞の刺激をウシ - インターフェロン試験 (BOVIGAM; オーストラリア国ビクトリア、パークビルに所在のCSL Laboratories) を製造業者のプロトコルに従って用いて検出した。以下の抗原を全血 (1.5ml) に添加した：組換え精製14kDタンパク質、9kDタンパク質、Hsp70及びHsp65 (0.5及び5ug)、並びにミコバクテリウム・ボビス株AN5 (オランダ国のID-Lelystadが産生)、ミコバクテリウム・アビウム亜種アビウム株D4 (オランダ国のID-Lelystadが産生) 及びミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス株3+5/C (オランダ国のID-Lelystadが産生) から誘導される3種のPPD (3ug)。前記抗原のそれぞれについて、約2年前に1mlのミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス株DSU No. 405650 ($OD_{660} = 0.059$) を12回 (4週間にわたり、毎週月曜日、水曜日及び金曜日) 経口感染させた9匹のヤギからのサンプルを隔週用いて連続3回試験した。これらの動物のうち5匹 (188~193) に対して感染の4週間前に弱毒化ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス株316F (オランダ国のID-Lelystadが産生) をベースとする実験的に死滅させたワクチン0.5mlをワクチン接種した。0.1 (バックグラウンド値を補正した) の吸光度値及びバックグラウンド値の2倍は、抗原の存在のために高い - インターフェロン産生を示すと見做された。

【0150】

結果：

試験したすべての組換え抗原が少なくとも1匹の動物において高い - インターフェロン産生を誘導した。このことは、これらの抗原がT細胞性免疫応答において役割を果たすことを示す。典型的な実験を表1に示す。9匹の動物のうち5匹 (56%) が9kD抗原に対して高い応答を示し、9匹の動物のうち3匹 (33%) が14kD抗原に対して高い応答を示し、9匹の動物のうち8匹 (90%) がhsp65に対して高い応答を示し、9匹の動物のうち3匹 (33%) がhsp70に対して高い応答を示した。

【0151】

10

20

30

40

【表 1】

表 1.

実験 5. 040901	188	189	190	191	193	194	195	196	198
AG									
ウシ PPD (3 ug)	1.778	1.089	0.426	1.167	0.475	0.174	0.162	0.054	0.701
トリ PPD (3 ug)	3.484	1.795	1.348	3.475	3.114	0.731	0.655	0.099	2.466
パラツベルククローシ PPD (3ug)	3.501	2.664	2.187	> 4	3.319	1.919	1.339	0.254	3.078
14 kD 0.5 ug	0.022	-0.017	0.102	-0.023	0.022	0.103	0.004	-0.008	0.392
14 kD 5 ug	0.018	0.023	0.175	-0.017	0.011	0.151	0.131	-0.002	0.333
9 kD 0.5 ug	0.103	0.424	0.213	0.006	0.149	0.409	0.025	0.036	0.022
9 kD 5 ug	0.139	1.169	0.262	0.009	0.065	1.712	0.243	0.045	0.107
47 kD 0.5 ug	-0.022	-0.020	-0.012	-0.040	-0.002	-0.007	-0.006	-0.007	-0.002
47 kD 5 ug	-0.006	0.001	-0.007	-0.041	-0.010	0.019	0.009	-0.005	-0.010
Hsp70 0.5 ug	0.092	-0.012	0.143	-0.006	-0.011	0.286	0.007	-0.010	0.070
Hsp70 5 ug	0.174	0.032	0.220	0.023	0.001	0.969	0.094	0.001	0.187
Hsp65 0.5 ug	0.633	0.945	0.390	0.105	0.111	0.247	0.456	-0.001	0.121
Hsp65 5 ug	1,069	0.949	0.925	0.188	0.357	1.086	0.599	0.049	0.213

10

20

【実施例 4】

【0152】

14 kD、9 kD、47 kD、70 kD 及び 65 kD タンパク質での子ウシの免疫化、
特異的抗体応答の検出及び D T H 反応性の検出

a) 免疫化

14 kD、9 kD、47 kD、70 kD 及び 65 kD タンパク質の免疫原性及びミコバクテリウム・ボビスから誘導した PPD に対する (交差性) D T H 応答を誘導する能力を評価するために、子ウシを以下のように免疫化した:

- 1) 弱毒化ミコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス 316 F (オランダ国の ID - L e l y s t a d が産生) をベースとする死滅全細胞ワクチン; 動物 4 匹、
- 2) W/O アジュバント中の精製組換え 14 kD タンパク質; 動物 4 匹、
- 3) W/O アジュバント中の精製組換え 9 kD タンパク質; 動物 4 匹、
- 4) W/O アジュバント中の精製組換え 47 kD タンパク質; 動物 4 匹、
- 5) W/O アジュバント中の精製組換え H s p 7 0 ; 動物 2 匹、
- 6) W/O アジュバント中の精製組換え H s p 6 5 ; 動物 2 匹、
- 7) W/O アジュバントのみ; 動物 3 匹。

30

0 日目及び 1 2 7 日目に下表に示す量の抗原を初回及び追加免疫接種した。

【0153】

【表 2】

抗原	初回 (ug)	追加 (ug)
14 kD	207	259
9 kD	156	236
47 kD	273	305
70 kD	348	342
65 kD	681	491

40

50

【 0 1 5 4 】

0日目(1ml)及び127日目(0.5ml)に実験ワクチンを用いて免疫化した。血清サンプルを52日目及び178日目に採取した。DTH試験を-56日目(免疫化前に動物のDTH状態を確認するために)、52日目及び178日目に実施した。

【 0 1 5 5 】

b) 血清中の抗体検出

各免疫群の1つの代表的動物からの血清サンプル中の総IgG抗体を標準SDS-PAGE及び免疫ブロッティングプロトコルを用いて検出することにより抗原の免疫原性及びそのPPD中の存在を確認した。前記プロトコルでは、レーンに精製組換え14kD、9kD、47kD、65kD及び70kDタンパク質(2.5ug)及び各種抽出物(ミコバクテリウム・ボビス株AN5から誘導した全細胞音波処理物及びPPD;ミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス株B854からの全細胞音波処理物;ミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス株3+5/Cから誘導したPPD)(2.5ug)を充填した。

10

【 0 1 5 6 】

結果:

すべての代表的な血清中の抗体が対応の組換え14、9、47、65及び70kDタンパク質を検出した(図2,パネルA-E,レーン1)。組換え14kDタンパク質に対する抗体はミコバクテリウム・ボビス及びミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス全細胞音波処理物およびPPDでは対応抗原を認識できなかった(図2,パネルA,レーン2-4)。組換え9kDタンパク質に対する抗体はミコバクテリウム・ボビス及びミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス全細胞音波処理物及びミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシスPPDでは対応抗原を認識したが、ミコバクテリウム・ボビスPPDでは対応タンパク質を認識しなかった(図2,パネルB,レーン2-4)。組換え47kDタンパク質に対する抗体はミコバクテリウム・ボビス及びミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス全細胞音波処理物では対応抗原を弱く認識したが、PPDでは対応バンドを認識しなかった(図2,パネルC,レーン2-4)。組換え65及び70kDタンパク質に対する抗体はミコバクテリウム・ボビス及びミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス全細胞音波処理物及びPPDで対応抗原を認識した(図2,パネルD及びE,レーン2-4)。

20

30

【 0 1 5 7 】

更に、抗原の免疫原性を血清サンプル中の全IgG抗体を標準ELISAプロトコルを用いて検出することにより確認した。前記プロトコルでは、ウェルを各種ミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス株(B854、5255、316F、3+5/C、Teps)またはミコバクテリウム・ボビス株AN5の各種抽出物(全細胞音波処理物、KCL抽出物、分泌タンパク質)(5ug)及び組換え精製14kD、9kD、47kD、70kD及び65kDタンパク質(5ug)で被覆した。任意に、OD=1.0で1/80以上の力価をポジティブ応答の指標と見做した。

【 0 1 5 8 】

結果:

初期及び追加免疫後14kD、9kD、47kD、70kD及び65kDタンパク質に対して強い特異的抗体応答が検出された(力価>640;表2及び3)。9kDタンパク質に対する特異的抗体力価が追加免疫化後検出された(力価160;表2及び3)。

40

【 0 1 5 9 】

【表 3】

表 2.

		OD=1.0での血清力価(52日目)										
		B85 4 For m Cell s	525 5 US O	3+5/ C Joh n.	316 F Exc r.	Tep s KC L	AN5 KC L	14 kD	9 kD	47 kD	Hsp 70	Hsp 65
Paratb	840	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	<5 0	5	40	<5
	643 1	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	<5 0	<5	40	10
	702 9	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	<5 0	<5	20	5
	929 3	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	5	<5	40	10
14 kD	595 5	10	20	<5	10	20	40	320	<5	<5	5	20
	700 2	<5	5	<5	<5	10	20	>64 0	<5	40	<5	10
	854 6	40	40	10	20	160	20	>64 0	<5	<5	5	10
	950 6	5	5	<5	10	40	40	>64 0	<5	<5	<5	20
9 kD	172 8	<5	5	<5	5	10	<5	<5	<5	<5	<5	10
	743 0	5	<5	<5	<5	40	10	<5	<5	5	10	10
	811 6	<5	80	5	5	10	5	<5	<5	<5	<5	<5
	878 3	20	80	20	20	40	40	<5	<5	5	5	10

10

20

30

47 kD	296 8	10	20	<5	<5	20	10	<5	<5	>64 0	5	5
	296 9	160	80	40	40	160	10	<5	<5	>64 0	5	10
	384 7	<5	5	<5	<5	10	<5	<5	<5	>64 0	5	5
	391 1	10	5	<5	5	10	5	10	<5	>64 0	5	10
Hsp70	702 0	20	10	10	5	80	10	5	<5	5	>64 0	<5
	704 9	10	20	20	10	20	5	<5	<5	10	>64 0	<5
Hsp65	310 5	10	10	10	5	40	40	<5	<5	20	10	>64 0
	950 5	5	40	20	5	40	80	<5	<5	<5	5	>64 0
アジュ バント	172 7	<5	<5	<5	<5	10	10	<5	<5	<5	<5	<5
	384 8	10	10	10	20	10	5	<5	<5	<5	<5	<5
	742 9											
なし	835 4	20	80	5	5	10	5	<5	<5	<5	<5	>5
	873 8	<5	20	<5	10	5	<5	<5	<5	<5	10	>5

10

20

30

【 0 1 6 0 】

【表 4】

表 3.

		OD=1. 0での血清力価(178日目)										
		B85 4 For m Cell s	525 5 US O	3+5/ C Joh n.	316 F Exc r.	C KC L	AN5 KC L	14 kD	9 kD	47k D	Hsp 70	Hsp 65
Paratb	840	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	5	5	10	320	20
	643 1	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<64 0	>64 0	<5	10	5	40	20
	702 9	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5	5	5	10	5
	929 3	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5	10	10	20	40
14 kD	595 5	20	80	<5	20	320	5	>64 0	5	20	10	40
	700 2	<5	20	<5	<5	320	<5	>64 0	10	10	<5	20
	854 6	10	80	5	20	80	10	>64 0	40	5	5	20
	950 6	5	40	<5	10	160	5	>64 0	20	10	10	20
9 kD	172 8	<5	10	<5	20	80	<5	10	<5	40	10	80
	743 0	<5	40	<5	5	80	20	5	160	20	<5	40
	811 6	<5	20	<5	<5	160	40	40	160	80	10	80
	878	40	80	20	80	320	10	10	160	10	5	40

10

20

30

	3											
47 kD	296 8	40	80	10	10	40	<5	10	<5	>64 0	20	40
	296 9	20	80	10	40	320	5	<5	<5	>64 0	5	20
	384 7	<5	80	<5	<5	80	<5	<5	<5	>64 0	10	10
	391 1	80	160	20	10	80	5	40	20	>64 0	10	40
Hsp70	702 0	>64 0	80	80	10	>64 0	40	<5	<5	20	>64 0	5
	704 9	>64 0	640	>64 0	10	>64 0	320	<5	<5	80	>64 0	10
Hsp65	310 5	320	80	160	20	80	40	10	20	40	40	>64 0
	950 5	>64 0	160	>64 0	20	80	80	80	320	160	80	>64 0
アジュ バント	172 7	<5	20	<5	<5	20	<5	5	<5	<5	<5	<5
	384 8	10	80	10	10	20	5	<5	<5	<5	<5	<5
	742 9	<5	20	<5	<5	40	10	<5	<5	<5	5	10
なし	835 4	<5	80	<5	<5	20	10	<5	<5	<5	<5	<5
	873 8	<5	20	<5	<5	80	<5	<5	<5	<5	<5	<5

10

20

30

【0161】

c) DTH反応性

遅延型過敏性(DTH)反応をEU-指示64/432(指示97/12及び98/46により補正)に従って実施した。簡単に説明すると、2000IEトリPPD、2000及び5000IEウシPPDを注射し、72時間後の皮膚厚さの増加を検出した。2mm以上増加したならばDTH応答がポジティブと見做す。全細胞死滅パラツベルクローシワクチン群では、ウシPPD反応性が初回及び追加免疫後4匹すべての動物で検出された(表4)。初回免疫後14kDタンパク質(1/4)及びHsp65(1/2)をワクチン接種した動物、及び追加免疫後47kDタンパク質(1/4)をワクチン接種した動物においてウシPPD反応性が検出された。ウシPPD反応性は9kDタンパク質及び70kDタンパク質で免疫化した群では検出されなかった(表4)。

40

【0162】

結果:

9kD及びHsp70タンパク質はDTH PPD試験で応答を与えない。感染に対す

50

る防御に寄与せず、更にDTH PPD試験でPPDと交差反応しないワクチンが必要な場合には、本発明の新規な9kDタンパク質が選択されるワクチン成分であり、Hsp70との組合せが好ましい。

【0163】

【表 5】

表 4. DTH反応性

		DTH (56日目)			DTH (52日目)				DTH (178日目)		
		A2 k	B2 K		A2 k	B2 k	B5 k		A2 K	B2 K	B5 K
Ptb	840	0	0		23	6	9		12	2	8
	643 1	0	0		25	15	23		6	3	5
	701 9	0	0		11	5	7		10	4	4
	929 3	0	0		17	8	11. 5		6	6	6
14 kD	595 5	0	0		0.5	1.0	0		0	0	0
	700 2	0	0		2.5	0	0		0	0	0
	854 6	0	0		1.5	0	4.5		0	0	0
	950 6	0	0		1.0	0	1.5		5	0	0
9 kD	172 8	0	0		0	0	0		0	0	0
	743 0	0	0		0	0	0		0	0	0
	811 6	0	0		0	0	0		0	0	0
	878 3	0	0		0	0	0		0	0	0

10

20

30

40

47 kD	296 8	0	0		0	0	0		0	0	0
	296 9	0	0		0	0	0		1	0	0
	384 7	0	0		0	0	0		0	0	0
	391 1	0	0		0	0	0		1	0	4
Hs p70	702 0	0	0		1.5	0	0		0	0	0
	704 9	0	0		0	0	0		0	0	0
Hs p65	310 5	0	0		10	0.5	6		2	0	0
	950 5	0	0		0	0	0		0	0	0
Adj u	172 7	0	0		0	0	0		0	0	0
	384 8	0	0		2.0	0.5	0		1	0	0
	742 9	0	0		0	0	0		0	0	0
なし	835 4	2.7	0		2.5	0	0		NT	NT	NT
	873 8	0	0		0	0	0		0	0	0

ADTH > 2 mmは太字で示す
 NT 試験せず、実験中動物を除去した

【図面の簡単な説明】

【0164】

10

20

30

40

50

【図1】1Aは2D-ゲルのウェスタンブロットにおいて4.20~4.75のPIを有し、約3スポットの水平列として目に見える33kDタンパク質の存在を示す。1Bは2D-ゲルのウェスタンブロットにおいて5.60~6.15のPIを有し、約5スポットの水平列として目に見える60kDタンパク質の存在を示す。1Cは33kDタンパク質及び60kDタンパク質の両方の特定スポットが目に見えるクーマシーブリリアントブルーで染色した2D-ゲルを示す。1Dは33kDタンパク質及び60kDタンパク質の両方の特定スポットが目に見える銀染色した2D-ゲルを示す。

【図2】組換え精製14kDタンパク質(パネルA)、組換え精製9kDタンパク質(パネルB)、組換え47kD(パネルC)、組換え精製70kDタンパク質(パネルD)及び組換え65kD(パネルE)で免疫化した動物からの血清サンプル(178日)の免疫ブロット。レーン1:14kD(A)、9kD(B)、47kD(C)、70kD(D)または65kD(E)の組換え精製タンパク質。レーン2:ミコバクテリウム・ボビス株AN5全細胞音波処理物。レーン3:ミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス株B854全細胞音波処理物。レーン4:ミコバクテリウム・アビウム・パラツベルクローシス株3+5/C誘導PPD。レーン5:ミコバクテリウム・ボビス株AN5誘導PPD。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ID-Lelystad, Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid B.V.

<120> Paramycobacterial diagnostics and vaccines

<130> XYZ

<160> 22

10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1175

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

20

<220>

<221> CDS

<222> (134)..(1144)

<223>

<400> 1

aattgcctca cgattcaata tcaccactct agtaatagga ttccactcgc taccatcgac 60

tgtgtgtgat tcctgccaga cagcatcggc gggggcgccc gacacaacac atagtcagat 120

agaggagact tcc gtg ccg aac cga cgc cga cgc aag ctt tcg aca gcc 169

Val Pro Asn Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ser Thr Ala

1 5 10

30

atg agc gcg gtc gcc gcc ctg gca gtg gcg agt cct tgc gca tac ttc 217

Met Ser Ala Val Ala Ala Leu Ala Val Ala Ser Pro Cys Ala Tyr Phe

15 20 25

ctt gtc tac gaa tcg acg gcc ggc aac aag gcg ccc gag cac cac gag 265

Leu Val Tyr Glu Ser Thr Ala Gly Asn Lys Ala Pro Glu His His Glu

30 35 40

ttc aag cag gcc gca gtg atg agc gat ctg ccg ggc gag ctg atg ggt 313

Phe Lys Gln Ala Ala Val Met Ser Asp Leu Pro Gly Glu Leu Met Gly

45 50 55 60

gcg ctg tcg cag ggc ctg tcg cag ttt ggg atc aac ctg ccc ccg gtg 361

Ala Leu Ser Gln Gly Leu Ser Gln Phe Gly Ile Asn Leu Pro Pro Val

65 70 75

40

ccc gcc ctg agc ggc ggc gcc acc agc act ccc ggt ctg gcc agc ccc 409
 Pro Ala Leu Ser Gly Gly Ala Thr Ser Thr Pro Gly Leu Ala Ser Pro
 80 85 90

ggc ctg ggt agc ccc ggc ctg ggc acg ccc ggc ctg gga acg ccg ggc 457
 Gly Leu Gly Ser Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly
 95 100 105

ctg acc aat ccc ggt ctg acg agc ccc ggt gcg acc agt ccc ggc ctg 505
 Leu Thr Asn Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Ala Thr Ser Pro Gly Leu
 110 115 120

acc agt ccc ggc ctg acc agt cct ggt ttg acc agc ccc ggt ctg acc 553
 Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr
 125 130 135 140

agc ccg ggt gcg gcg ccg acg acg ccc ggg ctc acc gcg ccc ggc gcg 601
 Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Thr Pro Gly Leu Thr Ala Pro Gly Ala
 145 150 155

ctg ccg acc acg ccg ggc ggc ggg gtc gcc acc ccc ggc gcc ggg ctc 649
 Leu Pro Thr Thr Pro Gly Gly Gly Val Ala Thr Pro Gly Ala Gly Leu
 160 165 170

aac ccc gcg ctg tcc aac ccc ggg ctg acc agc ccg gcc ggg acg gcg 697
 Asn Pro Ala Leu Ser Asn Pro Gly Leu Thr Ser Pro Ala Gly Thr Ala
 175 180 185

ccg ggg ctg gcc agc ccg acc gtg gcg ccg agt gag gtg ccg atc gac 745
 Pro Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val Ala Pro Ser Glu Val Pro Ile Asp
 190 195 200

tcc ggg gcc ggc ctg gac ccg ggc gcc ggt ggc acg tac ccg atc ctg 793
 Ser Gly Ala Gly Leu Asp Pro Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Pro Ile Leu
 205 210 215 220

ggc gac ccg tcg acc ttc ggt aac gcc tcg ccg atc ggc ggc ggt ggc 841
 Gly Asp Pro Ser Thr Phe Gly Asn Ala Ser Pro Ile Gly Gly Gly Gly
 225 230 235

acc ggt ctg gcc ggc ggc tcg agc tcg ggt ggc agc ggc ggc ctg gtc 889
 Thr Gly Leu Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Leu Val
 240 245 250

aac gac gtg atg caa gcc gcc aac cag ctc gcc gcg ggt cag gcg atc 937
 Asn Asp Val Met Gln Ala Ala Asn Gln Leu Gly Ala Gly Gln Ala Ile
 255 260 265

gac ctg ctc aag ggc ctg gtg atg ccg gcg atc acg cag ggc atg cac 985
 Asp Leu Leu Lys Gly Leu Val Met Pro Ala Ile Thr Gln Gly Met His
 270 275 280

ggc ggc gcg gcc gcg ggt gct ttg ccc ggc gcg gcc ggt gct ctg ccc 1033
 Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro
 285 290 295 300

ggc gcg gcc ggc gcc ctg ccc ggt gcg gcc ggc gcc ctg ccg ggt gcg 1081
 Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala
 305 310 315

gcg ggc gcc gcg ggt gcg ttg ccg gcg gcc gcc ggc gcc gcg ccg gca 1129
 Ala Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Ala
 320 325 330

ctg ccc ccg gtc tag accttttcca aaccatccac cagacggcac c 1175
 Leu Pro Pro Val
 335

10

20

30

40

<210> 2

<211> 336

<212> PRT

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<400> 2

Val Pro Asn Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ser Thr Ala Met Ser Ala Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Ala Val Ala Ser Pro Cys Ala Tyr Phe Leu Val Tyr Glu
 20 25 30

Ser Thr Ala Gly Asn Lys Ala Pro Glu His His Glu Phe Lys Gln Ala
 35 40 45

Ala Val Met Ser Asp Leu Pro Gly Glu Leu Met Gly Ala Leu Ser Gln
 50 55 60

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

Gly Gly Ala Thr Ser Thr Pro Gly Leu Ala Ser Pro Gly Leu Gly Ser
 85 90 95

Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly Leu Thr Asn Pro
 100 105 110

Gly Leu Thr Ser Pro Gly Ala Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly
 115 120 125

Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Ala
 130 135 140

Ala Pro Thr Thr Pro Gly Leu Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Thr Thr
 145 150 155 160

Pro Gly Gly Gly Val Ala Thr Pro Gly Ala Gly Leu Asn Pro Ala Leu
 165 170 175

Ser Asn Pro Gly Leu Thr Ser Pro Ala Gly Thr Ala Pro Gly Leu Gly
 180 185 190

Ser Pro Thr Val Ala Pro Ser Glu Val Pro Ile Asp Ser Gly Ala Gly
 195 200 205

Leu Asp Pro Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Pro Ile Leu Gly Asp Pro Ser
 210 215 220

10

20

30

40

Thr Phe Gly Asn Ala Ser Pro Ile Gly Gly Gly Gly Thr Gly Leu Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Leu Val Asn Asp Val Met
245 250 255

Gln Ala Ala Asn Gln Leu Gly Ala Gly Gln Ala Ile Asp Leu Leu Lys
260 265 270

Gly Leu Val Met Pro Ala Ile Thr Gln Gly Met His Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly
290 295 300

Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Ala
305 310 315 320

Gly Ala Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Ala Leu Pro Pro Val
325 330 335

<210> 3

<211> 600

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(567)

<223>

<400> 3
ttcgagaagg gatagcaggc ggggccgggc ggtgaaccgc ggaggcgcgc ggtgcgtctt 60

cagggc atg tcc cgt ttg tca ttt gtc tgc agg ctt ttg gcc gca acc 108
Met Ser Arg Leu Ser Phe Val Cys Arg Leu Leu Ala Ala Thr
1 5 10

gct ttc gcc gtc gcc ctg cta ctc ggg ctg ggc gac gtg ccg cgc gcg 156
Ala Phe Ala Val Ala Leu Leu Leu Gly Leu Gly Asp Val Pro Arg Ala
15 20 25 30

gcg gcc acc gac gac cgc ctg caa ttc acc gcg acc acg ctc agc ggc 204
Ala Ala Thr Asp Asp Arg Leu Gln Phe Thr Ala Thr Thr Leu Ser Gly
35 40 45

gcg ccg ttc aac ggc gcc agt ctg cag ggc aag ccc gcc gtg ctg tgg 252
Ala Pro Phe Asn Gly Ala Ser Leu Gln Gly Lys Pro Ala Val Leu Trp
50 55 60

10

20

30

40

ttc tgg acg ccg tgg tgc ccg tac tgc aac gcc gag gcc ccg ggc gtg 300
 Phe Trp Thr Pro Trp Cys Pro Tyr Cys Asn Ala Glu Ala Pro Gly Val
 65 70 75
 agc cgg gtg gcc gcc gcc aac ccg ggc gtc acc ttc gtc ggc gtc gcc 348
 Ser Arg Val Ala Ala Ala Asn Pro Gly Val Thr Phe Val Gly Val Ala
 80 85 90
 gcc cac tcc gaa gtc ggc gcc atg gcc aac ttc gtc tcc aag tac aac 396
 Ala His Ser Glu Val Gly Ala Met Ala Asn Phe Val Ser Lys Tyr Asn
 95 100 105 110
 ctg aac ttc acc acg ctc aac gac gcc gac ggc gcg atc tgg gcc cgc 444
 Leu Asn Phe Thr Thr Leu Asn Asp Ala Asp Gly Ala Ile Trp Ala Arg
 115 120 125
 tac ggc gtg ccc tgg cag ccc gcg tac gtg ttc tac cgg gcg gac gcc 492
 Tyr Gly Val Pro Trp Gln Pro Ala Tyr Val Phe Tyr Arg Ala Asp Gly
 130 135 140
 agc tcc acc ttc gtc aac aac ccc acc tcg gcg atg ccc cag gac gaa 540
 Ser Ser Thr Phe Val Asn Asn Pro Thr Ser Ala Met Pro Gln Asp Glu
 145 150 155
 ctg gcc gcc cgg gtg gcg gcg ctg cgc tgacgtggac cgcggtctgg 587
 Leu Ala Ala Arg Val Ala Ala Leu Arg
 160 165
 tcgggctggc ggt 600

<210> 4

<211> 167

<212> PRT

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<400> 4

Met Ser Arg Leu Ser Phe Val Cys Arg Leu Leu Ala Ala Thr Ala Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Leu Leu Leu Gly Leu Gly Asp Val Pro Arg Ala Ala Ala
20 25 30

Thr Asp Asp Arg Leu Gln Phe Thr Ala Thr Thr Leu Ser Gly Ala Pro
35 40 45

Phe Asn Gly Ala Ser Leu Gln Gly Lys Pro Ala Val Leu Trp Phe Trp
50 55 60

Thr Pro Trp Cys Pro Tyr Cys Asn Ala Glu Ala Pro Gly Val Ser Arg
65 70 75 80

Val Ala Ala Ala Asn Pro Gly Val Thr Phe Val Gly Val Ala Ala His
85 90 95

10

20

30

40

Ser Glu Val Gly Ala Met Ala Asn Phe Val Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 100 105 110

Phe Thr Thr Leu Asn Asp Ala Asp Gly Ala Ile Trp Ala Arg Tyr Gly
 115 120 125

Val Pro Trp Gln Pro Ala Tyr Val Phe Tyr Arg Ala Asp Gly Ser Ser
 130 135 140

Thr Phe Val Asn Asn Pro Thr Ser Ala Met Pro Gln Asp Glu Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Arg Val Ala Ala Leu Arg
 165

<210> 5

<211> 366

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> CDS

<222> (34)..(366)

<223>

<400> 5

tagcgggtgca ttgactgggg aaggtgtcca cac atg agy ctg tcg ttg agc aaa 54
 Met Arg Leu Ser Leu Ser Lys
 1 5

ttg ggc gtt gcg gtg gcc agc gcg gca gtg gca ttg acc gcc gcg gcc 102
 Leu Gly Val Ala Val Gly Ser Ala Ala Val Ala Leu Thr Ala Ala Ala
 10 15 20

ggt gtc gca tcc gcc gac ccc atg gac gcg atc atc aac acc acc tgc 150
 Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Met Asp Ala Ile Ile Asn Thr Thr Cys
 25 30 35

aac tac ggg cag gtg atc gcc gcg ctg aac gcg tcc gac ccg gcg gct 198
 Asn Tyr Gly Gln Val Ile Ala Ala Leu Asn Ala Ser Asp Pro Ala Ala
 40 45 50 55

gcc cag cag ctg aac tcg tcg ccg atg gcg cag tcc tac atc cag ccg 246
 Ala Gln Gln Leu Asn Ser Ser Pro Met Ala Gln Ser Tyr Ile Gln Arg
 60 65 70

ttc ctg gcc tcc ccg ccg gcg aag cgt cag cag atg gcc cag cag atc 294
 Phe Leu Ala Ser Pro Pro Ala Lys Arg Gln Gln Met Ala Gln Gln Ile
 75 80 85

cag gcc atg ccg gcc gcg cag cag tac atc aac gac atc aac cag gtc 342
 Gln Gly Met Pro Ala Ala Gln Gln Tyr Ile Asn Asp Ile Asn Gln Val
 90 95 100

10

20

30

40

gcg gtc acc tgt aac aac ttc tga
 Ala Val Thr Cys Asn Asn Phe
 105 110

366

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<400> 6

10

Met Arg Leu Ser Leu Ser Lys Leu Gly Val Ala Val Gly Ser Ala Ala
 1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Ala Ala Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Met Asp
 20 25 30

Ala Ile Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Ile Ala Ala Leu
 35 40 45

Asn Ala Ser Asp Pro Ala Ala Ala Gln Gln Leu Asn Ser Ser Pro Met
 50 55 60

Ala Gln Ser Tyr Ile Gln Arg Phe Leu Ala Ser Pro Pro Ala Lys Arg
 65 70 75 80

20

Gln Gln Met Ala Gln Gln Ile Gln Gly Met Pro Ala Ala Gln Gln Tyr
 85 90

Ile Asn Asp Ile Asn Gln Val Ala Val Thr Cys Asn Asn Phe
 100 105 110

<210> 7

<211> 1410

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

30

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(1410)

<223>

<400> 7

ctatagcat accccgacgc agaaacaaca cggaaggtag ctccg gtg gct ccg aag

57

40

Gly Thr Ala Leu Trp Leu Asp Val Thr Ala Pro Asp Ala Val Asp Lys		
265	270	275
atc acc gag cac ctg cgc gag cac cac ggc ggt cac gcc gac atc ctg	921	
Ile Thr Glu His Leu Arg Glu His His Gly Gly His Ala Asp Ile Leu		
280	285	290
gtc aac aac gcc ggg atc acc cgc gac aag ctg ctg gcc aac atg gac	969	
Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Lys Leu Leu Ala Asn Met Asp		
295	300	305
gac gcg cgc tgg gac gcc gtg ttg gcc gtg aat ctg ctt gcc cca ctt	1017	
Asp Ala Arg Trp Asp Ala Val Leu Ala Val Asn Leu Leu Ala Pro Leu		
310	315	320
cgc ctt acc gaa ggg ctg gtg ggc aac ggc agc atc ggc gaa ggc ggc	1065	
Arg Leu Thr Glu Gly Leu Val Gly Asn Gly Ser Ile Gly Glu Gly Gly		10
325	330	340
cgc atc gtc ggc ctt tcg tcg atg gcc ggc atc gcg ggc aac cgc ggc	1113	
Arg Ile Val Gly Leu Ser Ser Met Ala Gly Ile Ala Gly Asn Arg Gly		
345	350	355
cag acc aac tac gcc acc acc aag gca ggc atg atc ggc ctc acc cag	1161	
Gln Thr Asn Tyr Ala Thr Thr Lys Ala Gly Met Ile Gly Leu Thr Gln		
360	365	370
gcg ctg gcg ccg gag ctc tac gac aag ggc atc acc atc aac gcc gtc	1209	
Ala Leu Ala Pro Glu Leu Tyr Asp Lys Gly Ile Thr Ile Asn Ala Val		
375	380	385
gcg ccg gga ttc atc gag acc cag atg acg gcc gcc atc ccg ctg gcc	1257	
Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Gln Met Thr Ala Ala Ile Pro Leu Ala		20
390	395	400
acc cgc gag gtg ggg cgc cgg atg aac tcg ctg ctg cag ggc ggg cag	1305	
Thr Arg Glu Val Gly Arg Arg Met Asn Ser Leu Leu Gln Gly Gly Gln		
405	410	415
ccg gtg gac gtc gcc gaa acc atc gcc tac ttc gcc agc ccg gcg tcg	1353	
Pro Val Asp Val Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Phe Ala Ser Pro Ala Ser		
425	430	435
aac gcg gtg acc ggc aac gtc atc cgg gtc tgc ggc cag gcg atg ctg	1401	
Asn Ala Val Thr Gly Asn Val Ile Arg Val Cys Gly Gln Ala Met Leu		
440	445	450
ggg gca tga	1410	
Gly Ala		
		30
<210> 8		
<211> 454		
<212> PRT		
<213> mycobacterium avium paratuberculosis		
<400> 8		
val Ala Pro Lys Val Ser Ser Asp Leu Phe Ser Gln Ile Val Asn Ser		
1	5	10
		15
		40

Gly Pro Gly Ser Phe Leu Ala Lys Gln Leu Gly Val Pro Gln Pro Glu
 20 25 30
 Thr Leu Arg Arg Tyr Arg Pro Gly Asp Pro Pro Leu Ala Gly Ser Leu
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Glu Gly Arg Val Val Glu Pro Leu Arg Ala Ala Leu
 50 55 60
 Ala Lys Asp Tyr Asp Leu Val Gly Asn Asn Leu Gly Gly Arg Trp Ala
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Gly Gly Leu Val Phe Asp Ala Thr Gly Ile Thr Thr Pro
 85 90 95
 Glu Gly Leu Lys Gly Leu Tyr Glu Phe Phe Thr Pro Leu Leu Arg Asn
 100 105 110
 Leu Gly His Cys Ala Arg Val Val Val Val Gly Thr Thr Pro Asp Ala
 115 120 125
 Ala Ala Gly Pro His Glu Arg Ile Ala Gln Arg Ala Leu Glu Gly Phe
 130 135 140
 Thr Arg Ser Leu Gly Lys Glu Leu Arg Asn Gly Ser Thr Val Ala Leu
 145 150 155 160
 Val Tyr Leu Ser Pro Ala Ala Lys Pro Ala Ala Thr Gly Leu Glu Ser
 165 170 175
 Thr Met Arg Phe Ile Leu Ser Ala Lys Ser Ala Tyr Val Asp Gly Gln
 180 185 190
 Val Phe Tyr Val Gly Glu Ala Asp Ser Thr Pro Pro Ala Asp Trp Glu
 195 200 205
 Arg Pro Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Ala Ala Arg Gly
 210 215 220
 Ile Gly Ala Thr Ile Ala Glu Val Phe Ala Arg Asp Gly Ala Arg Val
 225 230 235 240
 Val Ala Ile Asp Val Glu Ser Ala Ala Glu Thr Leu Ala Glu Thr Ala
 245 250 255
 Ser Arg Val Gly Gly Thr Ala Leu Trp Leu Asp Val Thr Ala Pro Asp
 260 265 270
 Ala Val Asp Lys Ile Thr Glu His Leu Arg Glu His His Gly Gly His
 275 280 285

10

20

30

40

Ala Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Lys Leu Leu
 290 295 300

Ala Asn Met Asp Asp Ala Arg Trp Asp Ala Val Leu Ala Val Asn Leu
 305 310 315 320

Leu Ala Pro Leu Arg Leu Thr Glu Gly Leu Val Gly Asn Gly Ser Ile
 325 330 335

Gly Glu Gly Gly Arg Ile Val Gly Leu Ser Ser Met Ala Gly Ile Ala
 340 345 350

Gly Asn Arg Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Thr Thr Lys Ala Gly Met Ile
 355 360 365

Gly Leu Thr Gln Ala Leu Ala Pro Glu Leu Tyr Asp Lys Gly Ile Thr
 370 375 380

Ile Asn Ala Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Gln Met Thr Ala Ala
 385 390 395 400

Ile Pro Leu Ala Thr Arg Glu Val Gly Arg Arg Met Asn Ser Leu Leu
 405 410 415

Gln Gly Gly Gln Pro Val Asp Val Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Phe Ala
 420 425 430

Ser Pro Ala Ser Asn Ala Val Thr Gly Asn Val Ile Arg Val Cys Gly
 435 440 445

Gln Ala Met Leu Gly Ala
 450

<210> 9

<211> 625

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> misc_feature

<222> (592)..(592)

<223> "n"

<220>

<221> CDS

10

20

30

40

<222> (179)..(625)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (619)..(619)

<223> "n"

<400> 9

aattcgcgca taccgcgtcac tggtcacaac gccacatgct ggtaggctgt ggaatcgagg 60

gtcaatccgg atcggacccc aacgtcgact tgtggggcgc aattcgcggg ttttcgcca 120

gcaagtgcac gttcggcgcg aatcgggtgag gtgggcacag gtgaatgacg aagaggac 178

atg ctg gtc gcc acg gtg cgg cgg ttc atc gac cgc gag gtc aaa cgg 226
Met Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Phe Ile Asp Arg Glu Val Lys Pro
1 5 10 15

acc gtg cgc gag gtg gag cac gcc gat gcc tat ccc gag cgc tgg atc 274
Thr Val Arg Glu Val Glu His Ala Asp Ala Tyr Pro Glu Ala Trp Ile
20 25 30

gag cag atg aag cgg atc ggg atc tac ggg ctg cgc gtg ccc gag gaa 322
Glu Gln Met Lys Arg Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Ala Val Pro Glu Glu
35 40 45

tac ggt ggt tgc cgg gtg tcc atg cgg tgc tac gtg cgg gtc acc gag 370
Tyr Gly Gly Ser Pro Val Ser Met Pro Cys Tyr Val Arg Val Thr Glu
50 55 60

cag ctg cgc cgc ggc tgg atg agc ctg gcc ggg cgc atg gcc ggg cac 418
Gln Leu Ala Arg Gly Trp Met Ser Leu Ala Gly Ala Met Gly Gly His
65 70 75 80

acc gtg gtg gcc aag ctg cta acg ctg ttc ggc acc gag gac cas aag 466
Thr Val Val Ala Lys Leu Leu Thr Leu Phe Gly Thr Glu Asp Xaa Lys
85 90 95

cgg gcc tac ctg cgg atg gcc agc ggc gaa atc cgg gcc acc atg 514
Arg Ala Tyr Leu Pro Arg Met Ala Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Met
100 105 110

gcg ttg acc gag ccc sgc ggc ggc tgc gac ctg cag aac atg tgc acc 562
Ala Leu Thr Glu Pro Xaa Gly Gly Ser Asp Leu Gln Asn Met Ser Thr
115 120 125

acc ggc ctg ccc gac ccc gac tcc gac ggn ctg gtg gtc aac ggg gcc 610
Thr Ala Leu Pro Asp Pro Asp Ser Asp Gly Leu Val Val Asn Gly Ala
130 135 140

aag acc tgn atc aac 625
Lys Thr Xaa Ile Asn
145

<210> 10

<211> 149

10

20

30

40

<212> PRT

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> misc_feature

<222> (95)..(95)

<223> The 'Xaa' at location 95 stands for Gln, or His.

<220>

<221> misc_feature

<222> (118)..(118)

<223> The 'Xaa' at location 118 stands for Gly, or Arg.

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> The 'Xaa' at location 147 stands for a stop codon, Trp, or Cys.

<220>

<221> misc_feature

<222> (592)..(592)

<223> "n"

<220>

<221> misc_feature

<222> (619)..(619)

<223> "n"

<400> 10

Met	Leu	Val	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Phe	Ile	Asp	Arg	Glu	Val	Lys	Pro
1				5					10					15	

Thr	Val	Arg	Glu	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ala	Tyr	Pro	Glu	Ala	Trp	Ile
			20					25						30	

Glu	Gln	Met	Lys	Arg	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Glu
		35				40						45			

Tyr	Gly	Gly	Ser	Pro	Val	Ser	Met	Pro	Cys	Tyr	Val	Arg	Val	Thr	Glu
	50					55					60				

Gln	Leu	Ala	Arg	Gly	Trp	Met	Ser	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	Gly	Gly	His
65					70					75					80

10

20

30

40

Thr Val Val Ala Lys Leu Leu Thr Leu Phe Gly Thr Glu Asp Xaa Lys
 85 90 95

Arg Ala Tyr Leu Pro Arg Met Ala Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Met
 100 105 110

Ala Leu Thr Glu Pro Xaa Gly Gly Ser Asp Leu Gln Asn Met Ser Thr
 115 120 125

Thr Ala Leu Pro Asp Pro Asp Ser Asp Gly Leu Val Val Asn Gly Ala
 130 135 140

Lys Thr Xaa Ile Asn
 145

10

- <210> 11
- <211> 241
- <212> DNA
- <213> mycobacterium avium paratuberculosis

- <220>
- <221> CDS
- <222> (147)..(239)
- <223>

20

<400> 11
 gtgggggcaa gccaaattacg ttgcacatga cccggcacag gcggtcgctc acgtcatcaa 60
 catgccgctc atccccgatg aggctcgaat gaccttgcta cgcaggcgct gaacgcacga 120
 cgaaacggac cggaggtgaa agggac atg agc cac gcc gat caa ctc gct cgg 173
 Met Ser His Ala Asp Gln Leu Ala Arg
 1 5
 acg cac ctg gcg ccc gat cct gcg gac ctg tcg cgc ctg gtc gcc ggc 221
 Thr His Leu Ala Pro Asp Pro Ala Asp Leu Ser Arg Leu Val Ala Gly 30
 10 15 20 25
 acc cac cac gac ccg cac gg 241
 Thr His His Asp Pro His
 30

30

- <210> 12
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> mycobacterium avium paratuberculosis

40

<400> 12

Met Ser His Ala Asp Gln Leu Ala Arg Thr His Leu Ala Pro Asp Pro
 1 5 10 15

Ala Asp Leu Ser Arg Leu Val Ala Gly Thr His His Asp Pro His
 20 25 30

<210> 13

<211> 236

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

10

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(214)

<223>

<400> 13

ggacacc aac gtg acc ggg gtg ttt ctc acc gcc cag gcg gcg gcc cgg 49
 Asn Val Thr Gly Val Phe Leu Thr Ala Gln Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

20

gcg atg atg cgg cag ggc cgc ggc gcc gcc atc atc acc acc gcc tcg 97
 Ala Met Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Ala Ile Ile Thr Thr Ala Ser
 15 20 25 30

atg tcc ggg cac atc atc aac gtc cgg cag cag gtc gcc cac tac tgc 145
 Met Ser Gly His Ile Ile Asn Val Pro Gln Gln Val Gly His Tyr Cys
 35 40 45

gcc agc aag gcg gcc gtg atc cag ctg acc aag gcc atg gcc gtc gaa 193
 Ala Ser Lys Ala Ala Val Ile Gln Leu Thr Lys Ala Met Ala Val Glu
 50 55 60

ttc tgc agg atc cgt cga ctc tagactcgag caagcttatg ca 236
 Phe Cys Arg Ile Arg Arg Leu
 65

30

<210> 14

<211> 69

<212> PRT

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<400> 14

Asn Val Thr Gly Val Phe Leu Thr Ala Gln Ala Ala Ala Arg Ala Met
 1 5 10 15

40

Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Ala Ile Ile Thr Thr Ala Ser Met Ser
 20 25 30

Gly His Ile Ile Asn Val Pro Gln Gln Val Gly His Tyr Cys Ala Ser
 35 40 45

Lys Ala Ala Val Ile Gln Leu Thr Lys Ala Met Ala Val Glu Phe Cys
 50 55 60

Arg Ile Arg Arg Leu
 65

<210> 15
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> mycobacterium avium paratuberculosis

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (331)..(331)
 <223> "n"

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (398)..(398)
 <223> "n"

<220>
 <221> CDS
 <222> (25)..(417)
 <223>

30

<400> 15
 cggccaccgc acccagggga ggcc atg act cac acc aag gcc ggt cgt gcc 51
 Met Thr His Thr Lys Ala Gly Arg Ala
 1 5

gcg tgg ccy gcc gcc tgc gcg gtc gtc ctg tcc gcc gcc gcg ctg ttg 99
 Ala Trp Pro Ala Ala Cys Ala Val Val Leu Ser Ala Ala Ala Leu Leu
 10 15 20 25

tgc gcg gca gcg gcc gcc gcg gac gaa gcc gat gac gcg ttc ctc gcc 147
 Cys Ala Ala Ala Ala Ala Asp Glu Ala Asp Asp Ala Phe Leu Ala
 30 35 40

40

<400> 16

Met Thr His Thr Lys Ala Gly Arg Ala Ala Trp Pro Ala Ala Cys Ala
1 5 10 15

Val Val Leu Ser Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala
20 25 30

Asp Glu Ala Asp Asp Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Lys Gly Gly Ile
35 40 45

Thr Met Phe Asp Asp Asp Asp Ala Ile Ala Met Gly His Ser Val Cys
50 55 60

10

Ser Ser Ile Asp Ala Asn Pro Asn Val Ser Met Leu Ala Leu Arg Leu
65 70 75 80

Thr Lys Gln Thr Pro Leu Thr Pro Lys Gln Ser Gly Tyr Phe Ile Gly
85 90 95

Leu Ser Val Ala Ser Tyr Xaa Pro Ala Val Gln Gly Arg Arg Arg Pro
100 105 110

Leu Ala Gly Leu Ala Asp Pro Ala Ala Ala Asp Val Xaa Leu Pro Ala
115 120 125

20

Gly Ile Gly
130

<210> 17

<211> 392

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> CDS

30

<222> (94)..(390)

<223>

<400> 17

cggcgtagca tcgtcaagtc gttgcccgcg ctgatgccgg agcggcagta aggagttcgg 60

ctggtgcaaa aacgcttgcc cacagtcggt ttg gtg ctg acg gcc gtt gtc gcc 114
Val Leu Thr Ala Val Val Ala
1 5

ggt atc gcc ggg tgc agc gcg gcg cag acc gtg ccg cgc aag gcc gcc 162
Gly Ile Ala Gly Cys Ser Ala Ala Gln Thr Val Pro Arg Lys Ala Ala
10 15 20

40

cgg ctg acc atc gac ggt gcc acc cac acg acc cgc ccg ccg tcc tgc 210
 Arg Leu Thr Ile Asp Gly Ala Thr His Thr Thr Arg Pro Pro Ser Cys
 25 30 35
 cgg cag gac cag atg tat cgg acc atc aac atc ccc gac cac gac ggt 258
 Arg Gln Asp Gln Met Tyr Arg Thr Ile Asn Ile Pro Asp His Asp Gly
 40 45 50 55
 gga gtc gaa gcg gtg gtg ctg ctc agc ggt tac cgg gtg atg ccg cag 306
 Gly Val Glu Ala Val Val Leu Leu Ser Gly Tyr Arg Val Met Pro Gln
 60 65 70
 tgg gtg aag atc cgg aac gtc gac ggc ttc acc ggc agt cta ctg gcc 354
 Trp Val Lys Ile Arg Asn Val Asp Gly Phe Thr Gly Ser Leu Leu Ala
 75 80 85
 asg gcg gag tgg gcg acg cgc acg tcg atc tca cma at 392
 Xaa Ala Glu Trp Ala Thr Arg Thr Ser Ile Ser Xaa
 90 95

10

<210> 18

<211> 99

<212> PRT

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> misc_feature

<222> (88)..(88)

<223> The 'Xaa' at location 88 stands for Arg, or Thr.

<220>

<221> misc_feature

<222> (99)..(99)

<223> The 'Xaa' at location 99 stands for Gln, or Pro.

<400> 18

Val Leu Thr Ala Val Val Ala Gly Ile Ala Gly Cys Ser Ala Ala Gln
 1 5 10 15

30

Thr Val Pro Arg Lys Ala Ala Arg Leu Thr Ile Asp Gly Ala Thr His
 20 25 30

Thr Thr Arg Pro Pro Ser Cys Arg Gln Asp Gln Met Tyr Arg Thr Ile
 35 40 45

Asn Ile Pro Asp His Asp Gly Gly Val Glu Ala Val Val Leu Leu Ser
 50 55 60

Gly Tyr Arg Val Met Pro Gln Trp Val Lys Ile Arg Asn Val Asp Gly
 65 70 75 80

40

Phe Thr Gly Ser Leu Leu Ala Xaa Ala Glu Trp Ala Thr Arg Thr Ser
 85 90 95

Ile Ser Xaa

<210> 19

<211> 1884

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

10

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1884)

<223>

<400> 19

taaccaggag ca atg gct cgt gcg gtc ggt atc gac ctc ggg acc acc aac 51
 Met Ala Arg Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn
 1 5 10

20

tcc gtc gtc gca gtc ctc gag ggc ggt gac ccc gtc gtc gtc gcc aac 99
 Ser Val Val Ala Val Leu Glu Gly Gly Asp Pro Val Val Val Ala Asn
 15 20 25

tcc gag ggc tcg cgg acc acc ccg tcc atc gtc gcg ttc gcc cgc aac 147
 Ser Glu Gly Ser Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Ala Arg Asn
 30 35 40 45

ggc gag gtg ctc gtc ggc cag ccc gcc aag aac cag gcg gtg acc aac 195
 Gly Glu Val Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Asn Gln Ala Val Thr Asn
 50 55 60

gtc gac cgc acc atc cgt tcg gtc aag cgg cac atg ggc acc gac tgg 243
 Val Asp Arg Thr Ile Arg Ser Val Lys Arg His Met Gly Thr Asp Trp
 65 70 75

tcc atc gag atc gac ggc aag aaa tac acc gct cag gag atc agc gcc 291
 Ser Ile Glu Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Thr Ala Gln Glu Ile Ser Ala
 80 85 90

30

cgc gtg ctg atg aag ctc aag cgc gac gcc gag gcc tat ctg ggt gag 339
 Arg Val Leu Met Lys Leu Lys Arg Asp Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Glu
 95 100 105

gac atc acc gac gcg gtc atc acc gta ccg gcg tac ttc aac gac gcc 387
 Asp Ile Thr Asp Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala
 110 115 120 125

cag cgt cag gcg acc aag gaa gcc ggc cag atc gcc ggc ctc aac gtg 435
 Gln Arg Gln Ala Thr Lys Glu Ala Gly Gln Ile Ala Gly Leu Asn Val
 130 135 140

ctg cgc atc gtc aac gag ccg acc gcg gcc gcg ctg gcc tac ggc ctg 483

40

Leu Arg Ile Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Gly Leu 145 150 155		
gac aag ggc gag aag gag cag acc atc ctg gtc ttc gac ctc ggc ggc Asp Lys Gly Glu Lys Glu Gln Thr Ile Leu Val Phe Asp Leu Gly Gly 160 165 170	531	
ggc acg ttc gac gtt tcc ctg ctc gag atc ggc gag ggt gtg gtc gag Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Glu Ile Gly Glu Gly Val Val Glu 175 180 185	579	
gtc cgc gcc acc agc ggt gac aac caa ctc ggt ggc gac gac tgg gac Val Arg Ala Thr Ser Gly Asp Asn Gln Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp 190 195 200 205	627	
gac cgg atc gtc aac tgg ctg gtc gac aag ttc aag ggc acc agc ggc Asp Arg Ile Val Asn Trp Leu Val Asp Lys Phe Lys Gly Thr Ser Gly 210 215 220	675	10
atc gac ctg acc aag gac aag atg gcc atg cag cgg ctg cgt gag gcc Ile Asp Leu Thr Lys Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu Arg Glu Ala 225 230 235	723	
gcc gag aag gcc aag atc gag ttg tcc agc tcc cag agc acc tcc atc Ala Glu Lys Ala Lys Ile Glu Leu Ser Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ile 240 245 250	771	
aac ctg ccc tac atc acc gtc gac gcg gac aag aac ccg ctg ttc ctc Asn Leu Pro Tyr Ile Thr Val Asp Ala Asp Lys Asn Pro Leu Phe Leu 255 260 265	819	
gac gag cag ctg acc cgc gcc gaa ttc cag cgc atc acc cag gat ctg Asp Glu Gln Leu Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Ile Thr Gln Asp Leu 270 275 280 285	867	20
ctg gac cgc acc cgt cag ccg ttc aag tcc gtg atc gcc gac gcc ggc Leu Asp Arg Thr Arg Gln Pro Phe Lys Ser Val Ile Ala Asp Ala Gly 290 295 300	915	
atc tcc gtg tcc gac atc gac cac gtg gtg ctg gtg ggt ggt tcc acc Ile Ser Val Ser Asp Ile Asp His Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr 305 310 315	963	
cgg atg ccc gcg gtg acc gac ctg gtc aag gaa ctc acc ggc ggc aag Arg Met Pro Ala Val Thr Asp Leu Val Lys Glu Leu Thr Gly Gly Lys 320 325 330	1011	
gag ccc aac aag ggc gtc aac ccc gac gag gtt gtc gcg gtg ggt gcc Glu Pro Asn Lys Gly Val Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Val Gly Ala 335 340 345	1059	30
gcc ctg cag gcc ggt gtg ctt aag ggc gag gtg aaa gac gtt ctg ctg Ala Leu Gln Ala Gly Val Leu Lys Gly Glu Val Lys Asp Val Leu Leu 350 355 360 365	1107	
ctt gac gtt acg ccg ctg agc ctg ggt atc gag acc aag ggt ggc gtg Leu Asp Val Thr Pro Leu Ser Leu Gly Ile Glu Thr Lys Gly Gly Val 370 375 380	1155	
atg acc aag ctg atc gaa cgc aac acc acc atc ccg acc aag cgg tcc Met Thr Lys Leu Ile Glu Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Arg Ser 385 390 395	1203	
gag acg ttc acc acg gcc gac gac aac cag ccg tcc gtg cag atc cag Glu Thr Phe Thr Thr Ala Asp Asp Asn Gln Pro Ser Val Gln Ile Gln 400 405 410	1251	
gtg tat cag ggt gag cgc gaa atc gcc gcg cac aac aag ctg ctc ggc	1299	40

Val Tyr Gln Gly Glu Arg Glu Ile Ala Ala His Asn Lys Leu Leu Gly		
415	420	425
tcc ttc gag ctg acc gga att ccg ccg gcg ccc cgc ggc gtg ccg cag	1347	
Ser Phe Glu Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln		
430	435	440
445		
atc gag gtc acc ttc gac atc gac gcc aac ggc atc gtg cac gtc acc	1395	
Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Val His Val Thr		
450	455	460
gcc aag gac aag ggc acc ggt aag gag aac acg atc aag atc cag gag	1443	
Ala Lys Asp Lys Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Ile Lys Ile Gln Glu		
465	470	475
ggc tcc ggc ctg tcc aag gag gag atc gac ccg atg atc aag gac gcc	1491	
Gly Ser Gly Leu Ser Lys Glu Glu Ile Asp Arg Met Ile Lys Asp Ala		10
480	485	490
gag gcg cac gcc gag gag gac cgc aag agg cgc gag gaa gcc gac gtc	1539	
Glu Ala His Ala Glu Glu Asp Arg Lys Arg Arg Glu Glu Ala Asp Val		
495	500	505
cgc aac caa gcg gaa tcg ctt gtc tac cag acg gag aag ttc gtc aag	1587	
Arg Asn Gln Ala Glu Ser Leu Val Tyr Gln Thr Glu Lys Phe Val Lys		
510	515	520
525		
gac cag cgc gag gcc gag ggc ggc tcg aag gtt ccc gag gag acg ctg	1635	
Asp Gln Arg Glu Ala Glu Gly Gly Ser Lys Val Pro Glu Glu Thr Leu		
530	535	540
tcc aag gtc gac gcc gcg atc gcc gac gcc aag acg gcc ctg ggc gcc	1683	
Ser Lys Val Asp Ala Ala Ile Ala Asp Ala Lys Thr Ala Leu Gly Gly		20
545	550	555
acc gac atc acc gcg atc aag tcg gcg atg gag aag ctc ggc cag gag	1731	
Thr Asp Ile Thr Ala Ile Lys Ser Ala Met Glu Lys Leu Gly Gln Glu		
560	565	570
tcg caa gcg ctg gga cag gca atc tac gag gcc acc cag gcc gag tcc	1779	
Ser Gln Ala Leu Gly Gln Ala Ile Tyr Glu Ala Thr Gln Ala Glu Ser		
575	580	585
gcc cag gct ggc ggg ccg gac ggt gcc gcg gcc ggc ggc ggc tcc gga	1827	
Ala Gln Ala Gly Gly Pro Asp Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly		
590	595	600
605		
tcc gcc gac gat gtt gtg gac gcg gag gtg gtc gac gat gac cgg gag	1875	
Ser Ala Asp Asp Val Val Asp Ala Glu Val Val Asp Asp Asp Arg Glu		
610	615	620
1884		
tcc aag tga	1884	
Ser Lys		
<210> 20		
<211> 623		
<212> PRT		
<213> mycobacterium avium paratuberculosis		
<400> 20		40

Met Ala Arg Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Val Val
1 5 10 15

Ala Val Leu Glu Gly Gly Asp Pro Val Val Val Ala Asn Ser Glu Gly
20 25 30

Ser Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Ala Arg Asn Gly Glu Val
35 40 45

Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Asn Gln Ala Val Thr Asn Val Asp Arg
50 55 60

Thr Ile Arg Ser Val Lys Arg His Met Gly Thr Asp Trp Ser Ile Glu
65 70 75 80

Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Thr Ala Gln Glu Ile Ser Ala Arg Val Leu
85 90 95

Met Lys Leu Lys Arg Asp Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Glu Asp Ile Thr
100 105 110

Asp Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln
115 120 125

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

Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly
145 150 155 160

Glu Lys Glu Gln Thr Ile Leu Val Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe
165 170 175

Asp Val Ser Leu Leu Glu Ile Gly Glu Gly Val Val Glu Val Arg Ala
180 185 190

Thr Ser Gly Asp Asn Gln Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp Asp Arg Ile
195 200 205

Val Asn Trp Leu Val Asp Lys Phe Lys Gly Thr Ser Gly Ile Asp Leu
210 215 220

Thr Lys Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu Arg Glu Ala Ala Glu Lys
225 230 235 240

Ala Lys Ile Glu Leu Ser Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ile Asn Leu Pro
245 250 255

Tyr Ile Thr Val Asp Ala Asp Lys Asn Pro Leu Phe Leu Asp Glu Gln
260 265 270

10

20

30

40

Leu Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Ile Thr Gln Asp Leu Leu Asp Arg
 275 280 285

Thr Arg Gln Pro Phe Lys Ser Val Ile Ala Asp Ala Gly Ile Ser Val
 290 295 300

Ser Asp Ile Asp His Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Met Pro
 305 310 315 320

Ala Val Thr Asp Leu Val Lys Glu Leu Thr Gly Gly Lys Glu Pro Asn
 325 330 335

Lys Gly Val Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Val Gly Ala Ala Leu Gln
 340 345 350

Ala Gly Val Leu Lys Gly Glu Val Lys Asp Val Leu Leu Leu Asp Val
 355 360 365

Thr Pro Leu Ser Leu Gly Ile Glu Thr Lys Gly Gly Val Met Thr Lys
 370 375 380

Leu Ile Glu Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Arg Ser Glu Thr Phe
 385 390 395 400

Thr Thr Ala Asp Asp Asn Gln Pro Ser Val Gln Ile Gln Val Tyr Gln
 405 410 415

Gly Glu Arg Glu Ile Ala Ala His Asn Lys Leu Leu Gly Ser Phe Glu
 420 425 430

Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val
 435 440 445

Thr Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Val His Val Thr Ala Lys Asp
 450 455 460

Lys Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Ile Lys Ile Gln Glu Gly Ser Gly
 465 470 475 480

Leu Ser Lys Glu Glu Ile Asp Arg Met Ile Lys Asp Ala Glu Ala His
 485 490 495

Ala Glu Glu Asp Arg Lys Arg Arg Glu Glu Ala Asp Val Arg Asn Gln
 500 505 510

Ala Glu Ser Leu Val Tyr Gln Thr Glu Lys Phe Val Lys Asp Gln Arg
 515 520 525

Glu Ala Glu Gly Gly Ser Lys Val Pro Glu Glu Thr Leu Ser Lys Val
 530 535 540

10

20

30

40

Asp Ala Ala Ile Ala Asp Ala Lys Thr Ala Leu Gly Gly Thr Asp Ile
545 550 555 560

Thr Ala Ile Lys Ser Ala Met Glu Lys Leu Gly Gln Glu Ser Gln Ala
565 570 575

Leu Gly Gln Ala Ile Tyr Glu Ala Thr Gln Ala Glu Ser Ala Gln Ala
580 585 590

Gly Gly Pro Asp Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ala Asp
595 600 605

Asp Val Val Asp Ala Glu Val Val Asp Asp Asp Arg Glu Ser Lys
610 615 620

<210> 21

<211> 1701

<212> DNA

<213> mycobacterium avium paratuberculosis

<220>

<221> CDS

<222> (76)..(1701)

<223>

<400> 21

gcagcctggt cgtccgtcgc gggcactgca cccggccagg acgtgtcadc cccaatccgg 60

aggaatcact togca atg gcc aag aca att gcg tac gac gaa gag gcc cgt 111
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg
1 5 10

cgc ggc ctc gag cgg ggg ctc aac gcc ctc gcc gac gcg gta aag gtc 159
Arg Gly Leu Glu Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val
15 20 25

acg ttg ggc ccc aag ggt cgc aac gtc gtc ctg gag aag aag tgg ggt 207
Thr Leu Gly Pro Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly
30 35 40

gcc ccc acg atc acc aac gat ggt gtg tcc atc gcc aag gag atc gag 255
Ala Pro Thr Ile Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu
45 50 55 60

ctg gag gac ccg tac gag aag atc ggc gcc gag ctg gtc aag gaa gtc 303
Leu Glu Asp Pro Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val
65 70 75

gcc aag aag acc gac gac gtc gcc ggt gac ggc acg acg acg gcc acg 351
Ala Lys Lys Thr Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr
80 85 90

gtg ctc gcc cag gcg ttg gtc cgc gag ggc ctg cgc aac gtc gcg gcc 399

10

20

30

40

Val Leu Ala Gln Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala 95 100 105	
ggc gcc aac ccg ctg ggt ctc aag cgc ggc atc gag aag gcc gtc gag Gly Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu 110 115 120	447
aag gtc acc gag acc ctg ctc aag tcg gcc aag gag gtc gag acc aag Lys Val Thr Glu Thr Leu Leu Lys Ser Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys 125 130 135 140	495
gac cag atc get gcc acc gcg gcc atc tcc gcg ggc gac cag tcg atc Asp Gln Ile Ala Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Gln Ser Ile 145 150 155	543
ggc gac ctg atc gcc gag gcg atg gac aag gtc ggc aac gag ggc gtc Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val 160 165 170	591
atc acc gtc gag gag tcc aac acc ttc ggc ctg cag ctc gag ctc acc Ile Thr Val Glu Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr 175 180 185	639
gag ggt atg cgg ttc gac aag ggt tac atc tcg gcc tac ttc gtc acg Glu Gly Met Arg Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr 190 195 200	687
gac gcc gag cgt cag gaa gcg gtc ctc gag gac ccg ttc atc ctg ctg Asp Ala Glu Arg Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Phe Ile Leu Leu 205 210 215 220	735
gtc agc tcc aag gtc tcg acc gtc aag gac ctg ctg ccg ctg ctg gag Val Ser Ser Lys Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu 225 230 235	783
aag gtc atc cag gcc ggc aag ccg ctg ctg atc atc gcc gag gac gtc Lys Val Ile Gln Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val 240 245 250	831
gag ggc gag gcc ctg tcc acc ctg gtc gtc aac aag atc cgc ggc acc Glu Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr 255 260 265	879
ttc aag tcg gtg gcc gtc aag gcg ccc ggc ttc ggc gac cgc cgc aag Phe Lys Ser Val Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys 270 275 280	927
gcg atg ctt cag gac atg gcc atc ctc acc ggc ggc cag gtc atc agc Ala Met Leu Gln Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser 285 290 295 300	975
gaa gag gtc ggc ctg tcg ctg gag agc gcc gac atc tcg ctg ctc ggt Glu Glu Val Gly Leu Ser Leu Glu Ser Ala Asp Ile Ser Leu Leu Gly 305 310 315	1023
aag gcc cgc aag gtc gtc gtc acc aag gac gag acc acc atc gtc gag Lys Ala Arg Lys Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu 320 325 330	1071
ggc gcc ggt gac tcc gac gcc atc gcc ggc cgg gtg gcc cag atc cgc Gly Ala Gly Asp Ser Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg 335 340 345	1119
acc gag atc gag aac agc gac tcc gac tac gac cgc gag aag ctg cag Thr Glu Ile Glu Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln 350 355 360	1167
gag cgg ctg gcc aag ctg gcc ggc ggc gtg gcg gtg atc aag gcc ggc	1215

10

20

30

40

Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly 365 370 375 380	
gcc gcg acc gag gtc gag ctc aag gag cgc aag cac cgc atc gag gac Ala Ala Thr Glu Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp 385 390 395	1263
gcg gtc cgc aac gcc aag gcg gcc gtg gag gag ggc atc gtc gcc gcc Ala Val Arg Asn Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly 400 405 410	1311
ggt gcc gtg gcc ctg ctg cac gcg atc ccg gct ctg gac gag ctg aag Gly Gly Val Ala Leu Leu His Ala Ile Pro Ala Leu Asp Glu Leu Lys 415 420 425	1359
ctc gag gcc gaa gag gcg acc gcc gcc aac atc gtc cgg gtg gcc ctc Leu Glu Gly Glu Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Arg Val Ala Leu 430 435 440	1407
gag gct ccg ctg aag cag atc gcc ttc aac ggt gcc ctg gag ccc gcc Glu Ala Pro Leu Lys Gln Ile Ala Phe Asn Gly Gly Leu Glu Pro Gly 445 450 455 460	1455
gtg gtg gcc gag aag gtc cgc aac tcg ccc gcc ggt acc gcc ctc aac Val Val Ala Glu Lys Val Arg Asn Ser Pro Ala Gly Thr Gly Leu Asn 465 470 475	1503
gcc gcc acc ggt gag tac gag gac ctg ctc aag gcc gcc att gcc gac Ala Ala Thr Gly Glu Tyr Glu Asp Leu Leu Lys Ala Gly Ile Ala Asp 480 485 490	1551
ccg gtg aag gtc acc cgc tcg gcg ctg cag aac gcg gcg tcc atc gcg Pro Val Lys Val Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala 495 500 505	1599
ggg ctg ttc ctg acc acc gag gcg gtc gtc gcc gac aag ccg gag aag Gly Leu Phe Leu Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys 510 515 520	1647
gcg gcc gct ccc gcg gcc gac ccg acc gcc gcc atg gcc gcc atg gac Ala Ala Ala Pro Ala Gly Asp Pro Thr Gly Gly Met Gly Gly Met Asp 525 530 535 540	1695
ttc tga Phe	1701
<210> 22	
<211> 541	30
<212> PRT	
<213> mycobacterium avium paratuberculosis	
<400> 22	
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu 1 5 10 15	
Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro 20 25 30	40

Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile
 35 40 45
 Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro
 50 55 60
 Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr
 65 70 75 80
 Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln
 85 90 95
 Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro
 100 105 110
 Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Lys Val Thr Glu
 115 120 125
 Thr Leu Leu Lys Ser Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Asp Gln Ile Ala
 130 135 140
 Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu
 165 170 175
 Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg
 180 185 190
 Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg
 195 200 205
 Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Phe Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys
 210 215 220
 Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gln
 225 230 235 240
 Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala
 245 250 255
 Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val
 260 265 270
 Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu Gln
 275 280 285
 Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser Glu Glu Val Gly
 290 295 300

10

20

30

40

Leu Ser Leu Glu Ser Ala Asp Ile Ser Leu Leu Gly Lys Ala Arg Lys
305 310 315 320

Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu Gly Ala Gly Asp
325 330 335

Ser Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Thr Glu Ile Glu
340 345 350

Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala
355 360 365

Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly Ala Ala Thr Glu
370 375 380

Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn
385 390 395 400

Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly Val Ala
405 410 415

Leu Leu His Ala Ile Pro Ala Leu Asp Glu Leu Lys Leu Glu Gly Glu
420 425 430

Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Arg Val Ala Leu Glu Ala Pro Leu
435 440 445

Lys Gln Ile Ala Phe Asn Gly Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu
450 455 460

Lys Val Arg Asn Ser Pro Ala Gly Thr Gly Leu Asn Ala Ala Thr Gly
465 470 475 480

Glu Tyr Glu Asp Leu Leu Lys Ala Gly Ile Ala Asp Pro Val Lys Val
485 490 495

Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Gly Leu Phe Leu
500 505 510

Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys Ala Ala Ala Pro
515 520 525

Ala Gly Asp Pro Thr Gly Gly Met Gly Gly Met Asp Phe
530 535 540

10

20

30

【 図 1 】

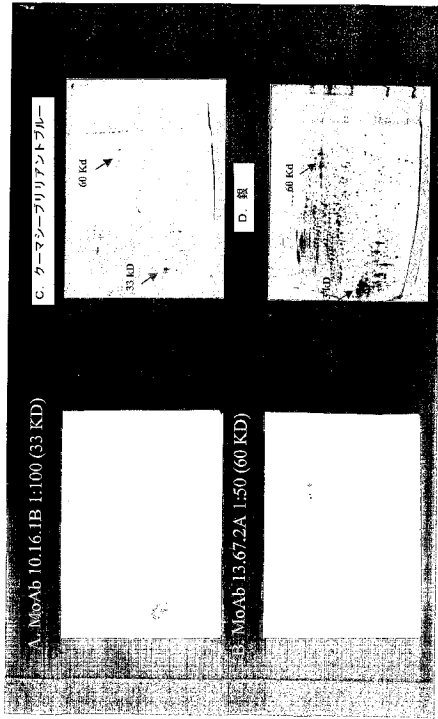


Figure 1

【 図 2 】

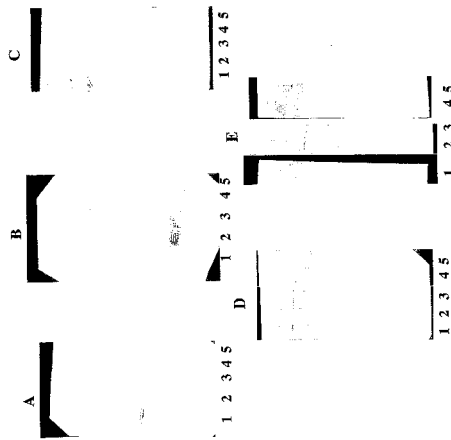


Figure 2

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/NL 03/00020
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/569 C12N5/10 C07K14/35 C12N15/31 C07K16/12 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K39/04		
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 C07K		
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) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 16628 A (INNOGENETICS NV) 1 October 1992 (1992-10-01) cited in the application abstract page 5, last paragraph -page 6, line 16 page 18, line 19-26 page 20, line 29 -page 21, line 13 page 22 -page 27, line 29 page 58, line 31 -page 59, line 30; table 3 claims 1-28	1,12-16, 27-37
X	EP 0 288 306 A (MCFADDEN JOHN JO ;TAYLOR JOHN HERMON (GB)) 26 October 1988 (1988-10-26) cited in the application abstract column 7, line 51 -column 8, line 11 --- -/--	1,12-16, 27-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" 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. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 June 2003		Date of mailing of the international search report 18.09.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl. Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Dumont, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Patent Application No
 PCT/NL 03/00020

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KESEL DE M ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF PORTIONS OF THE 34-KILODALTON- PROTEIN GENE OF MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS: ITS APPLICATION TO SEROLOGICAL ANALYSIS OF JOHNE'S DISEASE" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 31, no. 4, April 1993 (1993-04), pages 947-954, XP000978898 ISSN: 0095-1137 cited in the application the whole document	1,12-16, 27-37
X	EL-ZAATARI FOUAD A K ET AL: "Characterization of a specific Mycobacterium paratuberculosis recombinant clone expressing 35,000-molecular-weight antigen and reactivity with sera from animals with clinical and subclinical Johne's disease." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 35, no. 7, 1997, pages 1794-1799, XP002201774 ISSN: 0095-1137 the whole document	1,12-16, 27-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/NL 03/00020
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1, 16 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/AL 03 0020

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 16 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 5, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 6.

2. Claims: 2, 17 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 3, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 4.

3. Claims: 3, 18 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 1, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 2.

4. Claims: 4, 19 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 7, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 8.

5. Claims: 5, 20 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 9, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 10.

6. Claims: 6, 21 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 11, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 12.

7. Claims: 7, 22 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 13, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 14.

8. Claims: 8, 23 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according

International Application No. PCT/NL 03 00020

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

to SEQ ID NO: 15, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 16.

9. Claims: 9, 24 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO: 17, encoding an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 18.

10. Claims: 10, 25 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence encoding a 60 kD Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis protein having a pI of 5.60-6.15.

11. Claims: 11, 26 (complete), 12-15, 27-37 (partial)

subject-matter relating to a nucleic acid sequence encoding a 33 kD Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis protein having a pI of 4.20-4.75.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int national Application No PCT/NL 03/00020

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9216628	A	01-10-1992	AT 197069 T	15-11-2000
			AU 657743 B2	23-03-1995
			AU 1441092 A	21-10-1992
			DE 69231519 D1	23-11-2000
			DE 69231519 T2	31-05-2001
			WO 9216628 A1	01-10-1992
			EP 0577666 A1	12-01-1994
			ES 2152928 T3	16-02-2001
			US 6387372 B1	14-05-2002
			EP 0288306	A
AU 624574 B2	18-06-1992			
AU 1628688 A	02-12-1988			
CA 1340172 C	08-12-1998			
DE 3854767 D1	25-01-1996			
DE 3854767 T2	05-09-1996			
DK 524289 A	22-12-1989			
EP 0288306 A1	26-10-1988			
EP 0356450 A1	07-03-1990			
WO 8808456 A1	03-11-1988			
JP 3503837 T	29-08-1991			
NO 885756 A	23-02-1989			
NZ 224351 A	21-12-1990			
US 5225324 A	06-07-1993			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/09	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 K 39/108	A 6 1 K 39/108	
A 6 1 K 39/135	A 6 1 K 39/135	
A 6 1 K 39/145	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/155	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 39/215	A 6 1 K 39/215	
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/06	A 6 1 P 31/06	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
C 0 7 K 14/35	C 0 7 K 14/35	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/04	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	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 ウイレムセン, ベトルス・テオドルス・ヨハネス

オランダ国、エヌ・エル - 1 0 6 9 ・エー・ハー・アムステルダム、ラングスワートル・8 4 6

(72) 発明者 ブエステルフェーン, ショーケ・フエシユ

オランダ国、エヌ・エル - 8 9 1 1 ・カー・セー・レーワルデン、テイネン・2 5

(72) 発明者 バツケル, ダウワ

オランダ国、エヌ・エル - 8 2 1 2 ・アー・エム・レリースタット、パイテンブラツ・1 1 6

(72) 発明者 ファン・ジデルフェルト, フレツド・ゴベルト

オランダ国、エヌ・エル - 8 2 4 2 ・デー・セー・レリースタット、プンテル・1 0 2 6

(72) 発明者 トーレ, イエーレ・エグベルタス・ルドルファス

オランダ国、エヌ・エル - 8 2 5 3 ・ベー・エル・ドロントン、デユカート・7 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA03 CA09 CA20 DA06 EA03 EA04 FA02

GA11 HA11 HA17

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ06 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR39

QR42 QR56 QR62 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02

4B065 AA01X AA36Y AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA43

CA45 CA46

4C085 AA03 BA03 BA09 BA13 BA14 BA15 BA18 BA21 BA51 BA54

BA55 BA57 BA78 CC04 EE01 EE06 GG02 GG03 GG04 GG05

GG06 GG08

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA86 EA20 EA22 EA52 FA74

专利名称(译)	副结核分枝杆菌感染和疫苗的诊断剂		
公开(公告)号	JP2005514041A	公开(公告)日	2005-05-19
申请号	JP2003558505	申请日	2003-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	ID - 莱利斯塔德动物保健及动物育种研究所公司		
申请(专利权)人(译)	IDE - Rerisutatsuto客栈住下特乌特 - Fuoru德鳗鱼邸的赖TA院长如歌宗身高 - 基于 - 基于		
[标]发明人	ウイレムセンペトルステオドルスヨハネス ブエステルフエーンシヨーケフエシユ バツケルダウワ フアンジデルフェルトフレツドゴベルト トーレイエーレエグベルタスルドルフアス		
发明人	ウイレムセン,ペトルス・テオドルス・ヨハネス ブエステルフエーン,シヨーケ・フエシユ バツケル,ダウワ フアン・ジデルフェルト,フレツド・ゴベルト トーレ,イエーレ・エグベルタス・ルドルフアス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/005 A61K39/02 A61K39/04 A61K39/085 A61K39/09 A61K39/108 A61K39/135 A61K39/145 A61K39/155 A61K39/215 A61K39/245 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 C07K14/35 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12Q1/02 C12Q1/04 C12Q1/68 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/51 A61K2039/53 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 C07K14/35		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/005 A61K39/02 A61K39/04 A61K39/085 A61K39/09 A61K39/108 A61K39 /135 A61K39/145 A61K39/155 A61K39/215 A61K39/245 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 C07K14 /35 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/04 C12Q1/68.A G01N33/53.D C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024 /EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063 /QR39 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA36Y 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085 /AA03 4C085/BA03 4C085/BA09 4C085/BA13 4C085/BA14 4C085/BA15 4C085/BA18 4C085/BA21 4C085/BA51 4C085/BA54 4C085/BA55 4C085/BA57 4C085/BA78 4C085/CC04 4C085/EE01 4C085 /EE06 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045 /EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2002075089 2002-01-11 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码鸟分枝杆菌亚种副结核蛋白的核酸序列，涉及编码此类蛋白的免疫原性片段的此类核酸序列的部分，涉及DNA片段，重组DNA分子，活重组载体和包含此类核酸序列的宿主细胞 或其此类部分。本发明还涉及鸟分枝杆菌亚种副结核蛋白及其由这些序列编码的免疫原性部分。此外，本发明涉及包含此类核酸序列及其部分，DNA片段，重组DNA分子，活重组载体和包含此类核酸序列或其部分，蛋白质或免疫原性部分以及针对此类蛋白质的抗体的宿主细胞的疫苗 或其免疫原性部分。同样，本发明涉

及所述蛋白质在疫苗中的用途以及在疫苗的生产中的用途。此外，本发明涉及所述核酸序列，蛋白质或抗体用于诊断或疫苗接种目的用途。同样，本发明涉及制备此类疫苗的方法。最后，本发明涉及包含此类核酸，蛋白质或针对此类蛋白质的抗体的诊断试剂盒。

(61) Int. Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/005	A 6 1 K 39/005	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/085	A 6 1 K 39/085	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 75 頁) 最終頁に

(21) 出願番号	特願2003-558505 (P2003-558505)	(71) 出願人	504265514
(22) 出願日	平成15年1月13日 (2003. 1. 13)		イーデー・レリースタット・インステ
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月23日 (2004. 8. 23)		ユート・フオール・ダイールホウテラ
(86) 国際出願番号	PCT/NL2003/000020		エイ・ダイールゲゾントハイト・ペー
(87) 国際公開番号	W02003/058248		ー
(87) 国際公開日	平成15年7月17日 (2003. 7. 17)		オランダ国、エヌ・エル-8 2 1 9 ..
(31) 優先権主張番号	02075089.9		・ハー・レリースタット、エーデルヘ
(32) 優先日	平成14年1月11日 (2002. 1. 11)		ウエヒ・1 5
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠