

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-135873

(P2011-135873A)

(43) 公開日 平成23年7月14日(2011.7.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 7

審査請求 有 請求項の数 26 O L (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-190 (P2011-190)	(71) 出願人	598139601 ノース・キャロライナ・ステイト・ユニヴァーシティ アメリカ合衆国27695-8210 ノースカロライナ州ローリー、キャンパス・ボックス 8210、スウィート1122、リサーチ・ドライブ、2401番
(22) 出願日	平成23年1月4日(2011.1.4)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(62) 分割の表示	特願2006-513298 (P2006-513298) の分割	(72) 発明者	クレナマー トッズ アール アメリカ国 ノースキャロライナ 27606 ラレイ ベイカーズフィールドドライブ 6509
原出願日	平成16年4月23日(2004.4.23)	(72) 発明者	ラッセル ウィリアム エム アメリカ国 ウィスコンシン マチソン 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/465, 621		
(32) 優先日	平成15年4月25日(2003.4.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 細胞表面タンパク質相同体をコードするアシドフィルス菌核酸配列及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 グラム陽性菌の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質は、他の細胞又は化合物への付着、構造安定性の提供、並びに環境の刺激に対する応答を含めた多くの様々な機能を果たす。細菌の表面タンパク質は、宿主内での生存と、細胞の増殖及び分裂とに重要である。さらに、免疫促進、変調、又は増進が開始されることも多く、プロバイオティク産物を開発するため、これらのタンパク質の単離及び特性分析の提供。

【解決手段】 細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の核酸分子及びポリペプチド、並びにそれらの断片及び変種を開示する。細胞壁、細胞表面、及び分泌物の融合タンパク質、抗原性ペプチド、並びに、細胞壁、細胞表面、及び分泌物に対する抗体も包含される。該核酸分子を含有する組換え体発現ベクター、及びこれらの発現ベクターが導入された宿主細胞、該ポリペプチドを生成する方法、及びそれらの使用法も開示する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の群より選択される単離された核酸分子：

a) 配列番号57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列を含む核酸分子；

10

b) 配列番号57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列に少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、活性を保持しているポリペプチドをコードする核酸分子；

20

30

c) 配列番号58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子；

40

50

d) 配列番号 58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304 又は 306 のアミノ酸配列に少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、活性を保持しているポリペプチドをコードする核酸分子；及び

10

e) a) から d) のいずれかの相補体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸分子を含むプラスミド。

20

【請求項 3】

異種ポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項 2 に記載のプラスミド。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のプラスミドを含有する宿主細胞。

【請求項 5】

細菌宿主細胞である、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

以下からなる群より選択される単離されたポリペプチド：

a) 配列番号：58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304 又は 306 のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

30

40

b) 配列番号：57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、1

50

69、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列によってコードされているポリペプチド；

c) 配列番号58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミノ酸配列に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、活性を保持しているポリペプチド；

d) 配列番号：57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列に少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列によってコードされており、活性を保持しているポリペプチド。

【請求項7】

異種アミノ酸配列をさらに含む、請求項6に記載のポリペプチド。

【請求項8】

請求項6に記載のポリペプチドに選択的に結合する抗体。

【請求項9】

ポリペプチドを生成する方法であって、前記ポリペプチドをコードする核酸分子が発現される条件下で請求項4に記載の宿主細胞を培養することを含み、前記ポリペプチドが以下からなる群より選択される方法。

a) 配列番号：58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50

、 52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、
 86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108
 、 110、112、114、116、118、120、122、124、126、128
 、 130、132、134、136、138、140、142、144、146、148
 、 150、152、154、156、158、160、162、164、166、168
 、 170、172、174、176、178、180、182、184、186、188
 、 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208
 、 210、212、214、216、218、220、222、224、226、228
 、 230、232、234、236、238、240、242、244、246、248
 、 250、252、254、256、258、260、262、264、266、268
 、 270、272、274、276、278、280、282、284、286、288
 、 290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミ
 ノ酸配列を含むポリペプチド；

10

b) 配列番号：57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23
 、 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、
 51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、8
 5、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、1
 09、111、113、115、117、119、121、123、125、127、1
 29、131、133、135、137、139、141、143、145、147、1
 49、151、153、155、157、159、161、163、165、167、1
 69、171、173、175、177、179、181、183、185、187、1
 89、191、193、195、197、199、201、203、205、207、2
 09、211、213、215、217、219、221、223、225、227、2
 29、231、233、235、237、239、241、243、245、247、2
 49、251、253、255、257、259、261、263、265、267、2
 69、271、273、275、277、279、281、283、285、287、2
 89、291、293、295、297、299、301、303、305又は307の
 ヌクレオチド配列によってコードされているポリペプチド；

20

c) 配列番号：58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、2
 4、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50
 、 52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、
 86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108
 、 110、112、114、116、118、120、122、124、126、128
 、 130、132、134、136、138、140、142、144、146、148
 、 150、152、154、156、158、160、162、164、166、168
 、 170、172、174、176、178、180、182、184、186、188
 、 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208
 、 210、212、214、216、218、220、222、224、226、228
 、 230、232、234、236、238、240、242、244、246、248
 、 250、252、254、256、258、260、262、264、266、268
 、 270、272、274、276、278、280、282、284、286、288
 、 290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミ
 ノ酸配列に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、活性を保持して
 いるポリペプチド；及び

30

40

d) 配列番号：57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23
 、 25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、
 51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、8
 5、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、1
 09、111、113、115、117、119、121、123、125、127、1
 29、131、133、135、137、139、141、143、145、147、1

50

49、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列に少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされており、活性を保持しているポリペプチド。

10

【請求項10】

試料中における請求項6に記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、ポリペプチドに選択的に結合する化合物と、前記試料を接触させるステップと；前記化合物が、前記試料中の前記ポリペプチドに結合するかどうか判定するステップとを含む方法。

【請求項11】

ポリペプチドに結合する化合物が抗体である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

宿主の免疫系を変調する方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを前記宿主に導入することを含む方法。

20

【請求項13】

免疫系の変調が、宿主のサイトカイン産生を改変することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

免疫系の変調が、抗炎症活性を改変することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

宿主の免疫系を変調する方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを発現する微生物を前記宿主に導入することを含む方法。

【請求項16】

宿主のタンパク質又は化合物の発現を変化させる方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを前記宿主に導入することを含む方法。

30

【請求項17】

宿主のタンパク質又は化合物の発現を変化させる方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを発現する微生物を前記宿主に導入することを含む方法。

【請求項18】

対象における胃腸障害を治療する方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを発現する微生物を前記対象に導入することを含む方法。

【請求項19】

胃腸障害が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸管症候群、下痢、抗生物質関連の下痢、便秘、及び小腸細菌過増殖からなる群より選択される、請求項18に記載の方法。

40

【請求項20】

対象における感染の発生を予防又は抑制する方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを発現する微生物を前記対象に導入することを含む方法。

【請求項21】

改変された付着特性を微生物が保持するのを可能にする方法であって、請求項6に記載のポリペプチドを前記微生物に導入することを含む方法。

【請求項22】

微生物が、上皮細胞に付着できる、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

以下を含む異種核酸分子を含む微生物宿主細胞：

50

a) 配列番号 57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列；

10

b) 配列番号 57、69、1、3、5、7、9、11、13、15、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、59、61、63、65、67、71、73、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305又は307のヌクレオチド配列に少なくとも80%の配列同一性を有し、ムチンに結合するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

20

30

c) 配列番号 58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

40

d) 配列番号 58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、

50

110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、
 130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、
 150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、
 170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、
 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、
 210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、
 230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、
 250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、
 270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、
 290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミノ
 酸配列に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、活性を保持してい
 るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

10

e) 配列番号58、70、2、4、6、8、10、12、14、16、20、22、24
 、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、
 52、54、56、60、62、64、66、68、72、74、80、82、84、8
 6、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、
 110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、
 130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、
 150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、
 170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、
 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、
 210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、
 230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、
 250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、
 270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、
 290、292、294、296、298、300、302、304又は306のアミノ
 酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド
 配列であって、前記ポリペプチドが活性を保持しているヌクレオチド配列。

20

【請求項24】

細菌宿主細胞である、請求項23に記載の微生物宿主細胞。

30

【請求項25】

細菌細胞が、乳酸菌である、請求項24に記載の微生物宿主細胞。

【請求項26】

乳酸菌が、ラクトバチルス・アシドフィルスである、請求項25に記載の微生物宿主細胞
 。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌、すなわちアシドフィルス菌から単離されたポリヌクレオチドと、それ
 らによってコードされているポリペプチドとに関し、また、それらのポリペプチドと、そ
 れらを発現する微生物とを使用する方法にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

この出願は、2003年4月25日に出願された米国特許仮出願第60/465621号
 に基づく権利を主張し、その内容を全体として参照により本明細書に組み込む。

【0003】

アシドフィルス菌 (*Lactobacillus acidophilus*) は、胃腸及び尿生殖路の正常な常住菌
 であって、グラム陽性、桿状、非孢子形成性、同種発酵性の細菌である。最初にMorro
 (1900年) が幼児の糞便から単離して以来、この「酸を好む」生物は、ヒト、母乳を

50

与えられている乳児、及び乳、ラクトース、又はデキストリンの多い食物を摂取している人々の腸管で見出されている。歴史的に、アシドフィルス菌は、胃腸管微生物叢に有益な効果を引き起こすことのできる腸内プロバイオティックとして考えられることが最も多い乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) 種である (Klaenhammer and Russell (2000) "Species of the *Lactobacillus acidophilus* complex," *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2, pp. 1151-1157, Robinson et al. eds. (Academic Press, San Diego, California))。アシドフィルス菌は、ラクトース及びさらに複雑な少糖を含めたヘキソースを発酵させることができ、それによって乳酸を生成し、また、この生物が培養されている環境の pH を低下させる。酸性化した環境 (例えば、食物、腔、及び胃腸管内の領域) は、望ましくない細菌、病原体、及び酵母の成長を妨げることができる。この生物は、その酸耐性、培養乳製品中での生存、並びに、胃及び胃腸管の通過中における生存率によってよく知られている。乳酸桿菌及び他の片利共生細菌 (それらの一部は、「生体に好ましい」プロバイオティック細菌であるとみなされる) は、ヒトの健康に対するそれらの影響に関して、とりわけ、腸内感染及び下痢性疾患の予防又は治療、癌の予防、並びに免疫系の刺激に関して詳細に研究されている。

10

【0004】

グラム陽性菌の細胞壁は、ペプチドグリカン高分子、並びに、タイコ酸、テイクロン酸、リポタイコ酸、リポグリカン、ポリリン酸塩、及び炭化水素などの付属アクセサリー分子から成る (Hancock (1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25:183-187; Salton (1994) *The bacterial cell envelope-a historical perspective*, p. 1-22. In J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (ed.) *Bacterial cell wall*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands)。グラム陽性菌の細胞表面に付随しているタンパク質には、加水分解酵素及びタンパク質分解酵素、多糖、表面排除タンパク質及び凝集促進タンパク質 (交配に関与していると考えられている)、S 層タンパク質 (多くの単細胞生物の外部表面を被包する結晶性アレイのサブユニット)、ソルターゼ (sortase) (LPXTG 様 (配列番号 308) モチーフにおける表面タンパク質の切断を行うトランスペプチダーゼ)、LPXTG 様のモチーフを有するタンパク質、並びに、フィブロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、及び粘液結合タンパク質などの MSCRAMM (微生物表面成分認識性粘着マトリックス分子) が含まれる。

20

【0005】

グラム陽性菌の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質は、他の細胞又は化合物への付着、構造安定性の提供、並びに環境の刺激に対する応答を含めた多くの様々な機能を果たす。細菌の表面タンパク質は、宿主内での生存と、細胞の増殖及び分裂とに重要である。さらに、表面タンパク質は、宿主の免疫系によって認識されて、それによって、免疫促進、変調、又は増進が開始されることも多い。これらのタンパク質の単離及び特性分析は、ヒト又は動物の健康のためになるもの、並びに食物の生産及び安全に関するものを含めた多数の適用がある必須のプロバイオティック産物を開発する補助となるであろう。

30

【特許文献 1】米国特許仮出願第 60 / 465621 号

【非特許文献 1】Klaenhammer and Russell (2000) "Species of the *Lactobacillus acidophilus* complex," *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2, pp. 1151-1157, Robinson et al., eds. (Academic Press, San Diego, California)

40

【非特許文献 2】Hancock (1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25:183-187

【非特許文献 3】Salton (1994) *The bacterial cell envelope-a historical perspective*, p. 1-22. In J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (ed.) *Bacterial cell wall*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands

【発明の開示】

【0006】

乳酸桿菌生物を改変する組成物及び方法を提供する。本発明の組成物は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードする、アシドフィルス菌から単離された核酸分子を含む。詳細には、本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、

50

19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305及び307

に示されるヌクレオチド配列を含む(ヌクレオチド配列からなる:"comprising the nucleotide sequences")単離された核酸分子と、配列番号:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304及び306に示されるアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子とを提供する。本明細書に記載の核酸分子によってコードされているアミノ酸配列を有する単離されているか、または組換え体のポリペプチドも提供する。変種核酸分子、並びに、配列リストに記載するヌクレオチド配列及びアミノ酸配列に十分に同一なポリペプチドも本発明に包含される。さらに、これらのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の断片と、それらに十分に同一な断片も包含される。本発明のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、又は本発明の配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列も包含される。

【0007】

組成物には、本明細書に記載する核酸分子の組換え体発現用のベクター及び宿主細胞もさらに含まれ、また、これらのベクターを含むトランスジェニック微生物群も含まれる。本明細書に記載のベクター及び宿主細胞を作製する方法も本発明に含まれ、また、本発明のポリペプチドの組換え体を産生する方法、及びそれらの使用方法も含まれる。試料中における、本発明の核酸配列又はポリペプチド配列の存在を検出する方法及びキット、並びに、本発明のポリペプチドに結合する抗体もさらに含まれる。

【0008】

本発明の配列によってコードされている細胞壁、細胞表面、及び分泌物のポリペプチド、並びにそれらを発現するトランスジェニック微生物には、健康に関連した恩恵がある。これらのポリヌクレオチド配列で形質転換された微生物は、健康に関連した恩恵を提供するために、医薬組成物又はプロバイオティック組成物として内部摂取することができ、或いはその代わりに、これらの微生物又はそれらがコードしているポリペプチドを、産物とは

10

20

30

40

50

別々に、またそれらに追加して投与することもできる。本発明の核酸分子は、それらを発現する微生物の安定性を高めることもあり、したがって、様々な食物の生産及び加工に有用でありうる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は、アシドフィルス菌の細胞壁、細胞表面、及び分泌物の分子に関する。これらの分子のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を提供する。これらの配列は、生物を改変して利点を促進するのに使用できる。

【0010】

「細胞壁、細胞表面、及び分泌物の分子」によって、アシドフィルス菌における新規の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質を意図する。「細胞壁」によって、細菌細胞の細胞壁に付随して見出されるタンパク質を意図する。本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドに関する場合、「細胞表面」によって、細菌細胞膜に付随して見出されるタンパク質を意図する。「分泌」によって、それがその中で発現される細胞から放出されるタンパク質を意図する。本発明のタンパク質は、細胞壁のタンパク質、細胞表面のタンパク質、又は分泌物のタンパク質のいずれかに分類できるか、或いはこれらの分類における複数に含まれることもある。さらに、「細胞壁、細胞表面、又は分泌物」という用語は、単一のタンパク質を記述するのに使用されることもあるし、複数のタンパク質を記述するのに使用されることもある。具体的な、本発明の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質分子については表1を参照のこと。

10

20

【0011】

これらの新規の、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質は、ペプチドグリカン；タイコ酸；リポテイコ酸；ホモ多糖及びヘテロ多糖を含めた多糖；接着タンパク質；分泌タンパク質；表面（s）層タンパク質；ステロイド結合タンパク質も含みうる、コラーゲン結合タンパク質及び他の細胞表面タンパク質；IemA様のタンパク質；凝集促進タンパク質；表面排除タンパク質；ミオシン交差反応性タンパク質；粘液結合タンパク質及び前駆体；フィブロネクチン結合タンパク質；ソルターゼ；生物膜に付随した表面タンパク；フィブリノーゲン結合タンパク質；トロポミオシン様のタンパク質；FmtB様の表面タンパク；psaA様の付着因子；lysM様のタンパク質；自己融解素；細胞形態決定タンパク質；及び桿形態決定タンパク質からなる群から選択された細胞成分を含む。完全長遺伝子配列は、「細胞壁、細胞表面、及び分泌物の分子の配列」と呼ばれ、細胞壁、細胞表面、及び分泌物の遺伝子に類似性を有することを示す。本発明は、これらの細胞壁、細胞表面、及び分泌物の配列の断片及び変種もさらに提供する。これらの断片及び変種も、本発明の方法を実施するのに用いることができる。

30

【0012】

本明細書で使用する場合、「遺伝子」及び「組換え体遺伝子」という用語は、オープンリーディングフレーム、とりわけ細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードするものを含む核酸分子を指す。本発明の単離された核酸分子は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードする核酸配列と、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、

40

50

256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、
 276、278、280、282、284、286、288、290、292、294、
 296、298、300、302、304及び306に記載のアミノ酸配列（以下、「配
 列番号1～307のうちの偶数」と呼ぶ）をコードする核酸配列と、配列番号：1、3、
 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、3
 3、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59
 、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、
 87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109
 、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129
 、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149 10
 、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169
 、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189
 、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209
 、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229
 、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249
 、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269
 、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289
 、291、293、295、297、299、301、303、305及び307に記載
 の核酸配列（以下、「配列番号1～307のうちの奇数」と呼ぶ）と、これらの変種及び
 断片とを含む。本発明は、以下に記載するアンチセンス核酸分子も包含する。 20

【0013】

加えて、細胞壁又は細胞表面に付随するか、或いは分泌される、単離されたポリペプチド
 及びタンパク質、並びにそれらの変種及び断片も包含される。本発明に関しては、「タン
 パク質」と「ポリペプチド」とは互換性をもって使用される。

【0014】

本発明の組成物及び方法は、アシドフィルス菌の細胞壁、細胞表面、及び分泌物の分子の
 機能を変調するのに使用することができる。「変調する」、「変化させる」、又は「改変
 する」によって、標的生物活性の上方制御、又は下方制御を意図する。本発明のタンパク
 質は、乳酸菌の生物活性を改変するのに有用であり、そして、乳酸菌によって発酵された
 食物の栄養特性、又は健康を促進する特性を改変するのにも有用である。本発明のヌクレ
 オチド分子は、乳酸菌によって発現される細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の
 発現を変調するのに有用である。本発明のポリヌクレオチドからの発現の上方制御及び下
 方制御も包含される。上方制御は、多数の遺伝子コピーを提供することによって、調節エ
 レメントの改変によって発現を変調することによって、転写又は翻訳の機構を促進する
 ことによって、或いは他の方法によって達成することができる。下方制御は、公知のアンチ
 センス技法及び遺伝子サイレンシング技法を用いることによって達成することができる。
 すなわち、本発明のタンパク質は、免疫系、宿主タンパク質の発現、治療効果、安定性、
 及び乳酸菌の他の活性を変調するのに有用である。「乳酸菌」によって、エロコッカス（
Aerococcus）、カルノバクテリウム（*Carnobacterium*）、エンテロコッカス、ラクトコッ
 カス、乳酸桿菌、ロイコノストック（*Leuconostoc*）、エノコッカス（*Oenococcus*）、ペ
 ディオコッカス（*Pediococcus*）、連鎖球菌、メリソコッカス（*Melissococcus*）、アロイ
 オコッカス（*Alloioococcus*）、ドロシグラニユラム（*Dolosigranulum*）、ラクトスフェラ
 （*Lactosphaera*）、テトラジェノコッカス（*Tetragenococcus*）、バゴコッカス（*Vagococ
 cus*）、及びワイセーラ（*Weissella*）から選択された属の細菌を意図する（Holzapfel et
 al. (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 73:365S-373S; *Bergey's Manual of Systematic Bacte
 riology*, Vol. 2 (Williams and Wilkins, Baltimore (1986) pp. 1075-1079)）。 30
 40

【0015】

本発明のポリペプチド、又はそれらを発現する微生物は、栄養添加物又はサプリメントと
 して、また、乳製品及び発酵加工の添加物としても有用である。これらのポリヌクレオチ
 ドの配列、コードされているポリペプチド、及びそれらを発現する微生物は、チーズ、ヨ 50

ーグルト、発酵乳、乳製品、酸乳、及びバターミルクなどの乳から作られる製品の製造に有用である。本発明のポリペプチドを発現する微生物は、プロバイオティック生物でありうる。「プロバイオティック」によって、胃腸管を通過しても生き残っており、かつ、宿主に対して有益な効果を有する、生きている微生物を意図する。「宿主」によって、本発明が開示するポリペプチド、又はそのようなタンパク質を発現する微生物と接触する生物を意図する。宿主は、ヒト及び他の動物を指すことも、また、細菌を指すこともある。

【0016】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、乳から作られる製品の健康に関連した恩恵を改変するのに有用である。これらの使用には、宿主の免疫系を変調すること；宿主のタンパク質又は化合物の発現を変化させること；胃腸障害を治療すること；感染を予防するか、又はその発生を低下させること；対象における有害な化合物を、結合、不活性化、除去、隔離、分解、消化、切断、又は改変すること；微生物が、改変された付着特性を保持するのを可能にすること；対象における虫歯の発生を低減すること；生産動物における飼料変換率を増大させること；微生物又はポリペプチドが他の微生物を抑制する（antagonize）のを可能にすること；食物を汚染から保護すること；創傷を治療すること；微生物の抗生物質の感受性を変調すること；微生物が生物膜を形成するのを可能にするか、又はそのような能力を阻害すること；癌を治療又は予防すること；心臓病を治療すること；及びコレステロールを低下させることが含まれるが、これらに限定されない。これらの使用には、乳酸菌によって産生された食物製品の食感を改変することも含まれる。

10

【0017】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、貯蔵（保管）を含めた工業発酵過程における微生物の安定性を高めるのにも有用である。そのような過程では、様々なストレスへの曝露によって、微生物生存率の低下、代謝活性の障害、及び最適ではない発酵条件が導かれることがある。ストレスは、胃腸管にも存在する。存在しうるストレスには、酸化ストレス、pH、浸透圧ストレス、脱水、炭素飢餓、リン酸塩飢餓、窒素飢餓、アミノ酸飢餓、機械的ストレス、圧力変化、熱又は低温ショック、及び変異原性ストレスが含まれる。

20

【0018】

本発明の核酸分子は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードする。それらは、配列番号1～307のうちの奇数に記載のDNA配列を有する転写産物をコードする。本発明のヌクレオチド配列によってコードされているアミノ酸配列を、配列番号1～307のうちの偶数に記載する。

30

【0019】

本発明の単離された核酸分子は、本明細書に開示されている細胞壁、細胞表面、及び分泌物のヌクレオチド配列、並びにそれらの断片及び変種に加えて、本明細書に開示されている細胞壁、細胞表面、及び分泌物のヌクレオチド配列又はそれらの変種及び断片から得られた配列の全体又は部分とのハイブリダイゼーションによって、他の生物又は細胞から同定及び単離された相同DNA配列も包含する。

【0020】

本発明によって包含される核酸組成物及びタンパク質組成物は、単離されているか、又は実質的に精製されている。「単離されている」又は「実質的に精製されている」によって、核酸若しくはタンパク質分子、又は生物学的に活性な断片若しくは変種が、天然の状態にある、それらの核酸又はタンパク質に、通常、付随して見出される成分を、実質的又は本質的に含まないことを意図する。そのような成分には、他の細胞物質と、組換え体生成における培地と、タンパク質又は核酸の化学合成に使用される様々な化学物質とが含まれる。本発明の「単離されている」核酸は、その核酸が由来した生物のゲノムDNA中で、注目している核酸に隣接している核酸配列（5'又は3'末端に存在するコード配列など）を含まないことが好ましい。しかし、これらの分子は、その組成物の基本特性に有害な影響を与えない塩基又は部分をいくらか追加して含んでもよい。例えば、様々な実施形態において、単離されている核酸は、それが由来した細胞のゲノムDNAに、通常、付随し

40

50

ている核酸配列を、5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、又は0.1 kb未満含有している。同様に、実質的に精製されているタンパク質は、(乾燥重量で)約30%、20%、10%、5%、又は1%の混入タンパク質、又は細胞壁、細胞表面、若しくは分泌物ではないタンパク質を有する。そのタンパク質が組換えによって生成されている場合には、培地が、そのタンパク質調製物の体積の30%、20%、10%、又は5%未満であることが好ましく、そして、そのタンパク質が化学的に生成されている場合には、その調製物は、(乾燥重量で)約30%、20%、10%、又は5%未満の化学前駆体、又は細胞壁、細胞表面、若しくは分泌物ではないタンパク質化学物質を有する。

【0021】

(断片及び変種)

本発明は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、さらに、それによってコードされている、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質も提供する。「細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質」によって、配列番号1~307のうちの偶数に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質を意図する。これらのヌクレオチド配列の断片及び変種、並びにそれらにコードされているタンパク質も提供する。ヌクレオチド配列又はタンパク質の「断片」によって、そのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の部分を意図する。

【0022】

本明細書に開示されている核酸分子の断片は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードする核酸を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして、又は細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の核酸分子のPCR増幅又は変異誘発におけるプライマーとして用いることができる。核酸の断片は、物理的な基質に結合して、マイクロアレイ又はマイクロアレイとみなせるものを構成することができる(例えば、米国特許第5837832号;米国特許第5861242号;WO89/10977;WO89/11548;WO93/17126;米国特許第6309823号を参照)。核酸のそのようなアレイは、遺伝子発現を研究するのに、又は標的配列に十分な同一性を有する核酸分子を同定するのに用いることができる。「ポリヌクレオチド」又は「核酸分子」によって、DNA分子(例えば、cDNA又はゲノムDNA)及びRNA分子(例えば、mRNA)並びにヌクレオチド類似体を用いて生成されるDNA類似体又はRNA類似体のセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方を意図する。核酸分子は、一本鎖でも、二本鎖でもよいが、二本鎖DNAであることが好ましい。細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードしている核酸分子の断片は、生物学的に活性なタンパク質断片をコードするものでもよく、或いは、以下に記述するハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして用いてもよい。本明細書に開示されているポリペプチドの生物学的に活性な断片は、本発明のヌクレオチド配列のうちの一配列の部分を単離し、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質がコードされている部分を発現し(例えば、*in vitro*での組換え体発現によって)、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質がコードされている部分の活性を評価することによって調製することができる。細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質をコードする核酸分子の断片は、少なくとも約15、20、50、75、100、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000ヌクレオチド、或いは、最大で、本明細書に開示されている、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の完全長ヌクレオチド配列に存在するヌクレオチドの総数(例えば、配列番号1では918、配列番号3では573、配列番号5では7617など)を含む。

【0023】

本発明のヌクレオチド配列の断片は、細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質の生物活性を保持するタンパク質断片をコードし、したがって、細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質活性を保持するであろう。「活性を保持する」によって、配列番号1~307のうちの偶数に開示する、細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質活性の少なくとも約30%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約70%、さら

10

20

30

40

50

により好ましくは少なくとも約80%を、その断片が有するであろうことを意図する。細胞表面、細胞膜、又は分泌物の活性を測定する方法は、当技術分野で周知である。機能アッセイの例としては、例えば、下記の実施例の項、又は「使用の方法」と題した項を参照のこと。

【0024】

アミノ酸配列の断片には、細胞壁、細胞表面、及び分泌物に対する抗体を産生する免疫原として使用するのに適したポリペプチド断片が含まれる。断片には、本発明の、細胞壁、細胞表面、若しくは分泌物のタンパク質のアミノ酸配列、又はその部分長タンパク質に十分に同一であるか、又はそれに由来するアミノ酸配列を含むペプチドであって、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の少なくとも1つの活性を示すペプチドが含まれるが、これらのペプチドは、本明細書に開示されている完全長の、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質より少ないアミノ酸を含む。通常、生物学的に活性な部分は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の活性の少なくとも1つを有するドメイン又はモチーフを含む。細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、連続した10、25、50、100、150、200アミノ酸の長さのポリペプチド、或いは、最大で、本発明の細胞壁、細胞表面、又は分泌物の完全長タンパク質に存在するアミノ酸の総数（例えば、配列番号2では306、配列番号4では191、配列番号6では2539など）を含む。そのような生物学的に活性な部分は、組換え技法によって調製され、天然の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の機能活性の1つ又は複数に関して評価することができる。本明細書で使用する場合、断片は、配列番号1～307のうち

10

20

【0025】

ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の変種も本発明に包含される。「変種」によって、十分に同一な配列を意図する。したがって、本発明は、配列番号1～307のうち

30

40

【0026】

本発明によって包含される変種タンパク質は、生物学的に活性であって、すなわち、天然タンパク質における望ましい生物活性、すなわち、本明細書に記載する、天然の、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質が有する1つ又は複数の機能活性を保持する。「活性を保持する」によって、配列番号1～307のうち

50

膜、又は分泌物のタンパク質活性の少なくとも約30%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%を、その変種が有するであろうことを意図する。細胞表面、細胞膜、又は分泌物の活性を測定する方法は、当技術分野で周知である。機能アッセイの例としては、例えば、下記の実施例の項、又は「使用の方法」と題した項を参照のこと。本発明のタンパク質の生物学的に活性な変種は、前者のタンパク質との相違が1~15アミノ酸残基という小さいものでもよく、6~10アミノ酸残基のもの、5アミノ酸残基という小さいもの、4、3、2、又は最小で1アミノ酸残基という小さいものなど、1~10アミノ酸残基という小さいものでもよい。

【0027】

自然発生の変種が集団（例えば、アシドフィルス菌集団）内に存在することもある。そのような変種は、以下に記述するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、及びハイブリダイゼーションなど、周知の分子生物学技法を用いることによって、同定することができる。合成によって得られたヌクレオチド配列、例えば、依然として細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードしている、部位特異的変異誘発又はPCRに媒介された変異誘発によって生成された配列も、変種に含まれる。本明細書に開示するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に、1つ又は複数のヌクレオチド又はアミノ酸の置換、付加、又は欠失を導入して、それによって、コードされているタンパク質に置換、付加、又は欠失を導入することができる。付加（挿入）又は欠失（トランケーション）は、天然タンパク質のN末端又はC末端に行っても、或いは、天然タンパク質中の1つ又は複数の部位に行ってもよい。同様に、天然タンパク質中の1つ又は複数の部位で、1つ又は複数のヌクレオチド又はアミノ酸の置換を行ってもよい。

【0028】

例えば、保存的なアミノ酸置換を、予測されるアミノ酸残基、好ましくは非必須アミノ酸残基の1つまたは複数で行ってもよい。「非必須」アミノ酸残基は、あるタンパク質の野生型配列から、その生物活性を変化させずに、変化させることができる残基であり、一方、「必須」アミノ酸は、生物活性に必要である。「保存的なアミノ酸置換」は、その際にそのアミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で公知である。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。そのような置換は、保存されているアミノ酸残基、又は保存されているモチーフ中に常在するアミノ酸残基がタンパク質活性に必須である場合、そのような残基には作製されないだろう。

【0029】

別法として、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のコード配列の全長にわたって、又はその部分に、飽和変異誘発など、無作為に変異を生成することもできる。変異体は、組換え体発現して、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の天然タンパク質の1つ又は複数の機能活性について、標準的なアッセイ技法を用いて検査することによって、生物活性を保有するものを求めて、スクリーニングすることができる。変異誘発及びヌクレオチド配列改変の方法は当技術分野で公知である例えば、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York)、及びそこに引用されている参考文献を参照のこと。自明のことであるが、変種をコードするDNA中に生成される変異は、リーディングフレームを破壊するものであってはならず、また、mRNAの二次構造を生成するかもしれない相補領域を生成しないものが好ましいであろう。欧州特許出願公開第75444号を参照のこと。

10

20

30

40

50

注目しているタンパク質の生物活性に影響を与えない適切なアミノ酸置換に関する指導を、参照により本明細書に組み込まれている、Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)のモデルに見出すことができる。

【0030】

本発明が包含するタンパク質配列の欠失、挿入、及び置換は、タンパク質の特性に根本的な変化を生成しないと予測されるものである。しかし、置換、欠失、又は挿入の正確な影響を、事前に予測するのが困難である場合には、その影響が通常のスクリーニングアッセイによって評価されるであろうことを当業者は理解するであろう。すなわち、活性は、改変された配列の活性を、元の配列の活性に比較することによって、評価されることができる。例えば、g u s Aの改変によって、酵素活性及び酵素安定性の変化が生じた (Matsumura and Ellington (2001) J. Mol. Biol. 305:331-9; Flores and Ellington (2002) J. Mol. Biol., 315:325-37を参照)。ラクターゼでも同様の研究が行われた。

【0031】

本発明の変種ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、DNAシャッフルなど、変異誘発操作及び組換え体生成操作によって得られた配列も包含する。望ましい特性を有する新規の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質を生成するのに、そのような操作で、1つ又は複数の異なった細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質のコード領域を用いることができる。この方法で、実質的な配列同一性を有し、*in vitro*又は*in vivo*で相同組み換えしうる配列領域を含む、関連した配列のポリヌクレオチドの集団から、組換え体ポリヌクレオチドのライブラリーを生成する。例えば、酵素の場合における K_m の増大など、注目している特性が改善されているタンパク質をコードする新規の遺伝子を得るために、このアプローチを用いて、本発明の細胞壁、細胞表面、又は分泌物の遺伝子と、既知の他の遺伝子の細胞壁、細胞表面、又は分泌物の遺伝子との間で、注目しているドメインをコードする配列モチーフをシャッフルすることができる。そのようなDNAシャッフルのストラテジーは当技術分野で公知である。例えば、Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 ; Stemmer (1994) Nature 370:389-391 ; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438 ; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347 ; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509 ; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291 ; 並びに、米国特許第5605793号及び第5837458号を参照のこと。

【0032】

細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の変種は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のアゴニスト(ミメティック)、或いは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のアンタゴニストとして機能しうる。細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のアゴニストは、天然存在型の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の生物活性に実質的に同一のもの、またはそれらのサブセットを保持しうる。細胞壁、細胞表面、又は分泌物タンパク質のアンタゴニストは、例えば、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質を含む細胞シグナリングカスケードの下流又は上流のメンバーに競合的に結合することによって、天然存在型の細胞壁、細胞表面、又は分泌物タンパク質の活性の1つまたは複数を阻害することができる。

【0033】

アゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとして機能する細胞壁、細胞表面、又は分泌物タンパク質の変種は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の変異体、例えばトランケーション変異体のコンビナトリアルライブラリーを、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質のアゴニスト又はアンタゴニスト活性に関してスクリーニングすることによって同定することができる。一実施形態では、細胞壁、細胞表面、及び分泌物変種の多様化されたライブラリーが、核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発で生成され、多様化された遺伝子ライブラリーによってコードされている。細胞壁、細胞表面、及び分泌物変種の多様化されたライブラリーは、例えば、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合

物を酵素的に連結し、それによって、細胞壁、細胞表面、及び分泌物の潜在的な配列の縮重セットを、個々のポリペプチドとして、或いは、その中に細胞壁、細胞表面、及び分泌物配列のセットを含有するさらに大きな融合タンパク質（例えば、ファージディスプレイ用の）のセットとして発現することによって生成することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から細胞壁、細胞表面、及び分泌物の潜在的な変種のライブラリーを生成するのに使用できる様々な方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成は、DNA自動合成機で行うことができ、その後、合成遺伝子を適切な発現ベクターに連結する。遺伝子の縮重セットを使用することによって、所望のセットの細胞壁、細胞表面、又は分泌物の潜在的なタンパク質配列をコードする配列すべてを1つの混合物中に準備することが可能となる。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当技術分野で公知である（例えば、Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3 ; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 ; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056 ; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。

【 0 0 3 4 】

さらに、細胞壁、細胞表面、及び分泌物タンパク質コード配列の断片のライブラリーは、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の変種のスクリーニングと、その後の選別とを行うための、細胞壁、細胞表面、及び分泌物の断片の多様化された集団を生成するのに用いることもできる。一実施形態では、細胞壁、細胞表面、又は分泌物コード配列の二本鎖のPCR断片を、ニックングが1分子あたりおよそ一度だけ起こるような条件下に、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なったニックング産物のセンス/アンチセンス対を含むことができる二本鎖DNAが形成されるようにDNAを再生させること、S1ヌクレアーゼ処理によって、再形成された二本鎖分子から一本鎖部分を除去すること、及びこの結果得られた断片ライブラリーを発現ベクターに連結することによって、コード配列断片のライブラリーを生成することができる。この方法によって、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質の、様々な大きさのN末端断片及び内部断片をコードする発現ライブラリーを得ることができる。

【 0 0 3 5 】

点突然変異又はトランケーションによって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする技法、及び選択された特性を有する遺伝子産物を得るためにcDNAライブラリーをスクリーニングする技法が、いくつか当技術分野で知られている。そのような技法は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの急速スクリーニングに適合させることができる。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするのに最も広範に使用されている技法はハイスループット分析になじみやすいものであるが、それらは、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、この結果得られたベクターのライブラリーで適当な細胞を形質転換すること、及び所望の活性の検出によって、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離が促進される条件下にコンビナトリアル遺伝子を発現することを通常含む。再帰的アンサンブル変異誘発 (Recursive ensemble mutagenesis) (REM) は機能を有する変異体の、ライブラリー中における頻度を増大する技法であるが、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の変種を同定するのに、スクリーニングアッセイと組み合わせて、この技法を用いることができる (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815 ; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331)。

【 0 0 3 6 】

(配列同一性)

グラム陽性菌の細胞壁、細胞表面、及び分泌物の配列は、それらが多様な範囲の機能を有し、かつ、複数のタンパク質ファミリーのものであるのにもかかわらず、それらのデザインにおいていくつかの共通のテーマを有している (Navarre and Schneewind (1999) *Micro. Mol. Biol. Rev.* 63:174-229を参照)。N末端ドメインは、通常、結合活性又は触媒活性を含有するが、それに続いて様々な大きさの反復ドメインがいくつかあることが多く、これらの反復ドメインは、活性をもつ場合も、もたない場合もある (Navarre and Schn

ewind (1999) *Micro. Mol. Biol. Rev.* 63:174-229)。プロリンに富んだ一続きのアミノ酸残基は、タンパク質構造にランダムコイルを導入することがあり、ペプチドグリカン複合体を横断する際の補助となりうるが、L P X T Gモチーフの直前に見出されることが多い(配列番号308、Navarre and Schneewind (1999) *Micro. Mol. Biol. Rev.* 63:174-229)。

【0037】

「ファミリー」によって、十分なヌクレオチド同一性又はアミノ酸配列同一性を有する2つ以上のタンパク質又は核酸分子を意図する。「配列同一性」は、指定の比較ウィンドウにおいて一致が最大となるように2つの配列を整列させた際、同一となるヌクレオチド残基又はアミノ酸残基を意図するものである。「比較ウィンドウ」によって、2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の最適アライメントのための連続したセグメントを意図し、この際、第2の配列は、第1の配列と比較して、付加又は欠失(すなわちギャップ)を含有してもよい。通常、核酸アライメントでは、比較ウィンドウは、連続した少なくとも20ヌクレオチドの長さであり、任意選択で、30、40、50、100、又はさらに長くともできる。アミノ酸配列アラインメントでは、比較ウィンドウは、連続した少なくとも6アミノ酸の長さであり、任意選択で、10、15、20、30、又はさらに長くともできる。当業者ならば、ギャップの包含によって類似性が高くなるのを回避するために、通常、ギャップペナルティーが導入され、一致の数から減算されることを理解している。

10

【0038】

ファミリーメンバーは、同一種のもので、異なった種のものでよく、相同なタンパク質を含むことができ、また、明確に異なったタンパク質を含むこともできる。ファミリーメンバーは、共通の機能特性を示すことが多い。相同体の単離は、本明細書に開示するアシドフィルス菌細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の核酸配列に対するそれらの同一性に基づいて、cDNA又はその部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、以下に開示するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件における標準的なハイブリダイゼーション技法に従って行うことができる。

20

【0039】

2つのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列の同一性の比率を判定するためにアライメントを実施する。2つの配列の同一性の比率は、比較ウィンドウ中の2つの配列によって共有されている同一残基数の関数である(すなわち、同一性の比率 = 同一残基数 / 総残基数 × 100)。一実施形態では、これらの配列が同じ長さである。2つの配列間における同一性の比率を判定するのに、以下に述べるものと同様の方法を用いることができる。これら方法は、ギャップを許容する場合にも、許容しない場合にも用いることができる。アライメントは、手操作の点検によっても実施できる。

30

【0040】

アミノ酸配列の相違が保存的な置換による場合、同一性の比率を上方調整して、置換の保存的な性質に関する修正を行うこともできる。この調節を行う方法は当技術分野で公知である。通常、保存的な置換は、完全な不一致ではなく、部分的な不一致として計算され、それによって、配列同一性の比率が増大する。

40

【0041】

2つの配列の同一性比率を判定するのに数学的アルゴリズムを用いることができる。数学的アルゴリズムの非限定的な例には、Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877において修正されている、Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264のアルゴリズム; Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17のアルゴリズム; Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482の局所アライメントアルゴリズム; Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453の相同性アライメントアルゴリズム; 及び Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448の類似性探索法 (search-for-similarity-method) がある。

【0042】

50

これらの数学的アルゴリズムに基づく様々なコンピューターインプリメンテーションが、配列同一性の判定を可能にするために設計されている。Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403のBLASTプログラムは、上記のKarlin and Altschul (1990)のアルゴリズムに基づいている。本発明のヌクレオチド配列に相同なヌクレオチド配列を得るための検索は、スコア = 100、語長 = 12で、BLASTNプログラムを用いて実施することができる。本発明のタンパク質又はポリペプチドをコードする配列に相同なアミノ酸配列を得るには、スコア = 50、語長 = 3で、BLASTXプログラムを用いることができる。Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389に記載されているように、ギャップつきBLASTを用いることによって、ギャップつきアライメントを得ることもできる。分子間の疎遠な関連性を検出するのに、PSI-BLASTを用いることもできる。上記のAltschul et al. (1997)を参照のこと。すべてのBLASTプログラムに、各プログラムのデフォルトパラメータを用いることができる。www.ncbi.nlm.nih.govを参照のこと。

10

【0043】

配列同一性の比率を判定するのに使用できる別のプログラムに、ALIGNプログラム(バージョン2.0)があるが、これは、上記のMyers and Miller (1988)の数学的アルゴリズムを用いたものである。アミノ酸配列の比較を行う場合、このプログラムで、PAM120重み残基表を用い、ギャップ長ペナルティーを12、そしてギャップペナルティーを4とすることができる。

【0044】

ALIGN及びBLASTプログラムに加えて、BESTFIT、GAP、FASTA、及びTFASTAプログラムが、Wisconsin遺伝学ソフトウェアパッケージ(GCG社、Madison、Wisconsin)の一部であり、配列アラインメントを実施するのに使用できる。好ましいプログラムはGAPバージョン10であるが、このプログラムは上記Needleman and Wunsch (1970)のアルゴリズムを用いている。別段の記載がない限り、本明細書に提示する配列同一性類似性値は、以下のパラメータでGAPバージョン10、又は任意の同等のプログラムを用いて得られた値を指す。すなわち、ヌクレオチド配列の同一性%及び類似性%には、ギャップ重みを50、ギャップ長重みを3として、nws gap dna . cmpスコアリングマトリックスを用い；アミノ酸配列の同一性%及び類似性%には、ギャップ重みを8、ギャップ長重みを2として、BLOSUM62スコアリングマトリックスを用いる。「同等のプログラム」によって、GAPバージョン10によって生成された対応するアライメントと比較した際に、問題となるいかなる2つの配列に関しても、等しいヌクレオチド残基一致又はアミノ酸残基一致と、等しい同一性比率とを有するアライメントを生成するいかなる配列比較プログラムも意図する。

20

30

【0045】

(相同配列の同定及び単離)

本明細書に記載の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のヌクレオチド配列、又はそれらの断片及び変種に対する配列同一性に基づいて同定された細胞壁、細胞表面、及び分泌物のヌクレオチド配列も、本発明によって包含される。cDNA又はゲノムライブラリーから、例えば、本発明の配列に実質的に同一な配列を同定するのに、PCR又はハイブリダイゼーションなどの方法を用いることができる。例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, New York) and Innis, et al., (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, New York)を参照のこと。そのようなcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを構築するための方法は、当技術分野で一般に知られており、さらに、上記の参考文献にも開示されている。

40

【0046】

ハイブリダイゼーション技法において、ハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNA断片、cDNA断片、RNA断片、又は他のオリゴヌクレオチドである場合があり、また、本明細書に開示する既知のヌクレオチド配列の全体から成る場合も、一部から成る場

50

合もある。さらに、 ^{32}P などの検出可能な官能基、或いは、他の放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、又は酵素補助因子など、いかなる他の検出可能なマーカーで、それらを標識してもよい。ハイブリダイゼーション用のプローブは、本明細書に開示する既知の細胞壁、細胞表面、及び分泌物ヌクレオチド配列に基づいた合成オリゴヌクレオチドを標識することによって生成することができる。さらに、既知の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のヌクレオチド配列又はコードされているアミノ酸配列中で保存されているヌクレオチド残基又はアミノ酸残基に基づいて設計された縮重プライマーも用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブは、本発明の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のヌクレオチド配列、又はその断片若しくは変種における、連続した少なくとも約10、好ましくは約20、より好ましくは、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、又は400ヌクレオチドに、ストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を通常含む。様々な条件下で特異的なハイブリダイゼーションを実現するために、そのようなプローブは細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質配列の間で独特の配列を含む。ハイブリダイゼーション用のプローブ調製物は、当技術分野で一般に知られており、参照により本明細書に組み込まれているSambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)に開示されている。

10

【0047】

一実施形態では、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードする全ヌクレオチド配列を、新規の細胞壁、細胞表面、又は分泌物の配列及びメッセンジャーRNAを同定するプローブとして用いる。別の実施形態では、このプローブは、本明細書に開示するヌクレオチド配列の断片である。実施形態の一部では、ストリンジентな条件下でこのプローブにハイブリダイズするヌクレオチド配列の長さが、少なくとも約300、325、350、375、400、425、450、500、550、600、650、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、12000、又は12500ヌクレオチドでありうる。

20

【0048】

実質的に同一な配列は、ストリンジентな条件下で相互にハイブリダイズするであろう。「ストリンジентな条件」によって、その条件下で、プローブがその標的配列にハイブリダイズする程度が、他の配列に対してより、検出可能に大きい(例えば、少なくともバックグラウンドの2倍)ものとなる条件を意図する。通常、ストリンジентな条件は、少なくとも約60%、65%、70%、好ましくは75%の配列同一性を有するヌクレオチドが、通常、その条件下で相互にハイブリダイズしたまま残るような、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を包含する。ストリンジентな条件は、当技術分野で公知であり、*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York (1989)), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。ハイブリダイゼーションは、典型的には約24時間以内、通常は約4から約12時間の間に起こる。

30

【0049】

ストリンジентな条件は、配列に依存し、異なった状況では相違するであろう。本発明によって包含される相同体及びオーソログを得るのに、完全長の核酸配列を用いる場合も、部分的な核酸配列を用いる場合もある。「オーソログ」によって、共通の祖先遺伝子に由来する遺伝子であって、種分化の結果として異なった種に見出される遺伝子を意図する。異なった種に見出された遺伝子は、それらのヌクレオチド配列、及び/又はそれらにコードされているタンパク質配列が、本明細書の他の場所で定義する実質的な同一性を共有する場合にオーソログであるとみなされる。オーソログの機能は、種相互で強く保存されていることが多い。

40

【0050】

プローブを用いる際、ストリンジентな条件とは、塩濃度が約1.5M Naイオン未満、典型的には、pH7.0から8.3で、約0.01から1.0M Naイオン濃度(

50

又は他の塩)であり、かつ、温度が短いプローブ(例えば10から50ヌクレオチド)用には少なくとも約30、そして、長いプローブ(例えば50ヌクレオチド超)用には少なくとも約60である条件であろう。

【0051】

ハイブリダイゼーション後の洗浄は、特異性を制御する手段となる。最終洗浄溶液のイオン強度及び温度が、2つの重要因子である。完全長か、又はほぼ完全長の標的配列にハイブリダイズする配列の検出では、ストリンジেন্টな条件下にある温度は、所定のイオン強度及びpHにおける、特定の配列の融点温度(T_m)より約5低く選択する。しかし、ストリンジেন্টな条件は、本明細書において別の方法で認定する所望の程度のストリンジエンシーに応じて、 T_m より1から20の範囲で低い温度を包含するであろう。DNA-DNAハイブリッドでは、Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284の方程式： $T_m = 81.5 + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - (0.61(\% \text{ フォルム}) - 500)/L$ を用いて T_m を判定することができ；式中、Mは一価陽イオンのモル濃度であり、%GCはDNA中のグアノシン及びシトシンヌクレオチドの割合であり、%フォルムはハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの割合であり、そして、Lはハイブリットの長さを塩基対で表したものである。 T_m は、相補的な標的配列の50%が、完全に一致したプローブにハイブリダイズする温度(特定のイオン強度及びpHの下で)である。

10

【0052】

ハイブリダイゼーション条件及び/又は洗浄条件のストリンジエンシーを変えることによって、異なった程度の相同性を有する配列を検出する能力を得ることができる。100%同一の配列を標的にする(相同プロービング)には、不一致を許容しないストリンジエンシー条件を得なければならない。ヌクレオチド残基の不一致が起こるのを許容することによって、より低い程度の類似性を有する配列を検出することができる(異種プロービング)。不一致が1%あるごとに、 T_m が約1低下し、したがって、標的とする同一性比率を有する配列のハイブリダイゼーションを許容するように、ハイブリダイゼーション条件及び/又は洗浄条件を操作することができる。例えば、>90%の配列同一性を有する配列が好ましい場合、 T_m が10低下しているものとすることができる。2つのヌクレオチド配列は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合には、ストリンジেন্টな条件下で相互にハイブリダイズしないにもかかわらず、実質的に同一であるかもしれない。このような状況は、例えば、遺伝コードにおける最大限のコドン縮重を用いて核酸のコピーを生成した場合に起こるかもしれない。

20

30

【0053】

低ストリンジエンシー条件の例には、30~35%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、37の緩衝溶液を用いたハイブリダイゼーション、及び1Xから2X SSC(20X SSC = 3.0M NaCl / 0.3Mクエン酸3ナトリウム)中、50~55での洗浄が含まれる。中程度ストリンジエンシー条件の例には、40から45%ホルムアミド、1.0M NaCl、1% SDS中、37でのハイブリダイゼーション、及び0.5Xから1X SSC中、55から60での洗浄が含まれる。高ストリンジエンシー条件の例には、50%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS中、37でのハイブリダイゼーション、及び0.1X SSC中、60から65での洗浄が含まれる。任意選択で、洗浄緩衝液は、約0.1%から約1%のSDSを含みうる。通常、ハイブリダイゼーションの時間は、一般的には24時間未満、通常は約4から約12時間である。核酸のハイブリダイゼーションを行うための詳細なガイドが、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)に見出される。Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)を参照のこと。

40

50

【 0 0 5 4 】

PCRアプローチでは、対応するDNA配列を、任意の注目している生物から抽出されたcDNA又はゲノムDNAから増幅するPCR反応で使用するために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。PCRプライマーは、長さが少なくとも約10ヌクレオチドであることが好ましく、また、長さが少なくとも約20ヌクレオチドであることが最も好ましい。PCRプライマーを設計する方法、及びPCRクローニングの方法は、当技術分野で一般的に知られており、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)に開示されている。Innis et al., eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press: New York); 及びInnis and Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, New York)も参照のこと。公知のPCR法には、対にされたプライマー、入れ子にされたプライマー、単一の特異的プライマー、縮重プライマー、遺伝子特異的プライマー、ベクター特異的プライマー、部分的な不一致を有するプライマー、及び同様のものを用いた方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 0 5 5 】

(アッセイ)

試料中における開示のポリペプチド及び/又は核酸分子の発現、並びにそれらにおける開示の活性を検出する診断アッセイを開示する。試料中における開示の核酸、又は開示のポリペプチドを含むタンパク質の存在又は不在を検出する方法の一例では、食物製品/乳製品/飼料産物、発端培養(母、種子、原体/セット、濃縮、乾燥、凍結乾燥、凍結)、培養された食物製品/乳製品/飼料産物、栄養補助食品、バイオプロセスを行っている発酵物、又はプロバイオティック物質を摂取した対象から試料を取得し、開示のポリペプチド又は核酸(例えば、開示の核酸、又はその断片を含むmRNA又はゲノムDNA)を検出できる化合物又は薬剤に上記試料を、開示の配列の存在が試料中に検出されるように接触させる。食物、サプリメント、培養、産物、又は対象からの試料から得られた結果は、対照の培養、産物、又は対象からの試料から得られた結果と比較することができる。

20

【 0 0 5 6 】

開示のヌクレオチド配列を含むmRNA又はゲノムDNAを検出する薬剤の1つは、開示のヌクレオチド配列のmRNA又はゲノムDNAにハイブリダイズできる標識されている核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、長さが少なくとも15、30、50、100、250、又は500ヌクレオチドであって、かつ、開示の核酸配列を含むmRNA又はゲノムDNAにストリンジентな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分である核酸分子など、配列番号1~307のうちの奇数の核酸又はその部分などの開示の核酸分子でありうる。本発明の診断アッセイで使用するための他の適当なプローブも本明細書に記述する。

30

【 0 0 5 7 】

開示のポリペプチド配列を含むタンパク質を検出する薬剤の1つは、開示のポリペプチドに結合できる抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を備えた抗体である。抗体は、ポリクローナルでもよく、より好ましくはモノクローナルである。完全な抗体、又はその断片(例えば、Fab又はF(ab')₂)を用いることができる。プローブ又は抗体に関して、「標識されている」という用語は、検出可能な物質をプローブ又は抗体に結合する(すなわち、物理的に連結させる)ことによって、プローブ又は抗体を直接標識することを包含し、また、直接的に標識されている別の試薬との反応性によって、プローブ又は抗体を間接標識することも包含するものとする。間接標識の例には、蛍光によって標識されている二次抗体を用いた一次抗体の検出と、蛍光標識されているストレプトアビジンで検出できるような、ビオチンによるDNAプローブの末端標識とが含まれる。

40

【 0 0 5 8 】

「試料」という用語は、対象の中に存在するか、又は対象から単離された組織、細胞、及び生物体液を含み、さらに、発端培養からの細胞、又はそのような培養を随伴するか、或

50

いはそのような培養の使用から得られる食物製品も含むものとする。すなわち、本発明の検出法は、試料中における、開示の配列を含むmRNA、タンパク質、又はゲノムDNAを、*in vitro*及び*in vivo*の両方で検出するのに用いることができる。開示の配列を含むmRNAを検出する*in vitro*技法には、ノーザンハイブリダイゼーション及び*in situ*ハイブリダイゼーションが含まれる。開示のポリペプチドを含むタンパク質を検出のための*in vitro*技法には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウエスタンブロット、免疫沈降反応、及び免疫蛍光が含まれる。開示のヌクレオチド配列を含むゲノムDNAを検出のための*in vitro*技法には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。加えて、開示のポリペプチドを含むタンパク質を検出する*in vivo*技法には、開示のポリペプチドに対する標識抗体を対象に導入することが

10

【0059】

一実施形態では、試料は、プロバイオティック物質を摂取した試験対象からのタンパク質分子を含有する。別法として、試料は、発端培養からのmRNA又はゲノムDNAを含有するものでありうる。

【0060】

本発明は、試料中における、開示の核酸、又は開示のポリペプチドを含むタンパク質の存在を検出するキットも包含する。そのようなキットは、本発明の特定のポリペプチドを発現する微生物が、食物製品若しくは発端培養、又はプロバイオティック物質を摂取した対象の中に存在しているかどうか判定するのに用いることができる。例えば、キットは、試料中における、開示のポリペプチド又はmRNAを検出できる標識された化合物又は薬剤と、試料中における、開示のポリペプチドの量を測定する手段とを含むことがある(例えば、開示のポリペプチドを認識する抗体、又は開示のポリペプチド、例えば、配列番号1~307のうちの任意の偶数のものをコードするDNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ)。キットは、そのような化合物の使用に関して詳しく述べる説明書も含むことがある。

20

【0061】

抗体ベースのキットでは、キットは、例えば、(1)開示のポリペプチドに結合する第1の抗体(例えば、固形担体に結合している)と、任意選択で、(2)開示のポリペプチド、又は第1の抗体に結合し、かつ、検出可能な薬剤に結合している第2の異なった抗体とを含むものでありうる。オリゴヌクレオチドベースのキットでは、キットは、例えば、(1)開示の核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば検出可能に標識されているオリゴヌクレオチド、又は(2)開示の核酸分子を増幅するのに有用な一対のプライマーを含むものでありうる。

30

【0062】

キットは、例えば、緩衝薬、保存剤、又はタンパク質安定化剤も含むことがある。キットは、検出可能な薬剤(例えば酵素又は基質)を検出するのに必要な構成要素を含むことがある。キットは、アッセイして、含まれている試験試料と比較することができる対照試料又は一連の対照試料も含むことがある。キットの各構成要素は、通常、個々の容器に入れられ、これらの様々な容器のすべてが、使用に関する説明書を伴った単一のパッケージの中にある。

40

【0063】

一実施形態では、キットは、例えば、参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5412087号及び第5545531号、並びにWO95/00530に記載のものなど、アレイフォーマットの複数のプローブを含む。アレイで使用するためのプローブは、WO95/00530に開示されているように、アレイの表面で直接合成することもできるし、アレイの表面に固定する前に合成することもできる(Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis a Practical Approach* IRL Press, Oxford, England)。プローブは、米国特許第5412087号に記載のものなど、当業者に周知の技法を用いて表面に固定

50

することができる。プローブは、核酸配列若しくはペプチド配列、好ましくは精製されたもの、又は抗体でありうる。

【0064】

アレイは、生物、試料、又は産物を、特定の配列又はタンパク質の存在又は不在を含めた、それらのゲノムcDNA、ポリペプチド、又は抗体の内容の相違、そして、それらの物質の濃度の相違に関してスクリーニングするのに用いることができる。捕捉プローブに対する結合は、例えば、開示の核酸配列を含む核酸分子、開示のアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は抗体に結合した標識から生成されるシグナルによって検出する。この方法は、開示の核酸、ポリペプチド、又は抗体を含む分子を、複数の捕捉プローブを有する第1のアレイ、及び異なった複数の捕捉プローブを有する第2のアレイと接触させることを含みうる。それぞれのハイブリダイゼーションの結果を比較して、第1の試料と、第2の試料との間の発現の相違を分析することができる。第1の複数の捕捉プローブは、対照試料、例えば、野生型の乳酸菌から得たもの、又は対照対象、例えば、食物、栄養補助食品、発端培養試料、または生物体液から得たものでありうる。第2の複数の捕捉プローブは、実験試料、例えば変異体型乳酸菌から得たもの、或いはプロバイオティック物質、例えば、発端培養試料又は生物体液を摂取した対象から得たものでありうる。

10

【0065】

これらのアッセイは、微生物の選択と、不要物の検出を必須とする品質管理操作とに特に有用でありうる。特定のヌクレオチド配列又はポリペプチドの検出は、食物、発酵産物、若しくは産業微生物の遺伝子組成、又はプロバイオティクスを摂取した動物若しくはヒトの消化系に存在する微生物を判定するのに有用でありうる。

20

【0066】

(アンチセンスヌクレオチド配列)

本発明は、アンチセンス核酸分子、すなわち、タンパク質をコードするセンス核酸に相補的な分子、例えば、二本鎖cDNA分子のコーディング鎖に相補的な分子、又はmRNA配列に相補的な分子も包含する。したがって、アンチセンス核酸はセンス核酸に水素結合できる。アンチセンス核酸は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードしている鎖全体又はその一部、例えば、タンパク質コード領域(又はオープンリーディングフレーム)の全体または一部だけに相補的なものでありうる。アンチセンス核酸分子は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非翻訳領域に対してアンチセンスである場合もある。非翻訳領域は、コード領域に隣接し、かつ、アミノ酸に翻訳されない5'及び3'の配列である。アンチセンスヌクレオチド配列は、標的遺伝子の発現を破壊するのに有用である。対応する配列に対して70%、好ましくは80%、より好ましくは85%の配列同一性を有するアンチセンスコンストラクトを用いることができる。

30

【0067】

本明細書に開示する、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードするコード鎖配列(例えば、配列番号1~307のうちの奇数)を考えて、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン及びクリックの塩基対合法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のmRNAのコード領域全体に相補的なものである場合もあるが、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のmRNAのコード領域又は非翻訳領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドがより好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のmRNAにおける翻訳開始部位の周辺領域に相補的なものでありうる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチドのものである場合もあり、或いは、長さが100、200ヌクレオチド、又はさらに長い場合もある。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野で公知の化学合成操作、及び酵素連結操作を用いて構築することができる。

40

【0068】

50

例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、又は限定されるものではないが、例えばホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドを含めた、分子の生物学的安定性を増大させるため、若しくは、アンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成された二本鎖分子の物理的安定性を増大させるために様々に修飾されたヌクレオチドを用いて、化学的に合成することができる。別法として、核酸がアンチセンスの方向にサブクローニングされている（すなわち、挿入されている核酸から転写されるRNAが注目している標的核酸に対してアンチセンスの方向のものになるであろう）発現ベクターを用いて、アンチセンス核酸を生物学的に生成することもできる。

【0069】

本発明のアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子でありうる。 α -アノマー核酸分子は、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリットを形成し、その中では、通常の β -ユニットとは反対に、鎖がお互いに対して平行に走っている(Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641)。アンチセンス核酸分子は、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148)、又はキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330)を含む場合もある。

【0070】

本発明はリボザイムも包含する。リボザイムは、mRNAなどの一本鎖核酸に対してそれが相補的な領域を有する場合に、その一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。リボザイム（例えばハンマーヘッド型リボザイム(Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591に記載)）は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のmRNA転写物を触媒作用によって切断して、それによって、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のmRNAの翻訳を阻害するのに用いることができる。細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードする核酸に対する特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のcDNAのヌクレオチド配列（例えば配列番号1~307のうちの奇数）に基づいて設計することができる。例えば、米国特許第4987071号、及び米国特許第5116742号を参照のこと。別法として、特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAをRNA分子のプールから選択するのに、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質のmRNAを用いることもできる。例えば、Bartel and Szostak (1993) *Science* 261:1411-1418を参照のこと。

【0071】

本発明は、三重らせん構造を形成する核酸分子も包含する。例えば、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の遺伝子発現は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の調節領域（例えば、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のプロモーター及び/又はエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的として、標的細胞内の細胞壁、細胞表面、又は分泌物タンパク質の遺伝子の転写を阻止する三重らせん構造を形成させることによって阻害できる。Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27; 及びMaher (1992) *Bioassays* 14(12):807を参照のこと。

【0072】

一部の実施形態では、例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション、又は溶解性改善するために、本発明の核酸分子を塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾することができる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を修飾して、ペプチド核酸を生成することができる(Hyrup et al. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4:5を参照)。本明細書で使用する場合、「ペプチド核酸」又は「PNA」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格が疑似ペプチドバックボーンによって置換され、天然の4つの核酸塩基のみが保持されている核酸模倣体、例えばDNA模倣体を指す。PNAの中性バックボーンは、低イオン強度条件下でのDNA及びRNAに対する特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、例えば、上記のHyrup et al. (1996); Perry-O'Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670に記載の

10

20

30

40

50

標準的な固相ペプチド合成プロトコルを用いて実施できる。

【0073】

PNAは、例えば転写又は翻訳の停止を誘導するか、或いは複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的な変調を行うためのアンチセンス薬剤又は抗原薬剤として用いることができる。本発明のPNAは、例えば、PNAを標的としたPCRクランプ法によって；他の酵素、例えばS1ヌクレアーゼと併用した際の人工制限酵素として(Hyrup (1996)、同上)；又はDNA配列及びハイブリダイゼーション用のプローブ又はプライマーとして(Hyrup (1996)、同上；Perry-O'Keefe et al. (1996)、同上)、例えば、遺伝子内の単一塩基対変異の分析に用いることができる。

【0074】

別の実施形態では、例えば、それらの安定性、特異性、又は細胞内取込みを促進するために、親油基又は他の補助基(helper group)をPNAに結合させることによって、PNA-DNAキメラを形成させることによって、或いは、リボソーム、又は当技術分野で公知の、薬物送達の他の技法を使用することによって、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の分子のPNAを修飾することができる。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup (1996)、同上；Finn et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63；Mag et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:5973；及びPeterson et al. (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5:1119に記載されている通りに実施できる。

【0075】

(融合タンパク質)

本発明は、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のキメラタンパク質又は融合タンパク質も含む。細胞壁、細胞表面、又は分泌物の「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、細胞壁、細胞表面又は分泌物ではないポリペプチドに作用可能に連結した細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドを含む。「細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチド」は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、一方、「細胞壁、細胞表面又は分泌物ではないポリペプチド」は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質に実質的に同一ではないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、同じ生物又は異なった生物に由来するポリペプチドを指す。細胞壁、細胞表面、又は分泌物の融合タンパク質の内部で、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の全体に対応することも、その部分に対応することもあるが、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質における少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含むことが好ましい。この融合タンパク質の内部で、「作用可能に連結した」という用語は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドと、細胞壁、細胞表面、又は分泌物ではないポリペプチドとが、インフレームで相互に融合していることを示すものとする。細胞壁、細胞表面、又は分泌物ではないポリペプチドは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドのN末端に融合する場合も、C末端に融合する場合もある。

【0076】

連結されているコード配列を発現することによって、融合タンパク質を形成する、連結されている2つの異種アミノ酸配列が結果として得られる。担体配列(細胞壁、細胞表面、又は分泌物ではないポリペプチド)は、細菌宿主における融合タンパク質の発現を増強又は増大させる担体ポリペプチドをコードすることがある。融合タンパク質における、担体配列によってコードされている部分(すなわち担体ポリペプチド)は、タンパク質断片、機能性部分の全体、又はタンパク質配列全体でありうる。加えて、担体領域すなわち担体ポリペプチドは、その担体ポリペプチドに特異的な抗体又はアフィニティー精製を用いた、融合タンパク質の精製に使用されるように設計することもできる。同様に、融合タンパク質の選択的な精製を可能にするために、担体ポリペプチドの物理学的特性を利用することもできる。

【0077】

具体的な当該の担体ポリペプチドには、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、マル

10

20

30

40

50

トース結合タンパク質 (MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、N末端ヒスチジン (His) タグ、及び同様のものが含まれる。このリストは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の発現を増強するいかなる担体ポリペプチドとしても、本発明の方法において使用できる融合タンパク質としても、限定するものではない。

【0078】

一実施形態では、融合タンパク質が、GSTと細胞壁、細胞表面、又は分泌物との融合タンパク質であり、その中では、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の配列がGST配列のC末端に融合している。別の実施形態では、融合タンパク質が、細胞壁、細胞表面、又は分泌物と免疫グロブリンとの融合タンパク質であり、その中では、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の全体または一部が免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合している。本発明の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質と免疫グロブリンとの融合タンパク質は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物に対する抗体を、対象で生成するための免疫原として用いたり、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のリガンドを精製するのに用いたり、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質と、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のリガンドとの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイに用いたりすることができる。

10

【0079】

当業者ならば、具体的な担体ポリペプチドは、精製スキームを考慮して選択されることを認めるであろう。例えば、Hisタグ、GST、及びマルトース結合タンパク質は、容易に利用できるアフィニティーカラムであって、それにそれらのポリペプチドを結合させて、溶出することができるアフィニティーカラムが存在する担体ポリペプチドを代表するものである。したがって、担体ポリペプチドがヘキサヒスチジン (His₆タグ) などのN末端Hisタグである場合、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の融合タンパク質を、金属キレート樹脂、例えば、ニッケルニトリロ三酢酸 (Ni-NTA)、ニッケルイミノ二酢酸 (Ni-IDA)、及びコバルト含有樹脂 (Co樹脂) を含むマトリックスを用いて精製することができる。例えば、参照により本明細書に全体として組み込まれている、Steinert et al. (1997) QIAGEN News 4:11-15を参照のこと。担体ポリペプチドがGSTである場合には、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の融合タンパク質を、グルタチオンアガロースビーズ (Sigma社又はPharmacia Biotech社) を含むマトリックスを用いて精製することができ；担体ポリペプチドがマルトース結合タンパク質 (MBP) である場合には、細胞壁、細胞表面、又は分泌物の融合タンパク質を、アミロースによって誘導体化されたアガロース樹脂を含むマトリックスを用いて精製することができる。

20

30

【0080】

本発明のキメラタンパク質又は融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法で生成することが好ましい。例えば、異なったポリペプチド配列をコードするDNA断片を一つにインフレーションに連結してもよく、或いは、DNA自動合成機などで融合遺伝子を合成することもできる。別法として、遺伝子断片のPCR増幅は、後で、アニーリングして、さらに再増幅することでキメラ遺伝子配列を生成することができる、連続した2つの遺伝子断片の間に相補的なオーバーハングをもたらすアンカープライマーを用いて実行することもできる (例えば、Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) を参照)。さらに、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質をコードする核酸を、市販されている発現ベクターに、既存の融合部分にインフレーションに連結されるようにクローニングすることもできる。

40

【0081】

融合タンパク質発現ベクターは、通常、担体ポリペプチドを除去するのが容易で、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質が、それに付随する天然の生物活性を保持できるように設計する。融合タンパク質を切断する方法は当技術分野で公知である。例えば、Ausubel et al., eds. (1998) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.) を参照のこと。融合タンパク質の化学的切断は、臭化シアン、2-(2-ニトロフェニル)スルフェニル)-3-メチル-3'-プロモインドレニン、ヒドロキシルアミン

50

、又は低 pH などの試薬で実行できる。化学的切断は、そうしないと不溶性となる融合タンパク質を切断するために、変性条件下で実行することが多い。

【0082】

細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドを担体ポリペプチドから分離することが望しく、かつ、これらの融合ポリペプチド間の接合部の切断部位が天然には存在しない場合、特異的なプロテアーゼ切断部位を含有して、担体ポリペプチドの酵素による切断及び除去が促進されるように融合コンストラクトを設計することができる。この様にして、所定の酵素に特異的な切断部位を有するペプチドのコード配列を含むリンカー配列を、担体ポリペプチド（例えば、MBP、GST、SOD、又はN末端Hisタグ）のコード配列と、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドのコード配列との間にインフレームに融合させることができる。切断部位に対する特異性を有する適当な酵素には、因子Xa、トロンピン、エンテロキナーゼ、レミン（remin）、コラゲナーゼ、及びタバコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼが含まれるが、これらに限定されない。これらの酵素の切断部位は当技術分野で周知である。したがって、例えば、担体ポリペプチドを、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のポリペプチドから切断するのに、因子Xaを用いる場合には、因子Xaに感受性の切断部位、例えば、IEGRという配列をコードするリンカー配列を含むように融合コンストラクトを設計することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれている、Nagai and Thogersen (1984) *Nature* 309:810-812 ; Nagai and Thogersen (1987) *Meth. Enzymol.* 153:461-481 ; 及びPryor and Leiting (1997) *Protein Expr. Purif.* 10(3):309-319を参照のこと）。担体ポリペプチドを、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のポリペプチドから切断するのにトロンピンを用いる場合には、トロンピンに感受性の切断部位、例えば、LVPRGS又はVIAGRという配列をコードするリンカー配列を含むように融合コンストラクトを設計することができる（例えば、それぞれ、Pryor and Leiting (1997) *Protein Expr. Purif.* 10(3):309-319、及びHong et al. (1997) *Chin. Med. Sci. J.* 12(3):143-147を参照のこと ; これらの開示を参照により本明細書に組み込む）。TEVプロテアーゼの切断部位は当技術分野で公知である。例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれている米国特許第5532142号に記載の切断部位を参照のこと。Ausubel et al., eds. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.), Chapter 16の考察も参照のこと。

10

20

30

【0083】

本発明の融合タンパク質は、「細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質」の全体又は部分を利用して、外来のペプチド及びタンパク質の指向性を細胞壁、細胞表面、又は分泌にすることができる。細胞壁、細胞表面、又は細胞による分泌への指向性は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質にあるシグナル配列、分泌シグナル、又はLPXTG様（配列番号308）モチーフの結果として生じる。天然の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質が細胞壁又は細胞表面に結合するか、或いは分泌されるのを可能にする機能領域は、下記の通り、細胞壁、細胞表面、又は分泌物ではないタンパク質が分泌されるか、或いは、同じ生物又は異なる生物の細胞壁又は細胞表面に結合するのが可能となるように融合させることができる。

【0084】

40

（抗体）

細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質に特異的に結合する抗体を生成するか、又は *in vivo* で抗体の産生を刺激するイムノゲンとして、本発明の単離されたポリペプチドを用いることができる。イムノゲンとして、完全長の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質を用いることもできるし、或いはその代わりに、本明細書に記載の、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の抗原性ペプチド断片を用いることもできる。細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の抗原性ペプチドは、配列番号1～307のうちの偶数のいずれに示されているアミノ酸配列でも、そのうちの少なくとも8、好ましくは10、15、20、又は30アミノ酸残基を含み、かつ、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のエピトープを包含して、それによって、そのペプチドに対して産生された

50

抗体が、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質と特異的な免疫複合物を形成する。抗原性ペプチドに包含される好ましいエピトープは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質の領域であって、そのタンパク質の表面に位置している領域、例えば、親水性の領域である。

【0085】

(組換え体の発現ベクター及び宿主細胞)

本発明の核酸分子は、ベクター、好ましくは発現ベクターに含まれていてもよい。「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。発現ベクターは、1つ又は複数の調節配列を含み、それらが操作可能に連結されている遺伝子の発現を指示する。「操作可能に連結されている」によって、注目しているヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列の発現が可能になるように(例えば、*in vitro*の転写系/翻訳系で、或いは、ベクターが宿主細胞に導入される場合には、宿主細胞で)、調節配列に連結されていることを意図する。「調節配列」という用語には、制御可能な転写プロモーター、オペレーター、エンハンサー、転写ターミネーター、及び翻訳調節配列など、他の発現制御エレメントが含まれるものとする(例えば、シャイン-ダルガルノコンセンサス配列、開始コドン、及び終止コドン)。これらの調節配列は、例えば使用される宿主細胞に応じて、異なるであろう。

10

【0086】

ベクターは、宿主細胞内で自律的に複製されることもあるし(エピソームベクター)、或いは、宿主細胞のゲノムに組み込まれて、宿主ゲノムと共に複製されることもある(非エピソーム哺乳類ベクター)。組み込み型ベクターは、通常、細菌染色体に相同な配列を少なくとも1つ含有し、それによって、ベクターと、細菌染色体とにある相同なDNAの間で組み換えが起こるのを可能にしている。組み込み型ベクターは、バクテリオファージ又はトランスポゾンの配列も含むことがある。エピソームベクター又はプラスミドは、その中にDNAセグメントを追加して連結することができる環状の二本鎖DNAループである。組み換えDNA技法を用いる場合には、通常、宿主内での安定した維持が可能なプラスミドが、発現ベクターの好ましい形態である。

20

【0087】

本発明に包含される発現コンストラクト又はベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適した形態にある本発明の核酸コンストラクトを含む。原核細胞の宿主細胞における発現も、本発明に包含される。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどの因子に依存しうることを、当業者ならば理解するであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入して、それによって、融合タンパク質又はペプチドを含めた、本明細書に記載の核酸によってコードされているタンパク質又はペプチド(例えば、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質、変異体型の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質;融合タンパク質など)を生成することができる。

30

【0088】

調節配列には、ヌクレオチド配列の構成的な発現を指示するものと、ある特定の環境条件下でのみヌクレオチド配列の誘導性の発現を指示するものとが含まれる。細菌性RNAポリメラーゼに結合して、mRNAへのコード配列(例えば構造遺伝子)の転写を下流(3')で開始することができるいかなるDNA配列も、細菌性プロモーターである。プロモーターは転写開始領域を有するであろう。そして、転写開始領域は、通常、コード配列の5'末端近傍に配置される。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位と、転写開始部位とを含む。細菌性プロモーターは、オペレーターと呼ばれる第2のドメインも有することができる。オペレーターは、RNA合成が始まる、隣接のRNAポリメラーゼ結合部位と重複する場合もある。オペレーターは、負に調節された(誘導性)転写を可能にするが、それは、遺伝子リプレッサータンパク質がオペレーターに結合して、それによって特定の遺伝子の転写を阻害する可能性があるためである。構成的な発現は、オペレーターなどの負の調節エレメントの非存在下に起こりうる。さらに、遺伝子活性化タンパク質結合配列によって、正の調節が実現される場合もある。この配列は、存在する場合に

40

50

は、通常、RNAポリメラーゼ結合配列の近傍(5')にある。

【0089】

遺伝子活性化タンパク質の一例に、カタボライト遺伝子活性化タンパク質(CAP)があるが、これは、大腸菌(*Escherichia coli*)のlacオペロンの転写開始を補助する(Raubaud et al. (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18:173)。したがって、調節性の発現は、正の場合も、負の場合もあり、それによって転写が促進されるか、又は抑制される。正及び負の調節エレメントの他の例は当技術分野で周知である。タンパク質発現系に含めることのできる様々なプロモーターには、T7/LacOハイブリッドプロモーター、trpプロモーター、T7プロモーター、ラクトースプロモーター、及びバクテリオファージプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。在来プロモーター又は異種プロモーターを含めた、いかなる適当なプロモーターも、本発明を実行するのに使用できる。異種プロモーターは、構成的に活性であることも、誘導性であることもある。異種プロモーターの非限定な例は、米国特許第6242194号に示されている。

10

【0090】

代謝経路の酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。それらの例には、ガラクトース、ラクトース(lac)(Chang et al. (1987) *Nature* 198:1056)、及びマルトースなど、糖を代謝する酵素に由来するプロモーター配列が含まれる。追加の例には、トリプトファンなどの生合成酵素(trp)に由来するプロモーター配列(Goeddel et al. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057; Yelverton et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:731; 米国特許第4738921号; 欧州特許公開第36776号及び第121775号)が含まれる。ベータラクタマーゼ(beta-lac)プロモーターシステム(Weismann, (1981) "The Cloning of Interferon and Other Mistakes," in *Interferon 3* (ed. I. Gresser)); バクテリオファージラムダPL(Shimatake et al.: (1981) *Nature* 292:128); アラビノース誘導性araBプロモーター(米国特許第5028530号); 及びT5(米国特許第4689406号)プロモーターシステムも有用なプロモーター配列を提供する。大腸菌(*E. coli*)の発現系について論じている、Balbas (2001) *Mol. Biotech.* 19:251-267も参照のこと。

20

【0091】

さらに、天然には存在しない合成プロモーターも細菌性プロモーターとして機能する。例えば、ある細菌性プロモーター又はバクテリオファージプロモーターの転写活性化配列を、別の細菌性プロモーター又はバクテリオファージプロモーターのオペロン配列に連結されて、合成のハイブリッドプロモーターを生成することもできる(米国特許第4551433号)。例えば、tacプロモーター(Amann et al. (1983) *Gene* 25:167; de Boer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21)、及びtrcプロモーター(Brosius et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:3539-3541)は、trpプロモーターと、ラックリプレッサーによって調節されるlacオペロン配列との両方で構成されるハイブリッドtrp-lacプロモーターである。tacプロモーターは、誘導性調節配列としての追加の機能も有する。したがって、tacプロモーターに作用可能に連結されているコード配列の発現は、細胞培養で、例えば、イソプロピル-1-チオ-D-ガラクトシド(IPTG)を添加することによって、誘導することができる。さらに、細菌性プロモーターは、細菌性RNAポリメラーゼに結合して、さらに転写を開始する能力を有する、細菌以外の出自の、天然に存在するプロモーターを含むこともある。原核生物のなんらかの遺伝子の発現を高レベルに生成するために、細菌以外の出自の、天然に存在するプロモーターを、適合性のあるRNAポリメラーゼと共役させることもできる。バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ/プロモーターシステムは、共役プロモーターシステムの例である(Stadler et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; Tabor et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1074)。加えて、ハイブリッドプロモーターは、バクテリオファージプロモーターと、大腸菌(*E. coli*)オペレーター領域とで構成されることもある(欧州特許第267851号)。

30

40

【0092】

50

ベクターは、そのプロモーターのリプレッサー（又は誘導物質）をコードする遺伝子をさらに含有しうる。例えば、本発明の誘導性ベクターは、LacIリプレッサータンパク質をコードする遺伝子を発現することによって、Lacオペレーター（LacO）からの転写を調節するものでありうる。他の例には、pRecAの発現を調節するためのlexA遺伝子の使用、及びptrpを調節するためのtrpOの使用が含まれる。抑制の程度を増強する（例えば、lacIq）か、或いは誘導の様式を改変する（例えば、pLに熱誘導性を与えるCI857、又はpLに化学誘導性を与えるCI+）そのような遺伝子のアレルを利用することもできる。

【0093】

機能的なプロモーター配列に加えて、効率的なリボゾーム結合部位も、融合コンストラクトの発現に有用である。原核生物では、リボゾーム結合部位は、シャイン-ダールガルノ（SD）配列と呼ばれ、開始コドン（ATG）と、開始コドンの3～11ヌクレオチド上流にある長さ3～9ヌクレオチドの配列とを含む(Shine et al. (1975) Nature 254:34)。SD配列は、SD配列と細菌16SリボゾームRNAの3'末端との間の塩基対合によって、リボゾームに対するmRNAの結合を促進すると考えられている(Steitz et al. (1979) "Genetic Signals and Nucleotide Sequences in Messenger RNA," in Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R. F. Goldberger, Plenum Press, NY))。

【0094】

細胞壁及び細胞表面のタンパク質も、細菌における細胞壁又は細胞表面のポリペプチドの分泌を提供するシグナルペプチド配列断片を含むタンパク質をコードするキメラDNA分子を生成することによって、細胞から分泌されることがある(米国特許第4336336号)。シグナル配列断片は、通常、細胞からのタンパク質の分泌を指示する、疎水性アミノ酸で構成されるシグナルペプチドをコードする。タンパク質は、増殖培地(グラム陽性細菌)か、細胞の内膜と外膜との間に位置する細胞膜周辺腔(グラム陰性菌)のいずれかに分泌される。シグナルペプチド断片と、細胞壁、細胞表面、及び分泌物のタンパク質との間にコードされたプロセッシング部位が存在し、このプロセッシング部位は、in vivo又はin vitroのいずれかで切断できるものであることが好ましい。

【0095】

適当なシグナル配列をコードするDNAは、大腸菌(E.coli)の外膜タンパク質遺伝子(compA)(Masui et al. (1983) FEBS Lett. 151(1):159-164; Ghayeb et al. (1984) EMBOJ 3:2437-2442)、及び大腸菌(E.coli)アルカリホスファターゼシグナル配列(phoA)(Oka et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212)など、細菌の分泌タンパク質の遺伝子から得ることができる。他の原核細胞シグナルには、例えば、ペニシリン分解酵素Ippからのシグナル配列；又は熱安定性エンテロトキシンIIのリーダー配列が含まれる。

【0096】

アシドフィルス菌(L.acidophilus)などの細菌は、通常、開始コドンATGを利用し、これはアミノ酸のメチオニン(これは、原核生物内でN-ホルミルメチオニンに修飾される)を指定する。細菌は、GTG及びTTGというコドンのなど、代替の開始コドンも認識するが、これらはそれぞれ、バリンと、ロイシンとをコードする。しかし、それらが開始コドンとして使用される場合、通常、これらのコドンは、それらがコードしているアミノ酸ではなくメチオニンの取込みを指示する。アシドフィルス菌NCFMは、これらの代替のスタート部位を認識して、メチオニンを最初のアミノ酸として組み込む。

【0097】

通常、細菌によって認識される転写終結配列は、翻訳終止コドンの3'に位置する調節領域であり、したがって、プロモーターと共にコード配列を挟み込む。これらの配列は、DNAによってコードされている、ポリペプチドに翻訳可能なmRNAの転写を指示する。転写終結配列は、頻写の終了を補助するステムループ構造を形成できるDNA配列(約50ヌクレオチドの)を含むことが多い。これらの例には、大腸菌(E.coli)のtrp遺伝

10

20

30

40

50

子、そして、他の生合成遺伝子など、強いプロモーターを有する遺伝子に由来する転写終結配列が含まれる。

【0098】

発現ベクターは、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質配列が調節領域の転写調節下となるように、その配列を挿入するための複数の制限部位を有する。ベクターを確実に細胞内に維持するための選択的マーカー遺伝子も、発現ベクターに含めることができる。好ましい選択的マーカーには、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン（ネオマイシン）、及びテトラサイクリンなどの薬物に対する抵抗性を与えるものが含まれる(Davies et al. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469)。選択的マーカーは、最少培地上で、又は毒性代謝物質の存在下で細胞が増殖するのを可能にするものでもよく、これには、ヒスチジン、トリプトファン、及びロイシンの生合成経路の遺伝子など、生合成遺伝子が含まれる。

10

【0099】

調節領域は、本発明の宿主、細胞、及び/又はヌクレオチド配列にとって、在来（同種）のものであることも、或いは外来（異種）のものであることもある。調節領域は、天然のものであることも、合成であることもある。その領域が、宿主細胞にとって「外来」、すなわち「異種」である場合には、その領域が導入される、自然状態の細胞で、その領域が見出されないことが意図されている。その領域が本発明の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のヌクレオチド配列に「外来」、すなわち「異種」である場合、作用可能に連結している、本発明の細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のヌクレオチド配列

20

【0100】

発現カセットを調製する際には、適切な配向性を有し、必要に応じて、適当なリーディングフレーム中にあるDNA配列を提供するために、様々なDNA断片が操作されることがある。このような目的で、DNA断片を連結するのに、アダプター又はリンカーが利用されることがあり、或いは、好都合な制限部位、不必要なDNAの除去、制限部位の除去、又は同様のもの提供するのに、他の操作が行われることもある。このために、in vitro変異誘発、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換、例えば、転移及び転換が行われこともある。

30

【0101】

本発明は、その発現ベクターにアンチセンスの方向にクローニングされている本発明のDNA分子を含む組換え体発現ベクターも提供する。すなわち、このDNA分子は、細胞壁、細胞表面、又は分泌物のタンパク質のmRNAに対してアンチセンスのRNA分子の発現（DNA分子の転写による）が可能となる様式で、調節配列に作用可能に連結している。アンチセンスの方向にクローニングされた核酸に作用可能に連結している調節配列は、アンチセンスRNA分子の連続的又は誘導性の発現を指示するように選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、組換え体のプラスミド又はファージミドの形態をとるが、この形態において、アンチセンス核酸が高効率の調節領域の制御下に生成され、この調節領域の活性は、ベクターがその中に導入された細胞型によって決定されることがある。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の調節に関する考察には、Weintraub et al. (1986) Reviews Trends in Genetics, Vol. 1(1)を参照のこと。

40

【0102】

別法として、上記の構成要素のいくつかを、形質転換ベクターに併せて入れることもできる。形質転換ベクターは、通常、選択的マーカーで構成され、複製単位によって維持されるか、或いは、上述のように、組み込み型ベクターへと展開される。

50

【0103】

(微生物又は細菌宿主細胞)

指定の核酸配列又はタンパク質を含有する細菌の生成、そのような細菌の発端培養の調製、及び基質、特に乳などの食物基質を発酵させる方法は、公知の技法に従って実行することができる。

【0104】

核酸分子に関する場合、「導入」によって、従来の形質転換又は形質移入の技法、或いはファージを媒介にした感染によって、原核細胞に導入することを意図する。本明細書で使用する場合、「形質転換」、「形質導入」、「接合」、及び「原形質融合」は、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストランを媒介にした形質移入、リポフェクション、又はエレクトロポレーションを含めた、宿主細胞に外来核酸(例えばDNA)を導入する、当技術分野技術で承認されている様々な技法を指すものとする。宿主細胞を形質転換又は形質移入するのに適した方法は、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)、及び他の実験室マニュアルに見出すことができる。本発明のポリペプチド又は微生物に関する場合、「導入」によって、食物摂取、局所適用、鼻腔内、座薬、泌尿生殖器、又は経口適用によってポリペプチド又は微生物を宿主に導入することを意図する。

10

【0105】

本発明の細胞壁、細胞表面、及び分泌物のポリペプチドを生成するのに使用される細菌細胞は、概ね、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)に記載されている適当な培地中で培養する。

20

【0106】

(機能及びアッセイ)

周辺質溶質結合タンパク質(PFAMアクセッションPF01297)などのタンパク質の結合活性を測定するアッセイは、当技術分野で周知である(例えば、Hosie et al. (2001) *MoL Microbiol.* 40: 1449-59; Hazlett et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:20687-20694を参照)。本発明の周辺質溶質結合タンパク質には、配列番号2のタンパク質が含まれる。

30

【0107】

O-グリコシル加水分解酵素などのグリコシル加水分解酵素(EC 3.2.1.-)は、2つ以上の炭化水素の間、又は炭化水素と非炭化水素部分との間にあるグリコシド結合を加水分解する酵素の広範なグループである。グリコシル加水分解酵素ファミリー32(PFAMアクセッションPF00251)は、いくつかの既知の活性を有する酵素、すなわち、インベルターゼ(EC: 3.2.1.26); イヌリナーゼ(EC: 3.2.1.7); レパナーゼ(EC: 3.2.1.65); エキソイヌリナーゼ(EC: 3.2.1.80); スクロース:スクロース1-フルクトシルトランスフェラーゼ(EC: 2.4.1.99); 及びフルクタン:フルクタン1-フルクトシルトランスフェラーゼ(EC: 2.4.1.100)を含む。本発明のグリコシル加水分解酵素ファミリー32タンパク質には、配列番号10のタンパク質が含まれる。

40

【0108】

グリコシド加水分解酵素ファミリー31(PFAMアクセッションPF01055)は、いくつかの既知の活性を有する酵素、すなわち、グルコシダーゼ(EC: 3.2.1.20); ガラクトシダーゼ(EC: 3.2.1.22); グルコアミラーゼ(EC: 3.2.1.3); スクララーゼ-イソマルターゼ(EC: 3.2.1.48) (EC: 3.2.1.10); キシロシダーゼ(EC: 3.2.1.); グルカンリアーゼ(EC: 4.2.2.13)を含む。本発明のグリコシル加水分解酵素ファミリー31タンパク質には、配列番号262、264、及び268のタンパク質が含まれる。

【0109】

50

加水分解酵素活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Avigad and Bauer (1966) *Methods Enzymol.* 8:621-628 ; Neumann and Lampen (1967), *Biochemistry* 6:468-475 ; Henry and Darbyshire (1980) *Phytochemistry* 19:1017-1020）。

【0110】

アルファアミラーゼ（PFAMアクセッションPF00128）はグリコシル加水分解酵素のファミリー13として分類される。アルファアミラーゼの構造は、活性部位を含有する、8ストランドのアルファ/ベータバレルと、これを中断し、ベータストランド3及びアルファヘリックス3の間に突出する約70アミノ酸のカルシウム結合ドメインと、C末端のギリシアキーベータバレルドメインとからなる。アルファアミラーゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Das et al. (2004) *Biotechnol. Appl. Biochem.* Mar 25; Grzybowska et al. (2004) *Mol. Biotechnol.* 26:101-110を参照）。本発明のアルファアミラーゼタンパク質には、配列番号260、266、270、272、274、276、及び278のタンパク質が含まれる。

10

【0111】

アルファアミラーゼN末端ig様ドメインを含有する酵素は、グリコシル加水分解酵素のファミリー13（PFAMアクセッションPF02903）に属する。マルトース生成アミラーゼは、デンプンをマルトースに変換する際に、鎖の非還元端からマルトース残基を連続的に除去するために、多糖の（1-4）-D-グルコシド結合の加水分解を促進する酵素である。他の酵素には、プルランをパノースに加水分解するネオプルラナーゼと、シクロデキストリンを加水分解するシクロマルトデキストリナーゼとが含まれる。本発明のアルファアミラーゼN末端ig様ドメインタンパク質には、配列番号274が含まれる。

20

【0112】

イソアミラーゼN末端ドメインを含有する酵素は、グリコシル加水分解酵素のファミリー13（PFAMアクセッションPF02922）に属する。このドメインは、分岐を有する基質に作用する様々な酵素、すなわち、イソアミラーゼ、プルラナーゼ、及び分岐酵素に見出される。イソアミラーゼは、グリコーゲン、アミロペクチン、及びデキストリンの1,6-D-グルコシド分枝結合を加水分解し；1,4-グルカン分枝酵素は、グリコーゲンの1,6-グルコシド結合の形成に機能し；そして、プルラナーゼは、デンプン脱分枝酵素である。本発明のイソアミラーゼN末端ドメインタンパク質には、配列番号272のタンパク質が含まれる。

30

【0113】

表層タンパク質は、細菌の最外層細胞エンベロープ成分の層を形成する糖タンパクであり、細胞外酵素の付着構造として、又は細胞形態の決定因子として機能しうる。s層タンパク質の構造機能関係を測定するアッセイは、当技術分野で周知である（例えば、Sleytr et al. (1997) *Trends Biotechnol.* 15:20-26; Olabarria et al. (1996) *J. Bacteriol.* 178:4765-4772を参照のこと）。本発明の表層タンパク質には、配列番号62のタンパク質が含まれる。

【0114】

N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼファミリーのタンパク質（PFAMアクセッションPF01510）には、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ活性（EC:3.5.1.28）を有する亜鉛アミダーゼが含まれる。この酵素ドメインは、細菌細胞壁のN-アセチルムラモイルとL-アミノ酸との間のアミド結合を切断する（D-ラクチル-L-Alaを選択的に）。アミダーゼ活性を測定する方法は当技術分野で周知である（例えば、Wang et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:49044-52; Gelius et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* 306:988-94を参照）。本発明のN-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼタンパク質には、配列番号82のタンパク質が含まれる。

40

【0115】

FtsW、RodA、及びSpovEなどのタンパク質は、細胞周期過程に關与する内在性膜タンパク質である（PFAMアクセッションPF01098）。細胞周期タンパク質

50

の活性をアッセイする方法は当技術分野で周知である（例えば、Vinella et al. (1993) J. Bacteriol. 175:6704-6710を参照）。本発明の細胞周期タンパク質には、配列番号 9 2 及び 2 8 6 のタンパク質が含まれる。

【0116】

Murリガーゼファミリータンパク質には、EC番号 6 . 3 . 2 - を有する多数の近縁のリガーゼ酵素が含まれる。このファミリーには、MurC、MurD、MurE、MurF、Mpl、及びFolCが含まれる。MurC、MurD、MurE、及びMurFは、ペプチドグリカン合成における連続したステップの触媒を行う。ペプチドグリカンは、2種類の糖誘導体によるシートからなり、これらのうちの1つであるN-アセチルムラミン酸が小さなペプチドに結合している。このペプチドは、L-アラニン、D-グルタミン酸、メソ-ジアミノピメリン酸、及びD-アラニルアラニンからできている。ペプチド部分は、これらのアミノ酸をUDP-N-アセチルムラミン酸に連続的に付加することによって合成される。MurCはL-アラニンを転移し；MurDはD-グルタミン酸塩を転移し；MurEはジアミノピメリン酸を転移し；そして、MurFはD-アラニルアラニンを転移する。このファミリーには、グルタミン酸をフォリルポリグルタミン酸（folylpolyglutamate）に転移するフォリルポリグルタミン酸シンターゼも含まれる。リガーゼ酵素活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（Bouhss et al. (1997) Biochemistry. 36:11556-11563；Hesse et al. (2003) J. Bacteriol. 185:6507-6512を参照）。本発明のMurリガーゼファミリータンパク質には、配列番号 9 4、9 6、9 8、1 0 0、及び 1 1 6 のタンパク質が含まれる。

【0117】

グリコシルトランスフェラーゼは、活性化されたドナー分子から、特異的なアクセプター分子への糖部分の転移を触媒して、グリコシル結合を形成する酵素である。グリコシルトランスフェラーゼファミリー 2 8 N 末端ドメイン（PFAMアクセッションPF03033）には、モノガラクトシルジアシルグリセロールシンターゼ（P93115、EC 2 . 4 . 1 . 4 6）、1, 2 - ジアシルグリセロール 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ（EC: 2 . 4 . 1 . 4 6）、1, 2 - ジアシルグリセロール 3 - グルコシルトランスフェラーゼ（EC: 2 . 4 . 1 . 1 5 7）、及びUDP-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ（MURG__SYNY3、EC 2 . 4 . 1 . -）が含まれる。このN末端ドメインは、アクセプター結合部位と、膜結合部位である可能性が高い部位とを含有する。本発明のグリコシルトランスフェラーゼファミリー 2 8 N 末端ドメインタンパク質には、配列番号 1 0 2 のタンパク質が含まれる。

【0118】

グリコシルトランスフェラーゼ（PFAMアクセッションPF00953）は、UDP-GlcNAc/MurNAc：ポリイソプレノール-P-GlcNAc/MurNAc-1-Pトランスフェラーゼのファミリーである。このファミリーのメンバーには、グリコシル化経路における、UDP-N-アセチル-D-グルコサミン及びドリコールリン酸の、UMP及びN-アセチル-D-グルコサミンル-ジホスホドリコールへの変換を触媒する、真核生物のN-アセチルグルコサミンリン酸トランスフェラーゼと；細胞壁ペプチドグリカンの生合成における脂質サイクル反応の第1ステップを触媒する、細菌のホスホ-N-アセチルムラモイル-ペプチド-トランスフェラーゼとが含まれる。本発明のグリコシルトランスフェラーゼタンパク質（PFAMアクセッションPF00953）には、配列番号 1 0 4 及び 1 2 6 のタンパク質が含まれる。

【0119】

グリコシルトランスフェラーゼファミリー（PFAMアクセッションPF00535）は、UDP-グルコース、UDP-N-GDP-マンノース、又はCDP-アベクオースから、セルロース、ドリコールリン酸、及びテイコ酸を含めた様々な基質に糖を転移する様々なグリコシルトランスフェラーゼからなる多様性に富んだファミリーである。本発明のグリコシルトランスフェラーゼタンパク質（PFAMアクセッションPF00535）には、配列番号 1 6 4、1 7 0、2 3 6、及び 2 5 2 のタンパク質が含まれる。

【 0 1 2 0 】

グリコシルトランスフェラーゼグループ 1 ファミリー (P F A M アクセション P F 0 0 5 3 4) のメンバーは、活性化された糖を、グリコーゲン、フルクトース - 6 - リン酸、及びリポ多糖を含めた様々な基質に転移する。このファミリーのメンバーは、U D P、A D P、G D P、又は C M P に連結した糖を、グリコーゲン、フルクトース - 6 - リン酸、及びリポ多糖を含めた様々な基質に転移する。細菌のグリコシルトランスフェラーゼは、エキソポリサッカライド生合成、リポ多糖コア生合成、及び粘液多糖コラン酸 (colanic acid) 生合成を含めた様々な生合成過程に関与している。本発明のグリコシルトランスフェラーゼグループ 1 ファミリータンパク質には、配列番号 2 4 2、2 5 0、及び 2 5 8 のタンパク質が含まれる。

10

【 0 1 2 1 】

グリコシルトランスフェラーゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である (例えば、Mengin-Lecreulx et al. (1991) J. Bacteriol. 173:4625-4636 を参照) 。

【 0 1 2 2 】

マンノシル - 糖タンパク質エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミダーゼファミリーには、E C : 3 . 2 . 1 . 9 6 の酵素が含まれるが、これらの酵素は、高マンノース糖ペプチド、及び - [M a n (G l c N A c) 2] - 構造を含有する糖タンパク質にあるジ - N - アセチルキトビオシルユニットのユニット内加水分解を引き起こす。アミダーゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である (例えば、Pierce et al. (1980) Biochem. J. 185:261-264; Koide and Muramatsu (1974) J. Biol. Chem. 249:4897-4904 を参照) 。

20

【 0 1 2 3 】

L y s M ドメインは、細菌細胞壁の分解に関与する様々な酵素に見出される (Bateman and Bycroft (2000) J. Mol. Biol. 299:1113-1119) 。このドメインは、一般性のあるペプチドグリカン結合機能を有するものかもしれない。このドメインの構造は公知である (Joris et al. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 70:257-264) 。本発明の L y s M ドメインタンパク質には、配列番号 1 1 0 のタンパク質が含まれる。

【 0 1 2 4 】

D - a l a D - a l a リガーゼ N 末端ファミリー (P F A M アクセション P F 0 1 8 2 0) には、細胞壁生合成に関与する細菌性酵素である D - アラニン D - アラニンリガーゼ (E C : 6 . 3 . 2 . 4) が含まれる。この酵素は、ペプチドグリカン前駆体である U D P - N - アセチルムラミルペンタペプチドの形成に関与する。これらの酵素は、多数の保存された領域を含有する 3 0 0 ~ 3 6 0 アミノ酸のタンパク質である。N 末端 G l y リッチ領域は、A T P 結合に関与しているかもしれない。D - アラニン D - アラニンリガーゼ活性を測定する方法は当技術分野で周知である (例えば、Ito and Strominger (1962) J. Biol. Chem. 237:2696-2703 ; Marshall et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:6480-6483 を参照) 。本発明の D - a l a D - a l a リガーゼ N 末端タンパク質には、配列番号 1 1 2 のタンパク質が含まれる。

30

【 0 1 2 5 】

D - アラニル - D - アラニカルボキシペプチダーゼ (P F A M アクセション P F 0 0 7 6 8) は、M e r o p s ペプチダーゼファミリー S 1 1 (D - A l a - D - A l a カルボキシペプチダーゼ A ファミリー、クラン S E) に属するセリンペプチダーゼである。D - A l a - D - A l a カルボキシペプチダーゼ A は、細胞成分の代謝に関与する。セリンタイプの D - A l a - D - A l a ペプチダーゼには、3 つのファミリーがあり、これらは、低分子量ペニシリン結合タンパク質 (S 1 1、S 1 2、S 1 3) としても知られている。ファミリー S 1 1 は、クラス C - ラクタマーゼ及び D - アミノペプチダーゼなど、他の酵素を含有するファミリー S 1 2 及び S 1 3 とは違って、D - A l a - D - A l a ペプチダーゼのみを含有する (Rawlings and Barrett (1994) Methods Enzymol. 244:19-61) 。

40

50

ば、Chang et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:2823-7を参照)。本発明のD - アラニル - D - アラニンカルボキシペプチダーゼタンパク質には配列番号118のタンパク質が含まれる。

【0126】

E P S Pシンターゼ(3-ホスホシキミ酸1-カルボキシビニルトランスフェラーゼ)(EC:2.5.1.19)は、細菌(遺伝子ar o A)、植物、及び真菌類で、コリスミ酸からの芳香族アミノ酸の生合成(シキミ酸経路)における6番目のステップを触媒する(この経路における連続した5つのステップを触媒する多機能酵素の一部である)。様々な生物学的供給源に由来するE P S Pの配列は、進化を通して、この酵素の構造がよく保存されていることを示す。強く保存されている2箇所の領域が詳細に明らかにされている。第1の領域は、活性部位の一部であって、グリフォセートに対する抵抗性にも重要な領域に対応している。第2の領域は、このタンパク質のC末端部分に位置し、この酵素の活性に重要と考えられる保存されているリジンを含む。E P S Pシンターゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である(例えば、Okunuki et al. (2003) Shokuhin Eis eigaku Zasshi. 44:77-82; Oliveira et al. (2001) Protein Expr. Purif. 22:430-435)。本発明のE P S Pシンターゼタンパク質には、配列番号120のタンパク質が含まれる。

10

【0127】

細菌性トランスフェラーゼヘキサペプチド(3反復)ファミリー(P F A MアクセッションP F 0 0 1 3 2)は、[L I V] - G - X(4)ヘキサペプチドの直列反復で構成された反復構造を含む。L p x A(UDP N - アセチルグルコサミンアシルトランスフェラーゼ)の三次構造では、このヘキサペプチドは、左回りの平行ヘリックスを形成することが示されている(Raetz and Roderick (1995) Science 270:997-1000)。本発明の細菌性トランスフェラーゼペプチドタンパク質には、配列番号122のタンパク質が含まれている。

20

【0128】

推定のウンデカプレニルニリン酸シンターゼファミリー(P F A MアクセッションP F 0 1 2 5 5)のメンバーには、D i - トランス - ポリ - シス - デカプレニルシストランスフェラーゼ(EC:2.5.1.31)(U P Pシンセターゼ)が含まれ、この酵素は、イソペンテニルピロリン酸(I P P)からウンデカプレニルピロリン酸(U P P)を生成する。U p pシンセターゼ活性を測定する方法は当技術分野で周知である(例えば、Apfel et al. (1999) J. Bacteriol. 181:483-492を参照)。本発明のウンデカプレニルニリン酸シンターゼタンパク質には、配列番号124のタンパク質が含まれる。

30

【0129】

ペニシリン結合タンパク質は、それぞれN末端及びC末端にあるトランスグリコシラーゼとトランスペプチダーゼとからなる二機能性のタンパク質である。トランスグリコシラーゼドメインは、ムレイングリカン鎖の重合を触媒する(Lefevre et al (1997) J Bacteriol. 179:4761-4767)。トランスグリコシラーゼファミリー(P F A MアクセッションP F 0 0 9 1 2)のメンバーには、トランスグリコシラーゼドメイン(N末端)及びトランスペプチダーゼドメイン(C - 末端)を有する、二機能性のペニシリン結合タンパク質と、一機能性の生合成ペプチドグリカントランスグリコシラーゼとが含まれる。これらのタンパク質の触媒活性を測定する方法は当技術分野で周知である(例えば、Di Guilmi et al. (2003) J. Bacteriol. 185:4418-4423を参照)。本発明のペニシリン結合性トランスグリコシラーゼタンパク質には、配列番号134及び138のタンパク質が含まれる。

40

【0130】

ペニシリン結合タンパク質トランスペプチダーゼドメインファミリー(P F A MアクセッションP F 0 0 9 0 5)のメンバーは、ファミリーの全メンバーに保存されている活性部位セリン(P B P X __ S T R P Nにおける残基337)を有する。これらのタンパク質は、細胞壁形成のためのペプチドグリカン生合成の最終ステージの原因となる。これらのタンパク質は、架橋されたペプチドグリカンを脂質中間体から合成し、また、ペニシリン応

50

答性のトランスペプチダーゼカルボキシ末端ドメインを含有する。トランスペプチダーゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Zijderveld et al. (1995) J. Bacteriol. 177:6290-6293を参照）。本発明のペニシリン結合性トランスペプチダーゼタンパク質には、配列番号132、134、138、及び146のタンパク質が含まれる。

【0131】

AMP結合酵素ファミリー（PFAMアクセッションPF00501）のメンバーは、それらの基質に、AMPがATP依存的に共有結合することを介して作用すると考えられ、また、配列類似性を有する一領域を共有している。この領域は、保存されているPro-Lys-Glyの三つ組によってさらに特徴付けられるSer/Thr/Glyリッチドメインである。これらのタンパク質の触媒活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Weimar et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:29369-29376を参照）。本発明のAMP結合タンパク質には、配列番号148のタンパク質が含まれる。

10

【0132】

多糖生合成タンパク質ファミリー（PFAMアクセッションPF01943）の多数のメンバーが、多糖生成に関与するものとされている。多糖生合成を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Yao and Valvano (1994) J. Bacteriol. 176:4133-4143を参照）。本発明の多糖生合成タンパク質には、配列番号156及び238のタンパク質が含まれる。

20

【0133】

UDP-ガラクトピラノースムターゼファミリー（PFAMアクセッションPF03275）（EC:5.4.99.9）のメンバーは、2-ケト中間体を介した、UDP-GALPの、UDP-CALFへの変換に関与しており、また、FADを補因子として含有する。UDP-ガラクトピラノースムターゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Lee et al. (1996) Anal. Biochem. 242:1-7を参照）。本発明のUDP-ガラクトピラノースムターゼタンパク質には、配列番号158のタンパク質が含まれる。

30

【0134】

細菌性糖転移酵素（Bacterial sugar transferase）ファミリー（PFAMアクセッションPF02397）は、多数の細菌性糖転移酵素に由来する保存領域を表し、また、様々な生合成経路に関与している。それらの例には、O-多糖生合成の第1ステップでガラクトース-1-リン酸を脂質前駆体に転移するガラクトシル-P-P-ウンデカプレノールシンセターゼ（EC:2.7.8.6）；アミロポラン（amylovoran）の生合成に関与するUDP-ガラクトース-脂質担体トランスフェラーゼ；及びグループB連鎖球菌（GBS）III型莢膜多糖の構築に必須なガラクトシルトランスフェラーゼCpsDが含まれる。トランスフェラーゼ活性をアッセイする方法は当技術分野で周知である（例えば、Osborn and Yuan Tze-Yuen (1968) J. Biol. Chem. 243:5145-5152；Wright et al. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:1798-1803を参照）。本発明の細菌性糖転移酵素タンパク質には、配列番号174のタンパク質が含まれる。

40

【0135】

鎖長決定タンパク質（Chain length determinant protein）ファミリー（PFAMアクセッションPF02706）には、リポ多糖（LSP）の生合成に関与するタンパク質が含まれる。リポ多糖生合成を測定する方法は当技術分野で周知である（例えば、Franco et al. (1998) J. Bacteriol. 180:2670-5を参照）。本発明の鎖長決定タンパク質には、配列番号180のタンパク質が含まれる。

50

【0136】

NipC/P60（PFAMアクセッションPF00877）は、細胞壁ペプチダーゼを含有するファミリーであり、そのメンバーの一部は、D-ガンマ-グルタミル-メソジアミノピメリン酸結合、又はN-アセチルムラミン酸-L-アラニン結合を加水分解することが知られている（Anantharaman and Aravind (2003) Genome Biol. 4:R11）。本発明のNipC/P60タンパク質には、配列番号190、194、及び196のタンパク質が

50

含まれる。

【0137】

リボヌクレオチド還元酵素 (EC: 1.17.4.1) は DNA 合成に必要な前駆体を提供する。この酵素は、それらの対応するリボヌクレオチドからのデオキシリボヌクレオチドの還元的合成、すなわち、 $2' - \text{デオキシリボヌクレオシドニリン酸} + \text{酸化チオレドキシシン} + \text{H}_2\text{O} = \text{リボヌクレオシドニリン酸} + \text{ニリン酸} + \text{還元チオレドキシシン}$ を触媒する。

【0138】

リボヌクレオチド還元酵素は、大きなサブユニット (700 ~ 1000 残基) と、小さなサブユニット (300 ~ 400 残基) とで構成されたオリゴマー酵素であり、クラス I E R N R はそれより複雑ではなく、小さな鎖の代わりに小分子 B 1 2 を用いる。小さい鎖は、2つの鉄原子に結合し (Glu 3つ、Asp 1つ、及びHis 2つが金属結合に参与する)、また、活性部位チロシンラジカルを含有する。金属に結合する残基と活性部位チロシンとを含有する配列の領域は、原核生物、真核生物、及びウイルスにおける、リボヌクレオチド還元酵素の小さな鎖で保存されている。リボヌクレオシドニリン酸還元酵素活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である (例えば、Nilsson et al. (1988) Biochem. Soc. Trans. 16:91-94; Reichard (1993) Science 260:1773-1777を参照)。本発明のリボヌクレオチド還元酵素タンパク質には、配列番号 208 のタンパク質が含まれる。

10

【0139】

A B C 輸送体 (P F A M アクセション P F 0 0 0 0 5) は、様々な化合物の、生体膜を通じた移行の原因となるタンパク質の大ファミリーを形成している。それらは、異分泌物質 (allocrite) の結合及び輸送の原因となる2つの膜貫通ドメイン (TMD) と、A T P 加水分解エネルギーを、TMDにおける立体配座変化に共役させる原因となる2つのヌクレオチド結合ドメイン (NBD) とを備えた最少4ドメインで構成される。NBDは両方ともA T P 加水分解を行うことができ、そして、一方のNBDにおける加水分解を阻害することによって、もう一方での加水分解が効果的に抑制される。このファミリーに属するタンパク質は、1コピー又は2コピーの「A」コンセンサス配列 (Walker et al. (1982) EMBO J. 1:945-951)、又はPループ (Saraste et al. (1990) Trends Biochem Sci. 15:430-434) を含有する。A T P の結合及び輸送を測定する方法は当技術分野で周知である (例えば、Hung et al. (1998) Nature 396:703-707; Higgins et al. (1990) J. Bioenerg. Biomembr. 22:571-592を参照)。本発明のA B C 輸送体タンパク質には、配列番号 218 及び 226 が含まれる。

20

30

【0140】

UDP - N - アセチルグルコサミン 2 - エピメラーゼファミリー (P F A M アクセション P F 0 2 3 5 0) のメンバーは、UDP - N - アセチルグルコサミン 2 - エピメラーゼ (EC: 5.1.3.14) からなる。この酵素は、UDP - G l c N A c から UDP - M a n N A c の生成を触媒する。UDP - N - アセチルグルコサミン 2 - エピメラーゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である (例えば、Stasche et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:24319-24324を参照)。本発明のUDP - N - アセチルグルコサミン 2 - エピメラーゼタンパク質には、配列番号 244 及び 246 のタンパク質が含まれる。

40

【0141】

tRNA (グアニン - 1) - メチルトランスフェラーゼ (P F A M アクセション P F 0 1 7 4 6) ファミリーは、tRNA (グアニン - 1) - メチルトランスフェラーゼ (EC: 2.1.1.31) からなる。大腸菌 K 1 2 では、この酵素は、tRNA のアンチコドンの隣である位置 37 の N 1 - メチルグアニンへのグアノシン残基の変換を触媒する (Hjalmarsson et al. (1983) J. Biol. Chem 258:1343-1351)。tRNA (グアニン - N 1 -) - メチルトランスフェラーゼは、S - アデノシル - L - メチオニン + tRNA - > S - アデノシル - L - ホモシステイン + tRNA 含有 N 1 - メチルグアニンという反応を触媒する。この過程で、グアノシン (G) が、tRNA の位置 37 の N 1 - メチル

50

グアニン（１-メチルグアノシン（m1G））にメチル化され、これがCUN（ロイシン）、CCN（プロリン）、及びCGG（アルギニン）のコドンを読み込む。m1Gの存在は、細胞増殖率及びポリペプチドのステップ時間を改善し、さらに、tRNAがリーディングフレームを移動させるのを阻止する（Hagervall et al. (1990) Biochim. Biophys. Acta. 1050:263-266）。tRNAメチルトランスフェラーゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Hjalrnarsson et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:1343-1351を参照）。本発明のtRNA（グアニン-1）-メチルトランスフェラーゼタンパク質には、配列番号294のタンパク質が含まれる。

【0142】

アミノアシル-tRNAシンテターゼ（EC:6.1.1）は、極めて特異的な二段階反応で、それが認識する転移RNA分子へのアミノ酸の結合を触媒する。20種のアミノアシル-tRNAシンテターゼは、2つのクラス、I及びII（PFAMアクセッションPF00587）に分けられる。クラスIアミノアシル-tRNAシンテターゼは、特徴的な口スマンフォールドを含有し、ほとんどが単量体であり、一方、クラスIIアミノアシルtRNAシンテターゼは、ヘリックスに挟まれた逆平行シート形成を共有し（Perona et al. (1993) Biochemistry 32:8758-8771）、ほとんどが二量体又は多量体である。クラスIアミノアシル-tRNAシンテターゼによって触媒される反応では、アミノアシル基は、tRNAの2'-ヒドロキシルに結合され、一方、クラスII反応では、3'-ヒドロキシル部位が好まれる。アルギニン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、チロシン、トリプトファン、及びバリンに特異的なシンセターゼがクラスIシンセターゼに属する。アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、及びトレオニンに特異的なシンセターゼがクラスIIシンセターゼに属する。アミノアシル-tRNAシンテターゼ活性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Augustine and Franklyn (1997) Biochemistry 36:3473-3482）。本発明のアミノアシル-tRNAシンテターゼタンパク質には、配列番号296のタンパク質が含まれる。

【0143】

LuxSタンパク質ファミリー（LuxS）（PFAMアクセッションPF02664）は、オートインデューサーA12の合成に關与するLuxSタンパク質と、その推定上の類縁とからなる。細菌における、細胞密度の変化に反応した遺伝子発現調節を、集団感知と呼ぶ。集団感知を行う細菌は、細胞集団が増大するにつれて外部環境に蓄積するホルモン様の分子（オートインデューサー）の生成、放出、及び応答を行う。LuxSタンパク質は、集団感知に關与し、かつ、オートインデューサー生成タンパク質である（Surette et al. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1639-1644）。集団感知を検出する方法は当技術分野で周知である（例えば、Surette et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1639-1644を参照）。本発明のLuxSタンパク質には配列番号304のタンパク質が含まれる。

【0144】

（使用の方法）

一実施形態では、本発明のポリペプチド及びそれらを発現する微生物は、局所及び全身における体液性、細胞性、及び非特定の免疫応答の変化を含めた、宿主の免疫系を変化させることがある。プロバイオティック細菌による免疫系の変化は、例えば、感染及び腫瘍に対する非特異的防御又は抗原特異的防御の増強によって、粘膜免疫の増強によって、アジュバント効果を抗原特異的な免疫応答に提供することによって、又はTh1/Th2細胞及びそれらのサイトカイン産生の調節によって起こりうる（例えば、米国特許出願第2002/0159976号を参照）。「アジュバント」によって、抗原と共に導入された際に、抗原に対する免疫反応を増強する物質を意図する。

【0145】

体液免疫は、プロバイオティック細菌を摂取した後における、IgA産生の増大と、Bリンパ球産生の刺激とによって増強されることがある。免疫グロブリンの型及び濃度を測定

するアッセイと、免疫細胞の数及び型を評価するアッセイを含めた、粘膜免疫系の調査に使用される方法は当技術分野で周知である（例えば、Erickson and Hubbard (2000) *J. Nutr.* 130:403S-409Sを参照）。非特異的な免疫の改変は、IL-1、IL-6、IL-10、TNF、IL-12、IFN-、及びIL-18などのサイトカイン産生の変化、及び食細胞活性の増強をもたらす。プロバイオティック細菌で刺激した後に、細胞から放出されるサイトカインの型及び量を検出するアッセイ、並びに、非特異的な免疫を測定する他のアッセイは当技術分野で公知である（例えば、Miettinen et al. (1996) *Infect. Immun.* 64:5403-5405; Marin et al. (1998) *J. Food Prot.* 61:859-864; Schiffrin et al. (1994) *J. Dairy Sci.* 78:491-497を参照）。細胞性免疫の変化は、マクロファージ産生の増大、又はサイトカイン産生の変化をもたらす。プロバイオティック

10

【0146】

プロバイオティック細菌は、経口ワクチンに対する免疫応答を促進するもの（Chin et al. (2000) *Immunol. Cell Biol.* 78:55-66; Isolauri et al. (1995) *Vaccine* 13:310-312を参照）、抗炎症性の特性を有するもの（Pessi et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:475-478; Isolauri et al. (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 73:444S-450S; Antonopoulos et al. (1996) *J. Agric. Food Chem.* 44:3047-3051）、及び腸の巨大分子透過性を安定させるもの（Heyman (2000) *J. Am. College Nutr.* 19:137S-146S; Isolauri et al. (1993) *Fed. Res.* 33:548-553）でありうる。腸の透過性に対するこの効果は、粘膜上皮細胞の間にある密着結合の維持又は修復の結果かもしれない。これらの特性を測定するアッセイは当技術分野で公知であり、それらの例は引用した参考文献に見出すことができる。

20

【0147】

別の実施形態では、本発明のポリペプチド及びそれらを発現する微生物は、様々な宿主タンパク質又は化合物の発現を変化させる。これらのタンパク質及び化合物には、細胞表面タンパク質（すなわち細胞接着分子）、ムチン産生に關与するタンパク質（すなわちMUC1及びMUC2）、細胞シグナル伝達タンパク質（すなわち、チロシンキナーゼ、プロテインキナーゼC、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ、及び核因子カッパB (nf- κ B)）、片利共生細菌の宿主耐性に關与するタンパク質、及び抗菌剤タンパク質又は化合物（すなわち、過酸化水素（Hawes et al. (1996) *J. Infect. Dis* 174:1058-1063）、又は酸化窒素（Korhonen et al. (2002) *Inflammation* 26:207-214））が含まれるが、これらに限定されない。変化させられた宿主タンパク質に關する場合、「細胞表面」によって、細胞膜に付随して見出されるタンパク質を意図する。「ムチン」によって、粘液腺又は粘液細胞によって分泌されるタンパク質を意図する。「細胞シグナル伝達タンパク質」によって、細胞シグナル伝達に關与するタンパク質を意図する。「宿主耐性」によって、特定の抗原を投与した際の、免疫応答を生成する動物の能力の低下又は減失を意図する。「片利共生細菌」によって、別の生物と密接な物理的結びつきをもって存在する細菌であって、この結びつきによって、どちらの生物も利益を得ることも、害を受けることもない細菌を意図する。「抗菌剤」によって、微生物を殺すか、その成長を阻止する化合物を意図する。

30

40

【0148】

細胞接着分子、又はその領域/ドメイン/断片の発現の変化は、改変された付着特性を微生物が有するのを可能にする。別法として、ムチン産生に關与するタンパク質は、病原体が腸上皮細胞に付着する能力を阻止する（Mack et al. (1999) *Am. J. Physiol.* 276:G941-G950）。ムチン産生の組成、質、及び量が影響されるかもしれず、それによって、

50

病原体 - ムチン相互作用の変化が導かれる。宿主タンパク質又は化合物の発現の変化を測定するアッセイは、当技術分野で周知であり、これらにはノーザンプロット及びウエスタンプロットが含まれる。例えば、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)を参照のこと。

【0149】

さらに別の実施形態では、これらのポリペプチド及びそれらを発現する微生物は、限定されるものではないが、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸管症候群、下痢、抗生物質関連の下痢、便秘、及び小腸細菌過増殖を含めた胃腸障害の治療又は予防に有用でありうる。「治療又は予防」によって、本発明のポリペプチド又は微生物の投与の後起こる、疾患に関連した任意の症候の軽減又は予防を意図する。この軽減には、治療を受けている対象における症候の強さまた期間のいかなる低減も含まれる。本明細書で使用する場合、本発明のポリペプチド又は微生物の「有効量」は、治療されている疾患の臨床症状を予防、軽減、又は減少させるのに十分であろう。

【0150】

プロバイオティック細菌は、上述のように、免疫調節薬として作用することによって、又は消化管関連リンパ系組織に影響を与えることによって、胃腸障害の治療又は予防に有効となることもあり、或いは、保護層を形成する上皮に付着することもあり、それによって病原菌の侵襲を予防する (Kasper (1998) *Int. J. Food Micro.* 41:127-131)。慢性の炎症性腸疾患であるクローン病の患者に、プロバイオティック細菌が投与され、その結果、免疫学的な改善が得られている (Malin et al. (1996) *Ann. Nutr. Metab.* 40:137-145)。肯定的な効果は、便秘 (Kasper (1998) *Int. J. Food Micro.* 41:127-131)、小児におけるロタウイルス関連腸管感染症 (Isolauri et al. (1991) *Pediatrics* 88:90-97; Boudraa et al. (1990) *Gastroenterol. Nutr.* 11:509-512)、旅行者下痢 (Hilton et al. (1997) *J. Travel Med.* 4:41-43) 小腸細菌過増殖 (Vanderhoof et al. (1998) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27:155-160)、及び抗生物質関連の下痢 (Biller. et al. (1995) *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 21:224-226) の治療の際にも見られた。胃腸障害の治療又は予防にプロバイオティック細菌を用いることの臨床効果を測定するアッセイは当技術分野で公知である (例えば、Guandalini et al. (2000) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:54-60; Saavedra et al. (1994) *Lancet* 344:1046-1049)。

【0151】

さらに別の実施形態では、本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチドを発現する微生物は、宿主における感染の発生を予防又は抑制しうる。「の発生を抑制する」によって、ある生物に対象が感染して、さらにその後、その生物によって引き起こされる疾患の症候を示す確率が低下することを意図する。プロバイオティック細菌によって予防又は治療することができる感染には、食品媒介病原体によって引き起こされるもの (すなわち、毒素原性大腸菌 (ETEC)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、及びコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)) (Boris et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:1985-1989; Silva et al. (2001) *J. Med. Microbiol.* 50:161-164; Strus et al. (2001) *Med. Dosw. Mikrobiol.* 53:133-142; Tannock (1999) *Probiotics: a critical review*. Horizon Scientific Press, 161 pp; Salminen, S, and von Wright, A. 1998. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional. aspects*. Marcel Dekker, Inc. NY. 617pp.を参照)、日和見病原体によって引き起こされる感染、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) によって引き起こされる感染 (Cremonini et al. (2001) *Dig. Dis.* 19:144-147; Lorca et. al. (2001) *Current Micro.* 42:39-44)、膣疾患又は膣炎などの泌尿生殖器疾患 (Reid et al. (2001) *FEMS Immunol. Med. Micro.* 30:49-52)、及び HIV 感染 (Hashemi et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1574-1580) が含まれるが、これらに限定されない。プロバイオティック細菌が感染の治療又は予防に有効であるかどうか判定する方法は、当技術分野で周知であり、それらの例は上記の参考文献に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 2 】

別の実施形態では、このポリペプチドは、毒素、変異誘発物質、胆汁酸塩、脂肪、コレステロール、及び現在未確認のタンパク質又は化合物を含めた、胃腸管内の有害な化合物に微生物が結合し、かつ除去することを可能にする。これらの化合物は、不活性化、隔離、分解、消化、切断、又は改変されることもある。これらの化合物は、例えば変異誘発化合物（すなわち、肉を料理する間に形成された複素環式アミン）を含む食品製品の消化の結果として、宿主によって生成されることもあり、或いは、消化管内に存在する微生物によって生成されることもある（すなわち、遺伝毒性、変異原性、又は発癌性の活性を有する微生物代謝物）。NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ（アゾレダクターゼ）、ニトロレダクターゼ、 α -グルコロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、及び7- α -デヒドロキシラーゼなどの細菌酵素は、毒性化合物の発癌効果を増強する可能性がある。乳酸桿菌などの細菌は、これらの生体外物質代謝酵素の活性が低く、一部の株の投与によって、ニトロレダクターゼ及び α -グルコロニダーゼの活性が低減された（Goldin and Gorbach. (1984) *Am. J. Clin. Nutr.* 39:756-761; Goldin et al. (1992) *Dig. Dis: Sci.* 37:121-128; Benno and Mitsuoka (1992) *Microbiol. Immunol.* 36:683-694; Bouhnik et al. (1996) *Eur. J Clin. Nutr.* 50:269-273）。

10

【 0 1 5 3 】

これらのポリペプチドが、それら自体でこれらの活性を有することもある。したがって、本発明のタンパク質又はそれらを発現するプロバイオティック細菌は、癌、特に大腸癌の治療又は予防に見出しうる。プロバイオティック細菌の抗発癌効果が指摘されており（Wollowski et al. (2001) *Am. J Clin. Nutr.* 73:451S-455S; Hayatsu and Hayatsu (1993) *Cancer Lett.* 73:173-179）、乳酸菌に対する様々な変異誘発化合物の物理的な結合が示されている（Orrhage et al. (1994) *Mutation Res.* 311:239-248）。プロバイオティック細菌の様々な抗発癌効果を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Wollowski et al. (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 73:451S-455S; Goldin and Gorbach (1980) *J. Natl. Cancer Inst.* 64:263-265; Goldin and Gorbach (1984) *J. Natl. Cancer Inst.* 73:689-695参照）。

20

【 0 1 5 4 】

癌予防に加えて、本発明のポリペプチド又はそれらを発現する微生物は、血清コレステロールレベルを低下させ、心臓病の予防の補助となりうる。乳酸菌は培養培地からコレステロールを除去することができ（Klaver and van der Meer (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1120-1124）、いくつかの研究によって、プロバイオティック細菌の摂取の後で、ヒトの血清コレステロールが低下していることが示されている（Lin et al. (1989) *J Dairy Res.* 72:2885-2899.; Khedkar et al. (1993) *J. Dairy Foods Home Sci.* 12:33-38）。コレステロールは、胆汁酸に変換されて、排出によって失われたものを置換するので、コレステロールレベルは、胆汁酸の脱抱合を介してプロバイオティック細菌によって低下されるのかもしれない（Sanders (2000) *J. Nutr.* 130:384S-390S）。

30

【 0 1 5 5 】

別の実施形態では、本発明のポリペプチド又はその変種は、微生物の安定性を高めることができる。この安定性の促進は、微生物が胃、小腸、及びノ又は消化管を生きのまま通過すること、それらの領域で酸及び胆汁に抵抗すること、又は宿主による摂取の後に、消化管に残留することを可能にする。高められた安定性は、微生物の貯蔵を含めた、発酵製品の生産及び加工の間に生じるストレスの多い条件に、微生物が耐えるのを可能にする。これらのストレスには、酸化ストレス、pH、圧力、浸透圧ストレス、脱水、炭素飢餓、リン酸飢餓、窒素飢餓、アミノ酸飢餓、遠心などの機械的な操作、熱又は低温ショック、変異原性ストレス、並びに、細胞培養、凍結、凍結乾燥、及び乾燥を含めた、様々な貯蔵条件に伴うストレスが含まれるが、これらに限定されない（Girgis et al. (2002) *Stress adaptations of lactic acid bacteria. In Microbial adaptation to stress and safety of new generation foods.* Yousef, A.E. and Juneja, V.K. (Eds.) Technomic Publishing Co. Inc.を参照）。本発明のポリペプチドは1つ又は複数のストレスに対して

40

50

防御を提供するかもしれない。微生物の安定性を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Klaenhammer and Kleernan (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1461-1467 ; Wright and Klaenhammer (1983). *J. Food Sci.* 48:773-777）。安定性を増大させるのに有用でありうる配列は、配列番号 60、62、286、270、294、300、302、304、及び306に記載の配列が含まれるが、これらに限定されない。

【0156】

別の実施形態では、本発明のポリペプチド又はその変種は、改変された付着特性を、微生物が保持するのを可能にしうる。これらの付着特性は、小腸上皮細胞などの特定の細胞型に、又は別の細菌細胞に、或いはムチンなどの化合物に、増大又は低減した能力で、その微生物が結合するのを可能にするかもしれない（例えば、Ouwehand et al. (2000) *Lett. Appl. Microbiol.* 30:10-13 ; Tuomola et al. (1999) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26:137-142を参照）。他の細菌細胞に付着する能力の増大は、凝集をもたらしうる。細菌の付着を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Jin et al. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4200-4204 ; Coconnier et al. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2034-2039 ; Greene and Klaenhammer (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4487-4494 ; Lorca et al, (2002) *FEMS Microbiol Lett* 206:31-37 ; Antikainen et al. (2002) *Mol. Microbiol.* 46:381-94を参照）。

【0157】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、対象に経口投与した後に、微生物が虫歯の発生を低減するのを可能にしうる。虫歯を低減するプロバイオティック細菌の能力を評価する方法は当技術分野で公知である（例えば、Nase et al. (2001) *Caries Res.*, 35:412-420を参照）。

【0158】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、生産動物における飼料変換率を微生物が増大させるのを可能にしうる。生産動物における飼料変換率の増大を測定する方法は当技術分野で公知である（例えば、Fuller (1998) *Priobiotics for farm animals. In: Probiotics: A Critical Review* (Tannock, G. W., ed.), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK）。

【0159】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、微生物が、「病原体」を含めた別の微生物を抑制するか、又は殺すのを可能にしうる。「抑制する」によって、一方が、もう一方の活性を部分的に又は完全に阻害するような、2つの生理活性物質間の相互作用を意図する。これらのポリペプチドは、それらを発現する微生物が、別の微生物に結合するか、別の微生物に対する抗菌剤活性を有するか、或いは別の微生物を溶解するのを可能にしうる。ポリペプチドの発現の結果、第1の微生物は、例えばその微生物を摂取した宿主の消化管の中で、必須結合部位又は必須栄養素のために、第2の微生物と競合することになりうる（例えば、Jin et al. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4200-4204を参照）。異なった実施形態では、単離されたポリペプチド自体が、上述した同じ機構で微生物を、抑制するか、又は殺しうる。微生物の溶解又は死を含めた抗菌剤活性を測定するアッセイは、当技術分野で公知である（例えば、*Methods for General and Molecular Bacteriology*. 1994. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. Krieg, N.R. (Eds.) American Society for Microbiology, 791 pp.）。細菌の付着を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、上記のJin et al.を参照）。結合部位又は栄養物のための競合を測定するアッセイは当技術分野で公知である（例えば、Edelman et al. (2003) *Vet. Microbiol.* 91:41-56 ; Gan et al. (2002) *J Infect. Dis.* 185:1369-1372 ; Hori et al. (2002) *J. Appl Microbiol.* 92:396-403を参照）。

【0160】

別の実施形態では、これらのポリペプチドは、抗菌剤活性を有し、食物保護、及び局所治療などの、傷の治療を含めた様々な適用における使用を提供しうる。タンパク質の抗菌剤活性を検出する方法は当技術分野で周知である（Allison and Klaenhammer (1999) *Genet*

10

20

30

40

50

ics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use in novel industrial applications. pp789-808. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. A.L. DeMain and J.E. Davies. (eds.) ASM Press, Washington, D.C.).

【 0 1 6 1 】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、微生物の抗生物質感受性を変調しうるものであるか、或いは、これらのポリペプチドは、抗菌剤活性を有する他の化合物に対する、微生物の感受性を変調しうる。微生物の抗生物質感受性、又は抗菌剤活性を有する化合物に対する、微生物の感受性を検出する方法は当技術分野で周知である。

【 0 1 6 2 】

別の実施形態では、ポリペプチドは、微生物の凝集又は生物膜の形成を可能にするか、或いは、第1の微生物が、第2の微生物の生物膜を形成する能力を阻害するのを可能にする。これらのポリペプチド自体も、生物膜を形成する微生物の能力を妨害しうる。「生物膜」によって、基層又は中間面に、或いは相互に、非可逆的に付着した細胞であって、それらが生成した細胞外重合体物質の基質に埋め込まれており、かつ、成長速度及び遺伝子転写に関して変化した表現型を示す細胞を特徴とする微生物由来の固着性群集を意図する。生物膜形成を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、O'Toole and Kolter (1998) Mol. Microbiol. 28:449-461 ; Yoshida and Kuramitsu (2002) Appl Environ Microbiol 68:6283-6291を参照）。

10

【 0 1 6 3 】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドから単離された、細胞壁への固着に十分な局在化シグナルを異種タンパク質に融合することができる（Schneewind et al. (1993) EMBO J. 12:4803-4811 ; Schneewind et al. (1992) Cell 70:267-281）。L P X T G（配列番号308）モチーフは、グラム陽性菌の表面タンパク質に特徴的なものとして同定された（Navarre and Schneewind (1994) Molecular Microbiology 14:115-121 ; Fischetti et al. (1990) Mol. Microbiol. 4:1603-1605）。細胞表面における異種タンパク質の発現を測定するアッセイは当技術分野で周知である（例えば、Steidler et al. (1998) Appl Environ Micro. 64:342-345を参照）。

20

【 0 1 6 4 】

本発明のポリペプチドは、乳酸菌を用いて生成された食物の食感又は他の物理的性質を変調しうる。細胞外多糖は、様々な食物製品において、安定化剤、濃縮剤、ゲル化剤、粘性強化剤、及び乳化剤として作用しうる（De Vuyst and Degeest (1999.) FEMS Microbiol. Rev. 153-177）。細胞外多糖を含有する食物の増強された粘着性は、消化管におけるプロバイオティック細菌のコロニー化に有益でありうる（German et al. (1999) Trends Biotechnol. 17:491-499 ; Jolly et al. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 82:367-374）。食物の食感を測定する方法は当技術分野で公知である（例えば、van den Berg et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61:2840-2844を参照）。

30

【 0 1 6 5 】

【表 1】

配列番号	同一性／機能
1, 2	A B C型金属イオン輸送系、周辺質成分／表面付着因子
3, 4	I e m Aタンパク質
5, 6	F m t B表面タンパク質
7, 8	6 7 k D aミオシン交差反応性連鎖球菌抗原
9, 10	ミオシン交差反応性抗原
11, 12	ソルターゼ
13, 14	粘液結合タンパク質前駆体
15, 16	粘液結合タンパク質前駆体
17, 18	粘液結合タンパク質前駆体 (M u b)
19, 20	粘液結合タンパク質前駆体 (M u b)
21, 22	粘液結合タンパク質前駆体 (M u b)
23, 24	粘液結合タンパク質前駆体

10

20

配列番号	同一性／機能
25, 26	粘液結合タンパク質
27, 28	粘液結合タンパク質
29, 30	粘液結合タンパク質
31, 32	粘液結合タンパク質
33, 34	粘液結合タンパク質
35, 36	粘液結合タンパク質前駆体
37, 38	粘液結合タンパク質前駆体
39, 40	ステロイド結合タンパク質
41, 42	表面排除タンパク質
43, 44	トロポミオシン様タンパク質
45, 46	生物膜結合表面タンパク質
47, 48	凝集促進タンパク質
49, 50	凝集促進タンパク質
51, 52	フィブリノーゲン結合タンパク質
53, 54	フィブリノーゲン結合タンパク質
55, 56	フィブリノーゲン結合タンパク質
57, 58	フィブリノーゲン結合タンパク質
59, 60	表面層タンパク質
61, 62	表面層タンパク質
63, 64	表面層タンパク質
65, 66	表面層タンパク質
67, 68	表面層タンパク質

10

20

30

40

配列番号	同一性/機能
69, 70	表面層タンパク質
71, 72	表面層タンパク質
73, 74	表面層タンパク質
75, 76	表面タンパク質
77, 78	表面タンパク質
79, 80	表面タンパク質
81, 82	自己溶菌酵素; アミダーゼ
83, 84	細胞形態決定タンパク質 (M r e B)
85, 86	細胞形態決定タンパク質 (M r e B)
87, 88	細胞形態決定タンパク質 (M r e C)
89, 90	細胞形態決定タンパク質 (M r e D)
91, 92	桿形態決定タンパク質 (R o d A)
93, 94	UDP-N-アセチルムラミン酸-アラニンライゲース
95, 96	UDP-N-アセチルムラモイルトリペプチドシンセターゼ
97, 98	UDP-N-アセチルムラモイル-L-アラニル-D -グルタミル-リジンライゲース
99, 100	UDP-N-アセチルムラミン酸アラニン-D -グルタミン酸ライゲース
101, 102	p-N-アセチルムラモイル-ペンタペプチド -トランスフェラーゼ
103, 104	p-N-アセチルムラモイル-ペンタペプチド -トランスフェラーゼ
105, 106	N-アセチルムラミダーゼ
107, 108	N-アセチルムラミダーゼ
109, 110	N-アセチルムラミダーゼ
111, 112	d-アラニン-d-アラニンライゲース

10

20

30

40

配列番号	同一性/機能
113, 114	透過酵素
115, 116	d-a l a-d-a l a付加酵素
117, 118	d-アラニン-d-アラニンカルボキシペプチダーゼ
119, 120	UDP-N-アセチルグルコサミン1- カルボキシビニルトランスフェラーゼ
121, 122	UDP-N-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼ
123, 124	ウンデカプレニルピロリン酸シンセターゼ
125, 126	ウンデカプレニル-リン酸N-アセチル -グルコサミンルトランスフェラーゼ
127, 128	ペニシリン結合タンパク質
129, 130	ペニシリン結合タンパク質
131, 132	ペニシリン結合タンパク質
133, 134	ペニシリン結合タンパク質
135, 136	ペニシリン結合タンパク質
137, 138	ペニシリン結合タンパク質1 A
139, 140	ペニシリン結合タンパク質関連因子A
141, 142	ペニシリン結合タンパク質
143, 144	ペニシリン結合タンパク質
145, 146	ペニシリン結合タンパク質2 B
147, 148	D I t A D-アラニン-D-アラニル担体タンパク質 ライゲース
149, 150	D I t B 塩基性膜タンパク質
151, 152	D I t C D-アラニル担体タンパク質
153, 154	D I t D 膜外転移タンパク質 D I t D 膜外転移タンパク質
155, 156	オリゴ糖反復ユニット輸送体 (E p s I)

10

20

30

40

配列番号	同一性／機能
157, 158	UDP-ガラクトピラノースムターゼ
159, 160	UDP-ガラクトピラノースムターゼ
161, 162	多糖ポリメラーゼ
163, 164	グリコシルトランスフェラーゼ
165, 166	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
167, 168	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
169, 170	グリコシルトランスフェラーゼ
171, 172	ガラクトシルトランスフェラーゼ
173, 174	ホスホ-グリコシルトランスフェラーゼ (EpsE)
175, 176	EpsD
177, 178	EpsC
179, 180	EpsB
181, 182	EpsA
183, 184	GTP結合タンパク質
185, 186	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
187, 188	細胞表面タンパク質
189, 190	細胞壁結合加水分解酵素
191, 192	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
193, 194	細胞壁結合加水分解酵素
195, 196	グリコシダーゼ
197, 198	グアニル酸キナーゼ
199, 200	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質

10

20

30

40

配列番号	同一性／機能
201, 202	膜タンパク質
203, 204	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
205, 206	リボヌクレオチド還元酵素 (Nrd I)
207, 208	リボヌクレオチド還元酵素
209, 210	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
211, 212	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
213, 214	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
215, 216	A B C 輸送体構成要素
217, 218	A B C 輸送体
219, 220	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
221, 222	膜タンパク質
223, 224	膜タンパク質
225, 226	A B C 輸送体の A T P a s e 構成要素
227, 228	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
229, 230	アセチルトランスフェラーゼ
231, 232	転写調節因子
233, 234	多糖輸送体
235, 236	EpsV
237, 238	EpsU
239, 240	EpsA
241, 242	莢膜多糖生合成タンパク質 J (c a p J)
243, 244	Cap5P

10

20

30

40

配列番号	同一性／機能
245, 246	Cap5P
247, 248	CpsIVN
249, 250	リボ多糖生合成タンパク質
251, 252	セルロースシンターゼ
253, 254	スクロースホスホリラーゼ
255, 256	多糖輸送体
257, 258	L P S 生合成タンパク質
259, 260	オリゴ-1, 6-グルコシダーゼ
261, 262	アルファ-グルコシダーゼ
263, 264	アルファ-グルコシダーゼ
265, 266	グルカン1, 6-アルファ-グルコシダーゼ
267, 268	アルファ-グルコシダーゼ I I
269, 270	デキストラングルコシダーゼ
271, 272	1, 4-アルファ-グルカン分枝酵素
273, 274	ネオプルラナーゼ
275, 276	プルラナーゼ
277, 278	アミロプルラナーゼ
279, 280	シクロマルトデキストリン輸送膜タンパク質
281, 282	細胞表面、細胞膜、又は分泌物のタンパク質
283, 284	細胞表面タンパク質
285, 286	細胞表面タンパク質 (細菌細胞分裂膜タンパク質)
287, 288	膜タンパク質

10

20

30

40

配列番号	同一性／機能
289, 290	膜タンパク質
291, 292	DNAメチラーゼ
293, 294	tRNA(グアニン-N1)-メチルトランスフェラーゼ
295, 296	セロニル-tRNAシンセターゼ
297, 298	表面タンパク質
299, 300	輸送アクセサリタンパク質
301, 302	メチオニンシンターゼ
303, 304	オートインデューサー-2生成タンパク質(LuxS)
305, 306	細胞分裂タンパク質(cdpA)
307	生物膜結合表面タンパク質

10

20

【0166】

以下の実施例を、限定のためではなく、例示のために提供する。

【実施例1】

【0167】

(アミノ酸配列のためのギャップつきBlastP結果)

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号2(306アミノ酸)における、アミノ酸7~304がラクトバシラスガセリ(*Lactobacillus gasseri*)の、ABC型メタルイオン輸送系、周辺質の構成要素/表面付着因子であるタンパク質(アクセッション番号ZP_00046648.1)と約73%の同一性、アミノ酸9~304がラクトバシルスジョンソニ(*Lactobacillus johnsonii*)の、ABC輸送体の溶質結合構成要素であるタンパク質(アクセッション番号NP_965678.1)と約71%の同一性、アミノ酸18~306がラクトバシラスガセリの、ABC型メタルイオン輸送系、周辺質の構成要素/表面付着因子であるタンパク質(アクセッション番号ZP_00046208.1)と約62%の同一性アミノ酸26~306がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質(アクセッション番号NP_964756.1)と約62%の同一性、そして、アミノ酸18~306がロイコノストックメセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)のメセンテロイデス(*mesenteroides*)亜種の、ABC型メタルイオン輸送系、周辺質の構成要素/表面付着因子であるタンパク質(アクセッション番号ZP_00064315.1)と約45%の同一性を有することを示した。

30

40

【0168】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号4(191アミノ酸)における、アミノ酸29~191がラクトバシラスガセリの、特徴付けされていない保存されているタンパク質(アクセッション番号ZP_00047066.1)と約75%の同一性、アミノ酸29~191がラクトバシルスジョンソニの、LemA様タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP_964093.1)と約76%の同一性、アミノ酸29~191がラクトバシラスプランタルム(*Lactobacillus plantarum*)の未知のタンパク質(アクセッション番号NP_784295.1)と約68%の同一性、アミノ酸29~191がミュータンス連鎖球菌(*Streptococcus mutans*)の、LemA様タン

50

パク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__722235.1）と約65%の同一性、そして、アミノ酸29~191が肺炎連鎖球菌の、LemA様タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__345748.1）と約61%の同一性を有することを示した。

【0169】

ギャップつきBlasT Pアミノ酸配列アラインメントは、配列番号6（2539アミノ酸）における、アミノ酸1~2501がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__964984.1）と約41%の同一性、アミノ酸797~2209がアビトロフィアデフェクティバ（*Abiotrophia defectiva*）の、細胞外基質結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号pir T31110）と約27%の同一性、アミノ酸4~2521が表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）の、Fm t Bタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP764984.1）と約20%の同一性、アミノ酸1~2529が黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）アウレウス（*aureus*）亜種の、連鎖球菌付着因子embに相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__374548.1）と約21%の同一性、そして、アミノ酸1~2529が黄色ブドウ球菌アウレウス亜種の推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__371958.1）と約20%の同一性を有することを示した。

10

【0170】

ギャップつきBlasT Pアミノ酸配列アラインメントは、配列番号8（591アミノ酸）における、アミノ酸1~591がラクトバシラスガセリの、ミオシン交差反応性抗原であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00047333.1）と約84%の同一性、アミノ酸1~591がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__964681.1）と約83%の同一性、アミノ酸1~591がロイコノストックメセンテロイデス（*Leuconostoc mesenteroides*）のメセンテロイデス（*mesenteroides*）亜種の、ミオシン交差反応性抗原であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00063735.1）と約70%の同一性、アミノ酸1~591が化膿連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）の、67kDaミオシン交差反応性連鎖球菌抗原であるタンパク質（アクセッション番号NP__268761.1）と約67%の同一性、そして、アミノ酸1~591が化膿連鎖球菌の、67kDaミオシン交差反応性連鎖球菌抗原であるタンパク質（アクセッション番号NP__664136.1）と約67%の同一性を有することを示した。

20

30

【0171】

ギャップつきBlasT Pアミノ酸配列アラインメントは、配列番号10（590アミノ酸）における、アミノ酸1~590がラクトバシラスガセリの、ミオシン交差反応性抗原であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00046024.1）と約79%の同一性、アミノ酸1~590がミュータンス連鎖球菌の、67kDaミオシン交差反応性連鎖球菌抗原に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__721921.1）と約71%の同一性、アミノ酸1~590が黄色ブドウ球菌アウレウス亜種の、67kDaミオシン交差反応性連鎖球菌抗原に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__644896.1）と約60%の同一性、アミノ酸1~590が黄色ブドウ球菌アウレウス亜種の、67kDaミオシン交差反応性連鎖球菌抗原に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__370630.1）と約59%の同一性、そして、アミノ酸1~590が表皮ブドウ球菌の、67kDaミオシン交差反応性連鎖球菌抗原様タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__764331.1）と約58%の同一性を有することを示した。

40

【0172】

ギャップつきBlasT Pアミノ酸配列アラインメントは、配列番号12（229アミノ酸）における、アミノ酸1~229がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__965278.1）と約61%の同一性、アミノ酸31~229がラクトバシラスガセリの、ソルターゼ（表面タンパク質トランスペプチダーゼ）であ

50

るタンパク質（アクセッション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 5 6 9 . 1 ）と約 6 5 % の同一性、アミノ酸 3 1 ~ 2 2 9 がエンテロコッカスフェカリス（*Enterococcus faecalis*）の、ソルターゼファミリータンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 N P _ 8 1 6 6 6 8 . 1 ）と約 3 8 % の同一性、アミノ酸 3 1 ~ 2 1 0 がラクトバシラスガセリの、ソルターゼであるタンパク質（アクセッション番号 N P _ 7 8 4 2 9 4 . 1 ）と約 3 7 % の同一性、そして、アミノ酸 3 1 ~ 2 2 9 がラクトコッカスラクチス（*Lactococcus lactis*）のラクチス（*lactis*）亜種の推定上のタンパク質（アクセッション番号 N P _ 2 6 7 2 6 9 . 1 ）と約 3 6 % の同一性を有することを示した。

【 0 1 7 3 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 4 （ 6 4 3 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 6 4 3 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 1 2 8 . 1 ）と約 3 4 % の同一性、アミノ酸 2 ~ 4 5 6 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 7 8 1 . 1 ）と約 3 8 % の同一性、アミノ酸 2 ~ 4 5 6 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 N P _ 9 6 4 0 6 4 . 1 ）と約 3 8 % の同一性、アミノ酸 1 2 4 ~ 6 0 2 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 N P _ 0 0 0 4 6 1 3 3 . 1 ）と約 3 4 % の同一性、そして、アミノ酸 1 1 ~ 4 2 8 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 N P _ 9 6 4 0 6 2 . 1 ）と約 3 3 % の同一性を有することを示した。

【 0 1 7 4 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 6 （ 1 0 1 7 アミノ酸）における、アミノ酸 2 9 9 ~ 8 6 5 がラクトバシラスガセリの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテイン（*exoprotein*）であるタンパク質（アクセッション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 7 8 0 . 1 ）と約 2 7 % の同一性、アミノ酸 2 7 3 ~ 8 4 8 が発酵乳酸杆菌（*Lactobacillus fermentum*）の、M l p タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 g b | A A P 4 1 7 3 8 . 1 ）と約 2 2 % の同一性、アミノ酸 4 2 0 ~ 8 6 2 がラクトバシラスロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）の、粘液結合タンパク質前駆体（M u b）であるタンパク質（アクセッション番号 g b | A A F 2 5 5 7 6 . 1 ）と約 2 3 % の同一性、アミノ酸 4 8 7 ~ 8 5 9 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 N P _ 9 6 4 0 6 3 . 1 ）と約 2 5 % の同一性、そして、アミノ酸 5 3 7 ~ 8 6 5 がラクトバシラスプラントルムの、細胞表面タンパク質前駆体であるタンパク質（アクセッション番号 N P _ 7 8 6 4 1 7 . 1 ）と約 2 5 % の同一性を有することを示した。

【 0 1 7 5 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 8 （ 4 3 2 6 アミノ酸）における、アミノ酸 2 2 3 4 ~ 4 1 6 5 がラクトバシラスガセリの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセッション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 7 8 0 . 1 ）と約 2 9 % の同一性、アミノ酸 6 5 0 ~ 3 9 7 4 がラクトバシラスロイテリの、粘液結合タンパク質前駆体（M u b）であるタンパク質（アクセッション番号 g b | A A F 2 5 5 7 6 . 1 ）と約 2 3 % の同一性、アミノ酸 1 7 7 8 ~ 4 1 6 4 が発酵乳酸杆菌の、M l p タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 g b | A A P 4 1 7 3 8 . 1 ）と約 2 4 % の同一性、アミノ酸 1 6 7 3 ~ 2 9 9 4 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 6 4 5 . 1 ）と約 2 7 % の同一性、アミノ酸 1 3 8 8 ~ 2 9 7 4 がラクトバシラスプラントルムの、細胞表面タンパク質前駆体であるタンパク質（アクセッション番号 N P _ 7 8 5 2 3 2 . 1 ）と約 2 5 % の同一性を有することを示した。

【 0 1 7 6 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 2 0 （ 1 2 0 8 アミノ酸）における、アミノ酸 7 2 5 ~ 1 0 6 0 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 N P _ 9 6 4 0 6 3 . 1 ）と約 6 4 % の同一性、アミノ酸 7

10

20

30

40

50

～ 999 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046645.1）と約 29% の同一性、アミノ酸 159～999 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965681.1）と約 29% の同一性、アミノ酸 456～1060 が発酵乳酸杆菌の、Mlp タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAP41738.1）と約 35% の同一性、アミノ酸 504～1060 がラクトバシラスガセリの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046780.1）と約 35% の同一性を有することを示した。

【0177】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 22（1174 アミノ酸）における、アミノ酸 662～1000 がラクトバシラスプラタルムの、細胞表面タンパク質前駆体であるタンパク質（アクセッション番号 NP__784891.1）と約 30% の同一性、アミノ酸 641～985 がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__268337.1）と約 30% の同一性、アミノ酸 658～1000 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046308.1）と約 30% の同一性、アミノ酸 672～1000 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965614.1）と約 26% の同一性、そして、アミノ酸 636～974 がラクトバシラスロイテリの、粘液結合タンパク質前駆体（Mub）であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAF25576.1）と約 29% の同一性を有することを示した。

10

20

【0178】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 24（697 アミノ酸）における、アミノ酸 135～649 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046316.1）と約 25% の同一性、アミノ酸 185～681 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965614.1）と約 24% の同一性、アミノ酸 86～697 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046645.1）と約 23% の同一性、アミノ酸 185～615 がラクトバシラスロイテリの、粘液結合タンパク質前駆体（Mub）であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAF25576.1）と約 22% の同一性、アミノ酸 190～630 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046308.1）と約 22% の同一性を有することを示した。

30

【0179】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 26（2319 アミノ酸）における、アミノ酸 10～2010 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964063.1）と約 53% の同一性、アミノ酸 10～1552 がラクトバシラスガセリの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046780.1）と約 40% の同一性、アミノ酸 1154～2119 が発酵乳酸杆菌の、Mlp タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAP41738.1）と約 49% の同一性、アミノ酸 1263～2118 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965818.1）と約 33% の同一性、そして、アミノ酸 1270～2112 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046645.1）と約 31% の同一性を有することを示した。

40

【0180】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 28（2650 アミノ酸）における、アミノ酸 1～2373 がラクトバシラスガセリの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046780.1）と約 36% の同一性、アミノ酸 310～2086 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964063.1）と約 40%

50

の同一性、アミノ酸1702～2463が発酵乳酸杆菌の、Mlpタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号gb|AAP41738.1）と約42%の同一性、アミノ酸1504～2513がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP_965818.1）と約30%の同一性、アミノ酸1987～2513がウシ（Bos taurus）の、ヒトHr44ウシ相同体であるタンパク質（アクセッション番号emb|CAC16354.1）と約32%の同一性を有することを示した。

【0181】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号30（346アミノ酸）における、アミノ酸2～204がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046067.1）と約33%の同一性、アミノ酸56～231がラクトバシラスロイテリの、粘液結合タンパク質前駆体（Mub）であるタンパク質（アクセッション番号gb|AAF25576.1）と約34%の同一性、アミノ酸1～346がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP_964510.1）と約26%の同一性、アミノ酸2～344がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP_964406.1）と約24%の同一性、そして、アミノ酸2～182がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046945.1）と約29%の同一性を有することを示した。

10

【0182】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号32（294アミノ酸）における、アミノ酸6～294がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046131.1）と約34%の同一性、アミノ酸6～293がラクトバシラスガセリの、RTX毒素及び関連のCa²⁺結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号ZP_00046947.1）と約29%の同一性、アミノ酸6～293がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046945.1）と約29%の同一性、アミノ酸6～284がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046130.1）と約30%の同一性、そして、アミノ酸3～279がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP_964510.1）と約30%の同一性を有することを示した。

20

【0183】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号34（185アミノ酸）における、アミノ酸3～179がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP_964510.1）と約42%の同一性、アミノ酸10～176がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046067.1）と約33%の同一性、アミノ酸10～177がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046946.1）と約30%の同一性、アミノ酸10～177がラクトバシラスガセリの、RTX毒素及び関連のCa²⁺結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号ZP_00046947.1）と約30%の同一性、そして、アミノ酸12～177がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046945.1）と約30%の同一性を有することを示した。

30

40

【0184】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号36（508アミノ酸）における、アミノ酸4～474がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046128.1）と約30%の同一性、アミノ酸9～409がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046781.1）と約31%の同一性、アミノ酸9～362がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP_964064.）と約30%の同一性、アミノ酸13～399がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP_00046779.1）と約29%の同一性、そして、アミノ酸13～385がラク

50

トバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__964062.1）と約31%の同一性を有することを示した。

【0185】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号38（339アミノ酸）における、アミノ酸79～286がラクトバシラスプラントルムの、細胞表面タンパク質前駆体であるタンパク質（アクセッション番号NP__784891.1）と約31%の同一性、アミノ酸86～285がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__965614.1）と約32%の同一性、アミノ酸112～284がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP__00046316.1）と約34%の同一性、アミノ酸178～293がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP__00046308.1）と約42%の同一性、アミノ酸79～282が発酵乳酸杆菌の、Mlpタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号gb|AAP41738.1）と約29%の同一性を有することを示した。

10

【0186】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号40（76アミノ酸）における、アミノ酸4～75がラクトバシラスプラントルムの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__786269.1）と約47%の同一性、アミノ酸2～73がアセトンプタトル菌（*Clostridium acetobutylicum*）の、HypQ3タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号gb|AAK11585.1）と約43%の同一性、アミノ酸2～73がアセトンプタトル菌の、ステロイド結合タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__149307.1）と約43%の同一性、アミノ酸1～73がメタノサルチナアセチボランス（*Methanosarcina acetivorans*）の推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__618599.1）と約44%の同一性、アミノ酸1～73がクロストリジウムパーフリンジェンス（*Clostridium perfringens*）の推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__563415.1）と約42%の同一性を有することを示した。

20

【0187】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号42（355アミノ酸）における、アミノ酸99～340が化膿連鎖球菌の、表面排除タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__606538.1；NC__003485）と約26%の同一性、アミノ酸99～340が化膿連鎖球菌の、細胞表面タンパク質前駆体であるタンパク質（アクセッション番号NP__664001.1）と約26%の同一性、アミノ酸99～340が化膿連鎖球菌の、表面排除タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP268623.1；NC__002737）と約26%の同一性、アミノ酸116～319がエンテロコッカスフェカーリスの、表面排除タンパク質（sea1）前駆体であるタンパク質（アクセッション番号pir_S22452）と約23%の同一性、アミノ酸116～319がエンテロコッカスフェカーリスの、表面排除タンパク質（sea1）であるタンパク質（アクセッション番号NP__816976.1）と約23%の同一性を有することを示した。

30

40

【0188】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号44（111アミノ酸）における、アミノ酸1～107がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__965479.1）と約27%の同一性、アミノ酸1～102がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号ZP__00046710.1）と約27%の同一性、アミノ酸31～108のブラントラウト（*Salmo trutta*）の、心臓トロポミオシンであるタンパク質（アクセッション番号emb|CAA91434.1）と約26%の同一性、アミノ酸31～94がヒト（*Homo sapiens*）の推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__653299.2）と約31%の同一性、アミノ酸33～108がマウス（*Mus musculus*）の、精巣発現遺伝子9であるタンパク質（ア

50

クッセッション番号NP033385.1; NM__009359)と約25%の同一性を有することを示した。

【0189】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号46(66アミノ酸)における、アミノ酸15~62がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質(アクセッション番号ZP__00046645.1)と約58%の同一性、アミノ酸12~60がラクトバシラスガセリの、V型分泌経路付着因子(AidA)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046948.1)と約58%の同一性、アミノ酸15~53がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__964984.1)と約61%の同一性、アミノ酸16~54がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質(アクセッション番号ZP__00046307.1)と約58%の同一性、アミノ酸15~52がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965682.1)と約63%の同一性を有することを示した。

10

【0190】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号48(231アミノ酸)における、アミノ酸66~231がラクトバシラスガセリの、Apf1タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAO86515.1)と約44%の同一性、アミノ酸66~231がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質(アクセッション番号ZP__00047488.1)と約44%の同一性、アミノ酸66~231がラクトバシルスジョンソニの、凝集促進因子であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAN78451.1)と約44%の同一性、アミノ酸66~231がラクトバシルスジョンソニの表面タンパク質、凝集促進因子であるタンパク質(アクセッション番号NP__965551.1)と約40%の同一性、そして、アミノ酸66~231がラクトバシルスジョンソニの、表面タンパク質(Apf1)であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAN63951.1)と約40%の同一性を有することを示した。

20

【0191】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号50(120アミノ酸)における、アミノ酸26~120がラクトバシラスプラントルムの、細胞外タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__786365.1)と約61%の同一性、アミノ酸14~120がラクトバシラスプラントルムの、細胞外タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__786209.1)と約54%の同一性、アミノ酸24~120がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質(アクセッション番号ZP__00047488.1)と約52%の同一性、アミノ酸24~120がラクトバシルスジョンソニの、凝集促進因子であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAN78450.1)と約54%の同一性、そして、アミノ酸26~120がラクトバシルスジョンソニの、凝集促進因子であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAN64914.1)と約55%の同一性を有することを示した。

30

【0192】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号52(264アミノ酸)における、アミノ酸1~94が黄色ブドウ球菌アウレウス亜種の、ser-aspに富んだフィブリノーゲン結合性の骨シアロタンパク質結合タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__373774.1)と約27%の同一性、アミノ酸1~94が黄色ブドウ球菌アウレウス亜種の、ser-aspに富んだフィブリノーゲン結合性の骨シアロタンパク質結合タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__371087.1)と約27%の同一性、そして、アミノ酸1~94が黄色ブドウ球菌の、フィブリノーゲン結合タンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号pir T28680)と約27%の同一性を有することを示した。

40

【0193】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号54(991アミノ酸)における、アミノ酸97~477が熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)

50

の推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__701725.1）と約 24% の同一性、アミノ酸 270 ~ 510 が細胞性粘菌（*Dictyostelium discoideum*）の推定上のタンパク質（アクセッション番号 gb|AAO51593.1）と約 22% の同一性、アミノ酸 47 ~ 452 が熱帯熱マラリア原虫の、STARP 抗原であるタンパク質（アクセッション番号 NP__703988.1）と約 23% の同一性、アミノ酸 13 ~ 401 が熱帯熱マラリア原虫の推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__704588.1）と約 19% の同一性、そして、アミノ酸 44 ~ 403 がフソバクテリウムヌクレアタム（*Fusobacterium nucleatum*）のヌクレアタム（*nucleatum*）亜種の、溶血素であるタンパク質（アクセッション番号 NP__602617.1）と約 23% の同一性を有することを示した。

10

【0194】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 56（906 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 888 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964984.1）と約 70% の同一性、アミノ酸 1 ~ 760 がラクトバシラスガセリの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046780.1）と約 24% の同一性、アミノ酸 1 ~ 645 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964063.1）と約 23% の同一性、アミノ酸 1 ~ 248 がラクトバシラスガセリの推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046645.1）と約 29% の同一性、そして、アミノ酸 27 ~ 869 が表皮ブドウ球菌の、連鎖球菌血球凝集素タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__765804.1）と約 17% の同一性を有することを示した。

20

【0195】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 58（566 アミノ酸）における、アミノ酸 4 ~ 564 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965038.1）と約 69% の同一性、アミノ酸 4 ~ 564 がラクトバシラスガセリの、真核生物 snRNP に相同な RNA 結合タンパク質であることが予測されているタンパク質（アクセッション番号 ZP__00045959.1）と約 66% の同一性、アミノ酸 4 ~ 566 がエンテロコッカスファエシウム（*Enterococcus faecium*）の、真核生物 snRNP に相同な RNA 結合タンパク質であることが予測されているタンパク質（アクセッション番号 ZP__00037499.1）と約 41% の同一性、アミノ酸 4 ~ 566 がエンテロコッカスフェカリスのフィブロネクチン/フィブリノーゲン結合タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__814975.1）と約 41% の同一性、そして、アミノ酸 4 ~ 557 がラクトバシラスプランタルムの、粘着性タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__785358.1）と約 41% の同一性を有することを示した。

30

【0196】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 60（444 アミノ酸）における、アミノ酸 49 ~ 444 がアシドフィルス菌の、S 層タンパク質前駆体であるタンパク質（アクセッション番号 sp|P35829|SLAP_LACAC）と約 90% の同一性、アミノ酸 49 ~ 443 がラクトバシルスヘルベティカス（*Lactobacillus helveticus*）の、表層タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 emb|CAA62606.1）と約 67% の同一性、アミノ酸 49 ~ 443 がラクトバシルスヘルベティカスの、表層タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 emb|CAB46984.1; AJ388558）と約 67% の同一性、アミノ酸 49 ~ 443 がラクトバシルスヘルベティカスの、表層タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 emb|CAB46985.1）と約 66% の同一性、そして、アミノ酸 49 ~ 443 がラクトバシルスヘルベティカスの、表層タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 emb|CAB46986.1）と約 66% の同一性を有することを示した。

40

【0197】

50

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 62 (457 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 457 がアシドフィルス菌の、SB タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 CAA61561.1; X89376) と約 88% の同一性、アミノ酸 1 ~ 457 がアシドフィルス菌の、S 層タンパク質前駆体であるタンパク質 (アクセッション番号 sp|P35829|SLAP_LACAC) と約 51% の同一性、アミノ酸 1 ~ 456 がラクトバシルスヘルベティカスの、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 emb|CAB46985.1; AJ388559) と約 44% の同一性、アミノ酸 1 ~ 456 がラクトバシルスヘルベティカスの、表層タンパク質 (アクセッション番号 emb|CAA62606.1) であるタンパク質と約 44% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 456 がラクトバシルスヘルベティカスの、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 emb|CAA63409.1) と約 44% の同一性を有することを示した。

10

【0198】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 64 (567 アミノ酸) における、アミノ酸 163 ~ 311 がラクトバシルスクリスパトゥス (*Lactobacillus crispatus*) の、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAB58734.1; AF001313) と約 35% の同一性、アミノ酸 182 ~ 311 がアシドフィルス菌の、SB - タンパク質 (アクセッション番号 emb|CAA61561.1; X89376) であるタンパク質と約 37% の同一性、アミノ酸 163 ~ 304 がラクトバシルスヘルベティカスの、プロテナーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 dbj|BAB72065.1; AB061775) と約 34% の同一性、アミノ酸 27 ~ 311 がアシドフィルス菌の、表層タンパク質前駆体 (アクセッション番号 sp|P35829|SLAP_LACAC) であるタンパク質と約 25% の同一性、アミノ酸 44 ~ 104 がヒト (*Homo sapiens*) の、ミオメシン 1 であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__003794.1; NM__003803) と約 34% の同一性を有することを示した。

20

【0199】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 66 (177 アミノ酸) における、アミノ酸 13 ~ 170 がラクトバシルスクリスパトゥスの、表層タンパク質 (アクセッション番号 gb|AAB58734.1) であるタンパク質と約 28% の同一性、アミノ酸 9 ~ 170 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAF68972.1) と約 26% の同一性、アミノ酸 42 ~ 162 がアセトンプタトル菌の、腸管毒に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__347713.1) と約 26% の同一性、アミノ酸 62 ~ 166 がラクトバシラスガセリの、グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼ (アクセッション番号 ZP__00046260.1) であるタンパク質と約 26% の同一性、そして、アミノ酸 40 ~ 162 がクロモバクテリウムピオラセウム (*Chromobacterium violaceum*) の、r h s 関連タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__900908.1) と約 25% の同一性を有することを示した。

30

【0200】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 68 (173 アミノ酸) における、アミノ酸 68 ~ 135 がラマ (*Lama glama*) の、免疫グロブリン重鎖可変領域であるタンパク質 (アクセッション番号 emb|CAD22470:1) と約 32% の同一性、アミノ酸 107 ~ 171 がラット (*Rattus norvegicus*) の、嗅覚受容体様タンパク質 F3 に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 XP__216832.2) と約 33% の同一性、アミノ酸 71 ~ 165 がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) (アクセッション番号 NP__191860.1) のタンパク質と約 27% の同一性、アミノ酸 71 ~ 160 が環境配列 (アクセッション番号 gb|EAD49084.1) と約 29% の同一性、そして、アミノ酸 80 ~ 157 が細胞性粘菌のタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAO51562.1) と約 26% の同一性を有することを示した。

40

50

【0201】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 70 (292 アミノ酸) における、アミノ酸 2 ~ 292 がアシドフィルス菌の、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAF65561.1; AF250229) と約 66% の同一性、アミノ酸 8 ~ 291 がアシドフィルス菌の、S 層タンパク質前駆体 (アクセッション番号 sp | P35829; SLAP_LACAC) であるタンパク質と約 28% の同一性、アミノ酸 178 ~ 291 がアシドフィルス菌の、SB-タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 emb | CAA61561.1; X89376) と約 42% の同一性、アミノ酸 137 ~ 291 がラクトバシルスクリスパトゥスの、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAB58734.1; AF001313) と約 37% の同一性、アミノ酸 90 ~ 291 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAF68972.1; AF253044) と約 32% の同一性を有することを示した。

10

【0202】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 72 (216 アミノ酸) における、アミノ酸 35 ~ 128 がラクトバシルスクリスパトゥスの、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAB58734.1; AF001313) と約 27% の同一性、アミノ酸 35 ~ 128 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質 (アクセッション番号 dbj | BAC76687.1) であるタンパク質と約 27% の同一性、アミノ酸 35 ~ 128 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAF68972.1) と約 28% の同一性、アミノ酸 41 ~ 126 が環境配列 (アクセッション番号 gb | EAG77017.1) と約 31% の同一性、そして、アミノ酸 45 ~ 169 が環境配列 (アクセッション番号 gb | EAC33545.1) と約 28% の同一性を有することを示した。

20

【0203】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 74 (359 アミノ酸) における、アミノ酸 34 ~ 228 がサイトファガフチンソニ (*Cytophaga hutchinsonii*) の推定上のタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00118765.1) と約 27% の同一性、アミノ酸 3 ~ 160 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 dbj | BAC76687.1) と約 28% の同一性、アミノ酸 98 ~ 256 がデルブリュック菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) ブルガリカス (*bulgaricus*) 亜種の、ラクトセピン (*lactocepin*) (EC3.4.21.96) 前駆体 (アクセッション番号 pir | JJC6032) であるタンパク質と約 26% の同一性、アミノ酸 4 ~ 160 がラクトバシルスクリスパトゥスの、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAB58734.1) と約 27% の同一性、アミノ酸 3 ~ 160 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AAF68972.1) と約 28% の同一性を有することを示した。

30

【0204】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 76 (1676 アミノ酸) における、アミノ酸 926 ~ 1528 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__965634.1) と約 42% の同一性、アミノ酸 839 ~ 1528 がストレプトコッカスアガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) の、表面タンパク質 R28 であるタンパク質 (アクセッション番号 gb | AD39085.1; AF091393) と約 40% の同一性、アミノ酸 839 ~ 1528 がストレプトコッカスアガラクティエの、表面タンパク質 Rib であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__687467.1) と約 39% の同一性、アミノ酸 839 ~ 1528 がストレプトコッカスアガラクティエの、rib タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 pir | T28681) と約 39% の同一性、そして、アミノ酸 752 ~ 1528 がエンテロ

40

50

コッカスファエシウムの、表面タンパク質前駆体に相同であるタンパク質（アクセシオン番号 emb | CAD32315.1）と約33%の同一性を有することを示した。

【0205】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号78（1924アミノ酸）における、アミノ酸921～1796がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセシオン番号 NP__965634.1）と約44%の同一性、アミノ酸807～1923が化膿連鎖球菌の、表面タンパク質 R28であるタンパク質（アクセシオン番号 gb | AAD39085.1）と約29%の同一性、アミノ酸807～1923がストレプトコッカスアガラクティエの、表面タンパク質 Ribであるタンパク質（アクセシオン番号 NP__687467.1）と約30%の同一性、アミノ酸807～1923がストレプトコッカスアガラクティエの、ribタンパク質であるタンパク質（アクセシオン番号 pir T28681）と約30%の同一性、アミノ酸984～1812が発酵乳酸杆菌の、Rlpタンパク質であるタンパク質（アクセシオン番号 gb | AAP41737.1）と約31%の同一性を有することを示した。

10

【0206】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号80（353アミノ酸）における、アミノ酸128～344がヘモフィルスソムヌス（*Haemophilus somnus*）の、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセシオン番号 ZP__00133279.1）と約22%の同一性、アミノ酸128～344がヘモフィルスソムヌスの、ヘムの利用又は接着に關与する大きなエキソプロテインであるタンパク質（アクセシオン番号 ZP__00133280.1）と約22%の同一性、アミノ酸137～278が環境配列（アクセシオン番号 gb | EAC64082.1）と約26%の同一性、そして、アミノ酸84～250が環境配列（アクセシオン番号 gb | EAJ12295.1）と約27%の同一性を有することを示した。

20

【0207】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号82（364アミノ酸）における、アミノ酸33～222がリステリアイノクア（*Listeria innocua*）の、自己溶菌酵素、アミダーゼであるタンパク質（アクセシオン番号 NP__472032.1）と約46%の同一性、アミノ酸49～237がリステリア菌（*Listeria monocytogenes*）の、自己溶菌酵素、アミダーゼであるタンパク質（アクセシオン番号 gb | AAC46384.1）と約45%の同一性、アミノ酸49～237がリステリア菌の、自己溶菌酵素、アミダーゼであるタンパク質（アクセシオン番号 NP__466081.1）と約45%の同一性、アミノ酸49～237がリステリア菌の、AMIタンパク質であるタンパク質（アクセシオン番号 gb | AAC45605.1）と約45%の同一性、そして、アミノ酸49～299がリステリア菌の、Ami 4bタンパク質であるタンパク質（アクセシオン番号 emb | CAC20640.1；AJ276390）と約39%の同一性を有することを示した。

30

【0208】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号84（334アミノ酸）における、アミノ酸1～333がラクトバシルスジョンソニの、桿形態決定タンパク質（Mr e B）であるタンパク質（アクセシオン番号 NP__964817.1）と約87%の同一性、アミノ酸23～333がラクトバシラスガセリの、細胞形態形成に關与するアクチン様 ATPアーゼであるタンパク質（アクセシオン番号 ZP__00047434.1）と約86%の同一性、アミノ酸1～331がラクトバシラスプラントルムの、細胞形態決定タンパク質（Mr e B）（であるタンパク質アクセシオン番号 NP__785793.1）と約75%の同一性、アミノ酸2～331がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、細胞形態形成に關与するアクチン様 ATPアーゼであるタンパク質（アクセシオン番号 ZP__00063690.1）と約66%の同一性、そして、アミノ酸1～333がリステリアイノクアの、細胞形態決定タンパク質（Mr e B）に相同であるタンパク質（アクセシオン番号 NP__470919.1）と約66%の

40

50

同一性を有することを示した。

【0209】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 86 (329 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 329 がラクトバシルスジオンソニの、mreB 様タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964798.1) と約 86% の同一性、アミノ酸 1 ~ 329 がラクトバシラスガセリの、細胞形態形成に関するアクチン様 ATPアーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046248.1) と約 86% の同一性、アミノ酸 1 ~ 325 がラクトバシラスプラントルムの、細胞形態決定タンパク質 (MreB) であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785826.1) と約 65% の同一性、アミノ酸 1 ~ 328 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、細胞形態形成に関するアクチン様 ATPアーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00063606.1) と約 65% の同一性、そして、アミノ酸 2 ~ 328 が炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の、mb1 タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__847679.1) と約 64% の同一性を有することを示した。

10

【0210】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 88 (283 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 281 がラクトバシラスガセリの、細胞形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047435.1) と約 64% の同一性、アミノ酸 1 ~ 281 がラクトバシルスジオンソニの、桿形態決定タンパク質 (MreC) であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964818.1) と約 63% の同一性、アミノ酸 1 ~ 279 がラクトバシラスプラントルムの、細胞形態決定タンパク質 (MreC) であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785792.1) と約 42% の同一性、アミノ酸 1 ~ 279 がエンテロコッカスファエシウムの、細胞形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00037396.1) と約 38% の同一性、アミノ酸 33 ~ 281 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、細胞形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00063689.1) と約 41% の同一性を有することを示した。

20

【0211】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 90 (179 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 171 がラクトバシルスジオンソニの、桿形態決定タンパク質 (MreD) であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964819.1) と約 42% の同一性、アミノ酸 15 ~ 171 がラクトバシラスガセリの、細胞形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047436.1) と約 39% の同一性、アミノ酸 6 ~ 159 がラクトバシラスプラントルムの、細胞形態決定タンパク質 (MreD) であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785791.1) と約 26% の同一性、アミノ酸 3 ~ 122 がオセアノバチラスイヘエンシス (*Oceanobacillus iheyensis*) の、細胞形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__692972.1) と約 28% の同一性、そして、アミノ酸 11 ~ 132 がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、細胞形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__268387.1) と約 29% の同一性を有することを示した。

30

40

【0212】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 92 (397 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 397 がラクトバシルスジオンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__964801.1) と約 61% の同一性、アミノ酸 1 ~ 397 がラクトバシラスガセリの、細胞分裂膜タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046251.1) と約 60% の同一性、アミノ酸 13 ~ 392 がラクトバシラスプラントルムの、桿形態決定タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785823.1) と約 50% の同一性、アミノ酸 5 ~ 384 がエンテロコッカスフェカーリスの、FtsW/RodA/SpoVE ファミリーの細胞分裂タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__816148.1) と約 41% の同一性、そ

50

して、アミノ酸 16 ~ 368 がラクトバシラスプラントルムの、桿形態決定タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__785596.1）と約 41% の同一性を有することを示した。

【0213】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 94（437 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 437 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラミン酸 - アラニンリガーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046723.1）と約 91% の同一性、アミノ酸 1 ~ 437 がラクトバシルスジョンソニの、UDP - N - アセチルムラミン酸 - アラニンリガーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__965470.1）と約 91% の同一性、アミノ酸 2 ~ 434 がラクトバシラスプラントルムの、UDP - N - アセチルムラミン酸 - アラニンリガーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__785073.1）と約 56% の同一性、アミノ酸 5 ~ 437 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、UDP - N - アセチルムラミン酸 - アラニンリガーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00064100.1）と約 56% の同一性、アミノ酸 4 ~ 437 がエンテロコッカスフェカーリスの、UDP - N - アセチルムラミン酸 - アラニンリガーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__815590.1）と約 51% の同一性を有することを示した。

10

【0214】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 96（452 アミノ酸）における、アミノ酸 3 ~ 452 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラモイルトリペプチドシンターゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046234.1）と約 87% の同一性、アミノ酸 3 ~ 452 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964783.1）と約 86% の同一性、アミノ酸 3 ~ 452 がラクトバシラスプラントルムの、UDP - N - アセチルムラモイルトリペプチドシンターゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__785844.1）と約 55% の同一性、アミノ酸 3 ~ 452 がエンテロコッカスフェカーリスの、mur リガーゼファミリータンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__816226.1）と約 50% の同一性、そして、アミノ酸 3 ~ 451 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、UDP - N - アセチルムラモイルトリペプチドシンターゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063654.1）と約 51% の同一性を有することを示した。

20

30

【0215】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 98（532 アミノ酸）における、アミノ酸 11 ~ 528 がラクトバシルスジョンソニの、UDP - N - アセチルムラモイル - L - アラニル - D - グルタミル - リジンライゲースであるタンパク質（アクセッション番号 NP__965690.1）と約 83% の同一性、アミノ酸 11 ~ 528 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラモイルトリペプチドシンターゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046637.1）と約 83% の同一性、アミノ酸 10 ~ 524 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、UDP - N - アセチルムラモイルトリペプチドシンターゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00062837.1）と約 44% の同一性、アミノ酸 24 ~ 522 がエンテロコッカスファエシウムの、UDP - N - アセチルムラモイルトリペプチドシンターゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00036035.1）と約 43% の同一性、そして、アミノ酸 10 ~ 522 がエンテロコッカスフェカーリスの、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミン酸 - 2, 6 - ジアミノピメリン酸リガーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__814420.1）と約 42% の同一性を有することを示した。

40

【0216】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 100（459 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 459 がラクトバシルスジョンソニの、UDP - N - アセ

50

チルムラモイルアラニル - D - グルタミン酸リガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964826.1) と約 78% の同一性、アミノ酸 89 ~ 459 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミン酸リガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046265.1) と約 80% の同一性、アミノ酸 1 ~ 456 が炭疽菌の、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミン酸リガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__846291.1) と約 49% の同一性、アミノ酸 1 ~ 456 がバチルスセレウス (*Bacillus cereus*) の、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミン酸リガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__980253.1) と約 49% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 456 がバチルスセレウスの、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミン酸リガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__833632.1) と約 49% の同一性を有することを示した。

10

【0217】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 102 (368 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 364 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルグルコサミン : LPS N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046266.1) と約 79% の同一性、アミノ酸 1 ~ 366 がラクトバシルスジョンソニの、UDP - N - アセチルグルコサミン N - アセチルムラモイル - (ペンタペプチド) ピロホスホリル - ウンデカプレノール N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964827.1) と約 78% の同一性、アミノ酸 1 ~ 366 がラクトバシラスプラントルムの、UDP - N - アセチルグルコサミン N - アセチルムラモイル - (ペンタペプチド) ピロホスホリル - ウンデカプレノール N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785692.1) と約 49% の同一性、アミノ酸 1 ~ 368 がバシラスハロドラン (*Bacillus halodurans*) の、UDP - N - アセチルグルコサミン - N - アセチルムラモイル - (ペンタペプチド) ピロホスホであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__243431.1) と約 46% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 366 がエンテロコッカスヒラエ (*Enterococcus hirae*) の、UDP - N - アセチルグルコサミン N - アセチルムラモイル - (ペンタペプチド) ピロホスホリル - ウンデカプレノール N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 sp|O07670|MURG_ENTHR) と約 47% の同一性を有することを示した。

20

30

【0218】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 104 (322 アミノ酸) における、アミノ酸 4 ~ 322 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラモイルペンタペプチドホスホトランスフェラーゼ / UDP - N - アセチルグルコサミン - 1 - リン酸トランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047442.1) と約 67% の同一性、アミノ酸 4 ~ 322 がラクトバシルスジョンソニの、ホスホ - N - アセチルムラモイル - ペンタペプチド - トランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964825.1) と約 67% の同一性、アミノ酸 1 ~ 319 がラクトバシラスプラントルムの、ホスホ - N - アセチルムラモイル - ペンタペプチド - トランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785694.1) と約 49% の同一性、アミノ酸 9 ~ 320 がエンテロコッカスファエシウムの、UDP - N - アセチルムラモイルペンタペプチドホスホトランスフェラーゼ / UDP - N - アセチルグルコサミン - 1 - リン酸トランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00037828.1) と約 47% の同一性、そして、アミノ酸 9 ~ 320 がエンテロコッカスフェカリスの、ホスホ - N - アセチルムラモイルペンタペプチドトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__814728.1) と約 47% の同一性を有することを示した。

40

【0219】

50

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 0 6 (2 1 5 アミノ酸) における、アミノ酸 1 5 ~ 2 1 4 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 5 5 2 7 . 1) と約 5 4 % の同一性、アミノ酸 1 5 ~ 2 1 4 がラクトバシラスガセリの、ムラミダーゼ (ベン毛特異的) であるタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 4 6 3 6 5 . 1) と約 5 4 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 2 1 5 がリステリア菌の、N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (自己溶菌酵素) に相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 4 6 4 7 4 0 . 1) と約 4 2 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 2 1 5 がリステリアイノクアの、N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (自己溶菌酵素) に相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 4 7 0 5 1 5 . 1 ; N C _ 0 0 3 2 1 2) と約 4 2 % の同一性、そして、アミノ酸 7 1 ~ 2 1 5 がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、N - アセチルムラミダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 2 6 7 5 2 1 . 1) と約 5 3 % の同一性を有することを示した。

10

【 0 2 2 0 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 0 8 (4 0 9 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 2 6 2 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 4 1 7 1 . 1) と約 4 3 % の同一性、アミノ酸 2 6 ~ 2 5 7 がリステリア菌の、自己溶菌酵素 (E C 3 . 5 . 1 . 2 8) 、 (N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ) に相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 4 6 4 6 0 1 . 1) と約 3 9 % の同一性、アミノ酸 1 6 ~ 2 3 6 がリステリアイノクアの、自己溶菌酵素、N - アセチルムラミダーゼに相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 4 7 2 1 6 6 . 1) と約 3 8 % の同一性、アミノ酸 1 6 ~ 2 7 4 がリステリア菌の、自己溶菌酵素、N - アセチルムラミダーゼに相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 4 6 6 2 1 3 . 1) と約 3 4 % の同一性、そして、アミノ酸 4 0 ~ 2 2 2 がエンテロコッカスファエシウムの、グリコシダーゼ (G l y A) に相同であるタンパク質 (アクセション番号 g b | A A K 7 2 4 9 6 . 1) と約 3 9 % の同一性を有することを示した。

20

【 0 2 2 1 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 1 0 (1 5 3 アミノ酸) における、アミノ酸 1 0 5 ~ 1 5 2 がエノコッカスエニ (Oenococcus oeni) の、ムラミダーゼ (ベン毛特異的) であるタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 6 9 3 8 4 . 1) と約 4 7 % の同一性、アミノ酸 1 0 8 ~ 1 5 0 が枯草菌 (Bacillus subtilis) の、N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 3 8 9 1 6 4 . 1 ; N C _ 0 0 0 9 6 4) と約 5 3 % の同一性、アミノ酸 1 0 4 ~ 1 5 0 がクロロフレクサスアウランティアクス (Chloroflexus aurantiacus) の推定上のタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 1 9 7 4 1 . 1) と約 4 8 % の同一性、アミノ酸 1 0 7 ~ 1 5 2 がデイノコッカスラジオデュランス (Deinococcus radiodurans) の、細胞壁タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 2 9 4 6 3 4 . 1) と約 5 4 % の同一性、アミノ酸 1 0 9 ~ 1 5 2 がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、N - アセチルムラミダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 2 6 6 6 9 7 : 1) と約 4 7 % の同一性を有することを示した。

30

40

【 0 2 2 2 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 1 2 (3 6 0 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 3 6 0 がラクトバシラスガセリの、D - アラニン - D - アラニンリガーゼ及び関連の A T P 捕捉酵素であるタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 4 7 0 3 6 . 1) と約 7 1 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 3 6 0 がラクトバシルスジョンソニの、D - アラニン - D - アラニンリガーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 4 1 2 4 . 1) と約 7 1 % の同一性、アミノ酸 3 ~ 3 4 8 が大腸菌 (Escherichia coli) の、D - アラニン - D - アラニンリガーゼ A であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 3 0 8 4 5 8 . 1) と約 4 1 % の同一性、アミノ酸 3 ~ 3 4 8 が大腸菌の、

50

D - アラニン - D - アラニンリガーゼ A であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__752421.1) と約 41% の同一性、アミノ酸 4 ~ 348 がオセアノバチラスイヘエンシス (*Oceanobacillus iheyensis*) の、D - アラニン - D - アラニンリガーゼ A であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__692227.1) と約 39% の同一性を有することを示した。

【0223】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 114 (327 アミノ酸) における、アミノ酸 29 ~ 326 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__965730.1) と約 41% の同一性、アミノ酸 79 ~ 326 がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046598.1) と約 43% の同一性、アミノ酸 58 ~ 165 がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046597.1) と約 43% の同一性、そして、アミノ酸 141 ~ 187 がクロストリジウムパーフリンジエンスの、細胞分裂タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__561266.1) と約 38% の同一性を有することを示した。

10

【0224】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 116 (455 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 454 がラクトバシルスジョンソニの、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミル - 2, 6 - ジアミノピメリン酸 - D - アラニル - D - アラニルリガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964286.1) と約 77% の同一性、アミノ酸 150 ~ 454 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラモイルペントペプチドシンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047007.1) と約 79% の同一性、アミノ酸 1 ~ 454 がラクトバシラスプラントラムの、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミル - 2, 6 - ジアミノピメリン酸 - D - アラニル - D - アラニルリガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__784298.1) と約 54% の同一性、アミノ酸 1 ~ 454 がエンテロコッカスフェカリスの、UDP - N - アセチルムラモイルアラニル - D - グルタミル - 2, 6 - ジアミノピメリン酸 - D - アラニル - D - アラニルリガーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__814587.1) と約 46% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 454 が化膿連鎖球菌の、D - Ala - D - Ala 付加酵素に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__269511.1) と約 43% の同一性を有することを示した。

20

30

【0225】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 118 (432 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 426 がラクトバシラスプラントラムの、セリン型 D - Ala - D - Ala カルボキシペプチダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__786467.1) と約 40% の同一性、アミノ酸 37 ~ 317 がラクトバシルスジョンソニの、D - アラニル - D - アラニンカルボキシペプチダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964537.1) と約 51% の同一性、アミノ酸 37 ~ 317 がラクトバシラスガセリの、D - アラニル - D - アラニンカルボキシペプチダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047293.1) と約 49% の同一性、アミノ酸 5 ~ 430 が枯草菌の、D - アラニル - D - アラニンカルボキシペプチダーゼ (ペニシリン結合タンパク質 5) であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__387891.1) と約 38% の同一性、アミノ酸 56 ~ 430 が枯草菌の、ペニシリン結合タンパク質 5 であるタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAA22375.1) と約 40% の同一性を有することを示した。

40

【0226】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 120 (441 アミノ酸) における、アミノ酸 11 ~ 430 がラクトバシルスジョンソニの、UDP - N - アセチルグルコサミン 1 - カルボキシビニルトランスフェラーゼ 1 であるタンパク質 (アク

50

セッション番号 NP__964240.1) と約 88% の同一性、アミノ酸 11 ~ 382 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルグルコサミン 1 - カルボキシビニルトランスフェラーゼ 1 であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047072.1) と約 90% の同一性アミノ酸 11 ~ 435 がラクトバシラスプランタルムの、UDP - N - アセチルグルコサミン 1 - カルボキシビニルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__784290.1) と約 64% の同一性、アミノ酸 11 ~ 429 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、UDP - N - アセチルグルコサミンエノールピルビルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00063218.1) と約 62% の同一性、そして、アミノ酸 11 ~ 436 がエンテロコッカスフェカーリスの、UDP - N - アセチルグルコサミン 1 - カルボキシビニルトランスフェラーゼ 2 であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__814899.1) と約 58% の同一性を有することを示した。 10

【0227】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 122 (459 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 459 がラクトバシラスジョンソニの、UDP - N - アセチルグルコサミン - 1 - リン酸ウリジルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964224.1) と約 82% の同一性、アミノ酸 1 ~ 459 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルグルコサミン - 1 - リン酸ウリジルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047088.1) と約 81% の同一性、アミノ酸 3 ~ 453 がラクトバシラスプランタルムの、UDP - N - アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__784257.1) と約 62% の同一性、アミノ酸 3 ~ 457 がエンテロコッカスフェカーリスの、UDP - N - アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__813869.1) と約 61% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 453 がストレプトコッカスアガラクティエの、UDP - N - アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__688532.1) と約 56% の同一性を有することを示した。 20

【0228】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 124 (244 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 239 がラクトバシルスジョンソニの、ウンデカプレニルピロリン酸シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__965298.1) と約 69% の同一性、アミノ酸 1 ~ 239 がラクトバシラスガセリの、ウンデカプレニルピロリン酸シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046589.1) と約 68% の同一性、アミノ酸 10 ~ 242 がエノコッカスエニ (Oenococcus oeni) の、ウンデカプレニルピロリン酸シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00070158.1) と約 57% の同一性、アミノ酸 10 ~ 237 がリステリアイノクアの、ウンデカプレニルニリン酸シンターゼに相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__470688.1) と約 59% の同一性、そして、アミノ酸 10 ~ 242 がエンテロコッカスフェカーリスの、ウンデカプレニルニリン酸シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__816141.1) と約 56% の同一性を有することを示した。 30 40

【0229】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 126 (389 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 377 がラクトバシラスガセリの、UDP - N - アセチルムラモイルペントペプチドホストランスフェラーゼ / UDP - N - アセチルグルコサミン - 1 - リン酸トランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046896.1) と約 72% の同一性、アミノ酸 1 ~ 377 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__964696.1) と約 72% の同一性、アミノ酸 1 ~ 375 がデルブリュック菌の、RgpG タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号、gb|AAK00329.1) と約 72% の同一性、アミノ酸 2 50

～ 355 がラクトバシラスプラントルムの、ウンデカブレニル - リン酸 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__784485.1) と約 54% の同一性、そして、アミノ酸 1～358 がエンテロコッカスフェカリスの、グリコシルトランスフェラーゼ、グループ 4 ファミリータンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__815860.1) と約 51% の同一性を有することを示した。

【0230】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 128 (313 アミノ酸) におけるアミノ酸 51～311 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__965759.1) と約 38% の同一性、アミノ酸 51～311 がラクトバシラスガセリの、ベータラクタマーゼクラス C 及び他のペニシリン結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046847.1) と約 38% の同一性、アミノ酸 30～296 がエンテロコッカスフェカリスの、ペニシリン結合タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__814494.1) と約 31% の同一性、アミノ酸 12～290 がラクトバシラスプラントルムの、セリン型 D - Ala - D - Ala カルボキシペプチダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785548.1) と約 31% の同一性、そして、アミノ酸 38～289 がエンテロコッカスファエシウムの、ベータ - ラクタマーゼクラス C 及び他のペニシリン結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質 (アクセッション番号 ZP__0.0035472.1) と約 33% の同一性を有することを示した。

10

20

【0231】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 130 (374 アミノ酸) における、アミノ酸 49～304 がデルブリュック菌ブルガリカス (bulgaricus) 亜種の、保存されている推定上のペニシリン結合タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAM22482.1) と約 51% の同一性、アミノ酸 67～362 がラクトバシラスプラントルムの、セリン型 D - Ala - D - Ala カルボキシペプチダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__784838.1) と約 30% の同一性、アミノ酸が 46～371 ストレプトコッカスアガラクティエ (Streptococcus agalactiae) の推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__735091.1) と約 24% の同一性、アミノ酸 46～371 がストレプトコッカスアガラクティエの、リポタンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__687676.1) と約 24% の同一性、そして、アミノ酸 48～346 がエンテロコッカスフェカリスの、ペニシリン結合タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__814494.1) と約 27% の同一性を有することを示した。

30

【0232】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 132 (702 アミノ酸) における、アミノ酸 1～699 がラクトバシルスジョンソニの、ペニシリン結合タンパク質 2B であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__965426.1) と約 69% の同一性、アミノ酸 22～699 がラクトバシラスガセリの、細胞分裂タンパク質 FtsI / ペニシリン結合タンパク質 2 であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046928.1) と約 71% の同一性、アミノ酸 1～700 がラクトバシラスプラントルムの、ペニシリン結合タンパク質 2B であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785166.1) と約 44% の同一性、アミノ酸 19～699 がエンテロコッカスフェカリスの、ペニシリン結合タンパク質 2B であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__816479.1) と約 39% の同一性、そして、アミノ酸 12～702 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、細胞分裂タンパク質 FtsI / ペニシリン結合タンパク質 2 であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00063639.1) と約 37% の同一性を有することを示した。

40

【0233】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 134 (704 アミ

50

ノ酸)における、アミノ酸34~704がラクトバシルスジョンソニの、ペニシリン結合タンパク質1Fであるタンパク質(アクセッション番号NP__965485.1)と約75%の同一性、アミノ酸34~704がラクトバシラスガセリの、膜カルボキシペプチダーゼ(ペニシリン結合タンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046704.1)と約74%の同一性、アミノ酸34~703がラクトバシラスプラントルムの、ペニシリン結合タンパク質2aであるタンパク質(アクセッション番号NP__785034.1)と約53%の同一性、アミノ酸24~699がエンテロコッカスフェカリスの、ペニシリン結合タンパク質2aであるタンパク質(アクセッション番号NP__814430.1)と約47%の同一性、そして、アミノ酸61~704がリステリア菌の、ペニシリン結合タンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__465753.1)と約47%の同一性を有することを示した。

10

【0234】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号136(343アミノ酸)における、アミノ酸26~337がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965496.1)と約68%の同一性、アミノ酸26~338がラクトバシラスガセリの、ベータラクタマーゼクラスC及び他のペニシリン結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質(アクセッション番号ZP__00046698.1)と約67%の同一性、アミノ酸27~178がラクトバシラスロイテリの、ペニシリン結合タンパク質クラスCのfmt様タンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAP97059.1)と約67%の同一性、アミノ酸27~343がミュータンス連鎖球菌(Streptococcus mutans)の、ペニシリン結合タンパク質クラスCのfmt様タンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__721297.1)と約29%の同一性、そして、アミノ酸39~323がストレプトコッカスアガラクティエの、リポタンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__687676.1)と約30%の同一性を有することを示した。

20

【0235】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号138(776アミノ酸)における、アミノ酸1~679がラクトバシラスガセリの、膜カルボキシペプチダーゼ(ペニシリン結合タンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00045945.1)と約71%の同一性、アミノ酸1~680がラクトバシルスジョンソニの、ペニシリン結合タンパク質1Aであるタンパク質(アクセッション番号NP__965052.1)と約71%の同一性、アミノ酸19~688がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、膜カルボキシペプチダーゼ(ペニシリン結合タンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZF__00064357.1)と約45%の同一性、アミノ酸1~688がラクトバシラスプラントルムの、ペニシリン結合タンパク質1a(アクセッション番号NP__785323.1)であるタンパク質と約45%の同一性、そして、アミノ酸20~651がエンテロコッカスファエシウムの、膜カルボキシペプチダーゼ(ペニシリン結合タンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00035508.1)と約45%の同一性を有することを示した。

30

【0236】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号140(218アミノ酸)における、アミノ酸7~217がラクトバシラスガセリの、リコンビナーゼに相同なペニシリン結合タンパク質関連因子Aであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00045946.1)と約72%の同一性、アミノ酸7~212がラクトバシルスジョンソニの、組換えタンパク質(RecU)であるタンパク質(アクセッション番号NP__965051.1)と約74%の同一性、アミノ酸7~213がエンテロコッカスヒラエの、ペニシリン結合タンパク質関連因子Aであるタンパク質(アクセッション番号emb|CAC21567.1)と約53%の同一性、アミノ酸7~212がラクトバシラスプラントルムの、組換えタンパク質(RecU)であるタンパク質(アクセッション番号NP__785324.1)と約57%の同一性、アミノ酸7~213がエンテロコッカスファ

40

50

エシウムの、リコンビナーゼに相同なペニシリン結合タンパク質関連因子Aであるタンパク質（アクセッション番号ZP__00035507.1）と約52%の同一性を有することを示した。

【0237】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号142（364アミノ酸）における、アミノ酸48～290がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、保存されている推定上のペニシリン結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号gb|AAM22482.1）と約46%の同一性、アミノ酸37～337がラクトバシラスプラントルムの、セリン型D-Ala-D-Alaカルボキシペプチダーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__784838.1）と約30%の同一性、アミノ酸19～336がエンテロコッカスフェカリスの、ペニシリン結合タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__814494.1）と約27%の同一性、アミノ酸78～299がミュータンス連鎖球菌の、ペニシリン結合タンパク質クラスC、fmt様タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__721297.1）と約31%の同一性、そして、アミノ酸48～336がラクトバシラスプラントルムの、セリン型D-Ala-D-Alaカルボキシペプチダーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__785548.1）と約27%の同一性を有することを示した。

10

【0238】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号144（369アミノ酸）における、アミノ酸46～299がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、保存されている推定上のペニシリン結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号gb|AAM22482.1）と約46%の同一性、アミノ酸16～350がラクトバシラスプラントルムの、セリン型D-Ala-D-Alaカルボキシペプチダーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__784838.1）と約30%の同一性、アミノ酸26～362が黄色ブドウ球菌アウレウス亜種の、自己融解及びメチシリン耐性に関連したタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__371581.1）と約29%の同一性、アミノ酸22～304が表皮ブドウ球菌の、自己融解及びメチシリン耐性に関連したタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__764309.1）と約28%の同一性、そして、アミノ酸16～341がラクトバシラスプラントルムの、セリン型D-Ala-D-Alaカルボキシペプチダーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__785548.1）と約28%の同一性を有することを示した。

20

30

【0239】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号146（720アミノ酸）における、アミノ酸14～719がラクトバシラスガセリの、細胞分裂タンパク質FtsI/ペニシリン結合タンパク質2であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00047441.1）と約60%の同一性、アミノ酸14～719がラクトバシルスジョンソニの、ペニシリン結合タンパク質2Bであるタンパク質（アクセッション番号NP__964824.1）と約60%の同一性、アミノ酸42～719がラクトバシラスプラントルムの、ペニシリン結合タンパク質2Bであるタンパク質（アクセッション番号NP__785695.1）と約43%の同一性、アミノ酸42～718がリステリアイノクアの、ペニシリン結合タンパク質2Bに相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__471479.1）と約39%の同一性、そして、アミノ酸42～718がリステリア菌の、ペニシリン結合タンパク質2Bに相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__465563.1）と約38%の同一性を有することを示した。

40

【0240】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号148（504アミノ酸）における、アミノ酸1～503がラクトバシルスジョンソニの、D-アラニン活性化酵素であるタンパク質（アクセッション番号NP__965763.1）と約74%の同一性、アミノ酸1～503がラクトバシラスガセリの、非リボソームペプチドシンターゼモジュール及び関連のタンパク質ファミリーに属するタンパク質（アクセッション番号

50

Z P__00046843.1)と約73%の同一性、アミノ酸1~503がラクトバシラスプラタルムの、D-アラニン活性化酵素(DltA)であるタンパク質(アクセッション番号NP__785546.1)と約53%の同一性、アミノ酸1~503がラクトバシラスラムノサス(Lactobacillus rhamnosus)の、D-アラニン-ポリ(ホスホリビトール)リガーゼサブユニット1(D-アラニン活性化酵素)であるタンパク質(アクセッション番号sp|P35854|DLTA_LACRH)と約51%の同一性、そして、アミノ酸1~504がストレプトコッカスアガラクティエの、D-アラニン活性化酵素であるタンパク質(アクセッション番号NP__688780.1)と約49%の同一性を有することを示した。

【0241】

ギャップつきBlasTPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号150(412アミノ酸)における、アミノ酸6~412がラクトバシラスガセリの、D-アラニンの搬出に關与する推定上の膜タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046844.1)と約70%の同一性、アミノ酸6~412がラクトバシルスジョンソニの、DltBタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__965762.1)と約70%の同一性、アミノ酸6~410がラクトバシラスプラタルムの、D-アラニル輸送タンパク質(DltB)であるタンパク質(アクセッション番号NP__785545.1)と約58%の同一性、アミノ酸4~409がエンテロコッカスフェカーリスの、塩基性膜タンパク質(DtlB)であるタンパク質(アクセッション番号NP__816377.1)と約55%の同一性、そして、アミノ酸6~409がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、D-アラニンの搬出に關与する推定上の膜タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00064054.1)と約51%の同一性を有することを示した。

【0242】

ギャップつきBlasTPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号152(79アミノ酸)における、アミノ酸1~79がラクトバシルスジョンソニの、D-アラニル担体タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__965761.1)と約81%の同一性、アミノ酸1~79がラクトバシラスガセリの、アシル担体タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046845.1)と約79%の同一性、アミノ酸1~73がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、アシル担体タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00064053.1)と約63%の同一性、アミノ酸2~77がラクトバシラスプラタルムの、D-アラニル担体タンパク質(DltC)であるタンパク質(アクセッション番号NP__785544.1)と約67%の同一性、そして、アミノ酸2~77がラクトバシラスプラタルムの、D-アラニル担体タンパク質(DltC)であるタンパク質(アクセッション番号NP__785028.1)と約64%の同一性を有することを示した。

【0243】

ギャップつきBlasTPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号154(428アミノ酸)における、アミノ酸1~428がラクトバシルスジョンソニの、DltD前駆体であるタンパク質(アクセッション番号NP__965760.1)と約58%の同一性、アミノ酸1~428がラクトバシラスガセリの、リポテイコ酸及び細胞壁タイコ酸のD-アラニンエステル化に關与するタンパク質(D-アラニン輸送タンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046846.1)と約58%の同一性、アミノ酸1~409がラクトバシラスプラタルムの、D-アラニル輸送タンパク質DltDであるタンパク質(アクセッション番号NP__785543.1)と約50%の同一性、アミノ酸1~410がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、リポテイコ酸及び細胞壁タイコ酸のD-アラニンエステル化に關与するタンパク質(D-アラニン輸送タンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00064052.1)と約46%の同一性、そして、アミノ酸5~408がミュータンス連鎖球菌の、膜外タンパク質(DltD)に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__722019.

10

20

30

40

50

1)と約45%の同一性を有することを示した。

【0244】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号156(477アミノ酸)における、アミノ酸1~473がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質(アクセッション番号 NP_964890.1)と約74%の同一性、アミノ酸1~474がラクトバシラスガセリの、O抗原及びタイコ酸の搬出に關与する膜タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 ZP_00045854.1)と約74%の同一性、アミノ酸1~470が高温性連鎖球菌(*Streptococcus thermophilus*)の、cpsUタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAM93406.1)と約46%の同一性、アミノ酸1~470が高温性連鎖球菌の、EpsIタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAK61904.1)と約46%の同一性、そして、アミノ酸1~470が高温性連鎖球菌の、EpsUタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 emb|CAB52225.1)と約46%の同一性を有することを示した。

10

【0245】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号158(174アミノ酸)における、アミノ酸1~174がラクトバシラスガセリの、UDP-ガラクトピラノースムターゼ(アクセッション番号 ZP_00045853.1)であるタンパク質と約83%の同一性、アミノ酸1~172がラクトバシルスジョンソニの、UDP-ガラクトピラノースムターゼであるタンパク質(アクセッション番号 NP_964888.1)と約83%の同一性、アミノ酸1~169がラクトバシラスプラントルムの、UDP-ガラクトピラノースムターゼであるタンパク質(アクセッション番号 NP_784842.1)と約74%の同一性、アミノ酸1~172がラクトバシラスプラントルムの、UDP-ガラクトピラノースムターゼであるタンパク質(アクセッション番号 NP_784882.1)と約69%の同一性、そして、アミノ酸1~172が高温性連鎖球菌の、EpsJタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAK61905.1)と約63%の同一性を有することを示した。

20

【0246】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号160(133アミノ酸)における、アミノ酸2~133がラクトバシルスジョンソニの、UDP-ガラクトピラノースムターゼであるタンパク質(アクセッション番号 NP_964888.1)と約88%の同一性、アミノ酸4~133がラクトバシラスプラントルムの、UDP-ガラクトピラノースムターゼであるタンパク質(アクセッション番号 NP_784842.1)と約79%の同一性、アミノ酸4~133がラクトバシラスプラントルムの、UDP-ガラクトピラノースムターゼであるタンパク質(アクセッション番号 NP_784882.1)と約78%の同一性、アミノ酸1~133が肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)の、Glf様のタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAL68431.1)と約73%の同一性、そして、アミノ酸1~133が高温性連鎖球菌の、EpsJタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAK61905.1)と約70%の同一性を有することを示した。

30

【0247】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号162(431アミノ酸)が、アミノ酸1~375が肺炎連鎖球菌の、多糖ポリメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAC44966.1)と約22%の同一性、アミノ酸1~368が肺炎連鎖球菌の、多糖ポリメラーゼ(Cps19aI)であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAC78671.1)と約22%の同一性、アミノ酸4~376が肺炎連鎖球菌の、Wzyタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAK20689.1)と約24%の同一性、アミノ酸4~376が肺炎連鎖球菌の、多糖ポリメラーゼ(Cps6aI)に相同であるタンパク質(アクセッション番号 gb|AAL68424.1)と約24%の同一性、そして、アミノ酸4~376が肺炎連鎖球菌の、多糖ポリメラーゼ(Cps6aI)に相同であるタンパク質(アクセッション番号 g

40

50

b | A A L 8 2 7 8 6 . 1) と約 2 4 % の同一性を有することを示した。

【 0 2 4 8 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 6 4 (3 4 6 アミノ酸) における、アミノ酸 3 5 ~ 2 5 1 が肺炎連鎖球菌の、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセセッション番号 e m b | C A A 0 7 4 0 1 . 1 ; A J 0 0 6 9 8 6) と約 3 5 % の同一性、アミノ酸 3 6 ~ 3 0 5 が肺炎連鎖球菌の、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質 (アクセセッション番号 e m b | C A B 5 9 2 9 1 . 1 ; A J 1 3 1 9 8 4) と約 3 2 % の同一性、アミノ酸 4 ~ 2 7 2 がアセトンプタトル菌の、細胞壁生合成に關与するグリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセセッション番号 N P _ 3 4 8 1 1 6 . 1 ; N C _ 0 0 3 0 3 0) と約 3 3 % の同一性、アミノ酸 4 ~ 2 5 4 がビフィドバクテリウムロングム (*Bifidobacterium longum*) の、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質 (アクセセッション番号 N P _ 6 9 5 6 3 9 . 1) と約 3 1 % の同一性、そして、アミノ酸 4 ~ 2 5 4 がビフィドバクテリウムロングムの、細胞壁生合成に關与するグリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセセッション番号 Z P _ 0 0 1 2 0 9 0 7 . 1) と約 3 1 % の同一性を有することを示した。

10

【 0 2 4 9 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 6 6 (2 1 8 アミノ酸) における、アミノ酸 8 ~ 1 5 1 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A F 1 5 7 1 2 . 1) と約 2 9 % の同一性、アミノ酸 3 8 ~ 1 3 9 がヘリコバクターヘパティカス (*Helicobacter hepaticus*) の推定上の、タンパク質 (アクセセッション番号 N P _ 8 6 0 3 7 7 . 1) と約 2 6 % の同一性、アミノ酸 1 3 ~ 1 6 6 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A B 8 8 9 3 2 . 1) と約 2 4 % の同一性、アミノ酸 5 1 ~ 1 5 5 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A D 8 8 2 6 0 . 1) と約 2 7 % の同一性、そして、アミノ酸 2 ~ 1 6 7 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A F 0 1 7 5 2 . 1) と約 2 4 % の同一性を有することを示した。

20

【 0 2 5 0 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 6 8 (1 7 3 アミノ酸) における、アミノ酸 3 0 ~ 1 0 8 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A J 1 8 1 4 3 . 1) と約 2 9 % の同一性、アミノ酸 3 0 ~ 1 0 8 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A K 6 7 5 0 8 . 1) と約 2 9 % の同一性、アミノ酸 8 ~ 1 3 4 が環境配列 (アクセセッション番号 g b | E A D 6 3 9 9 1 . 1) と約 2 3 % の同一性、アミノ酸 3 8 ~ 1 7 3 がシロイヌナズナの、F - ボックスファミリータンパク質 (アクセセッション番号 N P _ 1 7 8 9 8 6 . 1) であるタンパク質と約 2 3 % の同一性、そして、アミノ酸 4 7 ~ 1 5 5 がホトラブダスルミネセンス (*Photorhabdus luminescens*) のラウモンジ (*laumondii*) 亜種の、マルトデキストリンホスホリラーゼであるタンパク質 (アクセセッション番号 N P _ 9 2 7 8 2 3 . 1) と約 2 5 % の同一性を有することを示した。

30

【 0 2 5 1 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 1 7 0 (2 9 3 アミノ酸) における、アミノ酸 3 ~ 2 9 3 がラクトバシルスジョンソニの推定上の、タンパク質 (アクセセッション番号 N P _ 9 6 4 8 8 6 . 1) と約 3 9 % の同一性、アミノ酸 5 ~ 2 9 3 がエノコッカスエニ (*Oenococcus oeni*) の、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質 (アクセセッション番号 Z P _ 0 0 0 6 9 9 2 1 . 1) と約 3 8 % の同一性、アミノ酸 3 ~ 2 9 0 がロイコノストックメセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) のメセンテロイデス (*mesenteroides*) 亜種の、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質 (アクセセッション番号 Z P _ 0 0 0 6 4 0 3 0 . 1) と約 3 6 % の同一性、アミノ酸 4 ~ 2 9 2 がサーモアナエロバクテリウムサーモサッカロリティカム (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) の、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質 (アクセセッション番号 g b | A A R 8 5 5 1 5 . 1) と約 3 3 % の同一性、そして、アミノ酸 4 ~ 2 6 5 がピロコッカスヒロコシ (*Pyrococcus horikoshii*)

40

50

の推定上の、タンパク質（アクセッション番号 NP__142407.1）と約32%の同一性を有することを示した。

【0252】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 172（257 アミノ酸）における、アミノ酸 1～257 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964882.1）と約75%の同一性、アミノ酸 1～257 がラクトバシラスプラントルムの、多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__784889.1）と約49%の同一性、アミノ酸 1～249 がラクトバシラスプラントルムの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__784846.1）と約51%の同一性、アミノ酸 1～249 がエノコッカスエニ（*Oenococcus oeni*）の、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00069922.1）と約44%の同一性、そして、アミノ酸 2～228 が高温性連鎖球菌の、EpsF タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAK61900.1）と約46%の同一性を有することを示した。

10

【0253】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 174（217 アミノ酸）における、アミノ酸 1～217 がラクトバシラスガセリの、リボ多糖合成に関与する糖転移酵素であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00045843.1）と約73%の同一性、アミノ酸 1～217 がラクトバシルスジョンソニの、ウンデカプレニル-リン酸ガラクトースホストランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__964881.1）と約71%の同一性、アミノ酸 9～215 がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、ホスホグルコシルトランスフェラーゼ（EpsE）であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAG44709.1）と約70%の同一性、アミノ酸 18～217 がラクトバシラスラムノサスの、ウンデカプレニル-リン酸グリコシル-1-リン酸トランスフェラーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAK63832.1）と約66%の同一性、そして、アミノ酸 7～217 がラクトバシラスプラントルムの、プライミンググリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__784894.1）と約60%の同一性を有することを示した。

20

【0254】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 176（256 アミノ酸）における、アミノ酸 1～255 がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、EpsD タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAG44708.1; AF267127）と約68%の同一性、アミノ酸 1～256 がラクトバシルスガセリの、莢膜多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00045842.1）と約67%の同一性、アミノ酸 1～256 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964880.1）と約66%の同一性、アミノ酸 3～250 がラクトバシラスラムノサスの、EpsB タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAK64289.1）と約57%の同一性、そして、アミノ酸 3～256 がラクトバシラスプラントルムの、細胞外多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__784865.1）と約45%の同一性を有することを示した。

30

40

【0255】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 178（260 アミノ酸）における、アミノ酸 5～225 がラクトバシルスジョンソニの、チロシンプロテインキナーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__964879.1）と約66%の同一性、アミノ酸 5～225 がラクトバシラスガセリの、染色体分配に関与する ATPアーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00045840.1）と約65%の同一性、アミノ酸 1～228 がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、EpsC タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAG44707.1）と約57%の同一性、アミノ酸 1～226 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイ

50

デス亜種の、染色体分配に關与する ATPアーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063784.1）と約51%の同一性、そして、アミノ酸5～230がオセアノパチラスイヘエンシス（*Oceanobacillus iheyensis*）の、莢膜多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__693822.1）と約46%の同一性を有することを示した。

【0256】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号180（291アミノ酸）における、アミノ酸1～288がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964878.1）と約51%の同一性、アミノ酸2～289がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、EpsBタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAG44706.1）と約50%の同一性、アミノ酸74～291がラクトバシラスガセリの、莢膜多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00045839.1）と約51%の同一性、アミノ酸9～279がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、莢膜多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063785.1）と約35%の同一性、そして、アミノ酸8～284がラクトバシラスプラントルムの、細胞外多糖生合成タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__784863.1）と約31%の同一性を有することを示した。

10

【0257】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号182（351アミノ酸）における、アミノ酸45～340がデルブリュック菌ブルガリカス亜種の、EpsAタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAG44705.1; AF267127）と約52%の同一性、アミノ酸26～335がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964877.1）と約51%の同一性、アミノ酸58～335がラクトバシラスプラントルムの、転写調節因子であるタンパク質（アクセッション番号 NP__784704.1）と約43%の同一性、アミノ酸59～335がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、転写調節因子であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063495.1）と約37%の同一性、そして、アミノ酸26～335がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、転写調節因子であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063643.1）と約37%の同一性を有することを示した。

20

30

【0258】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号184（421アミノ酸）における、アミノ酸1～417がラクトバシラスガセリの、GTPアーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046671.1）と約76%の同一性、アミノ酸1～417がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965656.1）と約76%の同一性、アミノ酸10～421がリステリア菌の、ATP/GTP結合タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__464289.1）と約51%の同一性、アミノ酸13～421がリステリアイノクアの、ATP/GTP結合タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__470098.1）と約51%の同一性、そして、アミノ酸4～421がラクトバシラスプラントルムの、GTPアーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__784620.1）と約48%の同一性を有することを示した。

40

【0259】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号186（336アミノ酸）における、アミノ酸25～331がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__964123.1）と約41%の同一性、アミノ酸2～331がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00047037.1）と約39%の同一性、アミノ酸6～310がクロストリジウムサーモセルム（*Clostridium thermocellum*）の、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP

50

__00059706.1)と約20%の同一性、アミノ酸162~194が環境配列(アクセッション番号gb|EAD87497.1)と約45%の同一性、そして、アミノ酸215~324が環境配列(アクセッション番号gb|EAB36127.1)と約24%の同一性を有することを示した。

【0260】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号188(1382アミノ酸)における、アミノ酸132~1035がエンテロコッカスフェカーリスの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__815907.1)と24%の同一性、アミノ酸456~931がラクトバシラスプラタルムの、細胞表面タンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__786384.1)と約27%の同一性、アミノ酸491~925がビブリオブルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)の、膜結合リポタンパク前駆体であるタンパク質(アクセッション番号NP__935020.1)と約31%の同一性、アミノ酸408~926がヘリコクターヘパティカスの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__859581.1)と約28%の同一性、そして、アミノ酸24~795がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__964510.1)と約23%の同一性を有することを示した。

10

【0261】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号190(250アミノ酸)における、アミノ酸126~249がラクトバシラスガセリの、細胞壁結合加水分解酵素(侵襲関連のタンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046669.1)と約52%の同一性、アミノ酸126~249がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965658.1)と約50%の同一性、アミノ酸131~249がアセトンプタトル菌の、N末端ドメインインテグリン様反復及びC末端細胞壁結合加水分解酵素ドメインを有するタンパク質(アクセッション番号NP__349545.1)と約54%の同一性、アミノ酸126~250がエノコッカスエニ(*Oenococcus oeni*)の、細胞壁結合加水分解酵素(侵襲関連のタンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00070605.1)と約46%の同一性、そして、アミノ酸72~246がラクトバシラスプラタルムの、細胞外タンパク質、ガンマ-D-グルタミン酸-メソ-ジアミノピメリン酸Δロペプチダーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__785666.1)と約33%の同一性を有することを示した。

20

30

【0262】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号194(262アミノ酸)における、アミノ酸145~260がラクトバシラスガセリの、細胞壁結合加水分解酵素(侵襲関連のタンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046669.1)と約54%の同一性、アミノ酸145~260がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965658.1)と約51%の同一性、アミノ酸143~261がクロストリジウムパーフリンジエンスの、保存されている推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__561194.1)と約53%の同一性、アミノ酸145~261がエノコッカスエニ(*Oenococcus oeni*)の、細胞壁結合加水分解酵素(侵襲関連のタンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00070605.1)と約50%の同一性、そして、アミノ酸143~260がアセトンプタトル菌の、細胞壁結合加水分解酵素であるタンパク質と(アクセッション番号NP__346949.1)約51%の同一性を有することを示した。

40

【0263】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号196(184アミノ酸)における、アミノ酸48~182がラクトバシラスガセリの、細胞壁結合加水分解酵素(侵襲関連のタンパク質)であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046669.1)と約43%の同一性、アミノ酸47~182がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965658.1)と約43%の同一

50

性、アミノ酸 66 ~ 182 がエンテロコッカスファエシウムの、表面抗原であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00036908.1）と約 48% の同一性、アミノ酸 66 ~ 182 がエンテロコッカスファエシウムの、グリコシダーゼ（GlyA）に相同であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAK72496.1）と約 48% の同一性、そして、アミノ酸 46 ~ 171 がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__267092.1）と約 41% の同一性を有することを示した。

【0264】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 198（149 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 146 がラクトバシルスガセリの、グアニル酸キナーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046668.1）と約 52% の同一性、アミノ酸 1 ~ 145 がラクトバシルスジョンソニの、グアニル酸キナーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__965659.1）と約 54% の同一性、アミノ酸 1 ~ 148 がラクトバシラスプランタルムの、グアニル酸キナーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__784598.1）と約 43% の同一性、アミノ酸 1 ~ 145 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、グアニル酸キナーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063506.1）と約 40% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 145 がエノコッカスエニ（*Oenococcus oeni*）の、グアニル酸キナーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00070365.1）と約 38% の同一性を有することを示した。

【0265】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 200（99 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 80 がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046667.1）と約 71% の同一性、アミノ酸 1 ~ 80 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965660.1）と約 70% の同一性、アミノ酸 8 ~ 69 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063600.1）と約 40% の同一性、アミノ酸 5 ~ 75 がラクトバシラスプランタルムのタンパク質（アクセッション番号 NP__785013.1）と約 33% の同一性、そして、アミノ酸 4 ~ 69 がラクトバシラスプランタルムの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__786559.1）と約 39% の同一性を有することを示した。

【0266】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 202（503 アミノ酸）における、アミノ酸 1 ~ 497 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965661.1）と約 40% の同一性、アミノ酸 214 ~ 502 がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046666.1）と約 40% の同一性、アミノ酸 105 ~ 477 がバチルスセレウス（*Bacillus cereus*）の、膜タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__977301.1）と約 22% の同一性、アミノ酸 4 ~ 497 が炭疽菌の、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__653890.1）と約 19% の同一性、そして、アミノ酸 4 ~ 497 が炭疽菌の、膜タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__847818.1）と約 19% の同一性を有することを示した。

【0267】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 204（206 アミノ酸）における、アミノ酸 4 ~ 205 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965662.1）と約 43% の同一性、アミノ酸 4 ~ 205 がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046665.1）と約 42% の同一性、アミノ酸 41 ~ 203 がラクトバシラスプランタルムのタンパク質（アクセッション番号 NP__786135.1）と約 33% の同一性、アミノ酸 71 ~ 177 が熱帯熱マラリア原虫の、推定上のタンパク質（アクセッション番

10

20

30

40

50

号NP__701622.1)と約26%の同一性、そして、アミノ酸62~145が環境配列(アクセッション番号gb|EAH10085.1)と約27%の同一性を有することを示した。

【0268】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号206(148アミノ酸)における、アミノ酸1~147がラクトバシルスジョンソニの、NrDIタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__965663.1)と約60%の同一性、アミノ酸1~147がラクトバシルスガセリの、リボヌクレオチド還元に関するタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046664.1)と約60%の同一性、アミノ酸4~123がエンテロコッカスフェカーリスの、NrDIタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__814256.1)と約38%の同一性、アミノ酸4~124がラクトコッカスラクチスの、NrDIタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号sp|Q48709|NRDI_LALC)と約33%の同一性、そして、アミノ酸4~124がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、リボヌクレオチド還元酵素であるタンパク質(アクセッション番号NP__267132.1)と約33%の同一性を有することを示した。

10

【0269】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号208(311アミノ酸)における、アミノ酸3~310がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965664.1)と約53%の同一性、アミノ酸3~311がラクトバシラスガセリの、リボヌクレオチド還元酵素、ベータサブユニットであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046663.1)と約53%の同一性、アミノ酸5~296が化膿連鎖球菌の、リボヌクレオチドニリン酸還元酵素小サブユニットであるタンパク質(アクセッション番号NP__607484.1)と約42%の同一性、アミノ酸5~296が化膿連鎖球菌の、リボヌクレオチドニリン酸還元酵素小サブユニットであるタンパク質(アクセッション番号NP__269482.1)と約42%の同一性、そして、アミノ酸5~296がストレプトコッカスアガラクティエの、リボヌクレオチドニリン酸還元酵素2、ベータサブユニットであるタンパク質(アクセッション番号NP__687833.1)と約42%の同一性を有することを示した。

20

【0270】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号210(177アミノ酸)における、アミノ酸1~152がラクトバシラスガセリのタンパク質(アクセッション番号ZP__00046662.1)と約58%の同一性、アミノ酸1~152がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965665.1)と約57%の同一性、アミノ酸1~132がラクトバシラスプランタルムの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__786047.1)と約33%の同一性、アミノ酸23~144がパイロコッカスホリコシ(Pyrococcus horikoshii)の、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__142266.1)と約29%の同一性、そして、アミノ酸1~67が環境配列(アクセッション番号gb|EAC37753.1)と約33%の同一性を有することを示した。

30

40

【0271】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号212(240アミノ酸)における、アミノ酸7~240がラクトバシラスガセリのタンパク質(アクセッション番号ZP__00047171.1)と約63%の同一性、アミノ酸20~240がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965638.1)と約66%の同一性、アミノ酸7~239がラクトバシラスプランタルム(アクセッション番号NP__786183.1)のタンパク質と約41%の同一性、アミノ酸51~239がリステリア菌の、YvpBタンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__464251.1)と約44%の同一性、そして、アミノ酸52~240が枯草菌(Bacillus subtilis)の、YvpBタンパク質であるタンパク質(アクセッシ

50

ョン番号NP__391374.1)と約42%の同一性を有することを示した。

【0272】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号214(105アミノ酸)における、アミノ酸4~105がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__964999.1)と約60%の同一性、アミノ酸4~104がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__267039.1)と約50%の同一性、アミノ酸3~104がエンテロコッカスファエシウムの、金属硫黄クラスター生合成酵素に相同であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00036555.1)と約50%の同一性、アミノ酸4~104がエンテロコッカスフェカーリスの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__815231.1)と約46%の同一性、そして、アミノ酸16~105がラクトバシラスプラントルムの、タンパク質(アクセッション番号NP__784773.1)と約56%の同一性を有することを示した。

10

【0273】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号216(98アミノ酸)における、アミノ酸3~98がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__964998.1)と約81%の同一性、アミノ酸3~98がラクトバシラスプラントルムの、鉄で調節されるABC輸送体構成要素に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__785081.1)と約72%の同一性、アミノ酸3~98がエノコッカスエニ(Oenococcus oeni)の、Fe-Sクラスター形成に關与するABC-タイプ輸送系、透過酵素構成要素であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00069298.1)と約67%の同一性、アミノ酸4~98が肺炎連鎖球菌の、保存されている推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__358369.1)と約64%の同一性、そして、アミノ酸4~98が肺炎連鎖球菌の、保存されている推定上のインテイン含有タンパク質(アクセッション番号NP__345358.1)と約64%の同一性を有することを示した。

20

【0274】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号218(76アミノ酸)における、アミノ酸1~73がラクトバシルスジョンソニの、ABC輸送体のATPアーゼ構成要素であるタンパク質(アクセッション番号NP__964994.1)と約80%の同一性、アミノ酸1~73がラクトバシラスプラントルムの、ABC輸送体、ATP結合タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__785077.1)と約73%の同一性、アミノ酸1~73がミュータンス連鎖球菌の、ABC輸送体、ATP結合タンパク質に相同であるタンパク質(アクセッション番号NP720711.1)と約71%の同一性、アミノ酸1~73がエンテロコッカスファエシウムの、鉄-硫黄クラスター形成に關与するABC型輸送系、ATPアーゼ構成要素であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00037285.1)と約65%の同一性、そして、アミノ酸1~72が肺炎連鎖球菌の、ABC輸送体、ATP結合タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP__345354.1)と約69%の同一性を有することを示した。

30

【0275】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号220(52アミノ酸)における、アミノ酸5~47が熱帯熱マラリア原虫の、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__700844.1)と約32%の同一性を有することを示した。

40

【0276】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号222(161アミノ酸)における、アミノ酸1~146がラクトバシラスガセリのタンパク質(アクセッション番号ZP__00046659.1)と約59%の同一性、アミノ酸1~146がラクトバシルスジョンソニのタンパク質(アクセッション番号NP__965668.1)と約60%の同一性、アミノ酸7~151がリステリアイノクア(アクセッション番号NP__469929.1)のタンパク質と約44%の同一性、アミノ酸7~161がエンテロコ

50

ツカスファエシウムの、膜タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号 NP__814929.1）と約39%の同一性、そして、アミノ酸11~137がラクトバシラプランタルムの、内在性膜タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__784703.1）と約40%の同一性を有することを示した。

【0277】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号224（256アミノ酸）における、アミノ酸12~235がラクトバシラスガセリのタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046658.1）と約64%の同一性、アミノ酸12~235がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（NP__965669.1）と約63%の同一性、アミノ酸12~216がラクトバシラスサケイ（*Lactobacillus sakei*）の、LabLタンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 gb|AAL00959.1）と約48%の同一性、アミノ酸13~235がリステリアイノクアの保存されている膜タンパク質（アクセッション番号 NP__469930.1）と約45%の同一性、そして、アミノ酸13~235がリステリア菌の保存されている膜タンパク質（アクセッション番号 NP__464106.1）と約45%の同一性を有することを示した。

10

【0278】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号226（513アミノ酸）における、アミノ酸1~513がラクトバシルスガセリの、重複した ATPアーゼドメインを有する ABC 輸送体の ATPアーゼ構成要素であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046657.1）と約81%の同一性、アミノ酸1~513がラクトバシルスジョンソニの、ABC輸送体 ATPアーゼ構成要素であるタンパク質（アクセッション番号 NP__965670.1）と約81%の同一性、アミノ酸1~513がラクトバシルスプランタルムの、ABC輸送体、ATP結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__785961.1）と約52%の同一性、アミノ酸1~512がエンテロコッカスフェカリスの、ABC輸送体、ATP結合タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号 NP__815740.1）と約52%の同一性、そして、アミノ酸1~513がエノコッカスエニ（*Oenococcus oeni*）の、重複した ATPアーゼドメインを有する ABC 輸送体の ATPアーゼ構成要素であるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00070366.1）と約49%の同一性を有することを示した。

20

【0279】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号228（124アミノ酸）における、アミノ酸3~124がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965671.1）と約50%の同一性、アミノ酸3~121がラクトバシラスガセリの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 ZP__00046656.1）と約51%の同一性、そして、アミノ酸53~81がピロコッカスフリオサス（*Pyrococcus furiosus*）の、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__578913.1）と約48%の同一性を有することを示した。

30

【0280】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号230（73アミノ酸）における、アミノ酸8~58がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、アセチルトランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00063180.1）と約39%の同一性、アミノ酸7~58がエノコッカスエニ（*Oenococcus oeni*）の、アセチルトランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号 ZP__00069032.1）と約36%の同一性、アミノ酸7~56がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号 NP__965082.1）と約36%の同一性、アミノ酸15~55が環境配列（アクセッション番号 gb|EAI00330.1）と約36%の同一性、そして、アミノ酸12~54が炭疽菌の、GNATファミリーに属するアセチルトランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号 NP__658716.1）と約37%の同一性を有することを示した。

40

【0281】

50

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 232 (424 アミノ酸) における、アミノ酸 8 ~ 375 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP_965673.1) と約 58% の同一性、アミノ酸 8 ~ 375 がラクトバシラスガセリの、転写調節因子であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP_00046655.1) と約 58% の同一性、アミノ酸 42 ~ 383 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP_964188.1) と約 41% の同一性、アミノ酸 42 ~ 370 がラクトバシラスガセリの、転写調節因子であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP_00047236.1) と約 42% の同一性、そして、アミノ酸 78 ~ 350 がラクトバシラスプラントルムの、転写調節因子であるタンパク質 (アクセッション番号 NP_784105.1) と約 46% の同一性を有することを示した。

10

【0282】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 234 (538 アミノ酸) における、アミノ酸 5 ~ 527 がラクトバシラスガセリの、O 抗原及びタイコ酸の搬出に關与する膜タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP_00047298.1) と約 30% の同一性、アミノ酸 5 ~ 527 がラクトバシルスジョンソニの、多糖及びタイコ酸の搬出タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP_964533.1) と約 29% の同一性、アミノ酸 1 ~ 457 がエンテロコッカスフェカリスの、多糖生合成ファミリータンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP_814328.1) と約 31% の同一性、アミノ酸 3 ~ 450 がエンテロコッカスフェカリスの、多糖生合成ファミリータンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP_814421.1) と約 33% の同一性、そして、アミノ酸 3 ~ 526 がミュータンス連鎖球菌の、膜タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP_722009.1) と 28% の同一性を有することを示した。

20

【0283】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 236 (271 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 271 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP_964116.1) と約 58% の同一性、アミノ酸 1 ~ 271 がラクトバシルスガセリの、細胞壁生合成に關与するグリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP_00047045.1) と約 58% の同一性、アミノ酸 7 ~ 234 がパチルスセレウスの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP_834930.1) と約 31% の同一性、アミノ酸 2 ~ 250 が高温性連鎖球菌の、EpsV タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 emb|CAB52224.1) と約 28% の同一性、そして、アミノ酸 2 ~ 222 がラクトバシラスプラントルムの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP_786160.1) と約 31% の同一性を有することを示した。

30

【0284】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 238 (476 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 475 がラクトバシルスガセリの、O 抗原及びタイコ酸の搬出に關与する膜タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP_00047223.1) と約 75% の同一性、アミノ酸 1 ~ 475 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP_965532.1) と約 74% の同一性、アミノ酸 7 ~ 460 が高温性連鎖球菌の、cpsU タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAM93406.1) と約 30% の同一性、アミノ酸 7 ~ 460 が高温性連鎖球菌の、EpsU タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 emb|CAB52225.1) と約 30% の同一性、そして、アミノ酸 7 ~ 460 が高温性連鎖球菌の、EpsI タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAK61904.1) と約 30% の同一性を有することを示した。

40

【0285】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 240 (367 アミ

50

ノ酸)における、アミノ酸3～364がラクトバシラスガセリの、転写調節因子であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00047236.1)と約54%の同一性、アミノ酸3～364がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__964188.1)と約53%の同一性、アミノ酸22～360がラクトバシラスガセリの、転写調節因子であるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046655.1)と約42%の同一性、アミノ酸21～360がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965673.1)と約41%の同一性、そして、アミノ酸33～338がラクトバシラスプラントルムの、転写調節因子であるタンパク質(アクセッション番号NP__784704.1)と約44%の同一性を有することを示した。

10

【0286】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号242(246アミノ酸)における、アミノ酸1～242がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965126.1)と約46%の同一性、アミノ酸77～234がクロストリジウムサーモセルム(*Clostridium thermocellum*)の、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00060425.1)と約37%の同一性アミノ酸10～220がピロリ菌(*Helicobacter pylori*)の、1型莢膜多糖合成タンパク質J(capJ)であるタンパク質(アクセッション番号NP__207219.1)と約33%の同一性、アミノ酸17～225がビフィドバクテリウムロングムの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00120944.1)と約32%の同一性、そして、アミノ酸17～225がビフィドバクテリウムロングムの、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__696276.1)と32%の同一性を有することを示した。

20

【0287】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号244(380アミノ酸)における、アミノ酸1～380がラクトバシラスガセリの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046464.1)と約88%の同一性、アミノ酸1～379がラクトバシルスジョンソニの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__965402.1)と約84%の同一性、アミノ酸1～379がミュータンス連鎖球菌の、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__721794.1)と約70%の同一性、アミノ酸4～364がラクトバシラスプラントルムの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP__784839.1)と約68%の同一性、そして、アミノ酸1～379がリステリアイノクアの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__472010.1)と約64%の同一性を有することを示した。

30

【0288】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号246(399アミノ酸)における、アミノ酸7～398がラクトバシラスガセリの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00046464.1)と約85%の同一性、アミノ酸20～398がラクトバシルスジョンソニの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__965402.1)と約84%の同一性、アミノ酸20～398がミュータンス連鎖球菌の、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__721794.1)と約70%の同一性、アミノ酸23～383がラクトバシラスプラントルムの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP__784839.1)と約68%の同一性、そして、アミノ酸20～398がリステリアイノクアの、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番

40

50

号NP__472010.1)と約64%の同一性を有することを示した。

【0289】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号248(232アミノ酸)における、アミノ酸1~232がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965530.1)と約74%の同一性、アミノ酸1~232がラクトバシルスガセリの、マンノシルトランスフェラーゼOCH1及び関連した酵素ファミリーに属するタンパク質(アクセッション番号ZP__00047224.1)と約74%の同一性、アミノ酸1~208がクロストリジウムサーモセルム(*Clostridium thermocellum*)の、マンノシルトランスフェラーゼOCH1及び関連した酵素ファミリーに属するタンパク質(アクセッション番号ZP__00060271.1)と約40%の同一性、アミノ酸2~213がラクトバシルスガセリの、マンノシルトランスフェラーゼOCH1及び関連した酵素ファミリーに属するタンパク質(アクセッション番号ZP__00045846.1)と約35%の同一性、そして、アミノ酸1~211がラクトコッカスラクチスのクレモリス(*cremoris*)亜種の、EpsQタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号gb|AAP32730.1)と38%の同一性を有することを示した。

10

【0290】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号250(387アミノ酸)における、アミノ酸1~379がラクトバシルスプラントラムの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__965577.1)と約70%の同一性、アミノ酸1~315がラクトバシルスガセリの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00047202.1)と約77%の同一性、アミノ酸1~374がラクトバシルスガセリの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP__784929.1)と約53%の同一性、アミノ酸1~386がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00063751.1)と約49%の同一性、そして、アミノ酸1~374がエンテロコッカスファエシウムの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00036762.1)と48%の同一性を有することを示した。

20

【0291】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号252(156アミノ酸)における、アミノ酸26~152がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP__964097.1)と約62%の同一性、アミノ酸1~152がラクトバシルスガセリの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP__00047062.1)と約52%の同一性、アミノ酸50~152がミュータンス連鎖球菌の、グリコシルトランスフェラーゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__721791.1)と約56%の同一性、アミノ酸36~149が破傷風菌(*Clostridium tetani*)の、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP__781499.1)と約40%の同一性、そして、アミノ酸が44~152枯草菌(*Bacillus subtilis*)の、セルロースシンターゼに相同であるタンパク質(アクセッション番号NP__388311.1)と37%の同一性を有することを示した。

30

40

【0292】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号254(490アミノ酸)における、アミノ酸11~490がアシドフィルス菌の、スクロースホスホリラーゼであるタンパク質(アクセッション番号gb|AAO21861.1)と約100%の同一性、アミノ酸11~490がアシドフィルス菌の、スクロースホスホリラーゼであるタンパク質(アクセッション番号gb|AAO21868.1)と約69%の同一性、アミノ酸11~490がラクトバシルスジョンソニの、スクロースホスホリラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP__964279.1)と約68%の同一性、アミノ酸11~490がミュータンス連鎖球菌の、スクロースホスホリラーゼ(EC 2.4.1

50

． 7) であるタンパク質 (アクセション番号 p i r A 2 7 6 2 6) と約 6 3 % の同一性、そして、アミノ酸 1 1 ~ 4 8 9 が *Mycobacterium tuberculosis* の、 g t f A タンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 p i r B W S O G M) と 6 3 % の同一性を有することを示した。

【 0 2 9 3 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 2 5 6 (5 4 8 アミノ酸) における、アミノ酸 8 ~ 5 4 6 がラクトバシラスガセリの、 O 抗原及びタイコ酸の搬出に關与する膜タンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 4 7 2 9 8 . 1) と約 6 9 % の同一性、アミノ酸 8 ~ 5 4 6 がラクトバシルスジヨンソニの、多糖及びタイコ酸の搬出タンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 4 5 3 3 . 1) と約 6 7 % の同一性、アミノ酸 5 ~ 5 4 6 がエンテロコッカスフェカーリスの、多糖生合成ファミリータンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 8 1 4 4 2 1 . 1) と約 4 2 % の同一性、アミノ酸 1 7 ~ 5 4 6 がラクトバシラスプラントルムの、内在性膜タンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 7 8 4 9 5 9 . 1) と約 4 2 % の同一性、そして、アミノ酸 1 3 ~ 5 4 7 が *Mycobacterium tuberculosis* の、膜タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 7 2 2 0 0 9 . 1) と 3 8 % の同一性を有することを示した。

10

【 0 2 9 4 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 2 5 8 (3 6 3 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 3 6 3 がラクトバシルスジヨンソニの、推定上のタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 5 5 4 1 . 1) と約 6 4 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 3 6 3 がラクトバシラスガセリの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 4 7 2 1 5 . 1) と約 6 2 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 3 6 3 が炭疽菌の、グリコシルトランスフェラーゼ、グループ 1 ファミリータンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 8 4 7 8 1 7 . 1) と約 4 1 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 3 6 3 が炭疽菌からの、グリコシルトランスフェラーゼグループ 1 タンパク質であるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 6 5 3 8 8 9 . 1) と約 4 0 % の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 3 6 3 がパチルス - セレウスの、グリコシルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 8 3 5 0 8 1 . 1) と 3 9 % の同一性を有することを示した。

20

30

【 0 2 9 5 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 2 6 0 (5 5 6 アミノ酸) における、アミノ酸 6 ~ 5 5 5 がラクトバシラスガセリの、グリコシダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 Z P _ 0 0 0 4 7 0 8 5 . 1) と約 7 4 % の同一性、アミノ酸 6 ~ 5 5 3 がラクトバシルスジヨンソニの、推定上のタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 4 2 2 7 . 1) と約 7 3 % の同一性、アミノ酸 8 ~ 5 5 3 がラクトバシラスプラントルムの、 - グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 7 8 4 0 0 6 . 1) と約 5 0 % の同一性、アミノ酸 7 ~ 5 5 6 がバシラスハロドラン (*Bacillus halodurans*) の、オリゴ - 1 , 6 - グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 2 4 3 7 6 9 . 1) と約 3 5 % の同一性、そして、アミノ酸 9 ~ 5 5 3 がパチルスセレウスの、オリゴ - 1 , 6 - グルコシダーゼ (オリゴ糖アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ) であるタンパク質 (アクセション番号 s p | P 2 1 3 3 2 | O 1 6 G _ B A C C E) と 3 4 % の同一性を有することを示した。

40

【 0 2 9 6 】

ギャップつき B l a s t P アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 2 6 2 (7 5 9 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 7 5 7 がラクトバシルスジヨンソニの、推定上のタンパク質 (アクセション番号 N P _ 9 6 4 5 8 9 . 1) と約 7 5 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 7 3 2 がアセトンプタトル菌の、アルファグルコシダーゼであるタンパク質 (アクセション番号 N P _ 3 4 7 7 1 9 . 1) と約 5 2 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 7 2 6 がサーモトガマリチマ (*Thermotoga maritima*) の、アルファキシロシダーゼであるタンパク質 (アク

50

セッション番号 NP__228120.1) と約 51% の同一性、アミノ酸 1~724 がバシラスハロドラン (*Bacillus halodurans*) のタンパク質 (アクセッション番号 NP__242771.1) と約 49% の同一性、そして、アミノ酸 1~727 が大腸菌 (*Escherichia coli*) の推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__418113.1) と 47% の同一性を有することを示した。

【0297】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 264 (767 アミノ酸) における、アミノ酸 3~766 がラクトバシルスジョンソニの、 α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__965686.1) と約 69% の同一性、アミノ酸 3~766 がラクトバシラスガセリの、 α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046641.1) と約 69% の同一性、アミノ酸 5~761 がラクトバシラスプランタルムの、 α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__786738.1) と約 64% の同一性、アミノ酸 15~720 がサーモアナエロバクターテングジェネシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) の、 α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__621719.1) と約 41% の同一性、そして、アミノ酸 20~717 がバシラスサーモアミロリケファシエンス (*Bacillus thermoamyloliquefaciens*) の、 α -グルコシダーゼ II であるタンパク質 (アクセッション番号 sp|Q9F234|AGL2__BACTQ) と 40% の同一性を有することを示した。

10

20

【0298】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 266 (544 ミノ酸) における、アミノ酸 6~541 がラクトバシラスガセリの、 α -グリコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047077.1) と約 78% の同一性、アミノ酸 6~541 がラクトバシルスジョンソニの、 α -グルカン 1,6- α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__964235.1) と約 77% の同一性、アミノ酸 2~542 がエンテロコッカスファエシウムの、 α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00037211.1) と約 63% の同一性、アミノ酸 9~542 がエンテロコッカスフェカーリスの、 α -グルカン 1,6- α -グルコシダーゼに相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__815069.1) と約 62% の同一性、そして、アミノ酸 9~543 が肺炎連鎖球菌の、 α -グルカン 1,6- α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__344876.1) と 61% の同一性を有することを示した。

30

40

【0299】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 268 (1004 アミノ酸) における、アミノ酸 4~1003 がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__964131.1) と約 48% の同一性、アミノ酸 1~1003 がラクトバシルスガセリの、 α -グルコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00047030.1) と約 48% の同一性、アミノ酸 12~1001 がエンテロコッカスフェカーリスの、 α -グリコシルヒドロラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__815521.1) と約 32% の同一性、アミノ酸 98~1000 がバクテロイデステタイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*) の、 α -キキシロシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__812081.1) と約 30% の同一性、そして、アミノ酸 11~995 がクロストリジウムパーフリンジエンスの、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__561962.1) と約 25% の同一性を有することを示した。

【0300】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 270 (570 アミノ酸) における、アミノ酸 17~568 がラクトバシラスガセリの、 α -グリコシダーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00045981.1) と約 77% の同一性、アミノ酸 17~568 がラクトバシルスジョンソニの、トレハロース-6-リン酸ヒドロ

50

ラーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__964610.1）と約77%の同一性、アミノ酸18～566がラクトバシラスプラントルムの、アルファ、アルファホストレハラーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__784081.1）およそ66%の同一性、アミノ酸23～568が肺炎連鎖球菌の、デキストラングルコシダーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__359290.1）と約57%の同一性、そして、アミノ酸23～568が肺炎連鎖球菌の、デキストラングルコシダーゼ（DexS）に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__346315.1）と57%の同一性を有することを示した。

【0301】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号272（638アミノ酸）における、アミノ酸8～621がミュータンス連鎖球菌の、1,4-アルファ-グルカン分枝酵素に相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__721883.1）と約56%の同一性、アミノ酸8～619がストレプトコッカスアガラクティエの、1,4-アルファ-グルカン分枝酵素であるタンパク質（アクセッション番号sp|Q8E5V8|GLGB__STRA3）と約57%の同一性、アミノ酸8～619がストレプトコッカスアガラクティエの、1,4-アルファ-グルカン分枝酵素である。タンパク質（アクセッション番号NP__687868.1）と約57%の同一性、アミノ酸8～621が肺炎連鎖球菌の、1,4-アルファ-グルカン分枝酵素であるタンパク質（アクセッション番号NP__345592.1）と約56%の同一性、そして、アミノ酸8～621が肺炎連鎖球菌の、1,4-アルファ-グルカン分枝酵素であるタンパク質（アクセッション番号NP__358623.1）と56%の同一性を有することを示した。

10

20

【0302】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号274（573アミノ酸）における、アミノ酸1～572がラクトバシルスジョンソニの、マルトース生成（maltogenic）アミラーゼすなわちネオプルナーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__964228.1）と約76%の同一性、アミノ酸1～572がラクトバシルスガセリの、グリコシダーゼであるタンパク質（アクセッション番号ZP__00047084.1）と約75%の同一性、アミノ酸56～571がエンテロコッカスファエシウムの、グリコシダーゼであるタンパク質（アクセッション番号ZP__00036988.1）と約54%の同一性、アミノ酸1～570がエンテロコッカスフェカーリスの、グリコシルヒドロラーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__815068.1）と約49%の同一性、そして、アミノ酸1～540がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、ネオプルナーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__267838.1）と約50%の同一性を有することを示した。

30

【0303】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号276（1185アミノ酸）における、アミノ酸284～1008がバチルスセレウスの、プルナーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__832487.1）と約39%の同一性、アミノ酸284～1008アミノ酸がバチルスセレウスの、プルナーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__979065.1）と約40%の同一性、アミノ酸284～1008が炭疽菌の、プルナーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号NP__845079.1）と約40%の同一性、アミノ酸306～1008が炭疽菌の、-アミラーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__656611.1）と約41%の同一性、そして、アミノ酸284～976がアナエオブランカホリコシ（Anaerobranca horikoshii）の、プルナーゼ（アクセッション番号gb|AAP45012.1）であるタンパク質と38%の同一性を有することを示した。

40

【0304】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号278（589アミノ酸）における、アミノ酸5～548がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、アミロプルナーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP266857.1; NC__

50

002662)と約42%の同一性、アミノ酸1~546がラクトバシルスプラントルムの、-アミラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP_783889.1)と約41%の同一性、アミノ酸3~558がクロストリジウムパーフリンジエンスの、アミロプラーゼであるタンパク質(アクセッション番号NP_560982.1)と約38%の同一性、アミノ酸198~441がデルブリュック菌ラクチス亜種の、グリコシルヒドロラーゼであるタンパク質(アクセッション番号gb|AAQ06973.1)と約70%の同一性、そして、アミノ酸73~547がデスルフィトバクテリウムハフニエンス(*Desulfitobacterium hafniense*)の、グリコシダーゼであるタンパク質(アクセッション番号ZP_00100175.1)と37%の同一性を有することを示した。

【0305】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号280(435アミノ酸)における、アミノ酸78~384が環境配列(アクセッション番号gb|EAH69409.1)と約22%の同一性、アミノ酸53~387が熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP701320.1)と約23%の同一性、アミノ酸59~382が熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP_701961.1)と約22%の同一性、アミノ酸56~386が熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)の、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP_473199.1)と約22%の同一性、そして、アミノ酸61~336がプラスモディウムヨエリヨエリ(*Plasmodium yoelii yoelii*)の、CCAATボックスDNA結合タンパク質サブユニットBに相同である。タンパク質(アクセッション番号gb|EAA22696.1)と約24%の同一性を有することを示した。

【0306】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号282(382アミノ酸)における、アミノ酸1~382がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP_965524.1)と約54%の同一性、アミノ酸115~382がラクトバシラスガセリの、性フェロモン生合成に関与するタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP_00046368.1)と約60%の同一性、アミノ酸1~382がラクトバシラスプラントルムの、リボタンパク前駆体であるタンパク質(アクセッション番号NP_784816.1)と約41%の同一性、アミノ酸53~374がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、性フェロモン生合成に関与するタンパク質であるタンパク質(アクセッション番号ZP_00063694.1)と約38%の同一性、そして、アミノ酸1~379がリステリアイノクアのタンパク質(アクセッション番号NP_471203.1)と35%の同一性を有することを示した。

【0307】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号284(173アミノ酸)における、アミノ酸1~161がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP_964736.1)と約52%の同一性、アミノ酸1~161がラクトバシルスガセリの、推定上のタンパク質(アクセッション番号ZP_00047405.1)と約51%の同一性、アミノ酸21~159がエノコッカスエニ(*Oenococcus oeni*)の、推定上のタンパク質(アクセッション番号ZP_00070369.1)と約25%の同一性、アミノ酸4~74が環境配列(アクセッション番号gb|EAF86579.1)と約28%の同一性、そして、アミノ酸63~160がリステリアイノクアの、細胞表面タンパク質であるタンパク質(アクセッション番号NP_471613.1)と24%の同一性を有することを示した。

【0308】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号286(414アミノ酸)における、アミノ酸21~404がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質(アクセッション番号NP_964852.1)と約65%の同一性、アミノ酸21

10

20

30

40

50

～404がラクトバシラスガセリの、細菌性細胞分裂膜タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00046289.1）と約64%の同一性、アミノ酸23～407がラクトバシラスプラントルムの、細胞分裂タンパク質FtsWであるタンパク質（アクセッション番号NP__785648.1）と約39%の同一性、アミノ酸48～411がエンテロコッカスフェカーリスの、FtsW/RodA/SpoVEファミリーに属する細胞分裂タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__816105.1）と約36%の同一性、そして、アミノ酸48～404がエンテロコッカスファエシウムの、細菌性細胞分裂膜タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00035664.1）と35%の同一性を有することを示した。

【0309】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号288（151アミノ酸）における、アミノ酸1～149がラクトバシルスプラントルムの、内在性膜タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__785439.1）と約53%の同一性、アミノ酸18～146がリステリア菌のタンパク質（アクセッション番号NP__465093.1）と約58%の同一性、アミノ酸18～146がリステリアイノクアのタンパク質（アクセッション番号NP__470939.1）と約58%の同一性、アミノ酸1～149がエンテロコッカスファエシウムの、膜タンパク質に相同であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00036546.1）と約48%の同一性、そして、アミノ酸1～147エンテロコッカスフェカーリスのタンパク質（アクセッション番号NP__814972.1）と49%の同一性を有することを示した。

【0310】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号290（451アミノ酸）における、アミノ酸13～450がラクトバシルスジョンソニの、推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__965202.1）と約62%の同一性、アミノ酸13～450がラクトバシラスガセリのタンパク質（アクセッション番号ZP__00046546.1）と約61%の同一性、アミノ酸6～451がラクトバシラスプラントルムの、内在性膜タンパク質であるタンパク質（アクセッション番号NP__783922.1）と約53%の同一性、アミノ酸13～451がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種のタンパク質（アクセッション番号ZP__00062829.1）と約51%の同一性、そして、アミノ酸19～451がエノコッカスエニ（*Oenococcus oeni*）のタンパク質（アクセッション番号ZP__00070095.1）と51%の同一性を有することを示した。

【0311】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号292（374アミノ酸）における、アミノ酸1～374がラクトバシルスガセリの、DNAメチラーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00045949.1）と約75%の同一性、アミノ酸1～374がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__965048.1）と約74%の同一性、アミノ酸1～373がラクトバシラスプラントルムのタンパク質（アクセッション番号NP__785327.1）と約53%の同一性、アミノ酸2～373がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、DNAメチラーゼに相同であるタンパク質（アクセッション番号ZP__00062777.1）と約52%の同一性、そして、アミノ酸2～373がエンテロコッカスフェカーリスの、保存されている推定上のタンパク質（アクセッション番号NP__814882.1）と50%の同一性を有することを示した。

【0312】

ギャップつきBlastPアミノ酸配列アラインメントは、配列番号294（242アミノ酸）における、アミノ酸1～238がラクトバシルスジョンソニの、tRNA（グアニン-N1）-メシルトランスフェラーゼであるタンパク質（アクセッション番号NP__965315.1）と約79%の同一性、アミノ酸1～241がラクトバシラスプラントルムの、tRNA（グアニン-N1）-メシルトランスフェラーゼであるタンパク質（アク

10

20

30

40

50

セッション番号 NP__785229.1) と 52% の同一性、アミノ酸 1 ~ 238 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテロイデス亜種の、tRNAメチルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00064008.1) と約 46% の同一性、アミノ酸 1 ~ 238 がパチルスセレウスの、tRNA (グアニン - N1) - メチルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__833560.1) と 51% の同一性、そして、アミノ酸 1 ~ 236 が炭疽菌の、tRNA (グアニン - N1) メチルトランスフェラーゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__657810.1) と 51% の同一性を有することを示した。

【0313】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 296 (667 アミノ酸) における、アミノ酸 24 ~ 666 がラクトバシルスジョンソニの、トレオニル tRNA シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__965452.1) と約 83% の同一性、アミノ酸 24 ~ 666 がラクトバシラスガセリの、トレオニル tRNA シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00046734.1) と約 83% の同一性、アミノ酸 25 ~ 665 がラクトバシラスプランタルムの、トレオニン tRNA リガーゼ 1 であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__785120.1) と約 61% の同一性、アミノ酸 28 ~ 665 がミュータンス連鎖球菌の、トレオニル tRNA シンターゼに相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__721923.1) と約 57% の同一性、そして、アミノ酸 28 ~ 665 がラクトコッカスラクチスのラクチス亜種の、トレオニル tRNA シンターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__268068.1) と約 56% の同一性を有することを示した。

10

20

【0314】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 298 (706 アミノ酸) における、アミノ酸 123 ~ 511 がラクトバシラスプランタルムの、細胞表面タンパク質前駆体であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__786268.1) と約 24% の同一性、アミノ酸 220 ~ 510 がエンテロコッカスファエシウムの、オートトランスporter 付着因子であるタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00035995.1) と約 29% の同一性、アミノ酸 181 ~ 503 がフソバクテリウムヌクレアタムのヌクレアタム亜種からの、溶血素であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__603198.1) と約 23% の同一性、アミノ酸 26 ~ 260 が黄色ブドウ球菌のアウレウス亜種の、フィブリノーゲン結合タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__645581.1) と約 19% の同一性、そして、アミノ酸 383 ~ 509 がマイクロバルブリファーデグラダンス (*Microbulbifer degradans*) の推定上のタンパク質 (アクセッション番号 ZP__00064879.1) と 25% の同一性を有することを示した。

30

40

【0315】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 300 (438 アミノ酸) における、アミノ酸 116 ~ 297 がミュータンス連鎖球菌の、推定上のタンパク質 (アクセッション番号 NP__722210.1) と約 31% の同一性、アミノ酸 116 ~ 188 がラクトバシラスサリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) のサリバリウス (*salivarius*) 亜種のタンパク質 (アクセッション番号 gb|AAM61773.1) と約 50% の同一性、アミノ酸 126 ~ 220 がストレプトコッカスアガラクティエの、バクテリオシン輸送アクセサリタンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 NP__687482.1) と約 29% の同一性、アミノ酸 125 ~ 338 がブラディリゾビウムジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) の、チオレドキシンであるタンパク質 (アクセッション番号 NP__767234.1) と 24% の同一性、そして、アミノ酸 123 ~ 201 が炭疽菌のタンパク質 (アクセッション番号 NP__052783.1) と 27% の同一性を有することを示した。

【0316】

ギャップつき BlastP アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 302 (372 アミノ酸) における、アミノ酸 11 ~ 371 がロイコノストックメセンテロイデスのメセンテ

50

ロイデス亜種の、メチオニンシターゼ I I (コバラミン非依存性) タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `_Z P 0 0 0 6 4 0 7 0 . 1`) と約 5 5 % の同一性、アミノ酸 5 ~ 3 7 2 がラクトバシラスガセリの、メチオニンシターゼ I I (コバラミン非依存性) タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `Z P _ 0 0 0 4 6 3 1 1 . 1`) と約 4 7 % の同一性、アミノ酸 7 ~ 3 7 2 が肺炎クラミジア (*Chlamydomytila pneumoniae*) の推定上のタンパク質 (アクセッション番号 `N P _ 2 2 4 3 5 1 . 1`) と約 4 6 % の同一性、アミノ酸 4 ~ 3 7 2 がラクトバシルスジョンソニの推定上のタンパク質 (アクセッション番号 `N P _ 9 6 5 6 2 3 . 1`) と約 4 4 % の同一性、そして、アミノ酸 9 ~ 3 7 2 がエノコッカスエニ (*Oenococcus oeni*) の、メチオニンシターゼ I I (コバラミン非依存性) タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `Z P _ 0 0 0 6 9 8 9 8 . 1`) と 4 5 % の同一性を有することを示した。

10

【 0 3 1 7 】

ギャップつき `B l a s t P` アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 3 0 4 (1 5 7 アミノ酸) における、アミノ酸 1 ~ 1 5 7 がラクトバシルスジョンソニの、オートインデューサー 2 産生タンパク質 `L u x S` であるタンパク質 (アクセッション番号 `N P _ 9 6 5 6 2 4 . 1`) と約 8 7 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 1 5 7 がラクトバシラスガセリの、オートインデューサー A I 2 合成に関与する `L u x S` タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `Z P _ 0 0 0 4 6 3 1 0 . 1`) と約 8 7 % の同一性、アミノ酸 4 ~ 1 5 7 がストレプトコッカスボビス (*Streptococcus bovis*) の、`L u x S` オートインデューサー 2 シターゼであるタンパク質 (アクセッション番号 `d b j | B A D 0 6 8 7 6 . 1`) と約 7 6 % の同一性、アミノ酸 1 ~ 1 5 7 がラクトバシラスプラントルムの、オートインデューサー 1 産生タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `N P _ 7 8 4 5 2 2 . 1`) と約 7 7 % の同一性、そして、アミノ酸 4 ~ 1 5 7 が化膿連鎖球菌の、オートインデューサー 2 産生タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `N P _ 2 6 9 6 8 9 . 1`) と 7 3 % の同一性を有することを示した。

20

【 0 3 1 8 】

ギャップつき `B l a s t P` アミノ酸配列アラインメントは、配列番号 3 0 6 (5 9 9 アミノ酸) における、アミノ酸 2 2 5 ~ 3 4 3 がラクトバシルスクリスパトゥスの、`S` 層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `e m b | C A A 0 7 7 0 8 . 1`) と約 3 7 % の同一性、アミノ酸 2 2 5 ~ 3 4 3 がラクトバシルスクリスパトゥスの、表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `g b | A A B 5 8 7 3 4 . 1`) と約 3 4 % の同一性、アミノ酸 2 2 5 ~ 3 4 3 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質であるタンパク質 (アクセッション番号 `d b j | B A C 7 6 6 8 7 . 1`) と約 3 3 % の同一性、アミノ酸 2 2 5 ~ 3 4 3 がラクトバシルスクリスパトゥスの、サイレント表層タンパク質に相同であるタンパク質 (アクセッション番号 `g b | A A F 6 8 9 7 2 . 1`) と約 3 4 % の同一性、そして、アミノ酸 1 3 7 ~ 2 8 4 がラクトバシルスヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の、細胞外プロテイナーゼ (E C 3 . 4 . 2 1 . -) (`p r t Y`) であるタンパク質 (アクセッション番号 `p i r J C 7 3 0 6`) と約 3 0 % の同一性を有することを示した。

30

【 実施例 2 】

40

【 0 3 1 9 】

(アミノ酸配列に関する P F A M 結果)

配列番号 2 は、およそアミノ酸 2 5 から 3 0 6 に位置する推定のリボタンパク質 `_ 4` (`Lipoprotein_4`) ドメインを含有し、周辺質溶質結合タンパク質ファミリー (`S B P _ b a c _ 9`) (P F A M アクセッション P F 0 1 2 9 7) のメンバーである。

【 0 3 2 0 】

配列番号 1 0 は、およそアミノ酸 2 4 から 4 0 9 に位置する推定の `G l y c o _ h y d r o _ 3 2` ドメインを含有し、グリコシルヒドロラーゼファミリー 3 2 (`G l y c o _ h y d r o _ 3 2`) (P F A M アクセッション P F 0 0 2 5 1) のメンバーである。

【 0 3 2 1 】

50

配列番号 62 は、およそアミノ酸 1 から 456 に位置する推定の S L A P ドメインを含有し、細胞表層タンパク質ファミリー (S L A P) (P F A M アクセション P F 0 3 2 1 7) のメンバーである。

【 0 3 2 2 】

配列番号 82 は、およそアミノ酸 59 から 208 に位置する推定のアミダーゼ__2 (Amidase_2) ドメインを含有し、N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼ (A m i d a s e _ 2) ファミリー (P F A M アクセション P F 0 1 5 1 0) のメンバーである。

【 0 3 2 3 】

配列番号 92 は、およそアミノ酸 15 から 388 に位置する推定の F T S W _ R O D A _ S P O V E ドメインを含有し、細胞周期タンパク質ファミリー (F T S W _ R O D A _ S P O V E) (P F A M アクセション P F 0 1 0 9 8) のメンバーである。

10

【 0 3 2 4 】

配列番号 94 は、およそアミノ酸 43 から 293 に位置する推定の M u r _ リガーゼ (M u r _ l i g a s e) ドメインと、およそアミノ酸 301 - 390 に位置する推定の M u r _ リガーゼ__C (M u r _ l i g a s e _ C) ドメインとを含有し、M u r リガーゼ、触媒ドメインファミリー (M u r _ l i g a s e) (P F A M アクセション P F 0 1 2 2 5)、及び M u r リガーゼ、グルタミン酸リガーゼドメインファミリー (M u r _ l i g a s e _ C) (P F A M アクセション P F 0 2 8 7 5) のメンバーである。

【 0 3 2 5 】

配列番号 98 は、およそアミノ酸 365 から 454 に位置する推定の M u r _ リガーゼ__C (M u r _ l i g a s e _ C) ドメインを含有し、M u r リガーゼ、グルタミン酸リガーゼドメインファミリー (M u r _ l i g a s e _ C) (P F A M アクセション P F 0 2 8 7 5) のメンバーである。

20

【 0 3 2 6 】

配列番号 100 は、およそアミノ酸 48 から 309 に位置する推定の M u r _ リガーゼ (M u r _ l i g a s e) ドメインと、およそアミノ酸 317 - 394 に位置する推定の M u r _ リガーゼ__C (M u r _ l i g a s e _ C) ドメインとを含有し、M u r リガーゼ、触媒ドメインファミリー (M u r _ l i g a s e) (P F A M アクセション P F 0 1 2 2 5)、及び M u r リガーゼ、グルタミン酸リガーゼドメインファミリー (M u r _ l i g a s e _ C) (P F A M アクセション P F 0 2 8 7 5) のメンバーである。

30

【 0 3 2 7 】

配列番号 102 は、およそアミノ酸 2 から 287 に位置する推定の G l y c o _ t r a n s f _ 2 8 ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー 28 N 末端ドメイン (G l y c o _ t r a n s f _ 2 8) (P F A M アクセション P F 0 3 0 3 3) のメンバーである。

【 0 3 2 8 】

配列番号 104 は、およそアミノ酸 82 から 254 に位置する推定の G l y c o s _ t r a n s f _ 4 ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー (G l y c o s _ t r a n s f _ 4) (P F A M アクセション F F 0 0 9 5 3) のメンバーである。

40

【 0 3 2 9 】

配列番号 106 は、およそアミノ酸 63 から 212 に位置する推定のアミダーゼ__4 (Amidase_4) ドメインを含有し、マンノシル - 糖タンパク質エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミダーゼファミリー (A m i d a s e _ 4) (P F A M アクセション P F 0 1 8 3 2) のメンバーである。

【 0 3 3 0 】

配列番号 108 は、およそアミノ酸 43 から 196 に位置する推定のアミダーゼ__4 (Amidase_4) ドメインを含有し、マンノシル - 糖タンパク質エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミダーゼファミリー (A m i d a s e _ 4) (P F A M アクセション P F 0 1 8 3 2) のメンバーである。

50

【0331】

配列番号110は、およそアミノ酸110から153に位置する推定のLysMドメインを含有し、LysMドメインファミリー(LysM)(PFAMアクセッションPF01476)のメンバーである。

【0332】

配列番号112は、およそアミノ酸5から343に位置する推定のDala__Dala__ligas(Dala__Dala__lig__N)ドメインを含有し、D-lala D-lalリガーゼN末端ファミリー(Dala__Dala__lig__N)(PFAMアクセッションPF01820)のメンバーである。

【0333】

配列番号116は、およそアミノ酸36から303に位置する推定のMur__リガーゼ(Mur_ligase)ドメインを含有し、Murリガーゼ、触媒ドメインファミリー(Mur__ligase)(PFAMアクセッションPF01225)のメンバーである。

【0334】

配列番号118は、およそアミノ酸25から321に位置する推定のペプチダーゼ__S11(Peptidase_S11)ドメインを含有し、D-アラニル-D-アラニンカルボキシペプチダーゼファミリー(Peptidase__S11)(PFAMアクセッションPF00768)のメンバーである。

【0335】

配列番号120は、およそアミノ酸16から419に位置する推定のEPSP__シンターゼ(EPSP_synthase)ドメインを含有し、EPSPシンターゼ(3-ホスホシキミ酸1-カルボキシビニルトランスフェラーゼ)ファミリー(EPSP__synthase)(PFAMアクセッションPF00275)のメンバーである。

【0336】

配列番号122は、およそアミノ酸4から233に位置する推定のNTP__トランスフェラーゼ(NTP_transferase)ドメインを含有し、細菌性トランスフェラーゼヘキサペプチド(3反復)ファミリー(Hexapep)(PFAMアクセッションPF00132)のメンバーである。

【0337】

配列番号124は、およそアミノ酸14から238に位置する推定のPrenyltransf(UPP__シンターゼ(UPP_synthetase))ドメインを含有し、推定上のウンデカプレニルニリン酸シンターゼファミリー(Prenyltransf)(PFAMアクセッションPF01255)のメンバーである。

【0338】

配列番号126は、およそアミノ酸74から240に位置する推定のGlycos__transf__4ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー(Glycos__transf__4)(PFAMアクセッションPF00953)のメンバーである。

【0339】

配列番号132は、およそアミノ酸331から693に位置する推定のトランスペプチダーゼ(Transpeptidase)ドメインを含有し、ペニシリン結合タンパク質トランスペプチダーゼドメインファミリー(Transpeptidase)(PFAMアクセッションPF00905)のメンバーである。

【0340】

配列番号134は、およそアミノ酸82から251に位置する推定のトランスグリコシル(Transglycosyl)ドメインと、およそアミノ酸336から640に位置する推定のトランスペプチダーゼ(Transpeptidase)ドメインを含有し、トランスグリコシラーゼファミリー(Transgly)(Transglycosyl)(PFAMアクセッションPF00912)、及びペニシリン結合タンパク質トランスペプチダーゼドメインファミリー(Transpeptidase)(PFAMアクセッションPF00905)のメンバーである。

10

20

30

40

50

【0341】

配列番号138は、およそアミノ酸70から242に位置する推定のトランスグリコシル (Transglycosyl) ドメインと、アミノ酸324~629に位置する推定のトランスペプチダーゼ (Transpeptidase) ドメインとを含有し、トランスグリコシラーゼファミリー (Transgly) (Transglycosyl) (PFAMアクセッションPF00912)、及びペニシリン結合タンパク質トランスペプチダーゼドメインファミリー (Transpeptidase) (PFAMアクセッションPF00905) のメンバーである。

【0342】

配列番号146は、およそアミノ酸259から593に位置する推定のトランスペプチダーゼ (Transpeptidase) ドメインを含有し、ペニシリン結合タンパク質トランスペプチダーゼドメインファミリー (Transpeptidase) (PFAMアクセッションPF00905) のメンバーである。

10

【0343】

配列番号148は、およそアミノ酸30から426に位置する推定のAMP結合 (AMP-binding) メインを含有し、AMP結合酵素ファミリー (AMP-binding) (PFAMアクセッションPF00501) のメンバーである。

【0344】

配列番号156は、およそアミノ酸3から269に位置する推定のPolysacc__syn__tドメインを含有し、多糖生合成タンパク質ファミリー (Polysacc__syn__t) (PFAMアクセッションPF01943) のメンバーである。

20

【0345】

配列番号158は、およそアミノ酸1から154に位置する推定のGLFドメインを含有し、UDPガラクトピラノースムターゼファミリー (GLF) (PFAMアクセッションPF03275) のメンバーである。

【0346】

配列番号164は、およそアミノ酸7から179に位置する推定のGlycos__transf__2ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー (Glycos__transf__2) (PFAMアクセッションPF00535) のメンバーである。

【0347】

配列番号170は、およそアミノ酸5から171に位置する推定のGlycos__transf__2ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー (Glycos__transf__2) (PFAMアクセッションPF00535) のメンバーである。

30

【0348】

配列番号174は、およそアミノ酸24から217に位置する推定のBact__transf (Bact__transf) ドメインを含有し、細菌性糖転移酵素ファミリー (Bact__transf) (Bact__transf) (PFAMアクセッションPF02397) のメンバーである。

【0349】

配列番号180は、およそアミノ酸9から186に位置する推定のWzzドメインを含有し、鎖長決定タンパク質ファミリー (Wzz) (PFAMアクセッションPF02706) のメンバーである。

40

【0350】

配列番号190は、およそアミノ酸141から249に位置する推定のNLPC__P60ドメインを含有し、NlpC/P60ファミリー (NLPC__P60) (PFAMアクセッションPF00877) のメンバーである。

【0351】

配列番号194は、およそアミノ酸152から260に位置する推定のNLPC__P60ドメインを含有し、NlpC/P60ファミリー (NLPC__P60) (PFAMアクセッションPF00877) のメンバーである。

50

【0352】

配列番号196は、およそアミノ酸77から182に位置する推定のNLP_C__P60ドメインを含有し、NlpC/P60ファミリー(NLP_C__P60)(PFAMアクセッションPF00877)のメンバーである。

【0353】

配列番号208は、およそアミノ酸1から283に位置する推定のRibonuc__red__Smドメインを含有し、リボヌクレオチドレダクターゼ、小さな鎖ファミリー(Ribonuc__red__Sm)(PFAMアクセッションPF00268)のメンバーである。

【0354】

配列番号214は、およそアミノ酸9から83に位置する推定のDUF59ドメインを含有し、未知機能ドメインDUF59ファミリー(DUF59)(PFAMアクセッションPF01883)のメンバーである。

【0355】

配列番号216は、およそアミノ酸2から73に位置する推定のUPF0051ドメインを含有し、特徴付けされていないタンパク質ファミリー(UPF0051)(PFAMアクセッションPF01458)のメンバーである。

【0356】

配列番号218は、およそアミノ酸35から73に位置する推定のABC__trandメインを含有し、ABC輸送体ファミリー(ABC__tran)(PFAMアクセッションPF00005)のメンバーである。

【0357】

配列番号226は、およそアミノ酸29から232と、およそアミノ酸347から512とに位置する推定のABC__trandメインを含有し、ABC輸送体ファミリー(ABC__tran)(PFAMアクセッションPF00005)のメンバーである。

【0358】

配列番号236は、およそアミノ酸8から171に位置する推定のGlycos__transf__2ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー(Glycos__transf__2)(PFAMアクセッションPF00535)のメンバーである。

【0359】

配列番号238は、およそアミノ酸4から273に位置する推定のPolysacc__syntドメインを含有し、多糖合成タンパク質ファミリー(Polysacc__synt)(PFAMアクセッションPF01943)のメンバーである。

【0360】

配列番号242は、およそアミノ酸57から233に位置する推定のGlycos__transf__1ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼグループ1ファミリー(Glycos__transf__1)(PFAMアクセッションPF00534)のメンバーである。

【0361】

配列番号244は、およそアミノ酸45から365に位置する推定のエピメラーゼ__2(Epimerase_2)ドメインを含有し、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼファミリー(Epimerase__2)(PFAMアクセッションPF02350)のメンバーである。

【0362】

配列番号246は、およそアミノ酸64から384に位置する推定のエピメラーゼ__2(Epimerase_2)ドメインを含有し、UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼファミリー(Epimerase__2)(PFAMアクセッションPF02350)のメンバーである。

【0363】

配列番号250は、およそアミノ酸189から359に位置する推定のGlycos__t

10

20

30

40

50

r a n s f _ 1 ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼグループ1ファミリー (G l y c o s _ t r a n s f _ 1) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 0 5 3 4) のメン
バーである。

【0364】

配列番号252は、およそアミノ酸51から152に位置する推定の G l y c o s _ t r a n s f _ 2 ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼファミリー (G l y c o s _ t r a n s f _ 2) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 0 5 3 5) のメン
バーである。

【0365】

配列番号258は、およそアミノ酸174から241に位置する推定の G l y c o s _ t r a n s f _ 1 ドメインを含有し、グリコシルトランスフェラーゼグループ1ファミリー (G l y c o s _ t r a n s f _ 1) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 0 5 3 4) のメン
バーである。

10

【0366】

配列番号260は、およそアミノ酸18から412に位置する推定のアルファアミラーゼ (Alpha-amylase) ドメインを含有し、アルファアミラーゼ、触媒ドメインファミリー (A l p h a - a m y l a s e) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 0 1 2 8) のメン
バーである。

【0367】

配列番号262は、およそアミノ酸110から757に位置する推定の G l y c o _ h y d r o _ 3 1 ドメインを含有し、グリコシルヒドロラーゼファミリー31 (G l y c o _ h y d r o _ 3 1) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 1 0 5 5) のメン
バーである。

20

【0368】

配列番号：264は、およそアミノ酸83から757に位置する推定の G l y c o _ h y d r o _ 3 1 ドメインを含有し、グリコシルヒドロラーゼファミリー31 (G l y c o _ h y d r o _ 3 1) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 1 0 5 5) のメン
バーである。

【0369】

配列番号266は、およそアミノ酸18から410に位置する推定のアルファアミラーゼ (Alpha-amylase) ドメインを含有し、アルファアミラーゼ、触媒ドメイン
ファミリー (A l p h a - a m y l a s e) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 0 1 2 8)
のメンバーである。

30

【0370】

配列番号268は、およそアミノ酸68から682に位置する推定の G l y c o _ h y d r o _ 3 1 ドメインを含有し、グリコシルヒドロラーゼファミリー31 (G l y c o _ h y d r o _ 3 1) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 1 0 5 5) のメン
バーである。

【0371】

配列番号270は、およそアミノ酸28から429に位置する推定のアルファアミラーゼ (Alpha-amylase) ドメインを含有し、アルファアミラーゼ、触媒ドメイン
ファミリー (A l p h a - a m y l a s e) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 0 1 2 8)
のメンバーである。

【0372】

配列番号272は、およそアミノ酸23から109に位置する推定のイソアミラーゼ_N (Isoamylase_N) ドメインと、およそアミノ酸145から495に位置するアルファアミ
ラーゼ (Alpha-amylase) ドメインとを含有し、イソアミラーゼN末端ドメインファミ
リー (I s o a m y l a s e _ N) (P F A M ア ク セ ッ シ ョ ン P F 0 2 9 2 2) 、 及びアル
ファアミラーゼ、触媒ドメインファミリー (A l p h a - a m y l a s e) (P F A M ア
クセセッション P F 0 0 1 2 8) のメンバーである。

40

【0373】

配列番号274は、およそアミノ酸1から121に推定のアルファアミラーゼ_N (Alph
a-amylase_N) ドメインと、およそアミノ酸140から503に位置するアルファアミラ
ーゼ (Alpha-amylase) ドメインとを含有し、アルファアミラーゼ、触媒ドメインファミ

50

リー (Alpha-amylase) (PFAMアクセッションPF00128)、及びアルファアミラーゼ、N末端ig様ドメインファミリー (Alpha-amylase_N) (PFAMアクセッションPF02903) のメンバーである。

【0374】

配列番号276は、およそアミノ酸548から926に位置する推定のアルファアミラーゼ (Alpha-amylase) ドメインを含有し、アルファアミラーゼ、触媒ドメインファミリー (Alpha-amylase) (PFAMアクセッションPF00128) のメンバーである。

【0375】

配列番号278は、およそアミノ酸133から505に位置する推定のアルファアミラーゼ (Alpha-amylase) ドメインを含有し、アルファアミラーゼ、触媒ドメインファミリー (Alpha-amylase) (PFAMアクセッションPF00128) のメンバーである。

10

【0376】

配列番号286は、およそアミノ酸29から405に位置する推定のFTSW__RODA__SPOVEドメインを含有し、細胞周期タンパク質ファミリー (FTS__WRODA__SPOVE) (PFAMアクセッションPF01098) のメンバーである。

【0377】

配列番号292は、およそアミノ酸163から368に位置する推定のUPF0020ドメインを含有し、推定上のRNAメチラーゼファミリーUPF0020 (UPF0020) (PFAMアクセッションPF01170) のメンバーである。

20

【0378】

配列番号294は、およそアミノ酸21から226に位置するtRNA__m1G__MTドメインを含有し、tRNA (グアニン - 1) - メチルトランスフェラーゼ (tRNA__m1G__MT) (PFAMアクセッションPF01746) のメンバーである。

【0379】

配列番号296は、およそアミノ酸22から85に位置する推定のTGSドメインと、およそアミノ酸283から438に位置する推定のtRNA__syn__2bドメインと、およそアミノ酸562から659に位置する推定のHGTP__アンチコドン (HGTP_anticodon) ドメインとを含有し、tRNAシンテターゼクラスIIコアドメインファミリー (G、H、P、S、及びT) (tRNA__syn__2b) (PFAMアクセッションPF00587)、アンチコドン結合ドメインファミリー (HGTP__anticodon) (PFAMアクセッションPF03129)、及びTGSドメインファミリー (TGS) (PFAMアクセッションPF02824) のメンバーである。

30

【0380】

配列番号304は、およそアミノ酸2から155に位置する推定のLuxSドメインを含有し、LuxSタンパク質ファミリー (LuxS) (PFAMアクセッションPF02664) のメンバーである。

【実施例3】

【0381】

40

(細胞接着に関する配列の同定)

粘膜表面に粘着する微生物の能力は、消化管における常在性を確立する際に、明確な利点を提供することができる。乳酸杆菌は、腸微生物相の正常な構成員である。ただし、これらの生物が上皮に付着する分子機序は、まだ、完全に特徴付けられていない。アシドフィルス菌NCFMの接着に潜在的に関与する遺伝子を同定するために、完全ゲノム配列の分析を行い、接着に関与することが以前に示されている遺伝子に類似したオープンリーディングフレーム (ORF) を選択した。これらのORFには、連鎖球菌R28の2つの相同体 (配列番号76及び配列番号78、図1では、これらはそれぞれORF1633及びORF1634として示されている)、フィブロネクチン結合タンパク質 (FpbA) (配列番号58)、及びムチン結合タンパク質 (Mub) (配列番号18) が含ま

50

れる。接着に対するそれらの影響を測定するために、これらの遺伝子を標的として、挿入による不活性化を、(Russell and Klaenhammer (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67: 4361-4364) によって記述されている、組み込み用のツール及びストラテジーを用いて行った。細菌性表面構成要素は、接着と相互作用する性質があるため、不活性化されている表層タンパク質 (SlpA) (配列番号60) を含有する株に関しても、接着性の評価を行った。すべての変異体に関して、それらの接着性の評価は、Caco2細胞上で、アシドフィルス菌 NCFM LacL - と比較して行った。アシドフィルス菌 NCFM LacL - は、抗生物質に関する対照として使用され、野生型として指定されるものである。Caco2細胞は、正常な小腸絨毛細胞に関連している多数のマーカーを発現し、細菌の接着を研究するのに一般的に用いられている。

10

【0382】

R28の2つの相同体の変異体(配列番号76及び配列番号78)は、再現性のある接着の低減を示さなかった(図1を参照)。表層の変異体であるSlpA(配列番号60)が接着の最も大きな低減を示し、一方、フィブロネクチン(配列番号58)及びムチン結合(配列番号18)の変異体は、両方とも、野生型と比較した場合に、接着の、有意な低減を有した。これらのデータは、フィブロネクチン結合タンパク質、表層タンパク質、及びムチン結合タンパク質が、付着又は接着の過程に寄与していることを示す。

【0383】

(接着アッセイ)

Caco2細胞は、適切な分化と腸マーカーの発現とを実現するために、細胞培養処理されているカバーガラス上で15日間成長させた。その後、単層培養を、約 4×10^8 細菌/mlの濃度の細菌懸濁液で処理した。対数期の中間部にある細菌集団を用いて、選択を維持するために、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ のEmを含んだMRS中で成長させた。MRS及び細胞系培養液(20%ウシ胎仔血清で捕捉した最小必須培地)の混合物中、37で、1.5時間、細菌を単層培養上でインキュベートした。インキュベーションの後、単層培養を、リン酸緩衝食塩水(PBS)で5回洗浄し、メタノールで固定し、そして、グラム染色した。次に、カバーガラスを顕微鏡スライドに移し、そこで、細胞を計数した。統計上の目的で、各カバーガラスにつき、固定格子中の17の視野を計数し、各実験について、2枚組のカバーガラスを計数した。各カバーガラスの総計測数を用い、対照に対するパーセント(%)として接着を表した。アシドフィルス菌、NCFM::LacLは、3-ガラクトシダーゼ遺伝子中に組み込まれたpOR128を保持する。接着に対する、LacLへの組み込みの影響は見出されておらず、対照は、他のすべての組み込み体と同様に、同じ抗生物質選択条件下で増殖することができた。

20

30

【0384】

本明細書中に言及された全ての出版物及び特許出願は、本発明が関係する当業者の技術水準を示すものである。すべての出版物及び特許出願は、それぞれ個々の出版物または特許出願が、具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれると示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0385】

理解を明快にすることを目的として、例示による方法と、実例とによって、上記の発明をある程度詳細に記述したが、添付されている特許請求の範囲内において、ある程度の変更及び修正を行うことができるのは明らかであろう。

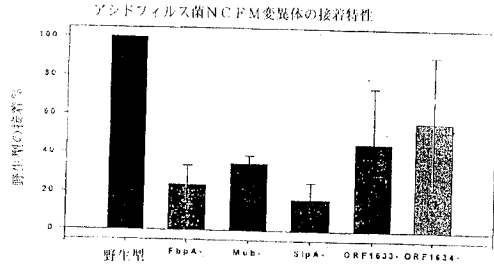
40

【図面の簡単な説明】

【0386】

【図1】野生型のアシドフィルス菌NCFMと、FpbA(配列番号58)、Mub(配列番号18)、SlpA(配列番号60)、又は連鎖球菌R28タンパク質(配列番号76及び配列番号78、それぞれORF1633及びORF1634と名付けられている)を欠失した変異体細菌とを対比した接着比率を示す図である。

【 図 1 】



【 配列表 】

2011135873000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/12	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 6 1 K	35/74 (2006.01)	A 6 1 K	35/74	A
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/12 (2006.01)	A 6 1 P	1/12	
A 6 1 P	1/10 (2006.01)	A 6 1 P	1/10	

(72)発明者 オルターマン エリック
 アメリカ国 ノースキャロライナ ラレイ

(72)発明者 カノ ラウル ジェイ
 アメリカ国 カリフォルニア サンルイオビスポ

(72)発明者 ハムリック アリス
 アメリカ国 カリフォルニア 9 3 4 0 2 ロスオソス フィフスストリート 1 6 1 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 BA50 BA80 CA01 GA11 HA01
 4B064 AG01 AG27 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01 DA10
 4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14 AC15 BA02 CA24 CA25 CA41 CA44
 CA46
 4C084 AA02 BA44 CA04 MA52 NA14 ZA682 ZA722 ZA732
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC58 CA09 NA14 ZA68 ZA72 ZA73
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA11 DA50 DA76 EA25 EA50 FA74

专利名称(译)	编码细胞表面蛋白同源物的嗜酸乳杆菌核酸序列及其用途		
公开(公告)号	JP2011135873A	公开(公告)日	2011-07-14
申请号	JP2011000190	申请日	2011-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗莱纳州立大学		
申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳州盐湖城		
[标]发明人	クレナマートツズアール ラッセルウィリアムエム オルターマンエリック カノラウルジェイ ハムリックアリス		
发明人	クレナマートツズアール ラッセルウィリアムエム オルターマンエリック カノラウルジェイ ハムリックアリス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/195 C07K16/12 C12P21/02 G01N33/53 A61K35/74 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/10 A23C9/123 A23C19/032 A23L1/305 A23L3/3526 C07H21/04 C07K14/335 C12N C12N9/00 C12P21/06 C12Q1/68		
CPC分类号	A23C9/123 A23C19/0323 A23L3/3526 A23L33/18 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/10 A61P1/12 A61P15/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/18 C07K14/335		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K14/195 C07K16/12 C12P21/02.C G01N33/53.D A61K35/74.A A61K37/02 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/10 A61K35/744 A61K35/747 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/113.Z C12N15/31 C12N15/52.Z C12N15/53 C12N15/54 C12N15/55 C12N15/56 C12N15/57 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA05 4B024/BA50 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA10 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA41 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA04 4C084/MA52 4C084/NA14 4C084/ZA682 4C084/ZA722 4C084/ZA732 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BC58 4C087/CA09 4C087/NA14 4C087/ZA68 4C087/ZA72 4C087/ZA73 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA25 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/465621 2003-04-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

细胞壁，细胞表面和革兰氏阳性细菌分泌物的蛋白质执行许多不同的功能，包括与其他细胞或化合物的附着，提供结构稳定性以及对环境刺激的反应。。细菌表面蛋白对于宿主的存活以及细胞的生长和分裂很重要。此外，通常会启动免疫刺激，调节或增强作用，从而提供这些蛋白质的分离和特征以开发益生菌产品。公开了细胞壁，细胞表面和分泌蛋白的核酸分子和多肽，及其片段和变体。还包括细胞壁，细胞表面和分泌融合蛋白，抗原肽以及针对细胞壁，细胞表面和分泌的抗体。还公开了包含核酸分子的重组表达载体，已将这些表达载体引入其中的宿主细胞，产生多肽的方法及其使用方法。[选择图]无

配列番号	同一性／機能
1, 2	A B C型金属イオン輸送系、周辺質成分／表面付着因子
3, 4	I e m Aタンパク質
5, 6	F m t B表面タンパク質
7, 8	6 7 k D a ミオシン交差反応性連鎖球菌抗原
9, 10	ミオシン交差反応性抗原
11, 12	ソルターゼ
13, 14	粘液結合タンパク質前駆体
15, 16	粘液結合タンパク質前駆体
17, 18	粘液結合タンパク質前駆体 (M u b)
19, 20	粘液結合タンパク質前駆体 (M u b)
21, 22	粘液結合タンパク質前駆体 (M u b)
23, 24	粘液結合タンパク質前駆体