

(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2010-220622

(P2010-220622A)

(43) 公開日 平成22年10月7日(2010.10.7)

(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 O 2 4
C O 7 K 14/295 (2006.01)	C O 7 K 14/295	4 B O 6 4
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-113606 (P2010-113606)	(71) 出願人	592243793
(22) 出願日	平成22年5月17日 (2010.5.17)		カイロン ソチエタ ア レスボンサビリ
(62) 分割の表示	特願2000-589563 (P2000-589563)		タ リミタータ
原出願日	平成11年12月17日 (1999.12.17)		イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
(31) 優先権主張番号	9828000.1		ア フィオレンティーナ 1
(32) 優先日	平成10年12月18日 (1998.12.18)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ジウリオ ラッティ
			イタリア国 イー53100 シエナ,
			ピア フィオレンティーナ 1, アイリ
			ス リサーチ センター
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Chlamydia trachomatis 抗原

(57) 【要約】

【課題】ワクチン開発における使用に適切な抗原および免疫原を提供するため、天然の感染の間に免疫応答を惹起するクラミジア抗原を同定することが本発明の課題である。

【解決手段】本発明は、Chlamydia trachomatis由来の抗原性タンパク質に関する。詳細には、これは、慢性に感染した患者血清またはセロコンバージョンした患者の血清由来の抗体により認識される抗原に関する。上記課題は、感染の結果としてヒトにおいて免疫原性である、Chlamydia trachomatisによってコードされるタンパク質を、二次元電気泳動マップのウエスタンブロットを用いて同定することで解決された。いくつかの公知の免疫原は、免疫原として以前には公知ではないタンパク質、および発現された遺伝子産物として以前には報告されていないタンパク質として、同定された。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(クラミジア抗原)

本発明は、*Chlamydia trachomatis*由来の抗原性タンパク質に関する。詳細には、これは、慢性に感染した患者血清またはセロコンバージョンした患者の血清由来の抗体により認識される抗原に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(背景)

*Chlamydia*は、風土性の性感染症、トラコーマ、感染性肺炎、および種々の他の疾患症候群の原因である真核生物細胞の偏性細胞内寄生生物である。それらは、排他的真正細菌の系統学的な分科であり、任意の他の公知の生物体に密接な関係を有さない。それらは、それ自体の目(*Chlamydiales*)に分類され、これは、単一の科(*Chlamydiaceae*)を含み、次に、これは単一の属(*Chlamydia*)を含む。4つの*Chlamydia*種が現在、公知である。*C. trachomatis*、*C. pneumoniae*、*C. pecorum*および*C. psittaci* [例えば、引用文献1を参照のこと]。*C. trachomatis* (血清型亜型D)のゲノム配列は、現在公表されている [2]。

20

【0003】

*C. Trachomatis*のヒトの血清改変体(「血清型亜型」)は、2つのバイオ改変体(「biovar」)に分けられる。血清型亜型A~Kは、主に眼の組織(A~C)または泌尿生殖器管(D~K)において上皮性感染を誘発する。血清型亜型L1、L2およびL3は、浸潤性の性病性リンパ肉芽腫(LGV)の因子である。

【0004】

クラミジア感染自体が疾患を生じるが、幾人かの患者においては、症候群の重篤度は、実際には、異常な宿主免疫応答に起因していると考えられる。感染を排除することの失敗は持続的な免疫刺激を生じ、そして宿主を助けることよりも、これは、重篤な結果(不妊および失明を含む)を伴う慢性感染を生じる [3]。

30

【0005】

さらに、天然のクラミジア感染により与えられる防御は、通常、不完全で、一過性で、そして株特異的である。

【0006】

疾患の深刻な性質に起因して、適切なワクチンを提供することが所望される。これらは、(a)クラミジア感染に対する、またはクラミジア誘導性疾患に対する免疫のために(予防ワクチン接種)、あるいは(b)確立された慢性クラミジア感染の根絶のために(治療ワクチン接種)有用であり得る。しかし、細胞内寄生生物であることから、この細菌は、一般に抗体媒介免疫応答を逃れ得る。

40

【0007】

種々の抗原性タンパク質が、*C. trachomatis*について記載されており、そして特に細胞表面が、詳細な検索の標的となっている [例えば、1, 4]。これらとしては、例えば、pgp3 [5, 6, 7]、MOMP [8]、Hsp60 (GroEL) [9] およびHsp70 (DnaK様) [10] が挙げられる。しかし、これらの全てが有効なワクチンであると証明されたわけではなく、そして、ワクチン開発における使用に適切な抗原および免疫原を提供するため、天然の感染の間に免疫応答を惹起するクラミジア抗原を同定することが本発明の目的である。

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の詳細な説明)

本発明は、感染の結果、ヒトにおいて免疫原性である、*Chlamydia trachomatis*によりコードされるタンパク質の同定に基づく。

【0009】

本発明は、15頁(PCT英文)の表I Iに列挙されたような、タンパク質、5、6、7、8、9、11、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55の分子量およびp Iの特徴を有する*C. trachomatis*タンパク質を提供する。

10

【0010】

これらは、*C. trachomatis*のL2株において、16頁(PCT英文)の表I I Iに開示されたN末端アミノ酸配列を有するタンパク質を含む。

【0011】

本発明はまた、これらの*C. trachomatis*タンパク質に同一の配列を有するタンパク質を提供する。特定のタンパク質に依存して、同一性の程度は、好ましくは、50%より大きい(例えば、65%、80%、90%、95%、98%、99%以上)。これらの相同なタンパク質としては、変異体、対立遺伝子改変体、血清型改変体、およびバイオ改変体が挙げられる。タンパク質の間の同一性は、好ましくは、MPSRCHプログラム(Oxford Molecular)において実行されるようなSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムにより決定される。これは、パラメーターgap open penalty=12、およびgap extension penalty=1を有するアフィニギャップ検索を用いる。代表的には、2つのタンパク質の間の50%以上の同一性は、機能的に等価の指標とみなされる。

20

【0012】

本発明は、さらに、本発明の*C. trachomatis*タンパク質のフラグメントを含むタンパク質を提供する。このフラグメントは、このタンパク質から少なくともnの連続するアミノ酸を含むべきであり、そして特定のタンパク質に依存して、nは、7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、50、100以上)である。好ましくは、このフラグメントは、このタンパク質由来のエピトープを含む。

30

【0013】

本発明のタンパク質は、当然ながら、種々の手段(例えば、組換え発現、細胞培養物からの精製、化学合成など)により、そして種々の形態(例えば、ネイティブ、融合など)で調製され得る。それらは、好ましくは、実質的に単離されたまたは精製された形態(すなわち、実質的に他の*C. trachomatis*または宿主細胞タンパク質を含まない)で調製される。

【0014】

さらなる局面に従って、本発明は、これらのタンパク質に結合する抗体を提供する。これらは、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよく、そして、任意の適切な手段により生成されてもよい。

40

【0015】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明のタンパク質およびタンパク質のフラグメントをコードする核酸を提供する。この核酸に配列同一性を有する核酸がまた提供される。特定の核酸に依存して、同一性の程度は、好ましくは、50%より大きい(例えば、65%、80%、90%、95%、98%、99%以上)。

【0016】

さらに、本発明は、好ましくは「高ストリンジェンシー」な条件(例えば、0.1×SSC、0.5% SDS溶液中、65℃)下で、この核酸にハイブリダイズし得る核酸を

50

提供する。この核酸のフラグメントもまた提供される。このフラグメントは、この配列由来の少なくともnの連続するヌクレオチドを含むべきであり、そして特定の配列に依存して、nは10以上である（例えば、12、14、15、18、20、25、30、35、40以上）。

【0017】

本発明は、上記の核酸に相補的（例えば、アンチセンスまたはプローブする目的のため）な配列を含む核酸を提供することもまた理解されるべきである。

【0018】

本発明に従う核酸は、当然ながら、多くの方法（例えば、化学合成により、ゲノムライブラリーもしくはcDNAライブラリー、または生物体自体から、など）で調製され得、そして種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブ、など）をとり得る。

10

【0019】

さらに、用語「核酸」は、DNAおよびRNA、そしてまたそれらのアナログ（例えば、改変された骨格を含むもの）、そしてまたペプチド核酸（PNA）などを含む。

【0020】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明の核酸を含むベクター（例えば、発現ベクター）およびこのようなベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0021】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明に従うタンパク質、抗体および/または核酸を含む組成物を提供する。これらの化合物は、免疫原性組成物（ワクチンを含む）として、例えば、または診断試薬として、適切であり得る。

20

【0022】

本発明はまた、医薬として（例えば、ワクチンとして）、または診断試薬としての使用のための、本発明に従う核酸、タンパク質、または抗体を提供する。詳細には、本発明は、クラミジア免疫原としての使用のため、（15頁（PCT英文）の表IIに列举されたような）タンパク質5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55を提供する。表IIに記載のタンパク質のいくつかは、それ自体、公知であり得ると考えられるが、それらが免疫原性であるとは開示されていない。

30

【0023】

本発明はまた、以下の製造における、本発明に従う核酸、タンパク質、または抗体の使用を提供する：(i) Chlamydiaに起因する感染を処置または予防するための医薬、(ii) Chlamydiaの存在またはChlamydiaに対して惹起された抗体の存在を検出するための診断試薬、および/あるいは(iii) Chlamydiaに対して抗体を惹起し得る試薬。Chlamydiaは、任意の種または株であってもよいが、好ましくは、C. trachomatisである。好ましい実施形態では、本発明は、このような製造における使用のための表IIの55タンパク質のタンパク質を提供する。

40

【0024】

本発明はまた、患者を処置する方法を提供する。この方法は、本発明に従う核酸、タンパク質および/または抗体の治療的有効量を患者に投与する工程を包含する。

【0025】

さらなる局面に従って、本発明は、種々のプロセスを提供する。

【0026】

本発明のタンパク質を生成するためのプロセスが提供される。このプロセスは、タンパク質発現を誘導する条件下で本発明に従う宿主細胞を培養する工程を包含する。

【0027】

本発明のタンパク質または核酸を生成するためのプロセスが提供される。ここで、タン

50

パク質または核酸は、化学的手段を用いて部分的にまたは全体として合成される。

【0028】

本発明の核酸を検出するためのプロセスが提供される。このプロセスは、以下の工程：
(a) 本発明に従う核酸プローブを、二重鎖を形成するハイブリダイズ条件下で、生物学的サンプルに接触させる工程；および (b) この二重鎖を検出する工程、を包含する。

【0029】

本発明のタンパク質を検出するためのプロセスが提供される。このプロセスは、以下の工程：
(a) 本発明に従う抗体を、抗体－抗原複合体の形成に適切な条件下で、生物学的サンプルに接触させる工程；および (b) この複合体を検出する工程、を包含する。同様に、本発明は、サンプル中の抗クラミジア抗体を検出するためのプロセスを提供する。このプロセスは、以下の工程：
(a) 本発明に従うタンパク質を、抗体－抗原複合体の形成に適切な条件下で、生物学的サンプルと接触させる工程；および (b) この複合体を検出する工程、を包含する。

【0030】

本発明はまた、これらのプロセスにおける使用に適切な試薬を備えるキットを提供する。

【0031】

本発明に従う核酸プローブ、およびこのプローブにより形成された二重鎖を検出するための手段を備えるキットが、提供される。本発明に従う抗体、およびこの抗体により形成された抗体－抗原複合体を検出するための手段を備えるキットが提供される。本発明に従うタンパク質、およびこのタンパク質により形成された抗体－抗原複合体を検出するための手段を備えるキットが提供される。

【0032】

疑いを回避するため、用語「含む、備える (comprising)」は、「を含む、が挙げられる (including)」、および「からなる (consisting)」を包含する。例えば、Xを「含む (comprising)」組成物は、排他的にXから構成されてもよいし、またはX以外に何かを含んでも (例えば、X+Y) よい。

【0033】

本発明は、例えば以下を提供する。

(項目1) 15頁の表IIに記載のようなタンパク質5、6、7、8、9、11、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55の分子量特性およびpI特性を有する、C. trachomatisタンパク質。

(項目2) C. trachomatisのL2株において、16頁の表IIIに開示されるN末端アミノ酸配列を有する、項目1に記載のタンパク質。

(項目3) 項目1に記載のタンパク質に50%以上の配列同一性を有する、タンパク質。

(項目4) 項目1に記載のC. trachomatisタンパク質の少なくとも7つの連続するアミノ酸のフラグメントを含む、タンパク質。

(項目5) 項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質に結合する、抗体。

(項目6) 項目1～4のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする、核酸。

(項目7) 項目6の核酸に50%以上の配列同一性を有する、核酸。

(項目8) 項目6に記載の核酸にハイブリダイズし得る、核酸。

(項目9) 項目6に記載の核酸の10以上連続するヌクレオチドのフラグメントを含む、核酸。

(項目10) 項目6に記載の核酸を含む、ベクター。

(項目11) 項目10に記載のベクターで形質転換された、宿主細胞。

(項目12) 項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質、項目5に記載の抗

10

20

30

40

50

体、および／または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸を含む、組成物。

(項目13) 医薬として、または診断試薬として用いるための、項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質、項目5に記載の抗体、および／または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸。

(項目14) クラミジアの免疫原として用いるための(15頁の表I Iに記載のような)タンパク質5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55の分子量特性およびpI特性を有する、C. t r a c h o m a t i sタンパク質。

(項目15) C h l a m y d i aによる感染の処置または予防のための医薬の製造における、項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質、項目5に記載の抗体、および／または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸の、使用。

(項目16) C h l a m y d i aの存在の検出のための診断試薬、またはC h l a m y d i aに対して惹起される抗体の製造における、項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質、項目5に記載の抗体、および／または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸の、使用。

(項目17) C h l a m y d i aに対する抗体を惹起し得る試薬の製造における、項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質、項目5に記載の抗体、および／または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸の、使用。

(項目18) 項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質、項目5に記載の抗体、および／または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸の、治療的有效量を患者に投与する工程を包含する、患者を処置する方法。

(項目19) タンパク質の発現を誘導する条件下で、項目11に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質を産生するためのプロセス。

(項目20) 項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質または項目6から9のいずれか一項に記載の核酸を産生するためのプロセスであって、該タンパク質または該核酸が、一部または全体において化学的手段を用いて合成される、プロセス。

(項目21) 項目6から9のいずれか一項に記載の核酸を検出するためプロセスであって、以下の工程：(a)ハイブリダイズする条件下で、核酸プローブを生物学的サンプルに接触させて二重鎖を形成する工程；および(b)該二重鎖を検出する工程、を包含する、プロセス。

(項目22) 項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質を検出するためのプロセスであって、該プロセスは、以下の工程：(a)抗体-抗原複合体の形成のために適切な条件下で、項目5に記載の抗体を生物学的サンプルに接触させる工程；および(b)該複合体を検出する工程、を包含する、プロセス。

(項目23) 項目5に記載の抗体を検出するためのプロセスであって、該プロセスは、以下の工程：(a)抗体-抗原複合体の形成のために適切な条件下で、項目1から4のいずれか一項に記載のタンパク質を生物学的サンプルに接触させる工程；および(b)該複合体を検出する工程、を包含する、プロセス。

(項目24) 項目21から23のいずれか一項に記載のプロセスにおける使用のために適切な試薬を含む、キット。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、注釈付き参照2D電気泳動EBマップを示し、免疫反応性タンパク質スポット(標識された1~55)の位置もまた示す。同じタンパク質の一連の等電点として現れるスポットの群を、一緒に囲み、そして同じ識別番号に分類した。

【図2A】図2は、典型的な免疫プロットを示す。全マップ領域を示す。より簡単な比較のために、主要な公知の免疫原は、印を付けている。他のスポットの同定に関しては、図

10

20

30

40

50

1 および表 I I を参照する。プロット A は、P I D 患者 J O 5 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈は、1 : 5 0 0 0 を有する。プロット B は、続発性不妊症によって影響された患者 J O 3 5 (M I F 力価 6 4) 由来でありかつ血清希釈 1 : 2 5 0 0 を有する。プロット C は、プロット B に類似するが、患者 J O 5 2 に由来する。プロット D は、P I D 患者 J O 3 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈 1 : 5 0 0 0 を有する。

【図 2 B】図 2 は、典型的な免疫プロットを示す。全マップ領域を示す。より簡単な比較のために、主要な公知の免疫原は、印を付けている。他のスポットの同定に関しては、図 1 および表 I I を参照する。プロット A は、P I D 患者 J O 5 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈は、1 : 5 0 0 0 を有する。プロット B は、続発性不妊症によって影響された患者 J O 3 5 (M I F 力価 6 4) 由来でありかつ血清希釈 1 : 2 5 0 0 を有する。プロット C は、プロット B に類似するが、患者 J O 5 2 に由来する。プロット D は、P I D 患者 J O 3 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈 1 : 5 0 0 0 を有する。

【図 2 C】図 2 は、典型的な免疫プロットを示す。全マップ領域を示す。より簡単な比較のために、主要な公知の免疫原は、印を付けている。他のスポットの同定に関しては、図 1 および表 I I を参照する。プロット A は、P I D 患者 J O 5 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈は、1 : 5 0 0 0 を有する。プロット B は、続発性不妊症によって影響された患者 J O 3 5 (M I F 力価 6 4) 由来でありかつ血清希釈 1 : 2 5 0 0 を有する。プロット C は、プロット B に類似するが、患者 J O 5 2 に由来する。プロット D は、P I D 患者 J O 3 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈 1 : 5 0 0 0 を有する。

【図 2 D】図 2 は、典型的な免疫プロットを示す。全マップ領域を示す。より簡単な比較のために、主要な公知の免疫原は、印を付けている。他のスポットの同定に関しては、図 1 および表 I I を参照する。プロット A は、P I D 患者 J O 5 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈は、1 : 5 0 0 0 を有する。プロット B は、続発性不妊症によって影響された患者 J O 3 5 (M I F 力価 6 4) 由来でありかつ血清希釈 1 : 2 5 0 0 を有する。プロット C は、プロット B に類似するが、患者 J O 5 2 に由来する。プロット D は、P I D 患者 J O 3 1 (M I F 力価 2 5 6) 由来でありかつ血清希釈 1 : 5 0 0 0 を有する。

【発明を実施するための形態】

【0035】

(実施例)

(ヒト血清)

血清 (表 1) は、生殖管のクラミジア属感染に応答した女性から得た。17 の血清 (A ~ Q) を、低い 4 症例の生殖管感染および 2 症例の続発性不妊症 (secondary sterility) を含む腹腔鏡検査で確認した 13 症例の P I D (骨盤炎症疾患) から得た。全ての血清は、精製した C. trachomatis L2 基本小体 [11] を用いた標準の微小免疫蛍光試験 (M I F) に対して陽性であり、そして p g p 3 抗原 [5] をコードしたプラスミドを用いる E L I S A 試験により、C. trachomatis 免疫血清として確認した。

【0036】

健康な血液ドナー由来の 10 のセロネガティブコントロール血清の群を、同じ方法で免疫プロットングすることにより、かつ非特異的反応の発生を除外するために患者の血清と同じ希釈を用いて試験した。

【0037】

ほとんどの血清は、Bio banque de Picardie (Amiens, France) の Chlamydia 収集から得た。いくつかの P I D および健康な血液ドナー由来のコントロール血清は、Ospedale Policlinico S. Orsola (Bologna, Italy) から得た。

【0038】

(タンパク質サンプルの調製)

精製したクラミジア属細胞を参考文献12に記載のように、Vero細胞培養中のC. trachomatis種L2/343/Buを通常の手順に従って増殖し、続く2サイクルの密度勾配遠心分離[13]によって得た。精製した基本小体(EB)調製物の平均タンパク質濃度を、ビウレットアッセイを用いて決定した。アリコート(2mgタンパク質/ml)を、続く電気泳動分析のために-20℃で水中に貯蔵した。使用した細胞は、主にEBの形態であり、現在までに知られているクラミジアの抗原の全ては、網様体(reticular body)よりもむしろ基本小体に見出される。

【0039】

(クラミジアのタンパク質の分離)

クラミジアのタンパク質を高分解能2D電気泳動を用いて分離し、本質的に参考文献14および15に記載されるようなイモビリン(immobiline)/ポリアクリルアミド系を用いて実施した。分析ゲルについては、1枚のゲル当たり約45μgの総基本小体タンパク質を使用した。(微小配列決定のための)セミプレパレーティブゲル(semipreparative gel)については、約1mgタンパク質を使用した。EBタンパク質のアリコートを低速度の遠心分離によってペレットにし、そして8M尿素、4%CHAPS(3-[(3-クロラミドプロピル)ジメチルアンモニウム]-1-プロパンスルホネート)、40mM トリス塩基、65mMジチオエリトリール(DTE)および微量のプロモフェノールブルー中に再懸濁した。

【0040】

等電点電気泳動を、非線形の3~10のpH勾配(IPG strips, Amersham Pharmacia Biotech)を提供するイモビリン片上で実施した。電圧は、最初の3時間の間、直線的に300~3500Vまで上昇させ、次いで5000Vで22時間安定化させた(総電圧-時間の積は、110kVhである)。電気泳動の後、IPGストリップを、6M尿素、30%グリセロール、2%SDS、0.05M TrisHCl、pH6.8、および2%DTEに対して12分平衡化させた。二次元を9~16%ポリアクリルアミド直線勾配ゲル(18cm×20cm×1.5mm)上、40mA/ゲル 定電流で、色素の前面がゲルの底面に到達するまで約5時間の間、Laemmli系において実施した。分析ゲルをアンモニア性の硝酸銀を用いて染色した[16]。タンパク質マップをレーザーフォトデンシトメーター(laser photodensitometer)(Molecular Dynamics)を用いてスキャンし、次いでMelanie II コンピューターソフトウェア(Bio-Rad)を用いて分析された電子ファイル(electronic file)に変換した。

【0041】

図1は、イムノブロット上の同定されたタンパク質に使用した注釈付き参照EBマップ(annotated reference EB map)を示す。参照マップに関するMWおよびpI座標を、参照タンパク質として働くヒト血清タンパク質とのクラミジアタンパク質の共同移動(co-migration)により校正した。血清タンパク質に使用した等電点の値は、参考文献17に記載の等電点の値である。

【0042】

(免疫プロット分析)

免疫プロットの結果を図2および表IIに要約する。

【0043】

二次元電気泳動の後、ゲルをニトロセルロース膜[18]上に電気プロットし、そして参考文献19に記載されたように改変された標準の手順にしたがって処理した。簡単には、免疫検出の前に、膜を3%(w/v)トリクロロ酢酸中の0.2%(w/v)Ponceau Sで3分間染色し、そして選択されたアンカースポットの位置をプロット上に印をつけ、免疫プロットと銀染色マップとの整合を補助した。免疫反応性スポットは、患者の血清(1500~5000×希釈)を用いて室温で一晩インキュベートし、続いてペル

10

20

30

40

50

オキシダーゼと結合体化したウサギ抗ヒトIgG (Cappel、7000×希釈) とインキュベートし、そして化学発光ベースのキット (Pharmacia Amersham Biotech) を用いる検出によって検出した。

【0044】

代表的には、6つの同一の2Dマップを各実験に関して並行して調製し、5つを、ニトロセルロース上にプロットし、そして1つを、引き続く免疫プロットとの相関関係および参照マップに対するコンピューターに補助されたマッチングのために硝酸銀を用いて染色した。

【0045】

免疫プロット上のスポットシグナルは、ほとんどいつも銀染色ゲル上のスポットに対応する。しかし、少なくとも2つの実例 (図1のスポット13および14) において、免疫プロット分析は、銀染色マップにおいて見えなかったタンパク質スポットを検出した。これは、この技術が、優れた感度を有し、かつ系統的なプロテオミクス (proteomics) 研究の価値ある手段としてもまた考慮されるべきであることを示す。

【0046】

免疫プロットと図1に示される参照マップとのマッチングを補助するために、ニトロセルロースプロットに、一過性Ponceau Red染色を用いて、多くの内部「アンカー」スポットに印をつけた。血清とのインキュベーションおよび化学発光による結合抗体の検出の後、免疫プロット画像を参照マップに整合し、そしてスポットを対応するpIおよびMW座標 (表II参照のこと) に割り当てた。スポット (または等電点の一連のスポット) の位置および形が、以前に同定されたEB抗原と一致した場合、そのような抗原に対する免疫応答を記録した。他の全ての場合において、免疫プロットスポットは、染色された領域 (または、複合体スポットパターンの場合には、座標領域) の重心 (baricentre) において得られたMWおよびpI座標によって同定した。MWおよびpI値が、電気泳動的に決定され、そして+/-10%の潜在的な平均誤差を有し得ることが理解される。より高いMWの測定は、低精度である傾向がある。

【0047】

コントロールプロットは全く空であったが、患者のプロットは、平均約15を有する2~28で変化した多数のスポットを含む、個々に異なるパターンを示す (表IIを参照のこと)。免疫反応性スポットの数は、血清MIF力価と相関しない (表IおよびIIを参照のこと)。それ故、プロットパターンは、単に抗体力価の差違ではなく、体液性応答において、事実上の個々の多様性を反映するようである。このことをまた、種々の希釈での各血清の結果を比較することによって確認した。

【0048】

代表的なイムノプロットの結果を、図2に示す。試験した血清すべてについて一定である唯一の特徴は、システインリッチな外膜タンパク質OMP2に起因すると以前に同定された、スポットの複合クラスターに対する抗体の存在であった[12]。このクラスターは、図1においてスポットとして示される「1」と表示されたスポットすべてが、単一の抗原としてスコア付けされたが、通常はOMP2の反応性に関連するようである、より低いMWおよびpI値を有する多数の付属スポットは、別々にスコア付けされた。なぜなら、OMP2ポリペプチドに対するこれらの関係が、未だ不明であるからである。OMP2タンパク質はクラミジア特異的であり、そしていかなる関連する抗原性の変化も生じるようではないので、このタンパク質は、本研究において、クラミジア感染のおそらく最良のマーカーと見なされ得る。

【0049】

観察された次の最も頻出したスポットは、以下に対応する：

- ・スポット2-GroEL様 (hsp60) タンパク質 (15/17の患者)
- ・スポット3-主要外膜タンパク質MOMP (13/17の患者)
- ・スポット4-DnaK様 (hsp70) タンパク質 (11/17の患者)。

【0050】

これら公知の免疫原との反応性は、本研究において使用されるヒト血清の質を示す、内部コントロールとして見なされ得る。しかし、これらのプロットに対する p g p 3 の反応性の欠如が、顕著である。なぜなら、これらの血清すべては、p g p 3 の精製された可溶性形態を用いる確認 E L I S A アッセイにおいて、陽性であることが見出されているからである。このことは、ヒト感染における p g p 3 に対する抗体応答が、主に、正確にフォールディングされたタンパク質構造においてのみ利用可能なエピトープに対して生じ、この応答がこれらの実験において失われたことを、示唆する。

【0051】

以下のタンパク質に対する患者の免疫反応もまた、検出された[参考文献12参照]：

- ・スポット10-タンパク質伸長因子 E F - T u (8 / 1 7)
- ・スポット19-リボソームタンパク質 S 1 (5 / 1 7)
- ・スポット12-リボソームタンパク質 L 7 / L 1 2 (7 / 1 7) 。

【0052】

これら公知のタンパク質に加えて、いくつかの新規な免疫反応性タンパク質が、11/17~1/17の範囲の頻度で検出された。これらのタンパク質のMWおよびpIの特徴を、表IIに示す。さらに、少数の場合において、さらなる分析を、データベースの相同性検索で補足した、N末端アミノ酸配列決定によって実施した。

【0053】

(スポットの小配列決定)

2D地図を上記のように調製した。参考文献20におけるように、1泳動当たり1mgの総EBタンパク質から開始し、続いて、ポリビニリデンジフルオリド膜(BioRad PVDF膜、20×20cm、孔径0.2μm)上にプロットした。このプロットを、50%水性メタノール中にある0.1%(w/v)Coomassie Brilliant Blue R250を用いて5分間染色し、そして40%メタノール、10%酢酸中で脱色した。膜を37℃で乾燥し、そしてさらなる分析のために-20℃で保存した。選択したタンパク質スポットを切り出し、そしてフェニルチオヒダントイン-アミノ酸分析機モデル120Aおよびコントロール/Data Moduleモデル900A(Applied Biosystems Inc.)とオンライン接続した、自動Protein/Peptide Sequencer(mod 470A; Applied Biosystems Inc.)を使用して、エドマン分解によるアミノ酸配列決定に供した。同様のプロットから代表的には3個または4個の等価なスポットを、そのスポット中のタンパク質の推定相対モル量に従って、使用した。

【0054】

この配列決定の結果を、16頁の表IIIに示す。

【0055】

(配列のコンピューター分析)

N末端配列のデータを使用して、タンパク質の類似性についてのデータベース検索を、NCBI[http://www.ncbi.nlm.nih.gov]から入手可能なBLASTプログラム[21]およびGCGソフトウェア(Wisconsin Package Version 9.0)のプログラム[22]を使用して、実施した。理論上のpI値およびMW値を、ExPASyインターネットサーバー[http://www.expasy.ch]から入手可能なpI/MWコンピュータープログラムによって算出した。

【0056】

これら通常のデータベースに加えて、Chlamydia Genome Project[http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231]により提供される、C. trachomatis D/UW-3/Cx株のゲノム配列決定データを検索した。この研究はC. trachomatis血液型亜型L2株(リンパ肉芽腫次亜種)(これは、異なる病原性表現型を有する)を使用した。いくつかのタンパク質配列が、この血液型亜型D遺伝子に確実に関連し得る。

【0057】

N末端のデータを用いたこれらの検索によって、7つの免疫反応性スポットを（上記の7つに加えて）以下の公知の配列に関連付けることが可能になった：

- ・スポット15：ペリプラズムペプチダーゼであると推測される（この血液型Dのゲノムデータベースにおいて、現在はh t r Aと注釈が付いている）。
- ・スポット18および46：外膜タンパク質であると推測される（このゲノムデータベースにおいて、現在はo m p Bと注釈が付いている）。
- ・スポット21：そのアミノ酸配列は、以前に記載されたどのタンパク質とも一致しないが、E F-T uからの内部配列に対する相同性を示す。このタンパク質は、E F-T uの分解産物またはプロセシング産物、あるいはその変異体であり得る。
- ・スポット24：RNAポリメラーゼαサブユニット（r p o A）。
- ・スポット25：細菌のロイシンペプチダーゼに対して相同（このゲノムデータベースにおいて、現在はp e p Aと注釈が付いている）。
- ・スポット38：GTP結合タンパク質であると推測される（現在は、y c h Fと注釈が付いている）。

10

【0058】

スポット26、31および33のN末端配列は、公開された血液型D配列を含む、データベースのどの配列にも一致しない。

【0059】

表I Vは、いくつかの免疫反応性抗原の同定（いくつかは推定）の要旨を示す。これらは、以前の2Dマッピングデータとの比較、または上記で得られたN末端配列決定データとの相同性検索のいずれかによって、得られた。

20

【0060】

（特に興味深いタンパク質）

これらのイムノプロットから同定された以下のタンパク質が、特に興味深い：

（スポット24）

このスポットは、そのMW／p Iの位置およびそのN末端配列に基づいて、C. t r a c h o m a t i s RNAポリメラーゼ（g i 6 2 0 0 2 9）のα鎖であると考えられる。このRNA Pα鎖は、以前に記載されている[23]が、クラミジア免疫原としては、未だ報告されていない。4人の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、これが、クラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを示す。C l a m y d i aの細胞内に寄生する性質は、この性質が一般的に、抗体媒介性免疫応答を回避し得ることを意味するが、上記で示される抗体の反応性は、その免疫系が、自然感染の間にこれらのタンパク質に遭遇することを示し、そして抗体の形成はまた、例えば、T細胞媒介性免疫応答を惹起することを補助し得る。

30

【0061】

（スポット18および46）

スポット18および46は、血清型Dのゲノム中のo m p B遺伝子（推定外膜タンパク質をコードすると注釈される）に相同であるようである。N末端配列ならびにp I値およびMW値（推定理論値5. 06／34. 5に対して、少なくともスポット18については、5. 08／34. 09）は、推定N末端シグナルペプチドの切断後の、o m p B遺伝子産物の予想特性と一致する。

40

【0062】

スポット46および18の両方が、クラミジア外膜複合体の精製調製物の2D電気泳動マップ中に存在することもまた、見出された。これもまた、スポット18および46が血清型Dのo m p B遺伝子のホモログを示すという考えを支持する。

【0063】

このタンパク質が2つの異なる電気泳動種として現れる理由を調べなかったが、この型のスポットのずれは、通常、アミノ酸配列変化および／またはいくつかのアミノ酸残基の真の誘導体化もしくは人為的な誘導体化のいずれかに起因した、アミノ酸組成の変化と関

50

連する。

【0064】

5名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質が、クラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。

【0065】

(スポット25)

このスポットは、そのMW/pI位置およびそのN末端配列(両方を、公開された血液型垂型Dの配列p e p Aと比較)に基づくと、アミノペプチダーゼであると考えられる。4名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質がクラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。

10

【0066】

(スポット38)

このスポットは、そのMW/pI位置およびそのN末端配列(両方を、公開された血液型垂型Dの配列y c h Fと比較)に基づくと、GTP結合タンパク質であると考えられる。2名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質がクラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。

【0067】

(スポット15)

このスポットは、そのMW/pI位置およびそのN末端配列(両方を、公開された血液型垂型Dの配列h t r Aと比較)に基づくと、ストレス誘導性プロテアーゼであると考えられる。7名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質がクラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。

20

【0068】

(スポット8)

9名の患者が、タンパク質スポット8に対する反応性を示した。このタンパク質スポットを、N末端配列決定によって特徴づけることができなかった。しかし、このタンパク質スポットは、確かに以下の「配列型(constellation type)2」アミノ酸組成(モル%)を有する:

【0069】

【数1】

30

aa	%	aa	%	aa	%	aa	%
Ala	6.5	Gly	22.5	Lys	3.7	Ser	13.7
Arg	3.5	His	0.5	Met	0.5	Thr	5.1
Asx	8.4	Ile	3.7	Phe	2.8	Tyr	2.2
Glx	12.5	Leu	6.7	Pro	3.4	Val	4.3

40

C y sおよびT r pは、この型の分析では決定されず、そしてG l u/G l nとA s p/A s nとを区別することができない。

【0070】

繰り返して試みられたにも拘わらず、N末端配列を得ることができないことは、そのN末端残基が、いくつかの形態の修飾(例えば、リボタンパク質)に起因してブロックされていることを示唆する。修飾は、しばしば、真核生物における膜結合型タンパク質に特徴的であるが、細菌種における外表面タンパク質または分泌型タンパク質に特徴的でもある(例えば、リボタンパク質[24]マイコプラズマ外膜タンパク質[25]、B. p e r t u s s i sのF H Aビルレンス因子[26]など)。

【0071】

50

(スポット12)

このスポットは、リボソームタンパク質L7/L12に起因すると考えられる。7名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質がクラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。このタンパク質は、クラミジアにおいて以前に記載されたが〔登録番号P38001〕、クラミジア免疫原であると報告されたことは一度もなかった。しかし、Brucella感染における免疫原として記載された〔27、28〕。

【0072】

(スポット19)

このスポットは、リボソームタンパク質S1に起因にすると考えられる。5名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質がクラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。このタンパク質は、クラミジアにおいて以前に記載されたが〔登録番号P38016〕、免疫原であると報告されたことは一度もなかった。

【0073】

(スポット10)

このスポットは、タンパク質合成伸長因子EF-Tuに起因すると考えられる。8名の患者が、このタンパク質に対する反応性を示した。このことは、このタンパク質がクラミジア感染の結果としてヒトにおいて免疫原性であることを実証する。クラミジアEF-Tuは、以前に記載されたが〔登録番号P26622〕、免疫原であると報告されたことは一度もなかった。

【0074】

(スポット10、12、15、19および24)

慢性感染において、免疫病理反応を誘発し得る保存された微生物抗原に対する、あり得る以前の感作の重要性を仮定すると、これらの新たな免疫反応性抗原のうちのいくつかは、細菌タンパク質の保存されたファミリーに属することは注目すべきである：4つの血清(23%)がスポット24(RNAポリメラーゼのαサブユニット)と反応した；5つ(29%)がスポット19(リボソームタンパク質S1)を認識した；8つ(47%)がスポット10(EF-Tu)を認識した；7つ(41%)がスポット15(HtrA(S2Cペプチダーゼ)ファミリーの推定ストレス誘導性プロテアーゼ)を認識した；そして7つの血清(41%)がスポット12(リボソームタンパク質L7/L12)を認識した。この研究において使用した血清の群において、12/17(76%)がこれらの5つの抗原(hsp60抗原およびhsp70抗原を含む)と反応し、そして全ての血清が1と7との間(平均3.7個)のクラミジアタンパク質(他の細菌においてホモログを有する)と反応する抗体を有した。

【0075】

クラミジア病理における免疫学的感作機構に関する役割を仮定する理論は、hsp60GroEL様抗原に関して記載される〔29〕ように、実際には、他のいくつかの共通する細菌抗原(この細菌抗原は、他の細菌感染に置いて免疫原性であり得る)に拡張されるべきである。例えば、タンパク質伸長因子EF-Tuは、Haemophilus influenzaeの感染の急性期の間に免疫原性であり、そしてL7/L12およびHtrAストレス誘導性プロテアーゼホモログの両方がBrucella感染において免疫原性である。EF-Tuの場合において、細菌細胞におけるこのタンパク質の豊富さは、免疫系によるその「注目度(visibility)」に好都合であり得る。しかし、EF-Tuが外膜およびペリプラズム細胞画分に関連すると記載され〔30〕、そしてより最近では、データにより、ペプチド伸長におけるその機能に加えて、EF-Tuがタンパク質折り畳みに関与するシャペロン活性およびストレスからの防御もまた有することが示唆される〔31〕ことに注意すべきである。L7/L12リボソームタンパク質に対する応答は特に興味を引く。なぜなら、Brucella melitensis感染において、相同なL7/L12抗原は、DTH細胞媒介応答を誘導する〔27〕からである。さ

らに、BALB/CマウスにL7/L12を用いてワクチン接種することは、B. abortusによる感染に対する防御を与えることが示された[32]。L7/L12に対する抗体がC. trachomatisに感染した患者においてかなり頻繁に存在するというこの予測外の知見は、おそらく、クラミジア誘導性疾患においてもまた、この抗原に対してさらなる注意が払われるべきであることを示唆する。

【0076】

(スポット5、6、7および9)

これらのタンパク質は、利用可能なゲノム配列といまだ全く相関付けられておらず、そして未だ配列決定されてもいないが、試験された血清におけるそれらの保有率(prevalence)(>50%)を考慮すると、明らかに興味深い。

10

【0077】

本発明は、上記で例示としてのみ記載されるにすぎず、そして本発明の範囲および趣旨内にとどまりつつ、変更が行われ得ることは理解される。

【0078】

(表I) 患者血清の要旨

第1欄における文字は、表IIに示される文字と対応する。第2欄におけるコードは、起源血清コレクションをいう。それぞれの患者に関する病理学は、子宮頸管炎(下部生殖器感染)、PIDまたは不妊(感染の次の)として広範に示される。全ての血清を、精製L2基本小体を用いるMIFアッセイによって特徴付けた。表中に示されるMIF力価は、最大で2倍希釈であり、これは、陽性シグナルを示した。「最適希釈」は、弱いスポットでのシグナルの喪失なしに最低限のバックグラウンドを与えることが見出された希釈である。

20

【0079】

【表1】

血清 ID in 表 II	起源血清 ID	病理学	MIF 力価	最適希釈
A	JO45/7931 BB	子宮頸管炎	256	1:5000
B	JO28/7935 BB	子宮頸管炎	16	1:1500
C	JO29/7936 BB	子宮頸管炎	16	1:2000
D	JO51/7997 BB	子宮頸管炎	256	1:5000
E	hs-C (Bologna)	P.I.D.	256	1:5000
F	14293 BB	P.I.D.	1024	1:10000
G	hs-B (Bologna)	P.I.D.	32	1:2000
H	JO6/7942BB	P.I.D.	256	1:5000
I	JO17/7953 BB	P.I.D.	256	1:5000
J	JO43/7989	P.I.D.	256	1:5000
K	JO20=7956 BB	P.I.D.	256	1:5000
L	JO42/7988 BB	P.I.D.	256	1:5000
M	JO41/7987 BB	P.I.D.	256	1:5000
N	JO31/7977 BB	P.I.D.	256	1:5000
O	13839 BB	P.I.D.	256	1:5000
P	JO35/7934 BB	不妊	64	1:2500
Q	JO52/7933 BB	不妊	64	1:2500

30

40

(表II) タンパク質スポットとの患者の反応性

50

【 0 0 8 0 】

【 表 2 】

試料 #	pl	MW	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	FREQ
1	5.2-5.3	89.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17
2	4.6-4.9	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
3	4.92-5.04	70.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
4	5.09	36.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11
5	6.34	46.2-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
6	6.59	46.2-50.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
7	4.98	36.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
8	6.36	37.7-39.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
9	5.44-5.64	42.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8
10	6.66	26.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8
11	4.80	15.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6
12	6.1	37.4-39.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7
13	6.24	47.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7
14	5.89	48.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7
15	6.15	46-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7
16	5.92	25.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6
17	5.08	34.09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
18	5.14-5.28	69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
19	5.44	26.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
20	5.27	40.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
21	4.81	46.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
22	4.97	34.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
23	5.32	40.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
24	5.97	47.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
25	5.68	48.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
26	6.29-6.42	124.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
27	5.39	25.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
28	5.1	28.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
29	4.8	36.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
30	5.43	40.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
31	5.2-5.37	62.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
32	6.64	25.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
33	4.79	28.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
34	4.82	29.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
35	6.55	37.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
36	5.14	40.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
37	5.23	40.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
38	4.69	45.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
39	6.89	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
40	6.39-6.55	105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
41	4.57	20.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
42	4.72	26.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
43	7.6	26.95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
44	6.9	29.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
45	5.19	33.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
46	6.99	35.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
47	6.54	35.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
48	5.44	39.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
49	5.37	41.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
50	7.59	42.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
51	8.73	49.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
52	7.98	49.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
53	7.4	50.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
54	7.4	51.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1

(表 I I I) タンパク質の N 末端配列

【 0 0 8 1 】

【表 3】

スポット #	N末端配列
10	SKETFQRNK
12	TTESLETVE
15	LAVSSGDQEVSQEDLLKE
18	XPAGNPAPFPVIP
21	AKTRTLKGDG
24	SDSSHNLNLYNK
25	VLLYSQASWDQRSKADAL
26	KAVYVQD(A/Q)E(V/D)Q
31	KDxxTNGQR
33	MSKGGQxD(Y/G)
38	XQXENGIVGL
46	MPAGNPAPFPVIP

(表 I V) 抗原の同定

「CT-D遺伝子」は、参考文献2から命名される遺伝子をいい、C. trachomatis D中のホモログタンパク質をコードするような遺伝子の名称を与える。最後の欄における理論的なpI/MW値を、実験値と比較して、CT-D遺伝子配列から計算した。

【0082】

【表 4】

スポット	スポット位置	N末端アミノ酸配列	注釈	CT-D遺伝子	予想 pI/MW
1	OMP2 cluster	-	OMP2	omcB	7.65-7.92/54.5-58.7
2	5.2-5.3/59.7	VA(D/K)NI(K/F)YNEE	GroEL 様	groEL1	5.11/58.1
3	4.6-4.9/40	LPVGN	MOMP	ompA	4.69/40.3
4	4.92-5.04/70.5	SEKRR(K/S)A(N/K/S)....	DnaK 様	dnaK	4.88/70.7
10	5.44-5.64/42.2	SKETFQRNK	EF-Tu	tufA	5.36/43.1
12	4.80/15.8	TTESLETVE	リボソームタンパク質 L7/12	rl7	5.09/13.5
15	5.89/48.4	LAVSSGDQEVSQEDLLKE	ストレス誘導プロテアーゼ	htrA	5.83/49.5
18	5.08/34.09	XPAGNPAPFPVIP	外膜タンパク質	ompB	5.06/34.5
19	5.14-5.28/69	Not determined	リボソームタンパク質 S1	rs1	5.17/63.6
21	5.27/40.5	AKTRTLKGDG	EF-Tu 関連ペプチド ?	-	-
24	5.32/40.5	SDSSHNLNLYNK	RNAP α 鎖	rpoA	5.34/41.7
25	5.97/47.6	VLLYSQASWDQRSKADAL	ペプティダゼ	pepA	5.74/54.0
26	5.68/48.6	KAVYVQD(A/Q)E(V/D)Q	未同定	-	-
31	5.43/40.4	KDxxTNGQR	未同定	-	-
33	6.64/25.4	MSKGGQxD(Y/G)	未同定	-	-
38	5.23/40.1	XQXENGIVGL	GTP-結合タンパク質	ychF	5.16/39.5
46	5.19/33.4	MPAGNPAPFPVIP	外膜タンパク質	ompB	5.06/34.5

(参考文献) (本明細書中にその全体を援用されるものの内容)

【 0 0 8 3 】

【 化 1 】

- 1 Raulston (1995) Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions. *Mol Microbiol* 15(4):607-616.
- 2 Stephens ♪ (1998) Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282:754-759.
- 3 Ward (1995) The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. *Apmis*. 103:769-96.
- 4 Moulder (1991) Interaction of *Chlamydiae* and host cells *in vitro*. *Microbiol Rev* 55(1):143-190.
- 5 Comanducci ♪ (1994) Humoral immune response to plasmid protein pgp3 in patients with *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 62(12):5491-5497.
- 6 EP-A-0499681
- 7 WO95/28487
- 8 Murdin ♪ (1993) *Infect Immun* 61:4406-4414
- 9 Cerrone ♪ (1991) Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from *Chlamydia trachomatis* and immunological reactivity of the protein. *Infect Immun* 59(1):79-90.
- 10 Raulston ♪ (1993) Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp70 family of proteins. *J. Biol. Chem.* 268:23139-23147.
- 11 Wang 林 Grayston (1970) Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am. J. Ophthalmol.* 70:367-374
- 12 Bini ♪ (1996) Mapping of *Chlamydia trachomatis* proteins by immobililine-polyacrylamide two-dimensional electrophoresis: spot identification by N-terminal sequencing and immunoblotting. *Electrophoresis* 17:185-190.
- 13 Schacter 林 Wyrick (1994) Culture and isolation of *Chlamydia trachomatis*. *Meth Enzymol* 236:377-390
- 14 Görg ♪ (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9:531-546
- 15 Hochstrasser ♪ (1988) Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173:424-435.
- 16 Oakley ♪ (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105:361-363.
- 17 Bjellqvist ♪ (1993) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14: 1357-1365

10

20

30

40

(AL) 9 続々)

- 18 Towbin り (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- 19 Magi り Chapter entitled "Immunoaffinity identification of 2-DE separated proteins" in *Methods in Molecular Biology*, 2-D Proteome analysis protocols. AJ Link (編), Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- 20 Matsudaira (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262:10035-10038.
- 21 Altschul り (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- 22 Devereux り (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12: 387-395.
- 23 Gu り (1995) *Chlamydia trachomatis* RNA polymerase alpha subunit: sequence and structural analysis. *J Bacteriol* 177:2594-2601.
- 24 Nyström り (1992) Membrane protein acylation. Preference for exogenous myristic acid or endogenous saturated chains in *Acholeplasma laidlawii*. *Eur J Biochem* 204:231-40
- 25 Jan り (1995) Acylation and immunological properties of *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. *Res Microbiol* 146:739-50
- 26 Lambert-Buisine り (1998) N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* 28:1283-93
- 27 Bachrach り (1994) *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in *Brucella*-sensitized guinea pigs. *Infect. Immun.* 62:5361-5366
- 28 Roop り (1994) Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect. Immun.* 62:1000-1007
- 29 Morrison り (1989) Chlamydial disease pathogenesis: the 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein *J.Exp.Med.* 170:1271-1283. 同様に : Morrison り (1989) Chlamydial disease pathogenesis: ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57-kD protein. *J.Exp.Med.* 169:663-675
- 30 Marques り (1998) Mapping and Identification of the Major Cell Wall-Associated Components of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 66: 2625-2631.
- 31 Caldas *et al.* (1998) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J Biol. Chem.* 273:11478-82
- 32 Oliveira *et al.* Splitter (1996) Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine* 14:959-62

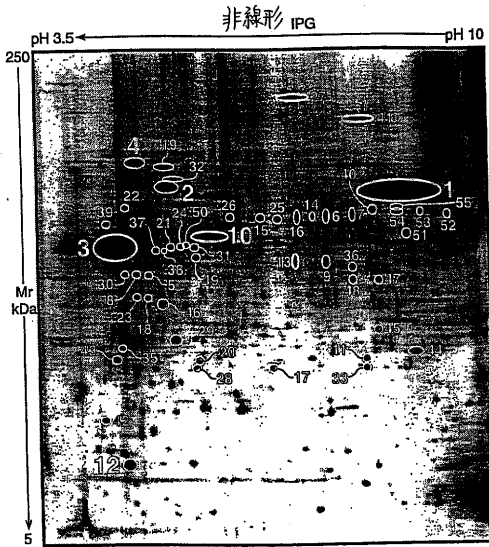
10

20

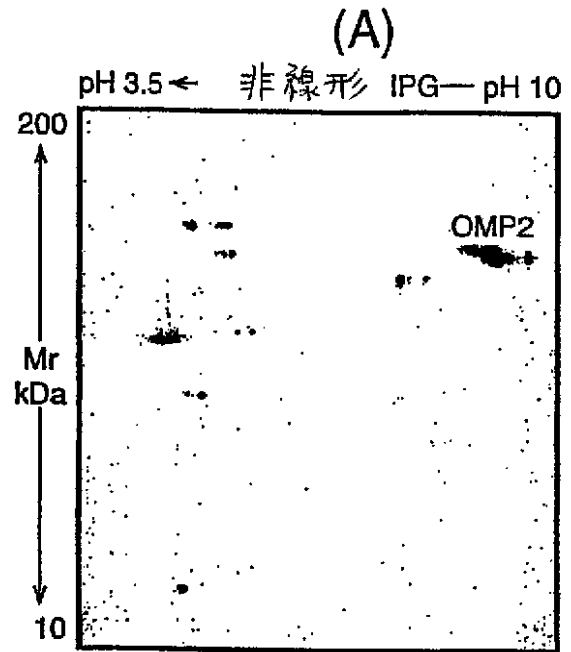
30

40

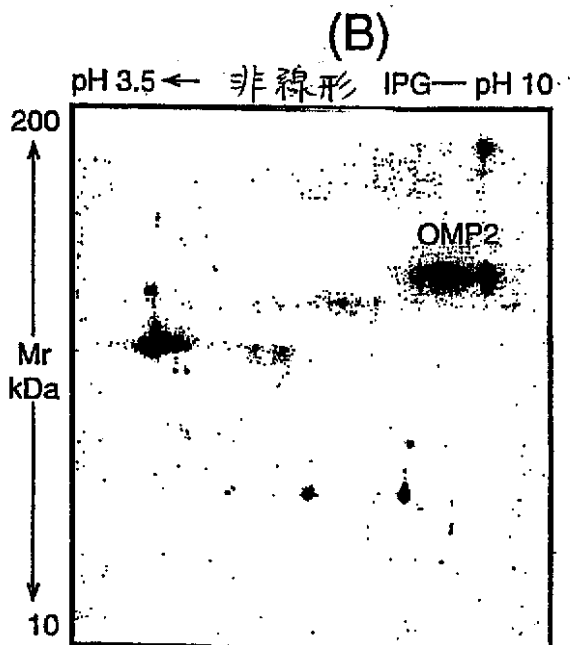
【図 1】



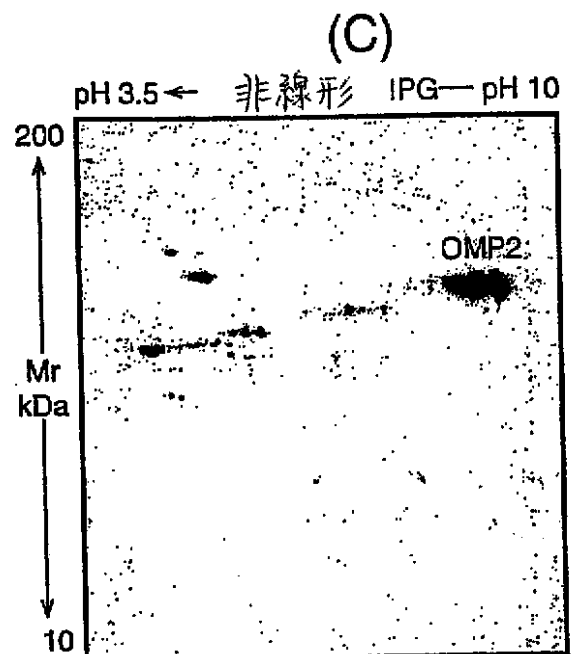
【図 2 A】



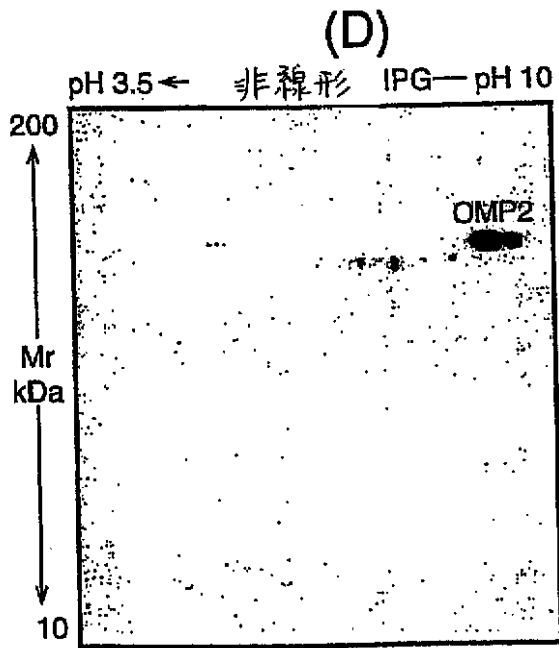
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>		<i>4 H 0 4 5</i>		
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>			
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>			
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>37/02</i>				
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>D</i>			
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>N</i>			
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>				
<i>A 6 1 P</i>	<i>31/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/00</i>	<i>H</i>			
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/569</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>31/04</i>				
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/569</i>	<i>F</i>			
			<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>M</i>			
			<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>D</i>			

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA48 CA01 HA01 HA11
 4B064 AG27 AG31 CA19 CC24 CE14 DA01 DA15
 4B065 AA01Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA25 CA45 CA46
 4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13 BA05 CA04 DA41 NA14 ZB351
 4C085 AA13 BB11 CC32 DD23 DD88 EE01
 4H045 AA11 BA10 CA11 DA76 DA86 EA29 EA52 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010220622A5	公开(公告)日	2011-05-12
申请号	JP2010113606	申请日	2010-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	凯龙Sochie数据数组赞助拓弥塔里首发		
申请(专利权)人(译)	凯龙Sochieta一个Resuonsabirita Rimitata		
[标]发明人	ジウリオラッティ		
发明人	ジウリオ ラッティ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/295 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K39/00 A61P31/04 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53 A61P31/04 A61P31/10 C07K14/295 C07K16/125 G01N33/56927 G01N2333/295 A61K39/118		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/295 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61K39/00.H A61P31/04 G01N33/569.F G01N33/53.M G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA48 4B024/CA01 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE14 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA05 4C084/CA04 4C084/DA41 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/DD23 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	1998028000 1998-12-18 GB		
其他公开文献	JP2010220622A		

摘要(译)

甲以提供适当的抗原和免疫原用于疫苗开发的使用，识别哪个引发自然感染过程中的免疫应答，本发明的一个目的衣原体抗原。 解决方案：本发明涉及源自沙眼衣原体的抗原蛋白。特别地，这涉及由源自慢性感染的患者血清的抗体或血清转化患者的血清识别的抗原。上述问题是在人类感染的结果的免疫原性，通过沙眼衣原体编码的蛋白质，通过使用解析的二维电泳图谱印迹鉴定。已经将几种已知的免疫原鉴定为先前未被称为免疫原的蛋白质和先前未报道为表达基因产物的蛋白质。 【选择图】无