

(19)日本国特許庁（J P）

(12)公表特許公報（A）

(11)特許出願公表番号
特表2003－506011
(P2003－506011A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] （参考）
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/165	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/165		31/43	4 B 0 2 4
31/43		31/496	4 B 0 5 0
31/496		31/545	4 B 0 6 3
31/545		31/7036	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求（全126数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000－611940(P2000－611940)	(71)出願人	ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァー シティー オブ カリフォルニア THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CAL I F O R N I A アメリカ合衆国 94607 カリフォルニア州 オークランド フランクリン ストリー ト 1111 トゥエルヴス フロアー
(86)(22)出願日	平成12年4月13日(2000.4.13)	(72)発明者	シュニーウィンド，オラフ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9002 4 ロサンゼルス ストラスモア ドライヴ ナンバー422 11050
(85)翻訳文提出日	平成13年10月15日(2001.10.15)	(74)代理人	弁理士 柳田 征史（外1名） 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/US00/10198		
(87)国際公開番号	W000/062804		
(87)国際公開日	平成12年10月26日(2000.10.26)		
(31)優先権主張番号	09/292,437		
(32)優先日	平成11年4月15日(1999.4.15)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 ソーターゼ遺伝子の同定

(57)【要約】

本発明は、ソーターゼトランスアミダーゼと称されるグラム陽性菌由来の酵素、その酵素をコードする核酸、およびその酵素の使用方法に関する。本酵素はソーティングシグナルを有するタンパク質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼし、そのソーティングシグナルはLPX₃X₄Gのモチーフを有し、そのLPX₃X₄Gモチーフの4番目と5番目の残基の間の切断によってソーティングが生じる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素であって、該酵素がソーティングシグナルを有するタンパク質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼし、該ソーティングシグナルがLPX₃X₄Gモチーフを有し、該LPX₃X₄Gモチーフの第4と第5残基の間での切断によってソーティングが生じることを特徴とする酵素。

【請求項2】 前記グラム陽性菌が、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・ソブリヌス、枯草菌、エンテロコッカス・ファエカリス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・ニューモニエおよびリステリア・モノサイトゲネスより成る群から選択される種であることを特徴とする請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項3】 前記グラム陽性菌が、黄色ブドウ球菌であることを特徴とする請求項2記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項4】 約23,539ダルトンの分子量を有することを特徴とする請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項5】 前記ソーティングシグナルが：（2）前記モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに（3）該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する荷電末端領域：をさらに含み、ここで、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基は前記モチーフから31-33残基の位置にあり、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつX₄はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択されることを特徴とする請求項4記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項6】 請求項1記載の酵素であって、

【化1】

(1) M-K-K-W-T-N-R-L-M-T-I-A-G-V-V-L-I-L-V-A-A-Y-L-F-A-K-P-H-I-D-N-Y-L-H-D-K-D-K-D-E-K-I-E-Q-Y-D-K-N-V-K-E-Q-A-S-K-D-K-K-Q-Q-A-K-P-Q-I-P-K-D-K-S-K-V-A-G-Y-I-E-I-P-D-A-D-I-K-E-P-V-Y-P-G-P-A-T-P-E-Q-L-N-R-G-V-S-F-A-E-E-N-E-S-L-D-D-Q-N-I-S-I-A-G-H-T-F-I-D-R-P-N-Y-Q-F-T-N-L-K-A-A-K-K-G-S-M-V-Y-F-K-V-G-N-E-T-R-K-Y-K-M-T-S-I-R-D-V-K-P-T-D-V-G-V-L-D-E-Q-K-G-K-D-K-Q-L-T-L-I-T-C-D-D-Y-N-E-K-T-G-V-W-E-K-R-K-I-F-V-A-T-E-V-K (配列番号：3)

および(2)配列番号3の配列に、1つ以上の保存的アミノ酸置換を加えた配列：より成る群から選択されたアミノ酸配列を包含し、該保存的アミノ酸置換が以下の：(1) イソロイシン、ロイシンおよびバリンの間での置換；(2) アスパラギン酸とグルタミン酸間での置換；(3) グルタミンとアスパラギン間での置換；ならびに(4) セリンとトレオニン間での置換：の何れかであることを特徴とする請求項1記載の酵素。

【請求項7】 前記アミノ酸配列が、

【化2】

M-K-K-W-T-N-R-L-M-T-I-A-G-V-V-L-I-L-V-A-A-Y-L-F-A-K-P-H-I-D-N-Y-L-H-D-K-D-K-D-E-K-I-E-Q-Y-D-K-N-V-K-E-Q-A-S-K-D-K-K-Q-Q-A-K-P-Q-I-P-K-D-K-S-K-V-A-G-Y-I-E-I-P-D-A-D-I-K-E-P-V-Y-P-G-P-A-T-P-E-Q-L-N-R-G-V-S-F-A-E-E-N-E-S-L-D-D-Q-N-I-S-I-A-G-H-T-F-I-D-R-P-N-Y-Q-F-T-N-L-K-A-A-K-K-G-S-M-V-Y-F-K-V-G-N-E-T-R-K-Y-K-M-T-S-I-R-D-V-K-P-T-D-V-G-V-L-D-E-Q-K-G-K-D-K-Q-L-T-L-I-T-C-D-D-Y-N-E-K-T-G-V-W-E-K-R-K-I-F-V-A-T-E-V-K (配列番号：3)

であることを特徴とする請求項6記載の酵素。

【請求項8】 請求項6記載の酵素をコードする核酸配列。

【請求項9】 請求項7記載の酵素をコードする核酸配列。

【請求項10】 グラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼトランスアミダーゼ酵素をコードする核酸配列であって、該酵素が、約23,539ダルトンの分子量を有し、かつソーティングシグナルを有するタンパク質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼし、ここで該ソーティングシグナルが：(1) LPX₃X₄Gモチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的

疎水性領域；ならびに（３）該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも２つの陽電荷残基を有する領域：を含み、該２つの陽電荷残基の内、少なくとも１つはアルギニンであり、該２つの陽電荷残基はそのモチーフから３１－３３残基の位置にあり、 X_3 は２０の天然Ｌアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され、 LPX_3X_4G モチーフの第４と第５残基の間での切断によってソーティングが生じ、該核酸配列が：

（１）

【化３】

ATGAAAAAATGGACAAATCGATTAATGACAATCGCTGGTGTGGTACTTATCCTAG
TGGCAGCATATTTGTTTGCTAAACCACATATCGATAATTATCTTCACGATAAAGA
TAAAGATGAAAAGATTGAACAATATGATAAAAATGTAAAAGAACAGGCGAGTA
AAGATAAAAAGCAGCAAGCTAAACCTCAAATTCCGAAAGATAAATCGAAAGTGG
CAGGCTATATTGAAATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACC
AGCAACACCTGAACAATTAAATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATGAATC
ACTAGATGATCAAAATATTTCAATTGCAGGACACACTTTCATTGACCGTCCGAAC
TATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAG
TTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGTATAAGAGATGTTAAGCCTA
CAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAAGATAAACAATTAACATTAA
TACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTTGGGAAAAACGTAAAATCTT
TGTAAGCTACAGAAGTCAAATAA（配列番号：２）

または（２）配列番号２の配列に相補的である配列：より成る群から選択される配列を包含することを特徴とする核酸配列。

【請求項１１】 グラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素をコードする核酸配列であって、該酵素が約２３，５３９ダルトンの分子量を有し、かつソーティングシグナルを有するタンパク質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼし、ここで、該ソーティングシグナルが：（１） LPX_3X_4G モチーフ；（２）該モチーフのカルボキシル側の少なくとも３１アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに（３）該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも２つの陽電荷残基を有する領域：を含み、該２つの陽電荷残基の内、少なくとも１つはアルギニンであり、該２つの陽電荷残基はそのモチーフから３１－３３残

基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され、 LPX_3X_4G モチーフの第4と第5残基の間での切断によってソーティングが生じ、該核酸配列が：

(1)

【化4】

ATGAAAAAATGGACAAATCGATTAATGACAATCGCTGGTGTGGTACTTATCCTAG
TGGCAGCATATTTGTTTGCTAAACCACATATCGATAATTATCTTCACGATAAAGA
TAAAGATGAAAAGATTGAACAATATGATAAAAAATGTAAAAGAACAGGCGAGTA
AAGATAAAAAGCAGCAAGCTAAACCTCAAATTCCGAAAGATAAATCGAAAGTGG
CAGGCTATATTGAAATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACC
AGCAACACCTGAACAATTAAATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATGAATC
ACTAGATGATCAAAATATTTCAATTGCAGGACACACTTTCATTGACCGTCCGAAC
TATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAG
TTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGTATAAGAGATGTTAAGCCTA
CAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAAGATAAACAATTAACATTAA
TTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTTGGGAAAAACGTAAAATCTT
TGTAGCTACAGAAGTCAAATAA (配列番号：2)

または(2)約15%以下の不一致で配列番号2の配列に相補的である配列：より成る群から選択される配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする核酸配列。

【請求項12】 前記不一致が約5%以下であることを特徴とする請求項1記載の核酸配列。

【請求項13】 前記不一致が約2%以下であることを特徴とする請求項1記載の核酸配列。

【請求項14】 核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制御配列に作動可能に結合した請求項8記載の核酸配列を包含するベクター。

【請求項15】 核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制御配列に作動可能に結合した請求項9記載の核酸配列を包含するベクター。

【請求項16】 核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制御配列に作動可能に結合した請求項10記載の核酸配列を包含するベクター。

【請求項17】 核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制

御配列に作動可能に結合した請求項11記載の核酸配列を包含するベクター。

【請求項18】 請求項14記載のベクターでトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項19】 請求項15記載のベクターでトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項20】 請求項16記載のベクターでトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項21】 請求項17記載のベクターでトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項22】 実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する方法であって：

(a) 宿主細胞がコードされたソーターゼートランスアミダーゼ酵素を発現するような条件下において請求項18記載の宿主細胞を培養し；さらに

(b) 発現された酵素を精製して、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項23】 実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する方法であって：

(a) 宿主細胞がコードされたソーターゼートランスアミダーゼ酵素を発現するような条件下において請求項19記載の宿主細胞を培養し；さらに

(b) 発現された酵素を精製して、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項24】 実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する方法であって：

(a) 宿主細胞がコードされたソーターゼートランスアミダーゼ酵素を発現するような条件下において請求項20記載の宿主細胞を培養し；さらに

(b) 発現された酵素を精製して、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項25】 実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する方法であって：

(a) 宿主細胞がコードされたソーターゼートランスアミダーゼ酵素を発現するような条件下において請求項21記載の宿主細胞を培養し；さらに

(b) 発現された酵素を精製して、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項26】 請求項22記載の方法によって作成された実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項27】 請求項23記載の方法によって作成された実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項28】 請求項24記載の方法によって作成された実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項29】 請求項25記載の方法によって作成された実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素。

【請求項30】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項31】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項3記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提

供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項32】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項26記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項33】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項27記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項34】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項28記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項35】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) 請求項29記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項36】 抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法であって：

(a) グラム陽性菌由来のソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性画分を提供し；

(b) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(c) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項37】 前記ソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性画分が黄

色ブドウ球菌由来の特定画分であることを特徴とする請求項36記載の方法。

【請求項38】 前記ソーターゼートランスアミダーゼ酵素の測定法が、親和性樹脂との相互作用による、該酵素の基質である可溶性ペプチドの捕獲をモニターすることによって成されることを特徴とする請求項36記載の方法。

【請求項39】 前記可溶性ペプチドが6以上のヒスチジン残基から成る配列を包含し、かつ前記親和性樹脂がニッケルを含有することを特徴とする請求項38記載の方法。

【請求項40】 前記可溶性ペプチドがグルタチオンS-トランスフェラーゼの活性部位を包含し、かつ前記親和性樹脂がグルタチオンを含有することを特徴とする請求項38記載の方法。

【請求項41】 前記可溶性ペプチドがストレプトアビジンの活性部位を包含し、かつ前記親和性樹脂がビオチンを含有することを特徴とする請求項38記載の方法。

【請求項42】 前記可溶性ペプチドがマルトース結合タンパク質の活性部位を包含し、かつ前記親和性樹脂がアミロースを含有することを特徴とする請求項38記載の方法。

【請求項43】 請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体。

【請求項44】 請求項3記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体。

【請求項45】 請求項26記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体。

【請求項46】 請求項27記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体。

【請求項47】 請求項28記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体。

【請求項48】 請求項29記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体。

【請求項49】 ヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸

長されている請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子であって、該ヒスチジン残基の数が、カルボキシル末端に付加されたヒスチジン残基を介してニッケルーセファロースカラムに該タンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数であることを特徴とするタンパク質分子。

【請求項50】 ヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されている請求項3記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子であって、該ヒスチジン残基の数が、カルボキシル末端に付加されたヒスチジン残基を介してニッケルーセファロースカラムに該タンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数であることを特徴とするタンパク質分子。

【請求項51】 ヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されている請求項26記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子であって、該ヒスチジン残基の数が、ニッケルーセファロースカラムに該タンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数であることを特徴とするタンパク質分子。

【請求項52】 ヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されている請求項27記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子であって、該ヒスチジン残基の数が、ニッケルーセファロースカラムに該タンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数であることを特徴とするタンパク質分子。

【請求項53】 ヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されている請求項28記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子であって、該ヒスチジン残基の数が、ニッケルーセファロースカラムに該タンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数であることを特徴とするタンパク質分子。

【請求項54】 ヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されている請求項29記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子であって、該ヒスチジン残基の数が、ニッケルー

セファロースカラムに該タンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数であることを特徴とするタンパク質分子。

【請求項55】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX₃X₄Gモチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつX₄はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現ポリペプチド；(ii) 請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンに含有するグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(c) 前記ソーティングシグナルのLPX₃X₄Gモチーフ内でポリペプチドを切断しかつ該切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼに触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上に該ポリペプチドを提示させる：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項56】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX₃X₄Gモチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基

の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現ポリペプチド；(ii) 請求項3記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンをも有するグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(c) 前記ソーティングシグナルのLP X_3X_4 Gモチーフ内でポリペプチドを切断し、かつ該切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼに触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上に該ポリペプチドを提示させる；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項57】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルをも有するポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LP X_3X_4 Gモチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基をも有する領域：をも有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現ポリペプチド；(ii) 請求項26記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンをも有するグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(c) 前記ソーティングシグナルのLP X_3X_4 Gモチーフ内でポリペプチドを切断し、かつ該切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼに触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上に該ポリペプチドを提示させる；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項58】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現ポリペプチド；(ii) 請求項27記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンに有するグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(c) 前記ソーティングシグナルの LPX_3X_4G モチーフ内でポリペプチドを切断しかつ該切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼに触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上に該ポリペプチドを提示させる：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項59】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニ

ン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現ポリペプチド；(ii) 請求項28記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(c) 前記ソーティングシグナルのLPX₃X₄Gモチーフ内でポリペプチドを切断し、かつ該切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼに触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上に該ポリペプチドを提示させる：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項60】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX₃X₄Gモチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつX₄はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現ポリペプチド；(ii) 請求項29記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(c) 前記ソーティングシグナルのLPX₃X₄Gモチーフ内でポリペプチドを切断し、かつ該切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼに触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上に該ポリペプチドを提示させる：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項61】 グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示させる方法であって：

(a) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するクローン化キメラタンパク質を作成するために、提示されるべきポリペプチドを包含するキメラタンパク質をコードする核酸断片をグラム陽性菌中にクローニングし、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するキメラタンパク質を作成するために、前記クローン化キメラタンパク質を発現するように、前記核酸断片がその中にクローン化された細菌を増殖させ；さらに

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させる；
各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項62】 LPX_3X_4G モチーフの切断によって生じた LPX_3X_4 のアミノ酸配列の共有結合によってグラム陽性菌の表面上に提示されたポリペプチドであって、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され、該ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されることを特徴とするポリペプチド。

【請求項63】 共有結合複合体であって：

(a) 請求項62記載のポリペプチド；および

(b) 該ポリペプチドに共有架橋結合した抗原またはハプテン；

を含むことを特徴とする共有結合複合体。

【請求項64】 抗原が前記ポリペプチドに共有架橋結合していることを特徴とする請求項63記載の共有結合複合体。

【請求項65】 ハプテンが前記ポリペプチドに共有架橋結合していることを特徴とする請求項63記載の共有結合複合体。

【請求項66】 動物にワクチン接種する方法であって、請求項62記載の提示されたポリペプチドで該動物を免疫にして、該提示されたポリペプチドに対する免疫反応を誘起させる工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項67】 動物にワクチン接種する方法であって、請求項63記載の共有結合複合体で該動物を免疫にして、該共有結合複合体の抗原またはハプテンに対する免疫反応を誘起させる工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項68】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現キメラタンパク質；(ii) 請求項1記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素

活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ；さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項69】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって；

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現キメラタンパク質；(ii) 請求項3記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ；さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項70】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法

であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現キメラタンパク質；(ii) 請求項26記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ；さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項71】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2

つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 該発現キメラタンパク質；(ii) 請求項27記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ；さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項72】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現キメラタンパク質；(ii) 請求項28記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグ

ナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、LPX₃X₄Gモチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ；さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする；

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項73】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって：

(a) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX₃X₄Gモチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつX₄はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) (i) 前記発現キメラタンパク質；(ii) 請求項29記載の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、LPX₃X₄Gモチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ；さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項74】 クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって：

(a) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するクローン化キメラタンパク質を作成するために、その発現についてスクリーニングすべきポリペプチドを包含するキメラタンパク質をコードする核酸断片をグラム陽性菌中にクローニングし、ここで、該ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；

(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；

(b) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するキメラタンパク質を作成するために、クローン化キメラタンパク質を発現するように、前記核酸断片がその中にクローン化された細菌を増殖させ；

(c) 前記ポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁に該ポリペプチドを共有結合させ：さらに

(d) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、該標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項75】 グラム陽性菌によって生じた細菌感染症を診断または治療する方法であって：

(a) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するタンパク質に対して、抗生物質または検出試薬を結合させて結合物を作成し、ここで、該カルボキシル末端ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され；さらに

(b) 感染症を治療または診断するために、前記結合体を細菌の細胞壁に局在化および共有架橋結合させるように、グラム陽性菌に感染した生物に該結合物を導入する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項76】 抗生物質が前記タンパク質に結合していることを特徴とする請求項75記載の方法。

【請求項77】 前記抗生物質が、ペニシリン、アンピシリン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、セファロスポリン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、パロモマイシン、 Tobromycin、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、リファンシピン、クロラムフェニコール、ノルフロキサシン、およびそれら抗生物質の誘導体より成る群から選択されることを特徴とする請求項76記載の方法。

【請求項78】 検出試薬が前記タンパク質に結合していることを特徴とする請求項75記載の方法。

【請求項79】 結合体を作成するためにカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するタンパク質に共有結合した抗生物質または検出試薬を含む結合体であって、ここで、該カルボキシル末端ソーティングシグナルが：(1) LPX_3X_4G モチーフ；(2) 該モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) 該実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、該2つの陽電荷残基

の内、少なくとも1つはアルギニンであり、該2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択されることを特徴とする結合体。

【請求項80】 抗生物質が前記タンパク質に結合していることを特徴とする請求項79記載の結合体。

【請求項81】 前記抗生物質が、ペニシリン、アンピシリン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、セファロスポリン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、パロモマイシン、 Tobromycin、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、リファンシピン、クロラムフェニコール、ノルフロキサシン、およびそれら抗生物質の誘導体より成る群から選択されることを特徴とする請求項80記載の結合体。

【請求項82】 検出試薬が前記タンパク質に結合していることを特徴とする請求項79記載の結合体。

【請求項83】 (a) 請求項79記載の結合体；および
(b) 薬剂的に許容される担体；
を含むことを特徴とする組成物。

【請求項84】 ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（配列番号34、配列番号35または配列番号36）あるいは枯草菌（配列番号8）の何れか1つ以上のアミノ酸配列と約30%以上の配列類似性を有し、かつソーターゼトランスアミダーゼ活性を有することを特徴とする実質的に純粋なタンパク質。

【請求項85】 ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（配列番号34、配列番号35または配列番号36）あるいは枯草菌（配列番号8）の何れか1つ以上のアミノ酸配列との配列類似性

が、約40%以上であることを特徴とする請求項84記載の実質的に純粋なタンパク質。

【請求項86】 ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（配列番号34、配列番号35または配列番号36）あるいは枯草菌（配列番号8）の何れか1つ以上のアミノ酸配列との配列類似性が、約50%以上であることを特徴とする請求項85記載の実質的に純粋なタンパク質。

【請求項87】 ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（配列番号34、配列番号35または配列番号36）あるいは枯草菌（配列番号8）の何れか1つ以上のアミノ酸配列と約18%以上の配列同一性を有し、かつソーターゼートランスアミダーゼ活性を有することを特徴とする実質的に純粋なタンパク質。

【請求項88】 ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（配列番号34、配列番号35または配列番号36）あるいは枯草菌（配列番号8）の何れか1つ以上のアミノ酸配列との配列同一性が、約20%以上であることを特徴とする請求項87記載の実質的に純粋なタンパク質。

【請求項89】 ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（配列番号34、配列番号35または配列番号36）あるいは枯草菌（配列番号8）の何れか1つ以上のアミノ酸配列との配列同一性が、約30%以上であることを特徴とする請求項88記載の実質的に純粋なタン

パク質

【請求項90】 請求項84記載の実質的に純粋なタンパク質をコードする核酸配列。

【請求項91】 核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制御配列に作動可能に結合した請求項90記載の核酸配列を包含するベクター。

【請求項92】 請求項91記載のベクターでトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項93】 ソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する実質的に純粋なタンパク質を作成する方法であって：

(a) 宿主細胞がソーターゼートランスアミダーゼ活性を有するタンパク質を発現するような条件下において請求項92記載の宿主細胞を培養し；さらに

(b) 発現されたタンパク質を精製して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する実質的に純粋なタンパク質を作成する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項94】 請求項87記載の実質的に純粋なタンパク質をコードする核酸配列。

【請求項95】 核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制御配列に作動可能に結合した請求項94記載の核酸配列を包含するベクター。

【請求項96】 請求項95記載のベクターでトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項97】 ソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する実質的に純粋なタンパク質を作成する方法であって：

(a) 宿主細胞がソーターゼートランスアミダーゼ活性を有するタンパク質を発現するような条件下において請求項96記載の宿主細胞を培養し；さらに

(b) 発現されたタンパク質を精製して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する実質的に純粋なタンパク質を作成する：

各工程を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**政府の権利

本発明は、国立衛生研究所から交付された補助金第A I 3 9 9 8 7号による政府の援助によってなされた。従って、政府は、本発明に関して特定の権利を有する。

【0002】発明の背景

本発明は、ソーターゼートランスアミダーゼ(sortase-transamidase)と称されるグラム陽性菌由来の酵素、その酵素をコードする核酸、およびその酵素の使用方法に関する。

【0003】

グラム陽性菌によって生じるヒト感染症は、近年の多剤耐性菌株の劇的な増加のため、医療的難題をもたらしている。ヒトにおいて重大なまたは致命的な感染症を生じさせ得るグラム陽性菌として、ブドウ球菌、連鎖球菌、エンテロкокカス、肺炎球菌、桿菌、アクチノマイセス、マイコバクテリウムおよびリステリア菌等が挙げられる。それら病原菌によって生じる感染症は、免疫的に易感染性の患者において得に重篤でありかつ治療が困難である。そのような患者として、A I D Sを生じさせるウィルスであるヒト免疫不全ウィルス(H I V)に感染した患者、ならびに癌または自己免疫性疾患の治療のために免疫抑制剤を投与されている患者が挙げられる。特に、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(結核菌)、マイコバクテリウム・ボビィス(ウシ型結核菌)、マイコバクテリウム・アビウムおよびマイコバクテリウム・イントラセルラーレ等の種々のマイコバクテリウム種によって生じる感染症は、しばしば、A I D S患者における病気の原因となる。

【0004】

従って、そのような病原菌を制御すべきであれば、細菌化学療法のための新たな標的部位が必要であることは明らかである。

【0005】

そのような病原菌および多くのグラム陽性菌の独自の特性は、細胞壁に固着されたタンパク質の表面提示(surface display)である。実際、多くのそれら分子は、感染しやすい宿主における病原性等の本質的な細胞機能に参与していることが分かっている。従って、その固着過程(anchoring process)の可能な破壊は、そのような疾患を生じさせる要素に対する効果的な治療と成るであろう。

【0006】

グラム陽性菌における細胞壁への表面分子の固着は、いくつかのまだ特徴付けられていない細胞機構による、保存された切断／固着部位の認識で終わる、保存された経路を含むことが示されている。その最終的な配置が細胞壁である分子は、その生物の単細胞膜を超えて常に転位しなければならない。その転位は、タンパク質が固着した全ての細胞壁において、I型シグナルペプチダーゼによるアミノ末端シグナルペプチドの切断を含む十分研究された第二の経路によって仲介されている。細胞質からの分子の転位において、細胞外においてそのタンパク質を固着のための基質として認識する機構が存在しなければならない。その工程は、LPXTG（配列番号1）のような高度に保存されたモチーフ（Xは20の天然L-アミノ酸の何れであっても差し支えなく、一連の疎水性残基、および最後に陽電荷残基の配列が続く）から成る、カルボキシル末端に位置する細胞壁ソーティングシグナルを含むことが以前示されている。従って、アミノ末端が修飾されかつうまく分泌されると、前記カルボキシル末端配列を有するペプチドが、固着機構によって処理される基質として現れる。その際、トレオニン残基の後でのソーティングシグナルの切断が、細胞壁におけるペンタグリシン架橋のフリーアミノ基に対する本ペプチドの残り部分の共有結合と連動して生じる。

【0007】

成熟表面タンパク質をペプチドグルカン層に固着させるのは、そのペプチド転位反応であり、固着によってそのタンパク質分子が生物学的機能を果たし得る。従って、その反応に触媒作用を及ぼす酵素を単離および精製する必要がある。また、遺伝子組換え技術によってその酵素を作成できるように、そのような酵素をコードする遺伝子を同定する必要もある。また、ソーターゼを阻害することによって表面タンパク質の固着を妨害する化合物を同定する必要もある。

【0008】

さらには、タンパク質またはペプチドを細菌表面上に提示させる必要もある。多くの目的のため、タンパク質またはペプチドが周囲の溶液に接近しやすく、さらにそのタンパク質またはペプチドに特異的に結合するリガンドが結合できるように、タンパク質またはペプチドが細菌表面上に提示されていることが望ましい。特に、細菌表面上へのタンパク質の提示は、ワクチンの調製のため、例えば抗生物質分子または診断試薬等の分子の細胞への結合のため、モノクローナル抗体等の試薬のスクリーニングのため、ならびにクローン化タンパク質を提示させ、その後例えば抗体等の特異的試薬との反応を観察することによるクローン化タンパク質の選択のために望ましい。それを実施する1つの方法は、ファージディスプレイである(G.P. Smith, "Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion Surface," Science 228: 1315-1316 (1985))。しかしながら、ファージディスプレイは、提示されたタンパク質を糸状ファージのコートタンパク質中に挿入し、さらにそのコートタンパク質の構造を歪めることなく、機能的ビリオンの形成をもたらして、そのタンパク質の活性を維持する必要があることから、その実用性において制限される。従って、通常、その技術は小さなペプチドおよびタンパク質にのみ制限される。

【0009】

従って、ペプチドおよびタンパク質を提示させるためのより一般的な方法が望まれている。

【0010】

発明の概要

本発明は、グラム陽性菌由来のソーターゼ-トランスアミダーゼ酵素、特に黄色ブドウ球菌の表面タンパク質ソーティング(srtA)遺伝子の産物、ならびに、得に薬剤スクリーニングおよびペプチドやタンパク質の提示の領域におけるそれらの使用方法に関する。

【0011】

本発明の1つの態様は、グラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼ-トランスアミダーゼ酵素であり、その酵素はソーティングシグナルを有するタンパク

質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼし、そのソーティングシグナルはLPX₃X₄Gのモチーフを有し、そのLPX₃X₄Gモチーフの4番目と5番目の残基の間の切断によってソーティングが生じる。通常、グラム陽性菌は、限定はされないが、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・ソブリヌス、エンテロコッカス・ファエカリス、ストレプトコッカス・ピオゲネスおよびリステリア・モノサイトゲネスより成る群から選択される種である。好ましくは、グラム陽性菌は黄色ブドウ球菌であり、より好ましくは、酵素は黄色ブドウ球菌のsrtA遺伝子の産物である。

【0012】

好ましくは、その酵素は、約23,539ダルトンの分子量を有し、そのソーティングシグナルは：(2)前記モチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；および(3)その実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する荷電末端領域：を更に含み、その2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、その2つの陽電荷残基は前記モチーフから31-33残基の位置にあり、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつX₄はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択される。

【0013】

好ましくは、その酵素は以下のアミノ酸配列：

【化5】

(1) M-K-K-W-T-N-R-L-M-T-I-A-G-V-V-L-I-L-V-A-A-Y-L-F-A-K-P-H-I-D-N-Y-L-H-D-K-D-K-D-E-K-I-E-Q-Y-D-K-N-V-K-E-Q-A-S-K-D-K-K-Q-Q-A-K-P-Q-I-P-K-D-K-S-K-V-A-G-Y-I-E-I-P-D-A-D-I-K-E-P-V-Y-P-G-P-A-T-P-E-Q-L-N-R-G-V-S-F-A-E-E-N-E-S-L-D-D-Q-N-I-S-I-A-G-H-T-F-I-D-R-P-N-Y-Q-F-T-N-L-K-A-A-K-K-G-S-M-V-Y-F-K-V-G-N-E-T-R-K-Y-K-M-T-S-I-R-D-V-K-P-T-D-V-G-V-L-D-E-Q-K-G-K-D-K-Q-L-T-L-I-T-C-D-D-Y-N-E-K-T-G-V-W-E-K-R-K-I-F-V-A-T-E-V-K (配列番号：3)

および(2)配列番号3の配列に1つ以上の保存的アミノ酸置換を加えた配列：より成る群から選択される配列を含み、ここで、保存的アミノ酸置換は、以下の：(1)イソロイシン、ロイシンおよびバリンの間での置換；(2)アスパラギ

ン酸とグルタミン酸間での置換；（３）グルタミンとアスパラギン間での置換；
ならびに（４）セリンとトレオニン間での置換：の何れかである。

【0014】

本発明の別の態様は、前記酵素をコードする核酸配列である。１つの選択として、その核酸配列は以下の配列：

【化６】

```
ATGAAAAAATGGACAAATCGATTAATGACAATCGCTGGTGTGGTACTTATCCTAG
TGGCAGCATATTTGTTTGCTAAACCACATATCGATAATTATCTTCACGATAAAGA
TAAAGATGAAAAGATTGAACAATATGATAAAAATGTAAAAGAACAGGCGAGTA
AAGATAAAAAGCAGCAAGCTAAACCTCAAATTCCGAAAGATAAATCGAAAGTGG
CAGGCTATATTGAAATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACC
AGCAACACCTGAACAATTAAATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATGAATC
ACTAGATGATCAAAATATTTCAATTGCAGGACACACTTTCATTGACCGTCCGAAC
TATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAG
TTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGTATAAGAGATGTTAAGCCTA
CAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAAGATAAACAATTAACATTAA
T TACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTTGGGAAAAACGTAAAATCTT
TG TAGCTACAGAAGTCAAATAA（配列番号：２）
```

および（２）配列番号２の配列に相補的である配列より成る群から選択された配列を含む。別の選択において、その核酸配列は、配列番号２の配列または約１５％以下の不一致で配列番号２の配列に相補的である配列と、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズする配列を含んでいて差し支えない。好ましくは、不一致の割合は約５％未満であり、より好ましくは、不一致の割合は２％未満である。

【0015】

本発明の更に別の態様は、核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも１つの制御配列に作動可能に連結した本発明の核酸配列を包含するベクターである。

【0016】

本発明の更に別の態様は、本発明のベクターでトランスフェクトした宿主細胞

である。

【0017】

本発明の別の態様は、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する方法である。本方法は：

- (1) 宿主細胞がコードされたソーターゼートランスアミダーゼ酵素を発現するような条件下において本発明の宿主細胞を培養し；さらに
- (2) 発現された酵素を精製して、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する：

各工程を含む。

【0018】

本発明の別の態様は、抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法である。本方法は、ソーティング反応を破壊し、さらにグラム陽性菌によって生じた感染症を治療するのに有効となるであろう抗生物質をスクリーニングする手段を提供する点において重要である。

【0019】

1つの選択において、そのスクリーニング法は：

- (1) 本発明の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を提供し；
- (2) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに
- (3) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する：

各工程を含む。

【0020】

別の選択において、本スクリーニング法は：

- (1) グラム陽性菌由来のソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性画分を提供し；
- (2) 化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し；さらに

(3) 化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較して、ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物を評価する：

各工程を含む。

【0021】

ソーターゼートランスアミダーゼ活性の活性画分は、黄色ブドウ球菌または別のグラム陽性菌由来の特定の画分であって差し支えない。

【0022】

親和性樹脂との相互作用による、本酵素の基質である可溶性ペプチドの捕獲をモニターすることによって、ソーターゼートランスアミダーゼ酵素の測定法を実施することができる。1つの選択において、その可溶性ペプチドは6つ以上のヒスチジン残基を包含し、かつその親和性樹脂はニッケルを含有する。別の選択において、その可溶性ペプチドはグルタチオンS-トランスフェラーゼの活性部位を包含し、かつその親和性樹脂はグルタチオンを含有する。さらに別の選択において、その可溶性ペプチドはストレプトアビジンの活性部位を包含し、かつその親和性樹脂はビオチンを含有する。さらに別の選択において、その可溶性ペプチドはマルトース結合タンパク質の活性部位を包含し、かつその親和性樹脂はアミロースを含有する。

【0023】

本発明の更に別の態様は、本発明のソーターゼートランスアミダーゼ酵素に特異的に結合する抗体である。

【0024】

本発明の更に別の態様は、そのカルボキシル末端に付加されたヒスチジン残基を介してニッケル-セファロースカラムにそのタンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数のヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長された、本発明の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を包含するタンパク質分子である。

【0025】

本発明の更に別の態様は、ポリペプチドをグラム陽性菌の表面上に提示させる

方法であり：

(1) そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ、ここで、そのソーティングシグナルが：(a) LPX_3X_4G のモチーフ；(b) そのモチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(c) その実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する領域：を有し、その2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、その2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択される；

(2) (i) 発現ポリペプチド；(ii) 本発明の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ；および(iii) ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンに含有するグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに

(3) ソーティングシグナルの LPX_3X_4G モチーフ内でポリペプチドを切断しかつその切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼ酵素に触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上にそのポリペプチドを提示させる：

各工程を含む。

【0026】

本発明の別の提示法は：

(1) 上記のカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するクローン化キメラタンパク質を作成するために、キメラタンパク質をコードする核酸断片をグラム陽性菌中にクローニングし；

(2) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するキメラタンパク質を作成するために、クローン化キメラタンパク質を発現するように、前記核酸断片がその中にクローン化された細菌を増殖させ；さらに

(3) そのポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素

活性によって、細胞壁にポリペプチドを共有結合させる：

各工程を含む。

【0027】

本発明の別の態様は、 LPX_3X_4G モチーフの切断から生じる LPX_3X_4 のアミノ酸配列の共有結合によってグラム陽性菌の表面上に提示されたポリペプチドであって、ここで、 X_3 は20の天然Lアミノ酸の何れかであり、かつ X_4 はアラニン、セリンおよびトレオニンより成る群から選択され、そのポリペプチドはリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示される。

【0028】

本発明の別の態様は：

- (1) 提示されたポリペプチド；および
- (2) そのポリペプチドに共有架橋結合した抗原またはハプテン：

を包含する共有結合複合体である。

【0029】

本発明の更に別の態様は、動物にワクチン接種する方法であって、提示されたペプチドで動物を免疫にしてその提示されたポリペプチドに対する免疫反応を誘起させ、あるいは、共有結合複合体で免疫にして、その抗原またはハプテンに対する免疫反応を誘起させる。

【0030】

本発明の更に別の態様は、クローン化ポリペプチドの発現をスクリーニングする方法であって：

- (1) 上記のようにカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ；
- (2) (i) 発現キメラタンパク質；(ii) 本発明の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；および(iii) ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；
- (3) そのポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると

共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁にポリペプチドを共有結合させ；さらに

(4) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする：

各工程を含む。

【0031】

本発明の更に別の態様は、グラム陽性菌によって生じた細菌感染症を診断または治療する方法であって：

(1) 上記のカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するタンパク質に対して、抗生物質または検出試薬を結合させて結合物を作成し；さらに

(2) 感染症を治療または診断するために、細菌の細胞壁にその結合体を局在化および共有架橋結合させるように、グラム陽性菌に感染した生物にその結合物を導入する：

各工程を含む。

【0032】

抗生物質が用いられる場合、通常、その抗生物質は、ペニシリン、アンピシリン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、セファロスポリン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、パロモマイシン、トブロマイシン、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、リファンシピン、クロラムフェニコール、ノルフロキサシン、あるいはそれら抗生物質の誘導体である。

【0033】

同様に、本発明の別の態様は、結合体を作成するために上述したカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するタンパク質に共有結合した抗生物質または検出試薬を包含する結合体である。本発明の更に別の態様において、組成物は、薬剂的に許容される担体と共にその結合体を含む。

【0034】

本発明の別の態様は、ストレプトコッカス・ピオゲネス（配列番号4）、アクチノマイセス・ナエスルンディ（配列番号5）、エンテロコッカス・ファエカリ

ス（配列番号6）、ストレプトコッカス・ミュータンス（配列番号7）、枯草菌（配列番号8）、または肺炎連鎖球菌の推定相同タンパク質の少なくとも1つのアミノ酸配列と、最良の整列で、約50%以上一致し、かつソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する、実質的に純粋なタンパク質である。好ましくは、その一致は、最良の整列で、約60%以上であり、更に好ましくは、その一致は、最良の整列で、約70%以上である。

【0035】

図面の簡単な説明

本発明の上記のおよび他の特徴、態様および利点は、以下の説明および添付図面を参照することによって、より理解されるであろう。

【0036】

図1は、本発明のソーターゼートランスアミダーゼ酵素活性の図解である。

【0037】

図2：

(A)は、表面タンパク質前駆体SEB-SPA490-524の一次構造の図示である。

【0038】

(B)は、免疫沈降させた $[^{35}\text{S}]$ SEB-SPA490-52 P1前駆体、P2前駆体および成熟タンパク質のSDS-PAGEゲルを表す。SM317およびSM329は、野生型ブドウ球菌（WT）と比較してP2を蓄積する2つのts（温度感受性）突然変異体である。

【0039】

(C)は、SEB-SPA490-524固着のパルスチェイス分析後における、SM317、SM329および野生型ブドウ球菌での、免疫沈降させた $[^{35}\text{S}]$ SEB-SPA490-52 P1前駆体、P2前駆体および成熟タンパク質のSDS-PAGEゲルを表す。

【0040】

(D)は、トリプシン大豆寒天(tryptic soy agar)上で画線培養しさらに42℃で増殖させたブドウ球菌株OS2（WT）、SM317およびSM329を表す

。

【0041】

図3：

(A) は、SEB-MH6-CWSの一次構造および細胞壁へのその結合を図示する。

【0042】

(B) は、可溶化およびアフィニティー精製したSEB-MH6-CWSの質量分光分析プロフィール(MALDI-MS)を表す。

【0043】

(C) は、f11ヒドロラーゼで消化した、可溶化させたミュータノリシン(mutanolysin)-遊離アンカーペプチドの質量分光分析プロフィール(MALDI-MS)を表す。

【0044】

図4：

(A) は、SEB-SPA490-524固着のパルスチェイス分析後における、pGL1834 (pC194-mcs中にクローン化されたsrtA遺伝子を包含するプラスミド) でトランスフェクトしたまたはトランスフェクトしていないSM317、SM329および野生型ブドウ球菌での、免疫沈降させた $[^{35}\text{S}]$ SEB-SPA490-52 P1前駆体、P2前駆体および成熟タンパク質のSDS-PAGEゲルを表す。

【0045】

(B) は、SM317変異体(pGL1898)または野生型株OS2 (pGL1897) の何れかのDNAで形質転換させたSM317での、免疫沈降させた $[^{35}\text{S}]$ SEB-SPA490-52 P1前駆体、P2前駆体および成熟タンパク質のSDS-PAGEゲルを表す。

【0046】

(C) は、pGL1898で形質転換されさらにパルスチェイス分析を受けた黄色ブドウ球菌OS2 (野生型)、SM317およびSM329での、免疫沈降させた $[^{35}\text{S}]$ SEB-SPA490-52 P1前駆体、P2前駆体および成熟タン

パク質のSDS-PAGEゲルを表す。

【0047】

図5は、表面タンパク質固着を高めるのに十分である黄色ブドウ球菌のsrtA遺伝子のコード配列（配列番号2）のDNA断片のサイズおよび位置を表す。

[³⁵S] メチオニンで標識することによって、変異SM317のプラスミド形質転換体におけるP2前駆体の濃度を測定し、割合（%）で示す。

【0048】

図6は、srtA遺伝子のDNA配列（配列番号2）、ならびにSrtAタンパク質の推定一次構造（配列番号3）を表す。NH₂末端疎水的膜アンカー配列に囲みをしている。LPXTGモチーフにある細胞壁ソーティングシグナルの切断のための活性部位であると予測されている単一のシステインに陰影をつけている。

【0049】

図7は、SrtAタンパク質（ソーターゼ）の予測される一次構造を、データベース検索によって同定された相同配列の一次構造と比較した配列の整列を表す。単一のシステイン残基ならびにその周囲の配列が保存されていることに注意すべきである。

【0050】

図8：

(A) は、シグナルペプチダーゼ切断部位を有するNH₂末端リーダー（シグナル）ペプチド、ならびにそのCOOH末端に融合した、LPXTGモチーフ、疎水性領域（ブラックボックス）および陽電荷端部（囲んでいる+）から成る細胞壁ソーティングシグナルを包含する、Seb-Spa490-524の構造を表す。

【0051】

(B) は、培養ブドウ球菌を [³⁵S] メチオニンで1分間標識し、過剰な非標識メチオニン（チェイス）の添加によって全ての更なる取り込みを停止させるパルスチェイス実験のSDS-PAGEゲル分析を表す。P1前駆体、P2前駆体および成熟Seb-Spa490-524を評価した。

【0052】

図9：

(A) は、抗生物質を添加した場合における (1, □：偽処理；2, ◇：ペニシリン $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；3, ◆：モエノマイシン(moenomycin) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；■：バンコマイシン $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、ブドウ球菌増殖の増殖曲線を表す。

【0053】

(B) は、(A) に記載のような抗生物質の存在下または偽処理における細胞壁ソーティングの速度を測定した曲線を表す。

【0054】

図10：

(A) は、 NH_2 末端シグナル (リーダー) ペプチド、ならびに、LPXTGモチーフ、疎水性領域 (陰影で囲む) および陽電荷領域 (囲んだRRREL) から成るプロテインAのソーティングシグナルを包含する、Seb-Cws-BlaZの構造を表す。そのソーティングシグナルは、SebのCOOH末端および成熟BlaZの NH_2 末端に融合している。LPXTGでの切断は、 NH_2 末端細胞壁固着表面タンパク質 (Seb) および細菌細胞質中に位置するCOOH末端BlaZ領域の2つの断片をもたらす。

【0055】

(B) は、黄色ブドウ球菌OS2 (pSeb-Cws-BlaZ) および黄色ブドウ球菌OS2 (pSeb-CwsDLPTG-BlaZ) 細胞壁ソーティングのSDS-PAGEゲル分析を表す。矢印はプロトプラスト中において観察されるが完全細胞中においては観察されないSeb種を示す。

【0056】

図11は、ブドウ球菌ソーターゼによって触媒作用を及ぼされるペプチド転位反応のモデルを表す。

【0057】

図12：

(A) は、ヒドロキシルアミンによる表面からのタンパク質の遊離の存在下または不在下における、細胞壁への表面タンパク質固着のパルスチェイス分析のSDS-PAGEゲル分析を表す。

【0058】

(B) は、標識の5分前（前）、パルスー標識の間（パルス）または停止5分後の何れかに、培養黄色ブドウ球菌OS2にヒドロキシルアミンを添加することによる表面からのタンパク質の遊離の存在下または不在下における、細胞壁への表面タンパク質固着のパルスチェイス分析のSDS-PAGEゲル分析を表す。

【0059】

(C) は、培養黄色ブドウ球菌OS2の標識5分前に添加するヒドロキシルアミンの量を増加させると、遊離される表面タンパク質の量が増加することを示唆する棒グラフを表す。

【0060】

図13：

(A) は、ヒドロキシルアミン処理によって遊離された表面タンパク質を特徴付けるのに用いられたクーマシー染色したSDS-PAGEゲルを表す。

【0061】

(B) は、0.1M NH_2OH での処理によって黄色ブドウ球菌BB270細胞から遊離したCOOH末端アンカーペプチドのrpHPLCクロマトグラムを表す。

【0062】

図14：

(A) は、ソーティング基質DABCYL-QALPETGEE-EDANSと共に、ブドウ球菌抽出物をインキュベートすることの効果を表す棒グラフである；ペプチド切断は蛍光の増強として示される。0.2M NH_2OH の添加によってペプチド切断が増加したが、一方、公知のソーターゼ阻害剤であるメタンチオスルホネート(MTSET)の添加によってペプチド切断が阻害された。

【0063】

(B) は、ソーターゼ(SrtA)の NH_2 末端膜アンカーが6ヒスチジンタグで置換されている、SrtADNを発現している大腸菌XL-1 Blue (pHTT5)のSDS-PAGEゲル分析を表す。レーン1は非誘導培養液を含み；レーン2は1mM IPTG誘導培養液を含み；レーン3はフレンチプレス抽

出物を含み；レーン4は遠心したフレンチプレス抽出物の上清を含み；レーン5はフレンチプレス抽出物の沈殿物を含み；レーン6はNi-NTA上でのアフィニティークロマトグラフィーの還流液を含み；レーン7はカラム洗浄液を含み；レーン8-10は、0.5Mイミダゾールで溶出した1ml画分を含む。

【0064】

(C)は、ペプチド基質DABCYL-QALPETGEE-EDANSと共に、精製SrtADNをインキュベートすることの効果を表す棒グラフであり、切断は蛍光の増強としてモニターされた。メタンチオスルホネート(MTSET)または有機水銀(pHMB)の添加によって反応が阻害されたが、一方0.2M NH₂OHの添加によって反応が加速された。10mM DTTとのインキュベーションによって、MTSET処理SrtADNでの阻害を回復することができた。

【0065】

定義

この中に記載の以下に定義した用語は、指示が無い限り、以下の意味を有する。

【0066】

「核酸配列」：「核酸配列」の用語は、特定されない限りDNAとRNAの両方を含み、さらに特定されない限り二本鎖と一本鎖の両方の核酸を含む。また、例えばDNA-RNAハイブリッド等のハイブリッドも含まれる。詳細には、DNAへの言及は、DNAにおけるチミンをRNAにおけるウラシルで置換することを除いて等価な塩基配列、あるいはチミンをウラシルで置換することを除いて相補的である塩基配列（相補性はワトソン-クリック塩基対規則に基づいて特定される）のいずれかを有するRNAを含む。核酸配列への言及は、その修飾が、その核酸による例えばタンパク質のようなリガンドの結合またはワトソン-クリック塩基対合のいずれも顕著には妨害しない限り、修飾塩基をも含んでいて差し支えない。

【0067】

「不一致」：この中で用いられている「不一致」は、2つの核酸配列が核酸ハ

ハイブリダイゼーションの面において最良の整列でハイブリダイズした場合に、対にならない全ての塩基を含む。言い換えると、「不一致」の用語は、2つの配列または配列断片中に同じ数の塩基が存在するがそれら配列のいくつかの塩基がワトソン-クリック対を形成しない状況のみならず、一般的に「インデルス(indels)」と称される挿入または欠失のために2つの配列中に異なる数の塩基が存在する状況も含む。後者の状況の場合、長い方の配列中の特定塩基が対にならずかつそのハイブリッドからはみ出て輪になるであろう。

【0068】

「一致」：この中で用いられている「一致」の用語は、タンパク質配列比較の面における最善の整列で2つのアミノ酸配列を比較した場合に、対となるすべてのアミノ酸を含む。アミノ酸「配列同一性」割合(%)は、最善の整列でアミノ酸配列を照合させた場合に対となる同一アミノ酸のみを含む。アミノ酸「配列類似性」割合(%)は、最善の整列でアミノ酸配列を照合させた場合に、類似アミノ酸および同一アミノ酸の両方を含む。類似アミノ酸は、類似の物理的および／または化学的特性を共有するアミノ酸である。以下に、類似すると考えられるアミノ酸、あるいは、それらアミノ酸が類似の物理的および／または化学的特性を共有するため、ある配列におけるそれらアミノ酸の相互的置換が分子の構造または機能を破壊しないことが多いようなお互いに保存的であるアミノ酸の一覧を示す。詳細には、保存的アミノ酸置換は、以下の何れかであって差し支えない：(1) ロイシンまたはバリンに対してイソロイシン、イソロイシンに対してロイシン、ならびにロイシンまたはイソロイシンに対してバリンの何れか；(2) グルタミン酸に対してアスパラギン酸、およびアスパラギン酸に対してグルタミン酸；(3) アスパラギンに対してグルタミン、およびグルタミンに対してアスパラギン；(4) トレオニンに対してセリン、およびセリンに対してトレオニン。

【0069】

特定アミノ酸の環境に依存して、他の置換も保存的であると考えられる。アラニンとバリン(V)の場合と同様、例えば、グリシン(G)とアラニン(A)は置換可能な場合が多い。相対的に疎水性であるメチオニン(M)は、ロイシンおよびイソロイシンと置換可能な場合が多く、さらにバリンと置換可能な

場合がある。リジン（K）とアルギニン（R）は、アミノ酸残基の重要な特性が電荷であり、それら2つのアミノ酸残基のpK値またはそれらの異なるサイズが重要では無いような配置において、置換可能な場合が多い。更に別の変化が、特定の環境において「保存的である」と考えられる。例えば、タンパク質表面上のアミノ酸が、別のタンパク質サブユニット等の別の分子との水素結合または塩架橋相互作用、あるいはそのタンパク質によるリガンド結合に関与しない場合、リジンまたはアルギニン等の陽電荷アミノ酸で、グルタミン酸およびアスパラギン酸等の負電荷アミノ酸を置換して差し支えなく、あるいはその逆であって差し支えない。アルギニンまたはリジンよりも弱塩基性でありかつ中性pHで部分的に荷電しているヒスチジン（H）は、前記のより強い塩基性アミノ酸で置換して差し支えない場合がある。さらには、アミドであるグルタミン（Q）およびアスパラギン（N）をそれらのカルボン酸相同物であるグルタミン酸およびアスパラギン酸で置換して差し支えない場合がある。

【0070】

「抗体」：この中で用いられている「抗体」の用語は、適切な特異性を有する無傷の抗体分子および抗体断片（Fab、F(ab')、FvおよびF(ab')₂等）の両方、ならびに、インビトロでのサブユニットの再結合によって組み立てられたハイブリッド抗体等の化学的に修飾した無傷抗体分子および抗体断片を含む。また、一般的にsFvと称される単鎖抗体分子、および、本来的にヒト抗体配列由来である定常領域で、本来的非ヒト定常領域のいくつかまたは全てを置き換えたヒト化抗体も含まれる。特定されない限り、ポリクロナール抗体とモノクロナール抗体の両方が含まれる。さらに、修飾抗体、あるいは抗体の結合力を妨害または変化させない標識または他の分子に結合させた抗体も含まれる。

【0071】

発明の詳細な説明

グラム陽性菌、特に黄色ブドウ球菌由来の実質的に純粋なソーターゼトランスアミダーゼ酵素を同定および精製した。その酵素の特性は、その酵素を抗菌性のための論理的標的とする。また、その酵素は、グラム陽性菌のペプチドグリカンへのタンパク質の共有架橋結合に触媒作用を及ぼす。

【0072】

I. ソーターゼートランスアミダーゼ酵素

本発明の1つの態様は、グラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素である。この中で用いられている「実質的に純粋な」の用語は、粗抽出物、溶解物、あるいはタンパク質が除去されておらずかつ細胞中においてソーターゼートランスアミダーゼと関連して認められるタンパク質から実質的に単離されていないような他の状況の中に存在するソーターゼートランスアミダーゼ活性よりも10倍以上高い特異的活性を有することを意味する。

【0073】

本酵素は、約23,539ダルトンの分子量を有する。本酵素は、ソーティングシグナルを有するタンパク質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼす。ソーティングシグナルは：(1) LPX₃X₄Gのモチーフ；(2) そのモチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに(3) その実質的疎水性領域のカルボキシル側の少なくとも2つの陽電荷残基を有する荷電末端領域：を有し：その2つの陽電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンであり、その2つの陽電荷残基はそのモチーフから31-33残基の位置にあり、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであって差し支えない。X₄はアラニン、セリンおよびトレオニンであって差し支えない。好ましくは、X₄はトレオニンである。

【0074】

ソーターゼートランスアミダーゼは全てのグラム陽性菌において生じると考えられている。詳細には、本酵素は、マイコバクテリウム、ノカルジア、アクチノマイセス、ブドウ球菌、連鎖球菌、リステリア菌、エンテロコッカス、バシラスおよび肺炎球菌中に存在する。特に、その酵素は以下の種：黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・ソブリヌス、エンテロコッカス・ファエカリス、ストレプトコッカス・ピオゲネス、枯草菌、ストレプトコッカス・ニューモニエおよびリステリア・モノサイトゲネス：に存在する。

【0075】

好ましくは、本酵素は、黄色ブドウ球菌から単離され、さらに好ましくは、黄

色ブドウ球菌の *s r t A* 遺伝子の産物である。

【0076】

A. アミノ酸配列

本発明のソーターゼートランスアミダーゼは、アミノ酸配列：

【化7】

M-K-K-W-T-N-R-L-M-T-I-A-G-V-V-L-I-L-V-A-A-Y-L-F-A-K-P-H-I-D-
N-Y-L-H-D-K-D-K-D-E-K-I-E-Q-Y-D-K-N-V-K-E-Q-A-S-K-D-K-K-Q-Q-A-K-P-Q-I-P-K-
D-K-S-K-V-A-G-Y-I-E-I-P-D-A-D-I-K-E-P-V-Y-P-G-P-A-T-P-E-Q-L-N-R-G-V-S-F-A-E-
E-N-E-S-L-D-D-Q-N-I-S-I-A-G-H-T-F-I-D-R-P-N-Y-Q-F-T-N-L-K-A-A-K-K-G-S-M-V-Y-
F-K-V-G-N-E-T-R-K-Y-K-M-T-S-I-R-D-V-K-P-T-D-V-G-V-L-D-E-Q-K-G-K-D-K-Q-L-T-
L-I-T-C-D-D-Y-N-E-K-T-G-V-W-E-K-R-K-I-F-V-A-T-E-V-K (配列番号：3)

を包含する。

【0077】

また、ソーターゼートランスアミダーゼ活性を維持する配列番号3の配列の突然変異体である実質的に純粋なタンパク質分子も本発明の範囲内に含まれる。詳細には、保存アミノ酸置換は以下の何れかであって差し支えない：(1) ロイシンまたはバリンに対してイソロイシン、イソロイシンに対してロイシン、およびロイシンまたはイソロイシンに対してバリンの何れか；(2) グルタミン酸に対してアスパラギン酸、およびアスパラギン酸に対してグルタミン酸；(3) アスパラギンに対してグルタミン、およびグルタミンに対してアスパラギン；(4) トレオニンに対してセリン、およびセリンに対してトレオニン。

【0078】

特定アミノ酸の環境に依存して、他の置換も保存的であると考えることができる。アラニンとバリン(V)の場合と同様、例えば、グリシン(G)とアラニン(A)は置換可能な場合が多い。相対的に疎水性であるメチオニン(M)は、ロイシンおよびイソロイシンと置換可能な場合が多く、さらにバリンと置換可能な場合がある。リジン(K)とアルギニン(R)は、アミノ酸残基の重要な特性が電荷であり、それら2つのアミノ酸残基のpK値またはそれらの異なるサイズが重要では無いような配置において、置換可能な場合が多い。更に別の変化が、特

定の環境において「保存的である」と考えられる。例えば、タンパク質表面上のアミノ酸が、別のタンパク質サブユニット等の別の分子との水素結合または塩架橋相互作用、あるいはそのタンパク質によるリガンド結合に関与しない場合、リジンまたはアルギニン等の陽電荷アミノ酸で、グルタミン酸およびアスパラギン酸等の負電荷アミノ酸を置換して差し支えなく、あるいはその逆であって差し支えない。アルギニンまたはリジンよりも弱塩基性でありかつ中性pHで部分的に荷電しているヒスチジン（H）は、前記のより強い塩基性アミノ酸で置換して差し支えない場合がある。さらには、アミドであるグルタミン（Q）およびアスパラギン（N）をそれらのカルボン酸相同物であるグルタミン酸およびアスパラギン酸で置換して差し支えない場合がある。

【0079】

黄色ブドウ球菌由来のソーターゼートランスアミダーゼのアミノ酸配列（配列番号3）は、他のグラム陽性菌由来の酵素の配列とかなり相同性を有する。ストレプトコッカス・ピオゲネスのオープンリーディングフレーム（配列番号4）の完全に配列決定された領域に亘り、最善の整列で、約31%の配列同一性（約44%の配列類似性）がある。アクチノマイセス・ナエスルンディのオープンリーディングフレーム（配列番号5）の完全に配列決定された領域に亘り、最善の整列で、約28%の配列同一性（約44%の配列類似性）がある。ストレプトコッカス・ミュータンスのオープンリーディングフレーム（配列番号7）の完全に配列決定された領域に亘り、最善の整列で、約27%の配列同一性（約47%の配列類似性）がある。エンテロコッカス・ファエカリスのオープンリーディングフレーム（配列番号6）の完全に配列決定された領域に亘り、最善の整列で、約25%の配列同一性（約45%の配列類似性）がある。ストレプトコッカス・ミュータンスのオープンリーディングフレーム（配列番号7）と比較して、枯草菌のオープンリーディングフレーム（配列番号8）の完全に配列決定された領域に亘り、最善の整列で、約23%の配列同一性および約38%の配列類似性があり、枯草菌とストレプトコッカス・ピオゲネスのオープンリーディングフレームとの間での配列同一性および配列類似性の割合はそれよりも低いものである。それら一致を図7に示す。

【0080】

さらには、黄色ブドウ球菌のオープンリーディングフレーム（配列番号3）とストレプトコッカス・ニューモニエ由来のs r t Aと称されるタンパク質（配列番号34）との間において、完全配列に亘り、最善の整列で、約32%の配列同一性および約47%の配列類似性がある。s r t Aタンパク質の配列は以下の通りである：

【化8】

MSRTKLRALLGYLLMLVACLIPIYCFGQMVLQSLGQVKGHATFVKSMTTEMYQEQQ
NHSLAYNQRLASQNRJVDPFLEAGYEVNYQVSDDPDAVYGYLSIPSLEIMEPVYLGA
DYHHLGMGLAHVDGTPLPLDGTGIRSVIAGHRAEPSHVFFRHL DQLKVG DALYYDN
GQEIVEYQMMDTEIILPSEWEKLESVSSKNIMTLITCDPIPTFNKRLLVNFERVAVYQK
SDPQTAAVARVAFTKEGQSVSRVATSQWLYRGLVVLAFLGILFVLWKLARLLRGK
（配列番号：34）

同様に、黄色ブドウ球菌のオープンリーディングフレーム（配列番号3）とストレプトコッカス・ニューモニエ由来のs r t Bと称されるタンパク質（配列番号35）との間において、完全配列に亘り、最善の整列で、約30%の配列同一性および約46%の配列類似性がある。s r t Bタンパク質の配列は以下の通りである：

【化9】

MDNSRRSRKKGTKKKKHPLILLIIFLVGFAVAIYPLVSRYYYRISNEVIKEFDETVSQ
MDKAELEERWRLAQAFNATLKPSEILDPFTEQEKKKGVSEYANMLKVHERIGYVEIP
AIDQEIPMYVGTSEDILQKGAGLLEGASLPVGGENTHTVITAHRLPTAELFSQLDKM
KKGDIFYLHVLDQVLA YQVDQIVTVEPNDFEPVLIQHGEDYATLLTCTPYMINSHRL
LVRGKRIPYTAPIAERNRAVRERGQFWLWLLLGAMAVILLLLYRVYRNRRIVKGLEK
QLEGRHVKD（配列番号：35）

同様に、黄色ブドウ球菌のオープンリーディングフレーム（配列番号3）とストレプトコッカス・ニューモニエ由来のs r t Cと称されるタンパク質（配列番号36）との間において、完全配列に亘り、最善の整列で、約29%の配列同一性および約43%の配列類似性がある。s r t Cタンパク質の配列は以下の通り

である：

【化10】

MDNSRRSRKKGTKKKKHPLILLIIFLVGFAVAIYPLVSRYYYRISNEVIKEFDETVSQ
MDKAELEERWRLAQAFNATLKPSEILDPFTEQEKKKGVSEYANMLKVHERIGYVEIP
AIDQEIPMYVGTSEDILQKGAGLLEGASLPVGGENTHTVITAHRLPTAELFSQLDKM
KKGDIFYLHVLDQVLAYQVDQIVTVEPNDFEPVLIQHGEDYATLLTCTPYMINSHRL
LVRGKRIPYTAPIAERNRAVRERGQFWLWLLLGAMAVILLLLYRVYRNRRIVKGLEK
QLEGRHVKD (配列番号：36)

従って、本発明の別の態様は、図7のストレプトコッカス・ピオゲネス、アクチノマイセス・ナエスルンディ、ストレプトコッカス・ミュータンス、エンテロコッカス・ファエカリスまたは枯草菌のオープンリーディングフレームと、最善の整列で、18%以上の配列同一性、好ましくは20%以上の配列同一性、最も好ましくは30%以上の配列同一性を有し、かつソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する実質的に純粋なタンパク質分子である。さらには、本発明の別の態様は、図7のストレプトコッカス・ピオゲネス、アクチノマイセス・ナエスルンディ、ストレプトコッカス・ミュータンス、エンテロコッカス・ファエカリスまたは枯草菌のオープンリーディングフレームと、最善の整列で、30%以上の配列類似性、好ましくは40%以上の配列類似性、最も好ましくは50%以上の配列類似性を有し、かつソーターゼートランスアミダーゼ活性を有する実質的に純粋なタンパク質分子である。

【0081】

ソーターゼートランスアミダーゼはシステインプロテアーゼである。

【0082】

B. ソーターゼートランスアミダーゼの活性

本発明のソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を概して図1に示す。本酵素はまず、LPX₃X₄Gモチーフ内で、ソーティングシグナルを有するポリペプチドを切断する。切断は、残基X₄ (通常トレオニンであり；上記のようにセリンまたはアラニン残基であっても差し支えない) の後で生じる。その残基は、ソーターゼートランスアミダーゼ酵素と共有結合中間体を形成する。次の工程

は、局在化すべきタンパク質の切断されたカルボキシル末端を、ペプチドグリカン前駆体内のペンタグリシン架橋の-NH₂に転移させるアミノ基転移反応である。次に、ウンデカプレニルリン酸塩の遊離と共に、トランスグリコシラーゼ反応によって、細胞壁中にペプチドグリカン前駆体を組み込ませる。非置換細胞壁テトラペプチドのε-アミノ側鎖に拘束された細胞壁中のペンタグリシン架橋に対して、成熟固着ポリペプチド鎖を結合させる。カルボキシペプチダーゼは、ペンタペプチド構造のD-Ala-D-Ala結合を切断して、ブドウ球菌細胞壁中に最終産物の分枝アンカーペプチドをもたらすことができる。ソーティングシグナルは：（１）LPX₃X₄Gのモチーフ；（２）そのモチーフのカルボキシル側の少なくとも31アミノ酸から成る実質的疎水性領域；ならびに（３）荷電末端領域：を有する。

【0083】

そのモチーフにおいて、X₃は20の天然Lアミノ酸の何れかであって差し支えない。X₄はトレオニン、セリンまたはアラニンであって差し支えない。好ましくは、X₄はトレオニンである(0. Schneewind et al., 12: 4803-4811(1993))。

【0084】

好ましくは、そのモチーフのカルボキシル側の実質的疎水性領域は、約7以下の荷電残基および極性側鎖を有する残基を包含する。本明細書のために、それら残基は以下のものを含む：荷電残基として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンおよびアルギニン；極性であるが非荷電の残基として、セリン、トレオニン、グルタミンおよびアスパラギン。好ましくは、その配列は、3以下の荷電残基を包含する。

【0085】

本発明のソーターゼトランスアミダーゼと共に用いるためのソーティングシグナルに適した例示的配列として、限定はされないが、以下のものが挙げられる：（１）黄色ブドウ球菌由来のブドウ球菌プロテイナーゼ（SPA）ソーティングシグナルの疎水性領域、E-E-N-P-F-I-G-T-T-V-F-G-G-L-S-L-A-L-G-A-A-L-L-A-G（配列番号9）；（２）黄色ブドウ球菌のSNBP

シグナル、G-E-E-S-T-N-K-G-M-L-F-G-G-L-F-S-I-L-G-L-A-L-L（配列番号10）；（3）ストレプトコッカス・ゾブリヌスのSPAAシグナル、D-S-S-N-A-Y-L-P-L-L-G-L-V-S-L-T-A-G-F-S-L-L-G-L（配列番号11）；（4）エンテロコッカス・ファエカリスのPRGBシグナル、E-K-Q-N-V-L-L-T-V-V-G-S-L-A-A-M-L-G-L-A-G-L-G-F（配列番号12）；（5）ストレプトコッカス・ピオゲネスのTEEシグナル、S-I-G-T-Y-L-F-K-I-G-S-A-A-M-I-G-A-I-G-I-Y-I-V（配列番号13）；（6）リステリア・モノサイトゲネスのINLAシグナル、D-S-D-N-A-L-Y-L-L-L-G-L-L-A-V-G-T-A-M-A-L-T（配列番号14）。他の疎水性領域もソーティングシグナルの一部として用いることができる。

【0086】

ソーティングシグナルの第三部分は、実質的に疎水性な領域のカルボキシル側の少なくとも2つの正電荷残基を有する荷電末端領域である。その2つの正電荷残基の内、少なくとも1つはアルギニンである。また、その荷電末端領域は、例えばリジン等の他の荷電アミノ酸を包含していて差し支えない。好ましくは、その荷電末端領域は、2つ以上のアルギニン残基を包含する。その2つの正電荷残基は、前記モチーフから31-33残基に位置する。好ましくは、その2つのアルギニン残基は、連続しているか、あるいは1つの介在アミノ酸によって分けられている。好ましくは、その荷電末端は、5以上のアミノ酸の長さであるが、4アミノ酸の長さでも可能である。用いることができる荷電末端は以下の通りである：（1）黄色ブドウ球菌のSPAシグナル由来のR-R-R-E-L（配列番号15）；（2）黄色ブドウ球菌のSNBPシグナル由来のR-R-N-K-K-N-H-K-A（配列番号16）；（3）ストレプトコッカス・ゾブリヌスのSPAAシグナル由来のR-R-K-Q-D（配列番号17）；（4）エンテロコッカス・ファエカリスのPRGBシグナル由来のK-R-R-K-E-T-K（配列番号18）；（5）ストレプトコッカス・ピオゲネスのTEEシグナル由来のK-R-R-K-A（配列番号19）；（6）アクチノマイセス・ビスコーサスのFIMソーティングシグナル由来のK-R-R-H-V-A-K-H（配列番号20）；（7）ストレプト

コッカス・アグラクチエのBACソーティングシグナル由来のK-R-R-K-S（配列番号21）；（8）ストレプトコッカス・ピオゲネスのEMMシグナル由来のK-R-K-E-E-N（配列番号22）。

【0087】

また、黄色ブドウ球菌のSPAシグナルから突然変異誘発によって生じた以下の配列もソーティングシグナルの荷電末端部分として用いることができる。それら配列として、R-R-R-E-S（配列番号23）、R-R-R-S-L（配列番号24）、R-R-S-E-L（配列番号25）、R-S-R-E-L（配列番号26）およびS-R-R-E-L（配列番号27）が挙げられる。1つ以上のセリン残基を塩基性アミノ酸のアルギニンで置換することによって、それ自体不活性であるポリセリン末端から、ソーティングシグナルの一部として用い得る他の荷電末端を導き出すことができる。そのようなものとして、R-R-S-S-S（配列番号28）、R-S-R-S-S（配列番号29）およびS-R-R-S-S（配列番号30）が挙げられる。他のソーティングシグナルも用いることができる。

【0088】

II. ソーターゼートランスアミダーゼ酵素をコードする遺伝子

A. ソーターゼートランスアミダーゼ酵素遺伝子の単離

黄色ブドウ球菌におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の遺伝子、srtA遺伝子を単離した。単離方法は以下の実施例に詳細に記載されている；概して、その方法は：（1）例えばDNA修飾試薬であるN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等を用いた化学的突然変異誘発によって、温度感受性突然変異体を作成し；（2）温度感受性突然変異体をスクリーニングし；（3）ブドウ球菌プロテインA（SPA）の細胞壁ソーティングシグナルに融合させたブドウ球菌エンドトキシンB（SEB）を包含する構成物を用いて、アミノ末端シグナルペプチドの切断によって形成された前駆体分子を蓄積するがその後カルボキシル末端ソーティングシグナルの切断による処理を受けない突然変異体を見つけることによって、タンパク質ソーティングにおける遮断について温度感受性突然変異体をスクリーニングし；（4）黄色ブドウ球菌染色体ライブラリーを作成し、さらにP2前駆体の異常な蓄積につながるソーティング欠損の相補性検定を行い

；ならびに（５）黄色ブドウ球菌相補性決定基を配列決定しさらに特徴付けする
：各工程を含む。

【0089】

B. ソーターゼートランスアミダーゼ遺伝子の配列

上記方法によって、ソーターゼートランスアミダーゼ遺伝子 s r t A の完全コード配列を得た。その配列は以下の通りである：

【化11】

ATGAAAAAATGGACAAATCGATTAATGACAATCGCTGGTGTGGTACTTATCCTAG
TGGCAGCATATTTGTTTGCTAAACCACATATCGATAATTATCTTCACGATAAAGA
TAAAGATGAAAAGATTGAACAATATGATAAAAATGTAAAAGAACAGGCGAGTA
AAGATAAAAAGCAGCAAGCTAAACCTCAAATTCCGAAAGATAAATCGAAAGTGG
CAGGCTATATTGAAATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACC
AGCAACACCTGAACAATTAAATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATGAATC
ACTAGATGATCAAAATATTTCAATTGCAGGACACACTTTCATTGACCGTCCGAAC
TATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAG
TTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGTATAAGAGATGTTAAGCCTA
CAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAAGATAAACAATTAACATTAA
TTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTTGGGAAAAACGTAAAATCTT
TGTAAGCTACAGAAGTCAAATAA（配列番号：2）

その配列の最後の3つのヌクレオチドTAAは終止コドンである。

【0090】

従って、グラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素をコードする核酸配列は、本発明の範囲内に含まれる。コードされる酵素は、約23,539ダルトンの分子量を有し、かつ上記のソーティングシグナルを有するタンパク質のカルボキシル末端をグラム陽性菌のペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応に触媒作用を及ぼす。その核酸配列は、配列番号2の配列または配列番号2の配列に相補的である配列を包含する。

【0091】

また、約23,539ダルトンの分子量を有しかつ交差結合反応に触媒作用を及ぼすグラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素

をコードする核酸配列であって：（１）配列番号２の配列；（２）配列番号２の配列に相補的である配列；あるいは（３）約１５％以下の不一致で配列番号２の配列に相補的である配列：の少なくとも１つとストリンジェントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列も本発明の範囲内に含まれる。好ましくは、不一致の割合は約５％以下であり、最も好ましくはその不一致は約２％以下である。

【００９２】

また、約２３，５３９ダルトンの分子量を有しかつソーティングシグナルに関連する上記の交差結合反応に触媒作用を及ぼすグラム陽性菌由来の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素をコードする核酸配列であって、その酵素が：

【化１２】

(1) M-K-K-W-T-N-R-L-M-T-I-A-G-V-V-L-I-L-V-A-A-Y-L-F-A-K-P-H-I-D-N-Y-L-H-D-K-D-K-D-E-K-I-E-Q-Y-D-K-N-V-K-E-Q-A-S-K-D-K-K-Q-Q-A-K-P-Q-I-P-K-D-K-S-K-V-A-G-Y-I-E-I-P-D-A-D-I-K-E-P-V-Y-P-G-P-A-T-P-E-Q-L-N-R-G-V-S-F-A-E-E-N-E-S-L-D-D-Q-N-I-S-I-A-G-H-T-F-I-D-R-P-N-Y-Q-F-T-N-L-K-A-A-K-K-G-S-M-V-Y-F-K-V-G-N-E-T-R-K-Y-K-M-T-S-I-R-D-V-K-P-T-D-V-G-V-L-D-E-Q-K-G-K-D-K-Q-L-T-L-I-T-C-D-D-Y-N-E-K-T-G-V-W-E-K-R-K-I-F-V-A-T-E-V-K（配列番号：３）

ならびに（２）配列番号３の配列中に１つ以上の保存的アミノ酸置換を加えた配列であって、その保存的アミノ酸置換が以下の：（１）イソロイシン、ロイシンおよびバリン間での任意の置換；（２）アスパラギン酸とグルタミン酸間での置換；（３）グルタミンとアスパラギン間での置換；および（４）セリンとトレオニン間での置換：の何れかである配列：より成る群から選択されたアミノ酸配列を包含するような核酸配列も本発明の範囲内に含まれる。標準遺伝暗号を用いて選択的核酸配列を特定することができ；その配列における各アミノ酸についてその選択的コドンを経易に特定することができる。

【００９３】

固相ヌクレオチド合成、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術、RNAからのDNAの逆転写、DNAポリメラーゼおよびリガーゼの使用、ならびに他の技術等の当業界で周知の技術によって、本発明の核酸配列を構築することができる。

アミノ酸配列が分かっている場合は、その遺伝暗号に基づいて対応する核酸配列を構築することができる。

【0094】

C. ベクターおよびベクターで形質転換した宿主細胞

本発明の別の態様は、核酸配列の発現または調節を制御する少なくとも1つの制御配列に作動可能に結合した本発明の核酸配列を包含するベクターである。そのような制御配列は当業界で周知であり、オペレーター、プロモーター、エンハンサー、プロモーター近接要素、および複製起点等が挙げられる。クローニング、連結反応、ギャップフィリング、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法の使用、固相オリゴヌクレオチド合成、ならびに他の技術等のベクター構築の技術は、当業界で全て周知であり、更にここで説明する必要は無い。

【0095】

本発明の別の態様は、本発明のベクターをトランスフェクトした宿主細胞である。用いることができる宿主細胞は、例えば黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌である。

【0096】

形質転換としても知られている、トランスフェクションは、用いられる宿主細胞、特に黄色ブドウ球菌に適切な標準技術を用いて成される。そのような技術は、例えば、R.P.Novick, “Genetic Systems in Staphylococci,” Meth. Enzymol. 204: 587-636 (1991)、ならびにO.Schneewind et al., “Sorting of Protein A to the Staphylococcal Cell Wall,” Cell 70: 267-281 (1992)に記載されている。

【0097】

I I I. 抗菌性のための標的としてのソーターゼートランスアミダーゼ

A. 抗菌性のための部位

本発明のソーターゼートランスアミダーゼによって成される反応は、多くのグラム陽性菌によって生じる医学上関連した感染症に対する新しいクラスの抗生物質のための潜在的な標的を与える。それは抗菌性の新規な部位であるため、それら抗生物質は、細菌による耐性が発達する可能性が無いという利点を有する。

【0098】

そのような抗生物質として、例えばメチルメタンチオスルホネートまたはより一般的にアルキルメタンチオスルホネートに類似の構造を有する化合物等の、切断部位を模倣する構造を有する化合物が挙げられる。本発明のソーターゼートランスアミダーゼはシステインプロテアーゼであると考えられている。本発明におけるソーターゼートランスアミダーゼの活性を阻害し得る他の抗生物質は、 β -ラクタム骨格におけるシステイン修飾に特異的である阻害剤を含む。それら阻害剤は、必ずしも必要ではないが、システインスルヒドリルと共に混合ジスルフィドを形成する活性部分を有する。それら活性部分は、例えば、メタンチオスルホネートエチルアンモニウム、メタンチオスルホネートエチルトリメチルアンモニウム、またはメタンチオスルホネートエチルスルホネート等のメタンチオスルホネートの誘導体であって差し支えない(J.A.Javitch et al., "Mapping the Binding Site Crevise of the Dopamine D2 Receptor by the Substituted-Cysteine Accessibility Method," *Neuron*, 14: 825-831 (1995); M.H. Akabas&A.Karlin, "Identification of Acetylcholine Receptor Channel-Lining Residues in the M1 Segment of the α -Subunit," *Biochemistry* 34: 12496-12500 (1995))。例えばメチルメタンチオスルホネート等のアルカンチオスルホネート、またはアルコキシカルボニルアルキルジスルフィド等の類似の試薬についても記載されている(D.J.Smith et al., "Simple Alkanethiol Groups for Temporary Blocking of Sulfhydryl Groups of Enzymes," *Biochemistry* 14: 766-771 (1975); W.N.Valentine&D.E.Paglia, "Effect of Chemical Modification of Sulfhydryl Groups of Human Erythrocyte Enzymes," *Am.J.Hematol.* 11: 111-124(1981))。他の有用な阻害剤として：2-トリフルオロアセチルアミノベンゼンフッ化スルホニルの誘導体(J.C.Powers, "Proteolytic Enzymes and Their Active-Site-Specific Inhibitors: Role in the Treatment of Disease," in *Modification of Proteins*); β -ラクタム骨格における、ペプチドアルデヒドおよびニトリル(E.Dufour et al., "Peptide Aldehydes and Nitriles as Transition State Analog Inhibitors of Cysteine Proteases," *Biochemistry* 34: 9136-9143(1995); J.O.Westerik&R.Wolfenden, "Aldehydes as Inhibitors of Papain,"

J.Biol.Chem 247: 8195-8197 (1972)) ; ペプチジルジアゾメチルケトン(L.Bjork et al., “Bacterial Growth Blocked by a Synthetic Peptide Based on the Structure of a Human Proteinase Inhibitor,” Nature 337: 385-386(1989)) ; ペプチジルホスホナミデート(P.A.Bartlett&C.K.Marlowe, “Phosphoramidates as Transition-State Analogue Inhibitors of Thermolysin,” Biochemistry 22: 4618-4624(1983)) ; 例えばm-カルボキシフェニルフェニルアセトアミドメチルホスホネートの誘導体または類似物等のリン酸モノエステル(R.F.Pratt, “Inhibition of a Class C β -Lactamase by a Specific Phosphonate Monoester,” Science 246: 917-919 (1989)) ; マレイミド、ならびに例えばo-フェニレンビスマレイミド、p-フェニレンビスマレイミド、m-フェニレンビスマレイミド、2,3-ナフタレンビスマレイミド、1,5-ナフタレンビスマレイミドおよびアゾフェニルビスマレイミド等の二官能マレイミドのような誘導体等のマレイミドの誘導体、ならびに単官能マレイミドおよびその誘導体(J.V.Moroney et al., “The Distance Between Thiol Groups in the γ Subunit of Coupling Factor 1 Influences the Proton Permeability of Thylakoid Membranes,” J.Bioenerget. Biomembr. 14:347-359 (1982)) ; ペプチジルハロメチルケトン (クロロメチルまたはフルオロメチルケトン) ; ペプチジルスルホニウム塩 ; ペプチジルアシロキシメチルケトン ; 例えばE-64 (N-[N-(L-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L-ロイシルアグマチン]、E-64c (アグマチン部分がイソアミルアミン基で置換されているE-64の誘導体)、E-64cエチルエステル、Ep-459 (アグマチン部分が1,4-ジアミノプロピル基で置換されているE-64の類似物) ; Ep-479 (アグマチン部分が1,7-ジヘプチルアミノ基で置換されているE-64の類似物)、Ep-460 (末端アミノ基がZ (ベンジルオキシカルボニル) 基で置換されているEp-459の誘導体)、Epp-174 (その分子がロイシン部分からのフリーのカルボキシル残基を有するように、アグマチン部分が除去されているE-64の誘導体)、Ep-475 (アグマチン部分が $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ 基で置換されているE-64の類似物)、またはEp-420 (ヒドロキシル基がベンゾイル化されてエステルを形成し、さらにロイシルアグマチン部分がイソロイシル-O-メチルチロシンで置

換されているE-64の誘導体)等のエポキシドの誘導体および類似物;あるいはペプチジル-O-アシルヒドロキサメート(E.Shaw, "CysteinyI Proteases and Their Selective Inactivation), pp 271-347):が挙げられる。他の阻害剤は当業界で公知である。

【0099】

他の残基の修飾も本酵素の阻害をもたらすことができる。

【0100】

B. スクリーニング法

本発明の別の態様は、抗ソーターゼートランスアミダーゼ活性について化合物をスクリーニングする方法である。本方法は、ソーティング工程を破壊しそれによってグラム陽性菌に対する潜在的抗菌性を有する化合物をスクリーニングする方法を提供することから、本発明の重要な態様である。

【0101】

概して、本方法は:(1)ソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性画分を提供し;(2)スクリーニングすべき化合物の存在下および不在下において、ソーターゼートランスアミダーゼの測定法を実施し;さらに(3)化合物の存在下および不在下におけるソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性を比較する:各工程を含む。

【0102】

ソーターゼートランスアミダーゼ酵素の活性画分は、本発明の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素の調製物であるが、例えば以下に記載の部分的に精製された粒子状調製物のような純度の低い調製物であっても差し支えない。

【0103】

例えばブドウ球菌プロテインA(SPA)の細胞壁ソーティングシグナルに融合させたブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)遺伝子を有する構成物のような適切な基質の切断によって酵素活性を測定することができる。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動または他の方法によって、その産物の分子量をモニターすることによってその切断を特定することができる。

【0104】

ソーターゼートランスアミダーゼ活性の特に好ましい測定法の1つは以下の通りである：

Zubay(G.Zubay, J.Mol. Biol. 4: 347-356 (1962))の技術の改変によって、黄色ブドウ球菌からブドウ球菌可溶性RNA (sRNA)を調製する。黄色ブドウ球菌を1晩培養したものをTBSで1：10に希釈し、さらに37℃で3時間インキュベートする。6000rpmで15分間遠心することによって細胞を回収する。

【0105】

細胞ペレット1g当たり、2mlの0.001M Tris溶液(pH7.5、0.01M酢酸マグネシウム含有)を用いてペレットを懸濁させる。ガラスビーズビーターによって、5分間隔で、45分間、細胞ペレットを攪拌する。懸濁液を2500rpmで5分間、2回遠心して、ガラスビーズを除去し、次にその懸濁液に0.5mlのフェノールを添加する。4℃で90分間懸濁液を激しく攪拌し、その後18,000xgで15分間遠心する。0.1容量の20%酢酸カリウムおよび2容量のエタノールを添加して最上層中の核酸を沈殿させ、その後4℃で36時間以上保存する。5,000xgで5分間遠心することによって沈殿を得る。その沈殿物に冷却NaCl(1ml)を添加し、さらに4℃で1時間攪拌する。その懸濁液を15,000xgで30分間遠心する。沈殿物を0.5mlの冷却1M NaClで洗浄する。上清を合わせ、さらに2容量のエタノールを添加してtRNAを沈殿させる。0.1mlの0.2Mグリシン溶液(pH10.3)に沈殿物を懸濁させ、さらに37℃で3時間インキュベートする。次にその懸濁液を0.4M NaClとなるようにし、2容量のエタノールの添加によってRNAを沈殿させる。沈殿物を0.7mlの0.3M酢酸ナトリウム溶液(pH7.0)に溶解させる。攪拌しながら、0.5容量のイソプロピルアルコールをゆっくり添加する。8,000xgで5分間遠心することによって沈殿物を除去する。その沈殿物を0.35mlの0.3M酢酸ナトリウム溶液(pH7.0)に再溶解させる。上記の同じやり方で、0.5容量のイソプロピルアルコールを添加する。遠心によって再び沈殿物を除去する。2回の遠心からの上清を合

わせたものをさらに0.37mlのイソプロピルアルコールで処理する。得られた沈殿物を75μlの水に溶解させ、さらに4℃で1晩、水で透析する。そのsRNAをソーターゼートランスアミダーゼ測定法で用いる。

【0106】

Chatterjee&Park(A.N.Chatterjee&J.T.Park, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51:9-16 (1964))の方法の改変による測定法において用いるために、粒子状ソーターゼートランスアミダーゼ酵素を調製する。黄色ブドウ球菌OS2を1晩培養したものをTBSで1:50に希釈し、さらに37℃で3時間インキュベートする。6000rpmで15分間遠心することによって細胞を回収し、さらに氷冷水で2回洗浄する。0.05M Tris-HCl緩衝液(pH7.5、0.1mM MgCl₂および1mM 2-メルカプトエタノール含有)中の13%細胞懸濁液(7ml)を、ビーター中、等容量のガラスビーズを用いて10-15分間攪拌しながら、細胞を破壊する。2000rpmで5分間遠心することによってガラスビーズを除去する。粗抽出物を15,000xgで5分間遠心する。上清を再度100,000xgで30分間遠心する。淡い黄色の半透明ペレットを2-4mlの0.02M Tris-HCl緩衝液(pH7.5、0.1mM MgCl₂および1mM 2-メルカプトエタノール含有)中に再懸濁させる。その懸濁液は粗粒子状酵素を表し、以下の反応混合物において用いられる。

【0107】

Sephadex■ G-25アガロースカラム(pharmacia)を用いて、100,000xgでの遠心から得られた上清をゲル濾過し、内因性基質を除去する。その上清も反応混合物において用いられる。

【0108】

完全反応混合物は、最終容量30μl中に:3μmolのTris-HCl(pH7.8);0.1μmolのMgCl₂;1.3μmolのKCl;2.7nmolの[³H]グリシン(200μCi/μmol);2nmolのUDP-M-ペンタペプチド;5nmolのUDP-N-アセチルグルコサミン;0.2μmolのATP;0.05μmolのホスホエノールピルビン酸カリウム;2.05μgのクロラムフェニコール;5μgのピルビン酸キナーゼ;0.025μmo

1の2-メルカプトエタノール；50 μ gの上記のように調製した黄色ブドウ球菌sRNA；4 μ g（タンパク質として）の上記のように調製した上清；271 μ gの上記のように調製した粒子状酵素；ならびに基質として、8 nmolの合成可溶性ペプチド（HHHHHHAQALEPTGEENPF）（配列番号32）：を含有する(M.Matsushashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 587-594 (1965))。

【0109】

混合物を20°で60分間インキュベートする。次に混合物を100℃で1分間加熱する。混合物を1mlに希釈し、さらに50 μ l ニッケル樹脂を用いて沈殿させ、その後洗浄緩衝液（1% Triton X-100、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、50mM Tris、pH7.5）で洗浄する。シンチレーションカウンターでニッケル樹脂ビーズを計数して、ビーズへの³H結合を特定する。

【0110】

予め定めた濃度でその測定混合物中に化合物を加え、さらに得られた酵素活性阻害の割合を特定することによって、スクリーニングされる化合物のソーターゼートランスアミダーゼ酵素活性を阻害する効果を特定することができる。通常、評価される化合物のある範囲の濃度を用いて、用量-反応曲線を作成する。

【0111】

純粋なまたは精製されていない、黄色ブドウ球菌由来の、組換え体の、または上記の他のグラム陽性菌からの任意の他の供給源由来の、任意の他のソーターゼートランスアミダーゼ調製物で、本プロトコルにおいて用いられる粒子状酵素調製物を置き換えても差し支えない。

【0112】

6ヒスチジン残基の存在によるニッケル樹脂へのその親和性によって、可溶性ペプチドを本実施例において捕らえることができる。そのペプチドにおいて、6より多くのヒスチジン残基を用いて差し支えない。あるいは、ペプチドにおいて、結合部位を構成するアミノ酸配列で6ヒスチジン残基を置換し、さらに結合パートナーを包含する適切な固相親和性樹脂を用いることによって、例えばストレ

プトアビジン-ビオチン、グルタチオンSトランスフェラーゼ-グルタチオン、マルトース結合タンパク質-マルトース等の他の相互作用から生じる親和性によって可溶性ペプチドを捕らえても差し支えない。M.Bodanszky, “Peptide Chemistry: A Practical Textbook” (2d ed., Springer-Verlag, Berlin, 1993)に記載のような当業界で周知の技術を用いた固相ペプチド合成によって、適切なペプチドを調製することができる。例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ-グルタチオン相互作用を用いる場合には、6ヒスチジン残基をグルタチオンSトランスフェラーゼの活性部位(D.B.Smith&K.S.Johnson, “Single-Step Purification of Polypeptides Expressed in Escherichia coli as Fusions with Glutathione S-Transferase,” Gene 67: 31-40 (1988))で置換して差し支えなく、さらにグルタチオンを固相支持体に結合させて差し支えない。

【0113】

あるいは、ヒドロキシルアミノ分解によって、ソーターゼから可溶性ペプチドを遊離させ、さらに定量化またはモニターすることができる。強い求核体であるヒドロキシルアミンは、チオエステルを攻撃して、カルボキシルを有するヒドロキサメートを形成し、それによって酵素スルフィドリルを再形成させる。0.1Mヒドロキシルアミンを含有する50mM Tris-HCl (pH7.0)中において、60分間の間に、ヒドロキシルアミノ分解が達成される。例えば、質量分析または他の方法によって、遊離されたペプチドを定量化することができる。

【0114】

IV. タンパク質およびペプチドの提示のためのソーターゼトランスアミダーゼの使用

A. タンパク質およびペプチドの提示方法

グラム陽性菌の表面上にポリペプチドを提示する方法においても、本発明のソーターゼトランスアミダーゼ酵素を用いることができる。

【0115】

概して、本方法の第1の実施形態は：(1) 上記のようにそのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを発現させ；(2) (i) 発現ポリペプチド；(ii) 本発明の実質的に純粋なソーターゼトランスアミダー

ゼ酵素；および（i i i）ソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；さらに（3）ソーティングシグナルのLPX₃X₄Gモチーフ内でポリペプチドを切断しかつその切断ポリペプチドのアミノ末端部位をペプチドグリカンに共有架橋結合させる反応をソーターゼートランスアミダーゼ酵素に触媒作用を及ぼさせて、グラム陽性菌の表面上にそのポリペプチドを提示させる；各工程を含む。

【0116】

本方法において、そのカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するポリペプチドを、グラム陽性菌において発現させる必要はなく；例えば、大腸菌またはサルモネラ・タイフィウム（ネズミチフス菌）等の別の細菌系、あるいは原核細胞発現系において発現させて差し支えない。

【0117】

タンパク質ターゲティングおよび提示の他の方法は、グラム陽性菌におけるキメラタンパク質の直接発現、および発現されたタンパク質へのソーターゼートランスアミダーゼ作用に頼る。概して、そのような方法は：（1）上記のカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するクローン化キメラタンパク質を作成するために、提示されるべきポリペプチドを包含するキメラタンパク質をコードする核酸断片をグラム陽性菌中にクローニングし；（2）カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するキメラタンパク質を作成するために、クローン化キメラタンパク質を発現するように前記核酸断片がその中にクローン化された細菌を増殖させ；さらに

（3）そのタンパク質がリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、LPX₃X₄Gモチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁にそのキメラタンパク質を共有結合させる；各工程を含む。

【0118】

通常、グラム陽性菌はブドウ球菌種である。特に好ましいブドウ球菌の種は、

黄色ブドウ球菌である。

【0119】

しかしながら、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス、他のストレプトコッカス種、および他の属のグラム陽性菌等の他のグラム陽性菌を用いても差し支えない。

【0120】

標準方法によって、キメラタンパク質をコードする核酸断片をグラム陽性菌中にクローニングする。概して、そのようなクローニングは：（１）細胞壁に局在化および共有結合するタンパク質をコードする核酸断片を単離し；（２）その核酸断片をソーティングシグナルに結合させ；（３）発現を生じさせるグラム陽性菌と適合するベクター中に挿入することによってクローニングし；さらに（４）新しいキメラ核酸断片を包含するベクターを細菌中に組み込む：各工程を含む。

【0121】

通常、局在化タンパク質をコードする核酸断片はDNAであるが；あるクローニング工程において、RNAを用いることも本発明の範囲内に含まれる。

【0122】

真核生物由来の遺伝子を扱う場合、天然遺伝子は通常介在配列または転写されないイントロンを包含するため、cDNAを用いるのが好ましい。あるいは、そのアミノ酸配列が分かっている場合は、例えばリン酸トリエステル法または亜リン酸トリエステル法等の標準固相オリゴデオキシリボヌクレオチド合成法によって、局在化タンパク質をコードする合成遺伝子を構築することができる。1つ以上のコドンによって各天然アミノ酸が特定される遺伝暗号によって、配列合成遺伝子の配列を特定する。さらには、タンパク質配列の一部が分かっているが、その遺伝子またはメッセンジャーRNAが単離されていない場合は、アミノ酸配列を用いて、公知の遺伝暗号の縮重に基づいてプローブの縮重セットを構築して差し支えない。クローニングの一般的態様は、例えば、J.Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); B. Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning” (2d ed., John Wiley&Sons, New York 1988)

,; S.L.Berger&A.R.Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques" (Methods in Enzymology, vol.152, Academic Press, Inc., San Diego, 1987); D.V.Goeddel,ed., "Gene Expression Technology" (Methods in Enzymology, vol.185, Academic Press, Inc., San Diego, 1991)に記載されている。

【0123】

単離すると、次に、局在化タンパク質をコードするDNAをソーティングシグナルに結合させる。通常、例えば大腸菌またはバクテリオファージT4リガーゼ等を用いて、連結によって成される。それら酵素の使用条件は公知であり、かつ上記の一般的引例に記載されている。

【0124】

単一タンパク質が産生されるように、局在化タンパク質とソーティングシグナルとが単一隣接リーディングフレーム中において結合するようなやり方で、連結を実施する。ある場合には、単一リーディングフレームを維持するために、クローン化DNA断片の塩基の付加または欠失を含んでいて差し支えない。それは標準技術を用いて成される。クローン化DNAの発現をもたらすように対照要素を包含するベクター中にクローン化DNAを挿入することによってクローニングを実施する。次に、形質転換の標準技術または細菌に核酸を導入するための他の技術を用いて、発現が成される細菌にそのベクターを組み込む。

【0125】

黄色ブドウ球菌のための1つの適切なクローニング系は、クローン化遺伝子をBlaZRIレギュロンの制御下に置く(P.Z.Wang et al., Nucl. Acids Res. 19: 4000 (1991))。黄色ブドウ球菌において用いるためのベクターおよび他のクローニング技術は、B.Nilsson&L.Abrahmsen, "Fusion to Staphylococcal Protein A," in Gene Expression Technology, supra, p.144-161に記載されている。

【0126】

キメラタンパク質をBlaZRIレギュロンの制御下にクローン化した場合、 β -ラクタム抗生物質メタシリンの添加によって、発現が誘導される。

【0127】

本発明の別の態様は、上記の LPX_3X_4G モチーフの切断から生じる LPX_3X_4 アミノ酸配列の共有結合によって、グラム陽性菌の表面上に提示されるポリペプチドである。

【0128】

本発明の更に別の態様は：（１）提示されたポリペプチド；および（２）そのポリペプチドに共有架橋結合した抗原またはハプテン：を包含する共有結合複合体である。

【0129】

B. スクリーニング法

種々のスクリーニング方法において、グラム陽性菌の細胞表面に結合したそれらポリペプチドを用いることができる。例えば、そのタンパク質のための標識抗体または他の標識特異的結合パートナーを利用できる場合、特定の所望のタンパク質を発現するクローンをスクリーニングするために、細胞表面上に発現されたタンパク質を含有する発現ライブラリーからの発現タンパク質の試料を用いることができる。

【0130】

それら方法は、上記のタンパク質ターゲティングおよび提示のための方法に基づく。

【0131】

そのような方法の第1の実施形態は：（１）上記のようにカルボキシル末端にソーティングシグナルを有するキメラタンパク質としてクローン化ポリペプチドを発現させ；（２）（i）発現キメラタンパク質；（ii）実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素；ならびに（iii）ソーティングシグナルを介してソーターゼートランスアミダーゼが結合し得るポリペプチドを含むペプチドグリカンを含むグラム陽性菌：を含有する反応混合物を形成し；（３）そのポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、 LPX_3X_4G モチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁にポリペプチドを共有結合させ；さらに

(4) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする：

各工程を含む。

【0132】

当業界で周知の方法によってキメラタンパク質をコードする核酸断片を形成し、さらにスペーサーを加えることができる。

【0133】

最後の工程において、標識抗体または他の標識特異的結合パートナーに細胞を曝し、未反応抗体を洗浄によって除去し、さらに、例えば蛍光、化学ルミネッセンスまたはオートラジオグラフィー等の従来技術によって、細胞と結合した標識を検出する。

【0134】

本方法の第2の実施形態は、ソーターゼートランスアミダーゼ酵素を産生するグラム陽性菌における発現を用いる。本方法は：(1) 上記のカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するクローン化キメラタンパク質を作成するために、その発現についてスクリーニングすべきキメラタンパク質をコードする核酸断片をグラム陽性菌中にクローニングし；(2) カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するキメラタンパク質を作成するために、クローン化キメラタンパク質を発現するように、前記核酸断片をその中にクローン化した細菌を増殖させて、；(3) そのポリペプチドがリガンドに接近できるようにグラム陽性菌の表面上に提示されるように、LPX₃X₄Gモチーフ内でキメラタンパク質を切断すると共に、グラム陽性菌によって発現されたソーターゼートランスアミダーゼの酵素活性によって、細胞壁にポリペプチドを共有結合させ；さらに(4) 提示されたポリペプチドを標識特異的結合パートナーと反応させて、標識特異的結合パートナーとの反応性についてキメラタンパク質をスクリーニングする：各工程を含む。

【0135】

V. 細菌感染症の診断および治療のための局在化分子の使用

グラム陽性菌によって生じた細菌感染症の診断および治療のために局在化分子を用いることができる。上記のようにスペーサーを包含し得る局在化ペプチド断片に抗生物質分子または蛍光もしくは他の診断分子を化学的に結合させ、次にそれらを動物またはヒトに注射して差し支えない。それら分子が細菌の細胞壁に共有結合するように、それら分子はソーターゼートランスアミダーゼ酵素によって局在化する。

【0136】

概して：それら方法は：（１）カルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するタンパク質に対して、抗生物質または検出試薬を結合させて結合物を作成し；さらに（２）感染症を治療または診断するために、その結合体を細菌の細胞壁に局在化および共有架橋結合させるように、グラム陽性菌に感染した生物にその結合物を導入する：各工程を含む。

【0137】

用いられる抗生物質は、限定はされないが、ペニシリン、アンピシリン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、セファロスポリン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、パロモマイシン、 Tobroマイシン、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、リファンシピン、クロラムフェニコール、ノルフロキサシン、あるいはそれら抗生物質の誘導体であって差し支えない。

【0138】

検出試薬は、通常、例えば放射標識等、検出可能な標識で標識した、抗体または他の特異的結合パートナーである。そのような方法は当業界で周知であり、ここで更に説明する必要は無い。

【0139】

従って、本発明の別の態様は、その中に上記のカルボキシル末端ソーティングシグナルを包含するタンパク質に共有結合した抗生物質または検出試薬を含む結合物である。

【0140】

本発明の更に別の態様は、前記結合物および薬剤的に許容される担体を含有する組成物である。

【0141】

これに関して、限定はされないが、静脈内、腹腔内、経口またはリンパ腺内等、従来の投与形態を用いてその結合体を投与して差し支えない。他の投与経路を選択的に用いて差し支えない。経口または腹腔内投与が通常好ましい。限定はされないが、液体溶液または懸濁液、錠剤、丸剤、粉末、座剤、高分子マイクロカプセルまたは微小胞、リポソーム、および注射用または注入用液等の種々の剤形で、本組成物を投与して差し支えない。好ましい剤形は、投与形態および投与量に依存する。

【0142】

投与のための組成物は、好ましくは、例えばヒト血清アルブミン、イオン交換体、アルミナ、レシチン、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム等の緩衝化物質、ならびに例えば硫酸プロタミン等の塩または電解質等の当業界で周知の、従来の薬剤的に許容される担体およびアジュバントも含有する。本発明の方法において用いられる結合体のための最も効果的な投与形態および投与計画は、疾患の重篤性および経過、患者の健康状態、治療に対する反応、患者に感染している細菌の特定菌株、他に投与される薬剤およびそれらに対する耐性の発達、感染部位の血流への接触性、例えば投与された結合体の代謝および／排泄に影響を及ぼし得る患者の肝臓および／または腎臓の状態のような薬物動態学的検討、ならびに治療する医者判断に依存する。従って、個々の患者に対して用量を定めるべきである。

【0143】

V I. ワクチン作成のための局在化ポリペプチドの使用

さらには、本発明のグラム陽性菌細胞壁に共有架橋結合した局在化ポリペプチドは多くの用途を有する。1つの用途は、ヒトおよび例えば蓄牛、ヒツジおよびヤギ等のヒト以外の哺乳類等の哺乳類、ならびに家禽および魚等の他の動物を襲う感染性疾患に対する免疫を誘起するのに用い得るワクチンの作成における使用である。本発明は哺乳類に対して特に重要である。ワクチン産生のためのそれら複合体の有用性は、そのタンパク質が細胞壁の表面上にありかつ細菌細胞周囲の媒体に接近可能であり、それによってそのキメラタンパク質の抗原部分が抗原

プロセッシング系に接近可能であるという事実に存在する。粒子状の提示抗原が免疫反応を非常に高めることは周知である。実際、その共有結合相互作用によって細菌に結合した抗原ペプチドをその表面上に有する細菌は、天然アジュバントとして機能する。ここで、本発明の方法によってそれに対する有用な抗体が調製され得るポリペプチド抗原を発現する一般的微生物の代表的一覧を以下に示す：

(1) 真菌：カンジダ・アルビカンズ、アスペルギルス・フミガーツス、ヒストプラズマ・カプスラーツム（全て播種性疾患を生じさせる）、ミクロスポルム・カニス（動物白癬）

(2) 寄生原生動物：熱帯熱マラリア原虫（マラリア）、クルーズトリパノソーマ（眠り病）

(3) スピロヘータ；ボレリア・バーグドオルフェリー（ライム病）、トレポネーマ・パリダム（梅毒）、ボレリア・リカレンシス（回帰熱ボレリア菌）、レプトスピラ・イクテロヘモラギエ（レプトスピラ症）

(4) 細菌：ナイセリア・ゴノロエ（淋病）、黄色ブドウ球菌（心内膜症）、*Strep* レプトコッカス・ピオゲネス（リ्यूマチ熱）、サルモネラ・タイフォサ（サルモネラ症）、ヘモフィラス・インフルエンザ（インフルエンザ）、ボルデテラ・パータスシス（百日咳）、アクチノマイセス・イスラエリイ（アクチノマイセス症）、ストレプトコッカス・ミュータンス（虫歯）、ストレプトコッカス・イークイ（ウマの腺疫）、ストレプトコッカス・アガラクチエ（ウシの乳腺炎）、ストレプトコッカス・アンギノサス（イヌの性器感染症）

(5) ウィルス：ヒト免疫不全ウィルス（HIV）、ポリオウィルス、インフルエンザウィルス；狂犬病ウィルス、ヘルペスウィルス、手足口病ウィルス、オウム病ウィルス、パラミクソウィルス、ミクソウィルス、コロナウィルス。

【0144】

通常、得られる免疫反応は、液性および細胞性経路の両方によって生じる。1つの可能な免疫反応は、抗体の産生であり、それによって、病原菌感染に対する防御をもたらす。

【0145】

本方法は、タンパク質抗原に限定されない。以下に記載のような非タンパク質

抗原またはハプテンも、単独でまたはそのアミノ末端にあるスペーサーと共に非依存的に発現されるポリペプチドとして産生され得るC末端細胞壁標的部分に、共有結合できる。アミノ末端にあるスペーサーを用いる場合、通常、そのスペーサーは非タンパク質抗原またはハプテンと免疫系との効率的な相互作用をもたらす配置を有し、最も一般的に、ランダムコイルまたは α ヘリックスの形態であろう。そのスペーサーは、任意の適切な長さであって差し支えなく；通常、約5から約30アミノ酸の範囲であり；最も一般的には、約10から約20アミノ酸の長さである。本実施形態において、非依存的に発現されるポリペプチドは、発現されると直ぐに、ハプテンまたは非タンパク質抗原に共有結合することができる。一般的な非タンパク質抗原またはハプテンとして、麻薬および治療用薬剤の両方の薬剤、アルカロイド、ステロイド、炭水化物、多くの汚染物質等の芳香族化合物、ならびにタンパク質に共有結合してそれに対する免疫反応が誘起され得る他の化合物等が挙げられる。

【0146】

あるいは、タンパク質抗原が、非依存的に発現された細胞壁標的部分またはスペーサーを有する細胞壁標的部分に共有結合して差し支えない。

【0147】

タンパク質および非タンパク質化合物の両方をタンパク質に共有結合させる多くの方法は、当業界で周知であり、かつ例えば、P.Tijssen, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays" (Elsevier, Amsterdam, 1985), pp.221-295, and in S.S.Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking" (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993)に記載されている。

【0148】

タンパク質および非タンパク質化合物上の多くの反応基を結合のために利用できる。

【0149】

例えば、混合無水法、ジシクロヘキシルカルボジイミドを用いるカルボジイミド法、およびN-ヒドロキシスクシニミドエステル法を用いて、カルボキシル基を含有しまたはカルボキシル化され得る有機部分をタンパク質に結合させること

ができる。

【0150】

有機部分が、アミノ基または還元可能なニトロ基を含有し、あるいはそのような基で置換され得る場合は、1つまたは複数の技術によって結合を成すことができる。亜硝酸のゆっくりの添加によって芳香性アミンをジアゾニウム塩に転化し、その後、約9のpHでタンパク質を反応させることができる。有機部分が脂肪族アミンを含有する場合は、カルボジイミド、トリレン-2,4-ジイソシアネート、または特にマレイミド誘導体のN-ヒドロキシスクシミドエステルのようなマレイミド化合物等を用いる種々の方法によって、そのような基をタンパク質に結合させることができる。そのような化合物の例は、4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸である。別の例は、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシミドエステルである。用いることができる更に別の試薬は、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートである。また、ジメチルピメリミデート、ジメチルアジピミデートまたはジメチルスベリミデート等の二官能エステルも、アミノ基含有部分をタンパク質に結合させるのに用いることができる。

【0151】

さらには、p-ニトロベンゾイルクロライドとの反応および続くp-アミノベンゾイルアミドへの還元によって、脂肪族アミンを芳香族アミンに転化させることができ、それはジアゾ化後タンパク質に結合できる。

【0152】

多くの間接法によって、水酸基を有する有機部分を交差結合させることができる。例えば、アルコール部分をコハク酸の半エステル(half ester) (ヘミスクシネート) に転化することによって、結合に利用できるカルボキシル基をもたらす。二官能試薬セバコイルジクロライド(sebacoyldichloride)は、アルコールをpH 8.5でタンパク質と容易に反応する酸塩化物に転化する。ヒドロキシル含有有機部分は、等モル量のホスゲンを用いて調製される高反応性クロロカルボネートを介して結合できる。

【0153】

ケトンまたはアルデヒドを含有する有機部分については、O-（カルボキシメチル）オキシムの形成を介して、そのようなカルボニル含有基をカルボキシル基に誘導することができる。また、p-ヒドラジン安息香酸を用いてケトン基を誘導して、上記の特異的結合パートナーに結合し得るカルボキシル基をもたらすこともできる。アルデヒド基を含有する有機部分は、シッフ塩基の形成（その後水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元によって安定化される）を介して直接結合することができる。

【0154】

ヒドロキシル含有有機部分のための特に有用な1つの架橋試薬は、感光性の非切断性ヘテロ二官能架橋試薬である、スルホスクシニミジル6-[4'-アジド2'-ニトロフェニルアミノ]ヘキサノエートである。他の類似試薬については、S. S.Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking," *supra*に記載されている。

【0155】

有機部分と特異的結合パートナーとの間のスペーサーを導入する他の架橋試薬も用いることができる。

【0156】

それら方法についてここで更に説明する必要は無い。

【0157】

V I I . 実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素の作成

本発明の別の態様は、実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成する方法である。

【0158】

A. クローン化遺伝子の発現を含む方法

実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成するための1つの方法は、クローン化遺伝子、好ましくはs r t A遺伝子の発現を含む。ソーターゼートランスアミダーゼ酵素をコードする核酸断片の単離については上記している；それら核酸断片をベクター中に組み込み、その後、酵素が発現されるべき宿主を形質転換するのに用いる。1つの選択において、宿主はグラム陽性菌である

。

【0159】

本選択における次の工程は、グラム陽性菌において発現させて、クローン化ソーターゼートランスアミダーゼ酵素を作成することである。発現は、通常、例えば *srtA* 遺伝子のコード領域等のソーターゼートランスアミダーゼ遺伝子をコードするDNAが組み込まれるベクターに関連する種々の制御要素の制御下であり；そのような要素としてレプレッサー等のタンパク質によって調節され得るプロモーターおよびオペレーターが挙げられる。グラム陽性菌、特に黄色ブドウ球菌におけるクローン化タンパク質の発現に必要とされる条件は、当業界で周知であり、ここで更に挙げる必要は無い。例えば、メチシリンの添加によって誘導される *BlaZR* レギュロンの制御下におけるリソスタフィンの発現の誘導が挙げられる。

【0160】

黄色ブドウ球菌において発現される場合、通常、キメラタンパク質は、例えばクローン化リソスタフィンのアミノ末端領域にある疎水性シグナルペプチド等のアミノ末端リーダーペプチドと共に、最初に運び去られる(P.Recsei et al., “Cloning, Sequence, and Expression of the Lysostaphin Gene from *Staphylococcus simulans*,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1127-1131(1987))。

【0161】

あるいは、例えば大腸菌またはサルモネラ・タイフィムリウム（ネズミチフス菌）等の別の生物においてソーターゼートランスアミダーゼの発現をもたらす配列を包含するベクター中に、ソーターゼートランスアミダーゼ酵素をコードするクローン化核酸断片を挿入して差し支えない。その後、クローン化核酸断片を包含するベクターで適切な宿主生物を形質転換またはトランスフェクトして差し支えない。さらに、その宿主において発現が成される。

【0162】

次に、標準技術を用いて、発現された酵素を精製する。クローン化タンパク質の精製技術は当業界で公知であり、ここで更に詳述する必要は無い。特に適切な1つの精製法は、ソーターゼに対する固相抗体を用いたアフィニティークロマト

グラフィーである

他のタンパク質精製法として、イオン交換樹脂におけるクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動、およびゲル濾過等が挙げられる。

【0163】

カルボキシル末端において、ヒスチジン残基によって伸長されている、例えばソーターゼートランスアミダーゼ、ならびに例えばグルタチオンS-トランスフェラーゼおよびチオレドキシンのような他のタンパク質等のクローン化タンパク質のためのアフィニティークロマトグラフィーの1つの特に有用な形態は、ニッケル-セファロースカラムにおけるクロマトグラフィーである。その方法は、ヒスチジン残基を介してニッケル-セファロースカラムにタンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数のヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されているソーターゼートランスアミダーゼ酵素の精製を可能とする。さらに、イミダゾールで結合タンパク質を溶出させる。通常、6以上のヒスチジン残基を付加し；好ましくは6ヒスチジン残基を付加する。例えばソーターゼートランスアミダーゼ等のクローン化タンパク質にヒスチジン残基を付加する1つの方法は、ヒスチジン残基をコードするヌクレオチドを包含するプライマーを用いたPCRによって成される。ヒスチジンコдонは、RNAとして表した場合CAUおよびCACであり、DNAとして表した場合CATおよびCACである。適切なプライマーを用いたクローン化DNAの増幅によってヒスチジン残基を付加し、新しい核酸断片を得ることができ、ヒスチジン残基で伸長された酵素の発現のために、適切な宿主中にその核酸断片を再クローン化して差し支えない。

【0164】

B. 他の方法

あるいは、硫酸アンモニウムまたは硫酸プロタミン等の試薬を用いた沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル電気泳動、ならびに当業界で公知の他の方法等の標準方法によって、グラム陽性菌からソーターゼートランスアミダーゼを精製することができる。

【0165】

ソーターゼートランスアミダーゼはシステインプロテアーゼであるため、特に有用な1つの精製法は、セファロース2B-グルタチオン2-ピリジルジスルフィドまたはセファロース6B-ヒドロキシプロピル2-ピリジルジスルフィド等の2-メルカプトピリジン離脱基を含有する2プロトン状態のゲルを用いたチオールジスルフィド置換によるコバレントクロマトグラフィーを含む。そのようなコバレントクロマトグラフィー技術については、K. Brocklehurst et al., “Cysteine Proteases,” in New Comprehensive Biochemistry, Volume 16: Hydrolytic Enzymes (A. Neuberger & K. Brocklehurst, eds., Elsevier, New York, 1987), ch. 2, pp.39-158に記載されている。

【0166】

V I I I. ソーターゼートランスアミダーゼの更に別の用途

A. 抗体の作成

ソーターゼートランスアミダーゼが細菌から精製されたかあるいは遺伝子クローニング法によって得られた組換え細菌から産生されたかに拘わらず、本発明の実質的に純粋なソーターゼートランスアミダーゼに対する抗体を調製することができる。本発明の実質的に純粋な酵素はタンパク質であるため、本酵素は有効な抗原であり、さらに、例えばE. Harlow & D. Lane, “Antibodies: A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor laboratory, 1988)に開示されているような、よく理解された方法によって抗体を作成することができる。通常、抗体調製は、例えばフロイントの完全または不完全アジュバント等のアジュバントと共に、またはアジュバント無しで、抗体を産生させるべき動物をタンパク質で免疫にして、さらに産生された抗体を精製することを含む。得例えばアフィニティークロマトグラフィー等の技術によって、得られたポリクロナール抗体を精製する。

【0167】

ポリクロナール抗体が調製されれば、Harlow & Lane, supraの第6章に記載のような標準方法によって、モノクロナール抗体を調製することができる。

【0168】

B. アフィニティークロマトグラフィー

本発明の別の態様は、そのヒスチジン残基を介してニッケル-セファロースカ

ラムにそのタンパク質分子を特異的に結合させるのに十分な数のヒスチジン残基によってそのカルボキシル末端において伸長されている、本発明のクローン化された、実質的に純粋なソーターゼトランスアミダーゼの誘導体である。通常、6以上のヒスチジン残基を付加し；好ましくは6ヒスチジン残基を付加する。

【0169】

上記のようにPCRクローニングによって、カルボキシル末端にヒスチジン残基を付加することができる。

【0170】

以下の実施例によって本発明をさらに説明する。本実施例は、単に例示のためであり、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されない。

【0171】

実施例1

細胞壁ソーティングにおけるブドウ球菌突然変異体欠損の同定

化学的突然変異誘発による温度感受性(ts)突然変異体の産生

細胞壁ソーティング突然変異体は、黄色ブドウ球菌(aureus)菌株0S2の条件致死突然変異体の個体群から産生され単離される。ブドウ球菌属は、ニトロソグアニジンにより突然変異化され、コロニーは30°Cでプレーティングすることにより形成された。細菌はすじ状になり、30°Cおよび42°Cでインキュベートすることにより、突然変異体が増殖について温度感受性(ts)であることを同定した。1000のts突然変異体の集まりを、pSEB-SPA490-524(0. Schneewind, D. Mihaylova-Petrov, P. Model, EMBO 12,4803(1993))により形質転換し、レポータータンパク質を明示して表面タンパク質結合を測定した。SEB-SPA₄₉₀₋₅₂₄前駆体(P1)は、細胞質から運び出され、そのNH₂末端リーダーペプチドを除去してP2中間体を産生する(図2A)。P2前駆体は、LPXTGモチーフのトレオニンとグリシンとの間のポリペプチドを開裂し、成熟固着表面タンパク質(M)を産生するソーターゼについての基質である。野生型ブドウ球菌属を[³⁵S]メチオニンで5分間標識することにより分析した場合、P1前駆体の開裂は、P2の種類の開裂より早く、P1(5%)、P2(19%)、およびM(76%)の濃度の割合を生ずる(図2B)。この分析を使用して、1000のts突然変異体をスクリーニングし、2つの菌株がそれぞれ47%(SM317)および26%(S

M329)でP2前駆体を蓄積させたことを同定した(図2B)。ソーティング反応をさらに調べるために、突然変異体および野生型ブドウ球菌属を、パルスチェイス分析にかけた(図2C)。黄色ブドウ球菌OS2(野生型)は、2分以内にP1前駆体を開裂し結合した。パルスラベルされたP2の開裂および細胞壁結合に10分以上必要なので、菌株SM317中のソーティング反応は非常に減少した。菌株SM329は、1週間の欠損のみを示し、P2プロセッシングには3分間を要した(図2C)。最少培地中で培養したブドウ球菌属をパルスラベルすることにより調べた場合、SM329は、細胞壁ソーティングにおいてはるかに著しい欠損を示した。

【0172】

突然変異菌株SM317における表面タンパク質の固着構造

突然変異SM317とSM329のいずれが細菌細胞壁の合成において欠損であるかを調べるために、2つのテストを行った。リソスタフィン[®]は、中央のグリシン残基においてブドウ球菌の細胞壁のペンタグリシン架橋を切断する溶菌酵素である(C. A. Schindler and V. T. Schuhardt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 414(1964); B. L. M. de Jonge, Y. S. Chang, D. Gage, A. Tomasz, J. Biol. Chem. 267, 11248(1992))。以前に報告されているように、fem突然変異体は、このバクテリオシンに対して耐性を示し、大量のリソスタフィンの存在下でも増殖する(U. Kopp, M. Roos, J. Wecke, H. Labischinski, Microb. Drug Resist. 2, 29(1996))。菌株SM317およびSM329は、野生型ブドウ球菌属の増殖も抑制する濃度でリソスタフィンに対して感受性であり、これによりSM317におけるソーティング欠損が突然変異により変化した細胞壁の架橋によるものではないことが示される。細菌の細胞壁合成を測定するために、ブドウ球菌属を最少培地中で培養し、^{[3]H}リシンおよび^{[3]H}ロイシンで標識した(D. Boothby, L. Daneo-Moore, G. D. Shockman, Anal. Biochem. 44, 645(1971))。ロイシンはそうではないが、リシンは細菌の細胞壁の構成要素なので、沈殿可能なおよびプロテアーゼ耐性のムレインポリマーに混合した^{[3]H}リシン/^{[3]H}ロイシンの割合により、細胞壁合成について測定される(D. Boothby, L. Daneo-Moore, G. D. Shockman, Anal. Biochem. 44, 645(1971))。野生型ブドウ球菌属は30の割合を示したのに対し、培養培地にバンコマイシンを加えることにより混合したリシン/ロイシンの割合は1.5ま

で減少した（20倍の抑制）。菌株SM317およびSM329は、18および19の割合を示し、突然変異体SM317におけるP2前駆体の蓄積は細胞壁合成の欠損により起こるのではないことが示される。

【0173】

菌株SM317における表面タンパク質の細胞壁固着構造が測定された（図3）。レポータータンパク質SEB-MH6-CWSを示すプラスミドpHTT4を、黄色ブドウ球菌SM317に形質転換した(H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 272, 22285(1997))。ブドウ球菌属細胞壁を精製し、グリカン鎖を加水分解するムラミダーゼであるミュータノリシンで分解した(K. Yokogawa, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 6, 156(1974))。ミュータノリシンで遊離された表面タンパク質を、Ni-NTA上でクロマトグラフィにより精製し、臭化シアンによりメチオニン残基において分解した(H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 272, 22285(1997))。細胞壁固着構造を支持するC00H末端ペプチドを、第2のアフィニティクロマトグラフィ工程により精製し、MALDI-MSにより分析した（図3B）。規則正しく区切られた分子量の増加を有する一連のイオンシグナルが現れ、これは表面タンパク質のC00H末端トレオニンに結合する1,2,3,4,5および6のペプチドグリカンサブユニットと一致する測定値であった。ムアノリシンで可溶化された結合ペプチドのイオンシグナルは、細胞壁テトラペプチド（予想分子量2235；観察された分子量2236）、ペンタペプチド（予想分子量2306；観察された分子量2306）、N,06-ジアセチルMurNac-GlcNacテトラペプチド（予想分子量2755；観察された分子量2756）、N,06-ジアセチルMurNac-GlcNacペンタペプチド（予想分子量2826；観察された分子量2826）、ムレイナーテトラペプチドームレイナーペンタペプチド（予想分子量3991；観察された分子量3995）、（ムレイナーテトラペプチド）₂ームレイナーペンタペプチド（予想分子量5194；観察された分子量5196）、（ムレイナーテトラペプチド）₄（予想分子量6285；観察された分子量6285）、（ムレイナーテトラペプチド）₄ームレイナーペンタペプチド（予想分子量7581；観察された分子量7583）、（ムレイナーテトラペプチド）₅ームレイナーペンタペプチド（予想分子量8783；観察された分子量8784）に結合したH6AQALPET-Gly5であることが明らかとなった。表面タンパク質が架

橋した菌株SM317のペプチドグリカンにつながれている場合、ムラミダーゼで可溶化された結合ペプチドのfl1ヒドロラーゼによる分解により、ムレインテトラペプチドおよびジサッカリド-テトラペプチドに結合した結合ペプチドが産生される(H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 272, 22285(1997); W. W. Navarre, H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 274, in press(1999)) (図3)。このことを試験し、二重に分解された結合ペプチドは、 m/z 2236[L-Ala-D-iGln-L-Lys(NH₂-H6AQALPET-Gly5)-D-Ala、予想分子量2235]、2714[MurNac(L-Ala-D-iGln-L-Lys(NH₂-H6AQALPET-Gly5)-D-Ala)-GlcNac、予想分子量2713]および2756[06-アセチル-MurNac(L-Ala-D-iGln-L-Lys(NH₂-H6AQALPET-Gly5)-D-Ala)-GlcNac、予想分子量2756]を産生した(図3C)。したがって、黄色ブドウ球菌SM317の表面タンパク質は、野生型ブドウ球菌属におけるポリペプチドの固着構造と区別のつかない様式で架橋したペプチドグリカンに結合する(W. W. Navarre, H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 273, 29135(1998))。これらの結果により、菌株SM317におけるP2前駆体の蓄積はソーターゼの欠損により起こり得ることが示される。

【0174】

ソーターゼ遺伝子についてのスクリーニング

マルチコピープラスミドからのソーターゼの過発現により、野生型および突然変異体ブドウ球菌属におけるP2の濃度が減少する。2000の3-5kbランダム黄色ブドウ球菌OS2染色体DNA挿入のプラスミドライブラリを、菌株SM317におけるP2前駆体の濃度を減少させる原因である配列についてスクリーニングした。2つのプラスミド、pGL1631およびpGL1834がこのスクリーニングの目的に合致した(図4)。pGL1834による形質転換により、P2濃度が、菌株SM317において44%から9%まで、SM329において26%から12%まで、および野生型黄色ブドウ球菌OS2において17%から8%まで減少した。パルスチェイス分析により測定した場合、黄色ブドウ球菌OS2(pGL1834)は、SM317およびSM329においても観察された表現型である、P2前駆体の急速に増加したプロセッシングを示した(図4C)。DNA配列決定により、pGL1631およびpGL1834は、同一の重複配列を有するブドウ球菌染色体DNA挿入を含有することが示された。P2濃度の減少を促進するのに十分なDNA配列を、s

rtA（表面タンパク質ソーティングA(sorting A)）と称される遺伝子上に位置付けた（図5）。

【0175】

srtA遺伝子

srtA遺伝子（配列番号2）は、206アミノ酸のポリペプチド鎖を示す（図6；配列番号3）。MH2末端に近い18の疎水性アミノ酸の配列は、シグナルペプチド／膜結合配列の存在を示す。この特徴は、LPXTGモチーフを支持するポリペプチド基質が細胞質膜を通して位置を換えた後に細胞壁結合が細胞表面で起こるという概念と一致する。ソーターゼとしての機能と一致したsrtA遺伝子の別の特性は、システインを示すコドン184の存在である。細胞壁ソーティング反応は、スルフヒドリルとともにジスルフィドを形成する物質である(D. J. Smith, E. T. Maggio, G. L. Kenyon, Biochemistry 14, 764(1975))メタンチオスルホネートに感受性であるので、システインの存在はソーターゼ相同体の保存された特徴である。

【0176】

すべてではないが多くのグラム陽性病原体は、ソーティングシグナルにより媒介される機構により表面上のタンパク質を示す(W. W. Navarre and O. Schneewind, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 174(1999))。したがって、srtA遺伝子がソーターゼを示す場合、相同体遺伝子は、他のグラム陽性病原体のゲノム中に見られる。エンテロコッカスファエカリス、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカスピオゲネス、ストレプトコッカスニューモニエ、およびストレプトコッカスマュータンスの染色体DNA配列を調べ、srtA遺伝子の存在が示された（図7）。データベースサーチによっても、枯草菌およびネスルンド放線菌におけるsrtAに相同の配列が同定された。すべてのsrtA相同体は、システインを完全に保存し、そのまわりのペプチド配列を著しく保存することを示した（図7）。ストレプトコッカスニューモニエは、それぞれsrtBおよびsrtCと称される一つ以上のsrtA相同体を収容する。エンテロコッカスファエカリスおよびネスルンド放線菌のsrtA様遺伝子は、C00H末端ソーティングシグナルを有する表面タンパク質を示す構造遺伝子に隣接する。枯草菌の染色体中にsrtA相同体が存在することは、ソーティング

シグナルを含有するLPXTGモチーフがこの有機体中で同定されていないので、驚くべきことである。ネスルンド放線菌中のsrtA相同体の一つである、上記に示されたorf365を突然変異させて、突然変異体放線菌の線毛集合をなくした(M. K. Yeung, J. A. Donkersloot, J. O. Cisar, P. A. Ragsdale, J. Bacteriol. 66, 1482(1998))。放線菌の線毛は、LPXTGモチーフを支持するタンパク質サブユニットからなるが(M. K. Yeung and J. O. Cisar, J. Bacteriol. 172, 2462(1990))、線毛集合の機構(重合)は未だ理解されていない。

【0177】

菌株SM317中のsrtA遺伝子

黄色ブドウ球菌SM317の細胞壁ソーティングにおける欠損がsrtA遺伝子における突然変異により起こるのか否かを調べるために、黄色ブドウ球菌0S2およびSM317の染色体DNAから対応する配列をPCR増幅した。マルチコピーベクター中にクローニングされ、黄色ブドウ球菌SM317に形質転換されると、野生型ブドウ球菌属から増幅されたsrtA遺伝子はP2濃度を44%から12%まで減少させるのに対し、黄色ブドウ球菌SM317の染色体DNAから増幅された同じ遺伝子は親菌株のP2濃度を減少させなかった(図4B)。したがって、srtA遺伝子は菌株SM317中で欠損しており、DNA配列決定によりコドン35および180において突然変異が同定された。突然変異体菌株のts表現型におけるSM317中の野生型srtAの発現を調べた。srtAのマルチコピー発現(pGL1894)により、野生型ブドウ型球菌について観察されたよりも少ない割合でも42°CでSM317の培養が可能となった。この結果により、黄色ブドウ球菌SM317の条件致死表現型はsrtA遺伝子における突然変異によってのみ起こるのではないことが示される。野生型srtAをコードするプラスミドの発現により、黄色ブドウ球菌SM329のts増殖表現型は変化しなかった。

【0178】

ソーターゼおよび細胞壁ソーティング反応

srtA遺伝子を、P2前駆体蓄積のマルチコピーサプレッサとして単離し、これはソーターゼについての遺伝子によってのみかなえられる計画である。ランダム3-5kb染色体DNA挿入を支持する2000のプラスミド形質転換体のライブラリから一つの遺伝子のみ(srtA)がこのスクリーニングで観察された。さらなる観察により

、SrtAタンパク質はLPXTGモチーフを支持する基質のペプチド転移を触媒することが示され、これによりSrtAはソーターゼ活性を示すことが示される。精製されたSrtAタンパク質を使用して、ソーターゼを抑制する化合物をスクリーニングすることができる。そのような化合物は、グラム陽性菌により生ずる人の感染の治療に有用かもしれない。

【0179】

物質および方法

黄色ブドウ球菌菌株0S2の突然変異誘発

ブドウ球菌属(1×10^{12} cfu)を、0.2mg/ml N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより45分間30°Cで処理し、二倍量の100mMリン酸ナトリウム、pH7.0を加えることにより突然変異誘発を終了させた。約80%の突然変異誘発された個体群を殺し、リファンピシン(rifampicin)耐性rpoBの突然変異頻度を 1.2×10^{-4} まで増加した。42°Cでトリプシン大豆汁中で突然変異誘発された個体群を培養し、2時間8 μ g/mlペニシリンGで処理することにより温度感受性突然変異体を選択し、選択を二度繰り返した。コロニーは30°Cで形成され、トリプシン大豆アガー上ですじ状になり、42°Cで増殖について調べた。

【0180】

コンピテント細胞の形質転換

ブドウ球菌属を、OD₆₆₀ 0.6まで30°Cでクロラムフェニコール(10mg/ml)またはテトラサイクリン(2mg/ml)を補ったトリプシン大豆汁中で培養した。細胞を42°Cで20分間インキュベートし、15,000×gで3分間遠心分離することにより沈降させ、1mlの予め暖めた最少培地により洗浄した[Schneewind, O., Model, P., Fischetti, V. A. (1992) Cell 70, 267]。ブドウ球菌属を、50mCiの $[^{35}\text{S}]$ -Promix(Amersham)で5分間標識し、75mlの100%TCAを加えることにより表面タンパク質プロセッシングを終了させた。TCA沈殿を遠心分離により集め、アセトン中で洗浄し、真空下で乾燥させた。サンプルを1mlの0.5M Tris-HCl, pH7.0中に懸濁し、ブドウ球菌属ペプチドグリカンに37°Cで1時間50mlの2mg/mlリソスタフィン(AMBI Pharmaceuticals)を加えることにより分解した。タンパク質を再びTCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、a-SEBで免疫沈降させた後、14%SDS-PAGEおよび蛍光イメージ

ヤーにより分析した。

【0181】

突然変異体のパルスチェイススクリーニング

ブドウ球菌属を上述のように培養し、5mlを500mCiの[35S]-Promix(Amersham)で45秒間標識した。50mlのチェイス(100mg/mlのアミノ酸、20mg/mlメチオニンおよびシステイン)を加えることにより放射能の導入を終了させた。チェイスを加えた後一定の間隔で、1mlのアリコートを取りだし、75mlの100%TCAを加えることによりタンパク質を沈殿させた。サンプル製剤について上述と同じ工程を行った。

【0182】

DNA配列決定

pGL1631および1834のDNAインサートを位置付け、配列決定された500ヌクレオチド離れたテンプレートDNAにアニーリングするオリゴヌクレオチドプライマーを合成することにより配列決定した。黄色ブドウ球菌菌株OS2およびSM317の染色体DNAからsrtAを増幅するためのプライマーは、5' -AAGGATTCAAAAGGAGCGGTATACATTGC-3' (配列番号32) および5' -AAGGATCCTACCTTTTCCTCTAGCTGAAC-3' (配列番号33) であった。

【0183】

実施例2

細胞壁ソーティングの抑制因子

表面タンパク質の結合を妨げる抗生物質細胞壁合成抑制因子の高かを調べるために、グラム陽性菌ソーティングアッセイにおいて多くの抑制因子を調べた。ソーティング反応の化学的抑制因子について調べることにより、メタンチオスルホネートおよびp-ヒドロキシメルクリ安息香酸が同定された。したがって、LPXTGモチーフにおいて表面タンパク質を開裂すると考えられる酵素であるソーターゼは、表面タンパク質の結合のための基質としてペプチドグリカン前駆体を使用するが細胞壁を使用しないスルフヒドリル含有酵素のようである。

【0184】

表面タンパク質の結合を妨げる化合物を同定するために、黄色ブドウ球菌OS2

細胞中で発現した場合に、細胞質中で前駆体として合成されNH₂末端リーダーペプチド (P1前駆体) により分泌経路に導入されるレポータータンパク質Seb-Spa490-524を使用した(Schneewind, O., mihaylova-Petkov, D. and Model, P.(1993)EMBO 12, 4803-4811)。シグナルペプチド開裂後、COOH末端ソーティングシグナルを支持するP2前駆体は、LPXTGモチーフのトレオニンとグリシンとの間を開裂する酵素であるソーターゼについての基質として作用する(Navarre, W. W. and Schneewind, O.(1994)Mol. Microbiol. 14, 115-121)。細胞壁架橋へのトレオニンおカルボキシルのアミド結合により、成熟固着表面タンパク質(M)が酸性される(Schneewind, O., Fowler, A. and Faull, K. F.(1995)Science 268, 103-106)。表面タンパク質プロセッシングを、[³⁵S]メチオニンによるパルスラベルポリペプチドにより調べた。パルスの間、P1およびP2並びに成熟したSeb-Spa490-524の3つのすべての種類が検出できた(図8B)。チェイスを加えた後1分以内に、ほとんどのパルス標識表面タンパク質が成熟固着した種類に変換された。表面タンパク質結合は、[³⁵S]メチオニンの混合が終わった3分後に終了した。

【0185】

アジ化ナトリウムは、細菌における分泌経路の本質的成分であるSecAの抑制因子である(Oliver, D. B., Cabelli, R. J., Dolan, K. M. and Jarosik, G. P.(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8227-8231)。パルスラベルの5分前にブドウ球菌属培養液に5mMのアジ化ナトリウムを加えることにより、タンパク質輸送が著しく減少し、P1前駆体を支持するリーダーペプチドが蓄積された(Schneewind, O., Model, P. and Fischetti, V. A.(1992)Cell 70, 267-281)。スルフヒドリルとのメタンチオスルホネートの反応(Akabas, M. H. and Karlin, A.(1995)Biochemistry 34, 12496-12500)およびこれらの化合物の一つである[2-(トリメチルアンモニウム)エチル]メタンチオスルホネート(MTSET)は、ブドウ球菌属による[³⁵S]メチオニンの混合を妨げた。しかしながら、パルス開始の15秒後に加えた場合、MTSETはLPXTGモチーフにおいてソーティングシグナルの開裂を妨げるのに対し、P1前駆体のSec依存性の輸送は変化しないままである。この結果により、ソーターゼはソーティングシグナルを支持するLPXTGにおいて酵素開裂するために必要なスルフヒドリルを収容することが示された。

【0186】

酵素活性についてのスルフヒドリルにおけるソーターゼの必要性を、他のスルフヒドリル物質を加えることによりおよびLPXTGモチーフにおいてソーティングシグナルの開裂の抑制を分析することによりテストした。他のメタンチオスルホネートであるMTSESもまた、MTSETほど有効ではないにしても、ソーティングを妨げた(表1)。システインプロテアーゼを抑制することが知られる有機水銀剤であるpHMBもまた抑制効果を示すのに対し、N-エチルマレイミド、ヨードアセトンおよびヨードアセトアミドのようなアルキル化薬は示さなかった(Creighton, T. E. (1993) Proteins. W. H. Freeman and Company, New York)。スルフヒドリル減少剤、すなわちジチオスレイトールおよびメルカプトエタノールは、ソーティング反応に影響を与えなかった。ヒドロキシルと反応するPMSF(Creighton, T. E. (1993) Proteins. W. H. Freeman and Company, New York)および二価陽イオンキレーターEDTAによる処理はいずれも細胞壁ソーティングを妨げず、ソーターゼが表面タンパク質の開裂および結合のために二価陽イオンまたはヒドロキシルを必要としないことが示された。

【0187】

細菌の細胞壁合成および細胞壁ソーティングの抗生物質による抑制

細胞壁ソーティングにおける既知の抗生物質の効果を調べるために、ペニシリン、バンコマイシンおよびモエノマイシン(moenomycin)の3つの化合物を使用した。黄色ブドウ球菌0S2(pSeb-Spa490-524)を、A600が0.3になるまで最少培地中で培養し、10 µg/mlのペニシリン、バンコマイシン、またはモエノマイシンで処理し、さらに5時間インキュベートした(図9A)。この実験中30分の間隔で、表面タンパク質ソーティングおよび細胞壁合成の測定のためにアリコートを取り出した。細菌の細胞壁合成の速度における抗生物質の効果を、酸沈殿可能なプロナーゼ耐性ペプチドグリカンに組み込まれた³Hリシン/³Hロイシン標識の割合として測定した。リシンはペプチドグリカンの構成要素であるのに対し、ロイシンはそうではない。したがって、これらの2つのアミノ酸の組込みの割合が細胞壁合成についての測定値である。表面タンパク質結合を、パルスラベルにより測定し、P2前駆体[P2]と成熟固着Seb-Spa490-524[M]との濃度間の割合として定量

した。

【0188】

バンコマイシン、ペニシリンまたはモエノマイシンを加えることにより、偽処理された対照と比較してブドウ球菌属の増殖の速度が減少した。偽処理されたブドウ球菌属の増殖中、細胞壁ソーティング前駆体開裂の速度が一定なままであるのに対し、バンコマイシンを加えることにより、P2前駆体が安定して蓄積され、このことは、この化合物がソーティング反応の減少の原因であることを示す。モエノマイシンをブドウ球菌属培養液に加えた場合、より弱いが同様の効果が観察された。対照的に、ペニシリンGは、細胞壁ソーティングの速度を変化させなかった。予想されるように、3つのすべての抗生物質により、ペプチドグリカン合成の速度が減少した(表2)。これらのデータにより、バンコマイシンおよびモエノマイシンにより、細胞壁ソーティングの速度が減少されるのに対し、ペニシリンは表面タンパク質結合に影響を与えなかったことが示された。

【0189】

ブドウ球菌プロトプラストにおける細胞壁ソーティング

既述の作業により、ブドウ球菌属のムラライティック(muralytic)分解または連鎖球菌L形態のペニシリン選別により産生されたプロトプラストは、表面タンパク質を周囲の培地に分泌することが示された(van de Rijn, I. And Fischetti, V. A.(1981)Infect. Immun. 32, 86-91; Movitz, J.(1976)Eur. J. Biochem. 68, 291-299)。このことは、二つの方法で説明できる。いずれのC末端ソーティングシグナルも、プロトプラストのエンベロープ中で表面タンパク質を保有できない、または無傷の集合した細胞壁はLPXTGモチーフにおいてソーティングシグナルの開裂に必要ではない。これらの可能性を区別するために、無傷の細菌およびブドウ球菌プロトプラスト中で結合する表面タンパク質を測定した(図10)。野生型ブドウ球菌属は、Seb-Cws-BlaZ前駆体を切断して、成熟固着NH2末端SebおよびCOOH末端の細胞質BlaZ断片を産生した(Navarre, W. W. and Schneerwind, O.(1994)Mol. Microbiol. 14, 115-121)。細胞壁のリソスタフィン分解により産生されたブドウ球菌プロトプラストでテストした場合、前駆体開裂は、完全な細胞と同様に起こり、これにより成熟固着細胞壁はソーティングシグナルの開裂

に必要でないことが示された。成熟固着Sebよりゆっくりと移動したプロトプラストにおける独特のソーティング産物（図10Bの矢印参照）を観察した。これらの種類はa-Sebにより免疫沈降されるがa-BlaZでは免疫沈降されないで、ソーティング反応の産物を示すようである。これらのプロトプラストの種類のC00H末端アンカー構造は、リソスタフィンを放出するSebよりもSDS-PAGE上でゆっくりと移動するので、リソスタフィン分解により産生されるものと異なる。

【0190】

すべての開裂されたSeb断片が細胞外培地中に放出されるか否かを調べるために、パルス標識されたプロトプラストを、遠心分離することにより沈殿させ、上澄中の細胞外培地から分離した。すべてのSeb-Cws-BlaZ前駆体およびC00H末端BlaZ開裂断片は、プロトプラストともに沈殿した。対照的に、無傷のブドウ球菌属の細胞壁からリソスタフィン分解により放出されるSebと同じ速度で移動するNH₂末端Seb断片は、培養培地中で可溶性であった。よりゆっくりと移動するSebの種類すべてではないがいくつかは、ペレットに沈殿し、これによりソーティング反応のこれらの産物はプロトプラスト膜に結合するかもしれないことが示された。全体の細胞またはブドウ球菌プロトプラストのいずれにおいても、Seb-CwsDLPXTG-BlaZについて前駆体開裂は観察されなかった。

【0191】

物質および方法

細菌の菌株およびプラスミド

プラスミドpSeb-Spa490-524(3)、pSeb-Csw-BlaZ、およびpSeb-CwsDLPXTG-BlaZ (Navarre, W. W. and Schneewind, O. (1994) Mol. Microbiol. 14, 115-121)を、黄色ブドウ球菌OS2(spa:ermC,r-)に形質転換し(Schneewind, O., Model, P. and Fischetti, V. A. (1992) Cell 70, 267-281)、上述のように記載した。ブドウ球菌属は通常、トリプシン大豆汁またはアガー中で培養される。すべての化学物質は、他に記載されない限り、Sigma社から購入した。

【0192】

細胞壁ソーティング中間体の特徴付け

黄色ブドウ球菌OS2(pSeb-Spa490-524)を、CDM中で一晚培養し(van der Rijn,

I. And Kessler, R. E. (1980) *Infect. Immun.* 27, 444-448) (Jeol BioSciences)、クロラムフェニコール(10mg/ml)を加え、最少培地に1:10に希釈し、37°Cで振盪しながらA600まで培養した。細胞を、100mCiの $[^{35}\text{S}]$ -Promix(Amersham)で1分間標識した。非放射性アミノ酸[50ml チェイス(100mg/ml キラスアミノサン、20mg/mlメチオニンおよびシステイン)]を加えることにより標識を終了させた。チェイスを加えた後、0,1,3,および10分の一定の間隔で、250mlのアリコートを取り出し、250mlの10%TCAを加えることによりタンパク質を沈殿させた。15,000×gで10分間遠心分離することにより沈殿を沈降させ、1mlのアセトンで洗浄し乾燥させた。サンプルを1mlの0.5M Tris-HCl, pH6.8に懸濁し、50mlのリソスタフィンを加え (Schindler, C. A. and Schuhardt, V. T. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 414-421) (100mg, AMBI Pharmaceuticals)、37°Cで1時間インキュベートすることによりブドウ球菌ペプチドグリカン进行分解した。タンパク質を再びTCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、a-Sebで免疫沈降させた後SDS-PAGEおよび蛍光イメージャー分析を行った。P1およびP2前駆体进行特徴付けるために、1mlの培養液を、標識前に5分間5mMのアジ化ナトリウムとともにインキュベートする、またはパルスの開始後15秒間5mMのMTSETを加えた。

【0193】

細胞壁ソーティングの抗生物質による抑制

CDM中で培養された黄色ブドウ球菌0S2(pSeb-Spa490-524)の一晩の培養液を、新鮮な最少培地中に希釈し、A600が0.3になるまでインキュベートした。次に培養液を、ペニシリン(10mg/ml)、バンコマイシン(10mg/ml)、モエノマイシン(10mg/ml)により処理するまたは未処理のままにする。0.5mlの培養サンプルを取り出し、100mCiの $[^{35}\text{S}]$ -Promix(Amersham)で5分間標識した。0.5mlの10%TCAを加えることにより標識を終了させタンパク質を沈殿させた。遠心分離により沈殿を集め、アセトンで洗浄し、真空下で乾燥させた。ペレットを1mlの0.5M Tris-HCl, pH7.0中に懸濁し、リソスタフィン(100mg/ml, AMBI Pharmaceuticals)を加え、37°Cで1時間インキュベートすることによりブドウ球菌の細胞壁进行分解した。タンパク質をTCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、乾燥させ、50mlの0.5M Tris-HCl, pH7.5, 4%SDS中に溶解し、10分間煮沸した。可溶化した表面タンパク質のアリコー

トを、a-Sebで免疫沈降させ、SDS-PAGEおよび蛍光イメージャー分析を行った。

【0194】

ペプチドグリカン合成の測定

上述のように抗生物質の存在および非存在下でブドウ球菌属を培養した。30分の間隔で、0.5mlの培養サンプルを取り出し、50mCi [^3H] リシンまたは50mCi [^3H] ロイシンで20分間標識した(Boothby, D., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D. (1971) Anal. Biochem. 44, 645-653)。0.5mlの20%TCAを加えることによりすべての標識を終了させた。サンプルを30分間96°Cまで加熱し、室温まで冷却し、ガラス繊維フィルタ上にピペッティングした。フィルタをホルダ中に配置し、真空吸引下で25mlの75%エタノールおよび2mlの50mM Tris-HCl, pH7.8で洗浄した。5ml プロナーゼ溶液(50mM Tris-HCl, pH7.8, 1mg/ml プロナーゼ)中30°Cで30分間インキュベートした後、フィルタを4mlの滅菌水および4mlのエタノールで再び洗浄した。フィルタににより保持された放射能の量を、シンチレーション計数により測定した(Boothby, D., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D. (1971) Anal. Biochem. 44, 645-653)。

【0195】

ソーティング反応の化学的抑制因子

黄色ブドウ球菌OS2(pSeb-Spa490-524)を、クロラムフェニコール(10mg/ml)を補充したCDM中で一晩培養し、最少培地に1:10で希釈し、A600が0.6になるまで37°Cで振盪しながら培養した。100mCiの [^{35}S]-Promix(Amersham)で5分間細胞を標識した。パルス開始の15秒後に化学物質を加えて5mMの最終濃度にした。TCAを10%まで加えることにより、すべての標識を終了させた。沈殿した細胞およびタンパク質を遠心分離により集め、アセトンで洗浄し、ブドウ球菌細胞壁を上述のようにリソスタフィンで分解した。この分解物をTCAで再び沈殿させ、a-Sebで免疫沈降させた後SDS-PAGEおよび蛍光イメージャー分析を行った。

【0196】

ブドウ球菌プロトプラストにおける細胞壁ソーティング

CDM中で培養された黄色ブドウ球菌OS2(pSeb-Cws-BlaZ)または黄色ブドウ球菌OS2(pSeb-CwsDLPXTG-BlaZ)を、最少培地中に1:10で希釈し、A600が0.6になるまで

37°Cで振盪しながら培養した。100mCiの $[^{35}\text{S}]$ -Promix(Amersham)で1mlの培養液を2分間パルス標識した後、50mlのチェイス溶液を加えることにより標識を終了させた。培養アリコート(0.5ml)を取り出し、パルス中またはチェイスを加えた20分後にTCA沈殿させた。別の培養アリコートをまずプロトプラストに変換し、その後標識した。15,000×gで5分間遠心分離することにより細胞を沈降させ、1mlの50mM Tris-HCl、0.4Mスクロース、10mM MgCl_2 、pH7.5に懸濁した。37°Cで30分間リソスタフィン(100mg)で細胞壁を分解した。100mCiの $[^{35}\text{S}]$ -Promix(Amersham)でプロトプラストを2分間標識した後、50mlのチェイス溶液を加えることにより標識を終了させた。沈降分析のために、パルス標識されたブドウ球菌属を、15,000×gで10分間遠心分離し、プロトプラストに結合したものから可溶性の表面タンパク質を分離した。すべてのサンプルをTCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、10分間煮沸しながら50mlの4%SDS、0.5M Tris-HCl pH7.5に懸濁した。可溶化した表面タンパク質前駆体およびアンカー産物のアリコートを、a-Sebおよびa-BlaZで免疫沈降させ、SDS-PAGEおよび蛍光イメージャー分析した。

【0197】

実施例3

ソーターゼトランスペプチダーゼの精製および特徴付け

アシル酵素中間体としてLPXTGモチーフにおいて開裂した後ブドウ球菌ソーターゼが表面タンパク質を捕獲するか否かを調べるために、表面タンパク質とソーターゼとの間の提案されるアシル酵素中間体を、ヒドロキシルアミノ分解により処理した(P. Lawrence and J. L. Strominger, J. Biol. Chem. 245, 3653(1970)); J. W. Kozarich, N. Tokuzo, E. Willoughby, J. L. Strominger, J. Biol. Chem. 252, 7525(1997))。このモデルにおいて、ソーターゼのスルフヒドリルは、トレオニンとグリシンとの間のペプチド結合において求核試薬として作用し、これによりトレオニンのカルボキシルを有するチオエステルが形成され、グリシンのアミノが放出される(図8A)。Lipmannは最初ヒドロキシルアミンを使用して、この強い求核試薬がチオエステルを攻撃してカルボキシルを有するヒドロキサメート(hydroxamate)を形成しそれにより酵素スルフヒドリルを再生するアシル酵素中間体の存在を示した(F. Lipmann and L. C. Tuttle, J. Biol. Chem. 1

61,415(1945))。

【0198】

表面タンパク質のヒドロキシルアミノ分解

表面タンパク質のヒドロキシルアミノ分解を、0.2M NaClの存在下または非存在下で $[^{35}\text{S}]$ メチオニンによりブドウ球菌属をパルス標識することにより調べた。培養液を、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識し、2つのアリコートに分け、それぞれを5%TCAで沈殿させた。一つのサンプルを熱いSDS中で煮沸したのに対し、他方をリソスタフィンで処理してすべての固着した表面タンパク質を遊離した後、熱いSDS中で煮沸した。偽処理したブドウ球菌属の表面タンパク質(SEB-SPA490-524)は、SDS(100%)中で煮沸する前にリソスタフィンでペプチドグリカン分解しておかなければ熱いSDS(3.8%)で不溶性であった(図12A)。0.2M NH_2OH を加えたことにより、すべての標識されたSEB-SPA490-524の25.3%が細胞外培地中に放出され、熱いSDS中に可溶性となった。黄色ブドウ球菌OS2および黄色ブドウ球菌BB270が同様の量の表面タンパク質ヒドロキシルアミノ分解を示したので、この現象は菌株特異的ではなかった。

【0199】

熱いSDS中における表面タンパク質の可溶性がアシル酵素中間体のヒドロキシルアミノ分解により生ずる場合、ブドウ球菌属のパルス標識後に NH_2OH を加えることによって、SEB-SPA490-524は細胞壁に急速に固着するペプチドであるので遊離されない。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンによるパルス前またはパルス中に NH_2OH を加えることにより、表面タンパク質は細胞外培地に放出される(それぞれ16.9%および12.7%)(図12B)。パルス後に NH_2OH を加えた場合、ごくわずかのSDS可溶性SEB-SPA490-524が検出された(4%)。パルス標識前に NH_2OH の量を増加することにより、放出される表面タンパク質の量が増加した(図12C)。

【0200】

NH_2OH 放出された表面タンパク質の特徴付け

ソーターゼアシル中間体のヒドロキシルアミノ分解により、LPXTGモチーフのトレオニンにおいて表面タンパク質ヒドロキサメートが形成される。 NH_2OH 放出された表面タンパク質を特徴付けるために、表面タンパク質SEB-MH6-CWS(H. Ton

-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 272, 22285(1997))を發現するブドウ球菌属(10^{13} cfu)を、0.1M NH₂OHの存在下および非存在下でインキュベートした。サンプルを遠心分離して細菌を沈殿させ、アフィニティークロマトグラフィによりSEB-MH6-CWSを上澄みから生成し、クマシー染色されたSDS-PAGE上で分析した。0.1MのNH₂OHによる処理によって、黄色ブドウ球菌菌株0S2およびBB270によるSEB-MH6-CWSの放出は起こらなかった(図13A)。菌株BB270から精製されたSEB-MH6-CWSを、臭化シアンによりメチオニンで分解した。アンカー構造を支持するCOOH末端ペプチドをアフィニティークロマトグラフィにより精製し、rpHPLCにより分析した(H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind, J. Biol. Chem. 272, 22285(1997))。偽処理された細菌から放出されたアンカーペプチドのクロマトグラムは、29%のCH₃CNにおいて主要な吸収ピークを示した(図13B)。サンプルをエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)にかけ、平均分子量2236Daを有する化合物を検出した。この測定値は、枝分かれした細胞壁テトラペプチドに結合したアンカーペプチドの構造と一致した[L-Ala-D-iGln-L-Lys(NH₂-H6AQALPET-Gly5)-D-Ala、予想分子量2235]。この表面タンパク質の種類は、ブドウ球菌細胞壁のグリカン鎖に結合しておらず、したがって培養培地中に放出される。0.1MのNH₂OHによる処理によって遊離されるアンカーペプチドのクロマトグラムにより、32%のCH₃CNにおいて主要な吸収ピークが示された(図13C)。ESI-MSにより、1548Daの平均分子量を有する化合物が同定された。エドマン分解にかけた場合、ペプチド配列NH₂-H6AQALPETが得られ、13の開裂サイクルにより未知の構造のフェニルチオヒダントイン成分が放出された。NH₂-H6AQALPET>(T>はトレオニンヒドロキサメートを示す)の予想分子量は1565Daであり、観察された分子量の1548Daより17Da大きかった。両方のクロマトグラムの分画を、平均分子量1548、1565または2236を有するイオンシグナルの存在についてrpHPLCにより調べた。偽処理された培養液からのアンカーペプチドのrpHPLC分画は、分子量2236を有する化合物を含有していたが、予想分子量1548または1565のイオンは検出されなかった。対照的に、NH₂OH処理されたブドウ球菌属のアンカーペプチドから集められたrpHPLC分画は、1548Da(NH₂-H6AQALPET, 32%CH₃CN)および1565Da(NH₂-H6AQALPET>, 31%CH₃CN)の平均分子量を有する化合物を有していたが、2235Daのア

ンカーペプチドは有していなかった。したがって、0.1MのNH₂OHによる処理により、LPXTGモチーフないのトレオニンのヒドロキサメートとしてブドウ球菌属から表面タンパク質が放出され、これによりソーターゼが開裂された表面タンパク質を有するアシル酵素中間体を形成することが示される。ペプチドNH₂-H6AQALPET>は、精製中不安定なようであり、これによりトレオニンヒドロキサメートにおいて17Daを失ったNH₂-H6AQALPETが産生される。

【0201】

NH₂OH存在下におけるインビトロのソーターゼヒドロキシルアミノ分解活性の分析

NH₂OHがインビボでブドウ球菌属から表面タンパク質を遊離できる場合、ソーターゼは、インビトロでNH₂OHの存在下でペプチドを支持するLPXTGモチーフの開裂に触媒作用を及ぼす。ペプチドDABCYL-QALPETGEE-EDANS内のEDANS蛍光体の蛍光を、DABCYLをきわめて近接することにより終了させた(G. T. Wang, E. Matayoshi, H. J. Huffaker, G. A. Krafft, Tetrahedon Lett. 31, 6493(1990))。ペプチドが開裂され蛍光体がDABCYLから分離された場合、蛍光の増加が観察される(E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, Science 247, 954(1989))。粗ブドウ球菌抽出物とともにLPXTGペプチドをインキュベートすることにより、蛍光は少し増加しただけであった。しかしながら、ブドウ球菌抽出物に0.1MのNH₂OHを加えることにより、蛍光強度は4倍増加した(図14)。ブドウ球菌抽出物を、ソーティング反応の既知の抑制因子であるメタンチオスルホネート(MTSET) (D. J. Smith, E. T. Maggio, G. L. Kenyon, Biochemistry 14, 764(1975))とともにプレインキュベートすることにより抑制できるので、この活性はソーターゼに特異的なようである。これらの結果は、ソーターゼが、インビトロでLPXTGのヒドロキシルアミノ分解に触媒作用を及ぼすことを示す。したがって、表面タンパク質は、LPXTGモチーフのトレオニンとグリシンとの間で開裂し、トレオニンのカルボキシルとソーターゼの活性部位スルフヒドリルとの間でNH₂OH感受性チオエステル結合を形成する。インビボにおいて、アシル酵素中間体は、ペンタグリシン架橋内でアミノの求核攻撃により分解される。細菌の観察により、脂質II前駆体のペンタグリシン架橋はソーティング反応のための求核試

薬として作用することが示されている。ここで、ヒドロキシルアミンはインビボおよびインビトロにおいてペンタグリシンの代わりになり得ることが示される。

【0202】

ソーターゼの精製および特徴付け

大腸菌中で発現され、粗溶解物の遠心分離により分析する場合、ブドウ球菌SrtAタンパク質は膜と共に沈降する。可溶性の酵素を得、その特性を調べるために、SrtAのNH2末端膜アンカーセグメントを、6つのヒスチジン標識とともに配置した(SrtA_{DN})。SrtA_{DN}を、大腸菌XL-1ブルー中で発現させ、アフィニティークロマトグラフィにより透明な溶解産物から精製した。LPXTGペプチドと共にインキュベートし、蛍光の増加として測定した場合、SrtA_{DN}は基質の開裂に触媒作用を及ぼした。この反応に0.2MのNH₂OHを加えることにより、蛍光が増加し、これはLPXTGペプチドの開裂がより有効に起こったことを示す。LPXTGペプチドのヒドロキシルアミノ分解は、MTSETとともにプレインキュベーションしたことによりすべての酵素活性が破壊されるのでSrtA_{DN}のスルフヒドリルに依存していた。メタンチオスルホネートは、ジチオスレイトール(DTT)(R. Pathak, T. L. Hendrickson, B. Imperiali, Biochemistry 34, 4179(1995))のような還元剤により置換できるスルフヒドリルとともにジスルフィドを形成する(D. J. Smith, E. T. Maggio, G. L. Kenyon, Biochemistry 14, 764(1975); M. H. Akabas and A. Karlin, Biochemistry 34, 12496(1995))。MTSET不活性化SrtA_{DN}を、10mMのDTTの存在下でインキュベートすると、LPXTGペプチド開裂活性の80%が復活した。精製された、可溶性のソーターゼ(SrtA_{DN})の有用性およびLPXTGペプチドのヒドロキシルアミノ分解についてのインビトロのアッセイにより、グラム陽性菌における表面タンパク質の結合を妨げる化合物のスクリーニングが可能となる。そのような化合物は、すべての既知の抗生物質に対して耐性を得たグラム陽性菌に感染したヒトの治療に有効かもしれない。

【0203】

物質および方法

表面タンパク質のヒドロキシルアミノ分解のパルスチェイススクリーニング

ブドウ球菌属を、OD₆₀₀が0.6になるまで最少培地中で培養し、100 μ CiのPro-M

ix ($[^3\text{S}]$ メチオニンおよびシステイン) で1分間パルス標識した。ポリペプチドへの放射標識の組込みを、50 μl のチェイス溶液(100mg/ml キラスアミノサン、20 mg/ml メチオニンおよびシステイン)を加えることにより終了させ、37°Cで5分間インキュベーションを続けた。標識された培養液の二つの0.5ml アリコートをそれぞれ0.5mlの10%TCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、真空下で乾燥させた。一つのサンプルを、50 μl の0.5Mtris、4%SDS中に懸濁し、煮沸した。他方のサンプルをまず1mlの0.5Mtris pH7.0に懸濁し、50 μl の2mg/ml リソスタフィンを加えることにより37°Cで1時間細胞壁を分解した。サンプルを75 μl の100%TCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、乾燥させた後SDS中で煮沸した。アリコートを、a-SEBで免疫沈降させ、蛍光イメージャー上でSDS-PAGE後分析した。

【0204】

NH₂OH表面タンパク質の精製

ブドウ球菌属(10^{13} 細胞)を、60分間、0.1M NH₂OHとともにまたは加えずに、200mlの50mM Tris-HCl, pH7.0中でインキュベートした。サンプルを10,000×gで15分間遠心分離し、上澄を1mlのNi-NTAカラムに入れ、カラムバッファーで予め平衡させた(CB, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5)。まずカラムを20ml CBおよび10%グリセロールを含有する20mlCBで洗浄し、4mlのカラムバッファーおよび0.5イミダゾルで溶出した。アリコートを、サンプルバッファーと混合し、SDS-PAGE上で分離した。溶出液をTFA(10%)で沈殿させ、アセトンで洗浄し、真空下で乾燥させた。臭化シアンの結晶を加えた後、サンプルを600 μl の70%ギ酸中に懸濁し、一晚インキュベートした。開裂されたペプチドを、反復的に乾燥させ、水中に懸濁して臭化シアンを蒸発させ、1mlのバッファーA中に可溶化し、既述のようにアフィニティークロマトグラフィにかけた。ペプチドを4mlの6Mグアニジニーハイドロクロライド、0.2M酢酸中で溶出し、C18カートリッジ上で脱塩し、乾燥させた。ペレットを50 μl のバッファーB (8M尿素、50mMホスフェート、10mM Tris-HCl, pH7.3) 中で可溶化し、90分間、0.1% TFA中で1%から99%までのCH₃CN直線勾配によりC18カラム上でrpHPLCにかけた。MALDI-MSおよびESI-MSを、既述のように行った(H. Ton-That, K. F. Faull, O. Schneewind(1997)J. Biol. Chem. 272:22285-22292)。

【0205】

質量分析によるペプチド構造の同定

分子量1548および1565を有するペプチドの構造を、親イオンを使用するタンデム質量分析、MS/MSにより測定した。衝突により誘発される親イオンの解離により、化合物の構造NH₂-H6AQALPET> (>はトレオニンヒドロキサメートであり、予想化合物分子量は1565) およびNH₂-H6AQALPET* (T*は、トレオニンヒドロキサメートの17Daを失うことを示す；この残基の構造は未知である) と一致する娘イオンスペクトルが産生される。

【0206】

蛍光アッセイによるソーターゼ活性のアッセイ

反応物を、50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5を含有する120 μ lの体積に集めた。LPXTGペプチド基質(DABCYL-QALPETGEE-EDANS)の濃度は10 μ Mであり、MTSETが5mM、NH₂OHが0.2Mであった。1013の細胞をビーズビーター装置中に分布させることによりブドウ球菌の細胞抽出物を得た。粗抽出物を、3,000 $\times$ gで15分間低速の遠心分離にかけ、ビーズおよび無傷の細胞を取り出した。約50mg/mlのタンパク質を含有する上澄の10 μ lのアリコート酵素製剤として使用した。37°Cで1時間インキュベートを行った後、15,000 $\times$ gで5分間サンプルを遠心分離した。励起のために395nmおよび記録のために495nmを使用して、上澄を蛍光計で分析した。

【0207】

ヒスチジン標識を加えることによるソーターゼの精製

プライマーorf6N-ds-B(5' -AAAGGATCCAAACCACATATCGATAATTATC-3')およびorf6C-dT-B(5' -AAAGGATCCTTTGACTTCTGTAGCTACAAAG-3')を使用して、黄色ブドウ球菌OS2の染色体からsrtA配列をPCR増幅した。DNA断片をBamHIで切断し、pQE16(Qiagen)中に挿入し、BamHIを切断してpHTT5を産生し、大腸菌XL-1ブルーに形質転換し、アンピシリン(100 μ g/ml)を有するルリア汁上で分泌した。大腸菌XL-1ブルー(pHTT5) (10¹²細胞) を、30mlのCバッファー (50mM Bis-Tris-HCl、150mM NaCl、10%グリセロール、pH7.2) 中に懸濁し、14,000psiでフレンチプレッシャー (French pressure)細胞を通す一つの経路により溶解した。抽出物を29,000 $\times$ gで30分間遠心分離し、上澄を1mlのNi-NTA樹脂に加え、Cバッファーで予め平衡にし

た。カラムを40mlのCバッファーで洗浄し、SrtA_{DN}タンパク質を、30 µg/µlの濃度で0.5Mイミダゾルにより4mlのCバッファー中で溶出した。

【0208】

反応物を、50mM Hepesバッファー、150mM NaCl、pH7.5、および既述のように50mMのBisTris、pH7.5中5 µMのSrtA_{DN}、10 µM LPXTGペプチド(DABCYL-QALPETGEE-EDANS)、10 µM TGXLPペプチド(DABCYL-QATGELPEE-EDANS)、5mM MTSET、0.2M NH₂OH、5mM pHMBまたは10mM DTTを含有する260 µlの体積に集めた。37°Cで1時間インキュベートを行った。励起のために395nmおよび記録のために495nmを使用して、サンプルを蛍光計で分析した。

【0209】

本発明の利点

黄色ブドウ球菌ソーターゼトランスアミダーゼ酵素についての遺伝子の単離および特徴付けにおいて、ブドウ球菌属、放線菌属、ミコバクテリウム属、連鎖球菌属、バチルス属、および従来の抗生物質に対していよいよ耐性のある医学的に重要なグラム陽性病原体のようなグラム陽性病原体に対して新しい抗生物質活性をスクリーニングするために使用できる抗生物質作用のための新しい部位の存在を測定した。実質的に精製された黄色ブドウ球菌ソーターゼトランスアミダーゼ酵素の有用性により、酵素を抑制する化合物をスクリーニングする方法が提供される。

【0210】

本発明の精製されたソーターゼトランスアミダーゼ酵素により、ファージ表示において利点を有するペプチドおよびタンパク質を表面表示する方法、並びにグラム陽性菌の表面に共有結合し得る様々の抗原に対するワクチンを産生する方法が提供される。

【0211】

本発明は、特定の好ましい実施の形態を参照してかなり詳細に記載されているが、他の実施の形態も可能である。したがって、本発明の範囲は以下の請求の範囲により決定される。

【0212】

表I

メタンチオスルホネートおよび有機水銀剤によるソーティング反応の抑制
 ソーティング反応を、パルス標識したSeb-Spa490-524 P2前駆体[P2]とLPXTGモチーフにおいて処理された成熟固着した種類[M]との量の間の割合として測定した。

【0213】

【表1】

化合物(5mM)	[P2]/[M]
[2-(トリメチルアンモニウム)エチル]メタンチオスルホネート(MTSET)	23.14±0.06*
(2-スルホネートエチル)メタンチオスルホネート(MTSES)	1.61±0.03
P-ヒドロキシメルクリ安息香酸(pHMB)	1.51±0.04
フェニルメチルスルホンルフッ化物(PMSF)	0.16±0.05
N-エチルマレイミド	0.16±0.05
ヨードアセトアミド	0.12±0.01
ヨード酢酸	0.13±0.02
2-メルカプトエタノール	0.15±0.04
ジチオトレイトール(DTT)	0.13±0.03
塩化亜鉛(ZnCl ₂)	0.32±0.02
塩化カルシウム(CaCl ₂)	0.06±0.05
塩化マグネシウム(MgCl ₂)	0.13±0.01
エチレンジアミン四酢酸(EDTA)	0.31±0.04
偽処理	0.15±0.02

* データは、3つの測定値の平均を示す。標準偏差は、±として示される。

表II

細胞壁合成の抗生物質による抑制および細胞壁ソーティングにおける効果
 細胞壁ソーティング反応を、パルス標識したSeb-Cws-BlaZ前駆体[P]とLPXTGモチーフにおいて処理された成熟固着した種類[C]との量の間の割合として測定した。
 。細胞壁合成を、酸沈殿された、プロナーゼ耐性ペプチドグリカンに組み込まれた[³H]リシンの量と[³H]ロイシンの量との間の割合として比較した。データは、抑制のパーセントとして記載されている。

【0214】

【表2】

化合物	[P2]/[M] ^a	細胞壁合成の抑制の倍数
バンコマイシン(10 μ g/m)	0.47 $\pm$ 0.04	9.5
モエノマイシン(10 μ g/m)	0.24 $\pm$ 0.04	1.6
ペニシリン(10 μ g/m)	0.10 $\pm$ 0.01	3.3
未処理	0.15 $\pm$ 0.02	-

^a データは、抗生物質の存在下で60分間培養した培養物から集めた

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Olaf Schneewind
      Sarkis Mazmanian
      Gwen Liu
      Hung Ton-That

<120> IDENTIFICATION OF SORTASE GENE

<130> 510015.213

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Bacteria

<400> 1
Leu Pro Xaa Thr Gly
1          5

<210> 2
<211> 621
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(621)

<400> 2
atg aaa aaa tgg aca aat cga tta atg aca atc gct ggt gtg gta ctt      48
Met Lys Lys Trp Thr Asn Arg Leu Met Thr Ile Ala Gly Val Val Leu
1          5          10          15

atc cta gtg gca gca tat ttg ttt gct aaa cca cat atc gat aat tat      96
Ile Leu Val Ala Ala Tyr Leu Phe Ala Lys Pro His Ile Asp Asn Tyr
          20          25          30

ctt cac gat aaa gat aaa gat gaa aag att gaa caa tat gat aaa aat      144
Leu His Asp Lys Asp Lys Asp Glu Lys Ile Glu Gln Tyr Asp Lys Asn
          35          40          45

gta aaa gaa cag gcg agt aaa gat aaa aag cag caa gct aaa cct caa      192
Val Lys Glu Gln Ala Ser Lys Asp Lys Lys Gln Gln Ala Lys Pro Gln
          50          55          60

att ccg aaa gat aaa tcg aaa gtg gca ggc tat att gaa att cca gat      240

```

Ile	Pro	Lys	Asp	Lys	Ser	Lys	Val	Ala	Gly	Tyr	Ile	Glu	Ile	Pro	Asp	
65					70					75					80	
gct	gat	att	aaa	gaa	cca	gta	tat	cca	gga	cca	gca	aca	cct	gaa	caa	288
Ala	Asp	Ile	Lys	Glu	Pro	Val	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln	
				85					90					95		
tta	aat	aga	ggg	gta	agc	ttt	gca	gaa	gaa	aat	gaa	tca	cta	gat	gat	336
Leu	Asn	Arg	Gly	Val	Ser	Phe	Ala	Glu	Asn	Glu	Ser	Leu	Asp	Asp		
			100					105					110			
caa	aat	att	tca	att	gca	gga	cac	act	ttc	att	gac	cgt	ccg	aac	tat	384
Gln	Asn	Ile	Ser	Ile	Ala	Gly	His	Thr	Phe	Ile	Asp	Arg	Pro	Asn	Tyr	
			115				120					125				
caa	ttt	aca	aat	ctt	aaa	gca	gcc	aaa	aaa	ggg	agt	atg	gtg	tac	ttt	432
Gln	Phe	Thr	Asn	Leu	Lys	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Ser	Met	Val	Tyr	Phe	
			130			135						140				
aaa	gtt	ggg	aat	gaa	aca	cgt	aag	tat	aaa	atg	aca	agt	ata	aga	gat	480
Lys	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Arg	Lys	Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Ile	Arg	Asp	
						150				155					160	
gtt	aag	cct	aca	gat	gta	gga	gtt	cta	gat	gaa	caa	aaa	ggg	aaa	gat	528
Val	Lys	Pro	Thr	Val	Gly	Val	Leu	Asp	Glu	Gln	Lys	Gly	Lys	Asp		
				165				170					175			
aaa	caa	tta	aca	tta	att	act	tgt	gat	gat	tac	aat	gaa	aag	aca	ggc	576
Lys	Gln	Leu	Thr	Leu	Ile	Thr	Cys	Asp	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Thr	Gly	
				180				185					190			
gtt	tgg	gaa	aaa	cgt	aaa	atc	ttt	gta	gct	aca	gaa	gtc	aaa	taa		621
Val	Trp	Glu	Lys	Arg	Lys	Ile	Phe	Val	Ala	Thr	Glu	Val	Lys	*		
			195			200						205				

<210> 3

<211> 206

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 3

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

```
<210> 4
<211> 227
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes
```

[illegible]

<210> 5
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Actinomyces naeslundii

<400> 5
 Met Gly Leu Leu Thr Tyr Pro Thr Ala Ala Ser Trp Val Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 Asn Gln Ser Lys Val Thr Ala Asp Tyr Ser Ala Gln Val Asp Gly Ala
 20 25 30
 Arg Pro Asp Ala Lys Thr Gln Val Glu Gln Ala His Ala Tyr Asn Asp
 35 40 45
 Ala Leu Ser Ala Gly Ala Val Leu Glu Ala Asn Asn His Val Pro Thr
 50 55 60
 Gly Ala Gly Ser Ser Lys Asp Ser Ser Leu Gln Tyr Ala Asn Ile Leu
 65 70 75 80
 Lys Ala Asn Asn Glu Gly Leu Met Ala Arg Leu Lys Ile Pro Ser Ile
 85 90 95
 Ser Leu Asp Leu Pro Val Tyr His Gly Thr Ala Asp Asp Thr Leu Leu
 100 105 110
 Lys Gly Leu Gly His Leu Glu Gly Thr Ser Leu Pro Val Gly Gly Glu
 115 120 125
 Gly Thr Arg Ser Val Ile Thr Gly His Arg Gly Leu Ala Glu Ala Thr
 130 135 140
 Met Phe Thr Asn Leu Asp Lys Val Lys Thr Gly Asp Ser Leu Ile Val
 145 150 155 160
 Glu Val Phe Gly Glu Val Leu Thr Tyr Arg Val Thr Ser Thr Lys Val
 165 170 175
 Val Glu Pro Glu Glu Thr Glu Ala Leu Arg Val Glu Glu Gly Lys Asp
 180 185 190
 Leu Leu Thr Leu Val Thr Cys Thr Pro Leu Gly Ile Asn Thr His Arg
 195 200 205
 Ile Leu Leu Thr Gly Glu Arg Ile Tyr Pro Thr Pro Ala Lys Asp Leu
 210 215 220
 Ala Ala Ala Gly Lys Arg Pro Asp Val Pro His Phe Pro Trp Trp Ala
 225 230 235 240
 Val Gly Leu Ala Ala Gly Leu Ile Val Val Gly Leu Tyr Leu Trp Arg
 245 250 255
 Ser Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Lys Glu Arg Ala Leu Ala Arg Ala
 260 265 270
 Arg Ala Ala Gln Glu Glu Pro Gln Pro Gln Thr Trp Ala Glu Gln Met
 275 280 285
 Arg Ile Trp Met Asp Asp Asp Ala Gly Val Glu Pro Gln Arg Trp Phe
 290 295 300
 Thr Asp Leu Pro Val Pro Pro Gln Pro Ser Glu Met Glu Asn Leu Ala
 305 310 315 320
 Leu Leu Glu Glu Ile Ala Ser Leu Ser Ala Pro Ser Gly Arg Trp Asp
 325 330 335
 Asp Gln Glu Leu Ile Asp Thr Ala Glu Ile Pro Val Leu Asp Ala Thr
 340 345 350
 Arg Pro Ser Ala Gly Thr Ser Gly Arg Thr His Arg Leu
 355 360 365

<210> 6
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Enterococcus faecalis

<400> 6
 Met Lys Ser Lys Lys Lys Arg Arg Ile Ile Asp Gly Phe Met Ile Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ile Ile Gly Ile Gly Ala Phe Ala Tyr Pro Phe Val Ser Asp
 20 25 30
 Ala Leu Asn Asn Tyr Leu Asp Gln Ile Ile Ala His Tyr Gln Ala
 35 40 45
 Lys Ala Ser Gln Glu Asn Thr Lys Glu Met Ala Glu Leu Gln Glu Lys
 50 55 60
 Met Glu Lys Lys Asn Gln Glu Leu Ala Lys Lys Gly Ser Asn Pro Gly
 65 70 75 80
 Leu Asp Pro Phe Ser Glu Thr Gln Lys Thr Thr Lys Lys Pro Asp Lys
 85 90 95
 Ser Tyr Phe Glu Ser His Thr Ile Gly Val Leu Thr Ile Pro Lys Ile
 100 105 110
 Asn Val Arg Leu Pro Ile Phe Asp Lys Thr Asn Ala Leu Leu Glu
 115 120 125
 Lys Gly Ser Ser Leu Leu Glu Gly Thr Ser Tyr Pro Thr Gly Gly Thr
 130 135 140
 Asn Thr His Ala Val Ile Ser Gly His Arg Gly Leu Pro Gln Ala Lys
 145 150 155 160
 Leu Phe Thr Asp Leu Pro Glu Leu Lys Lys Gly Asp Glu Phe Tyr Ile
 165 170 175
 Glu Val Asn Gly Lys Thr Leu Ala Tyr Gln Val Asp Gln Ile Lys Thr
 180 185 190
 Val Glu Pro Thr Asp Thr Lys Asp Leu His Ile Glu Ser Gly Gln Asp
 195 200 205
 Leu Val Thr Leu Leu Thr Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn Ser His Arg
 210 215 220
 Leu Leu Val Arg Gly His Arg Ile Pro Tyr Gln Pro Glu Lys Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Gly Met Lys Lys Val Ala Gln Gln Gln Asn Leu Leu Leu Trp Thr
 245 250 255
 Leu Leu Leu Ile Ala Cys Ala Leu Ile Ile Ser Gly Phe Ile Ile Trp
 260 265 270
 Tyr Lys Arg Arg Lys Lys Thr Thr Arg Lys Pro Lys
 275 280

<210> 7
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Streptococcus mutans

<400> 7
 Met Lys Lys Glu Arg Gln Ser Arg Lys Lys Arg Ser Phe Leu Arg Thr
 1 5 10 15
 Phe Leu Pro Ile Leu Leu Leu Val Ile Gly Leu Ala Leu Ile Phe Asn
 20 25 30


```

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

```

```

<210> 8
<211> 198
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

```

```

      <400> 8
Met Lys Lys Val Ile Pro Leu Phe Ile Ile Ala Ala Gly Leu Val Ile
  1      5      10      15
Ala Gly Tyr Gly Gly Phe Lys Leu Ile Asp Thr Asn Thr Lys Thr Glu
      20      25      30
Gln Thr Leu Lys Glu Ala Lys Leu Ala Ala Lys Lys Pro Gln Glu Ala
      35      40      45
Ser Gly Thr Lys Asn Ser Thr Asp Gln Ala Lys Asn Lys Ala Ser Phe
      50      55      60
Lys Pro Glu Thr Gly Gln Ala Ser Gly Ile Leu Glu Ile Pro Lys Ile
      65      70      75      80
Asn Ala Glu Leu Pro Ile Val Glu Gly Thr Asp Ala Asp Asp Leu Glu
      85      90      95
Lys Gly Val Gly His Tyr Lys Asp Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu Asn Gly
      100      105      110
Gln Ile Val Leu Ser Gly His Arg Asp Thr Val Phe Arg Arg Thr Gly
      115      120      125
Glu Leu Glu Lys Gly Asp Gln Leu Arg Leu Leu Leu Ser Tyr Gly Glu
      130      135      140

```

Phe Thr Tyr Glu Ile Val Lys Thr Lys Ile Val Asp Lys Asp Asp Thr
 145 150 155 160
 Ser Ile Ile Thr Leu Gln His Glu Lys Glu Glu Leu Ile Leu Thr Thr
 165 170 175
 Cys Tyr Pro Phe Ser Tyr Val Gly Asn Ala Pro Lys Arg Tyr Ile Ile
 180 185 190
 Tyr Gly Lys Arg Val Thr
 195

<210> 9
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 9
 Glu Glu Asn Pro Phe Ile Gly Thr Thr Val Phe Gly Gly Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Gly
 20 25

<210> 10
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 10
 Gly Glu Glu Ser Thr Asn Lys Gly Met Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ser
 1 5 10 15
 Ile Leu Gly Leu Ala Leu Leu
 20

<210> 11
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sobrinus

<400> 11
 Asp Ser Ser Asn Ala Tyr Leu Pro Leu Leu Gly Leu Val Ser Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Gly Phe Ser Leu Leu Gly Leu
 20

<210> 12
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Enterococcus faecalis

<400> 12
 Glu Lys Gln Asn Val Leu Leu Thr Val Val Gly Ser Leu Ala Ala Met
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Ala Gly Leu Gly Phe
 20

<210> 13
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 13
 Ser Ile Gly Thr Tyr Leu Phe Lys Ile Gly Ser Ala Ala Met Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Ile Gly Ile Tyr Ile Val
 20

<210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

<400> 14
 Asp Ser Asp Asn Ala Leu Tyr Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Thr Ala Met Ala Leu Thr
 20

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 15
 Arg Arg Arg Glu Leu
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 16
 Arg Arg Asn Lys Lys Asn His Lys Ala
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sobrinus

<400> 17
 Arg Arg Lys Gln Asp
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Enterococcus faecalis

```

      <400> 18
Lys Arg Arg Lys Glu Thr Lys
 1           5

      <210> 19
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Streptococcus pyogenes

      <400> 19
Lys Arg Arg Lys Ala
 1           5

      <210> 20
      <211> 8
      <212> PRT
      <213> Actinomyces viscosus

      <400> 20
Lys Arg Arg His Val Ala Lys His
 1           5

      <210> 21
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Streptococcus agalactiae

      <400> 21
Lys Arg Arg Lys Ser
 1           5

      <210> 22
      <211> 6
      <212> PRT
      <213> Streptococcus pyogenes

      <400> 22
Lys Arg Lys Glu Glu Asn
 1           5

      <210> 23
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes

      <400> 23
Arg Arg Arg Glu Ser
 1           5

      <210> 24
      <211> 5
      <212> PRT

```

```

      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes
      <400> 24
Arg Arg Arg Ser Leu
1           5

      <210> 25
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes
      <400> 25
Arg Arg Ser Glu Leu
1           5

      <210> 26
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes
      <400> 26
Arg Ser Arg Glu Leu
1           5

      <210> 27
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes
      <400> 27
Ser Arg Arg Glu Leu
1           5

      <210> 28
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes
      <400> 28
Arg Arg Ser Ser Ser
1           5

      <210> 29
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> Mutated derived from streptococcus pyogenes
      <400> 29
Arg Ser Arg Ser Ser
1           5

      <210> 30
      <211> 5

```

```

<212> PRT
<213> Mutated derived from streptococcus pyogenes

<400> 30
Ser Arg Arg Ser Ser
1 5

<210> 31
<211> 19
<212> PRT
<213> Mutated derived from streptococcus pyogenes

<400> 31
His His His His His His Ala Gln Ala Leu Glu Pro Thr Gly Glu Glu
1 5 10 15
Asn Pro Phe

<210> 32
<211> 29
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 32
aaggattcaa aaggagcggg atacattgc 29

<210> 33
<211> 29
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 33
aaggatccta ccttttcctc tagctgaac 29

<210> 34
<211> 283
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae srtA

<400> 34
Met Ser Arg Thr Lys Leu Arg Ala Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Met Leu
1 5 10 15
Val Ala Cys Leu Ile Pro Ile Tyr Cys Phe Gly Gln Met Val Leu Gln
20 25 30
Ser Leu Gly Gln Val Lys Gly His Ala Thr Phe Val Lys Ser Met Thr
35 40 45
Thr Glu Met Tyr Gln Glu Gln Gln Asn His Ser Leu Ala Tyr Asn Gln
50 55 60
Arg Leu Ala Ser Gln Asn Arg Ile Val Asp Pro Phe Leu Ala Glu Gly
65 70 75 80
Tyr Glu Val Asn Tyr Gln Val Ser Asp Asp Pro Asp Ala Val Tyr Gly
85 90 95
Tyr Leu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ile Met Glu Pro Val Tyr Leu Gly

```

```

      100      105      110
Ala Asp Tyr His His Leu Gly Met Gly Leu Ala His Val Asp Gly Thr
      115      120      125
Pro Leu Pro Leu Asp Gly Thr Gly Ile Arg Ser Val Ile Ala Gly His
      130      135      140
Arg Ala Glu Pro Ser His Val Phe Phe Arg His Leu Asp Gln Leu Lys
145      150      155
Val Gly Asp Ala Leu Tyr Tyr Asp Asn Gly Gln Glu Ile Val Glu Tyr
      165      170      175
Gln Met Met Asp Thr Glu Ile Ile Leu Pro Ser Glu Trp Glu Lys Leu
      180      185      190
Glu Ser Val Ser Ser Lys Asn Ile Met Thr Leu Ile Thr Cys Asp Pro
      195      200      205
Ile Pro Thr Phe Asn Lys Arg Leu Leu Val Asn Phe Glu Arg Val Ala
      210      215      220
Val Tyr Gln Lys Ser Asp Pro Gln Thr Ala Ala Val Ala Arg Val Ala
225      230      235
Phe Thr Lys Glu Gly Gln Ser Val Ser Arg Val Ala Thr Ser Gln Trp
      245      250      255
Leu Tyr Arg Gly Leu Val Val Leu Ala Phe Leu Gly Ile Leu Phe Val
      260      265      270
Leu Trp Lys Leu Ala Arg Leu Leu Arg Gly Lys
      275      280

```

<210> 35

<211> 296

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae srtB

<400> 35

```

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

```

```

      180      185      190
Asp Gln Ile Val Thr Val Glu Pro Asn Asp Phe Glu Pro Val Leu Ile
      195      200      205
Gln His Gly Glu Asp Tyr Ala Thr Leu Leu Thr Cys Thr Pro Tyr Met
      210      215      220
Ile Asn Ser His Arg Leu Leu Val Arg Gly Lys Arg Ile Pro Tyr Thr
      225      230      235
Ala Pro Ile Ala Glu Arg Asn Arg Ala Val Arg Glu Arg Gly Gln Phe
      245      250      255
Trp Leu Trp Leu Leu Leu Gly Ala Met Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu
      260      265      270
Tyr Arg Val Tyr Arg Asn Arg Arg Ile Val Lys Gly Leu Glu Lys Gln
      275      280      285
Leu Glu Gly Arg His Val Lys Asp
      290      295

```

```

<210> 36
<211> 304
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae srtC

```

```

      36
Met Leu Ile Lys Met Val Lys Thr Lys Lys Gln Lys Arg Asn Asn Leu
      5      10      15
Leu Leu Gly Val Val Phe Phe Ile Gly Met Ala Val Met Ala Tyr Pro
      20      25      30
Leu Val Ser Arg Leu Tyr Tyr Arg Val Glu Ser Asn Gln Ile Ala
      35      40      45
Asp Phe Asp Lys Glu Lys Ala Thr Leu Asp Glu Ala Asp Ile Asp Glu
      50      55      60
Arg Met Lys Leu Ala Gln Ala Phe Asn Asp Ser Leu Asn Asn Val Val
      65      70      75      80
Ser Gly Asp Pro Trp Ser Glu Glu Met Lys Lys Lys Gly Arg Ala Glu
      85      90      95
Tyr Ala Arg Met Leu Glu Ile His Glu Arg Met Gly His Val Glu Ile
      100      105      110
Pro Val Ile Asp Val Asp Leu Pro Val Tyr Ala Gly Thr Ala Glu Glu
      115      120      125
Val Leu Gln Gln Gly Ala Gly His Leu Glu Gly Thr Ser Leu Pro Ile
      130      135      140
Gly Gly Asn Ser Thr His Ala Val Ile Thr Ala His Thr Gly Leu Pro
      145      150      155      160
Thr Ala Lys Met Phe Thr Asp Leu Thr Lys Leu Lys Val Gly Asp Lys
      165      170      175
Phe Tyr Val His Asn Ile Lys Glu Val Met Ala Tyr Gln Val Asp Gln
      180      185      190
Val Lys Val Ile Glu Pro Thr Asn Phe Asp Asp Leu Leu Ile Val Pro
      195      200      205
Gly His Asp Tyr Val Thr Leu Leu Thr Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn
      210      215      220
Thr His Arg Leu Leu Val Arg Gly His Arg Ile Pro Tyr Val Ala Glu
      225      230      235      240
Val Glu Glu Glu Phe Ile Ala Ala Asn Lys Leu Ser His Leu Tyr Arg

```

```

      245      250      255
Tyr Leu Phe Tyr Val Ala Val Gly Leu Ile Val Ile Leu Leu Trp Ile
      260      265      270
Ile Arg Arg Leu Arg Lys Lys Lys Gln Pro Glu Lys Ala Leu Lys
      275      280      285
Ala Leu Lys Ala Ala Arg Lys Glu Val Lys Val Glu Asp Gly Gln Gln
      290      295      300

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のソーターゼートランスアミダーゼ酵素活性の図解である。

【図2】

図2は、表面タンパク質前駆体SEB-SPA490-524の一次構造(A)、免疫沈降させた $[^{35}\text{S}]$ SEB-SPA490-52 P1前駆体、P2前駆体および成熟タンパク質のSDS-PAGEゲル(B)、SEB-SPA490-524固着のパルスチェイス分析後における、SM317、SM329および野生型ブドウ球菌でのSDS-PAGEゲル(C)、ならびにトリプシン大豆寒天上で画線培養しさらに42℃で増殖させたブドウ球菌株OS2(WT)、SM317およびSM329(D)を表す。

【図3】

図3は、SEB-MH6-CWSの一次構造および細胞壁へのその結合(A)、可溶化およびアフィニティー精製したSEB-MH6-CWSの質量分光分析プロフィール(MALDI-MS)(B)、ならびにf11ヒドロラーゼで消化した、可溶化させたミュータノリシン-遊離アンカーペプチドの質量分光分析プロフィール(MALDI-MS)(C)を表す。

【図4】

図4は、SEB-SPA490-524固着のパルスチェイス分析後における、pGL1834(pC194-mcs中にクローン化されたsrtA遺伝子を包含するプラスミド)でトランスフェクトしたまたはトランスフェクトしていないSM317、SM329および野生型ブドウ球菌でのSDS-PAGEゲル(A)、SM317変異体(pGL1898)または野生型株OS2(pGL1897)の何れかのDNAで形質転換させたSM317でのSDS-PAGEゲル(B)、ならびにpGL1898で形質転換されさらにパルスチェイス分析を受けた黄色ブドウ球菌OS2(野生型)、SM317およびSM329でのSDS-PAGEゲル(C)を表す。

【図5】

図5は、表面タンパク質固着を高めるのに十分である黄色ブドウ球菌のsrtA遺伝子のコード配列(配列番号2)のDNA断片のサイズおよび位置を表す。

【図6】

図6は、s r t A遺伝子のDNA配列（配列番号2）、ならびにS r t Aタンパク質の推定一次構造（配列番号3）を表す。

【図7】

図7は、S r t Aタンパク質（ソーターゼ）の予測される一次構造を、データベース検索によって同定された相同配列の一次構造と比較した配列の整列を表す。

【図8】

図8は、シグナルペプチダーゼ切断部位を有するNH₂末端リーダー（シグナル）ペプチド、ならびにそのCOOH末端に融合した、LPXTGモチーフ、疎水性領域（ブラックボックス）および陽電荷端部（囲んでいる+）から成る細胞壁ソーティングシグナルを包含する、S e b - S p a 490-524の構造（A）、ならびに培養ブドウ球菌を [³⁵S] メチオニンで1分間標識し、過剰な非標識メチオニン（チェイス）の添加によって全ての更なる取り込みを停止させたパルスチェイス実験のSDS-PAGEゲル分析（B）を表す。

【図9】

図9は、抗生物質を添加した場合における（1，□：偽処理；2，◇：ペニシリン10 μg/ml；3，◆：モエノマイシン(moenomycin) 10 μg/ml；■：バンコマイシン10 μg/ml）、ブドウ球菌増殖の増殖曲線（A）、ならびに（A）に記載のような抗生物質の存在下または偽処理における細胞壁ソーティングの速度を測定した曲線（B）を表す。

【図10】

図10は、NH₂末端シグナル（リーダー）ペプチド、ならびに、LPXTGモチーフ、疎水性領域（陰影で囲む）および陽電荷領域（囲んだRRREL）から成るプロテインAのソーティングシグナルを包含する、S e b - C w s - B l a Zの構造（A）、ならびに黄色ブドウ球菌OS2（p S e b - C w s - B l a Z）および黄色ブドウ球菌OS2（p S e b - C w s D L P X T G - B l a Z）細胞壁ソーティングのSDS-PAGEゲル分析（B）を表す。

【図11】

図11は、ブドウ球菌ソーターゼによって触媒作用を及ぼされるペプチド転位

反応のモデルを表す。

【図12】

図12は、ヒドロキシルアミンによる表面からのタンパク質の遊離の存在下または不在下における、細胞壁への表面タンパク質固着のパルスチェイス分析のSDS-PAGEゲル分析(A)、標識の5分前(前)、パルスー標識の間(パルス)または停止5分後の何れかに、培養黄色ブドウ球菌OS2にヒドロキシルアミンを添加することによる表面からのタンパク質の遊離の存在下または不在下における、細胞壁への表面タンパク質固着のパルスチェイス分析のSDS-PAGEゲル分析(B)、ならびに培養黄色ブドウ球菌OS2の標識5分前に添加するヒドロキシルアミンの量を増加させると、遊離される表面タンパク質の量が増加することを示唆する棒グラフ(C)を表す。

【図13】

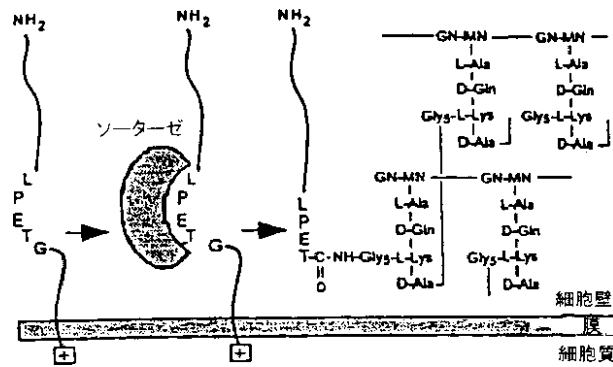
図13は、ヒドロキシルアミン処理によって遊離された表面タンパク質を特徴付けするのに用いられたクーマシー染色したSDS-PAGEゲル(A)、ならびに0.1M NH₂OHでの処理によって黄色ブドウ球菌BB270細胞から遊離したCOOH末端アンカーペプチドのrpHPLCクロマトグラムを表す。

【図14】

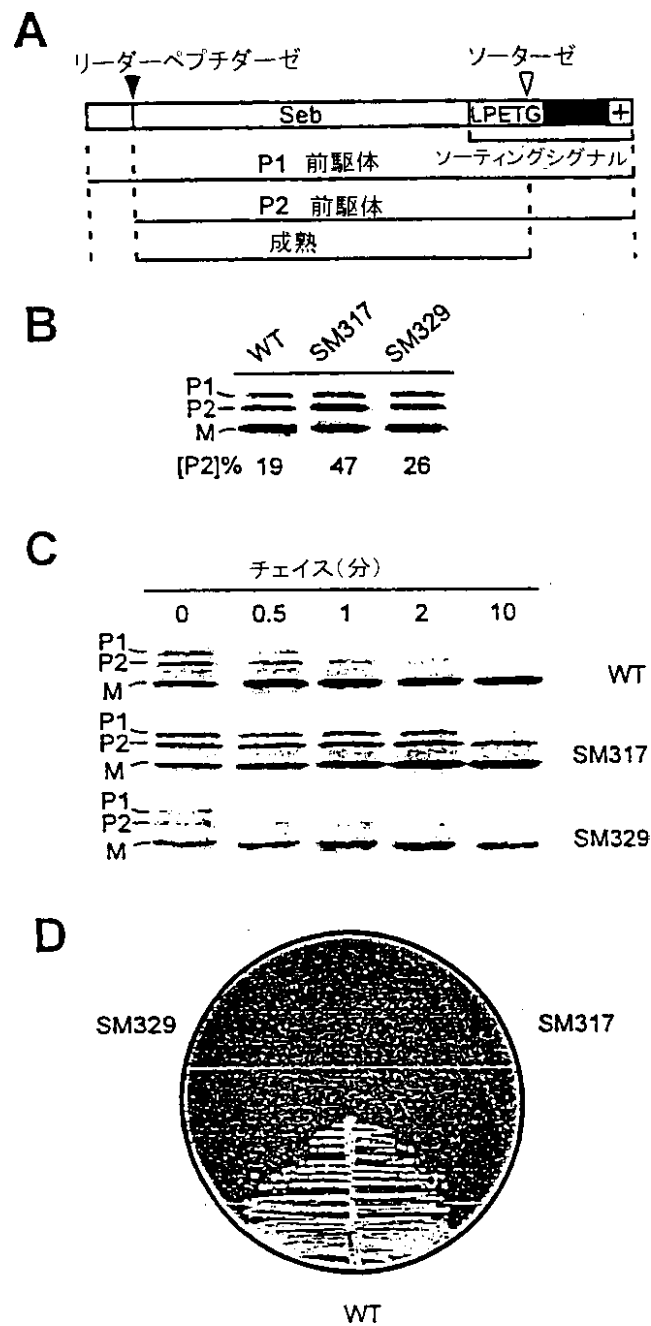
図14は、ソーティング基質DABCYL-QALPETGEE-EDANSと共に、ブドウ球菌抽出物をインキュベートすることの効果を表す棒グラフ(A)、

ソーターゼ(SrtA)のNH₂末端膜アンカーが6ヒスチジンタグで置換されている、SrtADNを発現している大腸菌XL-1 Blue(pHTT5)のSDS-PAGEゲル分析(B)、ならびにペプチド基質DABCYL-QALPETGEE-EDANSと共に、精製SrtADNをインキュベートすることの効果を表す棒グラフ(C)を表す。

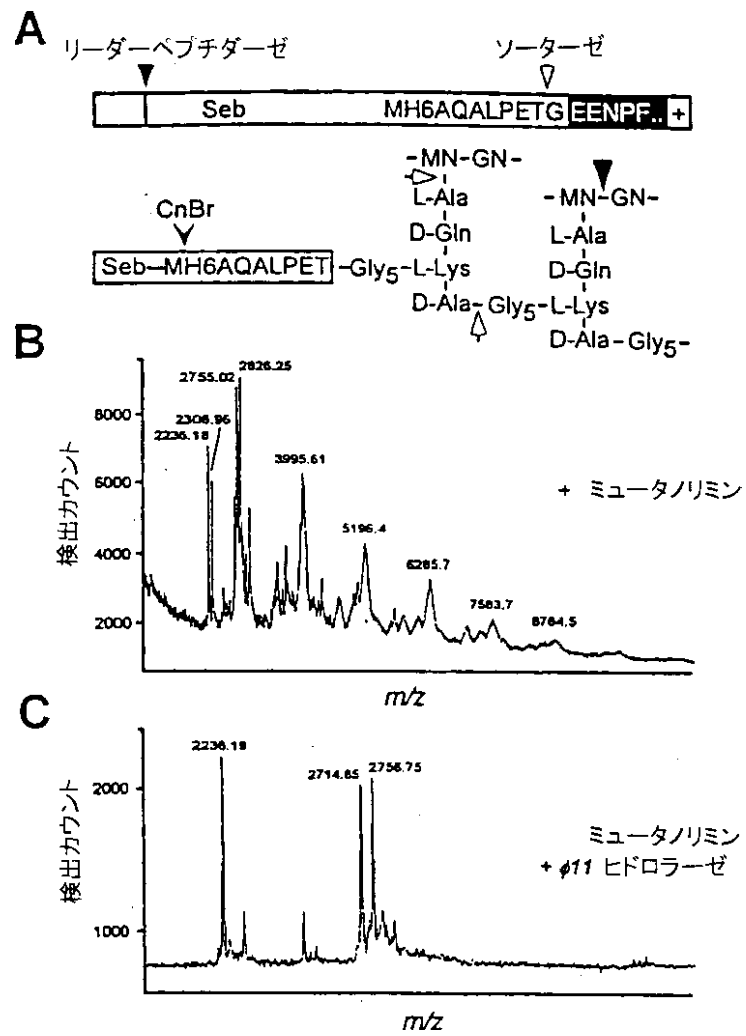
【図1】



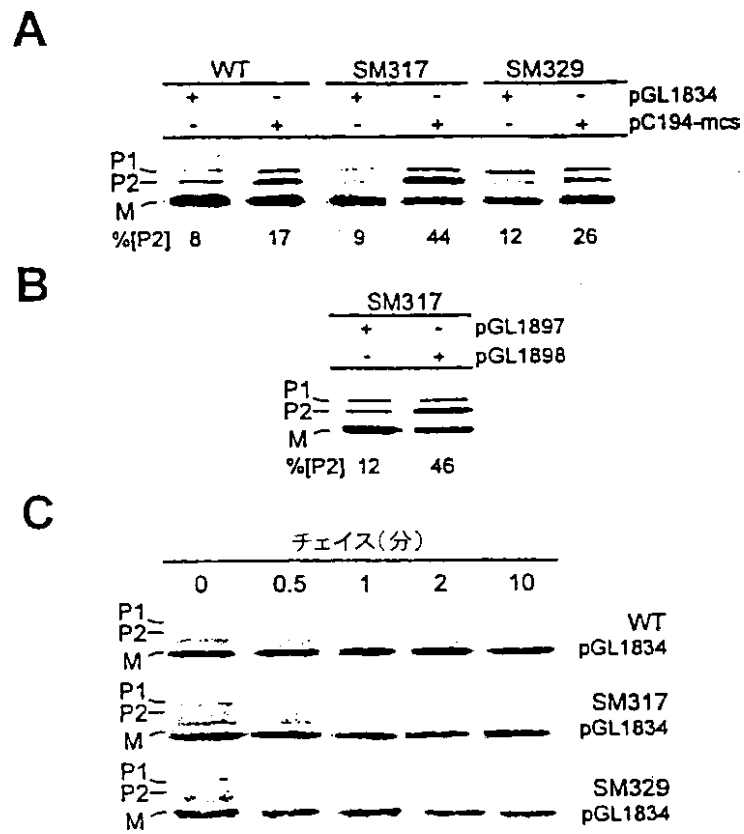
【図2】



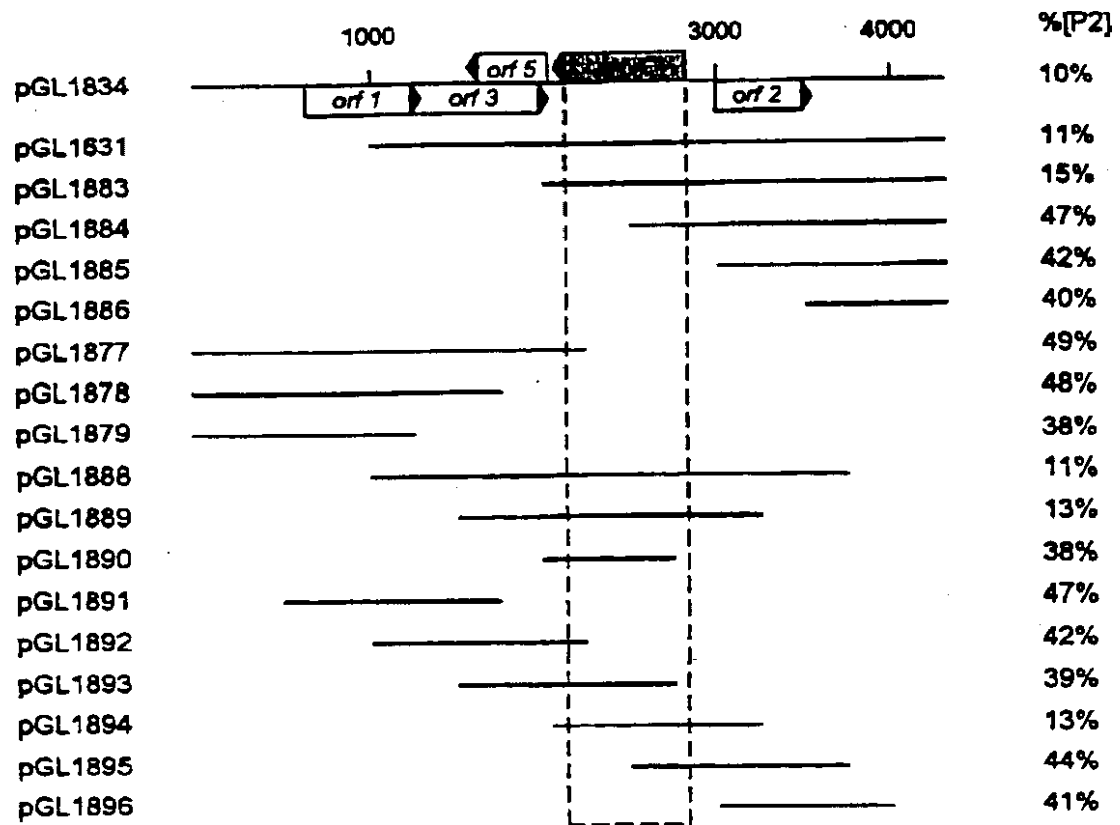
【図3】



【図4】



【図5】



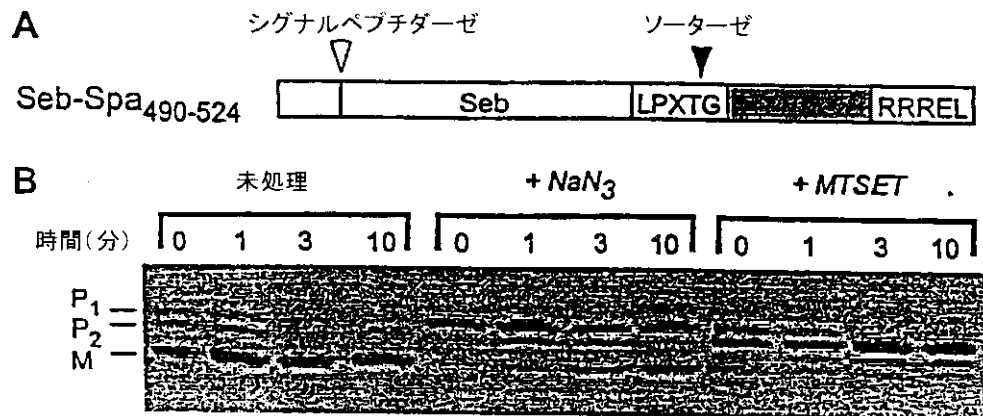
【図6】

ATG	AAA	AAA	TGG	ACA	AAT	CGA	TTA	ATG	ACA	ATC	GCT	GGT	GTG	GTA	CTT	ATC	CTA		
M	K	K	W	T	N	R	L	M	T	I	A	G	V	V	L	I	L	18	
GTG	GCA	GCA	TAT	TTG	TTT	GCT	AAA	CCA	CAT	ATC	GAT	AAT	TAT	CTT	CAC	GAT	AAA		
V	A	A	Y	L	F	A	K	P	H	I	D	N	Y	L	H	D	K	36	
GAT	AAA	GAT	GAA	AAG	ATT	GAA	CAA	TAT	GAT	AAA	AAT	GTA	AAA	GAA	CAG	GCG	AGT		
D	K	D	E	K	I	E	Q	Y	D	K	N	V	K	E	Q	A	S	54	
AAA	GAT	AAA	AAG	CAG	CAA	GCT	AAA	CCT	CAA	ATT	CCG	AAA	GAT	AAA	TCG	AAA	GTG		
K	D	K	K	Q	Q	A	K	P	Q	I	P	K	D	K	S	K	V	72	
GCA	GGC	TAT	ATT	GAA	ATT	CCA	GAT	GCT	GAT	ATT	AAA	GAA	CCA	GTA	TAT	CCA	GGA		
A	G	Y	I	E	I	P	D	A	D	I	K	E	P	V	Y	P	G	90	
CCA	GCA	ACA	CCT	GAA	CAA	TTA	AAT	AGA	GGT	GTA	AGC	TTT	GCA	GAA	GAA	AAT	GAA		
P	A	T	P	E	Q	L	N	R	G	V	S	F	A	E	E	N	E	108	
TCA	CTA	GAT	GAT	CAA	AAT	ATT	TCA	ATT	GCA	GGA	CAC	ACT	TTC	ATT	GAC	CGT	CCG		
S	L	D	D	Q	N	I	S	I	A	G	H	T	F	I	D	R	P	126	
AAC	TAT	CAA	TTT	ACA	AAT	CTT	AAA	GCA	GCC	AAA	AAA	GCT	AGT	ATG	GTG	TAC	TTT		
N	Y	Q	F	T	N	L	K	A	A	K	K	G	S	M	V	Y	F	144	
AAA	GTT	GGT	AAT	GAA	ACA	CGT	AAG	TAT	AAA	ATG	ACA	AGT	ATA	AGA	GAT	GTT	AAG		
K	V	G	N	E	T	R	K	Y	K	M	T	S	I	R	D	V	K	162	
CCT	ACA	GAT	GTA	GGA	GTT	CTA	GAT	GAA	CAA	AAA	GGT	AAA	GAT	AAA	CAA	TTA	ACA		
P	T	D	V	G	V	L	D	E	Q	K	G	K	D	K	Q	L	T	180	
TTA	ATT	ACT	TGT	GAT	GAT	TAC	AAT	GAA	AAG	ACA	GGC	GTT	TGG	GAA	AAA	CGT	AAA		
L	I	T	C	D	D	Y	N	E	K	T	G	V	W	E	K	R	K	198	
ATC	TTT	GTA	GCT	ACA	GAA	GTC	AAA	TAA	(配列番号2)										
I	F	V	A	T	E	V	K	*	(配列番号3)									206	

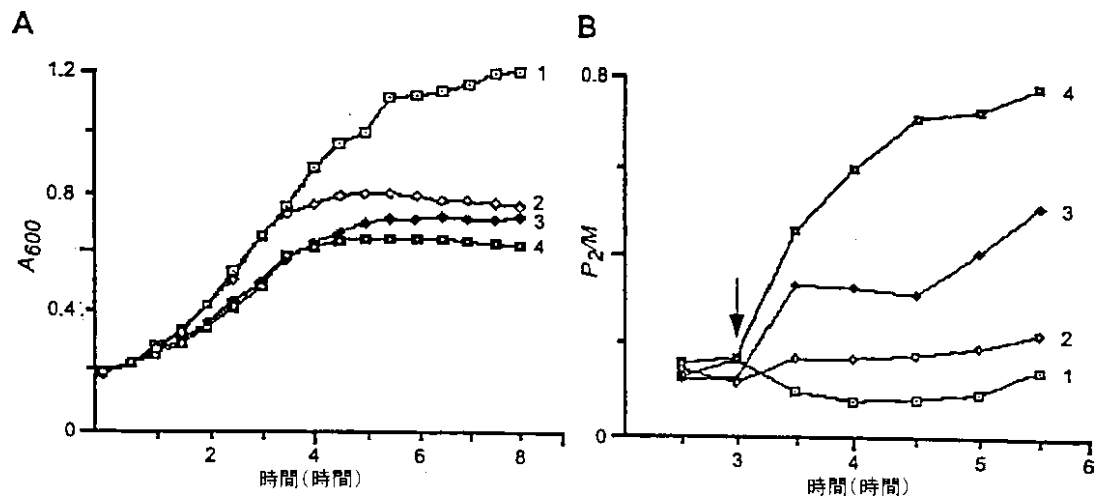
【図7】

	1	15	30	45	60	75	90								
1 Anei	----	-----HGLLTYP	TAASWSV	QYNQSKV	TADYS	AVDVG----	ARPD	AKTQVEQAHAYND-ALSGAVLEANNHVPTG	65						
2 Spy0	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MEEVWQAKAYNA-RIGIOPVDFAPS-PRDG	29						
3 Eiea	1	MKSKKKRI	YIDGFMILL	LLIIGIGAF	YFPVSDALNN	YLDQIIIAHYQAKASQE--	NTKEMAELOEKMEKKQO--	ELAKGSPGLDPESET	87						
4 Bsub	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GFKLIDTNTKTZQTLKE-AKLAARKPOEASGKN5	54						
5 Smut	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKKGRQSRKRSFRTPLPILLVIGLALFTPIRL	70						
6 Saur	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKTWNALMTIAGVVLILV--AAVLFAPKPHDNYLED-KDKDEKILEQYDKMKQEQ	52						
1 Anei	1	AGSSKDS	SSLOQYANIEK	ANNEGEMARLKH	ISISDDVYHG--	TADDTLK--	UGHUGESG--	EVGEGTRST--	NGRGA--	ATMTALDR	151				
2 Spy0	1	IHD-KN--	YESLQI	ENNDINGYV--	STAKVTL--	TYNY--	TTDEVTK--	SAGHIFGAL--	EVGGDGTHTV--	SARHGPS--	AEMGTNLNU	110			
3 Eiea	1	QKTKKP--	DKSYEESH	T--EGVLT--	MPKINVL--	IFDK--	FNALL--	SESLUGLSV--	167						
4 Bsub	1	TDQAH--	KASFAPETC	-QASGLE--	EPKINAE--	IVRG--	TDADD--	DEK--	WKKISY--	QSGDNTHAUGL--	SGRGPQ--	AKHITDLRE	129		
5 Smut	1	KVLSISTQSV	LAQAQMAAQ	KLPZQGLAD--	DLKHL--	EPAG--	LDNVG--	TT--	QVPSYVGN--	198					
6 Saur	1	ASKDKKQO--	AKPOIPKDKSK	-MYET--	EDAD--	ELG--	YFAT--	FEQ--	WVAT--	FEQ--	WVAT--	FEQ--	WVAT--	135	
1 Anei	1	MYEDSDIVE	VFGVLT--	RVTSRV--	EEET--	ELRV--	EEKL--	CHVIGTFC--	GINTRIC--	237					
2 Spy0	1	FKHSDFEY	FVLMKVL--	QKVDQSL--	TEEDQVTS	SLSGVM--	KDY--	ANV--	ITV--	156					
3 Eiea	1	EXKDEFTY	VNGKTL--	QVQVQIK--	ET--	DTKDLH--	IESGDL--	WTL--	LAETEX--	253					
4 Bsub	1	LEYDQRL	LESYGEFT	-DEKVKTK--	DDDD--	STL--	QHEE--	MT--	QVPSYVGN--	198					
5 Smut	1	AKLMEIY	LTDNKVYT--	VISEVKT--	TPER--	VEVID--	NPQONE--	MT--	QVSTDA--	242					
6 Saur	1	AKESMYV--	KVGNET--	TKH--	WTSIRD--	KET--	IVGUL--	DEQKGL--	206						
1 Anei	1	WWAVGLA	AGLIVVGLYL	WRSGYAAAR	AKERALARARA	ACEEPQ	QTHAQH--	IWMDD	DAGV	EPQ--	WFTDL	PVP	POPS	EMENLALLEEIAS	327
2 Spy0	1	MWAEVCA	AFGVVIAI	ILVFMYS	RVSAKSK--										227
3 Eiea	1	LWTLILL	IACALII	SGFIIWY	KARK--	TKTKP--									284
4 Bsub	1	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	198
5 Smut	1	QISF--													246
6 Saur	1	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	206
1 Anei	1	LSAPSGRW	DDQELIDTA	EIPVLDAT	RPSAGT	SGRTHRL	365	(配列番号5)							
2 Spy0	1	-----	-----	-----	-----	-----	227	(配列番号4)							
3 Eiea	1	-----	-----	-----	-----	-----	284	(配列番号6)							
4 Bsub	1	-----	-----	-----	-----	-----	198	(配列番号8)							
5 Smut	1	-----	-----	-----	-----	-----	246	(配列番号7)							
6 Saur	1	-----	-----	-----	-----	-----	206	(配列番号3)							

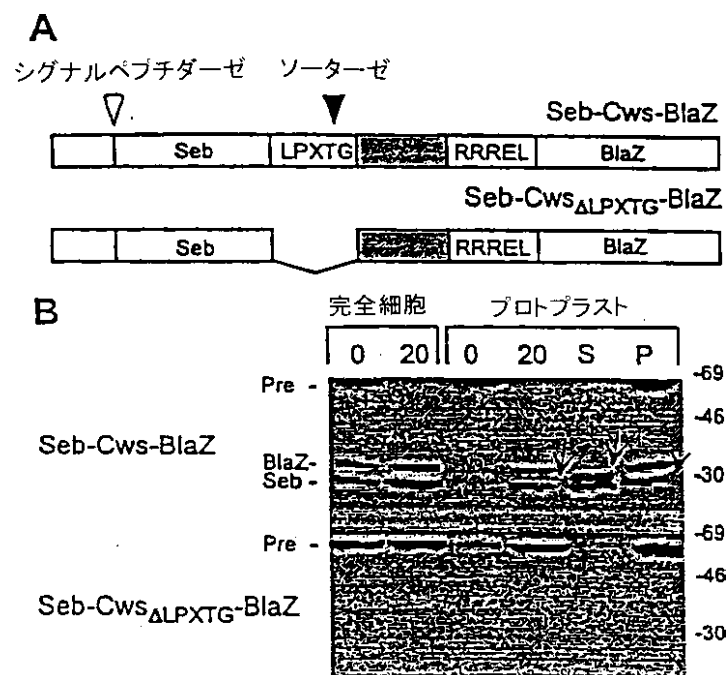
【図8】



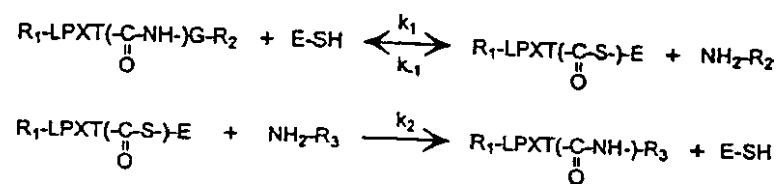
【図9】



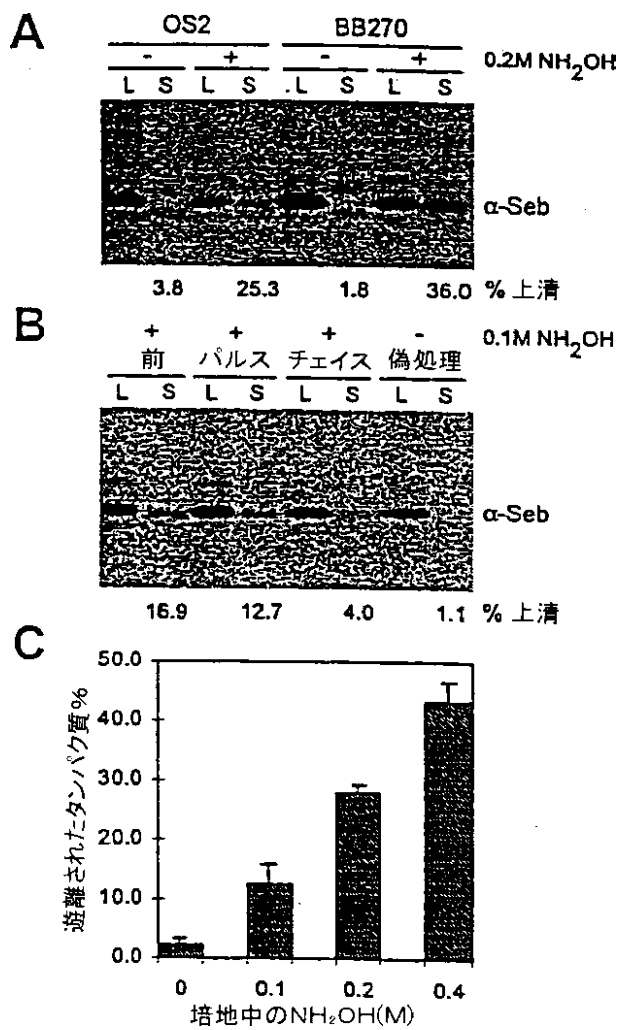
【図10】



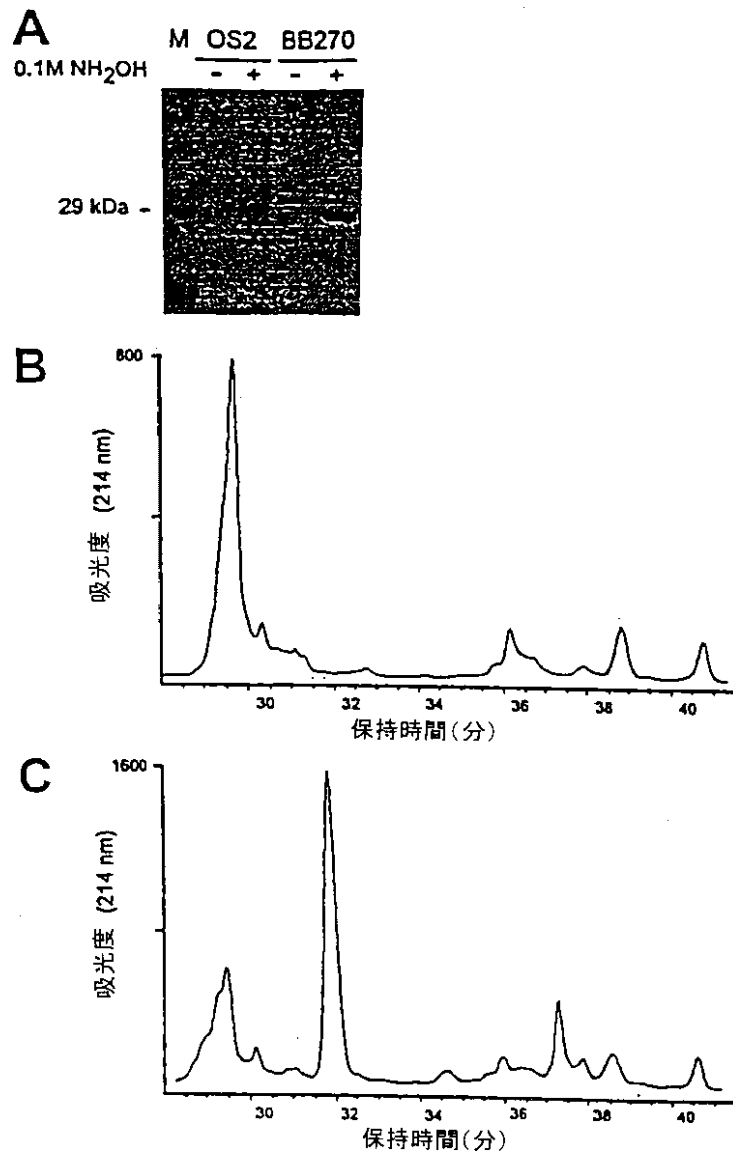
【図11】



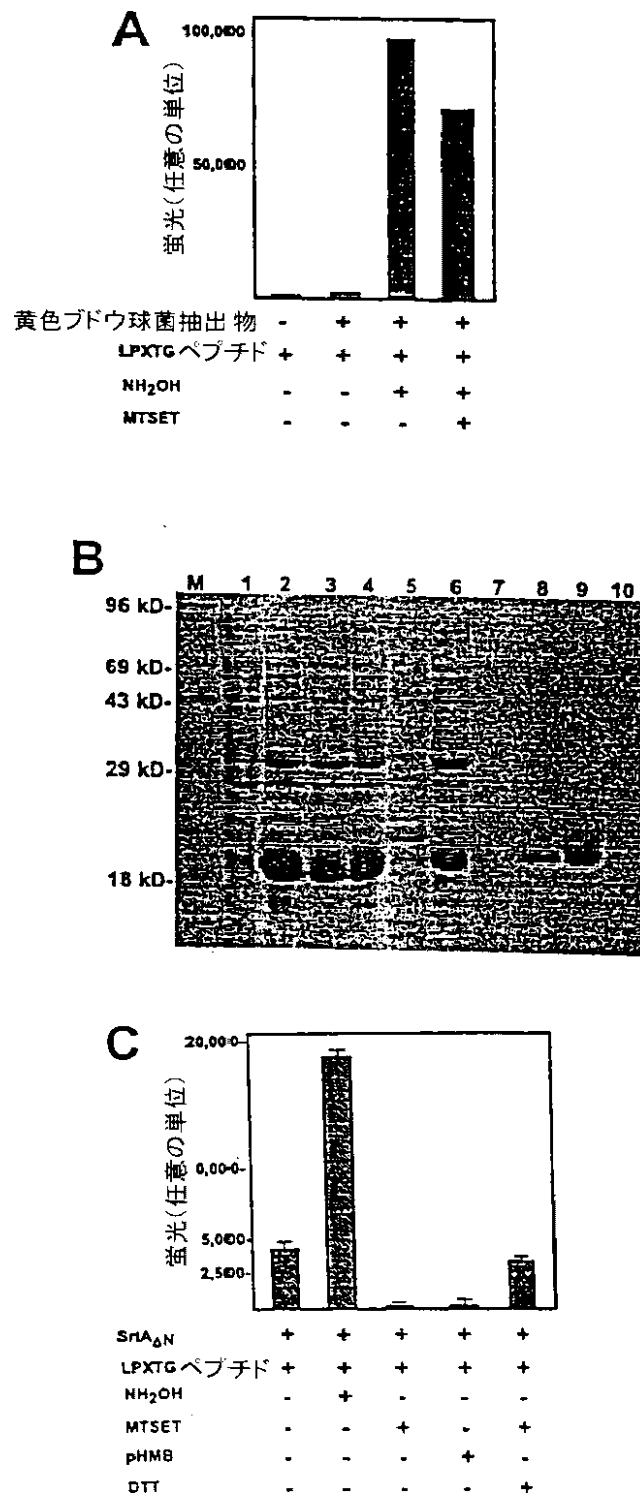
【図12】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
A 6 1 K	31/7036	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 4
	38/00	39/07	4 C 0 8 5
	39/00	39/085	4 C 0 8 6
	39/07	39/385	4 C 2 0 6
	39/085	45/00	4 H 0 4 5
	39/385	A 6 1 P 31/04	
	45/00	C 0 7 K 16/40	
A 6 1 P	31/04	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K	16/40	1/19	
C 1 2 N	1/15	1/21	
	1/19	9/10	
	1/21	C 1 2 Q 1/48	Z
	5/10	G 0 1 N 33/15	Z
	9/10	33/50	Z
C 1 2 Q	1/48	33/53	D
G 0 1 N	33/15	33/86	
	33/50	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/53	5/00	A
	33/86	A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 マズマニアン, サーキス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州
 91403 シャーマン オークス ノース
 セパルヴェーダ ブルヴァード 4401

(72)発明者 リュウ, グウェン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州
 92657 ニューポート コースト アンジ
 ョー 25

(72)発明者 トナーザット, ハング
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
91754 モントリー パーク ボルティモ
ア アヴェニュー 202

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB21 DA20 FB01 FB03
4B024 AA01 AA13 BA10 CA03 DA01
DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
4B050 CC01 CC03 DD02 LL01 LL03
4B063 QA01 QA18 QR06
4B065 AA01X AA01Y AA06Y AA49Y
AA57X AA87X AB01 AC14
AC15 BA02 CA29 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA07 AA16 BA01
BA08 BA16 CA04 DC50 MA02
NA13 NA14 ZB352 ZC75
4C085 AA03 BA13 BB11 CC07 EE01
EE06 GG02 GG06 GG08 JJ03
JJ05 JJ11 KA01
4C086 AA01 AA02 BC21 BC28 CB25
CC02 CC09 EA11 MA02 NA13
NA14 ZB35
4C206 AA01 AA02 GA28 MA02 NA13
NA14 ZB35
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA75
EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003506011A5	公开(公告)日	2007-06-21
申请号	JP2000611940	申请日	2000-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚州的盐湖城大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚州的盐湖城大学董事会		
[标]发明人	シュニーウィンドオラフ マズマニアンサーキス リュウグウェン トンザットハング		
发明人	シュニーウィンド,オラフ マズマニアン,サーキス リュウ,グウェン トン-ザット,ハング		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/165 A61K31/43 A61K31/496 A61K31/545 A61K31/7036 A61K39/00 A61K39/07 A61K39/085 A61K39/385 A61K45/00 A61P31/04 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9 /10 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/86 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	C07K2319/00 C12N9/104 C12N9/80 C12N9/52 C12N15/1037 A61P31/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/165 A61K31/43 A61K31/496 A61K31/545 A61K31/7036 A61K39/00.H A61K39/07 A61K39/085 A61K39/385 A61K45/00 A61P31/04 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1 /21 C12N9/10 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/86 C12N5/00.A A61K37 /02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB21 2G045/DA20 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024 /BA10 4B024/CA03 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063 /QR06 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA06Y 4B065/AA49Y 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA16 4C084/CA04 4C084 /DC50 4C084/MA02 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C084/ZC75 4C085/AA03 4C085/BA13 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/GG02 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085 /JJ03 4C085/JJ05 4C085/JJ11 4C085/KA01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC21 4C086/BC28 4C086/CB25 4C086/CC02 4C086/CC09 4C086/EA11 4C086/MA02 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086 /ZB35 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/GA28 4C206/MA02 4C206/NA13 4C206/NA14 4C206/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
优先权	09/292437 1999-04-15 US		
其他公开文献	JP2003506011A		

摘要(译)

革兰氏阳性细菌衍生的酶，称为该酶的核酸及其使用方法技术领域本发明涉及来源于革兰氏阳性细菌的称为分选酶-转酰胺酶的酶，编码该酶的核酸及其使用方法。该酶催化将具有分类信号的蛋白质的羧基末端与革兰氏阳性细菌的肽聚糖共价交联的反应，并且该分类信号具有LPX3X4G基序。通过在3X4G基序的第4个和第5个残基之间切割来进行分类。

