

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-166919

(P2006-166919A)

(43) 公開日 平成18年6月29日(2006.6.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/106 (2006.01)	A 6 1 K 39/106	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
審査請求 有 請求項の数 19 O L (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-376713 (P2005-376713)	(71) 出願人	503236795 ヴァンダービルト ユニバーシティ
(22) 出願日	平成17年12月27日 (2005.12.27)		アメリカ合衆国 テネシー 37240, ナッシュビル, カークランド ホール 405
(62) 分割の表示	特願平7-522437の分割	(74) 代理人	100107489 弁理士 大塩 竹志
原出願日	平成7年2月23日 (1995.2.23)		
(31) 優先権主張番号	08/200,232	(72) 発明者	ティモシー エル. カバー アメリカ合衆国 テネシー 37205- 2308, ナッシュビル, ウェスト リ ンデン 2804
(32) 優先日	平成6年2月23日 (1994.2.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マーティン ジェイ. ブラザー アメリカ合衆国 テネシー 37205- 2308, ナッシュビル, ダーデン プ レイス 733
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 空胞形成毒素欠損 *H. pylori* および関連する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 大量の空胞形成毒素を発現することができる核酸の提供。

【解決手段】 *Helicobacter pylori* 空胞形成毒素をコードする単離された核酸であって、特定の配列で規定されるヌクレオチドからなる核酸。或いは、*H. pylori* の *vacA* コード領域のための調節配列を含む単離された核酸や、これらの核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸とすることもできる。以上の核酸は、特定の配列を有するタンパク質をコードし、診断試薬やワクチンに有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Helicobacter pylori空胞形成毒素をコードする単離された核酸であって、配列表の配列番号 1 で規定されるヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964からなる、核酸。

【請求項 2】

前記核酸を発現するために適切なベクター内にある、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

前記核酸を発現するために適切な宿主中にある、請求項 2 に記載の核酸。

【請求項 4】

Helicobacter pyloriの単離された核酸であって、配列表の配列番号 1 で規定されるヌクレオチド配列からなる、核酸。 10

【請求項 5】

前記核酸を発現するために適切なベクター中にある、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

前記核酸を発現するために適切な宿主中にある、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の核酸によりコードされる、精製されたタンパク質。

【請求項 8】

薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の請求項 7 に記載のタンパク質を含む組成物。 20

【請求項 9】

H.pyloriによる感染に対して被験体を免疫する方法であって、該被験体に請求項 8 に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

ストリンジェント条件下で請求項 4 に記載の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸であって、そして該核酸がハイブリダイズする配列のセグメントと少なくとも70%の相補性を有する、核酸。

【請求項 11】

前記核酸を発現するために適切なベクター中にある、請求項10に記載の核酸。

【請求項 12】

前記核酸を発現するために適切な宿主中にある、請求項11に記載の核酸。 30

【請求項 13】

請求項12に記載の核酸によりコードされる、精製された抗原性タンパク質。

【請求項 14】

薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の請求項13に記載のタンパク質を含む組成物。

【請求項 15】

H.pyloriによる感染に対して被験体を免疫する方法であって、該被験体に請求項14に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 16】

配列番号 1 のアミノ酸をコードする単離された核酸。 40

【請求項 17】

ストリンジェント条件下で、請求項16に記載の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸であって、そして該核酸がハイブリダイズするセグメントと、または該セグメントに相補的な核酸と少なくとも95%の相補性を有する、核酸。

【請求項 18】

前記核酸を発現するために適切なベクター中にある、請求項17に記載の核酸。

【請求項 19】

前記核酸を発現するために適切な宿主中にある、請求項18に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】 50

【技術分野】

【0001】

政府の通知

本研究は、部分的に国立衛生研究所のthe Medical Research Service of the Department of Veterans AffairsからのR29DK45293-02および国立ガン研究所からのR01 CA58834の援助を受けた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、機能性空胞形成毒素を発現しない*H. pylori*の遺伝子操作変異株、この*Helicobacter pylori*空胞形成毒素をコードする単離された核酸、空胞形成毒素をコードする核酸と選択的にハイブリダイズする核酸ならびに*H. pylori*感染に対して免疫および処置する方法に関する。 10

【背景技術】

【0003】

背景技術

*Helicobacter pylori*は、ヒト慢性表在性胃炎の主な病因性因子であり、そしてこの生物による感染は、消化性潰瘍疾患およびおそらく胃ガンの病因における重要な病因性因子である(1~3)。基本的には、*H. pylori*感染者は全て組織学的胃炎に発展するが(4)、*H. pylori*感染者の大半は無症候にとどまり(4)、その他の感染者は消化性潰瘍または胃腺ガンのような重篤な感染合併症に発展する(2、3)。個々の*H. pylori*単離体は高レベルの遺伝子型多様性を示すが(5、6)、この生物の表現型特徴はほとんど全て保存される。現在、株間で異なることが知られている唯一の表現型特徴は、空胞形成細胞毒素の産生(7、8)およびcagAによりコードされる128kDaの細胞毒素関連タンパク質の存在(8)である。消化性潰瘍疾患を有する患者は、胃炎のみを有する患者よりも空胞形成細胞毒素産生株に頻繁に感染されている(11、12)。同様に、128kDaの細胞毒素関連CagAタンパク質への血清学的応答は、*H. pylori*感染者における消化性潰瘍の存在と関係がある(8、14)。従って、これらの2つの関連する表現型は、*H. pylori*感染の臨床的結果に影響し得る重要な毒性決定因子である。 20

【0004】

空胞形成細胞毒素は、インビトロで約50%の*H. pylori*株により産生され(7、8)、そして種々の細胞型に対して活性である(7)。本発明者らは、空胞形成細胞毒素を*H. pylori* 60190から精製し、そしてこれが変性および還元条件下で87 kDaタンパク質として移動することを示した(米国特許出願第07/841,644号)。このタンパク質をコードする遺伝子を単離または配列決定することは、このタンパク質が精製されるまで、不可能であった。従って、診断試薬としての使用、またはワクチンにおける使用のために、大量の空胞形成毒素を発現することは不可能であった。 30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の要旨 40

上記目的を達成するために、本発明は、例えば、以下を提供する。

項目1 . *Helicobacter pylori*空胞形成毒素をコードする単離された核酸であって、配列表の配列番号1で規定されるヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964からなる、核酸。

項目2 . 上記核酸を発現するために適切なベクター内にある、項目1に記載の核酸。

項目3 . 上記核酸を発現するために適切な宿主中にある、項目2に記載の核酸。

項目4 . *Helicobacter pylori*の単離された核酸であって、配列表の配列番号1で規定されるヌクレオチド配列からなる、核酸。

項目5 . 上記核酸を発現するために適切なベクター中にある、項目4に記載の核酸。

項目6 . 上記核酸を発現するために適切な宿主中にある、項目5に記載の核酸。 50

- 項目7．項目1に記載の核酸によりコードされる、精製されたタンパク質。
- 項目8．薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の項目7に記載のタンパク質を含む組成物。
- 項目9．*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法であって、その被験体に項目8に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。
- 項目10．ストリンジェント条件下で項目4に記載の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸であって、そしてその核酸がハイブリダイズする配列のセグメントと少なくとも70%の相補性を有する、核酸。
- 項目11．上記核酸を発現するために適切なベクター中にある、項目10に記載の核酸。
- 項目12．上記核酸を発現するために適切な宿主中にある、項目11に記載の核酸。 10
- 項目13．項目12に記載の核酸によりコードされる、精製された抗原性タンパク質。
- 項目14．薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の項目13に記載のタンパク質を含む組成物。
- 項目15．*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法であって、その被験体に項目14に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。
- 項目16．*Helicobacter pylori*由来の単離された核酸であって、配列表の配列番号3で規定されるヌクレオチド配列を含む、核酸。
- 項目17．上記核酸を発現するために適切なベクター中にある、項目16に記載の核酸。
- 項目18．上記核酸を発現するために適切な宿主中にある、項目17に記載の核酸。
- 項目19．項目16に記載の核酸によりコードされる、精製された抗原性タンパク質。 20
- 項目20．薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の項目19に記載のタンパク質を含む組成物。
- 項目21．*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法であって、その被験体に項目20に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。
- 項目22．ストリンジェント条件下で項目16に記載の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸であって、そしてその核酸がハイブリダイズする配列のセグメントと少なくとも70%の相補性を有する、核酸。
- 項目23．薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の、機能性空胞形成毒素を発現しない単離された天然に存在する*H. pylori*株を含む組成物。
- 項目24．*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法であって、その被験体に項目 30
- 23に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。
- 項目25．非*H. pylori*核酸を含み、そして機能性空胞形成毒素を発現しない遺伝子的に改変された*H. pylori*変異株。
- 項目26．薬学的に受容可能なキャリア中にある、免疫原性量の、項目25に記載の遺伝子的に改変された*H. pylori*株を含む組成物。
- 項目27．*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法であって、その被験体に項目26に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。
- 項目28．*H. pylori*感染を処置する方法であって、被験体に、免疫原性量の項目25に記載の遺伝子的に改変された*H. pylori*変異株を投与する工程を包含する、方法。
- 項目29．配列番号1のアミノ酸をコードする単離された核酸。 40
- 項目30．ストリンジェント条件下で、項目29に記載の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸であって、そしてその核酸がハイブリダイズするセグメントと、またはそのセグメントに相補的な核酸と少なくとも95%の相補性を有する、核酸。
- 項目31．上記核酸を発現するために適切なベクター中にある、項目30に記載の核酸。
- 項目32．上記核酸を発現するために適切な宿主中にある、項目31に記載の核酸。

【 0 0 0 6 】

本発明は、*Helicobacter pylori*空胞形成毒素をコードする単離された核酸を提供し、この核酸は、配列表において配列番号1として規定されるヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964からなる。この核酸は、本発明によって提供される*H. pylori*のvacAコード領域の2本鎖配列の一例である。*Helicobacter pylori*から単離された、配列表において配列 50

番号3として規定されるヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。この核酸は、機能性空胞形成毒素を産生しない天然に存在する*H. pylori*株(*tox⁻*株)の*vacA*(空胞形成毒素)遺伝子の2本鎖配列であり得る。

【0007】

本発明の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸が提供される。この選択的にハイブリダイズする核酸は、例えば、これがハイブリダイズする核酸を有する生物の存在を検出するためのプローブまたはプライマーとして使用され得る。このような核酸は、ポリペプチドをコードし得、そしてこれにより、ベクターおよび宿主に置かれて、この毒素、抗原的に類似の毒素、抗原性フラグメントまたは毒素機能を示すフラグメントを産生し得る。

10

【0008】

本発明はまた、*H. pylori*の遺伝子的に改変した変異株を提供し、この変異株は機能性空胞形成毒素を発現しない。

【0009】

本発明は、本発明の核酸によってコードされる精製タンパク質を提供する。本発明のタンパク質の1例は、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964によりコードされる、*H. pylori*の空胞形成毒素(配列番号2)である。

【0010】

本発明は、免疫原性量の本発明のタンパク質、遺伝子的に改変した株または天然に存在する*tox⁻*株を、薬学的に受容可能なキャリア中に含む組成物を提供する。この組成物に使用されるタンパク質は、本発明の空胞形成毒素タンパク質であり得る。*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法が提供され、この方法は本発明の免疫原性組成物を被験体に投与する工程を包含する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

発明の詳細な説明

核酸

本発明は、*Helicobacter pylori*空胞形成毒素をコードする単離された核酸を提供し、この核酸は、配列表において配列番号1として規定されるヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964からなる。この核酸は、本発明によって提供される*H. pylori*の*vacA*コード領域の2本鎖配列の一例である。「単離された」核酸は他の*H. pylori*遺伝子から分離される核酸である。

30

【0012】

*Helicobacter pylori*の単離された核酸もまた提供され、この核酸は配列表において配列番号1として規定されるヌクレオチド配列からなる。従って、この配列は、*H. pylori*の*vacA*コード領域のための調節配列を含む。配列表において配列番号1として規定されるヌクレオチド配列のヌクレオチド91~95からなるShine-Dalgarno配列が特に提供される。本発明はまた、配列番号1で規定されるタンパク質をコードする任意の核酸を提供する。

【0013】

配列表において配列番号3として規定されるヌクレオチド配列を含む、*Helicobacter pylori*から単離された核酸が提供される。この核酸は、機能性空胞形成毒素を産生しない、天然に存在する*H. pylori*株(*tox⁻*株)の*vacA*(空胞形成毒素)遺伝子の2本鎖配列であり得る。配列番号3の核酸は、本発明により提供される*tox⁻*株の空胞形成毒素遺伝子の2本鎖の部分配列である。この核酸は、オープンリーディングフレームの一部を含む。残りの配列は、本明細書中で提供されるクローニングおよび配列決定方法を用いて容易に決定され得る。

40

【0014】

本発明の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸が提供される。この選択的にハイブリダイズする核酸は、例えば、これがハイブリダイズする核酸を有する生物の存在を検出するためのプローブまたはプライマーとして使用され得る。このような核酸は、

50

ポリペプチドをコードし得、そしてこれにより、ベクターおよび宿主に置かれて、この毒素、機能的に類似の毒素、抗原性フラグメントまたは毒素機能を示すフラグメントを産生し得る。

【0015】

「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーションプロトコールに使用される洗浄条件を意味する。一般に、この洗浄条件は、できる限りストリンジェントであるべきである(すなわち、温度および塩濃度の組み合わせは、ハイブリダイズされる配列の変性温度が研究中のハイブリッドの計算される T_m の約5~20下であるように選択されるべきである)。温度および塩の条件は、フィルターに固定された参考DNAの試料を目的のプロブまたは配列にハイブリダイズさせ、続いて異なるストリンジェンシーの条件下で洗浄する予備実験において経験的に決定され得る。例えば、ストリンジェントな条件は、6×SSCにおいて68で18時間のハイブリダイゼーション、続いて65で0.1×または0.5×SSCを用いる複数の洗浄により例示される。

10

【0016】

ストリンジェントな条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964からなる核酸、または配列番号1のタンパク質をコードする核酸と選択的にハイブリダイズし、そしてこれがハイブリダイズする配列のセグメントに対して少なくとも70%の配列相補性を有する単離された核酸が提供される。従って、この核酸は、機能性空胞形成毒素をコードする遺伝子を有する生物の存在を検出するためのプロブまたはプライマーとして使用され得る。

20

【0017】

ストリンジェントな条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列からなる核酸、または配列番号1のタンパク質をコードする核酸と選択的にハイブリダイズし、そしてこれがハイブリダイズする配列のセグメントに対して少なくとも70%の配列相補性を有する単離された核酸が提供される。この選択的にハイブリダイズする核酸は、1つまたはそれ以上の空胞形成毒素コード配列の上流に位置する調節配列を含む。

【0018】

ストリンジェントな条件下で、配列番号3の核酸と選択的にハイブリダイズする単離された核酸もまた提供される。配列番号3の核酸はオープンリーディングフレームの一部であるため、選択的にハイブリダイズする核酸はポリペプチドをコードし得る。

30

【0019】

本発明の選択的にハイブリダイズする核酸は、これがハイブリダイズする配列のセグメントに対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%および99%の相補性を有し得る。この核酸は少なくとも20、50、100、150、200、300、500、750、1000、2000、3000または4000ヌクレオチドの長さを有し得る。従って、この核酸は、毒素の代替のコード配列であり得、あるいは機能性空胞形成毒素をコードする遺伝子を有する株または tox^- 株の存在を検出するためのプロブまたはプライマーとして使用され得る。プライマーとして使用される場合、本発明は、異なる領域と選択的にハイブリダイズして所望の領域を増幅させる少なくとも2つの核酸を含む組成物を提供する。プロブまたはプライマーの長さに応じて、プロブまたはプライマーは70%相補性塩基と完全な相補性の間の範囲であり得、そしてストリンジェントな条件下でなおハイブリダイズし得る。例えば、機能性空胞形成毒素産生*H. pylori*株の存在を診断する目的のために、ハイブリダイズする核酸(プロブまたはプライマー)とそれがハイブリダイズする配列(試料由来の*H. pylori* DNA)との間の相補性の程度は、少なくとも本発明の天然に存在する tox^- 株または遺伝子的に改変した株とのハイブリダイゼーションを排除するのに充分であるべきである。従って、機能性毒素コード配列と選択的にハイブリダイズする核酸は、ストリンジェントな条件下で tox^- 株の核酸とは選択的にハイブリダイズせず、反対の場合にも同じである。あるいは、プロブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件下で tox^+ および $tox^- vacA$ 遺伝子の両方とハイブリダイズするように選択され得る。本発明は、ストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズする核酸と非選択的にハイブリダイズする核酸とを区別す

40

50

るために必要とされる相補性の程度が各々の核酸について明確に決定され得るように、これらのH. pyloriの核酸の例を提供する。選択的にハイブリダイズする核酸が関連のないタンパク質または他の種由来のタンパク質をコードする核酸とはハイブリダイズしないこともまた明らかであるはずである。

【0020】

当業者は、全遺伝子およびより短いヌクレオチドフラグメントを合成するための日常的な実験を用いて本発明の核酸を容易に獲得し得る。例えば、配列表に示されているような核酸を得るための技術が、本明細書中で特に提供される。さらに、顕著な改変なしで利用され得る別の方法が、当該分野において提供される。Ferrettiら (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 599-603(1986)) および Wosnickら (*Gene* 76: 153-160(1989)) は配列が公知の遺伝子を合成するための日常的な方法を示している。より詳細には、Ferrettiらは、合成オリゴヌクレオチドからの1057塩基対の合成ウシロドプシン遺伝子の合成を教示している。この合成遺伝子は、公知の配列に対し忠実であり(第603頁、第1文)、このことは、この遺伝子合成方法の信頼性を示す。さらに、Wosnickらは、効率的な、1工程のアニーリング/結合プロトコルを用いてトウモロコシグルタチオントランスフェラーゼ(GST)遺伝子の合成を教示している。この技術はまた、100%の忠実度を有する完全合成遺伝子を産生した。このことは、このプロトコルの日常性を示す。

10

【0021】**タンパク質**

本発明は、本発明の核酸によりコードされる精製タンパク質を提供する。本発明のタンパク質の1例は、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964によりコードされる、H. pyloriの空胞形成毒素(配列番号2)である。

20

【0022】

ストリンジェントな条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド101~3964からなる核酸と選択的にハイブリダイズし、そしてこれがハイブリダイズする配列のセグメントに対して少なくとも70%の配列相補性を有する核酸によりコードされる精製抗原性タンパク質が提供される。

【0023】

配列表における配列番号3として規定されるヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされる抗原性タンパク質もまた提供される。このタンパク質は、E. coli発現系または本明細書中に記載されている他の適切な系において発現され得る。

30

【0024】

本発明の選択的にハイブリダイズする核酸によりコードされる抗原性タンパク質は、2本鎖の参考核酸のナンセンス鎖とハイブリダイズする核酸によりコードされる。本明細書中で使用される「タンパク質」は、ポリペプチドおよびペプチドを含む。従って、選択的にハイブリダイズする核酸によってコードされるタンパク質は、関連のないまたは無関係なタンパク質またはフラグメントではない。

【0025】

本発明のタンパク質の抗原性フラグメントは、化学的または機械的な分断により全抗原から単離され得る。このように得られた精製フラグメントは、本明細書中で教示される方法により、それらの抗原性および特異性を決定するために試験され得る。抗原性フラグメントは、代表的に、タンパク質のアミノ酸配列由来の少なくとも約8の連続的アミノ酸であり、そしてH. pyloriの機能性または非機能性空胞形成毒素に独特であるべきである。

40

【0026】

本発明のタンパク質の抗原性フラグメントは、このタンパク質の抗原性フラグメントを産生し得る発現系において、このフラグメントをコードする選択的にハイブリダイズする核酸をクローニングすることによって得られる組換えタンパク質であり得る。抗原性タンパク質をコードする核酸は、この核酸を宿主中に置き、そしてその産物を発現することにより決定され得る。続いて、この産物は、インタクトな天然タンパク質に対して惹起されたポリクローナルまたはモノクローナル抗体に対し、あるいは感染された被験者の血中に

50

存在する(特異的に*H. pylori*と反応する)抗体に対してスクリーニングされ得る。

【0027】

抗原性タンパク質のアミノ酸配列が一旦提供されると、標準的なペプチド合成技術を用いてこの抗体の毒性または免疫反応性領域に対応するように、および誘導された配列中の特定のアミノ酸残基の含有、欠失または修飾によりこれらフラグメントを修飾するように選択されるペプチドフラグメントを合成することもまた可能である。従って、このタンパク質由来の極めて大量のペプチドの合成または精製が可能である。

【0028】

本発明のタンパク質のアミノ酸配列は、ある追加の特性(例えば可溶性)を与えるように設計された配列に結合した抗原性タンパク質の免疫反応性部分を含有し得る。これらの抗原性タンパク質およびフラグメントは、1つまたはそれ以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されて、ある追加の特性を提供する(例えば、ジスルフィド結合可能なアミノ酸を除去/付加する、その生物学的寿命を増加させる、酵素活性を改変する、または免疫原性を改善する)アミノ酸配列を含有し得る。いずれの場合でも、ポリペプチドは、関連の生物学的に活性な性質(例えば、免疫反応性、免疫原性、毒性など)を有しなければならない。

10

【0029】

変異体生物

本発明はまた、機能性空胞形成毒素を発現しない*H. pylori*の遺伝子操作された変異株を提供する。この変異体株は、例えば、天然の*H. pylori*に見出されない核酸の存在により、天然に存在するtox⁺*H. pylori*株と区別され得る。1つの例では、変異体*H. pylori*株は本明細書の実施例に記載の空胞形成毒素のコード配列に挿入変異を作製することにより得られる。本発明は毒素をコードする核酸を提供するので、毒素のコード配列を変異させる他の方法が、本明細書中に意図されるように、他の変異株を得るために使用され得る。本発明の変異体*H. pylori*株の例は、84-183:v1および60190:v1と名付けられる。

20

【0030】

追加の変異体は、例えば、空胞形成毒素のコード配列中の置換変異により、あるいは空胞形成毒素遺伝子の一部の欠失により、この遺伝子を非機能性にするか、またはこの生物を非感染性、非毒性、低毒性または統計学的に有意な程度に弱毒化にするような低い量で産生されるようにすることにより、調製され得る。さらに、毒素をコードする核酸のヌクレオチド配列を提供することにより、本発明は、所望の効果を有する特異的な点変異の作製を可能にする。欠失、挿入または置換変異は、調節領域またはコード領域のいずれかまたは両方において作製されて、転写を防止し得、または転写された産物を非機能性にし得る。例えば、配列番号1に示されているShine Dalgarno配列は、毒素タンパク質の翻訳を防止する、または統計学的に有意な程度に低減するように破壊され得る。

30

【0031】

欠失または挿入変異体の構築へのこのようなアプローチの1つは、Donnenberg法による(DonnenbergおよびKaper *Infect. Immun.* 4310-4317, 1991)。毒素遺伝子中の欠失は、制限フラグメントを欠失させてクローンを再結合させることにより作製され得る。この変異体は、自殺ベクター-pILL570にクローン化される。Bacillus subtilisの*sacB*遺伝子もまた自殺ベクターにクローン化されて、条件的致死表現型を提供する。この構築物は、エレクトロポレーションにより*H. pylori*に形質転換され、形質転換体はスペクチノマイシン耐性により選択される。自殺ベクターおよび毒素遺伝子の変異型を含む部分二倍体株をスクロースに曝して、第2の組換えを受けてベクターの消失を生じた生物について直接に選択する。変異を作製するこれらおよび他の周知の方法は、本明細書中で提供される核酸に適用されて、他の所望の変異を獲得し得る。

40

【0032】

ワクチン

本発明は、薬学的に受容可能なキャリア中に、免疫原性量の本発明のタンパク質を含む組成物を提供する。この組成物に使用されるタンパク質は、本発明の空胞形成毒素タンパク質であり得る。*H. pylori*による感染に対して被験体を免疫する方法が提供され、この

50

方法は本発明の免疫原性組成物を被験体に投与する工程を包含する。

【0033】

本発明の選択的にハイブリダイズする核酸によってコードされる免疫原性量の抗原性タンパク質を薬学的に受容可能なキャリア中に含む組成物が提供される。これらのタンパク質をコードする核酸は、本質的には、配列表に示されている非コード鎖またはアンチセンス鎖とハイブリダイズする核酸である。H. pyloriによる感染に対して被験体を免疫する方法もまた提供され、この方法はこの組成物を被験体に投与する工程を包含する。

【0034】

配列表における配列番号3として規定されるヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされる免疫原性量の抗原性タンパク質を含む組成物は、薬学的に受容可能なキャリア中にあり得る。H. pyloriによる感染に対して被験体を免疫する方法は、この組成物を被験体に投与する工程を包含する。

10

【0035】

本発明の抗原性タンパク質、天然に存在するtox⁺または遺伝子的に改変した変異体H. pyloriは、免疫原性量の抗原、tox⁺または変異体および薬学的に受容可能なキャリアを含むワクチンの構築に使用され得る。このワクチンは、全抗原、インタクトなH. pylori(tox⁺株の場合)、E. coliまたは他の株上の抗原、あるいはこの抗原に特異的なエピトープ(フラグメント)であり得る。このワクチンはまた、他の抗原に対する抗体と潜在的に交差反応性であり得る。H. pyloriによる感染に対して被験体を免疫する方法もまた提供され、この方法は、遺伝子的に改変したH. pylori、タンパク質またはtox⁺株の免疫原性量を被験体に投与する工程を包含する。

20

【0036】

免疫原性の測定

本発明の精製タンパク質およびポリペプチドフラグメントは、それらの免疫原性および特異性を測定するために試験され得る。簡単に述べれば、種々の濃度の推定の免疫原フラグメントを調製しそして動物に投与し、そして各濃度に対する動物の免疫学的応答(例えば、抗体の産生または細胞媒介性免疫)を測定する。投与される抗原量は、被験体(例えば、ヒトまたはモルモット)、被験体の状態、被験体のサイズなどに依存する。その後、そのように抗原を接種された動物は、細菌に曝され得、特異的免疫原性タンパク質またはフラグメントの潜在的なワクチン効果を試験される。推定の免疫原性フラグメントの特異性は、接種動物由来の血清、他の体液またはリンパ球を、他の近縁の細菌との交差反応性について試験することにより確かめられ得る。

30

【0037】

一旦上記のように免疫原性が確立されると、抗原の免疫原性量は、標準手順を用いて測定され得る。簡単に述べれば、種々の濃度の推定の特異的免疫反応性エピトープが調製され、動物に投与され、そして各濃度に対する動物の免疫学的応答(例えば、抗体の産生)の程度が測定される。次いで、免疫化用量は、動物に細菌を投与し、そして種々の量の免疫原の防御効果を観察することにより立証し得る。H. pylori感染に対して動物を免疫化する方法の他の例は、CzinnおよびNedrud(*Infection and Immunity* 59(7): 2359-2363, 1991)、およびThomasら(*Acta Gastro-Enterologica Belgica, Suppl.* 58:54, 1993)に記載されている。

40

【0038】

本発明のワクチン中の薬学的に受容可能なキャリアは、生理食塩水または他の適切なキャリア(Arnon, R.(編) *Synthetic Vaccines* 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987)を含み得る。アジュバントもまた、ワクチンのキャリアの一部であり得、その場合にはそれは用いられる抗原、投与様式、および被験体を基礎として標準の基準により選択され得る(Arnon, R.(編), 1987)。投与方法は、特定の用いられるワクチンおよびそれが投与される被験体に依存して、経口または舌下、または注射による様式であり得る。

【0039】

50

上記から、ワクチンが予防療法または治療法として使用される得ることが認識される。例えば、被験体に免疫原性量の遺伝的に改変された本発明のH.pyloriを投与する工程を包含する、H.pylori感染の処置方法が提供される。従って、本発明は、ワクチンを被験体に投与することにより、H.pylori感染および関連疾病を防止または処置する方法を提供する。

【0040】

ベクターおよび宿主

本発明の核酸は、核酸の発現に適するベクター中に存在し得る。ベクター中の核酸は、核酸の発現に適切な宿主中に存在し得る。

【0041】

抗原の発現に有用な当業者に公知の多くのE.coli発現ベクターが存在する。使用に適した他の微生物宿主は、Bacillus subtilisのような桿菌、およびSalmonella、Serratiaおよび種々のPseudomonas種のような他の腸内細菌科を含む。これらの原核生物宿主では、宿主細胞に適合性の発現制御配列(例えば、複製起点)を代表的には含む発現ベクターも作製し得る。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン(Trp)プロモーター系、
-ラクタマーゼプロモーター系、または ファージ由来のプロモーター系のような任意の数の種々の周知のプロモーターが存在する。プロモーターは、必要に応じてオペレーター配列を有して代表的には発現を制御し、そして例えば、転写および翻訳を開始および終結するためにリボソーム結合部位配列を有する。必要であれば、抗原の5'でかつフレームが合ったMetコドンの挿入により、アミノ末端メチオニンを提供し得る。また、抗原のカルボキシ末端伸長は、標準のオリゴヌクレオチド変異誘発手順を用いて除去され得る。

10

20

【0042】

さらに、酵母発現が使用され得る。酵母発現系にはいくつかの利点がある。第1に、酵母分泌系で産生されるタンパク質は、正確なジスルフィド対合を示す証拠が存在する。第2に、酵母分泌系により翻訳後のグリコシル化が効率的に行われる。Saccharomyces cerevisiaeプレプロ 因子リーダー領域(MF⁻¹遺伝子によりコードされる)が、酵母からタンパク質を分泌させるために日常的に用いられる(Brakeら、1984)。このプレプロ 因子のリーダー領域は、シグナルペプチドおよびKEX2遺伝子によりコードされる酵母プロテアーゼに対する認識配列を含むプロセグメントを含む：この酵素は、Lys-Argジペプチド切断-シグナル配列のカルボキシル側で前駆体タンパク質を切断する。抗原コード配列は、プレ
プロ 因子リーダー領域にフレームを合わせて融合され得る。次いでこの構築物は、アル
コールデビドロゲナーゼIプロモーターまたは解糖系プロモーターのような強力な転写プロ
モーターの制御下に置かれる。抗原コード配列には翻訳終止コドンが続き、その後には
転写終結シグナルが続く。あるいは、抗原コード配列は、Sj26または -ガラクトシダー
ゼのようなアフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の精製を容易にする
ために用いられる第2のタンパク質コード配列に融合され得る。融合タンパク質の成分を
分離するためのプロテアーゼ切断部位の挿入は、酵母における発現のために用いられる構
築物に適用可能である。

30

【0043】

哺乳動物細胞は、タンパク質の発現を、折り畳みおよびシステイン対合、複合糖質構造の付加、および活性タンパク質の分泌などの重要な翻訳後改変に好適な環境に置く。哺乳動物細胞における抗原の発現に有用なベクターは、強力なウイルスプロモーターおよびポリアデニル化シグナルの間への抗原コード配列の挿入により特徴付けられる。ベクターは、選択マーカーとして使用するためのゲンタマイシンまたはメトトレキセート耐性のいずれかを付与する遺伝子を含み得る。抗原および免疫反応性フラグメントのコード配列は、メトトレキセート耐性コードベクターを用いてチャイニーズハムスター卵巣細胞株中に導入され得る。形質転換された細胞中のベクターDNAの存在は、サザン分析により確認され得、そして抗原コード配列に対応するRNAの産生は、ノーザン分析により確認され得る。インタクトなヒトタンパク質を分泌し得る多数の他の適切な宿主細胞株が当該技術分野で開発されており、そしてこれはCHO細胞株、HeLa細胞、ミエローマ細胞株、Jurkat細胞な

40

50

どを含む。これらの細胞に対する発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサー、ならびにリボソーム結合部位、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列のような必要情報プロセッシング部位などの発現制御配列を含み得る。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスなど由来のプロモーターである。目的のDNAセグメントを含むベクターは、細胞宿主の型に依存して変化する方法により宿主細胞中に移入され得る。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが一般に原核生物細胞に対して利用され、その一方その他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが用いられ得る。

【0044】

哺乳動物細胞における抗原の発現のための代替のベクターは、ヒト α -インターフェロン、組織プラスミノゲン活性化因子、第VIII凝血因子、B型肝炎ウイルス表面抗原、プロテアーゼネクシン1、および好酸球主要塩基性タンパク質の発現のために開発されたベクターに類似のベクターが使用され得る。さらに、ベクターは、(COS7のような)哺乳動物細胞中の、挿入されたDNAの発現に利用可能なCMVプロモーター配列およびポリアデニル化シグナルを含み得る。

【0045】

改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、コードされるポリペプチド産物が産生されるように、コード配列の転写(発現配列)および翻訳を促進する配列を含み得る。そのようなポリヌクレオチドの構築は、当該技術分野で周知である。例えば、そのようなポリヌクレオチドは、プロモーター、転写終結部位(真核生物発現宿主におけるポリアデニル化部位)、リボソーム結合部位、および、必要に応じて、真核生物発現宿主で使用するためのエンハンサー、および、必要に応じて、ベクターの複製に必要な配列を含み得る。

【0046】

DNA配列は、この配列が発現制御配列に作動可能に連結され、即ち、発現制御配列の機能を確実にするために位置された後、宿主中で発現され得る。これらの発現ベクターは、代表的には、エピソームとしてまたは宿主染色体DNAの組み込み部分としてのいずれかで宿主生物中で複製可能である。一般には、発現ベクターは、選択マーカー、例えば、テトラサイクリン耐性またはヒグロマイシン耐性を含み得、所望のDNA配列で形質転換されたこれら細胞の検出および/または選択を可能にする(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと)。

【0047】

核酸検出(診断)方法

空胞形成毒素、*H. pylori*が発現する機能性毒素、天然に存在するtox *H. pylori*または本発明の遺伝子的に改変された変異体の存在は、この毒素、毒素フラグメント、toxまたは変異した毒素遺伝子に特異的な核酸の存在を検出することにより測定され得る。野生型、tox-、および変異した遺伝子に対するこれら配列の特異性は、Genetics Computer Group(Madison, WI)のコンピュータープログラムWord SearchまたはFASTAを用いて(これらは問題の遺伝子に対する類似性について目録に載っているヌクレオチド配列をサーチする)、コンピュータ化されたデータベースである、GenBankの目録に載っている既知の配列とコンピューター比較を行うことにより決定され得る。

【0048】

*H. pylori*株または目的のタンパク質に特異的な核酸は、本発明の選択的にハイブリダイズする核酸を用いて検出され得る。より詳細には、ポリメラーゼ連鎖反応またはリガーゼ連鎖反応のような核酸増幅技術が利用される。あるいは、核酸は、直接ハイブリダイゼーションを利用してまたは制限フラグメント長多型を利用することにより検出される。例えば、本発明は、機能性空胞形成毒素を発現するまたは発現しない*H. pylori*の存在を検出する方法を提供し、これは本発明の毒素関連核酸に特異的な核酸とのみハイブリダイズするPCRプライマーを利用する工程を包含する。増幅の存在は、抗原をコードする核酸の存在

10

20

30

40

50

を示す。さらに、制限エンドヌクレアーゼ切断部位と関連するヌクレオチド配列の存在を確かめることが、検出のために用いられ得る。別の実施態様では、DNA試料の制限フラグメントは、例えば、サンガーのddNTPシーケンシングまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン 5'-トリホスフェートおよびTaqポリメラーゼを用いて直接配列決定され、そして既知の独特の配列に比較され得、*H. pylori*株を検出する。さらなる実施態様では、本発明は、本発明の選択的にハイブリダイズする核酸を用いた選択的増幅方法を提供する。なお別の実施態様では、相応する配列が、独特の配列を、検出されるべき配列と必須の配列同一性の程度を有する選択的にハイブリダイズする核酸を含むプローブと直接にハイブリダイズすることにより検出され得る。さらに、ヌクレオチド配列は、上記の方法によりハイブリダイゼーションに先立って増幅され得る。

10

【0049】

プローブは、例えば、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、ビオチン-アビジン標識などを用いて、次の例えばサザンプロットハイブリダイゼーション手順などの可視化のために適切に標識され得る。標識されたプローブは、例えば、ニトロセルロースシートに結合された試料DNAと、完全に相補的な配列または70%、80%、90%または95%の相補性を有する配列がハイブリダイズするようなストリンジェンシー条件下で反応される。標識されたDNAプローブにハイブリダイズするDNA配列を保有する領域が、再アニーリング反応の結果としてそれら自身標識されるようになる。次いで、そのような標識を示すフィルターの領域は、例えば、オートラジオグラフィにより可視化され得る。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、与えられた鎖長について、通常、 T_m (プローブとその標的配列との間で形成されるハイブリッドの不可逆的融解温度)の5 から20 低い温度である。50 ~ 200マーについては、推奨されるハイブリダイゼーション温度は、 $0.1 \times \sim 0.5 \times$ SSCの洗浄塩濃度で約68 である(9)。しかし、洗浄温度は、調査下の配列およびハイブリダイゼーションの目的に独特であり、そして本明細書でさらに記載されるように、各改変体について最適化される。

20

【0050】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、顕著な効率で特定のDNA配列を増幅する技術である。変性、プライマーアニーリングおよびポリメラーゼ(例えば熱安定性酵素Taqポリメラーゼ)を用いて実施される伸長の繰り返しサイクルは、所望のDNA配列の濃度の指数的增长をもたらす。ヌクレオチド配列の知見が与えられれば、目的のDNAに隣接する配列に相補的である合成オリゴヌクレオチドが調製され得る。各オリゴヌクレオチドは、2本鎖の一方に相補的である。DNAは、高温(例えば95)で変性され得、次いでモル大過剰のオリゴヌクレオチドの存在下で再アニールされる。3'末端が互いの方に向けて配向したオリゴヌクレオチドが、標的配列の反対の鎖にハイブリダイズし、そして4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下で核酸テンプレートに沿って酵素的伸長をプライムする。次いで、最終産物を、再び、別のサイクルのために変性する。この3工程サイクルが数回繰り返された後、百万倍以上のDNAセグメントの増幅が達成され得る。次いで、得られるDNAは、遺伝的改変を位置付けるために直接配列決定され得る。次いで、得られるDNAを、全ての遺伝子多様性の位置を決定するために、直接配列決定し得る。あるいは、改変されたDNAにのみ結合するオリゴヌクレオチドを調製することが可能であり得、その結果、PCRは、変異が存在する場合のDNA増幅のみを生じる。RNAポリメラーゼを利用して高コピー数を達成する3SRのようなその他の技術もまた、適切な場合用いられ得る。

30

40

【0051】

なお別の方法では、PCRは、得られた産物の次の分析を伴う制限エンドヌクレアーゼ消化を伴い得る。誘導された変異または天然に存在する可変配列により、特定の制限エンドヌクレアーゼ部位の獲得または損失を生じ得る。制限エンドヌクレアーゼ認識部位の獲得または損失は、制限フラグメント長多型(RFLP)分析を用いるか、または目的の配列にまたがるPCR産物中の多型性制限エンドヌクレアーゼ部位の存在または非存在の検出により変異の検出を容易にする。

【0052】

50

RFLP分析のためには、DNAは、例えば、毒素または被験体から単離された機能性毒素を発現する*H. pylori*を含むと疑われる被験体の、血液、胃標本、唾液、歯こう、または、その他の体液から、および毒素非発現*H. pylori*に感染した被験体から得られ、制限エンドヌクレアーゼで消化され、そして次いでアガロース電気泳動によるサイズを基礎に分離される。次いで、エンドヌクレアーゼ消化産物を、標識プローブを用いるハイブリダイゼーションにより、サザンブロット技術を用いて検出し得る。次いで、サザンブロットから得られるパターンが比較され得る。このようなアプローチを用いて、ネイティブtox、遺伝子的に改変された毒素または機能性毒素DNAが、検出されるバンドの数を測定しそしてこの数を異なる株由来のDNAに対して比較することにより検出され得る。

【0053】

10

一本鎖構造分析(SSCA)は、配列変化を検出する比較的迅速な方法を提供し、これは少なくともいくつかの例では適切であり得る。

【0054】

一般的に、PCRおよびLCR用のプライマーは、通常約20bpの長さであり、そして好ましい範囲は15~25bpである。両方のプライマーが同じ長さでほぼ同じヌクレオチド組成であるときにより良い増幅が得られる。鎖の変性は通常94 で起こり、そしてプライマーからの伸長は通常72 である。アニーリング温度は調査中の配列に従って変化する。反応時間の例は：20分の変性；アニーリング、伸長および変性に対して2分、1分、1分の35サイクル；および5分の最終伸長工程である。

【0055】

20

以下の実施例は本発明を例示するが、本発明を限定することを意図しない。記載されるプロトコールは、用いられ得るプロトコールの代表であり、当業者に公知のその他の手順も代わって使用され得る。

【実施例】**【0056】**

細菌株および増殖条件

H. pylori 60190(ATCC 49503)(これから当初空胞形成細胞毒素が精製された(15))を用いて空胞形成細胞毒素の遺伝子をクローン化した。*H. pylori* 84-183(ATCC 53726)および87-199は、空胞形成細胞毒素を産生することが先に示された良く特徴付けられた株であり(8、9、16)、そしてTx30a、86-313、および87-203株は、検出可能なインビトロでの細胞毒素活性を産生しない野生型株である(7-9、16)。26株のヒト由来のさらなる臨床*H. pylori*単離株(先に記載されている(9))もまた、細胞毒素遺伝子の保存を評価するために使用した。*H. pylori*単離株は、5%ヒツジ血液を含むトリプチケースソイ寒天平板上で、CampyPak-Plus(BBL、Cockeysville、MD)により生成される微好気性雰囲気下、37 で48時間培養した。

30

【0057】

空胞形成細胞毒素の部分アミノ酸配列の決定

H. pylori 60190由来の87 kDa空胞形成細胞毒素を、先に記載(15)のように、ブロス培養上清から精製し、7%アクリルアミドゲル上で電気泳動し、そしてProBlott膜(Applied Biosystems、Foster City、CA)上にエレクトロブロットした(15)。次いで、87kDaタンパク質をArg-Cプロテアーゼで消化し、フラグメントをクロマトグラフィーにより分離し、そして3つのフラグメントのアミノ酸配列を、Fernandezら(17)に記載のように、Microsequencing Laboratory of Rockefeller University、New York、NYで決定した。

40

【0058】

遺伝子技術およびヌクレオチド配列分析

染色体DNAを単離するために、*H. pylori*細胞をGES(60%グアニジウムチオシアネート - 0.1 M EDTA - 0.5% Sarkosyl)中で溶解し、そしてDNAをクロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿により精製した(18)。*H. pylori* 60190染色体DNAに、音波処理による剪断またはA1ulでの部分消化のいずれかを行った；次いで、先に記載(9)のように、ZapII(Stratagene、La Jolla、CA)を用いてゲノムライブラリーを構築した。ライブラリーを、ランダム

50

ヘキサマー (United States Biochemical, Cleveland, Ohio) を用いたプライマー伸長により放射性標識したプローブを用いて、ブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした (19)。精製した反応性クローンから、クローン化された DNA 挿入片を含む pBluescript を、R408 ヘルパーファージとの同時感染により切り出し、そして *E. coli* XL1-Blue 中にサブクローン化した。プラスミド精製の後、制限酵素切断マップを生成し、そしてジデオキシ鎖停止法 (20) を用いて両鎖についてヌクレオチド配列を決定した。60190 株由来の *vacA* の最終ヌクレオチド配列を、PCR フラグメントよりむしろクローン化ゲノム DNA から完全に決定した。推定のプロモーターおよび Shine-Dalgarno 配列を、コンセンサス配列 (21) との比較により同定した。相同タンパク質についてのデータベースサーチを、FastA および FastDB プログラム、および National Center for Biotechnology Information の BLAST ネットワークサービスを用いて実施した。 10

【 0 0 5 9 】

H. pylori 60190 の空胞形成細胞毒素遺伝子のクローニング

縮重オリゴヌクレオチドプライマー [(5' TTYTTYACNACNGTNATHAT 3') (配列番号 17) および (5' TTRTTDATYTCNARRAARTTRTC 3') (配列番号 18)] を、精製 87kDa タンパク質の N 末端および実験的に決定されたペプチド配列 (アミノ酸残基 35-41 および 198-205、それぞれ、配列番号 1 および 2) の逆翻訳を基に構築し、*H. pylori* 60190 DNA から 0.5 kb バンドを PCR 増幅するために用いた。この PCR 産物を 1% アガロースゲルから切り出し、Qiaex ゲル抽出キット (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて精製し、そして pT7 Blue T-ベクターキット (Novagen, Madison, WI) を用いて、*E. coli* Nova Blue 細胞中にサブクローン化し pCTB1 を生成した。pCTB1 のヌクレオチド配列は、配列番号 1 の塩基 203~714 に対応した。 20

【 0 0 6 0 】

pCTB1 を用いた ZapII ライブラリーのスクリーニングにより 2 つの異なる反応性クローン (pCTB2 および pCTB3) を得た。細胞毒素の N 末端をコードする配列を、pCTB2 中で同定し、そして 2 つの実験的に決定したペプチド配列をコードする配列を pCTB3 中で同定した。次いで、0.4kb 産物 (pCTB4) を、pCTB3 の下流部分から選択されたプライマー (5' AAGGC TGGTGTGGATAC 3') (配列番号 5)、および実験的に決定されたペプチド配列 (アミノ酸残基 617~625、配列番号 2) の逆翻訳により合成された縮重プライマー (5' CKNGTDATYTCNACRTTY TT 3') (配列番号 6) を用いて、*H. pylori* 60190 DNA から PCR 増幅した。pCTB4 をプローブとして用いた *H. pylori* 60190 ゲノムライブラリーのスクリーニングにより、pCTB5 を精製した。pCTB5 の下流 0.2kb XbaI フラグメントを用いたライブラリーのスクリーニングにより、クローン pCTB6 および pCTB7 を単離した。クローンの各々を制限エンドヌクレアーゼを用いて消化し、そして各クローンの相当する部分のヌクレオチド配列を決定した。制限部位は : EcoRI、HindIII、XbaI、BglII である。 30

【 0 0 6 1 】

複数クローンの配列の編集は、101 位の ATG コドン (配列番号 1) で開始し、そして 3964 位の TAA コドン (配列番号 1) で終結する 3864bp の ORF を示した。mRNA 中のステムループ構造を形成し得る ($G = -13.2$ kcal) 逆反復配列は、ヌクレオチド 3975~3999 に伸長していた。この ORF は、1287 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていた。そして推定されるポリペプチドの計算分子量は、138,955 ダルトンであった。87kDa 細胞毒素の実験的に決定された N 末端アミノ酸配列をコードする配列の前には、中央の疎水性領域および Ala-Ala シグナルペプチダーゼ I 切断部位により特徴付けられる 33 アミノ酸のリーダー配列が先行していた。潜在的なリボソーム結合部位 (AGGAA) は、オープンリーディングフレームの 5 bp 上流で終了していた。第 2 の ORF は *vacA* と同じ方向で進行し、pCTB2 中に *vacA* の上流に同定された。この 567bp 以上の ORF の終止コドンは、逆反復配列を伴っていなかった。従って、*vacA* ORF は、成熟 87kDa 細胞毒素よりかなり大きなポリペプチドをコードしていた。これらの知見に一致して、抗-87kDa 血清を用いた *H. pylori* 全細胞のウェスタンブロットティングは、培養上清には存在していなかった弱い免疫反応性の 120~150 kDa バンドを示した。 40

【 0 0 6 2 】

空胞形成細胞毒素遺伝子産物の分析

vacAの翻訳されたアミノ酸配列およびヌクレオチド配列、ならびに上流配列を、PIRおよびSwiss-Protデータベース中の配列と比較した。最も強い相同性が、vacAの上流に位置する567bp以上のORFと、E.coli由来のシステイン-tRNAシンセターゼ(cysS)との間に存在した(2つの50アミノ酸領域中40%および44%同一性)(26、27)。vacA遺伝子産物と有意な相同性を有するタンパク質は存在しなかった。しかし、関連のC末端モチーフおよび類似のC末端プロセッシングを有するいくつかのタンパク質が同定された。これらは、Haemophilus influenzae(28)およびNeisseria gonorrhoeae(29)由来のIgAプロテアーゼ、Serratia marcescensセリンプロテアーゼ(30~32)、Rickettsia rickettsiiの120kDa表面露出タンパク質(OmpB)(33、34)、Rickettsia prowazekiiの120kDa表面層タンパク質(35)、および腸病原性E.coli(EPEC)のAIDA-Iアドヘシン(adhesin)(36)を含む。これら遺伝子の各々は、サイズ30~60kDaのペプチドのC末端切断を受ける大きなタンパク質をコードする(28-36)。C末端1位のフェニルアラニンで開始する、交互する疎水性アミノ酸モチーフがこれらタンパク質の各々に存在する。このC末端セグメントは、一般に、グラム陰性外膜タンパク質に見出される(37)。これらのタンパク質は、低システイン含量(タンパク質あたり2~4のシステイン)によりすべて特徴付けられ、これは膜輸送の間のジスルフィド結合形成を最小にする必要性に多分関係する(38、39)。しかし、翻訳されたVacAタンパク質中および3つの関連プロテアーゼ中では、2つのシステイン残基が、わずか7~11アミノ酸離れて存在する。S.marcescensプロテアーゼでは、対のシステイン残基のセリンによる置換は減少した酵素分泌を伴う(31)。対応するシステイン残基はまた、H.pylori vacA遺伝子産物の分泌において所定の役割を演じ得る。

10

20

【0063】

vacA ORFのヌクレオチド配列の分析は、vacAが以下の3つの領域を有する139kDaプロ毒素をコードすることを示唆する：33アミノ酸リーダー配列、成熟細胞毒素ドメイン(約87kDa)、および切断されるC末端ドメイン(約48kDa)。N末端における著しく疎水性である領域の例外はあるが、成熟87kDaタンパク質(アミノ酸34~約842)は、優勢に親水性であり、そして68%の伸長配列(Robsonコンフォメーション)を含む。実験的に決定された等電点6.1(15)とは対照的に、VacA 87kDaドメインの推定される等電点は9.1であり；この不一致は、タンパク質の翻訳後修飾に帰せられ得る。切断されたC末端ドメインは優勢に親水性であり、50%の伸長配列および推定される等電点8.8を有する。実験的に決定された87kDa細胞毒素のアミノ酸含量に一致して(15)、87kDaドメインおよびC末端ドメインは両方ともアスパラギンが豊富である(12%)。

30

【0064】

vacA陰性変異体H.pylori株の構築

vacA遺伝子が単一コピーまたは多コピーのいずれで存在するかを決定するために、H.pylori 60190由来のゲノムDNAを調製し、そしてpCTB1またはpCTB4中の挿入片をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。両方のプローブが約7kbの単一のBglIIIフラグメントにハイブリダイズした(データは示さず)。pCTB4挿入片は、単一の1.7kb HindIIIフラグメントにハイブリダイズし、そしてマッピング研究から推定されるように、pCTB1挿入片は2つのHindIIIフラグメントにハイブリダイズした。5つのさらなる酵素(SacI、EcoRV、EcoRI、BamHI、およびKpnI)により消化したDNAについては、プローブは12kb以上の単一フラグメントとハイブリダイズした。これらの結果は、60190株では単一コピーのvacAのみが存在していること示唆し、そしてpCTB1をvacAプローブとして用いたBukanovおよびBergの物理的-遺伝的マッピング研究(40)と一致する。

40

【0065】

vacA遺伝子を破壊し、この遺伝子が空胞形成細胞毒素をコードするという仮説を試験した。最初の1236bpのvacA ORFおよび393bpの上流配列をコードする1.6kbフラグメントを、H.pylori 60190 DNAからPCR増幅し、そしてpT7Blue中にサブクローン化しpCTB8を作製した。このプラスミドをEcoRIで部分消化し、そしてCampylobacter coli カナマイシン(km)耐性遺伝子(22、23)と連結した。プラスミドpILL600をCampylobacter coli カナマイシン(km)耐性遺伝子(22、23)の供給源として用いた。より詳細には、pCTB8を、プライマー[(5

50

' GTGAAAGCGAAAAACAAG 3')(配列番号11)および(5' AAGAGAAGCTTTAAACCCTCC 3')(配列番号12)]を用いて、*H. pylori* 60190 DNAからPCR増幅した。pILL600由来のkmカセット(22、23)をpCTB8の唯一のEcoRI部位中に連結してpCTB8:kmを生成した。

【0066】

次いで、本発明者らは、*H. pylori*中で複製し得ないpCTB8:kmを、*H. pylori*中に、エレクトロポレーションにより導入しようとした。*H. pylori* 84-183細胞を、pCTB8:kmを用いてエレクトロポレートし、そしてカナマイシン耐性形質転換体をFerreroら(24)に記載のように選択した。自然な形質転換を、*H. pylori*変異体84-183:v1から単離されたDNAを、増殖の指数期中の60190株に添加することによりなし遂げた。細胞を30分後に回収し、そして血液寒天平板上37℃で一晩インキュベートした。これらの細胞を、カナマイシン(40μg/ml)を含む血液寒天平板上に再プレートし、そしてカナマイシン耐性形質転換体を増殖の2~3日に後に選択した。

【0067】

500ngのpCTB8:km DNAを用いた 10^9 cfuの84-183株のエレクトロポレーションは、200~300のカナマイシン耐性形質転換体を生成した。

【0068】

サザンおよびコロニープロットハイブリダイゼーション

対立遺伝子交換によりvacAが形質転換された株で破壊されたか否かを決定するために、野生型84-183株およびカナマイシン耐性*H. pylori*変異株84-183:v1から単離されたDNAをHindIIIで消化し、そしてサザンハイブリダイゼーションを、カナマイシン遺伝子またはpCTB8のいずれかをプローブとして用いて実施した。*H. pylori*染色体DNAの制限エンドヌクレアーゼ消化の後、標準化した量のフラグメントを、0.04M トリス酢酸-2 mM EDTA緩衝液(pH8.2)中0.7%アガロースゲル上で電気泳動した。ナイロン膜への転移、放射性標識したプローブを用いたハイブリダイゼーション、および洗浄は先に記載(9)のように行った。*H. pylori*株のコロニープロットハイブリダイゼーションは先に記載(9)のように行い；ハイブリダイゼーションは6×SSC中68℃で18時間であり、次いで65℃で0.5×SSCで洗浄した。

【0069】

カナマイシン耐性形質転換体84-183:v1由来のDNAはkmプローブにハイブリダイズし、その一方野生型株由来のDNAはハイブリダイズしなかった。このことはkm遺伝子が複製しないプラスミドからレスキューされたことを示した。野生型株および変異株の両方由来のDNAはpCTB8とハイブリダイズしたが、84-183:v1は新たな1.8kbのハイブリダイズするフラグメントを含みかつ0.6kbフラグメントを失った。これらのデータは、vacA遺伝子がkmカセットの挿入により破壊され、しかもベクター配列が二重組換え事象により失われたことを示した。

【0070】

次いで、自然の形質転換を用いて、*H. pylori* 60190のvacA変異体を生成した。84-183:v1株由来の染色体DNA(1μg)を、60190株の 10^7 の細胞とインキュベートし、そして約300のカナマイシン耐性形質転換体を得た。変異体60190:v1由来の染色体DNAのサザンハイブリダイゼーションは、vacA内に期待されたkm挿入を示し、対立遺伝子置換を生じた。

【0071】

vacA陰性*Helicobacter pylori*変異体の特徴付け

vacA遺伝子の破壊が87kDaタンパク質の産生を廃止するか否かを決定するために、野生型株84-183および60190由来の培養上清および2つの同質遺伝子型変異体84-183:v1および60190:v1を、抗-87kDa血清(15)を用いてイムノプロットした。期待されたように、両方の野生型株由来の上清は、免疫反応性の87kDaバンドを含んでいた。その一方、このバンドは、変異株の上清には存在しなかった。2つの野生型株および2つの同質遺伝子型変異体由来の濃縮培養上清を、組織培養アッセイでの空胞形成細胞毒素活性について試験した。

【0072】

空胞形成細胞毒素活性の評価

*H. pylori*野生型株および変異体を5%ウシ胎児血清を含むBrucellaブロス中で培養し、

10

20

30

40

50

そして濃縮した培養上清を限外濾過により調製した(8、16)。HeLa細胞を、10%ウシ胎児血清および10mM塩化アンモニウムを含むEagleの改変最少必須培地中(8、16)で培養した。タンパク質濃度により標準化した*H. pylori*上清の連続希釈液を、HeLa細胞と18時間インキュベートし、次いで細胞空胞形成を、先に記載(16、25)のように、ニュートラルレッド取り込みアッセイにより定量化した。天然に存在する *tox⁺* 株Tx30a由来の上清をコントロールとして試験した。

【0073】

期待されたように、参照 *tox⁺* 野生型60190株由来の上清は、*tox⁺* 野生型84-183株由来の上清より有意に高い細胞毒素活性を含んでいたが、2つの遺伝子的に改変された変異株由来の培養上清では細胞毒素活性は検出可能でなかった。従って、*vacA*遺伝子の挿入変異は、87kDaタンパク質および空胞形成細胞毒素産生の両方の不在をもたらした。

10

【0074】

空胞形成細胞毒素遺伝子の保存

インビトロで細胞毒素活性を発現する*H. pylori*株(*tox⁺*)および細胞毒素活性を発現しない野生型株(*tox⁻*)中に*vacA*配列が存在するかどうかを調査するために、15の*tox⁺*株および17の*tox⁻*株を、コロニーハイブリダイゼーションによりpCTB1をプローブとして用いて調べた。*H. pylori*株の各々は強くハイブリダイズしたが、その一方*E. coli* XL1Blueとのハイブリダイゼーションはなかった。

【0075】

次いで、*vacA*遺伝子の潜在的な制限フラグメント多型を調べるために、3つの*tox⁺**H. pylori*株(84-183、60190、または87-199)および3つの*tox⁻**H. pylori*株(87-203、86-313、またはTx30a)由来のHindIII消化ゲノムDNAを調製した。サザンハイブリダイゼーションを、3つの異なる*vacA*プローブ(pCTB1、pCTB4中の挿入片、またはpCTB5の0.7 XbaIフラグメント)を用いて実施した。*tox⁺**H. pylori*株由来の染色体DNAをHindIIIで消化し、そして制限フラグメントを0.7%ゲル上で分離した。次いで、DNAをナイロン膜に移し、そして高ストリンジェンシー条件下で標識した*vacA*プローブを用いてハイブリダイズした。ハイブリダイズしたプローブを、各々の新たなプローブとプロットする前に、70℃で30分間、0.1M水酸化ナトリウムを用いて膜から剥がした。6株の各々由来のDNAフラグメントは、pCTB1プローブとハイブリダイズし、そして顕著な制限フラグメント長多型が存在した。pCTB4は、6株のうち5株で1.7kbフラグメントと、そして1株由来の0.7kbフラグメントとハイブリダイズした。pCTB4の3つの*tox⁺*株へのハイブリダイゼーションは、3つの*tox⁻*株へのハイブリダイゼーションよりかなり強かった。第3のプローブ(pCTB5の0.7kb XbaIフラグメント)は、6つの株のすべて由来のフラグメントに、等しい強さでハイブリダイズした。これらのデータは、*vacA*配列が*tox⁺*および*tox⁻**H. pylori*株の両方に存在することを示したが、*vacA*遺伝子の中央領域中に株間で配列多様性が存在することを示唆した。

20

30

【0076】

*tox⁺*および*tox⁻*株由来の*vacA*フラグメントのPCR増幅

*tox⁺*および*tox⁻**H. pylori*株の両方に存在する*vacA*配列をさらに調査するために、遺伝子の3つの異なる領域からのフラグメントのPCR増幅を行った。3つの*tox⁺**H. pylori*株(84-183、60190、87-199)および3つの*tox⁻**H. pylori*株(87-203、86-313、およびTx30a)由来のDNAを、*vacA*遺伝子フラグメント増幅のテンプレートとして用いた。PCR反応は30サイクル行った。条件は3つの増幅について同じである(温度94℃、50℃、および72℃)。

40

【0077】

細胞毒素のN末端をコードする*vacA*の領域から選択された、プライマー#1および#2(5' ATGGAAATACAACAAACACA 3')(配列番号13)および(5' CTCCAGAACCCACACGATT 3')(配列番号14)は、試験した*H. pylori*株の各々から0.6kbフラグメントを増幅した。同様に、*vacA*の下流部分から選択されたプライマー#5および#6(5' TACAAACCTTATTGATTGATAGCC 3')(配列番号15)および(5' AAGCTTGATTGATCACTCC 3')(配列番号16)はまた、試験した株の各々から0.6kbフラグメントを増幅した。しかし、*vacA* ORFの中間から選択されたプライマー

50

3 および # 4 [(5' GATTTGTGAATTTAAAGGTGG 3')(配列番号 7) および (5' GTCTATATCATTAT TAAACATC 3')(配列番号 8)] は、ストリンジेंट条件下(50)で、*H. pylori* 60190、84-183、および 86-313のみから 0.6kb フラグメントを増幅した。低ストリンジエンシーアニーリング条件下(39)では、プライマー # 3 および # 4 は、試験した *H. pylori* 株の 4 つから期待された 0.6kb フラグメントを増幅したが、87-203 または Tx30aからは増幅しなかった。これらの結果は、*vacA* ORFの中央領域での顕著な配列可変性の存在をまた示唆したサザンハイブリダイゼーション研究と一致した。

【 0 0 7 8 】

tox⁻ *H. pylori* 87-203由来の *vacA* 遺伝子の配列分析

vacA 遺伝子における潜在的な配列多様性をさらに調査するために、*tox⁻* 株からの、推定 10
の可変性領域を含んだ *vacA* 遺伝子のフラグメントの PCR 増幅を試みた。1.5kb フラグメントを、bp1012~1029 および 2533~2549 (配列番号 1) に対応する、プライマー [(5' TAGTAACAA GACTCATAT 3')] (配列番号 9) および (5' CGTTAGCCGTTTTACTG 3') (配列番号 10) を用いて、*tox⁻* 株 87-203 から増幅した。

【 0 0 7 9 】

両方の鎖でのサブクローン化 PCR 産物の配列決定は、1541bp 以上の ORF (配列番号 3) の存在を示した。この ORF のヌクレオチド配列を、*tox⁺* 60190 株由来の *vacA* と並べ、そして 70.7 %の配列同一性が存在した。2つの推定アミノ酸配列間の比較は、64.8%の同一性および 78 .2%のアミノ酸相同性が存在したことを示した。従って、配列分析、サザンハイブリダイ 20
ゼーション、および PCR 分析はすべて、*tox⁺* および *tox⁻* *H. pylori* 株の *vacA* 配列間に有意な差異が存在することを示した。

【 0 0 8 0 】

本明細書に示されたデータは、*tox⁺* および *tox⁻* 両方の単離株を含む試験されたすべての *H. pylori* 株で空胞形成細胞毒素の遺伝子配列が存在することを示す。

【 0 0 8 1 】

本出願を通じて、種々の刊行物が、括弧内の番号により参照される。これらの刊行物の開示は、それらの全体が、本発明が関係する技術分野の状態をより十分に記載するために、本出願中に参考として援用される。これら刊行物の完全な引用は以下の通りである：

参考文献

【 0 0 8 2 】

【表 1】

1. Cover, T.L., および Blaser, M.J. (1992) *Annu. Rev. Med.* 43, 135-145
2. Correa, P. (1992) *Cancer Res.* 52, 6735-6740
3. Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A.M., Nemeo, H., Schutze, K., Taufer, M., および Wurzer, H. (1993) *N. Engl. J. Med.* 328, 308-312
4. Dooley, C.P., Cohen, H., Fitzgibbons, P.L., Bauer, M., Appleman, M.D., Perez-Perez, G.I., および Blaser, M.J. (1989) *N. Engl. J. Med.* 321, 1562-1566 10
5. Foxall, P.A., Hu, L-T., および Mobley, H.L.T. (1992) *J. Clin. Microbiol.* 30, 739-741
6. Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.R., Kresovich, S., および Berg, D.E. (1992) *Nuc. Acids Res.* 20, 5137-5142
7. Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G., および Morgan, D.R. (1988) *J. Med. Microbiol.* 26, 93-99 20
8. Cover, T.L., Dooley, C.P., および Blaser, M.J. (1990) *Infect. Immun.* 58, 603-610
9. Tummuru, M.K.R., Cover, T.L., および Blaser, M.J. (1993) *Infect. Immun.* 61, 1799-1809
10. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Tetracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., および Rappuoli, R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5791-5795
11. Figura, N., Guglielmetti, P., Rossolini, A., Barberi, A., Cusi, G., Mussmanno, R.A., Russi, M., および Quaranta, S. (1989) *J. Clin. Microbiol.* 27, 225-226 30
12. Goosens, H., Glupczynski, Y., Burette, A., Lambert, J.-P., Vlaes, L., および Butzler, J.-P. (1992) *Med. Microbiol. Lett.* 4, 153-159

【 0 0 8 3 】

【表 2】

13. Tee, W., Lambert, J.R., Pegorer, M., Dwyer, B. (1993) *Gastroenterology* 104, A789
14. Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S., および Rathbone, B.J. (1991) *Lancet* 338, 332-335
15. Cover, T.L., Blaser, M.J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 10570-10575
16. Cover, T.L., Cao, P., Lind, C.D., Tham, K.T., および Blaser, M.J. (1993) *Infect. Immun.* 61, 5008-5012 10
17. Fernandez, J., DeMott, M., Atherton, D., および Mische, S.M. (1992) *Anal. Biochem.* 201, 255-264
18. Schleif, R.F., および Wensink, P.C. (1981) *Practical methods in molecular biology* (Springer, New York), p. 98
19. Maniatis, T., Fritsch, E.F., および Sambrook, J. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY 20
20. Sanger, F., Nicklen, S., および Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346
21. Hawley, D.K., および M. Clure, W.R. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 2237-2255
22. Labigne-Roussel, A., Courcoux, P., および Tompkins, L. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 1704-1708
23. Suerbaum, S., Josenhans, C., および Labigne, A. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 3278-3288
24. Ferrero, R.L., Cussac, V., Courcoux, P., および Labigne, A. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 4212-4217 30
25. Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., および Blaser, M.J. (1991) *Infect. Immun.* 59, 1264-1270
26. Avalos, J., Corrochano, L.M., および Brenner, S. (1991) *FEBS Lett.* 286, 176-180
27. Hou, Y-M., Shiba, K., Mottes, C., および Schimmel P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 976-980
28. Poulsen, K., Brandt, J., Hjorth, J.P., Thogersen, H.C., および Kilian, M. (1989) *Infect. Immun.* 57, 3097-3105 40

【 0 0 8 4 】

【表3】

29. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., および Meyer, T.F. (1987) Nature (London) 325, 458-462
30. Yanagida, N., Uozumi, T., および Beppu, T. (1986) J. Bacteriol. 166, 937-944
31. Miyazaki, H., Yanagida, N., Horinouchi, S., および Beppu, T. (1989) J. Bacteriol. 171, 6566-6572
32. Shikata, S., Shimada, K., Kataoka, H., Horinouchi, S., および Beppu, T. (1992) J. Biochem. 111, 627-632 10
33. Gilmore, R.D., Jr., Joste, N., および McDonald, G.A. (1989) Mol. Microbiol. 3, 1579-1586
34. Gilmore, R.D., Jr., Cieplak, W., Jr., Policastro, F.F., および Hackstadt, T. (1991) Mol. Microbiol. 5, 2361-2370
35. Carl, M., Dobson, M.E., Ching, W.-M., および Dasch, G.A. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8237-8241
36. Benz, I., および Schmidt, M.A. (1992) Mol. Microbiol. 6, 1539-1546 20
37. Struyve, M., Moons, M., および Tommassen, J. (1991) J. Mol. Biol. 218, 141-148
38. Klauser, T., Pohlner, J., および Meyer, T.F. (1990) EMBO Journal 9, 1991-1999
39. Pollock, M.R., および Richmond, M.H. (1962) Nature 194, 446-449
40. Bukanov, N.O., および Berg, D.E. (1994) Molec. Microbiol. (印刷中) 30

【0085】

【表 4】

配列表

(1) 一般的情報 :

(i) 出願人 : カバー, ティモシー, エル.
ブラサー, マーティン ジェイ.

(ii) 発明の名称 : 空胞形成毒素欠損 *H. pylori* および関連する方法

(iii) 配列数 : 18

10

(iv) 連絡住所 :

- (A) 名称 : ニードル アンド ロッセンバーグ ピー. シー.
- (B) 番地 : 127 ピーチツリー ストリート, スイート 1200
- (C) 市 : アトランタ
- (D) 州 : ジョージア
- (E) 国 : アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号 : 30303

(v) コンピューター読み出し形態 :

- (A) 媒体型 : フロッピーディスク
- (B) コンピューター : IBM PC互換用
- (C) OS : PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア : パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.25

20

(vi) 現在の出願データ :

- (A) 出願番号 :
- (B) 出願日 :
- (C) 分類 :

30

(viii) 代理人/事務所情報 :

- (A) 氏名 : スプラット, グェンドリン ディー.
- (B) 登録番号 : 36,016
- (C) 照会/記録番号 : 2200.023

(ix) 電話回線情報 :

- (A) 電話 : 404/688-0770
- (B) テレファックス : 404/688-9880

40

(2) 配列番号 1 の情報 :

(i) 配列の特色 :

【 0 0 8 6 】

【表5】

- (A)長さ：4042塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：二本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：CDS
 (B)存在位置：101..3964

10

(xi)配列：配列番号1：

TATTTATAGC CTTAATCGTA AATGCAACAG AAATTTTCTA GTTTAAAGTC GCACCCTTTG	60	
TGCAAAAAAT TGTTTTACAA GAAAAGAAGA AAGGAAAGAA ATG GAA ATA CAA CAA	115	
		Met Glu Ile Gln Gln
		1 5
ACA CAC CGC AAA ATC AAT CGC CCT CTG GTT TCT CTT GCT TTA GTA GGA	163	20
Thr His Arg Lys Ile Asn Arg Pro Leu Val Ser Leu Ala Leu Val Gly		
		10 15 20
GCA TTG GTC AGC ATC ACA CCG CAA CAA AGT CAT GCC GCC TTT TTT ACA	211	
Ala Leu Val Ser Ile Thr Pro Gln Gln Ser His Ala Ala Phe Phe Thr		
		25 30 35
ACC GTG ATC ATT CCA GCC ATT GTT GGG GGC ATC GCT ACA GGC ACC GCT	259	
Thr Val Ile Ile Pro Ala Ile Val Gly Gly Ile Ala Thr Gly Thr Ala		
		40 45 50
GTA GGA ACG GTC TCA GGG CTT CTT GGC TGG GGG CTC AAA CAA GCC GAA	307	
Val Gly Thr Val Ser Gly Leu Leu Gly Trp Gly Leu Lys Gln Ala Glu		30
		55 60 65
GAA GCC AAT AAA ACC CCA GAT AAA CCC GAT AAA GTT TGG CGC ATT CAA	355	
Glu Ala Asn Lys Thr Pro Asp Lys Pro Asp Lys Val Trp Arg Ile Gln		
		70 75 80 85
GCA GGA AAA GGC TTT AAT GAA TTC CCT AAC AAG GAA TAC GAC TTA TAC	403	
Ala Gly Lys Gly Phe Asn Glu Phe Pro Asn Lys Glu Tyr Asp Leu Tyr		
		90 95 100

【0087】

【表 6】

AAA Lys	TCC Ser	CTT Leu	TTA Leu	TCC Ser	AGT Ser	AAG Lys	ATT Ile	GAT Asp	GGG Gly	GGT Gly	TGG Trp	GAT Asp	TGG Trp	GGG Gly	AAT Asn	451
105																
GCC Ala	GCT Ala	ACG Thr	CAT His	TAT Tyr	TGG Trp	ATC Ile	AAA Lys	GGC Gly	GGG Gly	CAA Gln	TGG Trp	AAT Asn	AAG Lys	CTT Leu	GAA Glu	499
120																
GTG Val	GAT Asp	ATG Met	AAA Lys	GAC Asp	GCT Ala	GTA Val	GGG Gly	ACT Thr	TAT Tyr	AAA Lys	CTC Leu	TCA Ser	GGG Gly	CTA Leu	AGG Arg	547
135																
140																
AAC Asn	TTT Phe	ACT Thr	GGT Gly	GGG Gly	GAT Asp	TTA Leu	GAT Asp	GTC Val	AAT Asn	ATG Met	CAA Gln	AAA Lys	GCC Ala	ACC Thr	TTG Leu	595
150																
155																
160																
CGC Arg	TTG Leu	GGC Gly	CAA Gln	TTC Phe	AAT Asn	GGC Gly	AAT Asn	TCT Ser	TTC Phe	ACA Thr	AGC Ser	TAT Tyr	AAG Lys	GAT Asp	AGT Ser	643
170																
175																
GCT Ala	GAT Asp	CGC Arg	ACC Thr	ACA Thr	AGA Arg	GTG Val	GAT Asp	TTC Phe	AAC Asn	GCT Ala	AAA Lys	AAT Asn	ATC Ile	TTA Leu	ATT Ile	691
185																
190																
195																
GAT Asp	AAT Asn	TTT Phe	TTA Leu	GAA Glu	ATC Ile	AAT Asn	AAT Asn	CGT Arg	GTG Val	GGT Gly	TCT Ser	GGA Gly	GCC Ala	GGG Gly	AGG Arg	739
200																
205																
210																
AAA Lys	GCC Ala	AGC Ser	TCT Ser	ACG Thr	GTT Val	TTG Leu	ACT Thr	TTG Leu	CAA Gln	GCT Ala	TCA Ser	GAA Glu	GGG Gly	ATT Ile	ACT Thr	787
215																
220																
225																
AGC Ser	AGT Ser	AAA Lys	AAT Asn	GCT Ala	GAA Glu	ATT Ile	TCT Ser	CTT Leu	TAT Tyr	GAT Asp	GGC Gly	GCT Ala	ACG Thr	CTC Leu	AAT Asn	835
230																
235																
240																
TTG Leu	GCT Ala	TCA Ser	AAC Asn	AGC Ser	GTT Val	AAA Lys	TTA Leu	AAT Asn	GGC Gly	AAT Asn	GTG Val	TGG Trp	ATG Met	GGC Gly	CGT Arg	883
250																
255																
260																

10

20

30

【 0 0 8 8 】

【表 7】

TTG	CAA	TAC	GTG	GGA	GCG	TAT	TTG	GCC	CCT	TCA	TAC	AGC	ACG	ATA	AAC	931
Leu	Gln	Tyr	Val	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Pro	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ile	Asn	
			265					270					275			
ACT	TCA	AAA	GTG	ACA	GGG	GAA	GTG	AAT	TTT	AAC	CAT	CTC	ACT	GTG	GGC	979
Thr	Ser	Lys	Val	Thr	Gly	Glu	Val	Asn	Phe	Asn	His	Leu	Thr	Val	Gly	
		280					285					290				
GAT	CAC	AAC	GCC	GCT	CAA	GCA	GGC	ATT	ATC	GCT	AGT	AAC	AAG	ACT	CAT	1027
Asp	His	Asn	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Ile	Ile	Ala	Ser	Asn	Lys	Thr	His	
		295				300					305					
ATT	GGC	ACA	CTG	GAT	TTG	TGG	CAA	AGC	GCG	GGG	TTA	AAT	ATC	ATT	GCC	1075
Ile	Gly	Thr	Leu	Asp	Leu	Trp	Gln	Ser	Ala	Gly	Leu	Asn	Ile	Ile	Ala	
310				315						320					325	
CCT	CCC	GAA	GGT	GGC	TAC	AAG	GAT	AAA	CCT	AAT	AAT	ACC	CCT	TCT	CAA	1123
Pro	Pro	Glu	Gly	Gly	Tyr	Lys	Asp	Lys	Pro	Asn	Asn	Thr	Pro	Ser	Gln	
				330					335					340		
AGT	GGT	GCT	AAA	AAC	GAC	AAA	CAA	GAG	AGC	AGT	CAA	AAT	AAT	AGT	AAC	1171
Ser	Gly	Ala	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Asn	Ser	Asn	
			345					350					355			
ACT	CAG	GTC	ATT	AAC	CCA	CCC	AAT	AGC	ACG	CAA	AAA	ACA	GAA	GTT	CAA	1219
Thr	Gln	Val	Ile	Asn	Pro	Pro	Asn	Ser	Thr	Gln	Lys	Thr	Glu	Val	Gln	
		360					365					370				
CCC	ACG	CAA	GTC	ATT	GAT	GGG	CCT	TTT	GCG	GGT	GGC	AAA	GAC	ACG	GTT	1267
Pro	Thr	Gln	Val	Ile	Asp	Gly	Pro	Phe	Ala	Gly	Gly	Lys	Asp	Thr	Val	
		375				380					385					
GTC	AAT	ATT	GAT	CGC	ATC	AAC	ACT	AAA	GCC	GAT	GGC	ACG	ATT	AAA	GTG	1315
Val	Asn	Ile	Asp	Arg	Ile	Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Lys	Val	
390					395				400						405	
GGA	GGG	TTT	AAA	GCT	TCT	CTT	ACC	ACC	AAC	GCG	GCT	CAT	TTG	AAT	ATC	1363
Gly	Gly	Phe	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Thr	Asn	Ala	Ala	His	Leu	Asn	Ile	
				410					415					420		

10

20

30

【 0 0 8 9 】

【表 8】

GGC Gly	AAA Lys	GGC Gly	GGT Gly	GTC Val	AAT Asn	CTG Leu	TCC Ser	AAT Asn	CAA Gln	GCG Ala	AGC Ser	GGG Gly	CGC Arg	ACC Thr	CTT Leu	1411	
			425					430					435				
TTA Leu	GTG Val	GAA Glu	AAT Asn	CTA Leu	ACC Thr	GGG Gly	AAT Asn	ATC Ile	ACC Thr	GTT Val	GAT Asp	GGG Gly	CCT Pro	TTA Leu	AGA Arg	1459	
		440					445					450					
GTG Val	AAT Asn	AAT Asn	CAA Gln	GTG Val	GGT Gly	GGC Gly	TAT Tyr	GCT Ala	TTG Leu	GCA Ala	GGA Gly	TCA Ser	AGC Ser	GCG Ala	AAT Asn	1507	
	455					460					465						
TTT Phe	GAA Glu	TTT Phe	AAG Lys	GCT Ala	GGT Gly	GTG Val	GAT Asp	ACT Thr	AAA Lys	AAC Asn	GGC Gly	ACA Thr	GCC Ala	ACT Thr	TTC Phe	1555	10
470				475					480						485		
AAT Asn	AAC Asn	GAT Asp	ATT Ile	AGT Ser	CTG Leu	GGA Gly	AGA Arg	TTT Phe	GTG Val	AAT Asn	TTA Leu	AAG Lys	GTG Val	GAT Asp	GCT Ala	1603	
				490					495					500			
CAT His	ACA Thr	GCT Ala	AAT Asn	TTT Phe	AAA Lys	GGT Gly	ATT Ile	GAT Asp	ACG Thr	GGT Gly	AAT Asn	GGT Gly	GGT Gly	TTC Phe	AAC Asn	1651	
			505					510				515					
ACC Thr	TTA Leu	GAT Asp	TTT Phe	AGT Ser	GGT Gly	GTT Val	ACA Thr	AAC Asn	AAG Lys	GTC Val	AAT Asn	ATC Ile	AAC Asn	AAG Lys	CTC Leu	1699	20
		520					525					530					
ATT Ile	ACG Thr	GCT Ala	TCC Ser	ACT Thr	AAT Asn	GTG Val	GCC Ala	GTT Val	AAA Lys	AAC Asn	TTC Phe	AAC Asn	ATT Ile	AAT Asn	GAA Glu	1747	
	535					540					545						
TTG Leu	ATT Ile	GTT Val	AAA Lys	ACC Thr	AAT Asn	GGG Gly	GTG Val	AGC Ser	GTG Val	GGG Gly	GAA Glu	TAC Tyr	ACT Thr	CAT His	TTT Phe	1795	
550					555					560					565		
AGC Ser	GAA Glu	GAT Asp	ATA Ile	GGC Gly	AGT Ser	CAA Gln	TCG Ser	CGC Arg	ATC Ile	AAT Asn	ACC Thr	GTG Val	CGT Arg	TTG Leu	GAA Glu	1843	
			570					575						580			
ACT Thr	GGC Gly	ACT Thr	AGG Arg	TCA Ser	ATC Ile	TTT Phe	TCT Ser	GGG Gly	GGT Gly	GTC Val	AAA Lys	TTT Phe	AAA Lys	AGC Ser	GGC Gly	1891	30
			585					590					595				
GAA Glu	AAA Lys	TTG Leu	GTT Val	ATA Ile	GAT Asp	GAG Glu	TTT Phe	TAC Tyr	TAT Tyr	AGC Ser	CCT Pro	TGG Trp	AAT Asn	TAT Tyr	TTT Phe	1939	
		600				605						610					
GAC Asp	GCT Ala	AGG Arg	AAT Asn	ATT Ile	AAA Lys	AAT Asn	GTT Val	GAA Glu	ATC Ile	ACC Thr	AGA Arg	AAA Lys	TTC Phe	GCT Ala	TCT Ser	1987	
	615					620					625						
TCA Ser	ACC Thr	CCA Pro	GAA Glu	AAC Asn	CCT Pro	TGG Trp	GGC Gly	ACA Thr	TCA Ser	AAA Lys	CTC Leu	ATG Met	TTT Phe	AAT Asn	AAT Asn	2035	40
630				635						640					645		

【 0 0 9 0 】

【表 9】

CTA ACC CTG GGT CAA AAT GCG GTC ATG GAC TAT AGT CAA TTT TCA AAT	2083
Leu Thr Leu Gly Gln Asn Ala Val Met Asp Tyr Ser Gln Phe Ser Asn	
650 655 660	
TTA ACC ATT CAG GGG GAT TTT ATC AAC AAT CAA GGC ACT ATC AAC TAT	2131
Leu Thr Ile Gln Gly Asp Phe Ile Asn Asn Gln Gly Thr Ile Asn Tyr	
665 670 675	
CTG GTC CGA GGC GGG AAA GTG GCA ACC TTA AAT GTA GGC AAT GCA GCA	2179
Leu Val Arg Gly Gly Lys Val Ala Thr Leu Asn Val Gly Asn Ala Ala	
680 685 690	
GCT ATG ATG TTT AAT AAT GAT ATA GAC AGC GCG ACC GGA TTT TAC AAA	2227
Ala Met Met Phe Asn Asn Asp Ile Asp Ser Ala Thr Gly Phe Tyr Lys	
695 700 705	
CCG CTC ATC AAG ATT AAC AGC GCT CAA GAT CTC ATT AAA AAT ACA GAG	2275
Pro Leu Ile Lys Ile Asn Ser Ala Gln Asp Leu Ile Lys Asn Thr Glu	
710 715 720 725	
CAT GTT TTA TTG AAA GCG AAA ATC ATT GGT TAT GGT AAT GTT TCT ACA	2323
His Val Leu Leu Lys Ala Lys Ile Ile Gly Tyr Gly Asn Val Ser Thr	
730 735 740	
GGT ACC AAT GGC ATT AGT AAT GTT AAT CTA GAA GAG CAA TTC AAA GAG	2371
Gly Thr Asn Gly Ile Ser Asn Val Asn Leu Glu Glu Gln Phe Lys Glu	
745 750 755	
CGC CTA GCC CTT TAT AAC AAC AAT AAC CGC ATG GAT ACT TGT GTG GTG	2419
Arg Leu Ala Leu Tyr Asn Asn Asn Asn Arg Met Asp Thr Cys Val Val	
760 765 770	
CGA AAT ACT GAT GAC ATT AAA GCA TGC GGT ATG GCT ATC GGC AAT CAA	2467
Arg Asn Thr Asp Asp Ile Lys Ala Cys Gly Met Ala Ile Gly Asn Gln	
775 780 785	
AGC ATG GTG AAC AAC CCT GAC AAT TAC AAG TAT CTT ATC GGT AAA GCA	2515
Ser Met Val Asn Asn Pro Asp Asn Tyr Lys Tyr Leu Ile Gly Lys Ala	
790 795 800 805	
TGG AAA AAT ATA GGC ATC AGT AAA ACG GCT AAC GGC TCT AAA ATT TCG	2563
Trp Lys Asn Ile Gly Ile Ser Lys Thr Ala Asn Gly Ser Lys Ile Ser	
810 815 820	
GTG TAT TAT TTA GGC AAT TCT ACG CCT ACT GAG AAT GGT GGC AAT ACC	2611
Val Tyr Tyr Leu Gly Asn Ser Thr Pro Thr Glu Asn Gly Gly Asn Thr	
825 830 835	
ACA AAT TTA CCC ACA AAC ACC ACT AAC AAT GCG CGT TTC GCT AGC TAC	2659
Thr Asn Leu Pro Thr Asn Thr Thr Asn Asn Ala Arg Phe Ala Ser Tyr	
840 845 850	
GCT CTC ATA AAG AAC GCT CCT TTC GCT CAC AGC GCC ACT CCT AAT TTA	2707
Ala Leu Ile Lys Asn Ala Pro Phe Ala His Ser Ala Thr Pro Asn Leu	
855 860 865	

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

【表 1 0】

GTC Val 870	GCT Ala	ATC Ile	AAT Asn	CAG Gln	CAT His	GAT Asp	TTT Phe	GGC Gly	ACT Thr	ATT Ile	GAA Glu	AGC Ser	GTG Val	TTT Phe	GAA Glu	2755	
					875					880					885		
TTG Leu	GCT Ala	AAC Asn	CGC Arg	TCT Ser	AAA Lys	GAT Asp	ATT Ile	GAC Asp	ACG Thr	CTT Leu	TAT Tyr	GCT Ala	AAC Asn	TCA Ser	GGC Gly	2803	
				890					895						900		
GCG Ala	CAA Gln	GGC Gly	AGG Arg	GAT Asp	CTC Leu	TTA Leu	CAA Gln	ACC Thr	TTA Leu	TTG Leu	ATT Ile	GAT Asp	AGC Ser	CAT His	GAT Asp	2851	
			905					910							915		
GCG Ala	GGT Gly	TAT Tyr	GCC Ala	AGA Arg	ACC Thr	ATG Met	ATT Ile	GAT Asp	GCT Ala	ACA Thr	AGC Ser	GCT Ala	AAT Asn	GAA Glu	ATC Ile	2899	10
		920					925					930					
ACC Thr	AAG Lys	CAA Gln	TTG Leu	AAT Asn	ACG Thr	GCC Ala	ACT Thr	ACC Thr	ACT Thr	TTA Leu	AAC Asn	AAC Asn	ATA Ile	GCC Ala	AGT Ser	2947	
		935				940					945						
TTA Leu	GAG Glu	CAT His	AAG Lys	ACA Thr	AGC Ser	AGT Ser	TTA Leu	CAA Gln	ACT Thr	TTG Leu	AGC Ser	TTG Leu	AGT Ser	AAT Asn	GCG Ala	2995	
					955					960					965		
ATG Met	ATT Ile	TTA Leu	AAT Asn	TCT Ser	CGT Arg	TTA Leu	GTC Val	AAT Asn	CTC Leu	TCT Ser	AGA Arg	AGG Arg	CAC His	ACC Thr	AAC Asn	3043	20
				970					975						980		
AAT Asn	ATT Ile	GAC Asp	TCG Ser	TTC Phe	GCT Ala	AAG Lys	CGC Arg	TTA Leu	CAA Gln	GCT Ala	TTA Leu	AAA Lys	GAC Asp	CAA Gln	AGA Arg	3091	
			985					990					995				
TTC Phe	GCT Ala	TCT Ser	TTA Leu	GAA Glu	AGC Ser	GCG Ala	GCG Ala	GAA Glu	GTG Val	TTG Leu	TAT Tyr	CAA Gln	TTT Phe	GCC Ala	CCT Pro	3139	
			1000				1005						1010				
AAA Lys	TAT Tyr	GAA Glu	AAA Lys	CCT Pro	ACC Thr	AAT Asn	GTT Val	TGG Trp	GCT Ala	AAC Asn	GCT Ala	ATT Ile	GGA Gly	GGA Gly	GCG Ala	3187	
		1015				1020					1025						
AGC Ser	TTG Leu	AAT Asn	AAT Asn	GGC Gly	GGC Gly	AAC Asn	GCT Ala	TCA Ser	TTG Leu	TAT Tyr	GGC Gly	ACA Thr	AGC Ser	GCG Ala	GGC Gly	3235	30
				1030		1035				1040					1045		
GTA Val	GAT Asp	GCT Ala	TAC Tyr	CTT Leu	AAC Asn	GGA Gly	CAA Gln	GTG Val	GAA Glu	GCC Ala	ATT Ile	GTG Val	GGA Gly	GGG Gly	TTT Phe	3283	
				1050					1055						1060		
GGA Gly	AGC Ser	TAT Tyr	GGT Gly	TAT Tyr	AGC Ser	TCT Ser	TTT Phe	AAT Asn	AAT Asn	CAA Gln	GCG Ala	AAC Asn	TCT Ser	CTT Leu	AAC Asn	3331	
			1065					1070						1075			
TCT Ser	GGA Gly	GCC Ala	AAT Asn	AAC Asn	ACT Thr	AAT Asn	TTT Phe	GGC Gly	GTG Val	TAT Tyr	AGC Ser	CGT Arg	ATC Ile	TTT Phe	GCT Ala	3379	40
		1080				1085						1090					

【 0 0 9 2】

【表 1 1】

AAC CAG CAT GAA TTT GAT TTT GAA GCT CAA GGG GCG CTA GGG AGT GAT Asn Gln His Glu Phe Asp Phe Glu Ala Gln Gly Ala Leu Gly Ser Asp 1095 1100 1105	3427	
CAA TCA AGC TTG AAT TTC AAA AGC GCT CTA CTG CGA GAT TTG AAT CAA Gln Ser Ser Leu Asn Phe Lys Ser Ala Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gln 1110 1115 1120 1125	3475	
AGC TAT AAT TAC TTA GCC TAT AGC GCT GCA ACA AGA GCG AGC TAT GGT Ser Tyr Asn Tyr Leu Ala Tyr Ser Ala Ala Thr Arg Ala Ser Tyr Gly 1130 1135 1140	3523	
TAT GAC TTT GCG TTT TTC AGG AAC GCT TTG GTG TTA AAA CCA AGT GTG Tyr Asp Phe Ala Phe Phe Arg Asn Ala Leu Val Leu Lys Pro Ser Val 1145 1150 1155	3571	10
GGC GTG AGC TAT AAC CAT TTA GGT TCA ACC AAC TTT AAA AGC AAC AGC Gly Val Ser Tyr Asn His Leu Gly Ser Thr Asn Phe Lys Ser Asn Ser 1160 1165 1170	3619	
ACT AAT AAA GTG GCT TTG AGT AAT GGC TCT AGC AGT CAG CAT CTA TTC Thr Asn Lys Val Ala Leu Ser Asn Gly Ser Ser Ser Gln His Leu Phe 1175 1180 1185	3667	
AAC GCT AGC GCT AAT GTG GAA GCG CGC TAT TAT TAT GGG GAC ACT TCA Asn Ala Ser Ala Asn Val Glu Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Asp Thr Ser 1190 1195 1200 1205	3715	20
TAC TTC TAT ATG AAC GCT GGA GTT TTA CAA GAA TTT GCT AAC TTT GGT Tyr Phe Tyr Met Asn Ala Gly Val Leu Gln Glu Phe Ala Asn Phe Gly 1210 1215 1220	3763	
TCT AGC AAT GCG GTA TCT TTA AAC ACC TTT AAA GTG AAT GCT ACT CGC Ser Ser Asn Ala Val Ser Leu Asn Thr Phe Lys Val Asn Ala Thr Arg 1225 1230 1235	3811	
AAC CCT TTA AAT ACC CAT GCC AGA GTG ATG ATG GGT GGG GAA TTA AAA Asn Pro Leu Asn Thr His Ala Arg Val Met Met Gly Gly Glu Leu Lys 1240 1245 1250	3859	
TTA GCT AAA GAA GTG TTT TTG AAT TTG GGC GTT GTT TAT TTG CAC AAT Leu Ala Lys Glu Val Phe Leu Asn Leu Gly Val Val Tyr Leu His Asn 1255 1260 1265	3907	30
TTG ATT TCC AAT ATA GGC CAT TTC GCT TCC AAT TTA GGA ATG AGG TAT Leu Ile Ser Asn Ile Gly His Phe Ala Ser Asn Leu Gly Met Arg Tyr 1270 1275 1280 1285	3955	
AGT TTC TAATACCATT CTA AACCCA TGCTCAAAGC ATGGGTTTGA AATCTTACAA Ser Phe	4011	
AACATTAACC CCTACAACGC ATACACGACA A	4042	40

【 0 0 9 3 】

【表 1 2】

(2)配列番号2の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ:1287アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:タンパク質

10

(xi)配列:配列番号2:

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

【 0 0 9 4 】

【表 1 4】

Phe	Asn	Ile	Asn	Glu	Leu	Ile	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Gly	
545					550					555					560	
Glu	Tyr	Thr	His	Phe	Ser	Glu	Asp	Ile	Gly	Ser	Gln	Ser	Arg	Ile	Asn	
				565					570					575		
Thr	Val	Arg	Leu	Glu	Thr	Gly	Thr	Arg	Ser	Ile	Phe	Ser	Gly	Gly	Val	
			580					585					590			
Lys	Phe	Lys	Ser	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Glu	Phe	Tyr	Tyr	Ser	
		595					600					605				
Pro	Trp	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ala	Arg	Asn	Ile	Lys	Asn	Val	Glu	Ile	Thr	
	610					615					620					
Arg	Lys	Phe	Ala	Ser	Ser	Thr	Pro	Glu	Asn	Pro	Trp	Gly	Thr	Ser	Lys	
625					630					635					640	
Leu	Met	Phe	Asn	Asn	Leu	Thr	Leu	Gly	Gln	Asn	Ala	Val	Met	Asp	Tyr	
				645					650					655		
Ser	Gln	Phe	Ser	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Asp	Phe	Ile	Asn	Asn	Gln	
			660					665					670			
Gly	Thr	Ile	Asn	Tyr	Leu	Val	Arg	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Thr	Leu	Asn	
		675					680					685				
Val	Gly	Asn	Ala	Ala	Ala	Met	Met	Phe	Asn	Asn	Asp	Ile	Asp	Ser	Ala	
	690					695					700					
Thr	Gly	Phe	Tyr	Lys	Pro	Leu	Ile	Lys	Ile	Asn	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	
705					710					715					720	
Ile	Lys	Asn	Thr	Glu	His	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Lys	Ile	Ile	Gly	Tyr	
				725					730					735		
Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Gly	Thr	Asn	Gly	Ile	Ser	Asn	Val	Asn	Leu	Glu	
			740					745					750			
Glu	Gln	Phe	Lys	Glu	Arg	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Asn	Asn	Arg	Met	
		755					760					765				
Asp	Thr	Cys	Val	Val	Arg	Asn	Thr	Asp	Asp	Ile	Lys	Ala	Cys	Gly	Met	
	770					775					780					
Ala	Ile	Gly	Asn	Gln	Ser	Met	Val	Asn	Asn	Pro	Asp	Asn	Tyr	Lys	Tyr	
785					790					795					800	
Leu	Ile	Gly	Lys	Ala	Trp	Lys	Asn	Ile	Gly	Ile	Ser	Lys	Thr	Ala	Asn	
				805					810					815		
Gly	Ser	Lys	Ile	Ser	Val	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ser	Thr	Pro	Thr	Glu	
			820					825					830			
Asn	Gly	Gly	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Pro	Thr	Asn	Thr	Thr	Asn	Asn	Ala	
		835					840					845				

10

20

30

40

【 0 0 9 6 】

【表 1 6】

Leu Lys Pro Ser Val Gly Val Ser Tyr Asn His Leu Gly Ser Thr Asn
 1155 1160 1165

Phe Lys Ser Asn Ser Thr Asn Lys Val Ala Leu Ser Asn Gly Ser Ser
 1170 1175 1180

Ser Gln His Leu Phe Asn Ala Ser Ala Asn Val Glu Ala Arg Tyr Tyr
 1185 1190 1195 1200

Tyr Gly Asp Thr Ser Tyr Phe Tyr Met Asn Ala Gly Val Leu Gln Glu
 1205 1210 1215

Phe Ala Asn Phe Gly Ser Ser Asn Ala Val Ser Leu Asn Thr Phe Lys
 1220 1225 1230

Val Asn Ala Thr Arg Asn Pro Leu Asn Thr His Ala Arg Val Met Met
 1235 1240 1245

Gly Gly Glu Leu Lys Leu Ala Lys Glu Val Phe Leu Asn Leu Gly Val
 1250 1255 1260

Val Tyr Leu His Asn Leu Ile Ser Asn Ile Gly His Phe Ala Ser Asn
 1265 1270 1275 1280

Leu Gly Met Arg Tyr Ser Phe
 1285

10

20

(2)配列番号3の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 1541塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 二本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: CDS
- (B)存在位置: 1..1541

30

(xi)配列: 配列番号3:

GGC GTG CTG GAT TTG TGG CAA AGC GCG GGG TTA AGC ATT ATC ACC CCT	48
Gly Val Leu Asp Leu Trp Gln Ser Ala Gly Leu Ser Ile Ile Thr Pro	
1 5 10 15	
CCA GAA GGC GGT TAT GAG AGT AAA ACT AAA GAT AAC CCT TCT CAA AAC	96
Pro Glu Gly Gly Tyr Glu Ser Lys Thr Lys Asp Asn Pro Ser Gln Asn	
20 25 30	
AGC CCT AAA AAT GAC ACG CAA AAA ACA GAA ATT CAA CCC ACT CAA GTC	144
Ser Pro Lys Asn Asp Thr Gln Lys Thr Glu Ile Gln Pro Thr Gln Val	
35 40 45	

40

【 0 0 9 8 】

【表 1 7】

ATT Ile	GAT Asp	GGG Gly	CCT Pro	TTT Phe	GCG Ala	GGC Gly	GGT Gly	AAA Lys	GAC Asp	ACG Thr	GTC Val	GTG Val	AAT Asn	ATT Ile	TTC Phe	192	
	50					55					60						
CAC His	TTA Leu	AAC Asn	ACT Thr	AAA Lys	GCC Ala	GAT Asp	GGC Gly	ACG Thr	CTT Leu	AAA Lys	GCG Ala	GGA Gly	GGG Gly	TTT Phe	AAA Lys	240	
	65				70					75					80		
GCT Ala	TCT Ser	CTT Leu	ACC Thr	ACC Thr	AAT Asn	GCG Ala	GCT Ala	CAT His	TTG Leu	CAT His	ATC Ile	GGC Gly	GAA Glu	GGC Gly	GGT Gly	288	
				85					90					95			
GTC Val	AAT Asn	CTG Leu	TCC Ser	AAT Asn	CAA Gln	GCG Ala	AGC Ser	GGG Gly	CGC Arg	TCT Ser	TTA Leu	TTA Leu	GTG Val	GAA Glu	AAC Asn	336	10
			100				105						110				
CTA Leu	ACC Thr	GGG Gly	AAT Asn	ATC Ile	ACC Thr	GTT Val	GAG Glu	GGG Gly	ACT Thr	TTA Leu	AGA Arg	GTG Val	AAT Asn	AAT Asn	CAA Gln	384	
		115					120					125					
GTG Val	GGC Gly	GGT Gly	GCT Ala	GCT Ala	GTG Val	GCA Ala	GGC Gly	TCA Ser	AGC Ser	GCG Ala	AAT Asn	TTT Phe	GAG Glu	TTT Phe	AAG Lys	432	
	130					135					140						
GCT Ala	GGC Gly	GCT Ala	GAT Asp	ACC Thr	AAC Asn	AAC Asn	GCC Ala	ACA Thr	GCC Ala	ACT Thr	TTT Phe	AAT Asn	AAC Asn	GAT Asp	ATC Ile	480	20
	145				150					155					160		
CAT His	CTA Leu	GGA Gly	AAA Lys	GCG Ala	GTG Val	AAT Asn	TTA Leu	AGA Arg	GTG Val	GAT Asp	GCT Ala	CAT His	ACA Thr	GCT Ala	TAT Tyr	528	
				165					170					175			
TTT Phe	AAT Asn	GGC Gly	AAT Asn	ATT Ile	TAT Tyr	CTG Leu	GGA Gly	AAA Lys	TCC Ser	ACG Thr	AAT Asn	TTA Leu	AGA Arg	GTG Val	AAT Asn	576	
			180					185					190				
GGC Gly	CAT His	AGC Ser	GCT Ala	CAT His	TTT Phe	AAA Lys	AAT Asn	ATT Ile	GAT Asp	GCC Ala	ACA Thr	AAG Lys	AGC Ser	GAT Asp	AAC Asn	624	
		195					200					205					
GGG Gly	CTA Leu	AAC Asn	ACT Thr	AGC Ser	GCT Ala	TTG Leu	GAT Asp	TTT Phe	AGT Ser	GGC Gly	GTT Val	ACA Thr	GAT Asp	AAA Lys	GTC Val	672	30
	210					215					220						
AAT Asn	ATC Ile	AAC Asn	AAG Lys	CTC Leu	ACT Thr	ACA Thr	TCT Ser	GCC Ala	ACT Thr	AAT Asn	GTG Val	AAC Asn	GTC Val	AAA Lys	AAC Asn	720	
	225			230						235					240		
TTT Phe	GAC Asp	ATT Ile	AAG Lys	GAA Glu	TTA Leu	GTG Val	GTT Val	ACA Thr	ACC Thr	CGT Arg	GTT Val	CAG Gln	AGT Ser	TTT Phe	GGA Gly	768	
				245					250					255			
CAA Gln	TAC Tyr	ACT Thr	ATT Ile	TTT Phe	GGC Gly	GAA Glu	AAT Asn	ATA Ile	GGC Gly	GAT Asp	AAG Lys	TCT Ser	CGC Arg	ATT Ile	GGT Gly	816	40
			260					265					270				

【 0 0 9 9 】

【表 1 8】

GTC Val	GTT Val	AGT Ser	TTG Leu	CAA Gln	ACG Thr	GGA Gly	TAT Tyr	AGC Ser	CCG Pro	GCC Ala	TAT Tyr	TCT Ser	GGG Gly	GGC Gly	GTT Val	864	
		275					280					285					
ACT Thr	TTT Phe	AAA Lys	AGC Ser	GGT Gly	AAA Lys	AAA Lys	CTG Leu	GTT Val	ATA Ile	GAT Asp	GAA Glu	ATT Ile	TAC Tyr	CAT His	GCC Ala	912	
	290					295					300						
CCT Pro	TGG Trp	AAT Asn	TAT Tyr	TTT Phe	GAC Asp	GCT Ala	AGG Arg	AAT Asn	GTT Val	ACC Thr	GAT Asp	GTT Val	GAA Glu	ATC Ile	AAC Asn	960	
	305				310					315					320		
AAG Lys	AGG Arg	ATT Ile	CTT Leu	TTT Phe	GGA Gly	GCC Ala	CCA Pro	GGA Gly	AAC Asn	ATT Ile	GCC Ala	GGC Gly	AAA Lys	ACA Thr	GGG Gly	1008	10
				325				330						335			
CTT Leu	ATG Met	TTT Phe	AAT Asn	AAC Asn	CTA Leu	ACC Thr	CTA Leu	AAC Asn	AGC Ser	AAC Asn	GCA Ala	AGC Ser	ATG Met	GAT Asp	TAT Tyr	1056	
			340					345					350				
GGT Gly	AAG Lys	GAT Asp	TTA Leu	GAC Asp	TTA Leu	ACC Thr	ATT Ile	CAA Gln	GGG Gly	CAT His	TTC Phe	ACT Thr	AAC Asn	AAT Asn	CAA Gln	1104	
		355					360					365					
GGC Gly	ACG Thr	ATG Met	AAT Asn	CTT Leu	TTT Phe	GTC Val	CAA Gln	GAT Asp	GGG Gly	CGT Arg	GTA Val	GCG Ala	ACC Thr	TTA Leu	AAT Asn	1152	20
	370					375					380						
GCA Ala	GGC Gly	CAT His	CAA Gln	GCA Ala	AGC Ser	ATG Met	ATA Ile	TTT Phe	AAT Asn	AAT Asn	TTA Leu	GTG Val	GAT Asp	AGC Ser	GCG Ala	1200	
	385				390					395					400		
ACT Thr	GGG Gly	TTT Phe	TAC Tyr	AAA Lys	CCA Pro	CTC Leu	ATT Ile	AAG Lys	ATC Ile	AAT Asn	AAC Asn	GCT Ala	CAA Gln	AAT Asn	CTC Leu	1248	
				405					410					415			
ACT Thr	AAA Lys	AAT Asn	AAA Lys	GAA Glu	CAT His	GTT Val	TTA Leu	GTG Val	AAA Lys	GGG Gly	CGA Arg	AAC Asn	ATT Ile	GAT Asp	TAT Tyr	1296	
			420					425					430				
AAT Asn	TTA Leu	GTG Val	GGA Gly	GTG Val	CAA Gln	GGC Gly	GCT Ala	AGT Ser	TAT Tyr	GAC Asp	AAT Asn	ATT Ile	TCT Ser	GCA Ala	AGC Ser	1344	30
		435					440					445					
AAC Asn	ACC Thr	AAT Asn	CTG Leu	CAA Gln	GAG Glu	CAA Gln	TTC Phe	AAA Lys	GAG Glu	CGC Arg	CTA Leu	GCC Ala	CTT Leu	TAT Tyr	AAC Asn	1392	
		450				455					460						
AAC Asn	AAC Asn	AAC Asn	CGC Arg	ATG Met	GAT Asp	ATT Ile	TGT Cys	GTG Val	GTG Val	CGA Arg	AAA Lys	GGC Gly	AAT Asn	ACC Thr	GAT Asp	1440	
	465				470					475					480		
GAC Asp	ATT Ile	AAA Lys	GCA Ala	TGC Cys	GGG Gly	ATG Met	GCT Ala	ATC Ile	GGC Gly	AAT Asn	CAA Gln	AGC Ser	ATG Met	GTG Val	AAT Asn	1488	40
				485					490					495			

【 0 1 0 0 】

【表 1 9】

AAC CCT AAC GAT TAC AAA TAT CTT GAA GGT AAG GCA TGG AAA AAT ACA 1536
 Asn Pro Asn Asp Tyr Lys Tyr Leu Glu Gly Lys Ala Trp Lys Asn Thr
 500 505 510

GGG AT 1541
 Gly

(2)配列番号4の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ:513アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:タンパク質

(xi)配列:配列番号4:

Gly Val Leu Asp Leu Trp Gln Ser Ala Gly Leu Ser Ile Ile Thr Pro
 1 5 10 15

Pro Glu Gly Gly Tyr Glu Ser Lys Thr Lys Asp Asn Pro Ser Gln Asn
 20 25 30

Ser Pro Lys Asn Asp Thr Gln Lys Thr Glu Ile Gln Pro Thr Gln Val
 35 40 45

Ile Asp Gly Pro Phe Ala Gly Gly Lys Asp Thr Val Val Asn Ile Phe
 50 55 60

His Leu Asn Thr Lys Ala Asp Gly Thr Leu Lys Ala Gly Gly Phe Lys
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Thr Thr Asn Ala Ala His Leu His Ile Gly Glu Gly Gly
 85 90 95

Val Asn Leu Ser Asn Gln Ala Ser Gly Arg Ser Leu Leu Val Glu Asn
 100 105 110

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Val Glu Gly Thr Leu Arg Val Asn Asn Gln
 115 120 125

Val Gly Gly Ala Ala Val Ala Gly Ser Ser Ala Asn Phe Glu Phe Lys
 130 135 140

Ala Gly Ala Asp Thr Asn Asn Ala Thr Ala Thr Phe Asn Asn Asp Ile
 145 150 155 160

His Leu Gly Lys Ala Val Asn Leu Arg Val Asp Ala His Thr Ala Tyr
 165 170 175

Phe Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Gly Lys Ser Thr Asn Leu Arg Val Asn
 180 185 190

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

【表 2 0】

Gly His Ser Ala His Phe Lys Asn Ile Asp Ala Thr Lys Ser Asp Asn
 195 200 205
 Gly Leu Asn Thr Ser Ala Leu Asp Phe Ser Gly Val Thr Asp Lys Val
 210 215 220
 Asn Ile Asn Lys Leu Thr Thr Ser Ala Thr Asn Val Asn Val Lys Asn
 225 230 235 240
 Phe Asp Ile Lys Glu Leu Val Val Thr Thr Arg Val Gln Ser Phe Gly
 245 250 255
 Gln Tyr Thr Ile Phe Gly Glu Asn Ile Gly Asp Lys Ser Arg Ile Gly
 260 265 270
 Val Val Ser Leu Gln Thr Gly Tyr Ser Pro Ala Tyr Ser Gly Gly Val
 275 280 285
 Thr Phe Lys Ser Gly Lys Lys Leu Val Ile Asp Glu Ile Tyr His Ala
 290 295 300
 Pro Trp Asn Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Val Thr Asp Val Glu Ile Asn
 305 310 315 320
 Lys Arg Ile Leu Phe Gly Ala Pro Gly Asn Ile Ala Gly Lys Thr Gly
 325 330 335
 Leu Met Phe Asn Asn Leu Thr Leu Asn Ser Asn Ala Ser Met Asp Tyr
 340 345 350
 Gly Lys Asp Leu Asp Leu Thr Ile Gln Gly His Phe Thr Asn Asn Gln
 355 360 365
 Gly Thr Met Asn Leu Phe Val Gln Asp Gly Arg Val Ala Thr Leu Asn
 370 375 380
 Ala Gly His Gln Ala Ser Met Ile Phe Asn Asn Leu Val Asp Ser Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly Phe Tyr Lys Pro Leu Ile Lys Ile Asn Asn Ala Gln Asn Leu
 405 410 415
 Thr Lys Asn Lys Glu His Val Leu Val Lys Gly Arg Asn Ile Asp Tyr
 420 425 430
 Asn Leu Val Gly Val Gln Gly Ala Ser Tyr Asp Asn Ile Ser Ala Ser
 435 440 445
 Asn Thr Asn Leu Gln Glu Gln Phe Lys Glu Arg Leu Ala Leu Tyr Asn
 450 455 460
 Asn Asn Asn Arg Met Asp Ile Cys Val Val Arg Lys Gly Asn Thr Asp
 465 470 475 480
 Asp Ile Lys Ala Cys Gly Met Ala Ile Gly Asn Gln Ser Met Val Asn
 485 490 495

10

20

30

40

【 0 1 0 2】

【表 2 1】

Asn Pro Asn Asp Tyr Lys Tyr Leu Glu Gly Lys Ala Trp Lys Asn Thr
 500 505 510

Gly

(2)配列番号5の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 17塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

(xi)配列: 配列番号5:

AAGGCTGGTG TGGATAC

17

10

(2)配列番号6の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

(xi)配列: 配列番号6:

CKNGTDATYT CNACRTTYTT

20

20

(2)配列番号7の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 21塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

(xi)配列: 配列番号7:

GATTTGTGAA TTTAAAGGTG G

21

30

40

【 0 1 0 3 】

【表 2 2】

(2)配列番号8の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 22塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

10

(xi)配列: 配列番号8:

GTCTATATCA TTATTAACA TC

22

(2)配列番号9の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 18塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

20

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

(xi)配列: 配列番号9:

TAGTAACAAG ACTCATAT

18

30

(2)配列番号10の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 17塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

40

(xi)配列: 配列番号10:

CGTTAGCCGT TTTACTG

17

【 0 1 0 4 】

【表 2 3】

(2)配列番号11の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：18塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

10

(xi)配列：配列番号11：

GTGAAAGCGA AAAACAAG

18

(2)配列番号12の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：21塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

20

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

(xi)配列：配列番号12：

AAGAGAAGCT TTAAACCCTC C

21

30

(2)配列番号13の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：20塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

40

(xi)配列：配列番号13：

ATGGAAATAC AACAAACACA

20

【 0 1 0 5 】

【表 2 4】

(2)配列番号14の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ:19塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:DNA(genomic)

10

(xi)配列:配列番号14:

CTCCAGAACC CACACGATT

19

(2)配列番号15の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ:24塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

20

(ii)配列の種類:DNA(genomic)

(xi)配列:配列番号15:

TACAAACCTT ATTGATTGAT AGCC

24

30

(2)配列番号16の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ:19塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:DNA(genomic)

40

(xi)配列:配列番号16:

AAGCTTGATT GATCACTCC

19

【 0 1 0 6 】

【表 2 5】

(2)配列番号17の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 20塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

10

(xi)配列: 配列番号17:

TTYTTYACNA CNGTNATHAT

20

(2)配列番号18の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 23塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA(genomic)

20

(xi)配列: 配列番号18:

TTRTTDATYT CNARRAARTT RTC

23

30

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 35/00

テーマコード(参考)

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA38 CA04 CA09 DA05 EA04 GA11 HA12
4C085 AA03 BA20 EE01 GG01 GG08 GG10
4H045 AA10 BA10 BA72 CA11 DA83 DA86 EA29 EA31 EA52 FA74

专利名称(译)	Vacuolating毒素缺乏的幽门螺旋杆菌及相关方法		
公开(公告)号	JP2006166919A	公开(公告)日	2006-06-29
申请号	JP2005376713	申请日	2005-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	凡德比特大学		
申请(专利权)人(译)	范德比尔特大学		
[标]发明人	テイモシーエルカバー マーティンジェイブラザー		
发明人	テイモシー エル. カバー マーティン ジェイ. ブラザー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 A61K39/106 A61P31/04 A61P1/04 A61P35/00 A61K31/365 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/395 C07H21/04 C07K1/20 C07K14/205 C07K14/41 C07K14/435 C07K16/00 C07K16/12 C12N1/21 C12N15/31 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/01 G01N33 /531 G01N33/569		
CPC分类号	A61K31/365 A61K38/00 A61K39/00 A61P1/04 C07K14/205 C07K16/121 G01N2333/205		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 A61K39/106 A61P31/04 A61P1/04 A61P35/00 C12N15/00.A C12N15 /00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA38 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA05 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4C085/AA03 4C085/BA20 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA72 4H045/CA11 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045 /EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	08/200232 1994-02-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够表达大量空泡毒素的核酸。编码幽门螺杆菌空泡毒素的分离的核酸，其包含由特定序列定义的核苷酸。备选地，它可以是含有幽门螺杆菌的vacA编码区的调控序列的分离的核酸，或者是选择性地与这些核酸杂交的分离的核酸。上述核酸编码具有特定序列的蛋白质，并且可用作诊断试剂和疫苗。 [选择图]无