

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-47581

(P2010-47581A)

(43) 公開日 平成22年3月4日(2010.3.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	
A61K 39/085 (2006.01)	A61K 39/395 R	

審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-232231 (P2009-232231)	(71) 出願人	502334308
(22) 出願日	平成21年10月6日 (2009.10.6)		インヒビテックス インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2003-506301 (P2003-506301) の分割		アメリカ合衆国 30009 ジョージア 州 アルファレッタ ウェストサイド パ ークウェイ 9005
原出願日	平成14年6月17日 (2002.6.17)	(71) 出願人	503457389
(31) 優先権主張番号	60/298,098		ザ プロボスト フェローズ アンド ス カラーズ オブ ザ カレッジ オブ ザ ホーリー アンド アンディバイディッ ド トリニティー オブ クイーン エリ ザベス ニアー ダブリン アイルランド国 2 ダブリン トリニテ ィー カレッジ
(32) 優先日	平成13年6月15日 (2001.6.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コアグラゼ陰性ブドウ球菌および黄色ブドウ球菌由来の表面蛋白質を認識する、交差反応性モノクローナルおよびポリクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 コアグラゼ陽性細菌 (例えば、*S. aureus*) 由来の MSCRAMM (登録商標) ならびにコアグラゼ陰性細菌 (例えば、*S. epidermidis* および *S. hemolyticus*) 由来の MSCRAMM (登録商標) の両方を認識するモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】 コアグラゼ陽性ブドウ球菌細菌 (例えば、*S. aureus*) ならびにコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (例えば、*S. epidermidis* および *S. hemolyticus*) 由来の特定の表面蛋白質、その活性フラグメント、例えば、これらの蛋白質の A ドメイン、または該全蛋白質を認識する抗体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、17、19 および 21 からなる群から選択されるブドウ球菌表面蛋白質へ結合する、単離抗体。

【請求項 2】

該抗体が表面蛋白質の A ドメインに対して惹起される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

該抗体がヒトまたは動物における *S. aureus* 感染を処置または予防する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

該抗体がヒトまたは動物における非経口、経口、鼻内、皮下、エアゾール化または静脈内投与に好適である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が、マウス、キメラ、ヒト化およびヒトモノクローナル抗体からなる群から選択されるタイプのものである、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 8】

該抗体が一本鎖モノクローナル抗体である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 9】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、17、19 および 21 からなる群から選択される配列を有するブドウ球菌表面蛋白質へ結合する抗体と同一の結合特異性を有する抗体フラグメントを含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、17、19 および 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する蛋白質に対して惹起される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記表面蛋白質が、核酸配列 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、20 および Aap 蛋白質の A ドメインまたはその縮重物をコードする核酸配列からなる群から選択される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の抗体を含有する、単離抗血清。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の抗体およびその抗体による結合を検出するための手段を含む、診断キット。

【請求項 14】

前記結合を検出するための手段が、前記抗体へ連結される検出可能な標識を含む、請求項 13 に記載の診断キット。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の抗体を、*S. aureus* に感染していると疑われるサンプルへ添加すること、および抗体が該サンプルへ結合したかどうかを測定することを包含する、*S. aureus* の感染を診断するための方法。

【請求項 16】

有効量の請求項 1 の抗体および薬学的に許容されるビヒクル、担体または賦形剤を含む、*S. aureus* の感染を処置または予防するための薬学的組成物。

【請求項 17】

有効量の請求項 1 に記載の抗体をヒトまたは動物患者へ投与することを包含する、*S. aureus* の感染を処置または予防するための方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

アミノ酸配列 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、17、19 および 21 からなる群から選択される免疫原性量の単離蛋白質を、ヒトまたは動物へ投与することを包含する、免疫学的応答を誘発させる方法。

【請求項 19】

配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、20 の核酸配列および A a p 蛋白質の A ドメインまたはその縮重物をコードする核酸配列によってコードされるアミノ酸へ結合する能力を有する、請求項 1 に記載の単離抗体。

【請求項 20】

D s q A 蛋白質の A ドメイン由来の単離された活性フラグメント。

10

【請求項 21】

生理学的に許容される抗生物質を更に含む、請求項 1 に記載の単離抗体。

【請求項 22】

免疫応答を誘発するに有効な量の配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、17、19 および 21 からなる群から選択される蛋白質配列、ならびに薬学的に許容されるピヒクル、担体または賦形剤を含む、S . a u r e u s の感染を処置または予防するためのワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

〔関連出願の相互参照〕

本願は、2001年6月15日に出願された米国仮出願第60/298,098の利益を主張する。

【0002】

〔発明の分野〕

本発明は、一般的に、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s (黄色ブドウ球菌)由来の表面蛋白質およびそれらの活性領域(例えば、それらのAドメイン)[これは、コアグラゼ陰性ブドウ球菌(例えば、S . e p i d e r m i d i s および S . h e m o l y t i c u s)における相同蛋白質(homologue proteins)を有する]、ならびに該蛋白質を認識する抗体に関し、そして特に、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s およびコアグラゼ陰性ブドウ球菌由来の特定の蛋白質を認識し、そしてS . a u r e u s およびコアグラゼ陰性ブドウ球菌に対して交差反応性であり、そして従ってブドウ球菌細菌によって引き起こされる広範囲の感染を予防または処置するために有用なワクチンおよび方法において使用され得る、単離されたモノクローナルおよびポリクローナル抗体に関する。

30

【背景技術】

【0003】

〔発明の背景〕

宿主の成功的定着(colonization)は、動物およびヒトにおいて感染を生じさせる大抵の微生物について必要とされるプロセスである。微生物付着(microbial adhesion)は、最終的に疾患へと導き得る一連の事象における第一の重要な工程である。病原性微生物は、細菌の表面上に存在する特定の付着因子を介して、宿主組織または血清条件化された(conditioned)インプラントされた生体材料(例えば、カテーテル、人工関節、および尿管移植片)へ付着することによって、宿主に定着する(colonize)。M S C R A M M (登録商標)(M i c r o b i a l S u r f a c e C o m p o n e n t s R e c o g n i z i n g A d h e s i v e M a t r i x M o l e c u l e s (付着性マトリックス分子を認識する細菌性表面成分))は、宿主細胞外マトリックス中の個々の成分を認識しそしてこれに特異的に結合する、細胞表面付着因子のファミリーである。一旦該細菌が宿主組織に首尾良く付着し(adhered)そして定着する(colonized)と、それらの生理学は劇的に変化され、そして有害な成分(例えば、毒素および蛋白質分解酵素)が分泌され

40

50

る。更に、付着している細菌は、しばしば、バイオフィルムを作製し、そして迅速に大抵の抗生物質の殺傷効果に対してより耐性となる。

【0004】

S. aureus は、皮膚病巣（例えば、創傷感染、膿痂疹、およびフルンケル）から、生命を脅かす状態（肺炎、敗血性関節炎（septic arthritis）、敗血症（sepsis）、心内膜炎、および生体材料関連感染（biomaterial related infections）を含む）にわたる、広範囲な感染を引き起こす。*S. aureus* は、特定の宿主組織成分への細菌付着を促進するように個々にまたは協力して作用し得る、異なる MSCRAMM のレパトリーを発現することが知られている。更に、別のタイプのブドウ球菌細菌が、コアグラゼ陰性細菌として同定されており、*S. epidermidis* および *S. hemolyticus* のような種を含み、これらはまた、MSCRAMM を発現することが知られておりそして広範囲の細菌感染および関連疾患を担う。この点で、MSCRAMM は、一般的に、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方）による免疫学的攻撃のための優れた標的を提供する。

10

【0005】

しかし、抗体は本質的に非常に特異的であるので、そして異なるタイプのブドウ球菌の場合 [例えば、一方で *S. aureus*（コアグラゼ陽性）および他方で *S. epidermidis* および *S. hemolyticus*（コアグラゼ陰性）]、異なるタイプの細菌に渡って交差反応性を示す抗体を開発することは、依然として重要な課題のままである。ヒトおよび動物患者を免疫化し、そして両タイプのブドウ球菌細菌 [即ち、コアグラゼ陽性細菌（例えば、*S. aureus*）およびコアグラゼ陰性細菌（例えば、*S. epidermidis* および *S. hemolyticus*）] によって引き起こされる感染に対する保護を提供することにおけるそれらの可能性のために、このような交差反応性抗体は特に望ましい。従って、このような抗体は、ブドウ球菌細菌によって引き起こされる広範囲の感染を予防または処置することにおいて極めて有用である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

〔発明の要旨〕

従って、コアグラゼ陽性細菌（例えば、*S. aureus*）由来の MSCRAMM（登録商標）ならびにコアグラゼ陰性細菌（例えば、*S. epidermidis* および *S. hemolyticus*）由来の MSCRAMM（登録商標）の両方を認識するモノクローナル抗体を提供することが、本発明の主題である。

30

【0007】

ブドウ球菌細菌由来の MSCRAMM（登録商標）、ならびにそれらの活性領域（例えば、Aドメイン）を同定および単離することがまた、本発明の主題であり、これらは、コアグラゼ陽性およびコアグラゼ陰性の両方のブドウ球菌に対して交差反応性であるモノクローナルおよびポリクローナル抗体を産生するために使用され得る。

【0008】

コアグラゼ陰性ブドウ球菌由来の表面蛋白質（例えば、DgsK蛋白質）のAドメインを認識しそして同時に *Staphylococcus aureus* 由来の表面蛋白質（例えば、SasA蛋白質）を認識し得る単離抗体を提供することが、本発明のなお更なる主題である。

40

【0009】

本発明の単離蛋白質、Aドメインおよび抗体を使用してブドウ球菌感染の処置または予防に有用なワクチンを作製すること、ならびに本発明のワクチンおよび抗体を使用してブドウ球菌感染を予防または処置する方法を提供することが、本発明のなお別の主題である。

【0010】

これらおよび他の主題は本発明によって提供され、これは、両タイプのブドウ球菌の表

50

面蛋白質を認識し得、従って広範囲のブドウ球菌感染を処置または予防するワクチンおよび方法において使用され得る、交差反応性抗体を惹起させ得る、1タイプのブドウ球菌細菌（例えば、コアグラゼ陰性またはコアグラゼ陽性ブドウ球菌）由来の表面蛋白質の同定および単離を含む。本発明はまた、これらの表面蛋白質からのポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方の産生、ならびにブドウ球菌感染を予防または処置することにおけるそれらの使用に関する。

【0011】

これらの実施形態ならびに開示される本発明の精神および範囲内の他の変形および修飾は、本明細書および/または本明細書中で引用される参考文献（これら全てが参考として援用される）を読むことにより、当業者に容易に明らかとなるであろう。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

〔好ましい実施形態の詳細な説明〕

本発明によれば、コアグラゼ陽性ブドウ球菌細菌（例えば、*S. aureus*）ならびにコアグラゼ陰性ブドウ球菌（例えば、*S. epidermidis* および *S. hemolyticus*）由来の特定の表面蛋白質〔その活性フラグメント、例えば、これらの蛋白質のAドメイン、または該全蛋白質を認識する抗体を産生し得る他のエピトピック（epitopic）領域を含む〕が、提供される。本発明によれば、候補ペプチド配列および蛋白質の同定および単離は、多くの場合において細胞壁ペプチドグリカンへ共有結合されている、MSCRAMM（登録商標）（Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules）の共通特徴のいくつかに基づいて行われた。これらの表面蛋白質は以下の共通特徴を有し、これらは本発明の配列を同定および単離する際に使用された、即ち：（i）Sec-依存分泌（Sec-dependent secretion）に必要とされる、N末端シグナルペプチド（約40残基長）、（ii）プロリンおよびグリシン残基に富んでいるかまたはセリンおよびアスパルテートジペプチド繰り返しから構成される、壁スパニングドメイン（wall spanning domain）、（iii）ペプチドグリカンにおけるペンタグリシン架橋への該蛋白質の共有結合的固定（covalent anchoring）のために必要とされる、LPXTGモチーフ、（iv）疎水性膜スパニングドメイン（hydrophobic membrane-spanning domain）、続いて（v）いくつかの正に帯電した残基。

20

30

【0013】

本発明によれば、上述のような特性の点で*S. aureus*の全ゲノムを利用することによって、MSCRAMMの指標である分泌（secretion）および固定（anchorage）モチーフを有する（即ち、N末端シグナルペプチドおよびC末端LPXTGモチーフ続いて疎水性ドメインおよび正に帯電したテイル（tail）を有する）蛋白質をコードする、少なくとも8つの新規のオープンリーディングフレームを同定した。以下の表は、*S. aureus*ゲノムにおけるそれらの分布、それらの蛋白質サイズおよびC末端細胞壁ソーティング配列（C-terminal cell wall sorting sequence）を含む、同定された蛋白質のリストを示す。

【0014】

40

【表 1】

表 1.

名称	分布	サイズ	C末端
EkeS	ENCSJM	2189 aa	LPNTGSEMDLPLKELALITGAALLARRRS KKEKES
DsqA	ENCSJM	~1363- 2283 aa	LPDTGDSIKQNGLLGGVMTLLVGLGLMKR KKKKDENDQDDSQA
KesK	ENCSJM	~909 aa	LPKTGETTSSQSWWGLYALLGMLALFIPK FRKESK
KrkN2	ENCSJM (Cowan)	~278 aa	LPKTGLTSVDNFISTVAFATLALLGSLSLLLF KRKESK
KrkN	ENCSJM	~661 aa	LPQTGEESNKDMTLPLMALIALSSIVAFVLP RKRKN
RkaS	ENCSJM	~801 aa	LPKTGTNQSSSPEAMFVLLAGIGLIATVRR RKAS
RrkN	NCSJM	1629 aa	LPKTGLESTQKGLIFSSIIGIAGLMLLARRRK N
KnkA	NCSJM	629 aa	LPKAGETIKEHWLPISVIVGAMGVLMIWLS RRNKLKKA

10

略字：e M R S A - 1 6 ; N , 8 3 2 5 ; C , C O L ; S , M S S A ; J , N 3 1 5 , M 20
, M u 5 0 .

8つのうち6つは、現在配列決定されている6つのブドウ球菌ゲノムの全てにおいて保存されており、そして残りの2つは、これらのゲノムの5/6において存在している。

【0015】

本発明によれば、上記蛋白質をコードするアミノ酸および核酸配列が得られ、そしてこれらは以下の通りであった：E k e s M R S A - 配列番号1 (DNA配列)； E k e S M R S A - 配列番号2 (蛋白質配列)； D s q A (8 3 2 5) - 配列番号3 (DNA配列)； D s q A (8 3 2 5) - 配列番号4 (蛋白質配列)； K e s K 1 (8 3 2 5) - 配列番号5 (DNA配列)； K e s K 1 (8 3 2 5) - 配列番号6 (蛋白質配列)； K r k N 2 (8 3 2 5) - 配列番号7 (DNA配列)； K r k N 2 (8 3 2 5) - 配列番号8 (蛋白質配列)； K r k N (8 3 2 5) - 配列番号9 (DNA配列)； K r k N (8 3 2 5) - 配列番号10 (蛋白質配列)； R k a S (C O L) - 配列番号11 (DNA配列)； R k a S (C O L) - 配列番号12 (蛋白質配列)； R r k N (8 3 2 5) - 配列番号13 (DNA配列)； R r k N (8 3 2 5) - 配列番号14 (蛋白質配列)； K n k A (8 3 2 5) - 配列番号15 (DNA配列)； K n k A (8 3 2 5) - 配列番号16 (蛋白質配列)。

【0016】

本発明によれば、単離された抗体は、該蛋白質および/または該ドメインを認識し得るように、上記蛋白質またはそれらの活性領域(例えば、Aドメイン)から産生され得る。これらの抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得る。ポリクローナル抗体が望ましい場合、これらは、当該分野に周知の多数の慣用的様式で産生され得る。典型的なプロセスにおいて、所望の表面蛋白質またはその活性領域は、好適な宿主動物(例えば、マウスまたはウサギ)へ注射され得、そして好適な時間後、抗体が、宿主動物から単離および回収され得る。モノクローナル抗体に関して、本発明によれば、これらは、多数の好適な様式[例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975)の周知の方法、または当該分野において公知の他の好適な様式(例えば、米国特許6,331,415; 5,981,216; 5,807,715; および4,816,567; 欧州特許出願519,596; ならびにPCT公開公報WO 00/71585に開示されている方法)を含む; これらの特許公開公報の全ては、本明細書中で参考として援用される]で、作製され得る。これらの方法は、当該分野に周知である様式での、キメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体としてのそれらの製 40 50

造を含む。なお更に、モノクローナル抗体は、軽鎖または重鎖のような一本鎖から製造され得、そして更に、全抗体の結合特徴（例えば、特異性および/または親和性）を保持する抗体活性フラグメントから製造され得る。活性フラグメント（active fragments）とは、異なるタイプのブドウ球菌細菌（即ち、コアグラゼ陰性またはコアグラゼ陽性）由来の特定の表面蛋白質またはその相同体（homologue）へ結合する完全抗体と同一の結合特異性を有する、抗体フラグメントを意味し、そして用語“抗体”は、本明細書中で使用される場合、該フラグメントを含むように意味される。更に、本発明に従うモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用して作製される抗血清がまた意図され、そして当業者に認識されるような多数の好適な様式で作製され得る。

【0017】

上述されるように、本発明に従う単離された表面蛋白質および/またはそれらの活性領域に対する抗体は、当該分野において周知である多数の好適な様式、例えば、モノクローナル抗体を産生するために使用され得る、上述の十分確立されたKohlerおよびMilsteinの方法で作製され得る。例えば、このようなプロセスで使用される予備工程において、マウスに、本発明に従う精製組換えMSCRAMM（登録商標）またはその活性部分が、長期間にわたって一週間に一回腹腔内注射され得、続いて該精製蛋白質に対する反応性を測定するために、該免疫化マウスから得た血液の検査が行われる。該蛋白質に反応性であるマウスの同定に続いて、マウス脾臓から単離したリンパ球をマウスメラノマ細胞と融合させて、本発明の表面蛋白質に対する抗体について陽性であるハイブリドーマを作製し、これを次いで単離および培養し、続いて精製およびアイソタイピング（isotyping）する。

【0018】

本発明に従うモノクローナル抗体を産生するために、これらが、本発明に従う組換えで作製されたMSCRAMM（登録商標）を使用して産生されることが好ましく、そしてこれらの組換え体は、当該分野に周知の多数の標準方法を使用して産生および単離され得る。例えば、このような方法の1つは、組換え蛋白質およびペプチドをクローン化および発現するために発現ベクターとしてE.coli発現ベクターpQE-30を使用する。1つの好ましい方法において、PCRを使用して、DgsKまたはSasAと同定された表面蛋白質のAドメインを上述の配列から増幅し、そしてE.coli発現ベクターpQE-30（Qiagen）[これは、6つのヒスチジン残基を含有する組換え融合蛋白質の発現を可能にする]へサブクローン化する。引き続き、このベクターを、E.coli株ATCC55151へ形質転換し、0.7の光学密度（OD₆₀₀）まで15リットル発酵槽において増殖させ、そして4時間0.2mMイソプロピル-β-Dガラクトシド（IPTG）で誘導した。細胞を、AG Technologies hollow-fiber assembly（細孔サイズ（pore size）0.45μm）を使用して収獲し、そして細胞ペーストを-80℃で凍結させた。細胞を、1100psiでthe French Pressを通過させる2回パスを使用して1×PBS（10mL緩衝液/1g細胞ペースト）において溶解させた。溶解した細胞を、30分間17,000rpmでスピンドウンさせて（spun down）、細胞残骸を除去した。上清みを、0.1M NiCl₂を充填させた5-mL HiTrap Chelating（Pharmacia）カラムに通過させた。ローディング（loading）後、カラムを、10mM Tris（pH 8.0）、100mM NaCl（緩衝液A）の5カラム容積で洗浄した。蛋白質を、30カラム容積に渡って、10mM Tris（pH 8.0）、100mM NaCl、200mM イミダゾール（緩衝液B）の0~100%勾配を使用して溶出した。SdrGN1N2N3またはSdrGN2N3は、~13%緩衝液B（~26mMイミダゾール）で溶出した。280nmでの吸光度をモニタリングした。SdrGN1N2N3またはSdrGN2N3を含有する分画を、1×PBSで透析した。

【0019】

次に、各蛋白質を、次いで、内毒素除去プロトコル（endotoxin removal protocol）に通した。このプロトコルの間に使用した緩衝液は、5-mL Mono-Q sepha

10

20

30

40

50

rose (Pharmacia) カラムを通過させることによって、内毒素フリーにさせた。蛋白質を、4 × 15 mL チューブに等しく分割した。各チューブの容積は、緩衝液 A を用いて 9 mL にされた。1 mL の 10% Triton X-114 を各チューブに添加し、そして 4 で 1 時間回転しながらインキュベートした。チューブを 37 °C 水浴に配置して相分離させた。チューブを 10 分間 2,000 rpm でスピンドウンさせ、そして各チューブからの上部の水相を回収し、そして洗剤抽出 (detergent extraction) を繰り返した。第 2 番目の抽出からの水相を合わせ、そして 0.1 M NiCl₂ をチャージした 5 - mL IDA chelating (Sigma) カラムを通過させて、残っている洗剤を除去した。カラムを緩衝液 A の 9 カラム容積で洗浄し、その後、該蛋白質を緩衝液 B の 3 カラム容積で溶出した。溶離液 (eluant) を、5 - mL Detoxigel (Sigma) カラムを通過させ、フロースルー (flow-through) を回収し、そしてカラムへ再適用した。第 2 通過からのフロースルーを回収し、そして 1 × PBS において透析した。精製産物を、濃度、純度および内毒素レベルについて分析し、その後マウスへ投与した。

10

20

30

40

50

【0020】

好ましいプロセスにおいて、本発明に従うモノクローナル抗体は、以下の様式において上記に同定される組換え蛋白質から作製され得る。このプロセスにおいて、E. coli 発現および精製された組換え SasA および DsgK 蛋白質は、マウスモノクローナル抗体のパネル (panel) を産生するために使用し、一方、マウス血清は、ポリクローナル抗体のソース (source) として使用した。手短に言えば、Balb/C または SJL マウスのグループに、表 2 において以下に記載されるように溶液状態のまたはアジュバントと混合されている 1 ~ 10 mg の蛋白質の一連の皮下免疫化 (subcutaneous immunizations) を受容させた。

【0021】

【表 2】

表 2. 免疫化スキーム

RIMMS 注射	日	量 (μg)	経路	アジュバント
#1	0	5	皮下	FCA/RIBI
#2	2	1	皮下	FCA/RIBI
#3	4	1	皮下	FCA/RIBI
#4	7	1	皮下	FCA/RIBI
#5	9	1	皮下	FCA/RIBI
慣用的な注射	日	量 (μg)	経路	アジュバント
初期	0	5	皮下	FCA
ブースト # 1	14	1	腹腔内	RIBI
ブースト # 2	28	1	腹腔内	RIBI
ブースト # 3	42	1	腹腔内	RIBI

【0022】

犠牲 (sacrifice) (RIMMS) 時またはブースト (boost) (慣用的) 後 7 日目に、血清を回収し、そして MSCRAMM (登録商標) 蛋白質に対するまたは全細胞 (Sepidermidis および S. aureus) についての ELISA アッセイにおいて力価を滴定した。最終ブースト 3 日後に、脾臓またはリンパ節を除去し、単一細胞懸濁へ掻き裂き (teased)、そしてリンパ球を収獲した。次いで、リンパ球を P3X63Ag8.653 メラノーマ細胞系 (ATCC # CRL-1580) へ融合させた。細胞融合、引き続きプレート化 (plating) および栄養補給 (feeding) を、Current Protocols in Immunology からの the Production of Monoclonal Antibodies protocol (Chapter 2, Unit 2) [本明細書中で参考として援用される] に従って行った。

【0023】

次いで、該融合から産生された任意のクローンを、標準ELISAアッセイを使用して特異的抗-SasA抗体産生についてスクリーンした (screened)。陽性クローンを増やしそしてフローサイトメトリーにより全細菌細胞結合アッセイにおける活性についてそしてBiacore分析によりSasA結合について更に試験した。Biacore分析の間、流速 (flow rate) は10 ml / 分で一定のままであった。SasAまたはDgsK注射の前に、試験抗体を、RAM-Fc結合を介してチップ (chip) へ吸着させた。時間0の際、30 mg / mlの濃度のSasAまたはDgsKを、3分間チップ上に注射し、続いて2分間解離した (dissociation)。この段階の分析によって、Mab / SasAまたはDgsK相互作用の相対的結合および解離動力学 (the relative association and disassociation kinetics) が測定された。

10

【0024】

次に、上述のように作製された抗体を、全細菌 (whole bacteria) への結合について試験した。この試験において、細菌サンプル *S. aureus* Newman、*S. aureus* 67-0、*S. aureus* 397 (SAL6)、*S. aureus* Wood、*S. aureus* 8325-4、メチシリン耐性 *S. aureus* MRSA 16、*S. epidermidis* ATCC 35984、*S. epidermidis* HB、*S. epidermidis* CN-899および *S. haemolyticus* ATCC 43253を回収し、洗浄し、そしてウサギIgG (50 mg / ml) でブロッキングした後の2 μg / mlの濃度のMabまたはPBSのみ (コントロール) と共にインキュベートした。抗体と共のインキュベーション後、細菌細胞を、ヤギ-F_(ab')₂-抗-マウス-F_(ab')₂-FITC (これは、検出抗体として役立った) と共にインキュベーションした。抗体標識後、細菌細胞を、FACSカリバーフローサイトメーター (FACScaliber flow cytometer) を介して吸引して、蛍光放出を分析した (励起: 488、放出: 570)。各細菌株について、10,000事象 (events) を回収しそして測定した。これらのデータは、*S. aureus* SasAに対する抗体がコアグラエゼ陰性ブドウ球菌の表面上の相同な蛋白質を認識し得たことを示す。該データは、*S. aureus* SasAに対するウサギポリクローナル抗体が *S. epidermidis* HBの細胞表面から放出された蛋白質ならびに *S. epidermidis* からクローン化されたDgsK由来の組換えA-領域と交差反応することを実証するウェスタンブロット分析を支持する (下記の表3および図6を参照のこと)。

20

30

【0025】

【表3】

表3. ポリクローナル血清反応性

	New man	67-0	397 (SAL 6)	Wood 46	8325-4	MRS A 16	ATC C 3598	HB	CN-899	ATC C 4325
							4			3
正常マウス血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マウス抗-SasA	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+

40

【0026】

本発明の表面蛋白質の組換え形態を使用しての抗体の産生が好ましいが、抗体は、これらの蛋白質またはそれらの活性領域 (例えば、Aドメイン) の天然の単離および精製され

50

たバージョンから産生され得、そしてモノクローナルまたはポリクローナル抗体は、このような抗体を得るための上述の同一様式でこれらの蛋白質または活性領域を使用して産生され得る。なお他の慣用的な様式が、当業者に認識されるように、組換えまたは天然の精製された蛋白質またはそれらの活性領域を使用して、本発明の抗体を産生するために利用可能である。

【0027】

当業者に認識されるように、本発明の抗体はまた、ブドウ球菌細菌によって引き起こされる感染を処置または予防するために、ヒトまたは動物患者への投与に好適な薬学的組成物に形成され得る。本発明の抗体（または、その有効なフラグメント）を含有する薬学的組成物は、当該分野において一般的に使用される任意の好適な薬学的ビヒクル（vehicle）、賦形剤または担体（例えば、生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールを含む）、他の治療化合物、ならびにそれらの組み合わせと組み合わせて処方され得る。当業者に認識されるように、使用される特定のビヒクル、賦形剤または担体は、患者および患者の状態に依存して変化し、そして様々な投与様式が、当業者に認識されるように、本発明の組成物に好適である。本願に開示される任意の薬学的組成物を投与する好適な様式としては、局所、経口、肛門、膺、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻内および皮内投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

局所投与について、組成物は、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、ドロップ（例えば、点眼剤および点耳剤（ear drops））、または溶液（例えば、マウスウォッシュ）の形態で処方される。創傷または手術包帯（dressings）、縫合糸およびエアゾール（aerosols）が、該組成物で含浸され得る。該組成物は、保存剤、浸透を促進するための溶媒、および軟化剤（emollients）のような慣用の添加物を含有し得る。局所製剤はまた、クリームもしくは軟膏ベース、エタノール、またはオレイルアルコールのような慣用の担体を含有し得る。抗体組成物の更なる形態、ならびに他のM S C R A M M（登録商標）についての組成物、ワクチン、方法および適用に関する他の情報がまた、一般的に、上述のM S C R A M M（登録商標）およびそれらの活性領域ならびにそれらに対する抗体を包含する本発明に適用可能であり得、そしてこれらの他のM S C R A M M（登録商標）は、例えば、米国特許5,175,096；5,320,951；5,416,021；5,440,014；5,571,514；5,652,217；5,707,702；5,789,549；5,840,846；5,980,908；6,086,895；6,008,341；6,177,084；5,851,794および6,288,214において開示されており；これらの特許の全ては、本明細書中で参考として援用される。

【0029】

本発明の抗体組成物はまた、免疫原性応答を増強するに有効な量の好適なアジュバントと共に投与され得る。例えば、好適なアジュバントとしては、ミョウバン（リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）（これは、ヒトにおいて広く使用される）、ならびに他のアジュバント、例えば、サポニンおよびその精製成分Quil A、フロイント完全アジュバント、R I B B Iアジュバント、ならびに研究および獣医学適用において使用される他のアジュバントが挙げられ得る。なお他の化学的に規定される調製物、例えばムラミールジペプチド、モノホスホリルリピドA、リン脂質複合体（例えば、Goodman-Snitkoff et al. J. Immunol. 147: 410-415 (1991) によって記載されそして本明細書中で参考として援用されるもの）、Miller et al., J. Exp. Med. 176: 1739-1744 (1992) によって記載されそして本明細書中で参考として援用されるようなプロテオリポソーム（proteoliposome）中の該複合体の封入物（encapsulation）、ならびに脂質小胞中の該蛋白質の封入物 [例えば、Novasome™脂質小胞（Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH）] もまた、有用であり得る。

【0030】

任意の事象において、上述の蛋白質またはそれらの活性領域を認識する本発明の抗体組成物は、ブドウ球菌感染を予防または処置する方法において、ならびに宿主組織および/または細胞へのブドウ球菌細菌の結合を阻害することにおいて有用である。本発明によれ

ば、ブドウ球菌感染を処置または予防するために本明細書に開示された表面蛋白質またはそれらの活性サブ領域 (subregions) に対する有効量の抗体を投与することを包含する、ブドウ球菌感染を予防または処置するための方法が提供される。更に、これらのモノクローナル抗体は、宿主細胞へのブドウ球菌細菌の結合を弱める (impairing) ことにおいて有用である。

【0031】

従って、本発明によれば、上記の任意の慣用的な様式 (例えば、局所、非経口、筋肉内など) での本発明の抗体の投与は、有効量の該抗体組成物がヒトまたは動物患者に投与されると、ヒトまたは動物患者におけるブドウ球菌感染を処置または予防する極めて有用な方法を提供するであろう。有効量とは、細菌の付着を予防するか、宿主細胞へのブドウ球菌細菌の結合を阻害するに十分であり、そして従ってブドウ球菌感染の処置または予防に有用である、使用のレベル (例えば、抗体力価) を意味する。当業者に認識されるように、ブドウ球菌感染を処置または予防することにおいて有効であるために必要とされる抗体力価のレベルは、患者の性質および状態、ならびに / あるいは既存のブドウ球菌感染の重篤度に依存して変化する。

10

【0032】

ブドウ球菌感染を処置または予防する方法における使用に加えて、本発明の抗体はまた、ブドウ球菌蛋白質の特異的検出のために、または研究ツールとして、使用され得る。用語“抗体”は、本明細書中で使用される場合、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、一本鎖 (single chain)、二重特異的 (bispecific)、サル化 (simianized)、およびヒト化または霊長類化 (primatized) 抗体ならびに F a b フラグメント [例えば、上記に特定される表面蛋白質に対する該抗体の結合特異性を保持しているフラグメント、F a b 免疫グロブリン発現ライブラリーのプロダクトを含む] を含む。従って、本発明は、該抗体の可変重鎖および軽鎖のような一本鎖 (single chain) の使用を意図する。これらのタイプのいずれの抗体または抗体フラグメントの産生も、当業者に周知である。この場合において、上記へ参照されるような表面蛋白質またはそれらの活性領域に対する抗体が、産生、単離および / または精製され、そして次いでブドウ球菌感染に対して処置または保護するために使用され得る。

20

【0033】

上述の抗体のいずれもが、ブドウ球菌細菌の同定および定量のために、検出可能な標識で直接標識化され得る。イムノアッセイにおける使用のための標識は、一般的に、当業者に公知であり、そして酵素、ラジオアイソトープ、および蛍光、発光および色素産生性物質 (コロイダルゴールドまたはラテックスビーズのような着色された粒子を含む) を含む。好適なイムノアッセイとしては、酵素結合イムノソルベント検定法 (E L I S A) が挙げられる。

30

【0034】

あるいは、抗体は、免疫グロブリンについて親和性を有する標識化物質との反応によって、間接的に標識化され得る。抗体は、第2物質と複合体化されて、そして抗体へ複合体化された第2物質について親和性を有する標識化された第3物質で検出され得る。例えば、抗体はビオチンへ複合体化され、そして抗体 - ビオチン複合体が、標識化されたアビジンまたはストレプトアビジンを使用して検出され得る。同様に、抗体はハプテンへ複合体化され、そして抗体 - ハプテン複合体が、標識化された抗 - ハプテン抗体を使用して検出され得る。抗体およびアッセイ複合体を標識するこれらおよび他の方法は、当業者に周知である。

40

【0035】

本発明によれば、ブドウ球菌感染に対して処置または保護するために設計された能動または受動免疫化のためのワクチンがまた提供され、そしてこれらのワクチンは、当該分野に周知の多数の慣用的ワクチン調製方法を使用して、上述の表面蛋白質またはそれらの活性領域から作製され得る。典型的なワクチンにおいて、免疫原性量の好適な表面蛋白質またはその活性フラグメントは、好適な薬学的に許容されるビヒクル、担体または賦形剤と

50

組み合わせられ、そしてヒトまたは動物患者を免疫化するに有効な量のこのワクチンが、必要に応じて投与され得る。免疫原性量 (immunogenic amount) とは、これが、ヒトまたは動物患者において免疫原性応答 (immunogenic response) を惹起させ得る該蛋白質またはその活性フラグメントもしくはサブ領域の任意の量をいうことが、当業者によって理解される。

【0036】

本発明に従う免疫原性量の蛋白質または活性フラグメントの導入または投与により患者において抗体が産生される、能動ワクチン (active vaccines) に加えて、本発明の単離抗体 (または、その活性フラグメント) はまた、ブドウ球菌感染に対する受動免疫化のためのワクチン開発において使用され得る。このような場合、上述のような抗体組成物、即ち、有効量の抗体および薬学的に許容されるビヒクル、担体または賦形剤が、必要に応じて、ヒトまたは動物患者へ投与され得る。

10

【0037】

従って、本発明によれば、該蛋白質またはその活性フラグメントは、能動ワクチンとして使用され得、そして本発明の抗体は、ブドウ球菌感染を処置または予防する好適な抗体を提供することにおいて有用である受動ワクチンとして使用され得る。当業者に認識されるように、ワクチンは、多数の好適な様式での投与、例えば非経口 (即ち、筋肉内、皮内または皮下) 投与または鼻咽喉頭 (即ち、鼻内) 投与のために包装され得る。1つのこのような様式は、ワクチンが筋肉内に (例えば、三角筋へ) 注射される場合であるが、投与の特定のモードは、扱われる細菌感染の性質および患者の状態に依存する。ワクチンは、好ましくは、投与を促進するために薬学的に許容されるビヒクル、担体または賦形剤と組み合わせられ、そして担体は、通常、保存剤を含むかまたは含まない、水または緩衝化生理食塩水である。ワクチンは、投与時の再懸濁のために凍結乾燥されるかまたは溶液状態であり得る。

20

【0038】

更に、特定の場合において、本発明の抗体は、それが投与される患者において必要であるならばそれらがより少ない免疫原性であるように、必要である場合には修飾され得る。例えば、患者がヒトである場合、抗体は、例えば Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986) または Tempest et al. *Biotechnology* 9:266-273 (1991) によって記載されるように、ハイブリドーマ由来抗体の相補性決定領域をヒトモノクローナル抗体へ移植することによって“ヒト化”され得、あるいは、例えば Padlan, *Molecular Imm.* 28: 489-498 (1991) によって記載されるように、免疫グロブリン可変領域における表面曝露マウスフレームワーク残基を、対応の相同ヒトフレームワークを模倣するように変化させることによって“化粧張り (veneered)”され得、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。なお更に、そのように望まれる場合、本発明のモノクローナル抗体は、必要である場合には細菌感染と戦う本発明の組成物の能力を更に増強するために、好適な抗生物質と組み合わせられて投与され得る。

30

【0039】

ヒトまたは動物患者を処置することに加えて、本発明の組成物はまた、医療装置または他の生体材料 (例えば、インプラント) の感染を停止 (halt) または予防するために使用され得る。ここで記載される抗体、蛋白質および活性フラグメントでコーティングされる医療装置またはポリマー性生体材料としては、ステーブル (staples)、縫合糸、代替心臓弁 (replacement heart valves)、心臓補助装置 (cardiac assist devices)、ハードおよびソフトコンタクトレンズ、眼内レンズインプラント (前房 (anterior chamber) または後房)、他のインプラント、例えば、角膜インレー (corneal inlays)、人工角膜 (kerato-prostheses)、脈管ステント、エピケラトファリア (epikeratophalia) 装置、緑内障シャント (glaucoma shunts)、網膜ステーブル (retinal staples)、強膜バックル (scleral buckles)、歯科プロテーゼ (dental prostheses)、甲状腺軟骨形成装置、喉頭形成装置、脈管グラフト、軟および硬組織プロテーゼ (ポンプを含むが、これに限定されない)、電気装置 (スティミュレーターおよびレコーダーを含む)、耳プロテーゼ、ペ

40

50

ースメーカー、人工喉頭、歯科インプラント、乳房インプラント、陰茎インプラント、頭蓋/顔の腱、人工関節、腱、靭帯、半月板、および円板、人工骨、人工器官（人工脾臓、人工心臓、人工肢、および心臓弁を含む）、ステント、ワイヤー、ガイドワイヤー、静脈内および中心静脈カテーテル、レーザーおよびバルーン血管形成装置、脈管および心臓装置（チューブ、カテーテル、バルーン）、心室補助器（ventricular assists）、血液透析コンポーネント、血液オキシジェネター、尿道/尿管/尿装置（Foleyカテーテル、ステント、チューブおよびバルーン）、気道カテーテル（気管内および気管開口チューブおよびカフ（cuffs））、経腸供給チューブ（経鼻胃管、胃内および空腸チューブを含む）、創傷ドレナージチューブ、体腔（例えば、胸膜、腹膜、頭蓋、および心膜腔）を空にするために使用されるチューブ、血液バック、試験管、採血チューブ、ヴァキュエーター（vacutainers）、注射器、針、ピペット、ピペットチップ、および血液チュービングが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0040】

用語“コーティングされた（coated）”または“コーティング（coating）”は、本明細書中で使用される場合、抗体または活性フラグメント、あるいはそれから誘導される薬学的組成物を、装置の表面、好ましくはブドウ球菌細菌感染へ曝される外部表面に適用することを意味することが、当業者に理解される。装置の表面は、該蛋白質、抗体または活性フラグメントによって完全にカバーされる必要はない。

【0041】

本発明に従う抗体組成物の投与のために好ましい用量は、量がブドウ球菌感染を予防または処置することにおいて有効であることであり、そしてこの量は、感染の性質および患者の状態に依存して大いに変化することが容易に認識されるだろう。上述のように、本発明に従って使用される“有効量”の抗体または薬学的薬剤は、所望の予防または治療効果が引き起こされるような、非毒性であるが十分な量の薬剤を意味するように意図される。以下に指摘されるように、必要とされる抗体または特定の薬剤の正確な量は、被験体の種、年齢、および一般的状態、処置される状態の重篤度、使用される特定の担体またはアジュバントおよびその投与モードなどに依存して、被験体ごとに変化する。従って、任意の特定の抗体組成物の“有効量”は、特定の状況に基づいて変化し、そして好適な有効量は、ルーチンの実験のみを使用して、当業者によって、適用の各場合において決定され得る。用量は、組成物が投与される個体に合うように調節されるべきであり、そして個体の年齢、体重および代謝で変化する。組成物はまた、安定剤または薬学的に許容される保存剤（例えば、チメロサル（エチル（2-メルカプトベンゾエート-S）水銀ナトリウム塩）（Sigma Chemical Company, St. Louis, MO））を含有し得る。

20

30

【0042】

好適な標識または他の好適な検出可能な生体分子または化学物質と共に使用される場合、ここで記載されるモノクローナル抗体は、ブドウ球菌感染のインビボおよびインビトロ診断あるはブドウ球菌細菌の検出のような目的のために有用である。実験室研究はまた、このような抗体の使用によって促進され得る。例えば以下に記載されるものような、種々のタイプの標識および本発明の抗体へ該標識を複合体化させる方法が、当業者に周知である。

40

【0043】

例えば、抗体は、これらに限定されないが³²P、³H、¹⁴C、³⁵S、¹²⁵I、または¹³¹Iのような放射標識へ複合体化され得る。標識の検出は、シンチレーションカウンティング、ガンマ線分光法またはオートラジオグラフィーのような方法により可能である。生物発光標識（例えば、ホタルルシフェリンの誘導体）がまた有用である。生物発光物質が、慣用方法で該蛋白質へ共有結合され、そして該標識化された蛋白質は、ルシフェラーゼのような酵素がATPとの反応を触媒して生物発光分子に光の光子を放出させる際に、検出される。フルオロゲン（fluorogen）がまた、蛋白質を標識するために使用され得る。フルオロゲンの例としては、フルオレセインおよび誘導体、フィコエリトリン、アロ-フィコシアニン（allo-phycoyanin）、フィコシアニン、ローダミン、およびテキサスレッド

50

が挙げられる。フルオロゲンは、一般的に、蛍光検出器によって検出される。

【0044】

細胞中のリガンドの位置は、上述の抗体を標識しそして当業者に周知の方法 [例えば、Warrenら (Mol. Cell. Biol., 7:1326-1337, 1987) によって記載されるもののような手順を使用する免疫蛍光顕微鏡検査法] に従って標識を検出することによって測定され得る。

【0045】

上述のように、本発明のモノクローナル抗体 (またはその活性な部分またはフラグメント) は、感染を担うブドウ球菌病原体と哺乳動物宿主との間の初期物理的相互作用を妨害するために特に有用であり、そして該物理的相互作用のこの妨害は、患者を処置することおよび使用をより安全にするために留置 (in-dwelling) 医療装置における細菌感染を予防または軽減することの両方に、有用であり得る。

【0046】

本発明の別の実施形態において、ブドウ球菌細菌および感染を単離および同定することに有用であり得るキットが提供され、これは、単一容器に凍結乾燥されて次いでブドウ球菌細菌を含有すると疑われる水性サンプルの添加によって活性となるような、好適な形態で本発明の抗体を含む。このようなキットは、典型的に、本発明の表面蛋白質または抗体へ結合する複合体 (complexes) の同定を可能にする好適な免疫検出試薬と共に、好適な形態の抗体を収容するための好適な容器を含む。一般的に、これらのキットは、本発明に従う抗体と、患者由来のサンプルが該抗体に導入された場合に該抗体の結合を同定するための手段とを含み得る。例えば、好適な免疫検出試薬は、好適な検出可能なシグナルまたは標識 (例えば、ビオチンまたは検出可能な色を生成する酵素など) を含み得、これは、通常、抗体へ結合され得るか、または抗体が抗原へ結合する場合に検出可能な結果を提供するような他の好適な様式で使用され得る。

【0047】

手短かに言えば、本発明の表面蛋白質 (またはその活性フラグメント) を認識しそしてこれに結合する本発明の抗体は、従って、ヒトおよび動物患者ならびに医療または他の留置装置における、広範囲のブドウ球菌感染を処置することに有用である。本発明によれば、これらの蛋白質の性質、ならびにそれらが他のタイプのブドウ球菌細菌の蛋白質と共通するエピトープを含有する、即ち、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌由来の蛋白質が *S. aureus* 由来の相同蛋白質を認識する抗体を惹起する (逆も同様) という事実のために、本発明の抗体は、交差反応性を示し、そして広範囲のブドウ球菌感染に対して有効である。従って、本発明は、広範囲のブドウ球菌感染に対して処置または保護する改善された方法のための方法および組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、本発明に従うインシリコ予測される蛋白質の一次構造の描写である。

【図2】図2は、本発明の *orfs* を発現する精製 N 末端組換え *His*-タグ蛋白質のクマシーゲルを示す。

【図3】図3A~3Cは、それぞれ抗-*KesK* 抗体 (図3A)、抗-*KnkA* 抗体 (図3B) および抗-*DsqA* 抗体 (図3C) でのプロービング (probing) を示す、*S. aureus* 細胞壁抽出物のウェスタンブロットティングを示す。

【図4】図4A~4Bは、*S. aureus* MSCRAMM (登録商標)、即ち *KnkA* (図4A) および *KesK* (図4B) を発現する *Lactococcus lactis* のドットブロットティングおよびウェスタンイムノブロットティングを示す。

【図5】図5A~5Dは、*RrKn* および *RrKN2* (図5A)、*Kesk1* および *Kesk2A* (図5B)、*KnkA* (図5C) ならびに *DsqA2* (図5D) を含む、インピボ発現を検査する回復期血清を用いての、本発明に従う組換え LPXTG 蛋白質のプロービングを示す。

【図6】図6は、*S. aureus SasA* に対するウサギポリクローナル抗体は、*S*

10

20

30

40

50

. e p i d e r m i d i s HBの細胞表面から放出される蛋白質ならびにS . e p i d e r m i d i sからクローン化されたD s g K由来の組換えA - 領域と交差反応することを実証する、ウェスタンブロット分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0049】

〔実施例〕

以下の実施例が提供され、これは本発明の好ましい実施形態の局面を例証する。続く実施例において開示される技術は、本発明者らによって本発明の実施において十分に機能すると発見された技術を示し、そして従ってその実施のために好ましいモードを構成すると考えられ得ることが、当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示を考慮して、多くの変化が、本発明の精神および範囲から逸脱することなしに、開示される特定の実施形態においてなされて、そして依然として同様または類似の結果を得ることができるを認識すべきである。

10

【0050】

〔実施例1 . S . A u r e u s由来のM S C R A M M ' sの単離および配列決定〕

S t a p h y l o c o c c u s a u r e u sは、細菌が宿主防衛を回避することを可能にしてそして付着因子として作用することにより病原性において重要な役割を果たす、表面結合蛋白質のクラスを発現することが公知である。これらの蛋白質は、M S C R A M M s (M i c r o b i a l S u r f a c e C o m p o n e n t s R e c o g n i z i n g A d h e s i v e M a t r i x M o l e c u l e s (付着性マトリックス分子を認識する細菌性表面成分)) として公知であり、そして大抵の場合において、細胞壁ペプチドグリカンに共有結合的に固定されている。それらは、いくつかの共通の特徴を有する：(i) S e c - 依存分泌に必要とされる、N末端シグナルペプチド(約40残基長)、(i i) プロリンおよびグリシン残基に富んでいるかまたはセリンおよびアスパルテートジペプチド繰り返しから構成される、壁スパニングドメイン、(i i i) ペプチドグリカンにおけるペンタグリシン架橋への該蛋白質の共有結合的固定のために必要とされる、L P X T Gモチーフ、(i v) 疎水性膜スパニングドメイン、続いて(v) いくつかの正に帯電した残基。

20

【0051】

S . a u r e u sの全ゲノム配列を利用することによって、M S C R A M Mの指標である分泌および固定モチーフを有する(即ち、N末端シグナルペプチドおよびC末端L P X T Gモチーフ続いて疎水性ドメインおよび正に帯電したテイル(tail)を有する)蛋白質をコードする、8つの新規のオープンリーディングフレームを同定した。以下の表は、S . a u r e u sゲノムにおけるそれらの分布、それらの蛋白質サイズおよびC末端細胞壁ソーティング配列を含む、同定された蛋白質のリストを示す。

30

【0052】

【表4】

名称	分布	サイズ	C末端
EkeS	ENCSJM	2189 aa	LPNTGSEEMDLPLKELALITGAALLARRRS KKEKES
DsqA	ENCSJM	~1363- 2283 aa	LPDTGDSIKQNGLLGGVMTLLVGLGLMKR KKKKDENDQDDSQA
KesK	ENCSJM	~909 aa	LPKTGETTSSQSWWGLYALLGMLALFIPK FRKESK
KrkN2	ENCSJM (Cowan)	~278 aa	LPKTGLTSVDNFISTVAFATLALLGSLSLLLF KRKESK
KrkN	ENCSJM	~661 aa	LPQTGEESNKDMTLPMLIALSSIVAFVLP RKRKN
RkaS	ENCSJM	~801 aa	LPKTGTNQSSSPEAMFVLLAGIGLIATVRR RKAS
RrkN	NCSJM	1629 aa	LPKTGLESTQKGLIFSSIIGIAGLMLLARRR KN
KnkA	NCSJM	629 aa	LPKAGETIKEHWLPISVIVGAMGVLMIWLS RRNKLKNKA

10

略字：e M R S A - 1 6 ; N , 8 3 2 5 ; C , C O L ; S , M S S A ; J , N 3 1 5 , M
, M u 5 0。

20

【0053】

8つのうち6つは、現在配列決定されている6つのブドウ球菌ゲノムの全てにおいて保存されており、そして残りの2つは、これらのゲノムの5/6において存在している。

【0054】

以下は、DNAおよび蛋白質配列のリストである：

【0055】

【 数 1 】

Ekes MRSA (配列番号 1)

acaacacagcagagaatagacaaccaggaggaaaacgaaatgaattgtaaagaaaaataaatatagtattag
 aaaataaaagtagggatattctactttaatcgggacagttttattactttcaaacccaaatggtgcacaagcittaac
 tacggatcataatgtgcaagggtggtcaaatcaagcattacctggcaactcacaaaatacaaatgccgatactaac
 gagacatagtaaatgattcgcaaaatactcctaattgcacatgcaacagacaatacatcaacaaatcaagcattgac
 taatcatcaaaacgttgatgtggcaaatcaagtcgggctgctccaatacagcctagcgctgcctgcgcaaaata
 ataataattctaattcaacagcaacagagccagcggcgaatacaataataatttagcatcaaataacaat
 acattaaacgtgcctaataatacagataacaatgattcagcgcgtcatctgactttaaaagaaattcaagaagatggt
 cgctattcgtctgataagccagagttagttgctgattgctgaagaagcatctaatagaccgaaaaagagaagcagac
 gtgctgcgccaacagatcctaattgcaacaccagcagatccaacggctacaccagcagatccaacggcaggaat
 ggtagtcaccagttgcaattacagcgcatacacgccaacaactgatccaatgccaataataggacaaaatg
 cacctaacgaagtgtttcatttgatgataacaacattagaccaagtagcaaccgttctgtgctacagtaactgtgtt
 gataattaccaggctacacactgattaatggtggtaaagtaggggtgttttagtcatgcaatggtagaacgagcatgt
 ttgattcaggagatgccaagaactatcaagcgcgaaggcaatgtaattgcatgggtcgtattagaggaaatgataca
 aatgatcatggcgttttaattggtatcgagaaaacattaacagtaaatccgaattctgaattaatcttgaatttaact
 atgactactaaaaactatcaaggatgacaaatcattaaaaatgctgataacgatactgttattggtgaaaaag
 tagttgcttatggtccgatttggcgttataaaagtacctgaaaatgtagtcatctaaaaattcaattgtacctaaaaat
 gacgcaataacagatgcacgtggtattatcaattacgagatggatataaatactatgactttgtagactcaatcggct
 tcttctgggtcacatgtctatgttgaagacgtacaatggagccaacagcaacaaataataaagaatttacagttac
 aacgtcattaagaataatgtaactttggcgttcattcaatacagatgattttgatataaaaattcaattacctgaaggt
 gttgaatagttaataatcattgactaaagattttctagcggtaattcaggtgtgatattaatgatatgaatgtgacgt
 tgacgcagcaaatcgaattattacaattaaaagtagtggagggtacaggggaattcgccggcagcactaatgcctg
 ataaaatattggattgaagataagctacgtgtgaacaatgtgccaacaccaagaacagtaacattaacgatacat
 taacgtataaaacattcacaagattttatcactcctgctgaaagtcatactgtaagtacaaatccatatacaattg
 atatcatcatgaataaagacgcattgcaagccgaagtcgatagacgáattcaacaagcggattatacattgcatcat
 tagatatttttaattgatcttaaagacgcgcacaaacaattttagatgaaaaccgtaacaatgtacctttaacaaaag
 agtttctcaagcagatcgttatttagcaaatcagatgcaacatacgttaattcgacgtgtgacgctgaaaatgcc

10

20

【 0 0 5 6 】

30

【 数 2 】

gttaatagaaaagttgatgacatggaagatttagttaacccaaaatgatgaactgacagatgaagaaaaacaagca
 gcgattcaagtcacgaggaacataaaaaatgaaattattgggaatattggtgaccaaacgactgatgatggcgttact
 agaattaaagatcaaggtatacagactttaagtggagacactgcaacaccagttgtaaaccaaatgctaaacaag
 ctatacgtgataaagcagcgaaacaaagagaaattatcaatcacacgccagatgctactcaagatgaaattcaag
 atgcattaaatcaattaacaacggatgaaacagatgctattgataatgttacgaatgctactaccaatgctgatgttga
 aacagctaaaaataatggtattaatacaatggtgcagttgcccacaagtgcacacaaacaagctgcaagaga
 tgcaattaatcaagcgacagcaacgaaacgacaacaaataaatagcaatagagaagcaacacaagaagaga
 aaaatgcagcattgaatgaattaacgcaagccacgaaccacgattagaacaaatcaatcaagcgacaaccaat
 gatgatgtagatactgccaaaggtgatggtctgaatgccattaatcctattgcccgttaactgttgcaagcaagcag
 caagagatgccgatcacatgatgcacaacagcatalcgcagagatcaatgcaaactcctgatgacgactcaagaag
 aaagacaagcagcaatagagaaagtaaatgctgctgtagctgtgcaataactaataatgtaataaccaat
 gctgatgtgagcaagtaagacaaatgcaattcaaggtatacaagccattgaaccagctacaaggttaaaaca
 gatgctaaaaacgctattgatcaaatgctggaacgcaacataatgcatatttaataataatgatgacgacttaga
 agagcaacaagcagcacaacaatgctgatcaagctgtagccacagcgaagcaaaatattaatgacgagata
 cgaatcaagaagttgcacaagcaaaagatcagggcacacaaaatatagttgattcaaccggcaacacaagtta
 aaacggatgacgcaatgctgtaaatgaaaaagcgcgagaggcgataacaaatcaatgctacacctggcgcg
 actcgagaagagaacaagaagcgataaatcgtgtcaatacacttaaaaatagagcattaaatgatattggtgta
 cgtctactactgcatggtcaatagtattagagacgatgcagtcattcaaatcgggtgcaattcaaccgcatgtaacga
 agaaacaaactgctacaggtgtattaacggacttagcaactgcaaaaaacaagaaattaacaaaatacaaatg
 caaccactgaagaaaagcaagtagcattaaatcaagtagaccaagatttagcaaccgcaattaataataataatc
 aagctgataactaatgcagaagtagatcaagcacaacaattaggtacaaaagcaattaatgcgattcagccaaat
 tgaaaaaaacctgcagcatttagcacaaccaatcagcattatagtgctaaattagttgaaatcaatgctacaccag
 atgcaacagatgatgagaaaaatgctgcatcaatactttaaatcaagacagacaacaagctattgaaagtattaa
 acaagcaaatcaaatgctggaagtagaccaagctgcgacagtgagagaataatcgatgctgttcaagttga
 cgttgtaaaaaacaagcagcgcgagataaaatcactgctgaagtagcgaagcgtattgaagcggttaacaaa
 cacctaactgcaactgacgaagaaaagcaggctgcagttaatcaatcaatcaactaaagatcaagcgttaaatca
 aattaatcaaaacaaacaaatgatcaggtagacgcaactacaaatcaagcgattaatgctatagataatgttgaa
 gctgaagtagtaattaaccaaaggcaattgcagatattgaaaagcgtgttaaagaaaagcaacagcaaatgat
 aatagcttgattcaacagataatgagaaagaagttgctttacaagcattagctaaagaaaaagaaaaagcacttg
 cagctattgaccaagctcaaacgaatagtcaggtgaatcaagcggcaacaaatggtgatcagcgattaaattatt
 caacctgaaacaaaaaattaaaccagcagcagcgtgaaaaaatcaatcaaaaagcgaatgaattacgtgacgaaa
 ttaatcaagataaagaagcagcagcagaagaagacaagcggcgttagataaaatcaatgatttagttgctaaag
 ctatgacaaatcacgaatgatagaacaaatcagcaagttatgactcaacaaatcaagcgttgacgacattgc
 attagtgacgctgaccatattgttagagcagctgctagagatgcagttaagcaacaatgaagctaaaaagcac
 gaaattgagcaagcggaaactgcgactgatgaagaaaaacaagttgctttaaatcaattagcgaataatgaaaa
 cgtgcattacaaaacattaatcaagcaatagcgaataatgatgtgaaacggttgaaatcaaatggtattgctacgtta
 aaggcgtagaaccgcacattggtgtaaacctgaagctcaagaagccataaaagcagcgcagataaccaagta
 gaatctataaaaagatacaccacatgctacgacagatgaattagatgaagcaaaccaacaaataaacgacacactt
 aaacaaggtcaacaagatatagacaatacgcacacaagatgcagctgcaatgatgttagaaaccaaaccgattaa
 ggcaatcgaacaaatfaaacgaaagttagacgcaaacgctgcagcgttgataacattgatgaaagtaataataat
 caactcgatgcaatacgaatacgcctagatacaacgcaagatgaacgaaatggtgctattgctgcgttaataaaat
 tgtaatgcaatfaaaatgatattgcacaaaacaaaacgaatgcagaagtggatcaaacctgaggctgatggtaac
 aacaacatcaaagtgatttacctaaagttcaagttaaaccagcagcgcgtcaatctgtcagcgcgaaaagctgaag
 ctcaaatgcacttattgatcaaatgatttatctaccgaagaagaagattagctgctaaacatttagtagaacaag
 cacttaatcaagctattgatcagatcaatcacgcagataagactgcgcaagttaatcaaatagtatcgatgctcaaa
 atattattcaaaaatfaaacagcgcacaacagttaaagcaacagcattacaacaaatcaaatatcgctcaaat

10

20

30

40

【 0 0 5 7 】

【数 3】

aaaattaatttaattaaagcaaataacgaagcgacagatgaagaacaaaatgctgcaatagtacaagttgaaaa
 gagtaattaaagctaaacaacaaattgctggtgcagtgactaatgctgatgtggcatatttattgcatgatgggaaaa
 acgaaattcgtgaaatcgaaacctgttattaataaaaaagcaactgcgagagaacaattaacaacattattcaacgat
 aagaaacaagcaattgaagcgaatgttcaagcaacagtagaagaagaatagtatttttagcacagttacaacaaa
 catttatgacactgctattggacaaatgatcaagatcgtagcaatgcacaagttgataaacagcaacattaatct
 acaacaatacatgatttagacgtacatcctattaaaaagccagatgctgaaaaaacgattaatgatgatcttgac
 gtgttacacatttagtcaaaattatcgaaaagtaagtgatcgtaataaggctgatgcattaaaagctataactgcatt
 aaaattacaatggatgaagaattaaaaacagcagcactaatgctgatgttgatgcagtttaaacgatttaattgtt
 gcattaggcgatatagaagcagtaactgaaaaagaaaatagcttactgctgattgataacattgtcacaacaaac
 ataTgcgaaattcaaagcgatcgcaacaccagaacaattagctaaagtaaaagcattaattgatcaaatgttgcag
 atggcaatagaatggtgatgaagatgcgacattaatgacatcaaaaaagatacgcaactcattattgatgaaattt
 tagcaattaaattacctgctgaagtgataaaagcgtcaccaaaaagtggggcaacctgctccaaaagttgtacgct
 attaaaaagaagataaacaagaagtcgaaaagttgaaaagaactccaatactgggtctgaagaaatggatt
 taccattaaaagaattagcactaattacaggcgcagcattattagctagaagacgttctaaaaagaaaaagaatc
 ataa

10

EkeS_MRSA (配列番号 2)

MNLLKKNKYSIRKYKVGIFSTLIGTVLLSNPNGAQALTTDHNVQGGSNQALPGNS
 QNTNADTNRDIVNDSQNTPNAHATDNTSTNQALTNHQNVQVANQVGPAPIQPSA
 SPAQNNNSNANSTATEPAANTNNNLASNNNTLNVPNNTDNNDSARHLTLKEIQE
 DVRHSSDKPELVAIAEEASNRPKKRSRRAAPTDPNATPADPTATPADPTAGNGSA
 PVAITAPYPTTDPNANNIGQNAPNEVLSFDDNNIRPSTNRSVPTVTVVDNLPGYTL
 INGKVGVSFHAMVRTSMFDSGDAKNYQAQGNVIALGRIRGNDTNDHGDFNGIEK
 TLTVPNSELIFEFNTMTTKNYQGMTNLIKNADNDTVIGEKVWAYGPIWRLLKVPE
 NVSHLKIQFVPKNDAITDARGIYQLRDGYKYDFVDSIGLHSGSHVYVERRTMEPT
 ATNKEFTVTTSLKNNGNFGASFNTDDFVYKIQLPEGVEYVNNSLTKDFPSGNSG
 VDINDMNVTYDAANRIITIKSTGGGTGNSPARLMPDKILDLYKLRVNNVPTPRTVT
 FNDTLTYKTYSQDFINSPAESHVSTNPTYIDIIMNKDALQAEVDRRIQQADYTFASL
 DIFNDLKRRAQTILDENRNNVPLNKRVSQADIDSLANQMQLTLIRSVDAENAVNRK
 VDDMEDLVNQDELTDDEEKQAAIQVIEEHKNEIIGNIGDQTTDDGVTRIKDQGIQL
 SGDATPVVKNPAKQAIRDKAAKQREIINHPTDATQDEIQDALNQLTTDETDIDNV
 TNATTNADVETAKNNGINTIGAVAPQVTHKQAARDAINQATATKRQQINSNREATQ
 EEKNAALNELTQATNHALEQINQATTNDDVDTAKEGDLNAINPIAPVTVVKQAARD
 AVSHDAQQHIAEINANPDATQEERQAAIEKVYAAVAVANTNILNANTNADVEQVKT
 NAIQGIQAIEPATKVKTDKNAIDQSAETQHNAIFNNNDATLEEQQAAQQLLDQAVA
 TAKQNINAADTNQEVAQAKDQGTQNVVQIPATQVKT DARNVNEKAREAITNINA
 TPGATREEKQEAIRVNTLKNRNLNDIGVTSTTAMVNSIRDDAVNQIGAVQPHVTK
 KQTATGVLTDLATAKKQEINQNTNATTEEKQVALNQVDQDLATAINNINQADTNAE
 VDQAQQLGTKAINAIQPNIVKKPAALQTNQHYSACLVEINATPDATDDEKNAIINT
 LNQDRQQAIESIKQANTNAEVDQAATVAENNIDAVQVDVVKQAARDKITAIEVAKR
 IEAVKQTPNATDEEKQAAVNQINQLKDQAFNQINQNTNDQVDATTNQAINAIDNV
 EAEVVIKPKAIADIEKAVKEKQQQIDNSLDSTDNEKEVALQALAKEKEKALAAIDQA
 QTNSQVNQAATNGVSAIKIIPETKIKPAAREKINQKANELRAQINQDKEATAEERQ
 AALDKINDLVAKAMTNITNDRTNQQVNDSTNQALDDIALVTPDHIVRAAARDAVKQ
 QYEAKKHEIEQAEHATDEEKQVALNQLANNEKRALQNINQAIANNDVKRVESNGIA

20

30

40

【数 4】

TLKGVEPHIVKPEAQEAIKASADNQVESIKDTPHATTDELDEANQQINDTLKQGQ
 QDIDNTTQDAAVNDVRNQTIKAIEQIKPKVRRKRAALDNIDESNNQLDAIRNTLDT
 TQDERNVAIAALNKIVNAIKNDIAQNKTNAEVDQTEADGNNNIKVILPKVQVKPAAR
 QSVSAKAEQNALIDQSDLSTEEERLAAKHLVEQALNQAIDQINHADKTAQVNS
 IDAQNIISKIKPATTVKATALQQIQNIATNKNLIKANNEATDEEQNAAIVQVEKELIKA
 KQQIAGAVTNADVAYLLHDGKNEIREIEPVINKKATAREQLTTLFNDKKQAIENVQ
 ATVEERNSILAQLQNIYDTAIGQIDQDRSNAQVDKTATLNLQTIHDLDVHPIKPPDAE
 KTINDDLARVTHLVQNYRKVSDRNKADALKAITALKQMDEELKTARTNADVDAVL
 KRFNVALGDIEAVITEKENSLLRIDNIAQQTYAKFKAIATPEQLAKVKALIDQYVADG
 NRMVDEDATLNDIKKDTQLIIDEILAIKLPAEVIKASPKVGPAPKVC TPIKKEDKQEV
 RKVKELPNTGSEEMDLPLKELALITGAALLARRRSKKEKES

10

DsqA (8325) (配列番号 3)

tctaatgaatgtaaagataatacaaggagtattacatgagtaaaagacagaaagcattcatgacagcttagcaaa
 cgaaaaacaagagtaagacttataaatctggaaaaaattgggtaaaatccggaattaaagaaatagaaatgttc
 aaaattatggggctaccatttattagtcagtttagtgagtaagataatcaaagcattagtaaaaaaatgacgggat
 acggactgaaaactacggcgggtattgtggtgcatcaccgtaaatatgttgcagaccagcaagctttgcggtctct
 gatgcaccattaactctgaattaacacacaaaagtgaacagtaggtaataaaaactcaacgacaatcgaagcat
 caacatcaacagccgattccacaagtgaacgaaaaatagtagttcggtaacaacatcaaatagtgacacagctctc
 aagtgaaaagtctgaaaaggtcacttcgacaactaatagtaacagcaatcaacaagagaaattgacatctacatc
 agaatcaacatcctcaagaatactacatcaagttctgataactaaatctgtagcttcaacttcaagtacagaacaacc
 aattaatacatcaacaaatcaaagtactgcatcaataacacttcacaaagcacaacgcatctcgggtcaacttaa
 acaaaaactgacacaacgtcaactagcaccgaccagtaaaacttcgaaacttcagtcgcttagctatgtcaacattg
 cgtcagcagcagcagacaaccgagtaactgctaatacaattacagftaataaagataacttaaaacaatatatgac
 aacgtcaggtaatgcfacctatgatcaaaagtaacgggtattgtgacgftaacacaggatgcatacagccaaaaagggtg
 ctattacattaggaacacgtattgactctaataagagtttcatcttctggaaaagtaaataggtaacaaatatgaag
 ggcattgaaatgggtggagatggatcgggtttgctttcaccagggtgattagggtgaacagggttaaacgggtccgc
 agtaggtattgggtgcttaagtaacgcaattggctcaaattggatacgtatcacaatacatctaaacaaatcagctg
 caaaggcgaatgctgaccatctaatgtagctggtggagggtgctttggtgcaattgtaacaacagatagttatgggtgt
 gcgacaacgtatacatcaagttcaacagctgataatgctgcgaagftaaatgttcaacctcaaaataacacgtcca
 agattttgatattaactataatgggtatacaaaagggtatgactgtcaaatatgcagggtcaaacatggacacgtaattt
 cagattggattgcaaaaagggtgacgaccaacttttcatatcaatgacagcctcaacagggtggcgcgacaaattac
 aacaagtacaattggaacattcgaatatacagagctgctgttacacaagtgagatacgttgatgtaacaacaggta
 aagataattatccacaaaaacatattcaggaaatgttgatcaagtcgtgacaatcgataatcagcaatctgcattga
 ctgctaaaggatataactacacgtccgtgatagttcatatgctgcaactataatgatacaaaataaaactgtaaaaat
 gacgaatgctggacaatcagtgacatattttactgatgtaaaagcaccactgtaactgtaggcaatcaaaccat
 agaagtggtgtaaaacaatgaatcctattgtattgactacaacggataatggactgggactgtgacaaatacagttac
 aggattaccaagcggattaagttacgatagtgcaacgaattcaatcattgggacaccaaaaaaattggtcaatca
 acagtgacagttgttctactgaccaagcaaaatacaaaatcgacgacaacttttaataaatgttggatagcaca
 gcaccaacagtgacaccaataggagatcaatcatcagaagtgattcaccataatccccgattaaaattgctacgca
 agataacagtggaatgctggtagcaatacagtgactggattgccatccggactaacattgatagtacaaataata
 ctattagtggtacaccaacaacattggtacaagtaactatacaatcgtttctacagatgagcggtgaacaaaacga
 cgacaacttttaaatatgaagtaacaagaaatagcatgagtgattccgtatcaacatcagggaagtacacaacaatct
 caaagtggtcaacaagtaagctgactcacaagtgatcaacaggtacatcaggatcgattgtggtatctacatc
 agctagtacctgaaatcgacaagtgtaagcctatctgattctgtgagtgatcctaagtcattaagcacatctgaaagt

20

30

40

【 数 5 】

aatagtgatcaagctcaacaagcacaagtttagtgaattcacaagtgatcatcaagcatgtcggattcagctagt
aatcaacatcattaagcggattctattcacaactctagcagctgaaaaatccgaaagctatcaacaagtcacatctg
attcattcgtacatcaacatcactcagtgactcattaagtatgagtacatcaggaagctgtctaagtcacaaagctta
tcaacgagtatacagggctgcttagtacatcagcatcattaagtacagtcacatcgaatgcaattagtcacatcaacat
cattgagcagtgacgtacacctcggactctatcagtttcaaatagcatagccaactctcaaagtgctcaacaa
gcaaatcagattcacaagtcacatcaatatacattaagtacaagtgattcaaaatcgatgagtcacatcagaatcattga
gcgattcgcagcagcacaagtggtctgttctggatcactaagcatagcagcatcacaagtgctcaacaagtcacat
cagactcgtatgagtactcagagatagtaagtactctatcagtcacaagtggtcattatctgcatcagacagtaaatc
aatgtccgtaagtagtcaatgagcacgctctcagtcaggtagtcacatcagaatcattaagtgattcacaagtcacatct
gattctgatagtaagtcattatcacaagtcactagtcacatcagggtcaacaagtcacatcaacgctcgacaagtgctcag
tacgactcggaaatcacaagtcagctgtggtcaatgagtgcaagtcacatccgattcaatgagcacaatcaacgctgctt
agtgattcaacgagtgatagcaaatcagcatcaactgcatcaagtgcaatcaatcacaagtgcttctacgagcac
atctggtcggtaagtaactcgcacatcgtaagtaacagtaatcagaacgtaacatcaacatctatgagtgattccaa
gcttaagtcacatcagagctgattcaataagtgcaatcaacgtaacgagcagactctataagtgaaatctgcttc
agagagcagcttatatacattaagtgcaatcaaatagtcactagcagattcagaatcacaagtgcatctgccttttaagtg
aatcattaagtgaaagtcagctctgaatcaacatcagagtcagtgagtagtgcgacaagtgagagtcagtcattatcag
acagtcacatcagaatctggtagcacaatcattaagtaattcaacaagtggttagtcctcattcaacatcga
caagtcacagtgcaatcaacgtaacggttaagagcagagtggttcaacatcactgagtagtcaacgagtcacaagtt
tgtctgactctacaagttgtcaacatcattaagtgattccacaagtgatagtaagtcgattcattaagtcacatcaatgtc
gacaagtgattcaatcagtcacaagtaaatctgattccattagtcacatccacatcattaagtggttctacaagtgaaagt
gaatccgactcaacatcatcaagtgaaagtaaatccgattcaacatcaatgagcacaatgagtcacatcaacatc
aggaagtcacaagtcagtcacaagttgtctgactcaacgagtcacatcattgtcactaagtgctcaatgaa
tcaaagcggagtagactcaaacctcagcaagccaaagtgctcaaacctcaacaagtcacaagcagcagcgaatcc
gattcacaagcacaatcatatatacaagtcagtcacaagccaaagtgcaatccacatcgacatcaacgtaactaa
gcgattcaacaagtcacatcaaaaagtcagagtcacatcagggtcggtaagcacatcagcgtcattaagtggtcagag
agtgcaatctgattcacaagtcacatcaacaagtgcaagtgagtcacaacatcagaagtgctcaacatcactcagtg
ctcaacaagtcacaagtaactcaggatcagcaagtcagtcacaatcagtcagtaactcagcaagcgaagtgcaatc
cgattgtcgtcaacatctttaagtgattcaacatctcgtcaatgcaaaagcagtgcaatccgattcacaagcacaatca
gcatcattaagtgattcgtcaagtcacatcaactcaaacggatgctgaccattgcaagttatctacatcggttaagtc
atcagagctggtcacaatcagaagtcacaagtgcaatccgattcaacatcaacatcattaagcagattcacaagc
acatcaagaagtcacaagtcacaggtcagcaagtcacatcaacatcaacaagtcactctcgtagtcacatcagctt
caactagtaactcgtacgtaacagtcactagtgattcacaagtcagcttctgacaagtcacatcaacaagtcagag
tgattcaacgctcattatctgatagtgtagtgattcaacatcagactcaacaagtcgagtcacatctggtcagtgagtg
gtctatctcgttaagtgattcgaagtcacatcaacatcggctagtgaaagtaatgagcgaagcacaatctgattcaca
agtcagtcagaaatctgaaatgattcagaagtgtaagtgcaatctgaaagtgactctaaatcagtcagtggtc
aacaagtgctcagtgattctggtcattgagcgtctcaacgctcattaagaaaatcagaagtgtaagcagtcaggtc
attgagtgctcacaatcagtcagcagtcagtaagcacaagcagtcagtcacattaagtgatcagcgtcactaaga
agtcagaaagcgtgagtgcaatctgattcattaagtgattcaaaatcaacaagtggttcgactcaacaagtcacatctg
gttcattgagtcactcaacatcattaagtggtcagaagcgaagtcagtcacctcgtcaagtgattcaatataatg
agtgattctactagtcacaagtcactcagactcattaagtggtatcaatatacttaagtggtccacaagtccttagcactc
gattcattaagtgattcaaaatcattgagtagctcgaagtcagtggtatcagaatcaacgtaacaagtcagtcagc
gattcgcagtcagtcacaagtaatagtcacatctgactctatgagcatcagtcacatcagaagcagtcacatgtct
acaagtgattcgtctagcatcagtggtatcaaatcaacgagtcacatcacttcaacatctgactcaatgagcgggaagc
gtatcagttcaacatcgacaagtttaagtgactcaatatacagggtcaacaagtgtaagtgactcagtcacacaagc
acatctacatcattaagtgattcaatgtcacaagccagtcacaagtcacaagtcacatctggttcttaagtcacatcga
tatcaacatcaatgcaatgagtgtagtcacatcagtcacacaagcacaatcgggtcagacatcattatcaacatcag

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

【数 6】

acagtatcagtgatttctacttcaataagtatcagtggttcacaaagtacagtagaatcagaatctacaagtgattcaac
 ttctatcagtgactcagaatcattgagtacatcagattcagactcgacatcgacaagtacatcggactcaacaagtg
 tcaacttcaacaagcatatctgaatcattaagtagctctggttcagggtcaacgagcgtatctgactcaacatcaatga
 gtgaatctaattcatcgagtggttcaatgtcacaagacaaatccgactcaacatcaattagtgactcagaatcagtgtc
 aacaagcacatcaacgctcattgagcacatccgattcgacaagcacatccgaatcactgagtagatctatgtctggttc
 acaaagcatttctgactcaacatcaacaagtagtccggctcaacaagtacatctgaatctaactcaatgcatccgctc
 agactcaatgagtagtgcatactcacagcacgagcacatctcgcttatcaagtgaagcaacaacgagcagcagtg
 gaatctcagttctacattaagtgcaacatctgaagtgactaaaacataatggcacaccagcacaagaagtaaaaaaga
 ttgccagatacaggtgactcaataaaacaaaatggattactaggtggcggtatgacattatagttggttaggttaatg
 aagagaagaaaaagaaatgaaaatgatcaagatgattctcaagcataa

10

DsqA (8325) (配列番号 4)

SNECKDNTRSYMSKRQKAFHDSLANKTRVRLYKSGKNWVKSGIKEIEMFKIMG
 LPFISHSLVSQDNQSIKMTGYGLKTTAVIGGAFTVNMLHDQQAFAASDAPLTSE
 LNTQSETVGNQNSTTIEASTSTADSTSVTKNSSSVQTSNSDTVSSEKSEKVTSTTN
 STSNQQEKLSTSESTSSKNTTSSSDTKSVASTSSTEQPINTSTNQSTASNNTSQS
 TTPSSVNLNKTSTTSTAPVKLRTF SRLAMSTFASAATTTAVTANTITVKNKDLKQ
 YMTTSGNATYDQSTGIVTLTQDAYSQKGAITLGTRIDSNKSFHFSGKVN LGNKYEG
 HGNGGDGIGFAFSPGVLGETGLNGAAVIGGGLSNAFGFKLDTYHNTSKPNSAAKA
 NADPSNVAGGGAFGAFVTTDSYGVATTYTSSTADNAAKLNVQPTNNTFQDFDIN
 YNGDTKVMVTKYAGQWTRNIDWIAKSGTTNFSLSMTASTGGATNLQQVQFGT
 FEYTESAVTQVRYVDVTTGKDIIPPKTYSGNVDQVVTIDNQQSALTAKGYNYTSVD
 SSYASTYNDTNKTVKMTNAGQSVTYFTDVKAPT VTVGNQTIEVGKTMNPIVLT
 DNGTGTVTNTVTGLPSGLSYDSATNSIIGTPTKIGQSTVTVVSTDQANNKSTTTFTI
 NVVDTTAPT VTPIGDQSSEVYSPISPIKIATQDNNGNAVTNTVTGLPSGLTFDSTNN
 TISGTPNIGTSTISIVSTDASGNKTTTTFKYEVTRNSMDSVSTSGSTQQSQSVST
 SKADSQSASTSTSGSIVVSTSASTSKSTSVSLSDSVSASKSLSTSESNSVSSSTST
 SLVNSQSVSSMSDSASKSTSLSDSISNSSSTEKSESLSTSTSDSLRTSTSLSDSL
 SMSTSGSLSKSQSLSTSIGSSSTSASLSDSTSNASTSTSLSESASTSDSISISNSI
 ANSQSASTSKSDSQSTSISLSTSDSKSMSTSESLSDSTSTSGSVSGSLSIAASQSV
 STSTSDSMSTSEIVSDSISTSGLSASDSKMSVSSSMSTSQSGSTSESLSDSQST
 SDSDSKSLSQSTSQSGSTSTSTSTASVRTSESQSTSGSMSASQSDSMSISTSFS
 DSTSDSKSASTASSEISQSASTSTSGSVSTSTSLSTSNERTSTSMSDSTSLSTS
 ESDSISESTSTSDSISEAISASESTFISLSESNSTSDSESQSASAFLESESESTSES
 TSESVSSSTSESTSLSDSTSESGSTSTSLSNSTSGSTSI STSTSIESTSTFKSESV
 STSLSMSTSTSLSDSTSLSTSLSDSTSDSKSDSLSTSMSTSDSISTSKSDSISTSTS
 LSGSTSESESDSTSSSEKSDSTSMSISMSQSTSGSTSTSTSTSLSDSTSTSLSL
 ASMNQSGVDSNSASQSASNSTSTSTSESDSQSTSSYTSQSTSQSESTSTSTSL
 DSTSISKSTSQSGSVSTASLSGSESESDSQSISTSAESTSEASTSLSDSTST
 NSGASTSTSLSNSASASEDLSTSLSDSTASMQSSESDSQSTASLSDSLST
 STSNRMSTIASLSTSVSTSESGSTSESTSESDSTSTSLSDSQSTSRSTASGSAST
 STSTSDSRSTASTSTSMRTSTSDSQSMLSTSTSTMSDSTSLSDSVSDSTSDS
 TSASTSGMSVVISLSDSTSTSTASEVMSASISDSQSMSESVNDESVSESNSE
 SDKSMSGSTSVSDSGLSVSTSLRKSESVSESSLSCSQMSDSDVSTSDSSLS
 VSTSLRSESVSESDSLSDSKSTSGSTSTSTSGSLSTSTSLSGSESVSESTSLSDS

20

30

40

【 0 0 6 1 】

【数 7】

ISMSDSTSTSDSDSLSGSISLSGSTSLSTSDSLSDSKSLSSSQSMSGSESTSTSVS
 DSQSSSTNSQFDSMSISASESDSMSTSDSSSISGSNSTSTSLSTSDSMSGSVSV
 STSTSLSDSISGSTSVSDSSSTSTSTSLSDSMSQSQSTSTASGSLSTSI STM SM
 SASTSSSQSTSVSTSLSTSDSISDSTSI S ISGSQSTVESESTSDSTSI DSESLSTSD
 SDSTSTSDSTSGSTSTSI E SLSTSGSGSTSVSDSTSMSESNSSSVSMSQDKS
 DSTSISDSESVSTSTSTSLSTSDSTSTSESLSTSMGSQSISDSTSTMSGSTST
 ENSMHPSDSMSMHHTSTSTRLSSEATTSTSESQSTLSATSEVTKHNGTPAQ
 SEKRLPDTGDSIKQNGLLGGVMTLLVGLGLMKRKKKKDENDQDDSQA

KesK1 (8325) (配列番号 5)

10

ttattcaattaaatataatcttataggagttgtaacaacatgaacaaacatcaccctaaattaaggctcttctattctat
 tagaaaatcaactctaggcgttgcatcggcattgctcagtaactatttfaattactctcaacatcaagcacaagcag
 cagaaaatacaaaactctcagataaaaatctcggaaaatcaaaataataatgcaactacaactcagccacctaagg
 atacaaatcaaacacaacctgctacgcaaccagcaaacactgcaaaaaactatcctgcagcggatgaatcactta
 aagatgcaattaaagatcctgcattagaaaataaagaacatgataaggccaagagaacaagtcaattccagtta
 ttagataaaaacaatgaaacgcagtaactatcacttttcagcatcaaagatccagcagatgtgtattactaaaaag
 aaagcagaagttgaattagacatcaatactgctcaacatggaagaagttgaagtctatgaaaacaatcaaaaatt
 gccagtgagactgtatcatatagctctgaccagaagaccatgcctatattcgattcccagttcagatggcacacaa
 gaattgaaaattgttctcactcaaatgatgatggagaagaacaaattatgattatactaaattagatttggctaaa
 cctatttataacgatcctcactgtaaaatcagatacaaatgatgcagtagtaacgaatgatcaatcaagttcagtcgc
 aagtaatcaacaaacacgaatacatctaatcaaaatatacaacgatcaacaatgctaataatcaaccgcagcc
 aacgaccaatgatgacacctgcacaacaaaatcgtaacgaatgcagatcaagcgtcaagccaaccagctc
 atgaaacaaattctaatggaataactaacgataaaacgaatgagtaacgaatcagtcggatgtaataacagatc
 caccagcagatgaatcactacaagatgcaattaaacccggctatcatcgataaagaacatacagctgataattg
 gcgaccaattgatttcaaatgaaaatgataaaggtaagacagttctatcattatgctagtactgtgaaccagca
 actgtcattttcaaaaacaggaccaataattgaattaggtttaaagacagctcaacatggaagaaattgaagttt
 atgaaggtagcaaaaagttaccagtcgaattagatcatatgattctgataaagattatgcctatattcgttcccagat
 ctaatggtacgagagaagttaaattgtgtcatctattgaatatggtgagaacatccatgaagactatgattatcgc
 atggtccttgacagcctattactaataaccagacgactatggtgagaagaacatacaatttcaaaaattattag
 ctccgatcacaaagctaaaacgftagaagacaagttatgaattagaaaaattacaagagaattgccagaa
 aatatagaagcgaatataaaaagaaattagatcaactagagtagagtagctgatcaagttaaatcagcagtg
 cggaaattgaaaatgttacacctacaatgatcaattaacagatttacaagaagcgcattttgtgttttgaagtgaa
 gaaaatagtgagtcagttatggacggctttgtgaacatccattctatacagcaactttaaattggtcaaaaatagtg
 gatgaaaacaaaggatgacagttactggaaagatttaattgtagaaggtaaacggtcactactgttctaaagatcct
 aaaaataattctagaacgctgattttccatatacctgacaaagcagttacaatgcgattgttaaagcgtgtggc
 aaacattggtatgaaggcaatatcatgtcagaattataaatcaggatatcaatacaaaagatgatgatacatcaca
 aaataacacgagtgaaaccgctaaatgtacaaaacaggacaagaaggtaaggtgctgatacagatgtagctgaaa
 atagcagcactgcaacaaatcctaaagatgcgtctgataaagcagatgtgatagaaccagagctgacgtggtaa
 agatgctgataataattgataaagatgtgcaacatgatgttgatcattatccgatatgtcggataataatcactcga
 taaatagattttaaagaaatggatactcaaattgccaaagatactgatagaatgtggataaagatgccgataat
 agcgttggtatgtcatctaatgtcgaactgataaagacttaataaaaataaagacaaagtcatacagctgaatcat
 attgccgataaaaataatcactggaagcagcaagcgtgacgtagtgaacaaaattataataacagaca
 aagttactgacaaaaaacaactgaacatctgcgagtgatattcaaaaactgtagataaaacagtgaaaacaa
 aagaaaaagccggcacaccatcgaaaagaaaacaacttagtcaatctaaaatgctacaaaaactggagaa

20

30

40

【 0 0 6 2 】

【数 8】

acaactcaagccaatcatggtgggcttatatgcggtattaggtatgtagctttattcattcctaaattcagaaaagaat
ctaaataa

KesK1 (8325) (配列番号 6)

LLSIKYNLIGVVNNMNKHHPKLRSFYRSIRKSTLGVASVIVSTLFLITSQHQAQAENT
NTSDKISENQNNNATTTQPPKDTNQTQPATQPANTAKNYPAADESLKDAIKDPALE
NKEHDIGPREQVNFQLLDKNNETQYYHFFSIKDPADVYYTKKKAVELDINTASTW
KKFEVYENNQKLPVRLVSYSPVPEDHAYIRFPVSDGTQELKIVSSTQIDDGEETNY
DYTKLVFAKPIYNDPSLVKSDTNDVVTNDQSSSVASNQTNNTSNQINISTINNAN
NQPPQATTNMSQPAQPKSSTNADQASSQPAHETNSNGTNDKTNESNNQSDVNQ
QYPPADESLQDAIKNPAIIDKEHTADNWRPIDFQMKNDKGERQFYHYASTVEPATV
IFTKTGPIIELGLKTAATWKKFEVYEGDKKLPVELVSYSDKDYAYIRFPVSNGTRE
VKIVSSIEYGENIHEDYDYTLMVFAQPITNNPDDYVDEETYNLQKLLAPYHKAKTLE
RQVYELEKLQEKLPEKYKAEYKKLDQTRVELADQVKSAVTEFENVTPNTDQLTD
LQEAHFVFESEENSESVMDFVEHPFYATLNGQKYVVMKTKDDSYWKDLIVEG
KRVTTVSKDPKNSRTLIFPYIPDKAVYNAIVKVVANIGYEGQYHVRIINQDINTKD
DDTSQNNTSEPLNVQTGQEGKVADTDVAENSSTATNPKDASDKADVIEPESDVVK
DADNNIDKDVQHDVDHLSMDSNHNFDKYDLKEMDTQIAKDTDRNVKDKADNSV
GMSSNVDTKDSNKNKDKVIQLNHIADKNNHTGKAAKLDVVKQNYNNTDKVTDKK
TTEHLPDIHKTVDKTVKTKKEKAGTPSKENKLSQSKMLPKTGETTSSQSWWGLYA
LLGMLALFIPKFRKESK

10

20

KrkN2 (8325) (配列番号 7)

gaggaaaacaacatgacaaaacattatttaaacagtaagatcaatcagaacaacgttca
tcagctatgaaaaagattacaatgggtacagcatctatcatttaggtccctgtatac
ataggcgcagacagccaacaagtcaatcgccaacagaagctcgaacgcaactaataat
caaagcacacaagtttcaagcaacatcacaaccaatfaattccaagtgcaaaaagat
ggctctcagagaagtcacacatggatgactatatgcaacaccctgtaagtaattaa
caaaaataataatattttcaaacctgttaacaatgcatcattctggaagaatac
aaattttacaatgcaacaatcaagaattagcaacaactgtgtaacgataataaaaa
gcggaactagaacaatcaatgttgagttgaacctggatataagagcttaactactaaa
gtacatatgtcgtgccacaaatfaatacaatcatagataactacgcatttgaattt
gaaaaagcaattcctacattagctgacgcagcaaaaccaaacaatgtaaacctgttca
ccaaaaccagctcaacctaaaacacctactgagcaactaaaccagttcaacctaaagt
gaaaagttaacctactgtaactacaacaagcaagttgaagacaatcactctactaaa
gttgaagtactgacacaacaaaagatcaaaactaaaacaaaactgctcatacagftaaa
acagcacaactgctcaagaacaaaataaagtcaaacacctgttaagatgttgcaaca
gcgaaatctgaaagcaacaatcaagctgtaagtataataatcacaacaaactaaca
gttacaaaacataacgaaacgcctaaacaagcatctaaagctaaagaattccaaaaact
ggtttaactcagttgataactttattagcacagttgcctcgcaacactgccccttta
ggtcattatcttattactttcaaaaagaaaagaatctaaataa

30

40

KrkN2 (8325) (配列番号 8)

【 0 0 6 3 】

【数 9】

EENNMTKHYLNSKYQSEQRSSAMKKITMGTAIIILGSLVYIGADSQQVNAATEATN
 ATNNQSTQVSQATSQPINFQVQKDGSSSEKSHMDDYMQHPGKVIKQNNKYFFQTV
 LNNASFWKEYKFYNANNQELATTVVNDNKKADTRTINVAVEPGYKSLTTKVHIVVP
 QINYNHRYTTHLEFEKAIPTLADAAKPNVVKPVQPKPAQPKTPTEQTKPVQPKVEK
 VKPTVTTTTSKVEDNHSTKVVSTDTTKDQTKTQTAHTVKTAQTAQEQNKVQTPVKD
 VATAKSESNNQAVSDNKSQQTNKVTKHNETPKQASKAKELPKTGLTSVDNFISTV
 AFATLALLGSLSLLLFKRKESK

KrK N (8325) (配列番号 9)

10

tatacaattaggagtggttctacaacatgaacaaacagcaaaaagaattaaatcattttattcaattagaaagtcac
 actaggcgtgcatctgtagcaatttagtacacttttattattaatgcaaatggcgaagcacaagcagcagctgaaga
 aacagggtggtacaaatacagaagcacaacaaaaactgaagcagttgcaagtccaacaacaacatctgaaaa
 gctccagaaactaaaccagtagctaattgctgtctcagtagtaataaagaagttgaggcccactctgaaacaaa
 agaagctaaagaagtaagaagtaagccctaaggaaacaaaagaagtaaacagcagcaaaaagccac
 taacaatacatatcctatgttgatcaggaacttagagaagcgattaaaaaccctgcaataaaagacaaagatcata
 ggcaccaaactctgctcaattgatttgaaatgaaaaagaagatggaactcaacagttttatcattatgcaagttc
 tgttaaacctgctagagttatcttactgattcaaaaccagaaattgaattaggattacaatcaggtaattttggagaaa
 attgaagttatgaagggtgacaaaaagttgccaattaaattagtagtatacagatactgttaaagattatgcttacattcg
 ctctctgtatcaaacggaacaaaagctgttaaattgttagttcaacacactcaataacaaagaagaaaaatac
 attacacattaatggaattcgacacaacattataacagtgacagataaattcaaaactgaagaagattataaagctg
 aaaaaattattagcgccatataaaaaagcgaacactagaaagacaagtttgaattaaataaaattcaagataa
 acttctgaaaaattaaaggctgagtagacaagaagaattagaggatacaagaagccttagatgagcaagtgaa
 atcagctattactgaattccaaaatgtacaaccaacaaatgaaaaatgactgattacaagatacaaaaatgtgtt
 tatgaaagtggtgagaataacgaatctatgatggatactttgttaaacaccctattaaaacaggtatgcttaacggcaa
 aaaatataatggcatggaaactactaatgacgattactggaaagatttcatggtggaaggtcaacgtgttagaactata
 agcaaaagatgctaaaaataactagaacaattttcccatatggtgaaggtaaaactctatatgatgctatcgtaa
 agttcacgtaaaaacgattgattatgatggacaataaccatgtcagaatcgttgataaagaagcatttacaagaagcca
 ataccgataaatcaacaaaaagaacaacaagataactcagctaagaaggaagcactccagctacgcctagc
 aaaccaacaccatcacctgttgaaaaagaatcacaacaaacagacagccaaaagatgacaataaacaattac
 caagtggtgaaaaagaaaatgacgcatctagtgagtcaggtaaagacaaaacgcctgtacaaaaccaactaaa
 ggtgaagtagaatcaagtagtacaactccaactaaggtagtatctcagactcaaaatgttgcaaaaccaacaactg
 ctcatcaaaaacaacaaaagatgtgttcaaaactcagcaggttctagcgaagcaaaagatagtgctccattacaa
 aaagcaaacattaaaaacacaaatgatggacacactcaaaagccaaaacaataaaaaatacacaagaaaataaa
 gcaaaaatcattaccacaaactgggaagaatcaataaagatatgacattaccattaatggcattattagcttaagta
 gcatcgttgattcgtattacctagaaaacgtaaaaactaa

20

30

KrK N (8325) (配列番号 10)

YTIRSCFYNNMKQKQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEEETGG
 TNTÉAQPKTEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEAKEVKEV
 KAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHSAPNSRPIDFEMKKKD
 GTQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQSGQFWRKFEVYEGDKLPIKLVSYD
 TVKDYAYIRFSVSNGTKAVKIVSSTHFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEED
 YKAEKLLAPYKKAKTLEKQVYELNKIQDKLPEKLAKEYKKKLEDTKKALDEQVKS
 AITFQNVQPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKYMV

40

【 0 0 6 4 】

【数 1 0】

METTNDYWKDFMVEGQVRVTRISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLYDAIVKVHVKTIDY
 DGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAKKEATPATPSKPTSPVEKESQK
 QDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGKDKTPATKPTKGEVSSSTPTKVVSTTQ
 NVAKPTTASSKTTKDVVQTSAGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNTQE
 NKAKSLPQTGEESNKDMTLPMLALLLSSIVAFVLPKRKN

RkaS (COL) (配列番号 1 1)

ttataaataattacataaaatcaatcatttaataataaggattatgataatattggtgatgacagttaatggagga
 acgaaatgaaagcttattacttaaaacaagtgatggctcgtttgcttttagtgtaatgggattatggcaagctcga
 cgcggtgagcagcatacaccaatgaaagcacatgcagtaacaacgatagacaaagcaacaacagataagca
 acaagtaccgccaacaaggaagcggtcatcattctggcaaaagaagcggcaaccaacgtatcagcatcagcg
 caggaacagctgatgatacaaacagcaaaagtaacatccaacgcacatctaaacaaacatctacagtagttca
 acaaaagtaaacgaaacacgcgacgtagatacaacaagcctcaacacaaaaaccaactcacacagcaac
 gttcaaatatcaaatgctaaaacagcatcacttcaccacgaatggttgcgtaatgcaccacaaacaacaacaca
 taaaattaccatacaaatgatatccatggccgactagccgaagaaaaagggcgtgcatcggtatggctaaattaa
 aacagtaaaagaacaagaaaagcctgatttaagttagacgcaggagacgctccaagggttaccacttcaaa
 ccagtctaaaggtgaagaaatggctaaagcaatgaatgcagtaggtatgatgctatggcagtcggtaacatgat
 ttgactttggatcagatcagttgaaaaagtagaggatgttagactcccgatgtaagtaactaacgtttataagatg
 gaaaacgcgcttaagcctcaacgattgaacaaaaatggattcgttatggaattatgggtgaacgacaccag
 aaacaagacgaaaacaagacctgaaggcattaaaggcgtgaatttagagatccattacaagtgtagcagcg
 gaaatgatcgtatttataagacgtagatacattggttatatcacatttaggaattgatcctcaacaagaaca
 tggcgtgggtattactagtgaaacaattaagtaaaaaatccacaattgaagaaacgtattacagttatgatggtcattc
 acatacagtaactcaaaatggtcaaatfataacaatgatgcattggcacaacagggtacagcacttgcaaatatcg
 taagattacatttaattatcgcaatggagaggtatcgaatattaaaccgtcattgattaatgtaaaagacgtgaaaatgt
 aacaccgaacaagcatttagctgaacaaattaatcaagctgatcaaacatttagagcacaactgcagaggtaat
 tattccaacaataaccattgatttcaagggagaagagatgacgftagaacgcgtgaaacaatttaggaaacgcg
 attgcagatgctatggaagcgtatggcgttaagaattctctaaaaagactgactttgccgtgacaatggtggaggt
 ttcgtcctctatcgaaaaggttaaggtgacacgctatgattaatctcagttaccatttggaatacgttgcgcaa
 attgatgtaaaaggtcagacgctcggacggcttgaacatagtttagggcgaccaacaacacaaaaggacggta
 agacagtgtaacagcgaatggcggttactacatatctctgattcaatccggtttactatgatataaataaacgctc
 gcaaacgaattaatgctattcaaatfataaataaagagacaggtaagttgaaaatattgatttaaacggttatcac
 gtaacgatgaatgactcacagcatcaggtggcgacggatagatgttcggtggtcctagagaagaaggatttca
 ttgatcaagtaactagcaagttatfataaacagctaaacttagctaatgatgatacgacagaaccacaacgtatgta
 taggtaaacagcagtaagtgaacaaccagctaaaggacaacaaggtagcaaggtagtaagtctggtaaagat
 acacaaccaattggtagcgcacaagtgatggatccagcgaacaaaccagctccaggtaaagttgattggtgctag
 cgcatagaggaactgttagtagcgttacagaaggtctggtcgcaaatagaaggagctactgtatcaagcaaga
 gtgggaacaattggctagaatgcagtcctaaaggtagcgcgatgagaaacagttacaaaaactggaacta
 atcaagttcaagcccagaagcgtatggttatttagcaggtataggttaatcgcgactgtacgacgtagaaaag
 ctagctaa

10

20

30

RkaS (COL) (配列番号 1 2)

FINNLHKINHFNIRIMIIYWCMTVNGGNEMKALLLKTSSVWLVLVLLFSVMGLWQVSNAA
 EQHTPMKAHAVTTIDKATTDKQVPPTKEAAHHSKGKAATNVSASAQGTADDTN

40

【 0 0 6 5】

【数 1 1】

SKVTSNAPSNKPSTVSTKVNTRDVTQASTQKPTHATFKLSNAKTASLSPR
MFAANAPQTTTHKILHTNDIHGRLAEEKGRVIGMAKLKTVKEQEKPDMLDAGDAF
QGLPLSNQSKGEEMAKAMNAVGYDAMAVGNHEFDGFDQLKKLEGMLDFPMLS
TNVYKDGKRAFKPSTIVTKNGIRYGIIGVTTPETKTKTRPEGIKGVEFRDPLQSVTA
EMMRYIKDVDTFVVISHLGIDPSTQETWRGDYLVKQLSQNPQLKKRITVIDGHSHT
VLQNGQIYNNDALAQGTALANIGKITFNRYRNGEVSNIKPSLINVKDVENVTPNKAL
AEQINQADQTFRAQTAEVIIPNNTIDFKGERDDVRTRETNLGNADAMEAYGVKN
FSKKTDFAVTNGGGIRASIAKGVTRYDLISVLPFGNTIAQIDVKGSDVWTAFEHSL
GAPTTQKDGKTVLTANGGLLHISDSIRVYYDINKPSGKRINAIQILNKETGKFENIDL
KRVIYHVTMNDFTASGGDGYSMFGGPREEGISLDQVLASYLKTANLAKYDTTEPQR
MLLGKPAVSEQPAKGQQGSKGSKGKDTQPIGDDKVMDBAKKPPAGKVVLLLAH
RGTVSSGTEGSGRTIEGATVSSKSGKQLARMSVPKGSAHEKQLPKTGTNQSSSP
EAMFVLLAGIGLIATVRRRKAS

10

RrkN (8325) (配列番号 1 3)

agtggaaaatggaagaggatgcaaatgagagataagaaaggaccggtaaataaaagagtagatttct
atcaataaattgaataaataatcaataagaaaattacagttggaacagcatctatttaattggctcactaatgtattg
ggaactcaacaagaggcagaagcagctgaaaacaatattgagaatccaactacattaaaagataatgtccaatc
aaaagaagtgaagattgaagaagtaacaaacaaagacactgaccacaggggtgtagaagctaaatctgaagta
actcaaaacaaagacacaatcgaacatgaaccatcagtaaaagctgaagatatacaaaaaaggaggatacac
caaaagaagtagctgatgtgctgaagtcagccgaaatcgctcagtcactacataacgcagagacacctaaggtag
aaaagctcgtctgtgatgaaggctctttgatattacaagagattctaaaaatgtagtgaatctacccaattacaatt
caaggtaaagaacatttgaaggctacggaagtgatatacaaaaaaaccaacagatttaggggtatcagagg
taaccaggttaattgtgtaaatgaaagtaattggttgataggagctttacaattaaaaataaaatagatttagtaag
gattcaattttaaagtagagtggaataaccatcaataaccacaggtgctgatggttgggggtcttatttagt
aaaggaaatgcagaagaatatttaactaatggtggaatccttggggataaaggctggttaaattcaggcggattaa
aattgatactggatacattatacaagttccatggacaaaactgaaaagcaagctggacaagggtatagaggatacg
gagctttgtgaaaaatgacagttctggaattcacaatggttggagaaaatattgataaatcaaaaactaatttttaa
actatgaggacaattcaactaatacatcagatggaaagttcatgggcaacggttaaatgatgtcatcttaactatgtg
ctcaactggtaaatgagagcagaatagctggttaaaacttgggagactcaataacagatttaggttattctaaaaa
tcaggcatataatttctaattacatctagcaaaagatggggccttaataagggaataatgcaaatggctggatgaga
actgactgaaagggtcagagtttactttacaccagaagcgcaaaaaacaataacagaattgaaaaaaaagttg
aagagattccattcaagaaagaacgtaaatattaatccggatttagcaccagggacagaaaaagtaacaagagaa
ggacaaaaagggtgagaagacaataacgacaccaactaaaaaatccattaactggagtaattattagtaaaaggt
gaacaaaaagaagagattcaaaaagatccgattaatgaattaacagaatacggacctgaaacaatagcgccag
gtcatcgagacgaatttgatccgaagttaccaacaggagagaaagagggaagttccaggtaaacagggaattaag
aatccagaaacaggagacgttagtttagaccgcccgtcgatagcgtaacaaaatattggacctgaaaaggagactc
gattgtagaaaaagaagagattccattcgagaagaacgtaaatattaatcctgatttagcaccagggacagaaaa
gtaacaagagaaggacaaaaagggtgagaagacaataacgacgccaacactaaaaaatccattaactggagaa
attattagtaaaaggtgaatcgaaagaagaatcacaagaatccgattaatgaattaacagaatacggaccagaa
acgataacaccaggtcatcgagacgaatttgatccgaagttaccaacaggagagaaagagggaagttccaggtaa
accaggaattaagaatccagaaacaggagatgtagtttagaccaccggctcgatagcgtaacaaaatattggacctgt
aaaaggagactcgattgtagaaaaagaagagattccattcgagaaagaacgtaaatattaatcctgatttagacca
gggacagaaaaagtaacaagagaaggacaaaaagggtgagaagacaataacgacaccaacactaaaaaatc

20

30

40

【 0 0 6 6 】

【数 1 2】

cattaactggagtaattattagtaaaggtgaacccaaaagaagaatcacaaaagatccgattaatgaattaacaga
 atacggaccagaaacgataacaccaggtcatcgagacgaattgatccgaagttaccaacaggagagaaagaa
 gaagttccaggtaaacagggaattaagaatccagaaacaggagacgtagttagaccaccggtcgatagcgtaac
 aaaatatggacctgtaaaaggagactcgattgtagaaaaagaagagattccattcaagaaagaacgtaaattaat
 ccggatttagcaccagggacagaaaaagtaacaagagaaggacaaaaaggtgagaagacaataacgacgcc
 aacactaaaaaatccattaactggagaaattattagtaaaggtgaatcgaaagaagaatcacaaaagatccgat
 taatgaattaacagaatacggaccagaaacgataacaccaggtcatcgagacgaattgatccgaagttaccaac
 aggagagaaagaggaagtccaggtaaacagggaattaagaatccagaaacaggagatgtagttagaccaccg
 gtcgatagcgtaacaaaatattggacctgtaaaaggagactcgattgtagaaaaagaagagattccattcgagaaa
 gaacgtaaatattaatcctgatttagcaccagggacagaaaaagtaacaagagaaggacaaaaaggtgagaaga
 caataacgacgccaacactaaaaaatccattaactggagaaattattagtaaaggtgaatcgaaagaagaatca
 caaaagatccgattaatgaattaacagaatacggaccagaaacgataacaccaggtcatcgagacgaattgatc
 cgaagttaccaacaggagagaaagaggaagttccaggtaaacagggaattaagaatccagaaacaggagacg
 tagttagaccaccggtcgatagcgtaacaaaatattggacctgtaaaaggagactcgattgtagaaaaagaagaa
 ttccattcaagaaagaacgtaaatattaatcctgatttagcaccagggacagaaaaagtaacaagagaaggacaaa
 aaggtgagaagacaataacgacgccaacactaaaaaatccattaactggagaaattattagtaaaggtgaatcga
 aagaagaatcacaaaagatccgattaatgaattaacagaatacggaccagaaacgataacaccaggtcatcg
 agacgaattgatccgaagttaccaacaggagagaaagaggaagttccaggtaaacagggaattaagaatccag
 aaacaggagatgtagttagaccaccggtcgatagcgtaacaaaatattggacctgtaaaaggagactcgattgtag
 aaaaagaagaattccattcgagaaagaacgtaaatattaatcctgatttagcaccagggacagaaaaagtaacaa
 gagaaggacaaaaaggtgagaagacaataacgacgccaacactaaaaaatccattaactggagaaattattagt
 aaaggtgaatcgaaagaagaatcacaaaagatccgattaatgaattaacagaatacggaccagaaacgataa
 caccaggtcatcgagacgaattgatccgaagttaccaacaggagagaaagaggaagttccaggtaaacaggga
 atfaagaatccagaaacaggagatgtagttagaccaccggtcgatagcgtaacaaaatattggacctgtaaaagga
 gactcgattgtagaaaaagaagaattccattcgagaaagaacgtaaatattaatcctgatttagcaccagggacag
 aaaaagtaacaagagaaggacaaaaaggtgagaagacaataacgacgccaacactaaaaatccattaactg
 gagaaattattagtaaaggtgaatcgaaagaagaatcacaaaagatccagttatgaattaacagaattcgggtg
 cgagaaaataccgcaaggtcataaagatattcttgatccaaactaccaacagatcaaacggaaaaagtagcagg
 taaaccaggaatcaagaatccagacacaggaaaagtgatcgaagagccagtgatgtgattaaacacggga
 ccaaaaaacgggtacaccagaaacaaaaacagtagagataccggttgaaacaaaaacgtgagtttaacccaaatt
 acaacctggtgaagagcgagtgaaacaagaaggacaaccaggaagtaagacaatcacacaccaatcacagt
 gaaccattaacaggtgaaaaagttggcgagggtaaccaacagaagagatcacaaaacaaccagtagataa
 gatttagagttcgggtgagagaaacaaaagatccaaaaggacctgaaaaccagagagaagccgagcagacc
 aactcatccaagtgcccagtaaatcctaacaatccaggattatcgaaagacagagcaaaaaccaaattggcccagt
 tcattcaatggataaaaatgataaagttaaaaaatctaaaattgctaagaatcagtagctaatcaagagaaaaaa
 cgagcagaattacaaaaaacaggttagaaagcacgcaaaaaggttgatcttagtagtataattggaattgctgga
 ttaatgtattggctcgtagaagaagaattaa

10

20

30

RrK N (8325) (配列番号 1 4)

SGKYGKRSMQMRDKKGPVNRVDFLSNKLNKYSIRKFTVGTASILIGSLMYLGTQ
 QEAEAAENNIENPTTLKDNVQSKEVKIEEVTNKDTAPQGVEAKSEVTSNKDTIEHE
 PSVKAEDISKKEDTPKEVADVAEVQPKSSVTHNAETPKVRKARSVDEGSFDITRDS
 KNVVESTPITIQQKEHFEGYGSVDIQKPTDLGVSEVTRFNVGNESNGLIGALQLK
 NKIDFSKDFNFKVRVANHHQSNTTGADGWGFLFSKGNAAEYLTNGGILGDKGLVN
 SGGFKIDTGYIYTSSMDKTEKQAGQGYRGYGAFVKNDSGNSQMVGENIDKSKT

40

【 0 0 6 7 】

【数 1 3】

NFLNYADÑSTNTSDGKFHGRQLNDVILTYVASTGKMRAEYAGKTWETSITDLGLS
 KNQAYNFLTSSQRWGLNQQGINANGWMRTDLKGSEFTFTPEAPKTITELEKKVEEI
 PFKKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEKTITPTLNPLTGVIIKSGEPKEEITKDPI
 NELTEYGPETIAPGHRDEFDPKLPTGEKEEVPGKPGIKNPETGDVVRPPVDSVTKY
 GPVKGDSIVEKEEIPFEKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEKTITPTLNPLTGEII
 SKGESKEEITKDPINELTEYGPETITPGHRDEFDPKLPTGEKEEVPGKPGIKNPETG
 DVVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEEIPFEKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEK
 TITPTLNPLTGVIIKSGEPKEEITKDPINELTEYGPETITPGHRDEFDPKLPTGEKE
 EVPGKPGIKNPETGDVVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEEIPFKKERKFNPDLAPG
 TEKVTREGQKGEKTITPTLNPLTGEIISKGESKEEITKDPINELTEYGPETITPGH
 RDEFDPKLPTGEKEEVPGKPGIKNPETGDVVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEEIP
 FEKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEKTITPTLNPLTGEIISKGESKEEITKDPIN
 ELTEYGPETITPGHRDEFDPKLPTGEKEEVPGKPGIKNPETGDVVRPPVDSVTKYG
 PVKGDSIVEKEEIPFKKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEKTITPTLNPLTGEIIS
 KGESKEEITKDPINELTEYGPETITPGHRDEFDPKLPTGEKEEVPGKPGIKNPETGD
 VVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEEIPFEKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEKTI
 TPTLNPLTGEIISKGESKEEITKDPINELTEYGPETITPGHRDEFDPKLPTGEKEE
 VPGKPGIKNPETGDVVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEEIPFEKERKFNPDLAPGT
 EKVTREGQKGEKTITPTLNPLTGEIISKGESKEEITKDPVNELTEFGGEKIPQGH
 KDIFDPNLPTDQTEKVPKPGIKNPDTGKVIIEPVDVVIKHGPKTGTPTETKVEIPF
 ETKREFNPKLQPGEEVKQEGQPGSKTITPITVNPLTGEKVGEGQPTEEITKQPV
 DKIVEFGGEKPKDPKGPENPEKPSRPTHPSGPVNPNNPGLSKDRAKPNPVPVHSM
 DKNDKVKKSKIAKESVANQEKKRAELPKTGLESTQKGLIFSSIIGIAGLMLLARRRK
 N

10

20

KnkA (8325) (配列番号 1 5)

ggaaggagatgtgtatggcctaataatcgaggaaaccgtttcaattatgtaaagttatcggttgcacaatgatggc
 gacaagtatcatttaacgaatatctgccgtacgatgcccaagctgcatctgaaaaggataactgaaattacaaaaga
 gatattatctaagcaagatttattagacaaagttgacaaggcaattcgtaaaattgagcaattaaacagttatcggctt
 catctaaagaacattataaagcacaaactaaatgaagcgaacacagcatcgcaaatagatgaaatcataaacga
 gctaataagttggatagcaaaagacaataaaagttctcactgaaatgaacggtaaaagtgatagacagtaaatt
 agatcaattgctaaagatttaaatgaggtttctcaaatgtgataggggtcaacaaagtgaggcgaggacgatctaat
 gcaatgaaaaatgatatgcacaaacggctacaacaaacatggagaaaaagatgataaaaaatgatgaagca
 atggtaaataaggcgttagaagacctagaccattgaaatcagcaaaatacacaacaaatcgaaagatgatcgaaagat
 acatcggaagatccagcagtgctacacagataataatcatgaagtagctaaaaacgcaaaataatgatggttctg
 gacatgttgtgtaataaaattcctttcaaatgaagagaatcaaagccatagtaatcgactcactgataaattacaagg
 aagcgataaaattaatcatgctatgattgaaaaattagctaaaagtaatgcctcaacgcaacattacacatatataa
 actgaatacgttacaatctttagatcaacgtattgcaaatcgaacttctaaaaatcaaaaatcagacttaattgagc
 gaagtaataagacgaaagagcgtataaaaagtcaacgaaatattttggaagaactgcacgtactgatgata
 aaaagtatgtacacaaagcattttagaaagtatttaataaagacgaggcagttaaaattctaaaagataatcgt
 gttgatggtaaaacagatcaacaaattgcagatcaaaactcgtcatattgatcaattatctctgacaacgagtgatg
 atttattaacgtcattgattgatcaatcacaagataagtcgctattgatttctcaaaatttacaacgaaattaggaaaag
 ctgaagcagataaattggctaagattggacgaataaaggattatcaaatcgccaaatcggttgaccaattgaagaa
 acattttgatcaactggcgacagctctcagatgataattaaaagcaattttgaataatgccaaagataaaaaaca
 agcaattgaaacgatttttagcaacacgtatagaaagacaaaaggcaaaattactggcagattaattactaaaata

30

40

【 0 0 6 8 】

【数 1 4】

gaaacagatcaaaataaaaatttttaatttagttaaatcggcattgaatggtaaagcggatgatttattgaattacaaaa
 gagactcaatcaaacgaaaaagatatagattatatttatcaccaatagtaaactcgccaagttactagatcgattg
 aataaaaaatgggaaaacgacagattaaataagtttagcaaatfaatgaatcaaggatcagatttattagacagatt
 ccagatataccacaccaaagccagaaaagacgftaacacttggtaaaggtaatggattgtaagtgattattaaa
 tgctgatggaatgtatctttgctaaagcgggggaaacgataaaagaacattggtgcccgatatctgtaattggtg
 caatgggtgactaatgatttggtatcacgacgcaataagtgaataaaagcataa

KnkA (8325) (配列番号 1 6)

GRSMLMAKYRGKPFQLYVKLSCSTMMATSIIILTNILPYDAQAASEKDTEITKEILSK
 QDLLDKVDKAIKQIEQLKQLSASSKEHYKAQLNEAKTASQIDEIIKRANELDSKDNK
 SSHEMNGQSDIDSKLDQLKDLNEVSSNVDRGQQSGEDDLNAMKNDMSQTATT
 KHGEKDDKNDEAMVNKALEDLDHLNQQIHKSKDASKDTSSEDPVSTTDNNHEVA
 KTPNNDGSGHVVLNKFLSNEENQSHSNRLTDKLGSDKINHAMIEKLAKSNASTQ
 HYTYHKLNTLQSLDQRIANTQLPKNQKSDLMSEVNKTKKERIKSQRNIIIEELARTDD
 KKYATQSILESIFNKDEAVKILKDIRVDGKTDDQIADQITRHHIDQLSLTTSDDLTSID
 QSQDKSLLISQILQTKLGKAEADKLAKDWTNKGLSNRQIVDQLKKHFASTGDTSSD
 DILKAILNNAKDKKQAIETILATRIERQKAKLLADLITKIETDQNKIFNLVKSALNGKAD
 DLLNLQKRLNQTKKIDIDYILSPIVNRPSLLDRLNKNKGTDLNKLANLMNQGSDDL
 SIPDIPTPKPEKTLTLGKGNGLLSGLLNADGNVSLPKAGETIKEHWLPISVIVGAMG
 VLMIWLSRRNKLKKA

10

20

【0069】

〔一次構造分析：〕

バイオインフォマティクスのアプローチを、一次構造および機能予測のために使用した(図1)。蛋白質 R r k N および D s q A は、前述の M S C R A M M と類似した構造組織 (structural organization) を有した。R r k N は、S . a u r e u s および S . e p i d e r m i d i s それぞれの P l s / A a p 蛋白質と構造において類似していた。それは、P l s および A a p と 40% 同一性を示す 200 残基ドメインをその N 末端に含む。該蛋白質の C 末端は、主に、128 残基繰り返しドメイン (repeat domain) (これは、株ごとに繰り返し数が増加する) から構成されている。これらの繰り返しはまた、P l s および A a p に存在している。推定 s a r 相同体ならびに f n b p A および f n b p B は、該ゲノムにおいて R r k N から直接上流に位置している。

30

【0070】

D s q A は、蛋白質の S d r ファミリーと構造組織において類似している。それは、典型的な A ドメイン、続いて T Y Y F T D V K モチーフ (これは、S d r 蛋白質の全てにおいて見られる保存された T Y T F T V Y V D モチーフに類似している) を含んでいる。このモチーフの機能は、まだ、決定されなければならない。2つの 88 残基繰り返しドメインが、該蛋白質の中央に存在し、これに、S d r 蛋白質において見られる S D - 繰り返しモチーフと類似した C - 末端 S X - 繰り返しモチーフが続く。この繰り返しのサイズは、株ごとに変化する。D s q A は、該ゲノムにおいて s e c Y および s e c A に隣接している。D s q A 相同体 (> 90% 同一) はまた、S . e p i d e r m i d i s において見られる。

40

【0071】

K n k A は、その配列に繰り返しドメインを含まない。二次構造予測分析は、この蛋白質が、主としてアルファ - ヘリックスから構成されることを示す。

【0072】

R k a S は、その配列に繰り返しドメインを含まない。B L A S T 分析は、それが、5' ヌクレオチダーゼ U D P - 糖ヒドロラーゼと類似していることを示す。R k a S をコードする遺伝子は、o r f X (m e c エレメントの挿入部位) から直接上流に位置する。

【0073】

50

K e s Kは、38%同一である2つの140残基繰り返しドメインを該蛋白質のN末端に含む。ヒドロパシープロット分析 (hydropathy plot analysis) (Kyte and Doolittle, 1982) は、該蛋白質の中央に大きな親水性ドメインが存在することを示す (残基500 - 560)。

【0074】

E k e Sは、38%同一である2つの300残基繰り返しドメインを該蛋白質の中央に含む。ブラスト分析 (Blast analysis) は、該蛋白質のN末端 (残基1 - 1268、両方の繰り返しを有する) がF m t B [17タンDEM繰り返し (tandem repeats) を有するL P X T G蛋白質] と49%同一であることを示す。f m t Bの不活性化がメチシリン耐性を撤廃する (abolishes) ために、F m t Bは、メチシリン耐性に間接的に関与している

10

【0075】

K r k NおよびK r k N 2は、ゲノムにおいて互いに隣接している。

【0076】

〔発現分析：〕

蛋白質データベースに配列相同性が不足しているために、これらの蛋白質の各々についての推定機能を予測することができず、そして従って、分子のアプローチを行った。o r f sの4つの特有の領域を、Q i a g e n p Q E - 30発現系を使用して、組換えh i s - タグ融合蛋白質 (recombinant his-tagged fusion proteins) として、E . c o l i において発現させた。図2は、精製N末端h i s タグ融合蛋白質のクマシー染色された (Coomassie stained) S D S - P A G Eゲルを示す。組換え蛋白質R r k N 1、D s q A 2、K e s K 1およびK n k Aを使用し、ウサギにおいて抗体を産生させた。S . a u r e u s 細胞壁抽出物のウェスタンブロッティング分析は、K e s K、K n k AおよびD s q Aが発現されそして細胞壁結合されている (cell wall-associated) ことを示した (図3)。株e M R S A - 16は、k n k A遺伝子を欠いているために、k n k A陰性株を示す。65k D aの免疫反応性バンドは、株8325 - 4の指数増殖期および定常期の両方の細胞由来の細胞壁分画と反応する (図3、B)。株e M R S A - 16においてこのバンドが存在しないことは、それがk n k Aの遺伝子産物を示すことを示唆している。

20

30

【0077】

抗 - K e s K抗体を使用しての株8325 - 4の細胞壁分画のウェスタンイムノブロッティングは、指数増殖期および定常期の両方の培養物において150k D a免疫反応性バンドを同定した。発現プラスミド (p K S 80) において全長K e s Kを発現するL a c t o c o c c u s l a c t i s の細胞壁分画から放出された同様なサイズの免疫反応性蛋白質は、150k D aバンドがk e s K遺伝子産物を示すことを示唆する (データを示していない)。S . a u r e u s におけるk e s Kノックアウト突然変異体が、細胞壁放出されるK e s K蛋白質のサイズを確認するために必要とされるだろう。

【0078】

抗 - D s q A抗体を使用してのS . a u r e u s 株M S S Aおよびe M R S A - 16の細胞壁分画のウェスタンイムノブロッティングは、130k D a免疫反応性バンドを同定した。発現レベルは、定常期細胞においてより高い。

40

【0079】

〔L a c t o c o c c u s l a c t i s における異種発現：〕

L a c t o c o c c u s l a c t i s (L . l a c t i s) におけるS . a u r e u s 表面蛋白質の異種発現は、蛋白質機能を研究するためのツールとして既に使用されている (Sinha et al., 2000)。この研究において、この代替系 (surrogate system) は、L . l a c t i s の表面において、インシリコ予測された (in silico-predicted) M S C R A M M の各々を発現させて、機能を探るために使用される。K e s KおよびK n k Aは、L . l a c t i s へクローン化され、そしてドットブロッティング (dot blotting) に

50

よって表面発現されることが示された(図4)。交差反応は、ネガティブコントロール(挿入物(insert)を含まないpKS80プラスミド)を用いて観察されず、これが特異的反応であることを示す。pKS-KnkAおよびpKS-KesKを有する*Lactococcus lactis*の細胞壁およびプロトプラスト分画を、リゾチームおよびムタノリシン(mutanolysin)を用いての細胞の消化によって作製し、そしてそれぞれ、抗-KnkAおよび抗-KesK抗体を使用してのウェスタンブロットング研究において使用した。*S. aureus*において観察されたものとは異なり、KnkAは、*L. lactis*の細胞壁分画において検出されなかったが、プロトプラスト分画と結合されることが判った。KnkAの固着モチーフ(anchoring motif)は、それがスレオニンの代わりにアラニン残基を含有する(即ち、LPKAG)という点で、コンセンサスLPXTG配列とは異なる(表1)。S. aureusは2つのソルターゼ(sortase)遺伝子、srtAおよびsrtBを含むことが、最近発表された(Pallen, 2001)。LPXTGモチーフのこの変異形態は第二ソルターゼ遺伝子(これは、*L. lactis*には存在しない)によって処理されることが可能である。これはまた、細胞壁ソーティングシグナル(cell wall sorting signal)は切断されていなかったため、プロトプラスト分画において観察されたKnkA蛋白質のサイズの僅かな増加を説明する。

10

【0080】

KesKは、*L. lactis*の細胞壁分画において検出されたが、*S. aureus*の細胞壁から放出されたKesK蛋白質よりも少ない分子量で移動した。*L. lactis*の表面において発現されるMSCRAMMの大部分は、細胞壁抽出手順の間に、蛋白質分解の傾向がある(Louise O'Brien, personal communication)。従って、*L. lactis*の表面から放出されたKesK蛋白質がKesKの先を切り取った形態(truncated form)を示すことが可能である。リゾチームおよびムタノリシンでのより短い消化時間が、蛋白質分解の程度を制限することが示された。

20

【0081】

[インビボにおけるインシリコ予測されるMSCRAMMの発現:]

*S. aureus*感染から回復した33患者からの回復期(convalescent-phase)血清を、ELISAアッセイにおいて精製N末端hisタグ融合蛋白質(purified N-terminal his-tag fusion proteins)を認識するそれらの能力を試験した。子供および健康な血液ドナーからのプールした血清を、ネガティブコントロールとして使用した。陽性反応は、該ネガティブコントロールの値の二倍に等しいか又はそれ以上の値の場合に採用した。図5A~5Dは、全ての蛋白質が、患者の27~42%によって認識されたことを示し、これらの蛋白質がインビボで発現されそして宿主の感染の間に免疫原性であることを示す。

30

【0082】

[参考文献:]

【0083】

【表 5】

Komatsuzawa, H., Ohta, K., Sugai, M., Fujiwara, T., Glanzmann, P., Berger-Bachi, B., Suginaka, H. (2000) Tn551-mediated insertional inactivation of the *fntB* gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 421-31.

Sinha, B., Francois, P., Que, Y.A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K.H., Peters, G., Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells.

Infect. Immun. **68**: 6871-6878.

Pallen, M.J., Lam, A.C., Antonio, M., Dunbar, K. (2000) An embarrassment of sortases - a richness of substrates? *Trends. Microbiol.* **9**: 97-101

10

【 0 0 8 4 】

20

〔実施例 2 : *S. Aureus* およびコアグラーゼ陰性ブドウ球菌からの交差反応性蛋白質の単離および配列決定〕

S. epidermidis は、*S. aureus* MSCRAMM (登録商標) 蛋白質と構造的に関連する表面蛋白質を含有することが、最近示された (US 09/386,962)。*S. aureus* 由来の 1 つの蛋白質は、それが *S. epidermidis* におけるものに近い相同体を有するので、特に興味深い。該蛋白質は、DsqA または SasA (*S. aureus*) ならびに DgsK (*S. epidermidis*) と呼ばれる。それらは、約 500 アミノ酸残基の典型的な "A" ドメイン、続いて 88 残基の 2 つの B 繰り返し (これらは、~40% 同一である)、および特有の SXSXジペプチド繰り返し (これは、株に依存して長さが変化し得る) によって特徴付けられる。*S. aureus* DsqA / SasA の A ドメイン内に、*S. aureus* 蛋白質 RrkN、Pls および *S. epidermidis* 蛋白質 Aap の領域 A 内の類似のサイズのドメインとの ~40% 同一性を有する 180 残基領域が含まれる。DsqA / SasA および DgsK 蛋白質の A 領域は、アミノ酸レベルで 46% 同一であり、B 繰り返しは 50% 同一である。*S. aureus* およびコアグラーゼ陰性ブドウ球菌蛋白質の両方を認識する、ワクチン、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む、能動および受動免疫化戦略は、本発明の主題である。

30

【 0 0 8 5 】

コアグラーゼ陰性ブドウ球菌および *S. aureus* と交差反応する抗体の具体例。

【 0 0 8 6 】

40

【数 1 5】

コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 D g s K A ドメイン：
アミノ酸配列（配列番号 1 7）

ASETPITSEISSNSETVANQNSTTIKNSQKETVNSTSLESNHSNSTNKQMSSEVTN
TAQSSEKAGISQQSSETSNQSSKLNTYASTDHVESTTINNDNTAQQDQNKSSNVT
SKSTQSNSTSSSEKNISSNLTQSIETKATDSLATSEARTSTNQISNLTSTSTSNQSSP
TSFANLRTFSRFTVLNTMAAPTSTTTTSSLTNSVSVVVKDNFNEHMNLSGSATY
DPKTGIATLTPDAYSQKGAISLNLRLDSNRSFRFIGKVN LGNRYEGYSPDGVAGGD
GIGFAFSPGPLGQIGKEGAAVGIGGLNNAFGFKLDTYHNTSTPRSDAKAKADPRN
VGGGGAFGAFVSTDRNGMATTEESTA AKLNVQPTDNSFQDFVIDYNGDTKVM TV
TYAGQTFTRNLTDWIKNSGGTTFSLSMTASTGGAKNLQQVQFGTFEYTESAVAKV
RYVDANTGKDIIPPKTIAGEVDGTVNIDKQLNFKNLGYSYVGT DALKAPNYTETSG
TPTLKL TNSSQTVIYKFKDVQ

10

S . a u r e u s S a s A A ドメイン：
アミノ酸配列（配列番号 1 8）

ASDAPLTSELNTQSETVGNQNSTTIEASTSTADSTSVTKNSSSVQTSNSDTV SSEK
SEKVTSTTNSTSNQQEKLSTSESTSSKNNTSSSDTKSVASTSSTEQPINTSTNQS
TASNNTSQSTTPSSVNLNKTSTTSTSTAPVKLR TFSRLAMSTFASAATTTAVTANTI
TVNKDNLKQYMTTSGNATYDQSTGIVTLTQDAYSQKGAITLGTRIDSNKSFHFSGK
VNLGNKYEGHNGGGD GIGFAFSPGVLGETGLNGAAVGIGGLSNAFGFKLDTYHNT
SKPNSAAKANADPSNVAGGGAFGAFVTTDSYGVATTY TSSSTADNA AKLNVQPT
NNTFQDFDINYNGDTKVM TVKYAGQ TWTRNISDWIAKSGTTNFSLSMTASTGGAT
NLQQVQFGTFEYTESAVTQVRYVDVTTGKDIIPPKTYSGNVDQVVTIDNQQSALTA
KGYNYTSVDSSYASTYNDTNKTVKMTNAGQSVTYFFTDVW

20

【 0 0 8 7】

A a p 蛋白質およびそれをコードする DNA の全配列を（A ドメインの存在を示しながら）、以下に示す：

【 0 0 8 8】

【数 1 6】

S. e p i d e r m i d i s A a p 蛋白質 (Aドメインに下線) (配列番号 19)

MGKRRQGPINKKVDLFPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQ
VDPITQANQNDSSERSLENTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPQSEPTKA
EEGGNAEAAQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKTEEGSNV
KAAQSEPTKAEEGSNAEAPQSEPTKTEEGSNAKAAQSEPTKAEEGGNAEAAQSE
PTKTEEGSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKTEEGGNAEAPNVPTIKANS
NDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVSKNEELQSSQPNTDSKIEPTTSEPVNLNYSS
PFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIESNPTDLNATNLTR
YNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDNIRVANNRQSNTTGADGWGFMFSK
KDGDDFLKNGGILREKGTSAAGFRIDTGYNNDPLDKIQKQAGQGYRGYGTQVFK
NDSQGNTSKVGSSTPSTDFLNYADNTTNDLDGKFGQKLNNVNLKYNASNQFTT
ATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYASGVMRADLDGATL
 TYTPKAVDGDPIISTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPGIETTTTPTVNP
 TGEKVGEGETEKITKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPG
 VKNPDTGEVTPPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFNPDLKPGEERVKQ
 KGEPGKTITPTTKNPLTGEKVGEGETEKITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEFD
 PNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVTPPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKK
 REFNPDLKPGEERVKQKGEPGKTITPTTKNPLTGEKVGEGETEKITKQPVDEI
 VHYGGEQIPQGHKDEFDPNAPVDSKTEVPGKPGVKNPDTGEVTPPVDDVTKYG
 PVDGDSITSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPGKTITPTTKNPLTGEKV
 GEGKSTEKVTKQPVDEIVEYGPTKAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGTPAEPGKPA
 EPGTPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGTPAEPGTPAEPGKPAEPGTPA
 EPGKPAEPGTPAEPGKPAESGKPVPGTPAQSGAPEQPNRSMHSTDNKNQLPD
 TGENRQANEGTLVGSLLAIVGSLFIFGRRKKGNEK

10

20

30

S. e p i d e r m i d i s a a p DNA (配列番号 20)

atggcaaac gtagacaagg tcctattaat aaaaaagtgg

【0 0 8 9】

40

【 数 1 7 】

atttttacc taacaaatta aacaagtatt ctataagaaa attcactgtt ggtacggcct
 caatattact tggttcgaca cttatftttg gaagtagtag ccatgaagcg aaagctgcag
 aagaaaaaca agttgatcca attacacaag ctaatcaaaa tgatagtagt gaaagatcac
 ttgaaaacac aatcaacct actgtaaaca atgaagcacc acagatgtct tctacattgc
 aagcagaaga aggaagcaat gcagaagcac ctcaatctga gccaacgaag gcagaagaag
 gaggcaatgc agaagcagct caatctgagc caacgaaggc agaagaagga ggcaatgcag
 aagcacctca atctgagcca acgaaggcag aagaaggagg caatgcagaa gcagctcaat
 ctgagccaac gaagacagaa gaaggaagca acgtaaaagc agctcaatct gagccaacga
 aggcagaaga aggaagcaat gcagaagcac ctcaatctga gccaacgaag acagaagaag
 gaagcaacgc aaaagcagct caatctgagc caacgaaggc agaagaagga ggcaatgcag
 aagcagctca atctgagcca acgaagacag aagaaggaag caatgcagaa gcacctcaat
 ctgagccaac gaaggcagaa gaaggaggca atgcagaagc acctcaatct gagccaacga
 agacagaaga aggaggcaat gcagaagcac cgaatgttcc aactatcaaa gctaattcag
 ataatgatac acaaacacaa tttcagaag ccctacaag aatgaccta gctagaaaag
 aagatatccc tgctgttct aaaaacgagg aattacaatc atcacaacca aacactgaca
 gtaaaaataga acctacaact tcagaacctg tgaattaaa ttatagtct cggttatgt
 ccttattaag catgcctgct gatagtcat ccaataacac taaaaatata atagatatac
 cgccaactac ggtaaaggt agagataatt acgatttita cggtagagta gatatcgaaa
 gtaatcctac agatttaaat gcgacaat taacgagata taattatgga cagccactg
 gtacaacaac agctggtgca gttcaattta aaaatcaagt tagttttagt aaagatttgc
 actttaacat tagagtagca aacaatcgtc aaagtaatac aactggtgca gatggttggg
 gctttatgtt cagcaagaaa gatggggatg atttctaaa aaacggtggt atcttacgtg
 aaaaaggtag acctagtgca gctggttca gaattgatac aggatattat aataacgac
 cattagataa aatacagaaa caagctggtc aaggctatag aggtatggg acatttggta
 aaaatgactc ccaaggtaat acttctaaag taggatcagg tactccatca acagatttct
 ttaactacgc agataatact actaatgatt tagatggtaa atccatggt caaaaattaa
 ataatgtaa ttgaaatat aatgctcaa atcaaactt tacagctact tatgctggta
 aaactggac ggctacgta tctgaattag gattgagtc aactgatagt tacaatttt
 tagttacatc aagtcaatat ggaaatggta atagtgttac atacgcaagt ggcgttatga
 gagctgattt agatgggtgca acattgacat acactcctaa agcagtcgat ggagatccaa

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

【 数 1 8 】

ttatatcaac taaggaaata ccatttaata agaaacgtga atttgatcca aacttagccc
 caggfacaga aaaagtagtc caaaaaggtg aaccaggaat tgaacaaca acaacaccaa
 cttatgtcaa tcctaataca ggagaaaaag ttggcgaagg tgaaccaaca gaaaaataa
 caaaacaacc agtggatgaa atcgffcatt atggtggcga agaatcaag ccaggccata
 aggatgaatt tgatccaaat gcaccgaaag gtagtcaaac aacgcaacca ggtaagccgg
 gggftaaaaa tctgataca ggcaagtag ttactccacc tgtggatgat gtgacaaat
 atggtccagt tgatggagat ccgatcacgt caacggaaga aattccattc gacaagaaac
 gtgaattcaa tctgattta aaaccaggtg aagagcgtgt taaacaaaaa ggtgaaccag
 gaacaaaaac aattacaaca ccaacaacta agaaccatt aacaggggaa aaagtggcg
 aaggatgaacc aacagaaaaa ataacaaaac aaccagtaga tgaatcaca gaatatgggtg
 gcgaagaaat caagccaggc cataaggatg aattgatcc aatgcaccg aaaggtagcc
 aagaggacgt tccaggtaaa ccaggagtta aaaaccctgg aacaggcgaa gtagtcacac
 caccagtgga tgatgtgaca aaatatgtc cagttgatgg agatccgatc acgtcaacgg
 aagaaatcc atcgacaag aaactgaaat tcaatcctga ttfaaaacca ggtgaagagc
 gcgtfaaaca gaaaggtgaa ccaggaacaa aaacaattac aacgccaaca actaagaacc
 cattaacagg agaaaaagtt ggcaaggtg aaccaacaga aaaaataaca aaacaaccag
 tggatgagat tgttcattat ggtggtgaac aaataccaca aggtcataaa gatgaattg
 atccaatgc acctgtagat agtaaaactg aagtccagg taaaccagga gftaaaaatc
 ctgatacagg tgaagttgt accccaccag tggatgatgt gacaaaatat ggtccagttg
 atggagattc gattacgtca acggaagaaa ttccgtttga taaaaaacgc gaattgatc
 caaacttagc gccaggtaga gagaaagtcg ttcaaaaagg tgaaccagga acaaaaacaa
 ttacaacgcc aacaactaag aaccattaa caggagaaaa agttggcgaa ggtaaatcaa
 cagaaaaagt cactaaacaa cctgttgacg aaattgtga gtaggtcca acaaaagcag
 aaccaggtaa accagcggaa ccaggtaaac cagcggaaacc aggtaaacca gcggaaccag
 gtacgccagc agaaccaggt aaaccagcgg aaccaggtac gccagcagaa ccaggtaaac
 cagcggaaacc aggtaaacca gcggaaccag gtaaaccagc ggaaccaggt aaaccagcgg
 aaccaggtac gccagcagaa ccaggtagc cagcagaacc aggtaaacca gcggaaccag
 gtacgccagc agaaccaggt aaaccagcgg aaccaggtac gccagcagaa ccaggtaaac
 cagcggaaatc aggtaaacca gtggaaccag gtacgccagc acaatcaggt gcaccagaac
 aaccaaatag atcaatgcat tcaacagata ataaaaatca attacctgat acagggtgaaa

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

【数 19】

atcgtcaagc taatgagga actttagtcg gatctctatt agcaattgfc ggatcattgt
 tcatattgg tcgtcgtaaa aaaggaatg aaaaataatt tcatataaaa actttctgcc
 attaa

S. e p i d e r m i d i s A a p由来のAドメイン (アミノ酸 55-600)
 (配列番号 21)

⁵⁵EKQVDPITQANQNDSSERSLENTNQPTVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPQSE
 PTKAEEGGNAEAAQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAAQSEPTKTEE 10
 GSNVCAAQSEPTKAEEGSNAEAPQSEPTKTEEGSNAKAAQSEPTKAEEGGNAEA
 AQSEPTKTEEGSNAEAPQSEPTKAEEGGNAEAPQSEPTKTEEGGNAEAPNVPTIK
 ANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVSKNEELQSSQPNTDSKIEPTTSEPVNL
 NYSSPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIESNPTDLNAT
 NLTRYNYGQPPGTTTAGAVQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNTTGADGWGF
 MFSKKDGDDFLKNGGILREKGTPSAAGFRIDTGYNNNDPLDKIQKQAGQGYRGYG
 TFVKND SQNTSKVSGTPTDFLNYADNTTNDLDGKFHGQKLNNVNLKYNASN 20
 QTFTATYAGKTWTATLSELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNGNSGTYASGVMRADLD
 GA⁶⁰⁰

【0092】

〔蛋白質産生および精製〕

PCRを使用して、DgsKまたはSasAのAドメインを、上記の配列から増幅させ、そしてE. coli 発現ベクターPQE-30 (Qiagen) [これは、6つのヒスチジン残基を含む組換え融合蛋白質の発現を可能にする]へサブクローン化した。引き続いて、このベクターをE. coli 株ATCC 55151へ形質転換し、0.7の光学密度(OD₆₀₀)まで15リットル発酵槽において増殖させ、そして4時間0.2 mMイソプロピル-1-ベータ-Dガラクトシド(IPTG)で誘導した。細胞を、AG Technologies中空系アッセンプリ(細孔サイズ(pore size)0.45 μm)を使用して収獲し、そして細胞ペーストを-80 °Cで凍結させた。細胞を、1100 psiでthe French Pressを通過させる2回パスを使用して1×PBS(10 mL緩衝液/1 g細胞ペースト)において溶解させた。溶解した細胞を、30分間17,000 rpmでスピンドウンさせて(spun down)、細胞残骸を除去した。上清みを、0.1 M NiCl₂を充填させた5-mL HiTrap Chelating (Pharmacia)カラムに通過させた。ローディングした(loading)後、カラムを、10 mM Tris(pH 8.0)、100 mM NaCl(緩衝液A)の5カラム容積で洗浄した。蛋白質を、30カラム容積に渡って、10 mM Tris(pH 8.0)、10 40
 0 mM NaCl、200 mM イミダゾール(緩衝液B)の0~100%勾配を使用して溶出した。SdrGN1N2N3またはSdrGN2N3は、~13%緩衝液B(~26 mMイミダゾール)で溶出した。280 nmでの吸光度をモニターした。SdrGN1N2N3またはSdrGN2N3を含有する分画を、1×PBSで透析した。

【0093】

次いで、各蛋白質を、エンドトキシン除去プロトコル(endotoxin removal protocol)に通した。このプロトコルの間に使用した緩衝液は、5-mL Mono-Q sepharose (Pharmacia)カラムを通過させることによって、内毒素フリーにさせた。蛋白質を、4×15 mLチューブに等しく分割した。各チューブの容積は、緩衝液Aを用いて9 mLにされた。1 mLの10% Triton X-114を各チューブに添 50

加し、そして4 で1時間回転しながらインキュベートした。チューブを37 水浴に配置して相分離させた。チューブを10分間2,000rpmでスピンドウンさせ、そして各チューブからの上部の水相を回収し、そして洗剤抽出(detergent extraction)を繰り返した。第2番目の抽出からの水相を合わせ、そして0.1M NiCl₂をチャージした5-mL IDA chelating (Sigma)カラムを通過させて、残っている洗剤を除去した。カラムを緩衝液Aの9カラム容積で洗浄し、その後、該蛋白質を緩衝液Bの3カラム容積で溶出した。溶離液(eluant)を、5-mL Detoxigel (Sigma)カラムを通過させ、フロースルー(flow-through)を回収し、そしてカラムへ再適用した。第2通過からのフロースルーを回収し、そして1xPBSにおいて透析した。精製産物を、濃度、純度およびエンドトキシンレベルについて分析し、その後マウスへ投与した。

10

【0094】

〔モノクローナル抗体産生〕

E.coli 発現および精製された組換えSasAおよびDsgK蛋白質を、マウスモノクローナル抗体のパネル(panel)を産生するために使用し、一方、マウス血清を、ポリクローナル抗体のソース(source)として使用した。手短に言えば、Balb/CまたはSJLマウスのグループに、以下の表において以下に記載されるように溶液状態のまたはアジュバントと混合されている1~10mgの蛋白質の一連の皮下免疫化(subcutaneous immunizations)を受容させた。

20

【0095】

〔免疫化スキーム〕

【0096】

【表6】

RIMMS 注射	日	量 (μg)	経路	アジュバント
#1	0	5	皮下	FCA/RIBI
#2	2	1	皮下	FCA/RIBI
#3	4	1	皮下	FCA/RIBI
#4	7	1	皮下	FCA/RIBI
#5	9	1	皮下	FCA/RIBI

30

慣用的な注射	日	量 (μg)	経路	アジュバント
初期	0	5	皮下	FCA
ブースト#1	14	1	腹腔内	RIBI
ブースト#2	28	1	腹腔内	RIBI
ブースト#3	42	1	腹腔内	RIBI

【0097】

犠牲(sacrifice)(RIMMS)時またはブースト(boost)(慣用的)後7日に、血清を回収し、そしてMSCRAMM(登録商標)蛋白質に対するまたは全細胞(SepidermidisおよびS.aureus)についてのELISAアッセイにおいて力価を測定した。最終ブースト3日後に、脾臓またはリンパ節を除去し、単一細胞懸濁液へ掻き裂き(teased)、そしてリンパ球を収獲した。次いで、リンパ球をP3X63Ag8.653メラノーマ細胞系(ATCC#CRL-1580)へ融合させた。細胞融合、引き続いてプレート化(plating)および栄養補給(feeding)を、Current Protocols in Immunologyからのthe Production of Monoclonal Antibodies protocol(Chapter 2, Unit 2) [本明細書中で参考として援用される]に従って行った。

40

【0098】

次いで、該融合物から産生されたクローンを、標準ELISAアッセイを使用して特異的抗-SasA抗体産生についてスクリーンした(screened)。陽性クローンを増やしそしてフローサイトメトリーにより全細菌細胞結合アッセイにおける活性についてそしてB

50

i a c o r e 分析により S a s A 結合について更に試験した。

【 0 0 9 9 】

〔 B i a c o r e 分析 〕

該分析の間、流速 (flow rate) は 1 0 m l / 分で一定のままであった。 S a s A または D g s K 注射の前に、試験抗体を、 R A M - F c 結合を介してチップ (chip) へ吸着させた。時間 0 の際、 3 0 m g / m l の濃度の S a s A または D g s K を、 3 分間チップ上に注射し、続いて 2 分間解離した (dissociation)。この段階の分析によって、 M a b / S a s A または D g s K 相互作用の相対的結合および解離動力学 (the relative association and disassociation kinetics) が測定された。

【 0 1 0 0 】

〔 全細菌への結合 〕

細菌サンプル S . a u r e u s N e w m a n、 S . a u r e u s 6 7 - 0、 S . a u r e u s 3 9 7 (S a l 6)、 S . a u r e u s W o o d、 S . a u r e u s 8 3 2 5 - 4、メチシリン耐性 S . a u r e u s M R S A 1 6、 S . e p i d e r m i d i s A T C C 3 5 9 8 4、 S . e p i d e r m i d i s H B、 S . e p i d e r m i d i s C N - 8 9 9 および S . h a e m o l y t i c u s A T C C 4 3 2 5 3 を回収し、洗浄し、そしてウサギ I g G (5 0 m g / m l) でブロッキングした後の 2 μ g / m l の濃度の M a b または P B S のみ (コントロール) と共にインキュベートした。抗体と共のインキュベーション後、細菌細胞を、ヤギ - F (a b ') ₂ - 抗 - マウス - F (a b ') ₂ - F I T C (これは、検出抗体として役立った) と共にインキュベーションした。抗体標識後、細菌細胞を、 F A C S カリバーフローサイトメーター (FACScaliber flow cytometer) を介して吸引して、蛍光放出を分析した (励起: 4 8 8、放出: 5 7 0)。各細菌株について、 1 0 , 0 0 0 事象 (events) を回収しそして測定した。これらのデータは、 S . a u r e u s S a s A に対する抗体がコアグラーゼ陰性ブドウ球菌の表面上の相同な蛋白質を認識し得たことを示す。該データは、 S . a u r e u s S a s A に対するウサギポリクローナル抗体が S . e p i d e r m i d i s H B の細胞表面から放出された蛋白質ならびに S . e p i d e r m i d i s からクローン化された D s g K 由来の組換え A - 領域と交差反応することを実証するウェスタンブロット分析を支持する (下記の表および図 6 を参照のこと)。

【 0 1 0 1 】

【表 7】

ポリクローナル血清反応性

	New man	67-0	397 (SAL 6)	Wood 46	8325 -4	MRS A 16	ATC C 3598 4	HB	CN-899	ATC C 4325 3
正常マウス血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マウス抗-SasA	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+

【 図 1 - 1 】

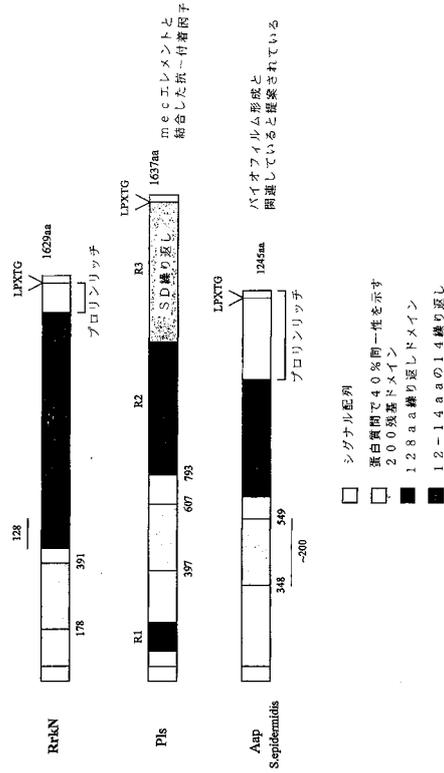


Figure 1. インシリコ予測される LpxTG 蛋白質の一次構造

【 図 1 - 2 】

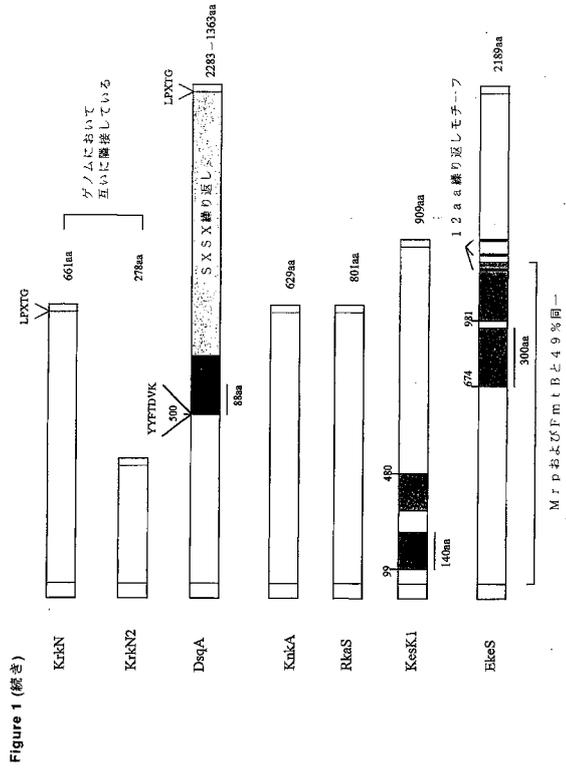


Figure 1 (続き)

【 図 2 】

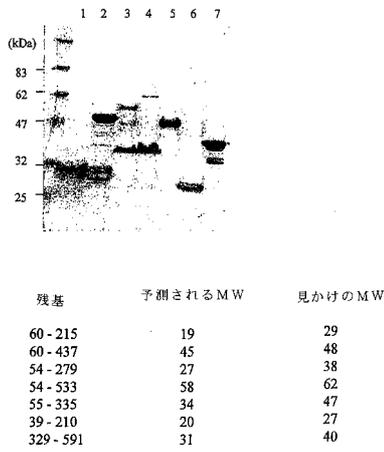


Figure 2. 精製 N 末端 His タグ融合蛋白質のクマシーゲル

【 図 3 】

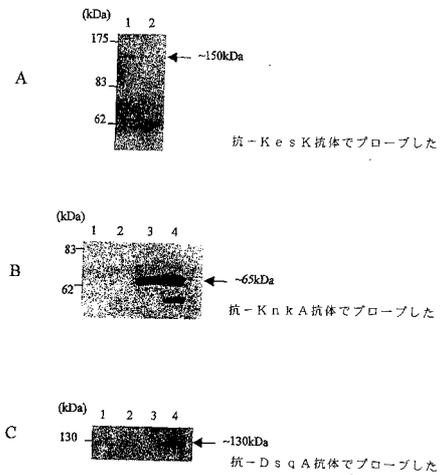


Figure 3. *S. aureus* 細胞壁抽出物のウェスタンブロッティング。細菌細胞を 50 単位の OD₆₀₀ へ標準化し、そして細胞壁を、安定化プロトプラストのリスタフィン消化によって単離した。A. レーン 1、8325-4 (初期指数増殖期) ; レーン 2、8325-4 (定常期)。B. レーン 1 および 2、eMRSA-16 ; レーン 3 および 4、8325-4 ; レーン 1 および 3 は初期指数増殖期細胞を示し、そしてレーン 2 および 4 は定常期細胞を示す。C. レーン 1 および 2、MSSA ; レーン 3 および 4、eMRSA-16 ; レーン 1 および 3 は初期指数増殖期細胞を示し、そしてレーン 2 および 4 は定常期細胞を示す。

【 図 4 】

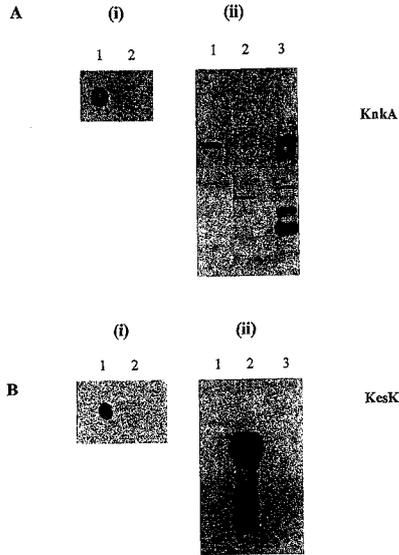


Figure 4. *S.aureus* MSCRAMMを発現する *Lactococcus lactis* のドットプロットングおよびウェスタンブロットング。
 全長 *kncA* および *kesK* を、*L. lactis* 発現プラスミド pKS80 ヘクローン化し、そしてコンピテントな (compotent) *L. lactis* MG1363 細胞へエレクトロポレーションした。陽性 *KncA* および *KesK* 発現クローンを、それぞれ、抗-KncA (A) および抗-KesK (B) 抗体を用いてのドットプロットングを使用して検出した。pKS80 を有する *L. lactis* を、ネガティブコントロールとして使用した。 A. (i) レーン 1、*L. lactis* pKS-KncA； レーン 2、*L. lactis* pKS80。 B. (i i) レーン 1、*L. lactis* pKS-KesK； レーン 2、*L. lactis* pKS80。ウェスタンブロットングを使用して、*S.aureus* および *L. lactis* において、*KesK* および *KncA* の発現を検査した。 A (i i)。 レーン 1、指数増殖期 *S.aureus* 株 8325-4 由来の細胞壁抽出物； レーン 2、pKS80 を有する *L. lactis* 由来のプロトプラスト分画； レーン 3、pKS-KncA を有する *L. lactis* 由来のプロトプラスト分画。 B. (i i) レーン 1、指数増殖期 *S.aureus* 株 8325-4 由来の細胞壁抽出物； レーン 2、pKS-KesK を有する *L. lactis* 由来の細胞壁抽出物； レーン 3、pKS80 を有する *L. lactis* 由来の細胞壁抽出物。

【 図 5 A 】

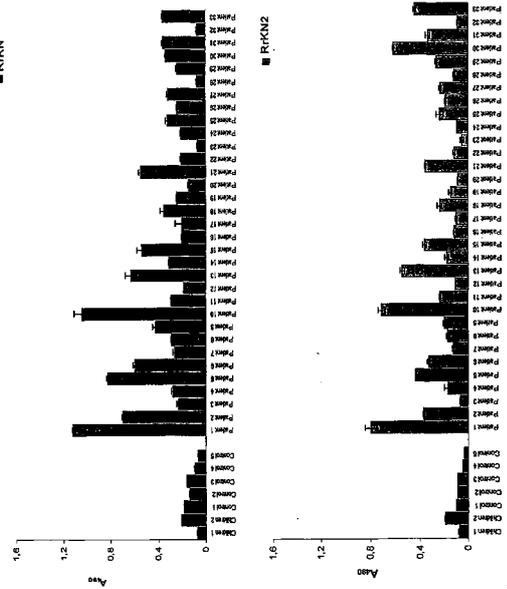


Figure 5A. インビトが発現を研究するための、回復期血清を用いての組織換え LPS-TG蛋白質のアロービツグ

【 図 5 B 】

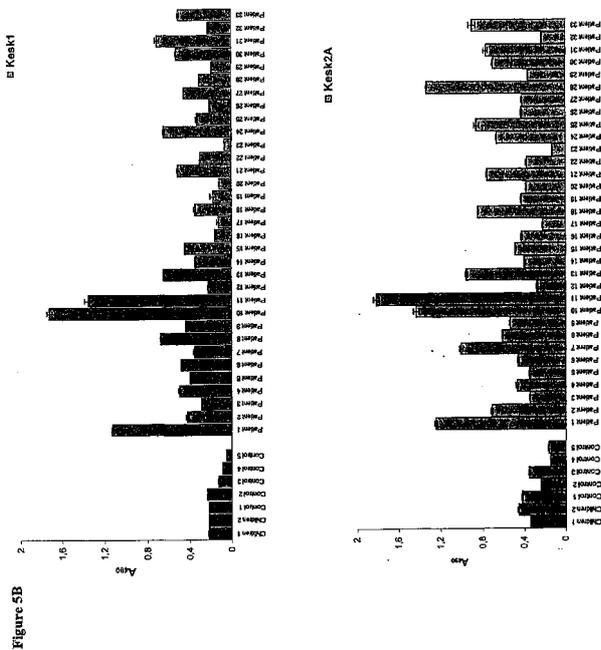


Figure 5B

【 図 5 C 】

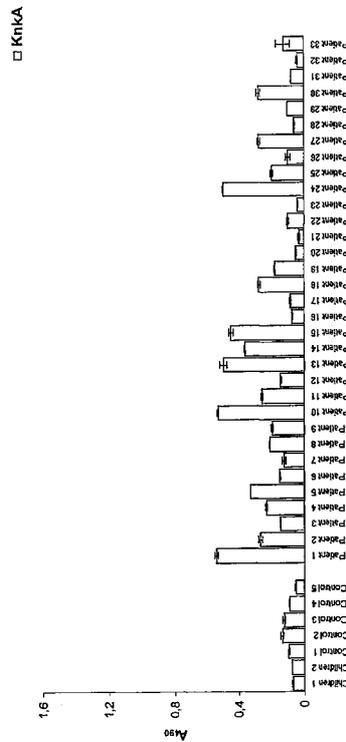


Figure 5C

【 図 5 D 】

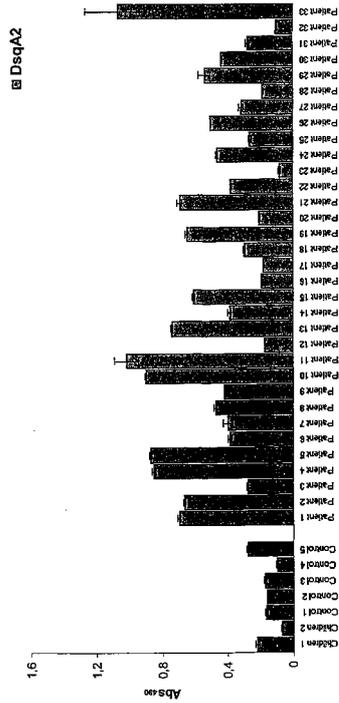


Figure 5D

【 図 6 】

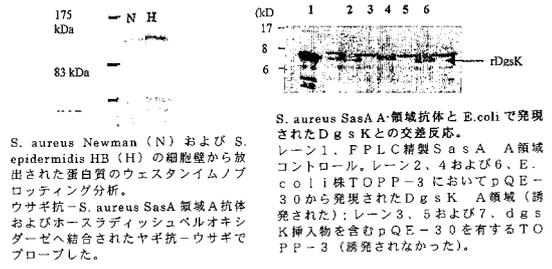


FIGURE 6

【 配列表 】

2010047581000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		A 6 1 K 39/085		
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	E	
		G 0 1 N 33/577	B	

(71)出願人 502334320

ユニヴァーシタ デグリ ストゥディ ディ パヴィア
 イタリア国 アイ - 2 7 1 0 0 パヴィア ストラータ ノオヴァ 6 5

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74)代理人 100108084

弁理士 中野 睦子

(74)代理人 100115484

弁理士 林 雅仁

(74)代理人 100129665

弁理士 木村 順子

(72)発明者 フォスター ティモシー ジェイ .

アイルランド国 1 6 ダブリン テンプロギユ クーランバー パーク 7 0

(72)発明者 ロッシュ フィオナ

アイルランド国 2 ダブリン トリニティー カレッジ シーノオー ザ プロボスト フェロ
 ーズ アンド スカラーズ オブ ザ カレッジ オブ ザ ホーリー アンド アンディバイデ
 ィッド トリニティー オブ クイーン エリザベス ニアー ダブリン

(72)発明者 パティー ジョセフ エム .

アメリカ合衆国 3 0 0 4 0 ジョージア州 カミング スタットフォード ブレイス 6 6 8 0

(72)発明者 ハッチンス ジェフ ティー .

アメリカ合衆国 3 0 0 4 1 ジョージア州 クウエイル ラン レーン 1 1 2 0

(72)発明者 スペジアレ ピエトロ

イタリア国 アイ - 2 7 1 0 0 パヴィア ストラータ ノオヴァ 6 5 シーノオー ユニヴァ
 ーシタ デグリ ストゥディ ディ パヴィア

(72)発明者 パレン マーク

アイルランド国 2 ダブリン トリニティー カレッジ シーノオー ザ プロボスト フェロ
 ーズ アンド スカラーズ オブ ザ カレッジ オブ ザ ホーリー アンド アンディバイデ
 ィッド トリニティー オブ クイーン エリザベス ニアー ダブリン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA50 BA61 CA04 DA06 GA11

4C085 AA03 AA13 AA14 BA13 BB36 CC07 CC23 EE01 EE03 GG02

GG04 GG08

4H045 AA11 AA30 BA10 DA75 DA76 EA20 EA52 FA74 GA26

专利名称(译)	交叉反应性单克隆和多克隆抗体，可识别来自凝固酶阴性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌的表面蛋白		
公开(公告)号	JP2010047581A	公开(公告)日	2010-03-04
申请号	JP2009232231	申请日	2009-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	英希比泰克斯公司 亲博斯特研究员和伊丽莎白女王的僻静三位一体近都柏林学者的学院的神圣和安迪盐湖西塔大邱名单©老爹帕维亚		
申请(专利权)人(译)	特克斯抑制公司 普罗布斯特的研究员和伊丽莎白女王的僻静三位一体近都柏林圣和安迪学院的学者ユニヴァーシタ德新闻今日迪パヴィア甘油		
[标]发明人	フォスターティモシージェイ ロッシュフィオナ パティージェョセフエム ハッチンスジェフティー スベジアレピエトロ パレンマーク		
发明人	フォスターティモシージェイ. ロッシュフィオナ パティージェョセフエム. ハッチンスジェフティー. スベジアレピエトロ パレンマーク		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12N15/09 A61K39/395 A61K39/085 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/53 A61K39/00 A61K39/40 A61P31/04 C07K14/31 C07K16/12 C12P21/08		
CPC分类号	A61P31/04 C07K16/1271		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.R A61K39/085 G01N33/569.E G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/GA11 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA13 4C085/BB36 4C085/CC07 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	睦野 林正人 木村 顺子		
优先权	60/298098 2001-06-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种单克隆抗体，该抗体可识别来源于凝固酶阳性细菌（例如金黄色葡萄球菌）的MSCRAMM（注册商标）和来源于凝固酶阴性细菌（例如表皮葡萄球菌和溶血性葡萄球菌）的MSCRAMM（注册商标）。提供。解决方案：来源于凝固酶阳性葡萄球菌细菌（例如金黄色葡萄球菌）和凝固酶阴性葡萄球菌（例如表皮葡萄球菌和溶血链球菌）的特定表面蛋白，其活性片段，例如这些蛋白的A。识别域或整个蛋白质的抗体。[选择图]无

名称	分布	サイズ	C末端
EkS	ENCSJM	2189 aa	LPNTGSEMDLPLKELALITGAALLARRRS KKEKES
DsqA	ENCSJM	~1363- 2283 aa	LPDTGDSIKQNGLLGGVMTLLVGLMKR KKKKDENDQDDSQ
KesK	ENCSJM	~909 aa	LPKTGETTSSQSWWGLYALLGMLALFIPK FRKESK
KrkN2	ENCSJM (Cowan)	~278 aa	LPKTGLTSVDNFISTVAFATLALLGSLSLLF KRKESK
KrkN	ENCSJM	~661 aa	LPQTGEESNKDMLPLMALIALSSIVAFVLP RKRKN
RkaS	ENCSJM	~801 aa	LPKTGTNQSSSPEAMFVLLAGIGLIATVRR RKAS
RrkN	NCSJM	1629 aa	LPKTGLESTQKGLIFSSIGIAGMLLARRRK N
KnkA	NCSJM	629 aa	LPKAGETIKEHWLPISVIVGAMGVLMWLS RRNKLKKA