

(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2005-239548

(P2005-239548A)

(43) 公開日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 39/095

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 39/02

// C 0 7 K 14/22

F I

A 6 1 K 39/095 Z N A

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 39/02

C 1 2 N 15/00 A

テーマコード (参考)

4 B 0 2 4

4 C 0 8 5

4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-141370 (P2003-141370)

(22) 出願日 平成15年5月20日 (2003.5.20)

(62) 分割の表示 特願2001-296757 (P2001-296757)
の分割

原出願日 平成3年8月23日 (1991.8.23)

(31) 優先権主張番号 572, 187

(32) 優先日 平成2年8月23日 (1990.8.23)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501378929

ザ ユニバーシティー オブ ノースカロ
ライナ アット チャペル ヒル
アメリカ合衆国 27599-4100
ノースカロライナ州, チャペル ヒル (番
地なし)

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸

(74) 代理人 100077562

弁理士 高野 登志雄

(74) 代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74) 代理人 100089048

弁理士 浅野 康隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Neisseria gonorrhoeae* および *Neisseria meningitidis* 由来トランスフェリン結合蛋白質

(57) 【要約】

【解決手段】 この蛋白質は、トランスフェリンアフィニティーカラムにより単離され、*Neisseria gonorrhoeae*に見出される分子量およそ100kDの鉄調節外層膜蛋白質に対して惹起される抗血清に特異的に結合する。【効果】 *Neisseria gonorrhoeae* および *Neisseria meningitidis*に見出される鉄調節外層膜蛋白質は、トランスフェリンレセプター機能において重要である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A)配列番号 2 記載の塩基配列に相補的な配列によってコードされるポリペプチドと免疫学的交差反応性である単離又は精製されたトランスフェリン結合性蛋白及び(B)配列番号 3 記載の塩基配列によってコードされるポリペプチドと免疫学的交差反応性である単離又は精製されたトランスフェリン結合性蛋白を含有する組成物。

【請求項 2】

単離又は精製されたトランスフェリン結合蛋白(A)が、Neisseria gonorrhoeae株 FA19由来の100kD蛋白又はその自然発生アナログである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

単離又は精製されたトランスフェリン結合蛋白(B)が、Neisseria meningitidis株 FAM20由来の95kD蛋白又はその自然発生アナログである請求項 1 又は 2 記載の組成物。

【請求項 4】

さらに薬学的に許容される担体を含むものである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 5】

単離又は精製された蛋白が、精製された組換えポリペプチドである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の組成物の医薬製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本出願は、Neisseria gonorrhoeaeおよびNeisseria meningitidis由来のトランスフェリン結合蛋白質および免疫学的交差反応性フラグメントおよびそれらのアナログに関するものである。さらに明細書は、そのような蛋白質に対して惹起される抗体、さらには、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisの検出におけるそのような蛋白質および抗体の使用、およびN. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisにより引き起こされる疾病の処置に関するものである。組換えトランスフェリン結合蛋白質をコードするDNAおよびそのようなDNAを発現する細胞もまた、本発明に包含されるものである。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisは、遺伝子的には類似しているが、病原性的には異なる二つのNeisseria 属病原体である。鉄は、多くの細菌同様、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisの増殖における必須栄養素である。大部分の他のグラム陰性細菌とは異なり、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisは小さな、シデロフォア(siderophore)と呼ばれる溶解性の鉄-キレート化合物を産生・分泌しない。これらの他のグラム陰性細菌は鉄-シデロフォア複合体を取り込むことができるレセプターを有する。

【0003】

一方、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisは、各々ヒトの外分泌物中および血清中に存在する鉄結合糖蛋白質であるラクトフェリンやトランスフェリンに結合する膜蛋白質を有すると考えられる。N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisは、ヒト宿主において、ラクトフェリンおよびトランスフェリンを、これらラクトフェリン-およびトランスフェリン-結合膜蛋白質、すなわちレセプターへ結合させることにより鉄を取り込むと考えられる。

【0004】

N. meningitidis由来のラクトフェリン結合蛋白質は105kD の、鉄調節外層膜蛋白質であると考えられる(Schryvers およびMorris, Infect. Immun. 56,1144-1149(1988) 参照)。 N. meningitidisのうちの一つの細胞株に由来するトランスフェリン結合蛋白質は71kD の鉄調節外層膜蛋白質であると報告されているが、その他の細胞株は分子量75kD ~ 88kD、

10

20

30

40

50

85kDおよび95kDのトランスフェリン結合蛋白質を有することが報告されている (Schryvers およびMorris, Mol.Microbiol. 2, 281-288(1988)参照)。これらの著者は、N. meningitidisのトランスフェリン結合蛋白質の同定の様々な試験結果が互いに一致しないことを認めている。事実、85kDおよび95kDの蛋白質はN. meningitidisのトランスフェリンレセプター機能に必要でないことが示された (Dyerら, Microbial Pathogenesis 3, 351-363(1987)参照)。

【0005】

N. gonorrhoeaeの鉄同化能力もまた興味深いものである。ある研究において、鉄欠失条件下で増殖させた細胞由来の淋菌膜全体を用いたドット結合アッセイ (dot binding assay) により、ラクトフェリンおよびトランスフェリンの各々のレセプターの存在が示唆された。結合蛋白質の分子量およびその他の特性は測定されていない (Lee およびSchryvers, Mol. Microbiol. 2, 827-829(1988)参照)。したがって、N. gonorrhoeaeの結合蛋白質の同定は、これまで立証されていない。 10

【0006】

淋菌および髄膜炎菌感染により引き起こされる疾病は広まり、しばしば重篤なものとなる。そのような疾病である淋病、髄膜炎および敗血性ショックの予防、検出および処置するための改善方法が必要とされている。

【0007】

ヒト体内におけるN. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisの増殖は、これらの細胞の鉄吸収能を低下させることにより阻害できる。淋菌および髄膜炎菌細胞の血流中での鉄の同化能力は、トランスフェリンレセプター機能をブロックすることにより低下させることが可能であろう。トランスフェリンレセプターは、例えば、レセプターに対する抗体によりブロックできるであろう。しかしながら、レセプターに対する抗体を惹起させるためには、レセプターは単離できるように同定されなければならない。 20

【0008】

したがって、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidis由来のトランスフェリン結合蛋白質の同定、単離および精製を行う必要がある。組換えトランスフェリン結合蛋白質を作製するためには、そのような蛋白質をコードするDNA分子が必要である。トランスフェリンレセプター機能を阻害するためには、トランスフェリン結合蛋白質に対する抗体が必要である。淋菌および髄膜炎菌感染を予防および処置をするためには、ワクチンが必要である。 30
N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisを検出するためには、抗体および核酸プローブが必要である。本発明の目的は、淋菌および髄膜炎菌感染の検出、予防および処理のためのそのような蛋白質、抗体、DNA分子およびワクチンを提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

これら、およびその他の目的は、当業者にとって明らかであるように、Neisseria gonorrhoeaeまたはNeisseria meningitidis外層膜に見出され、

(a) 洗浄剤；

(b) ニトロセルロース/セルロースアセテート紙；および

(c) Neisseria gonorrhoeaeおよびNeisseria meningitidis由来のその他の鉄調節蛋白質 40

を実質的に含有せず；

トランスフェリンアフィニティーカラムにより単離され；

Neisseria gonorrhoeaeに見出される分子量およそ100kDの鉄調節外層膜蛋白質に対して惹起される抗血清に特異的に結合し；

Neisseria gonorrhoeaeまたはNeisseria meningitidisのトランスフェリンレセプター機能において重要である；

鉄調節蛋白質；およびそのような蛋白質の機能性アナログを提供することにより達成される。

【0010】

本発明は、さらに、宿主細胞中でトランスフェリン結合蛋白質およびそのアナログを発現するDNA分子を提供するものである。その結果得られる組換え蛋白質もまた本発明に包含される。

【0011】

本発明はまた、本発明のトランスフェリン結合蛋白質に対する抗体をも包含するものである。該抗体はN. gonorrhoeaeおよび/またはN. meningitidisの増殖を阻害し、これらの病原体の感染を調節するうえで有用である。

【0012】

本発明は、さらに、本発明のトランスフェリン結合蛋白質およびそのような蛋白質のアナログを含有するワクチン組成物、さらにはそのようなワクチンを投与することにより淋病、髄膜炎および敗血性ショック等の淋病および髄膜炎菌性疾病に対して宿主を免疫する方法を包含するものである。本発明の抗体は、淋菌および髄膜炎菌性疾病を処置するための受動免疫に用いてもよい。

10

【0013】

【発明の実施の形態】

蛋白質の細菌からの単離

トランスフェリン結合蛋白質は、N. gonorrhoeaeまたはN. meningitidisの膜から調製される。この膜は当技術分野で公知の方法により調製することができる。Schryvers および Morrisにより *Infect. Immun.* 56, 1144-1149(1988)に記載されている方法が適当である。この方法はここに参考文献として挙げられる。

20

膜は鉄欠損培地で増殖した細胞から得られる。増殖培地は、Difco製のGC培地基（淋菌用培地基）等の標準的な増殖培地でもよい。この培地は、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレン - ジアミン - ジ - オルト - ヒドロキシフェニル酢酸（EDDA）またはデスフェラル（desferal）（Ciba Pharmaceuticals製）等のキレート剤の添加により鉄欠損化することができる。一方、増殖培地は、MickelsenおよびSparling（*Inf. Immun.* 33, 555-564(1981)）により記載されている既知組成培地であってもよく、これはキレート剤であるケレックス（Chelex）-100（Bio-Rad製）で処理することにより鉄欠損化されている培地である。

【0014】

本発明では、正常なトランスフェリンレセプター機能を有する如何なる淋菌株および髄膜炎菌株も有用である。通常、そのような菌株は、American Type Culture Collection, Bethesda, MarylandおよびNeisseria Repository, NAMRU, University of California, Berkeley等の医学的およびその他の入手源から入手することができる。

30

【0015】

例えば、McKenna ら, *Infect. Immun.* 56, 785-791(1988)に記載されている淋菌株FA19; Biswasら, *J. Bacteriol.* 151, 77-82(1979)に記載されているFA248; WestおよびSparling, *Infect. and Immun.* 47, 388-394(1985)に記載されているF62 が適当な淋菌トランスフェリン蛋白質源である。髄膜炎菌株FAM18 およびFAM20(Dyerら, *Microbial Pathogenesis* 3, 351-363(1987))およびB16B6、X群およびW135群(SchryversおよびMorris 56, 1144-1149(1988))が、代表的な髄膜炎菌トランスフェリン結合蛋白質源である。

【0016】

トランスフェリンに結合する蛋白質は、当技術分野で公知であるアフィニティ操作により、固定化トランスフェリンを有する鉄飢餓化N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisの他の膜蛋白質から単離されてもよい（例えば、SchryversおよびMorris, *Infect. Immun.* 56, 1144-1149(1988)参照のこと）。Schryvers およびMorrisの方法は、ここに参考文献として挙げられる。好ましくは、実施例2aに記載されているこの操作の応用法が、淋菌および髄膜炎菌の膜蛋白質からトランスフェリン結合蛋白質を分離するために用いられる。

40

【0017】

要約すれば、鉄飢餓化淋菌および髄膜炎菌細胞由来の膜を単離し、ビオチニル化（biotinylated）トランスフェリンで処理する。得られた複合体を、例えばアビジン - またはストレプトアビジン - アガロースで処理することにより固定化する。アフィニティ樹脂ペレット

50

を十分に洗浄し、緩衝液に懸濁する。トランスフェリンレセプターを、例えば加熱により固定化トランスフェリンから分離する。蛋白質を、例えばLaemmli, Nature 227, 680-685 (1970)の方法に従ってSDS-PAGEにより分離する。分子量がおよそ100kDである蛋白質（以下、100kD蛋白質という。）が淋菌から分離される。分子量がおよそ95～95kDである蛋白質（以下、95kD蛋白質という。）が髄膜炎菌から分離される。

【0018】

蛋白質の同定

分子量はSDS-PAGE上の単一バンドを解析し、その位置を既知の標準物質のバンドの位置と比較することにより求めた。この方法は3～5%の範囲内の誤差であると、当業者には理解される。分子量は測定間でほとんどバラツキを見せない。淋菌由来の蛋白質の分子量は一定しており、再現性もよく、髄膜炎菌からの蛋白質の分子量よりも大きくて97～100kDであった。

10

【0019】

トランスフェリンレセプター活性が欠損している5つの異なる淋菌突然変異体を調製することにより、N. gonorrhoeae由来の100kD トランスフェリン結合蛋白質がトランスフェリンレセプター機能に重要であることが確認された。ウサギにおいて惹起されるポリクローナル抗血清を用いて、ウエスタンブロットにより100kDトランスフェリン結合蛋白質の存在を各突然変異体においてテストした。各突然変異体において、100kD外層膜蛋白質の量は、野性型淋菌株で観察されるよりも非常に少なかった。正常なトランスフェリンレセプター活性を有するその他の突然変異型淋菌株では、野性型レベルの100kD蛋白質を膜に含有していた。

20

【0020】

同様の実験により、髄膜炎菌由来の95kD蛋白質がトランスフェリンレセプター機能にとって重要であることが確認された。N. gonorrhoeae由来の100kD蛋白質に対して惹起される抗血清を用いて、ウエスタンブロット分析を行ったところ、該蛋白質はN. meningitidis由来の95kD蛋白質と交差反応することが判明した。したがって、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisにおいても、トランスフェリンレセプター活性の欠如は、それぞれ100kD蛋白質および95kD蛋白質が存在しないことと相関する。

【0021】

したがって、先行技術に基づく予想に反して、N. gonorrhoeaeに見出される鉄調節100kD外層膜蛋白質はトランスフェリンレセプターである。N. meningitidisに見出される鉄調節95kD外層膜蛋白質は、驚くべきことに、N. gonorrhoeaeに見出される100kD蛋白質に対して惹起される抗血清と交差反応し、かつN. meningitidisのトランスフェリンレセプターである。通常、ウサギ、マウス、ヤギ、サルおよびヒト等の哺乳動物において、N. gonorrhoeae由来のトランスフェリンレセプターに対して惹起される抗血清は、N. meningitidis由来のトランスフェリンレセプターと交差反応し、N. meningitidis由来のトランスフェリンレセプターに対して惹起される抗血清は、N. gonorrhoeae由来のトランスフェリンレセプターと交差反応する。モノクローナル抗体もまた、通常95kDおよび100kD蛋白質と交差反応する。

30

【0022】

ここにおいて用いられるように、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidis由来のトランスフェリンレセプターとしては、N. gonorrhoeae由来の鉄調節100kD外層膜蛋白質およびN. meningitidis由来の鉄調節95kD外層膜蛋白質が挙げられる。これらのトランスフェリンレセプターは蛋白質のクラスを構築するものであると理解されるべきである。そのクラスには、例えば、N. gonorrhoeaeおよびN. meningitidisの様々な細菌株において自然に生じるアミノ酸配列が変化したものも含まれる。

40

【0023】

本発明の蛋白質としては、さらに、N. gonorrhoeaeまたはN. meningitidis由来のそれぞれ100kDまたは95kDトランスフェリンレセプターの機能性アナログも含まれる。蛋白質がそれ以外の蛋白質と免疫学的に交差反応する場合および同様の機能を有する場合、該蛋白

50

質は、以下に記載するように、特異的機能の故に他の蛋白質の機能性アナログであると考えられる。アナログは、例えば、蛋白質のフラグメントまたは蛋白質の置換、付加または欠失突然変異体であってもよい。

【0024】

本発明の蛋白質および機能性アナログは本質的には本精製されたものである。本明細書では、本質的に精製されたものであるということは、蛋白質および機能性アナログが、精製プロセス間に用いられる物質だけでなく、微量のその他の *N. gonorrhoeae* および *N. meningitidis* 由来の鉄調節蛋白質をも含まないことを意味する。 *N. gonorrhoeae* および *N. meningitidis* 由来のその他の鉄調節蛋白質としては、その他のトランスフェリン結合蛋白質が挙げられる。精製プロセスにおいて用いられる物質としては、洗浄剤、アフィニティ結合剤および分離膜が挙げられる。洗浄剤としては、ドデシル硫酸ナトリウムおよびサルコシンが挙げられる。アフィニティ結合剤としては、アガロース、アビジン - アガロース、ストレプトアビジン - アガロース、ビオチンおよびビオチニル化トランスフェリン等のビオチニル化蛋白質が挙げられる。分離膜としては、ニトロセルロース紙およびニトロセルロース/セルロースアセテート紙が挙げられる。

10

【0025】

組換え DNA

蛋白質が単離・精製されると、その DNA の単離方法は公知である。多くのこれらの方法が、Maniatisら, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982) に記載されている。免疫学的なスクリーニング法が好ましい。

20

【0026】

例えば、上記のようなトランスフェリンに結合した鉄を利用できる淋菌または髄膜炎菌株由来の染色体 DNA は単離され、標準的方法により適当な長さのフラグメントに切断される。適当な DNA 切断法としては、例えば、超音波処理法や制限エンドヌクレアーゼを用いる方法等が挙げられる。適当な平均フラグメント長はおよそ 0.5 ~ 10 kbp である。

【0027】

フラグメントにリンカーを添加し、得られたフラグメントを適当なベクターに連結させる。該リンカーはベクター中の制限部位と符号する。適当なリンカーとしては、例えば、*EcoRI*、*PstI* および *BamHI* が挙げられる。適当なベクターとしては λ - *gt11* が挙げられる。連結した DNA は、Promega 製のキット等の市販のキットによりパッケージされてもよい。

30

得られたライブラリーからの蛋白質をクローン化し、適当な宿主、典型的には *E. coli* 内で発現させる。クローン化は好ましくは以下の突然変異、すなわち *mcrA*、*mcrB*、*mcrC*、*mcr*、*hsdS*、*hsdR* および *hsdM* を伴う *E. coli* 宿主内で行われる。いくつかの好ましい *E. coli* 株としては、DH5 α MCR (BRL 製) および「SURE」(Stratagene 製) が挙げられる。

【0028】

得られるプラークを当技術分野で公知の方法により免疫学的に選別する。Maniatis の同著を参照されたい。適当な方法が下記の実施例 6 に記載されている。スクリーニングは、Stratagene (La Jolla, CA) 製のピコブルー・イムノロジカル・スクリーニングキット (Pico blue Immunological Screening Kit) 等の市販のスクリーニングキットを用い、添付の Stratagene プロトコル (Stratagene または本明細書のファイルヒストリーから得られる。) に従って行うことにより簡便化してもよい。

40

【0029】

トランスフェリン結合蛋白質特異性抗血清を結合するプラークを非反応性プラークから選別し、精製する。Maniatis の同著を参照されたい。精製されたファージ由来の DNA を当技術分野で公知の方法により単離する。適当な方法としては、例えば、ポリエチレングリコール沈降法、ファージ溶菌法および陰イオン交換クロマトグラフィーが挙げられ、それらは Qiagen (Studio City, CA) 製のキットを使用することにより簡便化できる。

【0030】

得られた DNA は、当技術分野で公知の方法により増幅してもよい。一つの適当な方法と

50

しては、Mullisらによる米国特許第4,683,195号およびSambrook, FritschおよびManiatis編によるMolecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に記載されているポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法が挙げられる。それはλ-gt10-特異性オリゴマー(New England Biolabsより入手可能)を用いてλ-gt10ベクター中でDNAクローンを増幅させるのに便利な方法である。

【0031】

増幅されたクローンを適当なベクターに挿入し、当技術分野で公知の方法にしたがってヌクレオチド配列を決定する。適当なヌクレオチド配列決定法としては、SangerらによるProc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977)に記載されているジデオキシチェーンターミネーティング法が挙げられる。

10

【0032】

ヌクレオチド配列決定のための適当なベクターおよびポリメラーゼは公知である。適当なベクターとしてはStratagene製のブルースクリプト(Bluescript)ベクターが挙げられる。適当なポリメラーゼとしてはシーケナーゼ(Sequenase)(United States Biochemical Corp. 製, Cleveland, OH)が挙げられる。

【0033】

通常、上記のイムノスクリーニング法では、トランスフェリン結合蛋白質特異性抗血清を有するフラグメントを同定するために、多数のプラークを選別することが必要である。例えば、ある実験では、淋菌(FA19)染色体のフラグメントからおよそ500,000プラークが得られた。N. gonorrhoeae由来の100kD トランスフェリン結合蛋白質に対する抗血清を用いて二つのプラークが同定された。挿入部の長さが323bpであるクローン(pUNCH401)が一つのプラークから単離され、それ以外のプラークからは挿入部の長さが483bpであるクローン(pUNCH402)が単離された。これらのDNA配列はFA19染色体の重複するフラグメントを表している。この二つのフラグメントの重複部も含む共通配列を図1に示す。75番目~323番目のヌクレオチドは重複配列を表している。1番目~74番目のヌクレオチドは323bpフラグメントの非重複配列を表している。324番目~558番目のヌクレオチドは483bpフラグメントの非重複配列を表している。オープンリーディングフレームのみが、図1に示すものとは反対方向に(すなわち、558番目のヌクレオチドから1番目のヌクレオチドに向かって)走っている。実施例6aを参照のこと。

20

【0034】

上記のフラグメントまたはそれらのサブフラグメントは、トランスフェリン結合蛋白質遺伝子の付加フラグメントを得るためのプローブとして用いられる。この技術を用いることにより、FA19染色体の8kbのClaIフラグメントおよび3.2kbのHincIIフラグメントが、323および483bpフラグメントとハイブリダイズする。3.2kbのHincIIフラグメントの制限酵素地図を図2Bに示す。得られたフラグメントはヌクレオチド配列を決定することができる。実施例7および8並びに図2Aを参照されたい。

30

【0035】

フラグメントを適当に伸長することにより、遺伝子全体がヌクレオチド配列決定される。コードする配列の限界は、挿入突然変異誘起等の当業界で公知の方法により決定される。実施例9を参照されたい。95kD髄膜炎菌トランスフェリン結合蛋白質のヌクレオチド配列を決定するために、同様の方法が用いられる。実施例10および11並びに図4~図6を参照されたい。

40

【0036】

組換え蛋白質

本発明の蛋白質は組換えDNA技術により作製することもできる。分離されたDNAから組換え蛋白質を作製するための適当な方法としては、Maniatisらの同著に記載されている。

【0037】

要約すれば、本発明のトランスフェリン結合蛋白質をコードするDNAコードは、それらの蛋白質の機能性アナログをコードするDNA同様、広範囲にわたる様々な宿主細胞およ

50

び広範囲にわたる様々なベクターを用いて発現されてもよい。宿主細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。DNAは天然源から得られてもよく、場合によっては修飾されていてもよい。DNAはまた、その全体または部分的に合成されていてもよい。

【0038】

ベクターは染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNA配列のセグメントを含んでいてもよい。いくつかの適当な原核性ベクターとしては、colE1、pCR1、pBR322、pMB9およびRP4等のE. coli由来のプラスミドが挙げられる。原核性ベクターとしてはまた、M13およびその他の糸状菌の一本鎖DNAファージ等のファージDNAの誘導体も挙げられる。

【0039】

酵母において有用なベクターが利用できる。適当な例としては2uプラスミドが挙げられる。

10

【0040】

哺乳動物細胞において使用する適当なベクターも公知である。そのようなベクターとしては、十分公知であるSV-40 アデノウイルスの誘導体、レトロウイルス誘導DNA配列およびプラスミドとファージDNAの組合せから誘導されるベクターが挙げられる。

【0041】

さらに真核性発現ベクターも当技術分野で公知である（例えば、P. J. Southern および P. Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341(1982); S. Subramani ら, Mol. Cell. Biol. 1, 854-864(1981); R. J. Kaufmann および P. A. Sharp, "Amplification And Expression Of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159, 601-621(1982); R. J. Kaufmann および P. A. Sharp, Mol. Cell. Biol. 159, 601-664(1982); S. I. Scashill ら, "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4654-4659(1983); G. Urlaub および L. A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220(1980)参照のこと）。

20

【0042】

有用な発現宿主としては、十分公知である原核性および真核性宿主が挙げられる。いくつかの適当な原核性宿主としては、例えば、E. coli SG-936、E. coli HB 101、E. coli W31 10、E. coli X1776、E. coli X2282、E. coli DH1 および E. coli MRC1 等の E. coli、Pseudomonas、Bacillus subtilis 等の Bacillus、および Streptomyces が挙げられる。適当な真核性細胞としては、酵母およびその他の菌類、昆虫、COS細胞およびCHO細胞などの動物細胞、組織培養のヒト細胞および植物細胞が挙げられる。

30

【0043】

本発明で有用な発現ベクターは、操作上トランスフェリン結合蛋白質遺伝子またはそれらのフラグメントに連結する少なくとも一つの発現調節配列を含有する。調節配列は、クローン化DNA配列の発現を調節および制御するためにベクターに挿入される。有用な発現調節配列の例としては、lac系、trp系、tac系、trc系、ファージλの主なオペレーターおよびプロモーター領域、fd被覆蛋白質の調節領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター等の酵母の解糖プロモーター、Pho5等の酵母酸ホスファターゼのプロモーター、酵母の接合因子のプロモーターおよびポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルスおよび、初期および後期プロモーターまたはSV40等のサルウイルス由来のプロモーター、並びに原核および真核細胞およびそれらのウイルスまたはそれらを組合せた遺伝子の発現を調節するものとして知られるその他の配列が挙げられる。

40

【0044】

100kDまたは95kD蛋白質は当技術分野で公知の方法により精製することができる。例えば、トランスフェリン結合蛋白質の全体または一部を、適当な融合パートナーとの融合蛋白質の形態で発現させてもよい。その融合パートナーは、好ましくは精製および同定を簡便化させるものである。いくつかの有用な融合パートナーとしては、β-ガラクトシダーゼ（Grayら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6598(1982)）; trpE (Itakuraら, Science 1

50

98, 1056(1977)) およびプロテイン A (Uhlen ら, Gene 23, 369(1983)) が挙げられる。例えば、 β - ガラクトシダーゼを含有する融合蛋白質は、抗 β - ガラクトシダーゼ抗体カラムを用いて、アフィニティクロマトグラフィーにより精製してもよい (Ullman, Gene. 29, 27-31(1984))。

【 0 0 4 5 】

所望により、融合蛋白質がトランスフェリン結合性蛋白質と融合パートナーとの間に切断可能な部位を含有するような融合蛋白質をコードする DNA を作製する。化学的および酵素的切断可能部位は共に当技術分野で公知である。酵素的に切断され得る部位の適当な例としては、コラゲナーゼにより特異的に認識され切断される部位 (Keil ら, FEBS Letters 56, 292-296(1975)) ; エンテロキナーゼ (Hopp ら, Biotechnology 6, 1204-1210(1988) 10) ; ファクター Xa (Nagai ら, Methods Enzymol. 153, 461-481(1987)) ; トロンピン (Eaton ら, Biochemistry 25, 505(1986)) ; およびグルタチオン S - トランスフェラーゼ (Johnson, Nature 338, 585(1989) ; および Van Etten ら, Cell 58, 669(1989)) が挙げられる。コラゲナーゼは配列 Pro-X-Gly-Pro (配列中の X は中性のアミノ酸である。) においてプロリンと X との間を切断する。エンテロキナーゼは配列 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys においてリジンの後ろを切断する。ファクター Xa は配列 Ile-Glu-Gly-Arg においてアルギニンの後ろを切断する。トロンピンは配列 Arg-Gly-Ser-Pro においてアルギニンとグリシンの間を切断する。

【 0 0 4 6 】

特異的な化学的切断剤も公知である。例えば、臭化シアンは蛋白質においてメチオニン残基で切断する。 20

【 0 0 4 7 】

一方、100kD および 95kD トランスフェリンレセプター蛋白質は誘導されるプロモーターの後ろで過剰に発現させ、特異的トランスフェリンレセプター抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製されてもよい。また別の方法として、過剰発現した蛋白質は、当技術分野で公知の方法により、イオン交換、サイズ排除および疎水的相互作用クロマトグラフィーを組合せて精製してもよい。これら、およびその他の適当な方法は、Marston による "The Purification of Eukaryotic Polypeptides Expressed in *E. coli*" (DNA Cloning, D. M. Glover, Ed., Volume III. IRL Press Ltd., England, 1987) に記載されている。 30

【 0 0 4 8 】

有用性

プローブとしての蛋白質

N. gonorrhoeae 由来の 100kD 蛋白質、*N. meningitidis* 由来の 95kD 蛋白質、およびそれらの機能性アナログは、淋菌および髄膜炎菌感染により引き起こされる疾病を検出および予防するうえで有用である。

【 0 0 4 9 】

例えば、蛋白質は、標識化して、淋病、敗血性ショック、あるいは髄膜炎の被検患者の血清またはその他の体液等の試料中の蛋白質に対する抗体を検出するための標準的イムノアッセイにおけるプローブとして用いてもよい。通常、請求の範囲 A による蛋白質またはそのような蛋白質の機能性誘導体を、蛋白質の抗体を含有すると思われる試料とインキュベートする。蛋白質は、インキュベーション前、インキュベーション中またはインキュベーション後のいずれかにおいて標識化する。試料中の抗体に結合した標識化蛋白質が検出されれば、抗体が存在することになる。抗体は好ましくは固定化されている。 40

【 0 0 5 0 】

蛋白質を有する抗体を検出するための適当なアッセイとしては、当技術分野で公知であり、例えば R. H. Kenneth, "Enzyme-Linked Antibody Assay with Cells Attached to Polyvinyl Chloride Plates" in Kenneth et al, *Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, N. Y., 376 頁 (1981) に記載されている標準 ELISA プロトコールが挙げられる。要約すれば、プレートを十分量の抗原性蛋白質で被覆し、検出可能量の抗体を結合させる。該プレート 50

をポリペプチドとインキュベートした後、適当なブロック剤、例えば10%正常ヤギ血清等でブロックする。患者の血清などの試料を添加して終結点を決定するために力価を求める。正および負の調節を同時に加え、未知の試料中に存在する目的の抗体を定量する。続いてインキュベートし、試料を適当な酵素にコンジュゲートさせたヤギ抗ヒトIgでプローブする。試料中の抗蛋白質抗体の存在は酵素の存在により示される。

【0051】

イムノアッセイに使用するために、蛋白質は放射性または非放射性原子および分子で標識化されていてもよい。それらの蛋白質とコンジュゲートさせるためのそのような標識および方法は当技術分野では公知である。

【0052】

有用な放射性標識のいくつかの例としては、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I および ^3H が挙げられる。放射性標識の使用については英国特許第2,034,323号、米国特許第4,358,535号、および同第4,302,204号に記載されている。

【0053】

非放射性標識のいくつかの例としては、酵素、発色団、電子顕微鏡で検出可能な原子および分子および磁気特性により検出可能な金属イオンが挙げられる。

いくつかの有用な酵素標識としては、基質中で検出可能な変化を生じる酵素が挙げられる。いくつかの有用な酵素およびその基質としては、例えば、西洋ワサビのパーオキシダーゼ（ピロガロールおよびo-フェニレンジアミン）、 β -ガラクトシダーゼ（フルオレセイン β -D-ガラクトピラノシド）およびアルカリ性フォスファターゼ（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム）が挙げられる。酵素標識の使用については、英国特許第2,019,404号、欧州特許第63,879号およびRotmanによるProc. Natl. Acad. Sci., 47, 1981-1991(1961)に記載されている。

【0054】

有用な発色団としては、例えば、染料以外に、蛍光性、化学発光性および生物発光性分子が挙げられる。本発明において有用ないくつかの具体的な発色団としては、例えばフルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリスリン、ウンベリフェロン、ルミノールが挙げられる。

【0055】

標識は、当技術分野で公知の方法によりプローブにコンジュゲートしていてもよい。標識は官能基を介して直接プローブに結合していてもよい。プローブはそのような官能基を含有しているか、あるいは含有させることができるものである。適当な官能基のいくつかの例としては、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、マレイミド基、イソシアナート基、イソチオシアナート基が挙げられる。

【0056】

標識はまた、上記の方法によりプローブに結合しているリガントによりプローブにコンジュゲートしていてもよいし、標識に結合しているリガントのレセプターによりプローブに結合していてもよい。いかなる公知のリガンド-レセプター結合体も適当であるが、ピオチン-アビジン結合体が好ましい。

【0057】

イムノアッセイに用いるために、蛋白質は100kDまたは95kD蛋白質全体であってもよいし、あるいはそれらの機能性アナログであってもよい。これらの蛋白質の機能性アナログとしては、フラグメントおよび該蛋白質の抗体への結合能力を損なわない置換、付加および欠失突然変異体が挙げられる。トランスフェリン結合蛋白質に特異的な抗体を検出できる蛋白質ならば、本発明において有用である。

【0058】

ワクチンにおける蛋白質

本発明のトランスフェリン結合蛋白質は、*N. gonorrhoeae*および*N. meningitidis*の生体機能にとって重要であり、かつ外層膜に見出されるものである。これらの蛋白質は*Neisseria*感染により引き起こされる淋病、敗血性ショックおよび髄膜炎等の疾病の予防用

10

20

30

40

50

ワクチンに有用である。このためには、該蛋白質が中和抗体を産生することが必要である。中和抗体とは、インビトロまたはインビボで著しく細菌細胞の増殖を阻害、かつ／あるいは死滅させる抗体である。疾病に感染した哺乳動物の疾病の微候を防ぐ、または弱めるのに十分阻害された場合、細菌の増殖にインビボで著しく阻害される。

抗原として100kDまたは95kD蛋白質または機能性アナログを含有するワクチンを、本発明に従って淋菌または髄膜炎菌の増殖を阻害または死滅させるのに用いてもよい。このための100kDまたは95kD蛋白質の機能性アナログとしては、ヒト宿主などの哺乳動物宿主内で中和抗体を産生するフラグメントおよび置換、付加または欠失突然変異体が挙げられる。

【0059】

本発明では、さらに、ヒトを含む哺乳動物を *N. gonorrhoeae* および *N. meningitidis* による感染に対して免疫するためのワクチン組成物を包含する。該ワクチンは、*N. gonorrhoeae* 由来の100kDトランスフェリンレセプターおよび／または *N. meningitidis* 由来の95kDトランスフェリンレセプターおよび薬学的に許容されるアジュバントを含有する。100kDおよび95kD蛋白質の代わりに、上記のような機能性アナログを代用してもよい。

10

【0060】

ワクチンは適当なキャリア中の抗原を含有する。ワクチンはムラミルペプチドおよびインターフェロン、インターロイキン - 1 およびインターロイキン - 6 等のリンフォカインなどのアジュバンドを含んでもよい。抗原は、あるいは当技術分野において公知であるように酸化アルミニウム粒子等の適当な粒子に吸着していてもよいし、リボソームに包まれていてもよい。

20

【0061】

抗原はまた、*S. typhimurium* のようなサルモネラ (*Salmonella*) の無発病性の細菌株から誘導されてもよい。そのようなワクチンは、当技術分野で公知であるように、サルモネラ菌株におけるトランスフェリン結合蛋白質の活性蛋白質を含むクローン化DNAによって調製されてもよい (例えば、Curtiss ら, *Vaccine* 6, 155-160(1988) および Galan ら, *Gene* 94, 29-35(1990) 参照のこと)。

【0062】

本発明は、さらにヒトを含む宿主哺乳動物を上記のワクチン組成物で免疫する方法を包含するものである。該ワクチンは、当技術分野で公知の方法により哺乳動物に投与してもよい。そのような方法としては、例えば、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内投与が挙げられる。

30

【0063】

ワクチン組成物は、100kD蛋白質または95kD蛋白質全体を含有していてもよいが、好ましくは100kDまたは95kD蛋白質の非毒性フラグメントを含有している。例えば、抗原性蛋白質のフラグメントを作製し、抗原性部位を含有するそれらのフラグメントを決定することは十分公知である。抗原性があり非毒性であれば、フラグメントの長さは特に限定されない。したがって、該フラグメントはエピトープを決定するのに十分なアミノ酸残基を含有していなければならない。既知の抗原性ポリペプチドから抗原性フラグメントを単離および同定する方法は、Salfeld らによる *J. Virol.* 63, 798-808(1989) および Isola らによる *J. Virol.* 63, 2325-2334(1989) に記載されている。

40

【0064】

フラグメントが、エピトープは決定するが、短すぎて抗原性がない場合には、キャリア分子にコンジュゲートしてもよい。いくつかの適当なキャリア分子としては、キーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) およびウシ血清アルブミンが挙げられる。コンジュゲーションは当技術分野で公知の方法により行ってもよい。そのような方法の一つは、フラグメントのシステイン残基をキャリア分子上のシステイン残基と結合することである。

【0065】

処置用抗体

さらに、本発明は、本発明の蛋白質および機能性アナログを特異的に認識し結合する中和

50

抗体の単離を包含するものである。該抗体はポリクローナルまたはモノクローナルでもよい。中和抗体およびワクチンとのコンジュゲートに用いられる機能性アナログの定義（上記参照）は、さらに中和抗体の作製にも適用される。

【0066】

ポリクローナル抗体は、当技術分野で公知の方法により蛋白質または機能性アナログが接種された哺乳動物から単離される。モノクローナル抗体は、当技術分野で公知の方法により作製されてもよい。これらの方法としては、KohlerおよびMilsteinのNature 256, 495-497(1975)に記載の免疫学的方法およびHuseらのScience 246, 1275-1281(1989)に記載の組換えDNA法が挙げられる。

【0067】

本発明はまた、N. gonorrhoeaeまたはN. meningitidisにより引き起こされる疾病に冒されている哺乳動物（ヒトを含む）を、本発明の中和抗体をそのような哺乳動物に有効量投与することにより処置する方法をも包含するものである。投与は、上記のようなワクチンの投与と同様の方法により行ってもよい。

【0068】

プローブとしての抗体

本発明のトランスフェリン結合蛋白質および機能性アナログはまた、試料中のNeisseria gonorrhoeaeまたはNeisseria meningitidisの存在の検出用プローブとして用いる抗体の作製に用いられてもよい。該抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってもよい。この目的のためには、機能性アナログは、試料中の100kDまたは95kD蛋白質の存在が検出可能な抗体を産生するものであれば、100kD蛋白質または95kD蛋白質のフラグメントおよび置換、付加および欠失突然変異体であってもよい。該試料は、例えば、N. gonorrhoeaeまたはN. meningitidisに感染していると思われる哺乳動物（ヒトを含む）の体液であってもよい。

【0069】

抗体で蛋白質の存在を検出するアッセイは、先に記載しており、続いて標準プロットおよびELISAフォーマット等の公知のフォーマットを行う。これらのフォーマットは、通常、抗体を95kDまたは100kD蛋白質を含有すると思われる試料とインキュベートし、抗体と蛋白質の複合体の存在を検出することである。抗体はインキュベーション工程前、インキュベーション工程中、あるいはインキュベーション工程後のいずれかの段階において標識化される。好ましくは、蛋白質は検出前に固定化される。固定化は、蛋白質をマイクロタイターウェル等の固相表面に直接結合させるか、あるいは蛋白質を固定化抗体に結合させることにより達成されてもよい。

【0070】

プローブとして用いた場合、抗体は通常、当技術分野で公知の方法により標識化される。蛋白質に有用な標識（上記参照）と同様の標識もまた、抗体の標識として有用である。抗体を標識化する方法は、例えば、HunterおよびGreenwoodによるNature 144, 945(1962)およびDavidらによるBiochemistry 13, 1014-1021(1974)に記載されている。それ以外の抗体を標識化する方法が米国特許第3,940,475号および同第3,645,090号に記載されている。

【0071】

プローブとしての核酸分子

N. gonorrhoeaeまたはN. meningitidisの存在を検出するために、特定の配列を有する100kD蛋白質、95kD蛋白質、あるいは100kDまたは95kD蛋白質のフラグメントをコード化する核酸分子を用いることができる。核酸分子はRNAでもDNAでもよい。

【0072】

核酸分子プローブが試料中の特定の核酸分子を認識するかどうかを決定する方法は、当技術分野では公知である。通常、試料中に存在すると思われる核酸配列と相補的な標識化プローブが調製される。好ましくは、目的とする核酸分子が固定化される。目的の核酸分子にハイブリダイズしたプローブの存在は、試料中の核酸分子の存在を示すものである。適

10

20

30

40

50

当な方法の例が、Dallasらによる"The Characterization of an Escherichia Coli Plasmid Determinant that Encodes for the Production of a Heat-labile Enterotoxin."(K. N. Timmis およびA.Puehler 編, Plasmids of Medical, Environmental, and Commercial Importance, Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 113-122 頁(1975) ; Grunstein およびHogness によるProc. Natl. Acad. Sci USA 72, 3961-3965(1975) ; Palva らによる米国特許第4,731,325号(Orion-yhtyma, Espoo, Finlandに譲渡されている。); Mullisらによる米国特許第4,683,195号(Cetus Corporation, Emeryville, Californiaに譲渡されている。); Schneiderらによる米国特許第4,882,269号(Princeton Universityに譲渡されている。); およびSegevによるPCT出願WO 90/01069号に記載されている。Schneiderらの特許およびSegevの出願は、共にImClone Systems Inc., New York City

10

【0073】

上記のプロープは当技術分野で公知の方法により標識化される。オリゴヌクレオチドのプロープを標識化する方法は、例えば、Leary ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1983)80: 4045; RenzおよびKurz, Nucl. Acids Res. (1984) 12: 3435; RichardsonおよびGumport, Nucl. Acids Res. (1983) 11: 6167; Smithら, Nucl. Acids Res. (1985)13: 2399; およびMeinkothおよびWahl, Anal. Biochem.(1984) 138: 267 に記載されている。

【0074】

【実施例】

1. 細菌株および培養条件

20

淋菌株FA19は、冷凍保存からGCB寒天に移し、1 lのGCB肉汁を含有するフラスコへの接種用として初濃度20KU (Klett units)とする。培養は5%のCO₂を伴って37℃で激しく攪拌しながら40KUの濃度に達するまで行い、キレート剤、すなわちデスフェラル(desferal)を最終濃度が50μMとなるように添加する。添加後、細胞を4時間保存する。

【0075】

髄膜炎菌株FAM20は、GCBおよびデスフェラルの代わりにケレックス(Chelex)処理したCDMを用いる以外は淋菌株FA19と同様の方法により調製する。

【0076】

2 a. 淋菌トランスフェリン結合蛋白質のアフィニティ精製

膜の調製法並びに淋菌トランスフェリン結合蛋白質の単離および精製法は、Schryvers およびMorris(Infected and Immun. 56, 1144-1149(1988))の髄膜炎菌ラクトフェリン結合蛋白質で用いた方法と同様である。Schryvers およびMorrisの報告文に記載されているこの方法は、ここに参考文献として挙げられる。SchryversおよびMorrisの方法を以下のように修飾した。625μgのビオチニル化トランスフェリン(ビオチニレーション反応剤としてPierce製ビオチン-S-S-NHSを用いてSchryversの方法により調製される。)を、25mlの100mM NaCl / 50mM トリス (pH8.0) 中で、25mgの淋菌株FA19由来の総膜蛋白質と混合する。混合物はゆっくり攪拌しながら室温で1時間インキュベートする。膜は17,000×gで10分遠心分離してペレットにする。ペレットは25mlの100mM NaCl / 50mM トリス (pH8.0) に再懸濁し、続いてNa₂ EDTAを最終濃度が10mMとなるように、またN-ラウロイル-サルコシンを最終濃度が0.75%となるように添加する。膜は、室温で10分間攪拌して可溶化される。2.5mlのストレプトアビジン-アガロース(Sigma製)を添加し、室温で1時間結合させる。樹脂を3000×gで5分間遠心分離し、上清を除去し、樹脂を5mM EDTAおよび0.5% N-ラウロイル-サルコシンを添加した1M NaCl / 50mM トリス (pH8.0) 中で2度洗浄した後、さらに何も添加されていない1M NaCl / 50mM トリス (pH8.0) 中で2度洗浄する。蛋白質は、0.45% N-ラウロイル-サルコシンおよび125mM β-メルカプトエタノールを添加した1M NaCl / 50mM トリス (pH8.0) によりマトリックスから溶出する。

30

40

【0077】

2 b. 髄膜炎菌トランスフェリン結合蛋白質のアフィニティ精製

淋菌株FA19の代わりに髄膜炎菌株FAM20を用いる以外は、実施例2 aと同様に操作を行う。

50

【 0 0 7 8 】

3 a . 淋菌トランスフェリン結合蛋白質の単離

アフィニティ調製による溶出物（実施例 2 a）をアミコン・コンセンレーター（Amicon concentrator）（30,000MW分画）を用いて濃縮する。得られた濃縮蛋白質調製物を20%グリセロール、4% SDS、130mM トリス（pH8.0）、10ug/mlプロモフェノール・ブルーに可溶化し、Laemmli（Nature, 227, 680-685(1970)）の方法にしたがって7.5% SDS - ポリアクリルアミドゲル上で分離する。ゲルはクーマシー・ブリリアント・ブルー（Coomassie Brilliant Blue）で染色し、蛋白質が見えるようにする。この方法により2種類の蛋白質が単一のバンドとして分離される。トランスフェリンの分子量はおよそ80kDである。トランスフェリン結合蛋白質の分子量はおよそ100kDである。100kD蛋白質のバンドは、切り出して凍結乾燥し、冷浸する。 10

【 0 0 7 9 】

3 b . 髄膜炎菌トランスフェリン結合蛋白質の単離

実施例 2 a の溶出物の代わりに実施例 2 b の溶出物を用いる以外は、実施例 3 A と同様の操作を行う。

【 0 0 8 0 】

4 . トランスフェリン結合蛋白質に対する抗血清

実施例 3 a および 3 b で得られた微細粉末を別々に生理的食塩水に再懸濁し、同量のフロインドのアジュバント（初回注射用として完全アジュバント；追加注射用としては不完全アジュバント）と混合し、ニュー・イングランド・ホワイト（New England White）種のメスのウサギに注射する。注射は2週間の間隔で行う。抗100kD蛋白質抗体は、精製されたトランスフェリン結合蛋白質に対するウエスタンブロッティングにより、3回目の注射から2週間後に検出できる。 20

【 0 0 8 1 】

5 a . 淋菌 DNA λ - gt10 発現ライブラリー

淋菌株 FA19 由来の染色体 DNA は、Seifert ら, J. Bacteriol. 172, 40-46(1990)にしたがって単離され、標準的な操作（Maniatis ら, 1982）により超音波処理されて、平均サイズが500bpのフラグメントを得る。EcoRI リンカーを添加し、得られたフラグメントをEcoRI 消化 λ - gt10 DNA に連結させる（Maniatis ら, 1982）。連結された DNA はPromega 製キットを用いてパッケージされる。 30

【 0 0 8 2 】

5 b . 髄膜炎菌 DNA λ - gt10 発現ライブラリー

髄膜炎菌株 FAM20 由来の染色体 DNA は、Seifert ら, J. Bacteriol. 172, 40-46(1990)にしたがって単離され、制限エンドヌクレアーゼHincIIで消化される。EcoRI リンカーを添加し、得られた DNA 分子をEcoRI で消化して、EcoRI 消化 λ - Zap(Stratagene製)に連結させる。連結された DNA はPromega 製キットを用いてパッケージされる。

【 0 0 8 3 】

6 a . 発現ライブラリーの免疫学的スクリーニング

実施例 5 a および 5 b のライブラリーから得られたおよそ500,000のプラークを、ピコブルー・イムノロジカル・スクリーニング・キット（Picoblu Immunological Screening Kit）に添付されているStratageneのプロトコールに記載されている免疫学的スクリーニング法により選別する。要約すると、一次抗血清をStratagene製（La Jolla, CA）より入手可能なE. coli / ファージ溶解物に、添付のプロトコールにしたがって吸着される。およそ 5×10^4 pfu（プラーク形成単位；plaque forming units）をE. coli 宿主菌株であるY1090にプレートする。10mMのイソロピルチオガラクトシド（IPTG）に浸漬したニトロセルロースフィルターをプレートにのせ、続いて42℃で3～4時間インキュベートする。そして、フィルターを除去した後でプレートを一晩インキュベートし、トリス緩衝化生理食塩水および0.05% ツイーン（Tween）- 20（TBST）で洗浄して、トリス緩衝化生理食塩水および5% ウシ血清アルブミンで1時間ブロックする。その後、1：200に希釈した吸着一次抗体でフィルターを1時間インキュベートする。一次抗体と共にインキュベートした後 50

、フィルターをTBSTで十分洗浄し、それから二次抗体（１：３０００に希釈したアルカリ性フォスファターゼとコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体、Bio-Radより購入）で１時間インキュベートする。その後、フィルターをTBSTで十分洗浄し、最後に０．３mg/mlニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、０．１５mg/ml ５-プロモ-４-クロロ-３-インドイルフォスフェート（BCIP）、１００mM トリス（pH9.8）、１００mM NaCl、５mM MgCl₂で十分に発色展開するまでインキュベートする。

【００８４】

トランスフェリン結合蛋白質特異的抗血清に結合しているプラークを採取し、その他の非反応プラークから純別する。精製プラーク由来のDNAを単離し、陰イオン交換クロマトグラフィー（Qiagen, Studio City, CAより購入のカラム）を用いて精製する。

10

【００８５】

6b. DNAプローブを用いた発現ライブラリーのスクリーニング

実施例5aおよび5bのライブラリーから得られたプラークもまた、標識化DNAプローブを用いて選別される。オリゴマー-TfBP1、2、3または5は、ジゴキシジェニン-11-dUTPおよびDNAテイリングキット（共に、Boehringer Mannheim Biochemicals（BMB）製）を用いて非放射性的に標識化される。オリゴマーの配列は以下のとおりである：

【００８６】

TFBP1 : GAG CCC CCC AAT GCG CCG CT

TFBP2 : AGC GGC GCA TTG GCG GGC TC

TFBP3 : GGG GCG CAT CGG CGG TGC GG

TFBP5 : AAA ACA GTT GGA TAC CAT AC

20

【００８７】

DNA標識化および検出のプロトコールはBMBより遺伝子非放射性DNA標識・検出キット（Genius nonradioactive DNA labeling and detecting kit）として入手可能である。一方、同様のオリゴマーは標準的な技術によりα-32p-dCTPおよびBMBのDNAテイリングキットを用いて放射性に標識化される（Maniatisら、1982）。

【００８８】

7. DNAの増幅および塩基配列決定

実施例5または6で得られたDNAは、PCR法（Sambrookら編、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Press(1989)）によりλ-gt10特異性オリゴマーをアンプライマーとして用いて増幅される。したがって、増幅される挿入部は、ブルースクリプトベクター（Bluescript vector）（Stratagene製）中で、標準的な技術（Maniatisら、1982）を用いてクローン化され、Sangerら（Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 5463-5467(1977)）のジデオキシ・チェーン・ターミネーティング法によりシーケナーゼ（United States Biochemical Corp. 製、Cleveland, OH）を用いて塩基配列が決定される。

30

【００８９】

8. 淋菌株FA19由来の100kDトランスフェリン結合蛋白質遺伝子の付加的なヌクレオチド配列

実施例6および7の一般的な方法を用いて、およそ1.0kbpの染色体Sau3AIフラグメントを同定する。このフラグメントをベクターpHSS6-GCUのBamHI部位にクローン化する（Elkinsら、V. Bacteriol., 173, 3911-3913(1991)）（GCUとは、淋菌取り込み配列（gonococcal uptake sequence）として知られている10bpのヌクレオチド配列がベクターに含有されていることを意味する。）。このヌクレオチド配列は、淋菌への種特異的なDNAの取り込みを仲介することが知られている（Elkinsら）。このクローニングのための宿主菌株はHB101であった。得られたクローンはpUNCH403であることが知られている。

40

【００９０】

pUNCH403の挿入部は、KraftらによるBiotechniques 6, 554-556(1988)に記載される方法により、二本鎖鋳型を用いてその全体が配列決定される。ヌクレオチド配列は、シーケナーゼ（Sequenase,登録商標）（United States Biochemicals製）を用いて、Sangerのジデ

50

オキシ法により決定される。pUNCH403中のSau3AIフラグメントのヌクレオチド配列を図2 Aに示す。図2 Aの1～558番目のヌクレオチドの配列は、pUNCH401とpUNCH402(図1)およびpUNCH403(図2 A)の重複部位を示している。ヌクレオチド659番目からヌクレオチド1番目に向かう一つのオープンリーディングフレームが存在する。したがって、メチオニン残基をコード化するヌクレオチド659番目(図2 Aに示されるものと相補的な鎖上)から始まるコдонは遺伝子の5'末端である。

【0091】

9. 100kDトランスフェリン結合蛋白質の構造および機能の証明

100kD トランスフェリン結合蛋白質遺伝子の不活性化の効果を調べるために、SeifertらによるGenetic Engineering, Principals and Methods およびSetlow, J. K. およびHoller, A. 編のPlenum Press, N. Y., 第8巻, 123-134 頁に記載のプロトコールにしたがって、トランスポゾン挿入部をpUNCH403の挿入部の長さに合わせて単離する。mTn3CATトランスポゾンをシャトル突然変異誘起により*E. coli*に挿入し、それから突然変異体を作製するためにFA19においてクロラムフェニコール耐性形質転換体を選択する。mTn3CATトランスポゾンについては、Seifertらによりm-Tn3(Cm)として述べられている。その後、突然変異体を、唯一の鉄供給源としてのトランスフェリン上での増殖能力およびウエスタンブロットによりアッセイされる100kD蛋白質の発現能力により評価する。その実験の結果を図3に示す。「I」の44、37および24で示される位置にあるトランスポゾン100kD蛋白質の発現およびトランスフェリン上での増殖能力を共に失わせる。しかしながら、「A」位置にあるトランスポゾンはトランスフェリン上で幾分か増殖させ、いくつかの検出可能な元来の長さのトランスフェリン結合蛋白質を発現させる。これらの結果より、659位(図2 A参照)にある逆向きの挿入部は野生型の長さの蛋白質を発現させるので、100kD蛋白質をコード化している構造遺伝子はこの位置から始まる、という仮定が確認される。発現が、突然変異体「A」中の野生型レベルで検出されないという事実から、推定上の開始コдонの逆向きの領域が100kD蛋白質をコードする遺伝子の調節に重要であることがわかる。

【0092】

10. 髄膜炎菌ゲノムライブラリーの構築および選別

95kD髄膜炎菌トランスフェリン結合蛋白質遺伝子は3工程でクローン化された。第1工程では、淋菌の抗血清を用いて、λ-ZapIIライブラリー由来の1.3kbのHincII/EcoRIフラグメントを同定した(図4参照)。このフラグメントのヌクレオチド配列を図5に示す。推定上の開始コдонを矢印で示すが、これはまた転写の方向を示すものでもある。先に述べたリボソーム結合部位には下線を引いてある。1.3kbフラグメントには約500bpの95kD蛋白質構造遺伝子が含まれている。このクローンは、髄膜炎菌株FAM20 染色体の単一の5 kb ClaIフラグメントにハイブリダイズした。ベクターpHSS6-GCU(実施例8に記載)における部分的な5 kb ClaIライブラリーが構築され、プローブとして1.3kbフラグメントを用いて5 kb ClaIフラグメントをクローン化した。このClaIフラグメントの部分制限地図により、このフラグメントは構造遺伝子船隊をコードしないことが示唆された。したがって、第3工程において、3.5kbのClaI/EcoRIフラグメント(第2工程で得られた5 kbのClaIフラグメントから産生)をプローブとして用いたところ、λ-ZapIIライブラリー(Stragagene製)由来の隣接するHincIIフラグメントのクローニングが行われた。このHincIIフラグメントは約3.5kbの長さであり、おそらく95kD蛋白質構造遺伝子の残部をコードするものである。この3.5kb HincIIフラグメントは、E. Ozkaynak およびS. D. PutneyによるBiotechniques 5,770(1987)に記載されているように、エクソヌクレアーゼ(Exonuclease) IIIおよびVIIを用いて一定方向性の欠失を起こすことにより、ヌクレオチド配列が決定された。

【0093】

11. 95kDトランスフェリン結合蛋白質の構造および機能の証明

髄膜炎菌の95kD蛋白質遺伝子を突然変異させるために、1.3kb のHincII/EcoRIフラグメントを用いた。mTn3CATトランスポゾンの代わりにmTn3ermトランスポゾンを1.3kbクロー

ンに導入した以外は、実施例 9 に記載されているのと同様のシャトル突然変異操作を用いた。mTn3ermトランスポゾン、実施例 9 に記載の mTn3CAT トランスポゾンを修飾してエリスロマイシン耐性を付与することにより作製された。この修飾によりエリスロマイシン耐性髄膜炎菌形質転換体を選択できるようになる。これらの形質転換体は、実施例 9 で記載されたようなトランスフェリンプレート上での増殖能力により選別された。この突然変異誘起実験の結果を図 6 に詳細に示す。mTn3erm挿入部および 2 は、95kD 蛋白質の発現およびトランスフェリンプレート上でのクローンの増殖能力を完全に失わせたが、mTn3erm挿入部 3 および 4 は、トランスフェリン上での増殖が幾分が見られ、ウエスタンブロット上にいくらかの 95kD 蛋白質を示した。ヌクレオチド配列決定および突然変異誘起のデータから鑑みて、mTn3erm挿入部 1 および 2 は、各々構造遺伝子およびプロモーター領域中に存在することは明らかであるが、一方、挿入部 3 および 4 は、発現の正の調節領域に含まれるであろう逆向きの領域中に存在すると思われる。

10

【 0 0 9 4 】

補足引用文献

請求の範囲に記載の発明は、明細書および容易に入手可能な引用文献および出発物質にしたがって実施可能である。しかし、発明の実施および利用が容易になるように、以下の細胞系を American Type Culture Collection, Bethesda, Maryland に 1990 年 7 月 16 日に寄託している：

髄膜炎菌細胞系 FAM18 (取得番号 ATCC 55071)

髄膜炎菌細胞系 FAM20 (取得番号 ATCC 55072)

20

淋菌細胞系 FA19 (取得番号 ATCC 55073)。

さらに、有用なプロトコールおよび情報を含む以下のパンフレットが本明細書のファイルヒストリーで利用できる。

"Predigested Lambda Zap/Eco RI Cloning Kit Instruction Manual," Stratagene, La Jolla, California (November 20, 1987) ;

"Gigapack Plus" (for packaging recombinant lambda phage), Stratagene, La Jolla, California (April 25, 1988) ;

"picoBlue Immunoscreening Kit" Instruction Manual, "Stratagene, La Jolla, California (May 19, 1989) ; および

"Genius Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit," Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana (January, 1989)。

30

【 0 0 9 5 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL

<120> TRANSFERRIN BINDING PROTEINS FROM NEISSERIA GONORRHOEAE

AND NEISSERIA MENINGITIDIS

<130> P01971505

<140>

<141> 1991-08-23

40

<150> US 572,187

<151> 1990-08-23

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 558

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 1

agcaaagcct ccgcaccgcc gatgcgcccc gccagcgcca tggattgggt aagcccccg 60

50

```

tttttgccgg aataggcggt ttactctga atgccccact gcctgccttc cccgataaca 120
tcgtcggcgg ttttggtttg aaatgcgacc gagcccgcca atgcgccgct gccttggttcg 180
accgagtttg agcctttgct gatttcgaca gccttgacgt tctcatactc gatttcattg 240
attgcgccgc tgctgccgcg cgtcctcgtc ccgccaatg ccgcctgcgc gtgtaggact 300
gtatttgcg ccaagccgtcc accgtcaagg agacgcggtt tttgtccata ccgcgtatcg 360
agtagcccga gcttgccgcg cgcctctgtt cgacgacggc gatgccgggg tcgtaacgcg 420
tcaggtcgcg gatgtcgagt acctgttcct tgctggaggg tgcggcggt tttgaccaat 480
ttgccc aaac cggttacttc gttatcgcg cgggttttct gttttttggc ttttacctgt 540
atgggtatcca actgtttt                                     558

```

<210> 2

<211> 918

<212> DNA

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 2

```

agcaaagcct ccgcaccgcc gatgcgcccc gccagcgcca tggattgggt aagcccccg 60
tttttgccgg aataggcggt ttactctga atgccccact gcctgccttc cccgataaca 120
tcgtcggcgg ttttggtttg aaatgcgacc gagcccgcca atgcgccgct gccttggttcg 180
accgagtttg agcctttgct gatttcgaca gccttgacgt tctcatactc gatttcattg 240
attgcgccgc tgctgccgcg cgtcctcgtc ccgccaatg ccgcctgcgc gtgtaggact 300
gtatttgcg ccaagccgtcc accgtcaagg agacgcggtt tttgtccata ccgcgtatcg 360
agtagcccga gcttgccgcg cgcctctgtt cgacgacggc gatgccgggg tcgtaacgcg 420
tcaggtcgcg gatgtcgagt acctgttcct tgctggaggg tgcggcggt tttgaccaat 480
ttgccc aaac cggttacttc gttatcgcg cgggttttct gttttttggc ttttacctgt 540
atgggtatcca actgtttttt ctgtgcttgt ccggcttgca cttttctgc ataagcgggc 600
agcgcagtca ttaaagacag gcataaaata tttaatcgga acaaagtgtg ctgttgcata 660
gtgtttccct aatcttcgct ttcagacgga atcggaagga acgatgccgt ctgaagcctt 720
attctcgatt gttgttcggc agcgtgtctt atttcacaag cttttggcgt ttcgcaccga 780
atacgacagt tgactgtctt gctgaatttc cattgccgga ttcaactgtt gcatttttcg 840
tttgttcatt gcccgatag gcaaaccatc cgcccaactc ttcggcggtt ggcccgtaaa 900
aaccgccctg cacttcgg                                     918

```

<210> 3

<211> 1192

<212> DNA

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 3

```

aatccgacg gaggaggact ttactgctg ccgtctgagg gcaataaggc ggcatttcag 60
cacgagattg agcaaaacgg cgtgaaggca acggtgtgtt gttccaactt ggattacatg 120
agttttggga agctgtcaaa agaaaaataa gacgatatgt tcctgcaagg tgtccgcact 180
cctgtatccg atgtggcggc aaggacggag caaacgccaa atatcgcggt acttggtacg 240
gatatatatg caacggcaca agctggagcg cgaagcctcc aatcaggaag gtggtaatag 300
ggcagagttt gacgtggatt tttccactaa aaaaatcagt ggcacactga cggcaaaaga 360
ccgtacgtct cctgcgttta ctattactgc catgattaag gacaacggtt tttcagggtgt 420
ggcgaaaacc ggtgaaaacg gctttgcgct ggatccgcaa aataccggaa attccacta 480
tacgcatatt gaagccactg tatccggctg gtttctacgg caaaaacgcc atcgagatgg 540
gcggattcgt tctcatttcc gggaaatgca ccagagggaa aacaagaaaa agcatcggtg 600
gtattcggtg cgaaacgcc aacagcttgt caataagcac ggctgccgaa caatcgagaa 660
taaggcttca gacggcacgt tccttccgat gccgtctgaa agcgaagatt agggaaacat 720
catgcaacag caacatttgt tccgattaaa tattttatgc ctgtctttta tgaccgcgcg 780
ctgcccgttt atgcagaaaa tgtgcaagcc gaacaagcac aggaaaaaca gttggatacc 840
atacaggtaa aagccaaaaa acagaaaacc cgccgcgata acgaagtaac cgggctgggc 900

```

aagttggtca agtcttccga tacgctaagt aaagaacagg ttttgaatat ccgagacctg 960
 acccggtatg atccggtatt gccgtggtcg aacagggtcg gggcgcaagt tcggctattc 1020
 aatacgcggc atggataaaa accgctttc cttaacggta gacggcgttt cgcaaataca 1080
 gtcctacacc gcgcaggcgg cattgggtgg gacgaggacg gcgggtacga gcggcgcaat 1140
 caatgaaatc gagtatgaaa acgtcaaggc cgttgaaatc agcaagggtt cg 1192

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:Designed probe based on Neisseria gonorrhoeae

<400> 4

gagcccccca atgcgccgct 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed probe based on Neisseria gonorrhoeae 20

<400> 5

agcggcgcat tggcgggctc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed probe based on Neisseria gonorrhoeae 30

<400> 6

ggggcgcatc ggcggtgcgg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed probe based on Neisseria gonorrhoeae

<400> 7

40

aaaacagttg gataccatac 20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 pUNCH401およびpUNCH402挿入部から得られる淋菌株FA19由来の100kD蛋白質遺伝子の部分DNAヌクレオチド配列を示す。実施例6aおよび実施例7を参照のこと。

【図 2 A】 pUNCH403挿入部における100kDトランスフェリン結合蛋白質遺伝子フラグメントのヌクレオチド配列を示す。大文字は、クローンpUNCH401およびpUNCH402（図1）およびpUNCH403間での重複領域を示す。100kD淋菌トランスフェリン結合蛋白質の提案される開示コドンは、659番目のヌクレオチドで生じる。オープンリーディングフレームの方向は、図で示される方向とは逆（すなわち、659番目から1番目のヌクレオチドに向かう方法）である。実施例8を参照のこと。

50

【図 2 B】 3.2kbのHincIIフラグメントの制限酵素地図を示す。

【図 3】 pUNCH403における100kD淋菌トランスフェリン結合蛋白質フラグメントのトランスポゾン挿入部および各突然変異体の相当する表現型の位置を示す。トランスポゾン (mTn3CAT) はシャトル突然変異誘起により *E. coli* に挿入された。突然変異体を作製するために、FA19においてクロラムフェニコール耐性形質転換体を選択した。各トランスポゾン挿入部 (逆三角形で示す。) の下に、2.5uMヒトトランスフェリン (鉄で25%が飽和されている。) 上で増殖およびウエスタンブロットによりアッセイされる蛋白質の発現を + または - で示す。波線矢印で示されるオープンリーディングフレームは、右から左へ (図 2 A での方向性と同じ。) 読み取り、Mで示されるメチオニンで開始される。典型的な - 10ヌクレオチド配列が見出されたが (- 10)、規範的な - 35ヌクレオチド配列は同定できなかった。野生型の増殖および蛋白質の発現は、右側に「No Tn」の見出しの下に示す。

【図 4】 髄膜炎菌95kDトランスフェリン結合蛋白質遺伝子のクローニング化計画を示すものである。1.3kbのHincII / EcoRI フラグメントは、抗体プローブを用いて、λ - ZapIIライブラリーよりクローン化された。第 2 工程で示される5.0kbおよび3.5kbフラグメントは、プローブとして該1.3kbフラグメントを用いて、pHSS6-GCU のClnIライブラリーの一部分からクローン化された。第 3 工程の3.5kbのHincIIフラグメントは、第 2 工程の3.5kbのEcoRI / ClnI フラグメントをプローブとして用いて、λ - ZapIIライブラリーからクローン化された。第 1 ~ 3 工程で得られたフラグメントは、「FAM20染色体」と見出しの付いたフラグメントで示されるように、共に適合する。

【図 5】 図 4 の第 1 工程で得られた1.3kbのHincII / EcoRI フラグメントのヌクレオチド系列を示す。リボソーム結合部位には下線を引いてある。ATG開始コドンおよび転写方向は矢印で示す。実施例10を参照のこと。

【図 6】 図 4 の第 1 工程で得られた1.3kbのHincII / EcoRI フラグメントを含むトランスポゾン突然変異誘起実験の結果を示す。実施例11を参照のこと。

【図 1】

```

1  AGCAAAGCCT CGCACCAGCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT
51  AAGCCCCCGG TTTTGGCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCACT
101 GCCTGCCTTC CCGATAACA TCGTCGGCGG TTTTGGTTTG AAATGCGACC
151 GAGCCCGCCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTTC ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT
201 GATTTTCGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTCATTG ATTGCGCCGC
251 TGCTGCCCGC CGTCTCGTC CCGCCCAATG CCGCTGCGC GTGTAGGACT
301 GTATTTCGCG CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA
351 CCGCGTATCG AGTAGCCCGA GCTTGCGCGC CGCCCTGTIT CGACGACGGC
401 GATGCCCGGG TCGTAACGGC TCAGGTGCGG GATGTCGAGT ACCTGTTCCT
451 TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT TTGCCCAAC CGGTIATCTC
501 GTTATCGCGG CGGGTTTCTT GTTTTGTGGC TTTTACCTGT ATGTAATCCA
551 ACTGTTTT

```

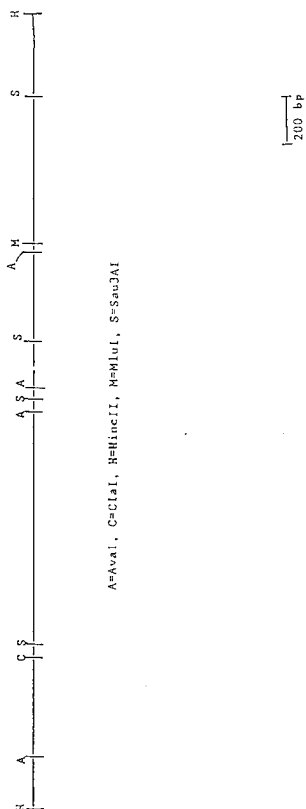
【図 2 A】

```

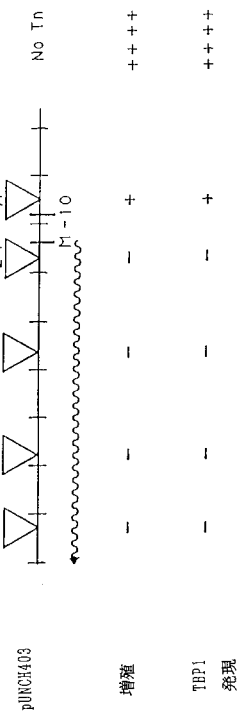
1  AGCAAAGCCT CGCACCAGCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT
51  AAGCCCCCGG TTTTGGCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCACT
101 GCCTGCCTTC CCGATAACA TCGTCGGCGG TTTTGGTTTG AAATGCGACC
151 GAGCCCGCCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTTC ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT
201 GATTTTCGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTCATTG ATTGCGCCGC
251 TGCTGCCCGC CGTCTCGTC CCGCCCAATG CCGCTGCGC GTGTAGGACT
301 GTATTTCGCG CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA
351 CCGCGTATCG AGTAGCCCGA GCTTGCGCGC CGCCCTGTIT CGACGACGGC
401 GATGCCCGGG TCGTAACGGC TCAGGTGCGG GATGTCGAGT ACCTGTTCCT
451 TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT TTGCCCAAC CGGTIATCTC
501 GTTATCGCGG CGGGTTTCTT GTTTTGTGGC TTTTACCTGT ATGTAATCCA
551 ACTGTTTTtc ctgtccttgt ccggtttgca ctttttcgc ataaagggc
601 agcgagtc ttaaagacag gcataaasta ttaacgga acaaatgtt
651 ctgttcgata gtgtttccct aatcttcgct ttcagacgga atcggaagg
701 acgatgcgt ctgaagcctt attctcgatt gttgttcgac agcgtgctt
751 atttcacaag cttttggcgt ttgcaccga atacgacagt tgcactgctt
801 gctgaatttc cattgccgga ttcaactgtt gcatttttcg ttgtttcatt
851 gccggatag gcaaacccatc cgcccaactc ttccggcgta ggcgcgtaaa
901 aaccgcccgt cacttcgg

```

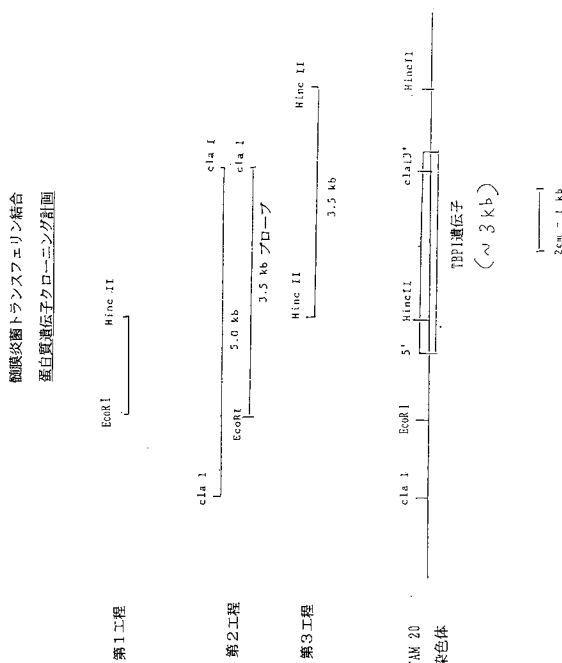
【 図 2 B 】



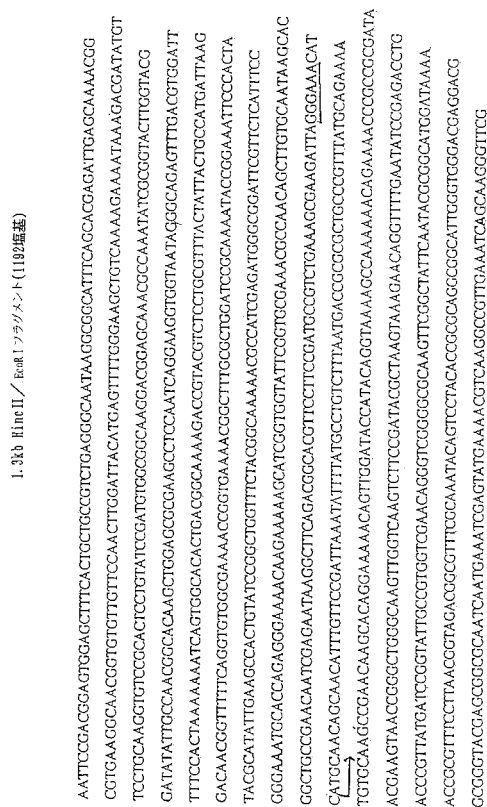
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



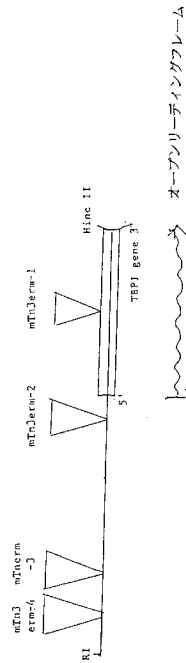
【図 6】

1. 3kbフラグメントのトランスポゾン突然変異誘起

$+/-$	$+/-$	---	---	TBP I 発現
-------	-------	-----	-----	----------

トランススクリプションでの増殖

$+/-$	$+/-$	---	---	
-------	-------	-----	-----	--



- 増殖またはTBP Iがないことを表す
 $+/-$ わずかな増殖および少量のTBP Iを表す

1 cm = 100 bp

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	C 0 7 K 14/22	

(74)代理人 100101317

弁理士 的場 ひろみ

(72)発明者 スパーリング, ピー., フレデリック

アメリカ合衆国 2 7 5 5 9 ノースカロライナ州, モンキュア, ボックス 9 8 0, ルート 1

(72)発明者 コーネリセン, シンチア, ナウ

アメリカ合衆国 2 7 6 0 6 ノースカロライナ州, ラレイ, マーシ アベニュー 3 0 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA01 CA06 CA09 DA06 EA04 FA10 GA11 HA01

HA03

4C085 AA03 BA16 BB11 CC07 DD86

4H045 AA30 BA10 CA11 DA50 EA20 FA73 FA74 GA26 HA06

专利名称(译)	Neisseriagonorrhoeae和Neisseriameningitidis衍生的转铁蛋白结合蛋白		
公开(公告)号	JP2005239548A	公开(公告)日	2005-09-08
申请号	JP2003141370	申请日	2003-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学教堂山分校		
申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学教堂山分校		
[标]发明人	スパーリングピーフレデリック コーネリセンシンチアナウ		
发明人	スパーリング,ピー.,フレデリック コーネリセン,シンチア,ナウ		
IPC分类号	A61K39/00 A61K39/095 A61K39/395 A61P9/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P39/02 A61P43/00 C07K1/22 C07K14/005 C07K14/195 C07K14/22 C07K14/41 C07K14/705 C07K14/715 C07K16/00 C07K16/12 C12N1/21 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12R1/19 C12R1/36 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/90		
CPC分类号	C07K14/22 A61K39/00 C07K16/1217		
FI分类号	A61K39/095.ZNA A61P9/00 A61P31/04 A61P39/02 C12N15/00.A C07K14/22		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4C085/AA03 4C085/BA16 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD86 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/GA26 4H045/HA06		
优先权	07/572187 1990-08-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

该蛋白通过运铁蛋白亲和柱分离，并特异性结合抗血清，该抗血清针对铁调节的外膜蛋白，分子量为 (100001e) ，约为100 kD。[作用]在 淋球菌和 脑膜炎奈瑟菌 中发现的铁调节的外层膜蛋白在运铁蛋白受体功能中很重要。[选择图]无

