

(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2007-44045

(P2007-44045A)

(43) 公開日 平成19年2月22日(2007.2.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 14/35 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/35	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 14/33 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/33	4 C O 8 4
<b>C O 7 K 14/34 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/34	4 C O 8 5
<b>C O 7 K 14/02 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/02	4 C O 8 7
審査請求 有 請求項の数 16 O L		(全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-241160 (P2006-241160)	(71) 出願人	506269116 アンステイチュ パストゥール
(22) 出願日	平成18年9月6日(2006.9.6)		フランス国 7 5 7 2 4 パリ セデック
(62) 分割の表示	特願平8-523317の分割		ス 1 5 リュ ドュ ドクトゥールルー
原出願日	平成8年1月31日(1996.1.31)		ー 2 8
(31) 優先権主張番号	08/382, 184	(74) 代理人	100092277 弁理士 越場 隆
(32) 優先日	平成7年2月1日(1995.2.1)	(72) 発明者	アン ラクイレリー フランス国 7 5 0 1 5 パリ アヴニユ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ドゥ プルトウイユ 8 3
		(72) 発明者	ジル マルシャル フランス国 9 4 2 0 0 イヴリーヌス
			ルーセーヌ リュ フランシスコーフエ
			レ 4
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 微生物蛋白質と、この蛋白質を産生する微生物と、該蛋白質のワクチンおよび結核検出での利用

## (57) 【要約】

【課題】 ワクチンあるいは結核特異的抗体を検出するために使用することができる蛋白質。

【解決手段】 分子量が28,779DaのMycobacterium tuberculosis(結核菌)蛋白質と、この蛋白質の配列の少なくとも一部を含むハイブリッド蛋白質。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも下記配列 No. 3 の一部を有する蛋白質：

## 【化 1】

## 配列 No. 3

Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala	
Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala	
Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr	10
Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro	
Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala	
Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val	
Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu	
Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu	
Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro	
Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg	20
Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp	
Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu	
Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu	
Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala	
Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro	
Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala	
Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe	
Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys	30
Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu	
Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu	
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro	
Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala	

## 【請求項 2】

少なくとも下記配列 No. 2 の一部を有する請求項 1 に記載の蛋白質：

## 【化 2】

## 配列 No. 2

Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly  
 Arg Leu Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala  
 Ser Leu Val Thr Val Ala Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala  
 Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala  
 Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala 10  
 Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr  
 Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro  
 Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala  
 Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val  
 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu  
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu  
 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro  
 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg 20  
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp  
 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu  
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu  
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala  
 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro  
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala  
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe  
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys 30  
 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu  
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro  
 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

10

20

30

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の配列 No. 2 または配列 No. 3 の少なくとも一部と、免疫応答を誘導可能なペプチド配列または蛋白質とを含むハイブリッド蛋白質。

## 【請求項 4】

免疫応答が体液性応答および / または細胞性応答である請求項 3 に記載の蛋白質。

40

## 【請求項 5】

ペプチドまたは蛋白質が、ジフテリア毒素、破傷風毒素、HBV ウィルスの HBS 抗原またはポリオウィルスの VP1 抗原もしくはその他任意の毒素または抗原の一部、特にエピトープである請求項 3 または 4 に記載の蛋白質。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするオリゴヌクレオチド。

## 【請求項 7】

下記配列 No. 1 の少なくとも一部を有する請求項 6 に記載の DNA :

## 【化 3】

配列 No. 1

GT GCTCGGGCCC AACGGTGC GG GCAAGTCCAC CGCCCTGCAT  
 GTTATCGCGG GGCTGCTTCG CCCCCGACGC GGGCTTGGTA CGTTTGGGGG  
 ACCGGGTGTT GACCGACACC GAGGCCGGGG TGAATGTGGC GACCCACGAC  
 CGTCGAGTCG GGCTGCTGTT GCAAGACCCG TTGTTGTTTC CACACCTGAG  
 CGTGGCCAAA AACGTGGCCT TCGGACCACA ATGCCGTCGC GGGATGTTTG  
 GGTCCGGGCG CGCGCTAGGA CAAGGGCGTC GGCACGCGA TGGCTGCGCG  
 AGGTGAACGC CGAGCAGTTC GCCGACCGTA AGCCTCGTCA GCTATCCGGG 10  
 GGCCAAGCCC AGCGCGTCGC CATCGCGCGA GCGTTGGCGG CCGAACCGBA  
 TGTGTTGCTG CTCGACGAGC CGCTGACCGG ACTCGATGTG GCCGCGGCGG  
 CGGGTATCCG TTCGGTGTTC CGTAGTGTTC TCGCGAGGAG CGGTTGCGCG  
 GTAGTCCTGA CGACCCATGA CCTGCTGGAC GTGTTACGC TGGCCGACCG  
 GGTATTGGTG CTCGAGTCCG GCACGATCGC CGAGATCGGC CCGGTTGCCG  
 ATGTGCTTAC CGCACCTCGC AGTCGTTTCG GAGCCCGTAT CGCCGGAGTC  
 AACCTGGTCA ATGGGACCAT TGGTCCGGAC GGCTCGCTGC GCACCCAGTC  
 CGGCGCCCAC TGGTACGGCA CCCC GGTTCCA GGATTTGCCT ACTGGGCATG  
 AGGCAATCGC GGTGTTCCCG CCGACGGCGG TGGCGGTGTA TCCGGAACCG 20  
 CCGCACGGAA GCCCGCGCAA TATCGTCGGG CTGACGGTGG CGGAGGTGGA  
 TACCCGCGGA CCCACGGTCC TGGTGC GCGG GCATGATCAG CCTGGTGGCG  
 CGCCTGGCCT TGCCGCATGC ATCACCGTCG ATGCCGCCAC CGAACTGCGT  
 GTGGCGCCCG GATCGCGCGT GTGGTTCAGC GTCAAGGCGC AGGAAGTGGC  
 CCTGCACCCG GCACCCACCC AACACGCCAG TTCATGAGCC GACCCGCGCC  
 GTCCTTGCGT CGCGCCGTTA ACACGGTAGG TTCTTCGCCA TGCATCAGGT  
 GGACCCCAAC TTGACACGTC GCAAGGGACG ATTGGCGGCA CTGGCTATCG  
 CGGCGATGGC CAGCGCCAGC CTGGTGACCG TTGCGGTGCC CGCGACCGCC  
 AACGCCGATC CGGAGCCAGC GCCCCCGGTA CCCACAACGG CCGCCTCGCC 30  
 GCCGTCGACC GCTGCAGCGC CACCCGACCC GGCAGACACT GTTGCCCCCC  
 CACCACCGGC CGCCGCCAAC ACGCCGAATG CCCAGCCGGG CGATCCCAAC  
 GCAGCACCTC CGCCGGCCGA CCCGAACGCA CCGCCGCCAC CTGTCAATTG  
 CCCAAACGCA CCCCAACCTG TCCGGATCGA CAACCCGGTT GGAGGATTCA  
 GCTTCGCGCT GCCTGCTGGC TGGGTGGAGT CTGACGCGC CCACTTCGAC  
 TACGGTTCAG CACTCCTCAG CAAAACCACC GGGGACCCGC CATTTCCCGG  
 ACAGCCGCCG CCGGTGGCCA ATGACACCCG TATCGTGCTC GGCCGGCTAG  
 ACCAAAAGCT TTACGCCAGC GCCGAAGCCA CCGACTCCAA GGCCGCGGCC  
 CGGTTGGGCT CGGACATGGG TGAGTTCTAT ATGCCCTACC CGGGCACCCG 40  
 GATCAACCAG GAAACCGTCT CGCTCGACGC CAACGGGGTG TCTGGAAGCG  
 CGTCGTATTA CGAAGTCAAG TTCAGCGATC CGAGTAAGCC GAACGGCCAG  
 ATCTGGACGG GCGTAATCGG CTCGCCCCGG GCGAACGCAC CGGACGCGCG  
 GCCCCCTCAG CGCTGGTTTG TGGTATGGCT CGGGACCGCC AACAACCCGG  
 TGGACAAGGG CGCGGCCAAG GCGCTGGCCG AATCGATCCG GCCTTTGGTC  
 GCCCCGCGC CGGCGCCGGC ACCGGCTCCT GCAGAGCCCG CTCCGGCGCC  
 GGGCGCGGCC GGGGAAGTCG CTCCTACCCC GACGACACCG ACACCGCAGC  
 GGACCTTACC GGCCTGACC

10

20

30

40

【請求項 8】

50

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質を産生する微生物。

【請求項 9】

上記蛋白質の少なくとも一部が表面に存在する請求項 8 に記載の微生物。

【請求項 10】

細菌である請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 11】

細菌、特に *M. bovis* BCG であることを特徴とする請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 および 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の蛋白質または微生物の有効量を薬学上許容される希釈剤またはアジュバントと組み合わせて含有する医薬組成物。 10

【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 および 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の蛋白質または微生物を含む医薬またはワクチン。

【請求項 14】

結核抗体を含有すると思われる生物液体を請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質と接触させることを特徴とする結核特異的抗体の検出方法。

【請求項 15】

蛋白質を担体に固定する請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質調製物と、プロセスを実施するための緩衝液とからなる請求項 14 または 15 に記載のプロセスを実施するための試験キット。 20

【請求項 17】

生成した抗体 - 蛋白質複合体を検出するための試薬を含む請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質と特異的に反応する抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は微生物蛋白と、この蛋白を産生する微生物とに関するものである。 30

本発明はさらに、この蛋白のワクチンまたは結核検出での利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

結核は現在でも世界中で公衆衛生上の問題になっている。結核を直接の原因とする年間の死者数は約 300 万人で、新たな結核の件数は約 1500 万人である。この結核による死者の数は先進国でも高く、例えばフランスでは年間 1500 人に達する。公式な数字と正確な分析結果との差に関するルジョーの評価方法を考慮すると、この数字は 2 分の 1 から 3 分の 1 に過少評価されている。最近の結核患者数の増加あるいは少なくともこの疾患の発生頻度が減少せず、横ばいである状況は感染性 HIV / AIDS 疾患の拡大との関連で考える必要がある。結論として、結核はフランスや先進国でも依然として頻度の高い主要な感染症であり、発展途上国では単一の病気による死亡の主要な原因になっている。 40

【0003】

現在、患者から採取したサンプル中の細菌の培養で判定する診断結果の確度は結核患者の半分以下である。結核患者の 80 ~ 90% を占める細菌の検出が最も容易な肺結核の場合でも、喀出物の検査で陽性が示されるのは患者の半数に満たない。

【0004】

PCR (ポリメラーゼチェーンリアクションによる増幅) のような感度の高い方法の開発で常に問題になることはサンプル採取が難しいことである。すなわち、女性や子供は一般に唾を吐くことがなく、幼児のサンプルを得るには特殊な医学的介入 (例えば神経節の生検や腰部穿刺による頭脊柱液の採取など) を必要とすることが多い。 50

しかも、サンプルの起源を管理できないため、サンプルをPCR法で使用するできないといったPCR法そのものに起因する制限が存在する。

【0005】

さらに、顕微鏡検査と培養による伝統的な細菌学的診断法は感度が低い（サンプル中に $10^4 \sim 10^5$ オーダーの細菌が必要）ため、既にかなり細菌が繁殖している状態、すなわち、かなり病気が進行した状態でなければならない。

従って、細菌自体の検出が困難または不可能なこの病気の診断では、*Mycobacterium tuberculosis*（結核菌）に対して特異的な抗体を用いる検出方法が大きな助けになるものと思われる。

研究者達は結核の血清学的診断方法を確立すべく努力してきた。この分野で行われた研究の概論は下記文献に記載されている。 10

【特許文献1】国際特許PCT W092/21758号公報

【0006】

大抵の従来法では、生化学的特性を利用して蛋白質を予め単離する。本発明者はこの蛋白を単離した後に初めてこの蛋白の肺結核患者検出能力をテストした。

上記特許文献1（国際特許PCT W092/21758号公報）には、結核患者または生菌で免疫処理したモルモットに由来する血清を用いて結核感染症の代表的な抗原を確実に選択する方法が開示されている。この方法では従来試験法とは異なり、分子量44.5～47.5kDのM.bovis蛋白質を単離することができる。

これら蛋白質の1つのN末端に位置する17個のアミノ酸は下記のように決定されている 20

【化1】

ALA-PRO-GLU-PRO-ALA-PRO-PRO-VAL-PRO-PRO-ALA-ALA-ALA-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

ALA-PRO-PRO-ALA

14 15 16 17

30

【0007】

下記文献にはこの国際特許に記載された結果の内容が要約されている。

【非特許文献1】ローマン達、1993、*Infection and Immunity*, 61, 742-750

【0008】

この論文は特に上記45～47kDの複合蛋白質に対してウサギを免疫処理して得られる兔のポリクロナル免疫血清を用いた競合ELISA試験について述べたものである。

これと平行して、ヤコブ(JACOBS)達によって結核菌の遺伝子ライブラリーが作られた（下記非特許文献2参照）。このライブラリーは多数の異なるクローンを含む。

【非特許文献2】1991、*Method Enzymol.*, 204, 537-557

【0009】

別のマイコバクテリア種である癩菌(*M. leprae*)由来の蛋白質がワイエル(WIELES)達によって同定されている（下記非特許文献3参照）。 40

【非特許文献3】*Infection and Immunity*, 62, 252-258, 1994

【0010】

この蛋白は43Lとよばれ、ヌクレオチド配列から推定される分子量は約25.5Daである。そのN末端はM.bovis BCGにおいて同定された45～47kDaの複合蛋白質のN末端と47%の相同性を有し、その17個のアミノ酸配列は上記のとおりである。

既に述べたように、ヒトの医学分野では診断上の観点および治療上の観点では、マイコバクテリア、特に結核菌によって産生される蛋白質の正確な同定が主たる興味の対象である。

50

すなわち、実際に直面している未解決の課題は多くの疾患に対するワクチンの製造である。

もう1つの課題は、マイコバクテリアによって引き起こされる病気、例えば結核の検出である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、本出願人は、免疫応答において主要な役割を担うと期待される結核菌の蛋白の配列決定を行った。

本出願人は、上記45~47kDの複合体に相当する蛋白質群が同一の遺伝子によってコードされるということ、そしてプロリン含有率が高いために分子量の計算値がポリアクリルアミドゲル上で推定される分子量と一致しないということを見出した。

【課題を解決するための手段】

【0012】

従って、本発明の対象は下記配列 No. 2 または配列 No. 3 のいずれか一方の少なくとも一部を含む蛋白質にある。

【化2】

配列 No. 2

Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly  
 Arg Leu Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala  
 Ser Leu Val Thr Val Ala Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala  
 Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala  
 Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala  
 Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr  
 Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro  
 Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala  
 Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val  
 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu  
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu  
 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro  
 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg  
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp  
 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu  
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu  
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala  
 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro  
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala  
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe  
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys  
 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu  
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro  
 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

10

20

30

## 【化3】

## 配列 No. 3

Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala  
 Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala  
 Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr  
 Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro  
 Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala 10  
 Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val  
 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu  
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu  
 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro  
 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg  
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp  
 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu  
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu 20  
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala  
 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro  
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala  
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe  
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys  
 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu  
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro 30  
 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

## 【0013】

本発明はさらに、配列 No. 2 または配列 No. 3 の少なくとも一部を含むハイブリッド蛋白質と、人間または動物の体内で免疫応答を誘導可能なペプチドまたは蛋白質の配列に関するものである。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0014】

抗原決定基は体液性および/または細胞性の応答を誘導可能なものであるのが好ましい。そのような決定基は各種のものにすることができ、特に複数のエピトープに対する抗体の合成を誘導可能な免疫源性組成物を得るために使用される抗原性蛋白断片、好ましくは糖蛋白にすることができる。 40

## 【0015】

これらのハイブリッド分子は、配列 No. 2 または配列 No. 3 を含む分子と、ジフテリア毒素、破傷風毒素、HBV ウイルスのHBs 抗原、ポリオウイルスの抗原、その他任意のウイルス毒素あるいは抗原の一部、特にエピトープとを一緒にしたもので構成することができる。

ハイブリッド分子の合成方法は、必要な蛋白質またはペプチド配列をコードしたハイブリッドDNAを製造するために遺伝子工学で用いられている方法にすることができる。 50

## 【 0 0 1 6 】

本発明はさらに、アミノ酸配列中に配列 No. 2 と配列 No. 3 とを含む蛋白質またはこれらの配列の少なくとも一部を含むハイブリッド蛋白質に比べて機能的な変性を与えない二次的な相違点または一定の変化を有する蛋白質に関するものである。

## 【 0 0 1 7 】

本発明は、配列 No. 3 に相当する蛋白質について算出される分子量 28779Da と、S D S ゲル電気泳動で得られる複合体の分子量 45 ~ 47kD との間の非常に大きな差を明らかにした点に注意されたい。この差はポリペプチド鎖中のプロリン頻度の高さ (21.7%) によるものと思われる。

## 【 0 0 1 8 】

本発明はさらに他の対象は、上記定義の蛋白質をコードしたオリゴヌクレオチド、RNA または DNA にある。このヌクレオチドは下記の配列 No. 1 の少なくとも一部を含むのが有利である：

## 【化4】

## 配列 No. 1

GT GCTCGGGCCC AACGGTGC GG GCAAGTCCAC CGCCCTGCAT  
 GTTATCGCGG GGCTGCTTCG CCCCCGACGC GGGCTTGGTA CGTTTGGGGG  
 ACCGGGTGTT GACCGACACC GAGGCCGGGG TGAATGTGGC GACCCACGAC  
 CGTCGAGTCG GGCTGCTGTT GCAAGACCCG TTGTTGTTTC CACACCTGAG  
 CGTGGCCAAA AACGTGGCCT TCGGACCACA ATGCCGTCGC GGGATGTTTG  
 GGTCCGGGCG CGCGCTAGGA CAAGGGCGTC GGCACGCGA TGGCTGCGCG  
 AGGTGAACGC CGAGCAGTTC GCCGACCGTA AGCCTCGTCA GCTATCCGGG 10  
 GGCCAAGCCC AGCGCGTCGC CATCGCGCGA GCGTTGGCGG CCGAACCGBA  
 TGTGTTGCTG CTCGACGAGC CGCTGACCGG ACTCGATGTG GCCGCGGCGG  
 CGGGTATCCG TTCGGTGTTC CGTAGTGTTC TCGCGAGGAG CGGTTGCGCG  
 GTAGTCCTGA CGACCCATGA CCTGCTGGAC GTGTTACGC TGGCCGACCG  
 GGTATTGGTG CTCGAGTCCG GCACGATCGC CGAGATCGGC CCGGTTGCCG  
 ATGTGCTTAC CGCACCTCGC AGTCGTTTCG GAGCCCGTAT CGCCGGAGTC  
 AACCTGGTCA ATGGGACCAT TGGTCCGGAC GGCTCGCTGC GCACCCAGTC  
 CGGCGCCCAC TGGTACGGCA CCCC GGTTCCA GGATTTGCCT ACTGGGCATG  
 AGGCAATCGC GGTGTTCCCG CCGACGGCGG TGGCGGTGTA TCCGGAACCG 20  
 CCGCACGGAA GCCCGCGCAA TATCGTCGGG CTGACGGTGG CGGAGGTGGA  
 TACCCGCGGA CCCACGGTCC TGGTGC GCGG GCATGATCAG CCTGGTGGCG  
 CGCCTGGCCT TGCCGCATGC ATCACCGTCG ATGCCGCCAC CGAACTGCGT  
 GTGGCGCCCG GATCGCGCGT GTGGTTCAGC GTCAAGGCGC AGGAAGTGGC  
 CCTGCACCCG GCACCCACCC AACACGCCAG TTCATGAGCC GACCCGCGCC  
 GTCCTTGCGT CGCGCCGTTA ACACGGTAGG TTCTTCGCCA TGCATCAGGT  
 GGACCCCAAC TTGACACGTC GCAAGGGACG ATTGGCGGCA CTGGCTATCG  
 CGGCGATGGC CAGCGCCAGC CTGGTGACCG TTGCGGTGCC CGCGACCGCC  
 AACGCCGATC CGGAGCCAGC GCCCCCGGTA CCCACAACGG CCGCCTCGCC 30  
 GCCGTCGACC GCTGCAGCGC CACCCGCACC GGCACACCT GTTGCCCCC  
 CACCACCGGC CGCCGCCAAC ACGCCGAATG CCCAGCCGGG CGATCCCAAC  
 GCAGCACCTC CGCCGGCCGA CCCGAACGCA CCGCCGCCAC CTGTCATTGC  
 CCCAAACGCA CCCCAACCTG TCCGGATCGA CAACCCGGTT GGAGGATTCA  
 GCTTCGCGCT GCCTGCTGGC TGGGTGGAGT CTGACGCGC CCACTTCGAC  
 TACGGTTCAG CACTCCTCAG CAAAACCACC GGGGACCCGC CATTTCCCGG  
 ACAGCCGCCG CCGGTGGCCA ATGACACCCG TATCGTGCTC GGCCGGCTAG  
 ACCAAAAGCT TTACGCCAGC GCCGAAGCCA CCGACTCCAA GGCCGCGGCC  
 CGGTTGGGCT CGGACATGGG TGAGTTCTAT ATGCCCTACC CGGGCACCCG 40  
 GATCAACCAG GAAACCGTCT CGCTCGACGC CAACGGGGTG TCTGGAAGCG  
 CGTCGTATTA CGAAGTCAAG TTCAGCGATC CGAGTAAGCC GAACGGCCAG  
 ATCTGGACGG GCGTAATCGG CTCGCCCCGG GCGAACGCAC CGGACGCCGG  
 GCCCCCTCAG CGCTGGTTTG TGGTATGGCT CGGGACCGCC AACAACCCGG  
 TGGACAAGGG CGCGGCCAAG GCGCTGGCCG AATCGATCCG GCCTTTGGTC  
 GCCCGCCGC CGGCGCCGGC ACCGGCTCCT GCAGAGCCCG CTCCGGCGCC  
 GGGCGCGGCC GGGGAAGTCG CTCCTACCCC GACGACACCG ACACCGCAGC  
 GGACCTTACC GGCCTGACC

本発明はさらに、上記蛋白質を産生する微生物、特に上記蛋白質を分泌する微生物に関するものである。

【0020】

この微生物は *Mycobacterium bovis* BCGのような細菌であるのが好ましい。このバクテリアは結核に対する免疫を獲得する目的で既に人間で使用されている。

本発明のハイブリッド蛋白質を *M. bovis* BCGで製造する利点は、*M. bovis* BCGがワクチン目的で広く用いられている株であり、人間に無害であることが知られている点にある。この株は人体に注射後、15日～1ヵ月かけて緩やかに増殖し、生体からの免疫応答の対象となる優れた抗原を発現する。

【0021】

これに対して、人間の癩病の原因物質である *Mycobacterium leprae*についてはほとんど知られていない。この細菌は現在でも培地で培養することができず、*M. bovis*と比較して成長期間が非常に長い。また、この細菌をワクチン処理に利用しない理由としては、この細菌のもつ病原性がある。

【0022】

配列 No. 2 または配列 No. 3 を有する蛋白質は、結核患者の体内に存在する抗体によって認識されるという利点があり、従って、先天的に免疫原性の高い抗原を構成する。

これらの蛋白質は *M. bovis* に非常に近い種である *M. tuberculosis* に由来する。これら2種類の細菌はそれぞれ人間および家畜において結核の原因となる。*M. tuberculosis* 由来の蛋白質は *M. bovis* 内で発現され、シグナルペプチドを有する細胞によって培地中に分泌される。

【0023】

*M. bovis* は人間のワクチン処理に関して上記の利点を有するとともに、配列 No. 2 および配列 No. 3 に対応する蛋白質は人間において強い免疫応答を誘導するので、*M. tuberculosis* に由来する蛋白質の一部を含むハイブリッド蛋白質を *M. bovis* で生産するのが特に有利である。

【0024】

ワクチン処理の対象となる病原性微生物抗原は特別な方法で与えられない限り、人体内で非常に微弱な応答しか誘導できないことは広く知られている。

【0025】

本発明は下記2つの方法でこの問題を解決する：

(1) ハイブリッド蛋白質を *M. bovis* BCGの表面に存在させ、および/または細菌によって排出させ、

(2) 強力な免疫応答を誘導することが分かっている抗原決定基すなわち配列 No. 2 または配列 No. 3 を有する蛋白質の一方の抗原決定基を、単独で注入した場合には弱い免疫応答しか誘導しない抗原決定基と組み合わせる。

【0026】

配列 No. 2 または配列 No. 3 蛋白質の一方の抗原決定基を組み合わせることによって、ハイブリッド蛋白質の第2の抗原決定基に対する免疫応答が増幅される。この現象はおそらく、ハプテン担体効果と関連させることができる。

【0027】

このような操作が、*M. leprae* 由来の蛋白質、例えばWieles達による論文(1994, 上記参照)に記載の蛋白質等では不可能であることは明らかである。なぜなら、*M. tuberculosis* と *M. leprae* との間にははるかに大きな違いがあるため、そのような蛋白質は適切に発現されない可能性があり、この *M. leprae* 蛋白質によって誘導される免疫誘導はあまりよく知られていないからである。さらに、ワクチン処理の目的で病原性種から蛋白質を導入することで人体の健康を損なう危険性があり、製薬業界はそのようなリスクを進んで負うものではない。

【0028】

以上の点から、蛋白質配列 No. 2 および配列 No. 3 とWieles達の論文(1994, 上記参照

10

20

30

40

50

)に記載のM. leprae 蛋白質とは、それらの配列の明らかな相同性(図17参照)にもかかわらず、互いに区別される。

【0029】

本発明はさらに、上記定義の蛋白質または微生物を少なくとも一つ含むワクチンまたは薬剤に関するものである。

非グラフト化蛋白質を含むワクチンは、結核に対して個人を免疫するために使用することができ、M. bovis以外の生物原因物質から得られたエピトープを含むグラフト化蛋白質は他の病気に対する免疫処理で使用することができる。

【0030】

指標として、一人に対する1回投与量当たり1~500 µgの蛋白質あるいは一人あたり  $10^3 \sim 10^7$  組み換えバクテリアを皮内投与することができる。 10

本発明のさらに他の対象は、薬学上許容される希釈剤またはアジュバントと組み合わせた上記蛋白質または微生物を少なくとも薬学的に有効な量含む医薬組成物にある。

本発明のさらに他の対象は、特定の結核抗体の存在を調べる生物学的液体を上記蛋白質と接触させる結核に特異的な抗体の検出方法にある。

【0031】

上記蛋白質は担体に固定されているのが好ましい。この検出法はウェスタンブロット(イムノプリント)法、酵素イムノアッセイ(ELISA)法またはラジオイムノアッセイ(RIA)法で蛋白質と、免疫反応を可能にするバッファー溶液と、必要に応じて用いられる生成した抗原-抗体複合体の検出物質とを含む試験用キットを用いて行うことができる。 20

【0032】

以下、図面を参照して本発明を具体的に説明するが、本発明が下記の説明に限定されるものではない。

[図1]は後述の条件下でイオン交換カラムに保持されないM. tuberculosis画分を分子濾過(Si 300)した場合の240nmにおける吸光度(OD)曲線。

[図2]は上記分子濾過によって得られた画分1に由来する分子を高速イオン交換カラム(DEAE)で分離した場合の220nmにおける吸光度曲線。

[図3]は上記イオン交換クロマトグラフィーで得られた画分1を逆相カラムクロマトグラフィーにかけた時の220nmにおける吸光度曲線。

【0033】

[図4A]~[図4E]はそれぞれ下記で得られたPVD F膜(メンブレン)の写真: 30

- (1) PVD F膜上に移した分子(4A)の着色剤  
Aurodyne着色(Amersyam)、
- (2) 生菌(4B)または死菌(4C)によって免疫処理したモルモット由来の血清混合物
- (3) BCG由来の精製抗原で免疫処理したウサギの血清(4D)  
(Infection and Immunity (1993) 61 742-750)
- (4) 参照番号I-1081のモノクロナル抗体(4E)

これらPVD F膜には、事前に、低圧イオン交換カラムで分離した画分をアクリルアミドゲル電気泳動で分離した分子をプロットした。レーン0は開始材料に対応し、レーン1は保持されなかった画分に、レーン2は保持された画分に対応する。 40

【0034】

[図5A]~[図5E]はSi 300ゲル濾過カラムで得られた5つの画分(1~5)および低圧DEAEカラムで保持されなかった画分(0)をマイグレートさせて得られるゲルに相当するPVD F膜を示している。同一のゲルを複数のPVD Fに移した後、蛋白質着色剤[Aurodyne, Amersham (5A)]、生菌(5B)または死菌(5C)で免疫処理したモルモット由来の血清あるいは兔血清(5D)またはモノクロナル抗体(5E)を用いてそれぞれの膜を検出した。

【0035】

[図6A]~[図6E]は高速イオン交換カラムで得られた画分(1~3)と分子篩を 50

用いた濾過で得られた画分 1 ( ウェル 0 ) をマイグレートさせて得られるゲルに対応する P V D F 膜を示す。上記膜はそれぞれ下記を用いて検出した：

- 蛋白質着色剤 (6A)、
- 生菌 (6B) および死菌 (6C) を用いて免疫処理したモルモットの血清に由来する抗体、
- 兔血清 (6D)、
- モノクロナル抗体 (6E)

【 0 0 3 6 】

[ 図 7 A ] ~ [ 図 7 D ] はイオン交換カラムで得られた画分 1 ( 0 ) および逆相クロマトグラフィで得られた画分 ( 1 ~ 5 ) の移動に相当するゲルをプロットした膜を同じコードを有する図 6 A ~ 6 B、6 D ~ 6 E と同一の試薬で検出した結果を示す。

10

[ 図 8 ] は、*M. smegmatis* において *M. tuberculosis* H37Rv を発現させるための遺伝子ライブラリーのスクリーニングを示す。*M. bovis* BCG、形質転換されていない *M. smegmatis* および抗体によって認識される組み換え蛋白質を発現するまたはしない組み換えクローンによって形質転換された *M. smegmatis* の上清を各種希釈率でテストした。

[ 図 9 ] はライブラリーより選択され、*E. coli* で電気穿孔 ( エレクトロポレ、electropore ) し、アルカリ溶解で抽出した 3 つのコスミドのアガールゲル上での移動を示す。

[ 図 10 ] は BamHI (a)、SmaI (b)、HpaI (c)、NotI (d)、SspI (e)、EcoRI (f) および HindIII (g) で処理した *E. coli* NM554 から抽出された pLA1 のコスミド DNA のゲル上での移動を示す。

20

【 0 0 3 7 】

[ 図 11 ] は 45/47kDa 蛋白質のマイコバクテリアにおける発現を示し、培養 7 日目の細菌培養液の上清を洗浄し、Amicon PM10 膜上で濃縮、凍結乾燥し、免疫インプリントで分析したもの。1/500 に希釈した兔血清のポリクロナル抗体によって蛋白質を検出した。

ウェルはそれぞれ下記 (1) ~ (4) を含む：

- (1) *M. bovis* BCG 由来の精製した 45 / 47 kDa 蛋白質 0.25  $\mu$  g
- (2) pLA1 によって形質転換された *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 の上清 5  $\mu$  g
- (3) 形質転換されていない *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 の上清 5  $\mu$  g
- (4) *M. bovis* BCG 上清 5  $\mu$  g。

【 0 0 3 8 】

30

[ 図 12 ] はマイコバクテリアにおける 45 / 47kDa 蛋白質の発現を示し、細菌培養液の上清を洗浄し、Amicon PM10 膜上で濃縮した後、凍結乾燥し、競合 ELISA 法で分析した。凍結乾燥させた各種濃度の上清を 8000 倍に希釈した兔のポリクロナル血清で検出し、混合物を予め精製蛋白質を固定したウェルに写した。

[ 図 13 A ]、[ 図 13 B ] は pUC18 の pLA1 コスミドを BamHI で処理して得られる断片をリゲーションして得られた各種 pUC18: *M. tuberculosis* H37Rv 組み換えクロンのプラスミドプロフィール ( 13 A ) と、BamHI 制限プロフィール ( 13 B ) である。この図は検討した 36 個のクローンのうち 21 個を示す。ウェル 『 P 』 は基準ベクターである pUC18 に相当し、ウェル 『 m 』 は pKN プラスミドを PvuII によって開裂させた断片であるサイズマーカーに相当する。

40

【 0 0 3 9 】

[ 図 14 ] は 45 / 47kDa 蛋白質の *E. coli* における発現を可能にする挿入断片の制限地図である。両方向にクローニングされた 3 kb の挿入断片を含む pLA34 および pLA4 プラスミドから欠失によって一群のクローンを得た。矢印はこれらクローンから 『 直接 』 および 『 逆 』 プライマーを用いて配列決定する時の方向を示す。

- B , Bam HI    S , Sma I    E , EcoR I    K , Kpn I  
H , Hind III    Sa , Sal I    Sp , Sph I

【 0 0 4 0 】

[ 図 15 ] は *E. coli* における 45 / 47kDa 蛋白質の発現を示し、細菌培養液の溶解物を免疫インプリントで分析した。DEAE 上で精製後、臭化シアンによって活性化した Sepharos

50

e-4Bカラム上に固定したE. coli の溶解物上に吸着させた兔のポリクロナル抗体によって蛋白質を検出した。

ウェルはそれぞれ下記 (1) ~ (4) を含む :

- (1) 精製された45 / 47kDa 蛋白質0.2  $\mu$ g
- (2) pLA34-2 で形質転換したE. coli XL-Blue の溶解物25  $\mu$ g
- (3) pLA34 で形質転換したE. coli XL-Blue の溶解物25  $\mu$ g
- (4) 形質転換していないE. coli XL-Blue の溶解物25  $\mu$ g。

【0041】

[図16]は E. coliにおける45 / 47kDa 蛋白質の発現を示し、競合EIIISA で分析した細菌培養液の溶解物は未精製の状態で使用した。

10

[図17]は本発明による配列 No.2とM. leprae (mln 431) 由来の蛋白質の配列とを比較したものである。

[図18]は配列 No.2の蛋白質の疎水性度プロフィールである。

【実施例】

【0042】

#### 実施例 1

##### M. tuberculosis抗原の精製法

##### 1) 抗原の入手

ソートン(Sauton's)の合成培地130 mlを入れたフラスコを用い、BCG の培養に関する通常の方法 (Gheorghiu et al., Bull. Institut Pasteur 1983, 81:281-288)で、M. tuberculosis (H37Rv株) の培養物を作った。37  $^{\circ}$ Cで20日間培養後、培地を回収し、室温で沈降分離および濾過(0.22  $\mu$ m)した。これらの操作は安全上の理由からグローブボックス内で実施した。回収および濾過した培地は安全フード内で再び0.22  $\mu$ mフィルターを用いて濾過した後、下記の操作に使用した。

20

窒素雰囲気下、2 bar、4  $^{\circ}$ CでAmicon(PM10)膜に取り、4%のブタノールを含む逆浸透水(retro-osmosed water)を用いて強く洗浄し、元の量の10~20倍に濃縮した。Amicon PM10膜で除外されなかった分子を含む濃縮培地を凍結乾燥し、重量測定後、-20  $^{\circ}$ Cで粉末状態で保存した。以下の精製操作に使用した12gの開始材料は70リットルの培地から得られたものである。

精製操作

30

【0043】

##### 2) 低速イオン交換カラム

約240 mlの Triacyl Mゲル(SEPRACOR)の高さが300 mm、直径32 mmの調製用低速イオン交換カラムを準備した。4%のブタノールを含む緩衝生理食塩水(10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=7 および 10mM NaCl)を用いてカラムを平衡化した。

上記段階で濃縮後に凍結乾燥して調製した材料を、上記緩衝化生理食塩水に溶解し、40,000 Gで12分間超遠心分離した。遠心後の溶液の上部4 / 5だけを回収し、蠕動ポンプを用いてイオン交換カラムに添加した。カラムに保持されない第1主要画分を回収した。緩衝生理食塩水(10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=7.5および1M NaCl)を用いて溶出し、第2画分を得た。2バールの圧力下で Amicon (PM10)膜に取り、4%ブタノールを含む逆浸透水を用いてそれぞれの画分を強く洗浄し、約15倍に濃縮した。カラムに保持されない画分は2.9 gの材料および大部分の分子を含んでおり、これを次の段階で精製した。カラムに保持され、塩溶液で溶出した画分には約1.01gの材料が含まれていた。

40

【0044】

##### 3) ゲル濾過

50 x 750 mm(SERVA)の調製用高速カラム(Si300 カラム 3  $\mu$ m)を4%ブタノールを含む緩衝生理食塩水(50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ を用いてpH=7.5に調整したもの)を用いて平衡化した。

この溶液は予め膜(0.22  $\mu$ m)を用いて濾過しておく。カラムの流速は1.25ml bar / 分に調節し、45barの設定最大圧には到達しなかった。

50

カラムに添加する材料は緩衝液/ブタノール溶液を用いて濃度50mg/mlに調製した。10mlのサンプルを調製し、-20℃で凍結した。解凍後に再び濾過してカラムに添加した10mlのサンプルには約500mgの未精製材料が含有されていた。典型的な分離法である240nmでの吸光度プロファイルを図1に示す。このプロファイルに基づいて選択された5つの主要画分を4℃で濃縮し、Amicon PM10膜上で4%のブタノールを含む逆浸透水を用いて強く洗浄した。濃縮された画分をそれぞれ凍結乾燥し、重量測定し、-20℃で保存した。この段階で得られた画分1は生菌を用いて免疫処理したモルモット由来の抗体または結核患者由来の抗体によって認識される主要な分子を含んでいた。この画分のみを用いて以下の段階を行う。

【0045】

10

#### 4) イオン交換カラム

4%のブタノールを含む緩衝生理食塩水(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.5 および10mM NaCl)を用いて、DEAE-TSK 5PW調製用カラム 21.5 × 150mm (LKB)を平衡化した。流量6ml/分で最大圧力は30bar以下であった。溶出バッファーに関してはNaCl濃度のみを変化させた(1M)。合計100mgの上記材料を含む4mlのサンプルを注入した後、図2に示す直線状濃度勾配を与えた。240nmでの吸光度プロファイルに従って主要画分を回収した。これらの画分を濃縮し、Amicon PM10膜上で4%ブタノールを含む逆浸透水を用いて洗浄し、凍結乾燥した。重量測定後、各画分を-20℃で保存した。この段階で得られた画分1のみが生きた細菌を用いて免疫処理したモルモット由来の抗体によって認識される分子の大部分を含んでいた。この画分を用いて次の分離段階を行った。

20

【0046】

#### 5) 逆相カラム

4.6 × 250mmのRP300C。10μm(Aquapore Brownlee Lab.)カラムを0.22μmのフィルターで濾過した酢酸アンモニウムバッファー(20mM NH<sub>4</sub>COOCH<sub>3</sub>)を用い、最大圧力115bar、流速2ml/分で平衡化した。10mgを含む1mlのサンプルを注入後、図3のプロファイルに従って90%のアセトニトリルを含む溶出バッファーを用いて溶出した。220nmにおける吸光度プロファイルから5つの主要な画分が分離され、それら画分を減圧下に40℃で蒸発し、濃縮し、その後凍結乾燥した。

【0047】

#### 6) 抗原の免疫検出

30

laemmliの通常の方法(Nature, 1970, 277: 680-685)に従って、10%ポリアミドを含む0.1%SDS変性ゲルを調製した。精製段階で得られた10~2μgの材料を含むサンプルを5%メルカプトエタノール、3%のSDSおよび痕跡量のブルモフェノールブルーを含むバッファーに溶解し、ゲルのウエルに10μlずつ添加した。電気泳動してブルモフェノールブルーをゲルの端まで移動させた後、一夜、中程度の電場を加えてサンプル中に存在する分子をPVDFシート(Millipore)上に移した。[Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (Publishers), 1988]。

PVDEシートをコマシーブルー溶液で1分以内で着色し、その後脱色して分子量マーカーを識別可能とし、その形状を鉛筆でなぞる。完全に脱色した後、PBS + Triton X100 3%を用いて室温で30分間シートを洗浄し、その後、PBS単独で5分間ずつ3回洗浄した。次いで、5%の脱脂粉乳を含むPBSを用いて37℃で1時間シートを飽和し、PBS + Tween 20 (0.2%)で3回洗浄した。

40

PBS + Tween 20バッファー(0.2%) + 粉末ミルク(5%)で20倍に希釈した抗血清を用い、37℃で1時間30分、定期的に攪拌しながらインキュベートした。さらにPBS + Tweenを用いて3回洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼを用いて標識した抗イムノグロブリン抗体と一緒にインキュベートした。ホスファターゼ(Biosys)を用いて標識した人間とモルモットの抗イムノグロブリン抗体をPBS + Tween20 (0.2%) + ミルク(5%)で最終希釈倍率を2500倍にして使用した。37℃で1時間30分インキュベート後、PBS + Tweenを用いてPVDFシートを3回洗浄し、BCIPおよびNBT(Harlow and Lane 上記)を含む検出バッファー中で室温で5~10分間培養した。反応を停止させ、乾燥させた後シートの写真を撮影し

50

た。

【 0 0 4 8 】

#### 7) アミノ酸組成物

BeckmannのLS6300分析装置を使用して、Institut Pasteur Organic Chemistry Departmentで各クロマトグラフィー画分について合計アミノ酸組成を分析した。

45-47kD 蛋白質のアミノ酸頻度(amino acid frequency)で表した合計組成は以下のとおり：

ASN/ASP:10.4% ; THR:5.7 % ; SER:5.6 % ; GLN/GLU:6.3 % ; GLY:7.1 % ; ALA:19.3% ; VAL:6.2 % ; ILE:2.2 % ; LEU:4.4% ; TYR:2.2 % ; PHE:2.4 % ; LYS:2.7 % ; ARG:2.7 % ; PRO:20.9%。

10

【 0 0 4 9 】

#### 実施例 2

M. tuberculosis 蛋白および蛋白画分の免疫特異性の決定と、生菌を用いて免疫処理したモルモットの抗体で認識される抗原の単離

12~15匹のモルモット群(Hartleyのメス、試験開始時の重量=250~300g)に生きたマイコバクテリア( $2 \times 10^7$ 単位のBCGを0.1 ml生理食塩水に添加したものを2回皮内注射)または同じ株のマイコバクテリア0.2 mgを熱殺菌(120℃、30分)したものを完全フロイントアジュバントに生理食塩水を懸濁して(1/1)成るエマルション溶液0.5 mlとして筋肉注射で投与した。免疫処理してから7~12ヶ月後に各モルモット群から血清サンプルをとり、濾過(0.22 μm)後、少量に分割し、-20℃で凍結保存した。いくつかの群の血清試験を行った(生菌で免疫処理したもの5群と死菌を用いて免疫処理したもの6群)。それぞれの免疫処理タイプを代表する血清群を用いて得られた結果を示す。同じ免疫処理方法ではグループ間の差は最小であった。

20

【 0 0 5 0 】

#### 1) 低速イオン交換カラムを用いた分離段階

培養培地(Amicon PM10膜を用いて洗浄・濃縮後、凍結乾燥したもの)を超遠心分離し、その後低速イオン交換カラムに添加した。カラムに保持されなかった画分と、高モル濃度緩衝溶液で溶出した画分との2種類の画分が得られ、これらをAmiconPM10膜を用いて洗浄・濃縮し、凍結乾燥した。

各画分(10 μm)をSDSゲルのトラックに添加し、電気泳動した後、PVD F膜に移し(プロットし)、免疫検出法で各種血清と反応する分子の大部分を含む画分を識別した。

30

【 0 0 5 1 】

[図4]は同一のゲルを、蛋白質用の着色剤(Aurodye-Amersham)(4A)、生菌(4B)または死菌(4C)で免疫処理したモルモットの血清を用いて検出した免疫インプリントを示す。免疫インプリント4Dおよび4FはBCGと同一の分子に対する兔血清(Infecation and Immunity, 1993, 61, 742~750)およびパスツール研究所のCNCM(Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes)に寄託されたモノクロナル抗体を生産するI-1081ハイブリドーマの上清を用いて検出した。カラムに保持されなかった画分のみが、生菌または死菌を用いて免疫処理されたモルモット由来の血清によって認識される45/47kDa分子または上記ハイブリドーマの上清によって認識される45/47kDa分子を含んでいた。

40

【 0 0 5 2 】

#### 2) Si300を用いた分子濾過段階

上記段階でカラムに保持されなかった画分を、500 mgの材料を含む10mlのサンプルとしてSi300カラムに添加した。図1に示したプロフィールに従って画分1~5を分離し、一連の添加によって得られた精製物を合わせ、洗浄、濃縮、凍結乾燥した。

各画分(10 μg)をSDSゲルのトラックに添加し、電気泳動を行ってPVD F膜に移し、免疫検出法で各種血清と反応する蛋白質の大部分を含む画分を同定した。

[図5]は同一のゲルを、蛋白質着色剤(Aurodye Amersham)、生菌(5B)または死菌(5C)で免疫処理したモルモットに由来する血清を用いて検出した免疫インプリントを示す。免疫インプリント5Dおよび5Eは、BCGから精製した分子に対する兔血清およびI-1081モノク

50

ロナル抗体を用いて検出した。

画分 1 に存在する 45kD および 47kD の 2 種類の抗原は主として生菌を用いて免疫処理した動物に由来する抗体、ポリクロナル兔血清またはモノクロナル抗体によって認識された。この画分を第 2 の精製段階用に選択した。

【 0 0 5 3 】

### 3) イオン交換段階

上記画分のサンプル 100 mg を D E A E - T S K 調製カラムに添加し、NaCl 濃度勾配を付けて溶出させた。溶出分子の 220nm におけるプロフィールから主要な 3 つの画分 ( 図 2 ) が画定された。一連の添加で得られた各画分を集め、洗浄、濃縮および凍結乾燥した。

上記画分を 5  $\mu$ g ずつ S D S ゲル電気泳動し、P V D F シート上の免疫インプリントを蛋白質着色剤 (Aurodye) ( 図 6 A )、生菌 ( 図 6 B ) または死菌 ( 図 6 C ) を用いて免疫処理したモルモットの血清、兔血清 ( 図 6 D ) あるいはモノクロナル抗体 ( 図 6 E ) を用いて検出した。1 - D E A E 画分は、死菌を用いて免疫処理した動物の抗体によって認識される抗原をごくわずかしき含んでいなかった。一方この同じ 1 - D E A E 画分は生菌を用いて免疫処理されたモルモット由来の抗体および兔血清およびモノクロナル抗体によって強く認識される 45/47kD のダブレットを含んでいた。この画分 1 - D E A E を用いて次の精製段階を行った。

【 0 0 5 4 】

### 4) 逆相カラム段階

10  $\mu$ m RP 300 カラムを、酢酸アンモニウムバッファー ( 20mM ) で平衡化し、上記 1 - D E A E 画分を最大 5 ~ 10mg 含むサンプル 1 ml を添加した。図 3 に示す 0 ~ 90% のアセトニトリル濃度勾配を付けて溶出し、5 つの主要画分を回収した。これらの画分から 40 で減圧蒸発してアセトニトリルの大部分を除去 / 濃縮し、凍結乾燥した。

Aurodye を用いた蛋白質の着色 ( 図 6 ) では、画分 4 ( アセトニトリル濃度 30 ~ 50% ) が生菌を用いて免疫処理した動物由来の抗体あるいは兔血清中に存在する抗体またはモノクロナル抗体によって認識される分子の大部分を含んでいた。

【 0 0 5 5 】

### 実施例 3

Mycobacterium tuberculosis 由来の 45 / 47kD 蛋白質の Mycobacterium smegmatis および Escherichia coli へのクローニングと発現

#### 1) 材料および方法

##### 1.1 菌株とその成長条件、上清と菌抽出物の調製

ソートンの合成培地で *M. bovis* BCG ( 1173 P<sub>2</sub> 株 ) を 37 で 7 日間培養し、上清液を 0.22  $\mu$ m の膜で濾過した。この上清液を 4 % ブタノールの存在下で未精製状態で保存するか Amicon-PM 膜を用いて濃縮後に凍結乾燥した。

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( Snapper 達、Molecular Microbiol. 4, 1911-1919, 1990 ) を、7 H9 + 0ADC 液体培地で 37 で 7 日間培養した。pYUB18: *M. tuberculosis* ライブラリー由来のコスミドによって形質転換した各 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 クローンを 25mg / ml のカナマイシン存在下で培養した。その後培養液を 5000rpm で 15 分間遠心分離し、培養液の上清を分離して、4 % ブタノール存在下で 4 で保存した。培地組成によって妨害されない ELISA 試験はこれらの調製物を用いて行った。クローン培養液の上清を SDS-PAGE ゲル上で分析する際には、それらをソートン合成培地で 37 で 7 日間培養し、0.22  $\mu$ m 膜を用いて培養液の上清を濾過し、Amicon-PM10 膜で濃縮し、凍結乾燥した。

【 0 0 5 6 】

*E. coli* NM554 および XL 1-Blue 株を固体または液体 Luria-Bertani (LB) 培地で 37 で培養した。pUC18 プラスミドで形質転換した *E. coli* XL 1-Blue クローンを 25  $\mu$ m / l のアンピシリン存在下で培養した。

*E. coli* XL1-Blue と pUC18: *M. tuberculosis* 組み換えプラスミドで形質転換したクローンとを一夜 (16h) 培養した後、培養液を一連の急激に凍結 / 溶解 ( - 70 / + 60 ) することによって培養液溶解物を調製した。溶解物を遠心分離し、上清を分離し、- 20 で保

10

20

30

40

50

存した。これら調製物からの蛋白質の分離はBCA法で行った(Pierce)。

【0057】

### 1.2 クローニングベクター

使用した *M. tuberculosis* の遺伝子ライブラリー (Jacobs達1991、上記) は、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155への電気穿孔法により、Stewart Coleによって作製された。本出願人は400個の組み換え体を使用した。

ライブラリーはコスミドのシャトルベクターpYU818内で作製した。このシャトルベクターは、pYUB12プラスミド (Snapper 達、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1988, 85:6987-6991) に由来するもので、このプラスミドはバクテリオファージのCos配列が挿入されてファージ溶解物状態のライブラリーにおける組み換えコスミドの増幅と良好な保持が可能になっている。このライブラリーは以下の方法で作製した。

すなわち、*M. tuberculosis* H37Rv 株のゲノムDNAを、最大35kbから45kbの断片が得られるような条件で、酵素Sau 3aで部分的に処理し、これらの断片を精製後、pYUB18にリゲーションし、制限エンドヌクレアーゼBamHIで処理後、脱リン酸化を行った。

【0058】

pUC18 プラスミドベクター (Yanisch-Perron 達、Gene, 1985, 33: 103-119) を用いて、*E. coli* XL-Blue へのサブクローニングを行った。この多コピープラスミドはガラクトシダーゼの末端アミノ酸断片をコードした *E. coli* のラクトースオペロンに由来するDNAを含む。この断片はイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) によって誘導可能で、*E. coli* XL1-Blue宿主株によってコードされる不完全なガラクトシダーゼフォームと共にアルファ相補性 (alpha-complementation) を確立することができる。従って、外部DNAの挿入によって、アルファ相補性の全廃が誘導される。組み換えプラスミドは、宿主株に形質転換されるとコロニーが白色を呈することによって確認され、これに対して細菌がpUC18 プラスミドで形質転換されるとコロニーは青色を示す。このスクリーニングは、IPTGおよびX-Gal 酵素基質の存在下で行った。

【0059】

### 1.3 分子生物学的方法

#### 1.3.1 *M. Smegmatis* mc<sup>2</sup> 155コスミドの抽出

いくつかの変更を加えて *M. smegmatis* 用に適応させたアルカリ溶菌法 (Jacobs 達、1991, 上記) を用いて組み換え pYUB18:*M. tuberculosis* コスミドの抽出を行った。培養5日目 (指数増殖期終了後) に細菌を回収し、5000rpmで10分間遠心分離した。細菌残留物 (3ml) を5mlの溶液A (50mMグルコース、25mMトリスHCl pH8、10mM EDTA、リゾチーム10mg/ml) に再懸濁し、37℃で20分間インキュベートした。2倍量 (10ml) の溶液B (0.2N NaOH、1%SDS) を添加し、逆混合した。混合物を65℃で30分間インキュベートし、その後、4℃で15分間インキュベートした。最後に1.5倍量 (7.5ml) の溶液C (5mM 酢酸カリウム、酢酸11.5%) を添加し、逆混合した。混合物を4℃で30分間インキュベートした。続いて調製物を4℃で13000rpm、15分間の遠心分離し、上清を回収して、同量のフェノール/クロロホルム50/50で処理した。

抽出後、試験管を4000rpmで10分間の遠心分離した。水相を清潔な試験管に移し、-20℃で保存しておいた2倍量のエタノールを用いて2回処理した。反転後、これを-20℃で少なくとも1時間保存し、その後、12000rpmで20分間遠心分離した。最後に残留物を同量の70%エタノール (-20℃に保存しておいたもの) で洗浄し、Speed-Vacで5分間乾燥させた。乾燥残留物を500µlの滅菌水に懸濁し、-20℃で保存した。

【0060】

#### 1.3.2. *E. coli* プラスミドの抽出および精製

pYUB18コスミドおよびpUC18組み換えプラスミドの迅速な抽出はアルカリ溶菌法 (Birnbom 達、Nucleic Acids Res., 1979, 7: 1513)で行った。

アルカリ溶解操作後、関連するコスミドと組み換えプラスミドとを、臭化エチジウムの存在下で塩化セシウム濃度勾配超遠心分離で精製した (Maniatis 達、Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 1 】

## 1.3.3 形質転換技術

塩化カルシウムを用いた化学的方法

この一般的な方法は pUC18組み換えプラスミドで *E. coli* XL1-Blueを形質転換するのに使用した。まず最初にコンピテントバクテリアを調製した。20mlの2YT培地に、一夜培養したプレカルチャーを1/100の割合で植えつけた。細菌を、攪拌しながら37℃で2時間、OD = 0.6になるまで培養し、その後4℃、400 rpmで10分間、遠心分離した。残留物を8 mlの100mM CaCl<sub>2</sub>に懸濁し、氷浴中に15分間保持し、その後再び4℃で4000rpm、10分間の遠心分離した。最後に残留物を1.6 mlの100mM CaCl<sub>2</sub>に懸濁し、氷浴中で30分間保持した。

こうして調製したコンピテントバクテリアはすぐに形質転換に利用するか、あるいは4℃で数日間保存してもよい。形質転換時には2 μlのDNAに200 μlのコンピテントバクテリアを混合した。混合物を氷浴中で45分間保存し、その後42℃で2分間の温度ショックを加えた。800 μlの2YT培地を添加し、その後攪拌しながら調製物を37℃で1時間インキュベートし、MIアンピシリンプレートに50 μl ~ 200 μl / プレートの割合で拡げた。翌日、コロニーをカウントし、形質転換効率を計算した。

## 【 0 0 6 2 】

物理的電気穿孔法

この方法は大型ベクターを用いて *E. coli* を形質転換するために使用した。すなわち、*E. coli* のNM554株を、50kb以上のサイズを有する組み換えpYUB18コスミドを用いて電気穿孔にかけた。コンピテントバクテリアは新規に調製した。200 mlの2YT培地に、一夜培養したプレカルチャーを1/100の希釈率で植えつけ、37℃で3時間細菌を培養した。その後、6000rpmで10分間遠心分離した。残留物を4℃の滅菌水10mlに取り、その後4℃の滅菌水190 mlに懸濁した。細菌を、再び6000rpmで10分間遠心分離し、4℃の滅菌水10mlを用いて再度洗浄した。最後に残留物を400 μlの10%グリセロールに懸濁した。

電気穿孔はBio-Rad Gene Pulserを用いて行った。4 mmのセル内で100 μlの細菌を1 ~ 4 μlのDNAと混合した。混合物に電気ショックを与え(2500V、25 μF)、その後、1 mlの2YT培地を素早くセルに添加した。全体を試験管に移し、攪拌しながら37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後培養液をML-アンピシリンプレートに50 μl ~ 200 μl / プレートの割合で拡げた。翌日コロニーをカウントし、形質転換効率を計算した。

## 【 0 0 6 3 】

## 1.3.4 酵素処理断片のクローニング

クローニングすべきDNAをBamHI制限エンドヌクレアーゼで処理した。pUC18プラスミドを同様の方法で処理した。所望のpYUB18組み換えコスミドから得られた断片を、T4 DNAリガーゼ酵素(Amersham)の活性を利用してプラスミドベクターにリゲーションした。リゲーションは、20 μlの容量で16℃で一晩行った。リゲーション混合物全体を用いて *E. coli* XL1-Blueの形質転換を行った。遺伝情報発現後、全ての細菌を25 μg / ml、(TPTG、X-Gal)の割合でMI-アンピシリンプレートに拡げた。アルファ相補性が確立されないクローニングが、コロニーの色(白色)によって確認された。

クローニングによる精製後、組み換えクローンを検討した。アルカリ溶解によってプラスミドDNAを抽出し、その後、制限エンドヌクレアーゼBamHIによる処理の前または後に0.8%のアガロールゲルを用いて分析した。

## 【 0 0 6 4 】

## 1.3.5 制限地図の作製

両方向にクローニングされた3 kbのBamHI-BamHI断片を含むpLA34およびpLA4組み換えプラスミドを、pUC18マルチサイトリンカー(ポリリンカー)内の部位を有する各種の制限エンドヌクレアーゼで処理した。制限エンドヌクレアーゼBamHI、HindIII、SphI、XbaI、SalI、KpnI、EcoRIおよびSmaIを用いて単一または二重の処理を行い、0.8%アガロールゲルを用いて分析した。臭化エチジウムを用いてDNAを染色した後、それらの移動距離をマーカー(インターナルラボラトリースタンド、PvuIIで処理し

たpKN プラスミド)と比較して各断片のサイズを決定した。

【0065】

#### 1.4 蛋白質の検出方法

##### 1.4.1 ELISA 法

競合ELISA 法によってポリクロナル血清 (Romain達、1993, 上記)を用いて、細菌培養物より得られる各種調製物中の45/47kDa 蛋白質濃度を測定した。

この兔のポリクロナル血清は、通常の免疫処理方法(フロインドの不完全アジュバントに懸濁した精製蛋白質50 $\mu$ gを注射し、1ヶ月後に25 $\mu$ gを注射する)に従って45/47蛋白質に対して作製されたものである。

第1のマイクロプレートのウェルを炭酸塩緩衝液を用いて1 $\mu$ g/mlに調製した精製蛋白質溶液が15日目のMycobacterium1 bovis BCG 上清液(10 $\mu$ g/ml)のいずれかで覆った。37 $^{\circ}$ Cで1時間かけて抗原を固定し、マイクロプレートをPBSで5回洗浄した。第2のインキュベーションではPBSと0.5%ゼラチンと4%ブタノールとを含む溶液を用いて37 $^{\circ}$ Cで1時間、ウェルを飽和させた。その後、PBS-Tween 0.1%を用いてマイクロプレートを5回洗浄した。

【0066】

試験は以下のように行った：

第2のマイクロプレート内でPBS-Tween 0.1%、0.25%ゼラチン、4%ブタノールを用いて各種濃度(純粋、1/2、1/4、1/8等)に希釈した分析すべき上清50 $\mu$ lと、PBS-Tween 0.1%、0.25%ゼラチン、4%ブタノールを用いて希釈倍率1/4000に調製した兔血清50 $\mu$ lとを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、次に混合物を第1のマイクロプレートに移して37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。0.1%のPBS-Tweenを用いてマイクロプレートを10回洗浄した。最後に、兔に対する抗IgG H+L 複合抗体(Byosys)をアルカリホスファターゼを用いて標識し、PBS-Tween 0.1%、0.25%ゼラチン、4%ブタノールを用いて希釈率1/4000に調製したものを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。PBS-Tween 0.1%を用いてマイクロプレートを10回洗浄した。

最後に、酵素基質であるパラ-ニトロフェニルホスフェート(pNPP)を、NaHCO<sub>3</sub>、MgCl<sub>2</sub>、pH9.6 緩衝液を用いて40mg/24ml濃度に調製した状態で1時間または一夜インキュベートした。Titertek Twinreader上、414nm および690nm でODを読み取った。

【0067】

##### 1.4.2 免疫インプリント法

変性SDS-PAGEゲル上で行う通常のゲル電気泳動方法を採用した(Laemmli, Nature, 1970, 277:680-685)。その後、PVD膜に電気的に移した(Towbin 達、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76:4350-4354; Pluskal 達、Biotechniques,1986, 4:272-283)。ゲル上で分析したサンプルを定量し、M. smegmatis上清については凍結乾燥体の重量 $\mu$ g(5 $\mu$ gを添加)を、E. coli 溶解物については蛋白質の重量 $\mu$ g(25 $\mu$ gを添加)を測定した。精製したM. bovis BCG蛋白質を、トラックあたり0.25 $\mu$ g蛋白質の濃度でゲル上に添加した。

膜上に移された蛋白質は、マイコバクテリア中で発現される蛋白質に対する兔のポリクロナル血清(希釈率:500分の1)を用いて検出した。E. coli 内の組み換え蛋白質を検出するために、これらポリクロナル抗体をDEAE(Trisacryl<sup>D</sup>)カラムで精製し、その後得られた免疫グロブリンを、臭化シアノゲン(Pharmacia)によって活性化したSepharose-4Bカラム上に固定されたE. coli の溶解物に吸着させた(Maniatis 達、1982)。保持されなかった抗体は4 $^{\circ}$ Cで保存し、100分の1の希釈率で膜に移された蛋白質を検出するために使用した。

アルカリホスファターゼで標識された種特異性のある抗Ig H+L 複合抗体(Bio-Sys)を3000分の1の希釈率で上記抗体を検出するために使用した。最後に、アルカリホスファターゼの活性は、2種類の人工色素産生基質、テトラゾリウムブルーと5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートを用いて検出した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 8 】

## 1.5 DNA配列決定

ヌクレオチドの配列決定は、2種類のクローンpLA34 およびpLA4から各種欠失によって得られたクローン群を使用して行った。欠失は作製した制限酵素地図に準じて選択した。

配列決定は2本鎖プラスミドDNAマトリクスを用いて行った。T7シーケンシングキット(Pharmacia) および<sup>35</sup>S ATPを用いてサンガーの方法を適用した。

各種の欠失クローンおよびpUC18 プラスミドのユニバーサルプライマー(Direct and Reverse Primer)、続いて合成オリゴヌクレオチドを用いて配列を決定した。

配列は、2種類の相補鎖について決定した。

*M. tuberculosis* のゲノムDNAのGCの割合が高い(65%)

コンプレッション領域は、7-Deaza dGTPすなわちdGTPの化学的類似物を含むT7 Deaza G/A配列決定キット(Pharmacia) を用いて配列決定した。

10

## 【 0 0 6 9 】

## 1.6 配列解析

得られた隣接する配列の比較および組合わはSTADENプログラムを用いてUnix (登録商標)で行った。EMBLおよびGen-Bankデータベースの配列から検索した配列の相同性は GCGのFASTA およびT-FSTAプログラムを用いて作製した。

## 【 0 0 7 0 】

## 2) 結果

2.1 M. tuberculosisに由来する45/47kDa蛋白質のM. smegmatis へのクローニングおよび発現

20

2.1.1 M. smegmatisにおいてM. tuberculosis を発現させるための遺伝子ライブラリーのスクリーニング

使用した遺伝子ライブラリー(Jacobs 達、1991, 上記)は、制限エンドヌクレアーゼSau 3aを用いてゲノムを部分的に切断して得られる40kbの断片をpYUB18コスミドベクター内にクローニングすることによって作製した。パルスフィールドゲル電気泳動によって4200 kbと推定されるゲノムのサイズは、約100 ~ 150 個のクローンに含まれる。

競合ELISA を用いて液体培地中の蛋白質を決定した (Romain達、1993, 上記)。それによって*M. bovis* BCGの7日目の培養物の上清に含まれる45/47kDa蛋白質の量の検出および定義が可能になった(図8)。

30

この試験は以下のような利点を有する：優れた感度すなわち8000分の1に希釈したポリクロナル血清を用いることによって液体培地中の蛋白質を1 ng/mlのオーダーで検出でき (Romain達、1993, 上記)、さらに一連のサンプルを迅速にスクリーニングするため操作が容易である。

## 【 0 0 7 1 】

電気穿孔法で*M. smegmatis*に導入された400 個のpYUB18::*M. tuberculosis* H37Rv組み換えクローンをスクリーニングした。そのために、各種のクローンを7H9 + OADC培地で7日間培養した。この試験では、培養液を遠心分離して得られる上清を分析して組み換え蛋白質を検索した。

*M. bovis* BCG 45/47kDa 蛋白質に特異的なモノクロナル抗体によって認識される蛋白質を発現する3つのクローンが見出された(図8)。この第1のスクリーニングでは、マイクロタイタープレートのウェルを、45/47kDa 蛋白質が全質量の2%と測定された*M. bovis* BCG培養物の上清で覆った。選択した3種類のクローンを、マイクロタイタープレートのウェルを精製した45/47kDa 蛋白質で覆う第2の試験で確認した。

40

## 【 0 0 7 2 】

2.1.2 選択された組み換えプラスミドの遺伝子分析

選択した各種コスミドを検討するために、変形アルカリ溶解によって*M. smegmatis* DNAを抽出した後、電気穿孔法によって*E. coli* NM554 に導入した。マイコバクテリアの染色体外DNAは細胞壁の複雑さ(溶解が困難である)およびベクターコピー数の少なさ(細菌1個につき平均3~10個)によって採取が困難である。*E. coli* NM554 に形質転換され

50

た3種類のクローンをML-カナマイシンプレート上で単離し、アルカリ溶菌によって抽出したコスミドDNAを0.8%アガロールゲル上で分析した。

3つのクローンはサイズ50kb以上のDNAを含んでいた。制限エンドヌクレアーゼBam HIによる処理を行い、選択された3つのコスミドのプロフィールを識別した。これらは同一であることが明らかになった(図9)。プロフィールは、pYUB18ベクターに対応する12kbのバンドを示し、さらにクローニングされたDNA断片(約40kb)に相当する一連の低分子量バンドを示した。得られたバンドの数およびゲル上のそれらバンドの位置を考慮すれば、単離されたコスミドは同一であるとみなすことができる。

G+Cを多く含むDNAに対して幾分多くの開裂部位を有する制限エンドヌクレアーゼを用いて、pLA1コスミド単独の各種処理を行い、45/47 kDa蛋白質の遺伝子(単数または複数)を含むのに十分な中程度の長さを有する断片を識別し、それらのサブクローニングを行った(図10)。

#### 【0073】

#### 2.1.3 M. tuberculosis に由来する45/47 kDa蛋白質の M. smegmatisにおける発現

約40kbの挿入部分を含むpLA1コスミドによってM. smegmatisにおける組み換え蛋白質の発現が行われ、培養物上清中でポリクロナル抗体によって検出された。

発現された蛋白質のおおよそのサイズを決定するために、培養7日目の上清の凍結乾燥物を免疫インプリントにより分析した。M. smegmatis において発現された組み換え蛋白質は2種類の分子量45/47kDaを有し、これは明らかにM. bovis BCGにおいて発現されるものと同一である(図11)。

別の試験ではこれら組み換え蛋白質の発現レベルはM. bovisBCGに匹敵するものであった。凍結乾燥した上清から得られた所定量の蛋白質を競合ELISAで定量した。各種濃度の凍結乾燥した上清を、8000分の1に希釈した兔のポリクロナル血清を用いて検出した。組み換えM. smegmatisは、M. bovis BCGと比較して5倍量の蛋白質を発現した(図12)。この挿入部分のサブクローニング並びに異種宿主(E. coli)における組み換え蛋白質の分析を行って、これらの蛋白質をコードする遺伝子の数を決定した。

#### 【0074】

#### 2.2 M. tuberculosis に由来する45/47 kDa蛋白質のE. coli へのクローニングおよび発現

##### 2.2.1 45/47蛋白質のE. coli におけるサブクローニングおよび発現

pLA1を異種宿主であるE. coli NM554に形質転換すると、細菌培養物または溶解物の上清からは組み換え蛋白質は検出されなかった。これら蛋白質の発現を促進するために、コスミドをBam HIで処理して得られる断片をpUC18プラスミドにサブクローニングする操作を行った(Yanisch-Perron 達、Gene, 1985, 33: 103,119)。

E. coli XL1-Blueに形質転換されたpUC18::M. tuberculosis組み換えプラスミドを宿主細菌のガラクトシダーゼ発現の欠損によって選択した。一連の36個のクローンのうち『白色』クローンのプラスミドDNAを、アルカリ溶解および制限エンドヌクレアーゼBam HIによる処理を行って調製した。

アガロールゲル上で観察される得られたプラスミドのサイズは、数種類のプロフィールを示し、組み換えプラスミドが異なっていることが示された(図13A)。

#### 【0075】

アガロールゲル上で観察されるクローニングされた挿入部分のサイズも、異なる制限プロフィールを示した(図13B)。これらのプロフィールは全て、pUC18ベクターに相当する2.8kbの断片と、クローニングされた挿入部分に相当するサイズの異なる一連の断片とを示した。

サイズが大きいためクローニングの困難な12kbの断片を除いて、全ての処理断片を単独、2個または3個ずつクローニングした。

選択した36個のクローンについて、E. coli XL1-Blueにおける組み換え蛋白質の発現を誘導する能力に関するスクリーニングを行った。この試験は上記と同じ競合ELISAテストによって行った。

10

20

30

40

50

細菌培養物の上清中に組み換え蛋白質は検出されなかった。一方、3 kbの挿入断片を少なくとも1つ含むクローンの細菌溶解物中に組み換え蛋白質が検出された。

この試験で測定された蛋白質の発現レベルは、プラミドのサイズによって影響されるものと思われた。検討した36個のクローンのうち、発現を可能にする2つのクローン、それぞれ3 kbおよび7 kbの挿入部分を含むpLA34 およびpLA35 が見出された。

発現レベルは、表1（下記参照）の結果に示すようにpLA34の方が高かった。

【0076】

#### 2.2.2 pLA34 およびpLA34-2 クローンの制限地図

pUC18 のマルチサイトリンカー（ポリリンカー）中に存在する一般的な制限エンドヌクレアーゼに対する各種開裂部位を同定することによってpLA34 プラスミドについての制限地図を決定した（図14）。単一の制限部位Eco RIが、3 kbを2 kbおよび1 kbの2つの断片に分断していた。

2 kbのBamHI-EcoRI 挿入部位を有するpLA34-2 クローンは、上記のクローンから欠失によって作製された。このクローンもまた細菌溶解物内に組み換え蛋白質を発現させた（図15）。

細菌溶解物の免疫インプリント分析の結果、45 / 47kDa の2種類の分子量を有する蛋白質がM. bovis BCG内で発現される天然の蛋白質と明らかに同一であることが示された（図16）。

【0077】

#### 2.2.3 M. tuberculosis H37Rvの45 / 47kDa 蛋白質をコードするヌクレオチド配列の分析

45 / 47kDa 蛋白質をコードした遺伝子の完全なヌクレオチド配列、上流の配列およびアミノ酸から推定される配列を、配列No. 1 および配列 No. 2 に示す。

蛋白質ダブレットの発現を可能にする単一の遺伝子はヌクレオチド配列の1082から2056までの位置に975塩基対を有する。リボソーム固定のコンセンサス配列(Shine Dalgarno)は遺伝子上流で確認された。

この遺伝子はGC含有率がM. tuberculosis の65%に比べて69.4%と高い。この遺伝子から推定される蛋白質はシグナルペプチダーゼのANA 開裂部位を含む典型的なシグナル配列を有する。この遺伝子は39アミノ酸のシグナル配列を含む325アミノ酸の蛋白質をコードしている。

M. bovis BCGおよびM. tuberculosis から精製した蛋白質のアミノ酸組成を生化学的分析して得られる結果と蛋白質配列から類推される結果とを比較すると、非常に優れた一致が見られる（表2）。

従って、Mycobacterium smegmatis およびE. coli において2つの分子量を有する蛋白質の発現を可能にする単一の遺伝子が存在するという結論が導かれる。

【0078】

#### 2.2.4 蛋白質配列の分析および配列の比較

推定されるアミノ酸配列から計算される分子量は28.7kDaである。

等電点の計算値は4.36である。この結果も精製したM. bovisBCG 蛋白質について行った生化学的な等電点の測定と非常によく一致する。

推定されるアミノ酸配列からプロリンとアラニンの含有率が高いことが示される(21.8%および19.1%)。

完全な配列は最近発表されたMycobacterium leprae由来の蛋白質との間に相同性を示す。2つの配列の比較を図17に示す。2つの蛋白質間の相同性率は65.4%である。Mycobacterium lepraeについて報告されたこの蛋白質も分泌蛋白に特異的なシグナル配列を有する。

M. tuberculosis から導かれる蛋白質（本発明の対象：配列No. 2）の疎水性プロファイルを求めた。これを図18に示す。

【0079】

10

20

30

40

【表 1】

E. coli における組み換え蛋白質の発現を可能にする  
3 kb挿入部分のpUC18 へのクローニング

pUC18:M. tuberculosis クローン	挿入部分サイズ	蛋白質発現 ELISA
N° 34	3 kb	++
N° 35	3kb + 4kb	+
N° 4	3 kb	-
N° 17	3kb+4kb+1.7 kb	-

【表 2】

M. tuberculosis および M. bovis BCG に由来する

45/47 kDa 蛋白質 および M. leprae に由来する

27/32 kDa 蛋白質のアミノ酸組成

残基	推定された配列 (モル%)		化学分析 (モル%)	
	<u>M. leprae</u>	<u>M. tuber</u>	<u>M. tuber</u>	<u>M. bovis BCG</u>
A = Ala	13.3	18.5	19.2	19.2
B = Asx	-	-	10.4	10.6
C = Cys	0.4	0	< 0.5	< 0.5
D = Asp	4.8	5.2	-	-
E = Glu	4.8	3.1	-	-
F = Phe	2.0	2.5	2.4	2.2
G = Gly	8.0	7.0	7.1	7.4
H = His	0.8	0.3	0.4	0.4
I = Ile	5.2	2.5	2.2	2.3
K = Lys	2.8	2.5	2.7	2.9
L = Leu	6.8	4.2	4.4	4.7
M = Met	0.8	0.7	0.5	0.5
N = Asn	4.0	4.5	-	-
P = Pro	13.3	21.7	20.9	21.9
Q = Gln	3.2	2.8	-	-
R = Arg	2.8	2.8	2.7	2.5
S = Ser	9.6	5.9	5.6	5.0
T = Thr	4.8	6.3	5.7	5.4
V = Val	8.0	5.9	6.2	5.8
W = Trp	1.2	1.4	N.D.	N.D.
Y = Tyr	2.8	2.1	2.2	2.2
Z = Glx	-	-	6.3	6.0
* Asx = Asp + Asn				
Glx = Glu + Gln				

10

20

30

40

【 0 0 8 0 】

【表 3】

配列リスト

(1) 一般情報

(i) 出願人

- (A) 氏名：アンステイチュ パストゥール
- (B) ストリート：リュドゥ ドクトル ル 28
- (C) 市：パリ
- (E) 国：フランス
- (F) 郵便番号：75724
- (G) 電話：4 568 8000
- (H) ファクシミリ：43 06 98 35
- (I) テレックス：250609 F

10

(ii) 発明の名称： 微生物蛋白質と、この蛋白質を産生する微生物と、該蛋白質のワクチンおよび結核検出における利用

(iii) 配列の数： 3

(iv) コンピュータで読み取り可能なフォーム

- (A) 媒体の種類：フロッピーディスク
- (B) コンピュータ：IBM PC コンパチブル
- (C) OS：PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

20

(2) 配列 No. 1 に関する情報

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：2061塩基対
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：二本鎖
- (D) 形状：直鎖

(ii) 分子タイプ：DNA (ゲノム)

(iii) 仮定：なし

(iv) アンチセンス：なし

(ix) 特徴

- (A) 名前/キー：CDS
- (B) 位置：1082..2057

30

(xi) 配列の記載：配列 No. 1

```

GTGCTCGGGC CCAACGGTGC GGGCAAGTCC ACCGCCCTGC ATGTTATCGC GGGGCTGCTT      50
CGCCCCCGAC GCGGGCTTGG TACGTTTGGG GGACCGGGTG TTGACCGACA CCGAGGCCGG      120
GGTGAATGTG GCGACCCACG ACCGTCGAGT CGGGCTGCTG TTGCAAGACC CGTTGTTGTT      180
TCCACACCTG AGCGTGGCCA AAAACGTGGC CTTCGGACCA CAATGCCGTC GCGGGATGTT      240
TGGGTCCGGG CGCGCGCTAG GACAAGGGCG TCGGCACTGC GATGGCTGCG CGAGGTGAAC      300
GCCGAGCAGT TCGCCGACCG TAAGCCTCGT CAGCTATCCG GGGGCCAAGC CCAGCGCGTC      360
GCCATCGCGC GAGCGTTGGC GGCCGAACCG GATGTGTTGC TGCTCGACGA GCCGCTGACC      420

```

40

【表 4】

GGACTCGATG TGGCCGCGGC CGCGGGTATC CGTTCGGTGT TCGGTAGTGT CGTCGCGAGG	480	
AGCGGTTGCG CGGTAGTCCT GACGACCCAT GACCTGCTGG ACGTGTTAC GCTGGCCGAC	540	
CGGGTATTGG TGCTCGAGTC CGGCACGATC GCCGAGATCG GCCCGGTTGC CGATGFGCTT	600	
ACCGCACCTC GCAGTCGTTT CGGAGCCCCT ATCGCCGGAG TCAACCTGGT CAATGGGACC	660	
ATFGGTCCGG ACGGCTCGCT GCGCACCCAG TCCGGCGCCC ACTGGTACGG CACCCCGGTC	720	
CAGGATTTGC CTRACTGGGCA TGAGGCAATC GCGGTGTTC CGCCGACGGC GGTGGCGGTG	780	
TATCCGGAAC CGCCGCACGG AAGCCCGCGC AATATCGTCG GGCTGACGGT GCGGAGGTG	840	10
GATACCCGCG GACCCACGGT CCTGGTGCGC GGGCATGATC AGCCTGGTGG CGCGCTGGC	900	
CTTGCCGCAT GCATCACCGT CGATGCCGCC ACCGAAGTGC GTGTGGCGCC CGGATCGCGC	960	
GTGTGGTTCA GCGTCAAGGC GCAGGAAGTG GCCCTGCACC CGGCACCCCA CCAACACGCC	1020	
AGTTCATGAG CCGACCCGCG CCGTCCTTGC GTCGCGCCGT TAACACGGTA GGTTCCTCGC	1080	
C ATG CAT CAG GTG GAC CCC AAC TTG ACA CGT CGC AAG GGA CGA TTG	1126	
Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly Arg Leu		
1 5 10 15		
GCG GCA CTG GCT ATC GCG GCG ATG GCC AGC GCC AGC CTG GTG ACC GTT	1174	
Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala Ser Leu Val Thr Val		20
20 25 30		
GCG GTG CCC GCG ACC GCC AAC GCC GAT CCG GAG CCA GCG CCC CCG GTA	1222	
Ala Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val		
35 40 45		
CCC ACA ACG GCC GCC TCG CCG CCG TCG ACC GCT GCA GCG CCA CCC GCA	1270	
Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala		
50 55 60		
CCG GCG ACA CCT GTT GCC CCC CCA CCA CCG GCC GCC GCC AAC ACG CCG	1318	
Pro Ala Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr Pro		
65 70 75		
AAT GCC CAG CCG GGC GAT CCC AAC GCA GCA CCT CCG CCG GCC GAC CCG	1366	
Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro Pro Ala Asp Pro		30
80 85 90 95		
AAC GCA CCG CCG CCA CCT GTC ATT GCC CCA AAC GCA CCC CAA CCT GTC	1414	
Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val		
100 105 110		
CGG ATC GAC AAC CCG GTT GGA GGA TTC AGC TTC GCG CTG CCT GCT GGC	1462	
Arg Ile Asp Asn Pro Val Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly		
115 120 125		
TGG GTG GAG TCT GAC GCC GCC CAC TTC GAC TAC GGT TCA GCA CTC CTC	1510	
Trp Val Glu Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu		
130 135 140		
AGC AAA ACC ACC GGG GAC CCG CCA TTT CCC GGA CAG CCG CCG CCG GTG	1558	
Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro Pro Pro Val		40
145 150 155		
GCC AAT GAC ACC CGT ATC GTG CTC GGC CCG CTA GAC CAA AAG CTT TAC	1606	
Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg Leu Asp Gln Lys Leu Tyr		
160 165 170 175		

【表 5】

GCC AGC GCC GAA GCC ACC GAC TCC AAG GCC GCG GCC CGG TTG GGC TCG Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser 180 185 190	1654	
GAC ATG GGT GAG TTC TAT ATG CCC TAC CCG GGC ACC CGG ATC AAC CAG Asp Met Gly Glu Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln 195 200 205	1702	
GAA ACC GTC TCG CTC GAC GCC AAC GGG GTG TCT GGA AGC GCG TCG TAT Glu Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala Ser Tyr 210 215 220	1750	
TAC GAA GTC AAG TTC AGC GAT CCG AGT AAG CCG AAC GGC CAG ATC TGG Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro Asn Gly Gln Ile Trp 225 230 235	1798	10
ACG GGC GTA ATC GGC TCG CCC GCG GCG AAC GCA CCG GAC GCC GGG CCC Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro 240 245 250 255	1846	
CCT CAG CGC TGG TTT GTG GTA TGG CTC GGG ACC GCC AAC AAC CCG GTG Pro Gln Arg Trp Phe Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val 260 265 270	1894	
GAC AAG GGC GCG GCC AAG GCG CTG GCC GAA TCG ATC CGG CCT TTG GTC Asp Lys Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu Val 275 280 285	1942	
GCC CCG CCG CCG GCG CCG GCA CCG GCT CCT GCA GAG CCC GCT CCG GCG Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro Ala 290 300	1990	20
CCG GCG CCG GCC GGG GAA GTC GCT CCT ACC CCG ACG ACA CCG ACA CCG Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro 305 310 315	2038	
CAG CGG ACC TTA CCG GCC T GACC Gln Arg Thr Leu Pro Ala 320 325	2061	

## 【表 6】

## (2) 配列 No. 2 に関する情報

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：325 アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖

10

## (ii) 分子タイプ：蛋白質

(xi) 配列の記載：配列 No. 2

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

20

30

【表 7】

Asn	Asp	Thr	Arg	Ile	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Lys	Leu	Tyr	Ala
				165					170					175	
Ser	Ala	Glu	Ala	Thr	Asp	Ser	Lys	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gly	Ser	Asp
			180					185					190		
Met	Gly	Glu	Phe	Tyr	Met	Pro	Tyr	Pro	Gly	Thr	Arg	Ile	Asn	Gln	Glu
		195					200					205			
Thr	Val	Ser	Leu	Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Tyr	Tyr
	210					215					220				
Glu	Val	Lys	Phe	Ser	Asp	Pro	Ser	Lys	Pro	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Thr
225					230					235					240
Gly	Val	Ile	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	Asn	Ala	Pro	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro
				245				250						255	
Gln	Arg	Trp	Phe	Val	Val	Trp	Leu	Gly	Thr	Ala	Asn	Asn	Pro	Val	Asp
			260					265					270		
Lys	Gly	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Arg	Pro	Leu	Val	Ala
		275					280					285			
Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro
	290					295					300				
Ala	Pro	Ala	Gly	Glu	Val	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Gln
305					310					315					320
Arg	Thr	Leu	Pro	Ala											
				325											

10

20

## 【表 8】

## (2) 配列 No. 3 に関する情報

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：286 アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(C) ストランド：

(D) トポロジー：直鎖

10

(ii) 分子タイプ：ペプチド

(iii) 仮定：なし

(xi) 配列の記載：配列 No. 3

Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro  
 1 5 10 15

20

Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala Thr Pro Val Ala Pro Pro  
 20 25 30



【図6】 A ~ Eは高速イオン交換カラムで得られた画分(1 ~ 3)と分子篩を用いた濾過で得られた画分1(ウェル0)をマイグレートさせて得られるゲルに対応するPVDF膜を示す図。

【図7】 A ~ Dはイオン交換カラムで得られた画分1(0)および逆相クロマトグラフィーで得られた画分(1 ~ 5)の移動に相当するゲルをプロットした膜を同じコードを有する図6A ~ 6B、6D ~ 6Eと同一の試薬で検出した結果を示す図。

【図8】 M. smegmatisにおいてM. tuberculosis H37Rvを発現させるための遺伝子ライブラリーのスクリーニングを示す図。

【図9】 ライブラリーより選択され、E. coliで電気穿孔(エレクトロポレ、electropore)し、アルカリ溶解で抽出した3つのコスミドのアガロールゲル上での移動を示す図

10

【図10】 BamHI(a)、SmaI(b)、HpaI(c)、NotI(d)、SspI(e)、EcoRI(f)およびHindIII(g)で処理したE. coli NM554から抽出されたpLA1のコスミドDNAのゲル上での移動を示す図。

【図11】 45/47kDa蛋白質のマイコバクテリアにおける発現を示す図。

【図12】 マイコバクテリアにおける45/47kDa蛋白質の発現を示す図。

【図13】 A、BはpUC18のpLA1コスミドをBamHIで処理して得られる断片をリゲーションして得られた各種pUC18:M.tuberculosis H37Rv組み換えクローンのプラスミドプロフィール(13A)と、BamHI制限プロフィール(13B)の図。

【図14】 45/47kDa蛋白質のE.coliにおける発現を可能にする挿入断片の制限地図

20

【図15】 E. coliにおける45/47kDa蛋白質の発現を示す図。

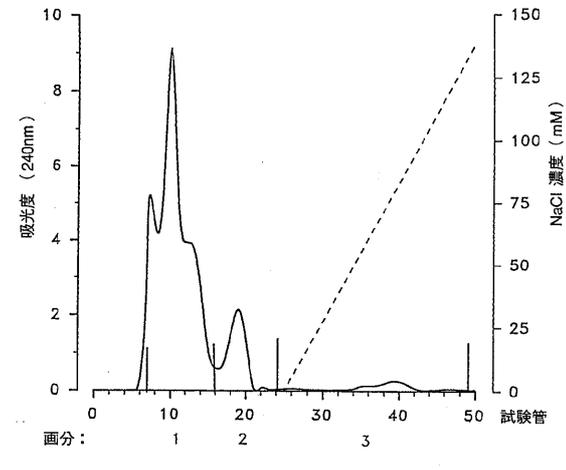
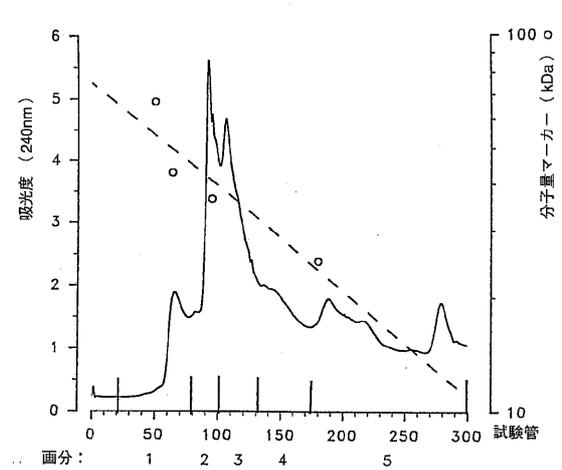
【図16】 E. coliにおける45/47kDa蛋白質の発現を示す図。

【図17】 配列No.2とM. leprae(mIn 431)由来の蛋白質の配列との比較図。

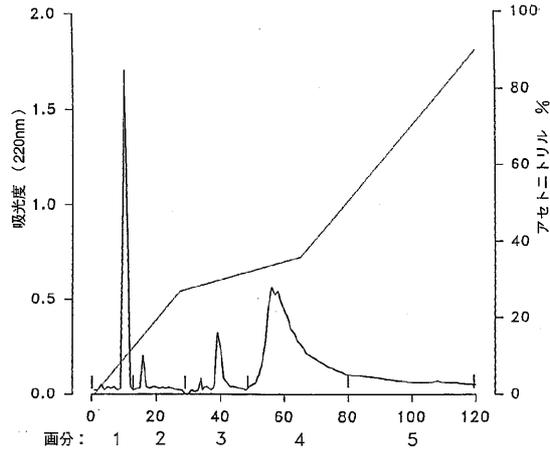
【図18】 配列No.2の蛋白質の疎水性度プロフィール。

【図1】

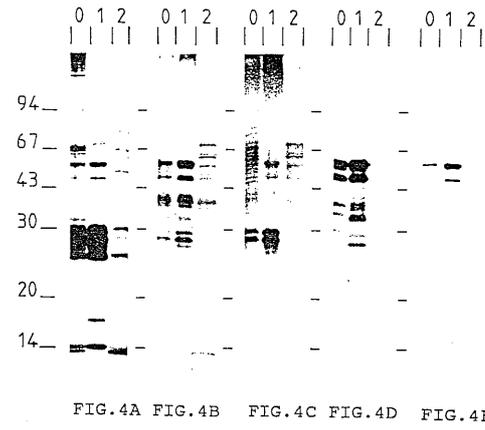
【図2】



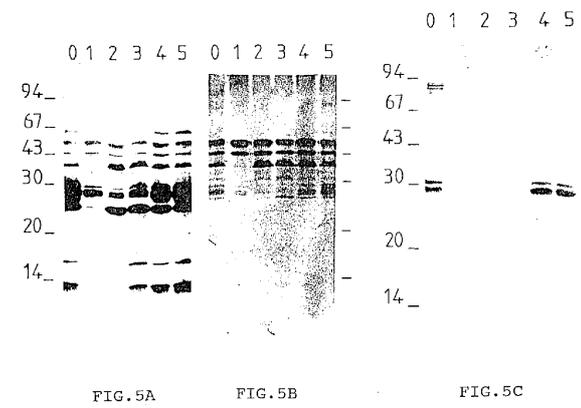
【 図 3 】



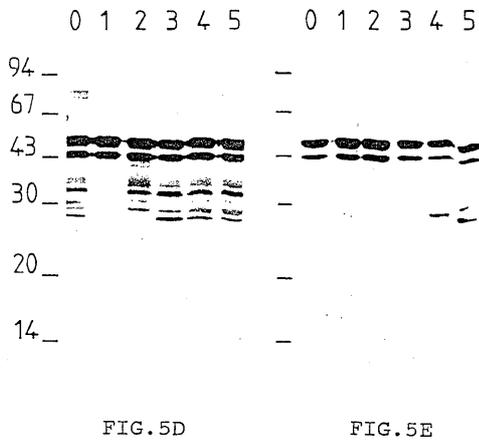
【 図 4 】



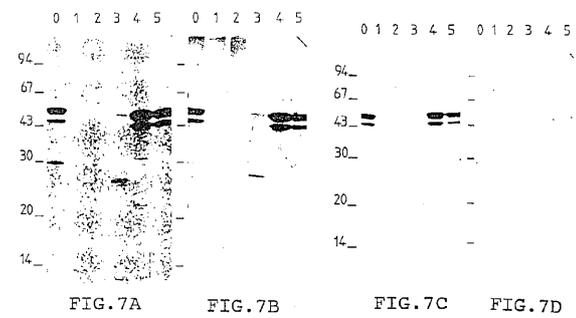
【 図 5 A - C 】



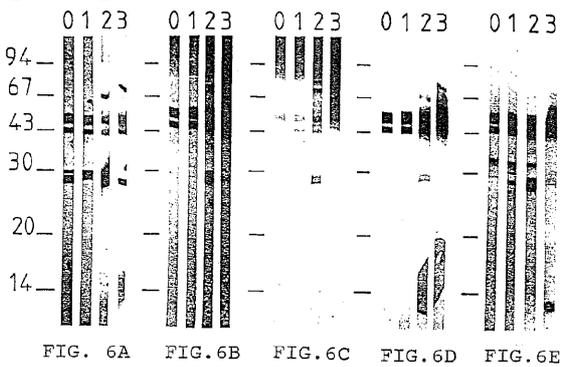
【 図 5 D - E 】



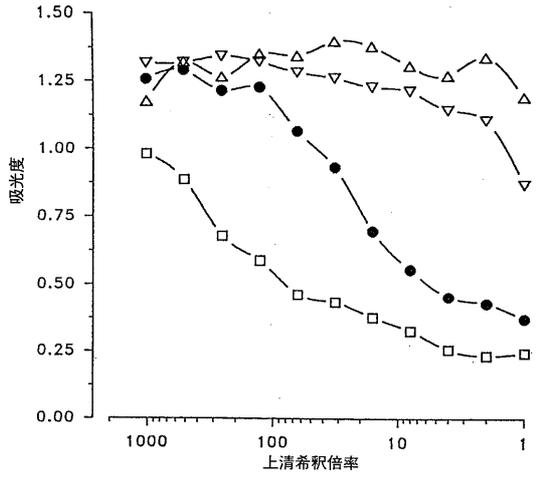
【 図 7 】



【 図 6 】

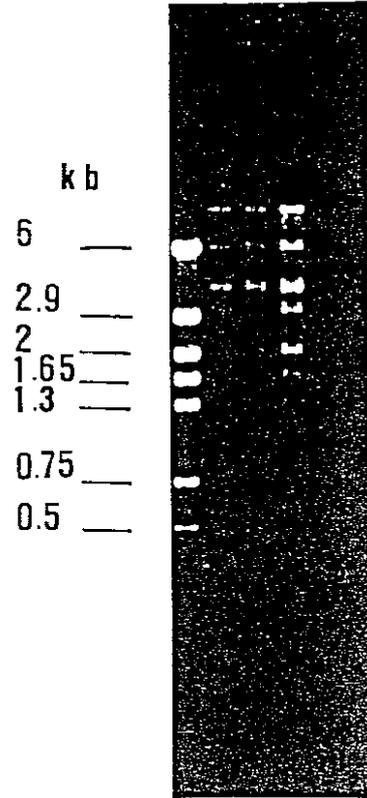


【 図 8 】

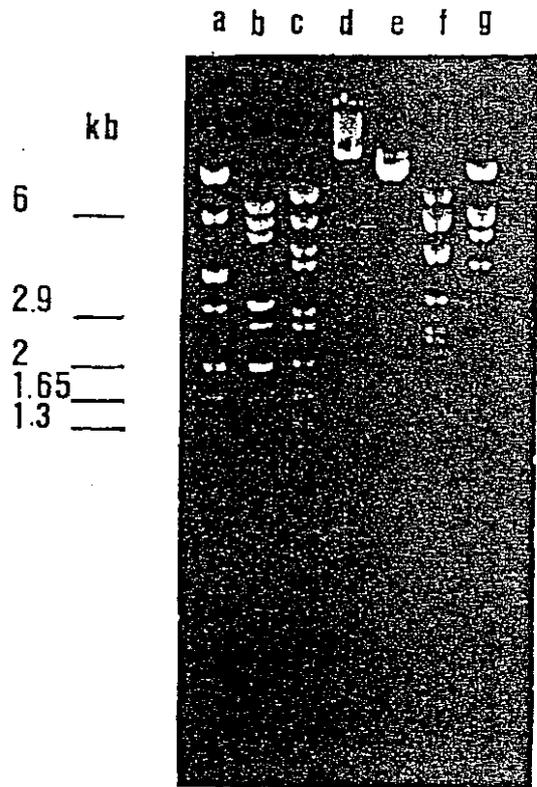


- - *M. bovis* BCGの上清
- ▲ - 形質転換されていない*M. smegmatis*の上清
- - 抗体によって認識される組み換え蛋白質を発現することの可能な組み換えクローンによって形質転換された*M. smegmatis*の上清
- ▽ - 抗体によって認識される組み換え蛋白質を発現しない組み換えクローンによって形質転換された*M. smegmatis*の上清

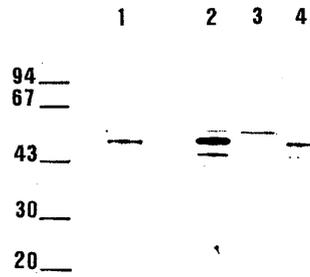
【 図 9 】



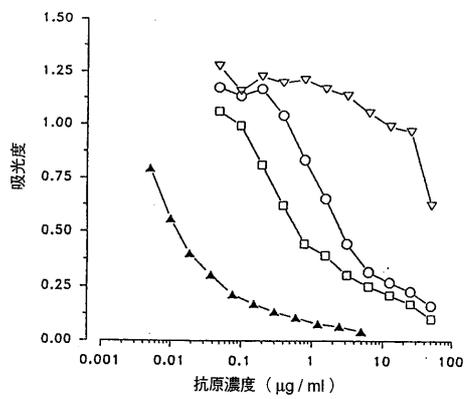
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



- ▲ - 精製された45/47kDa蛋白質
- - pLA1で形質転換された*M. smegmatis*の上清
- - *M. bovis* BCGの上清
- ▽ - 形質転換されていない*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155の上清



## 【手続補正書】

【提出日】平成18年9月20日(2006.9.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

下記の配列 No. 3 を有する蛋白質：

## 【化1】

Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala  
Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala  
Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr  
Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro  
Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala  
Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val  
Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu  
Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu  
Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro  
Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg  
Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp  
Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu  
Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu  
Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala  
Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro  
Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala  
Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe  
Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys  
Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu  
Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu  
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro  
Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

## 【請求項2】

下記の配列 No. 2 を有する請求項1に記載の蛋白質：

## 【化 2】

Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly  
 Arg Leu Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala  
 Ser Leu Val Thr Val Ala Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala  
 Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala  
 Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala  
 Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr  
 Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro  
 Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala  
 Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val  
 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu  
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu  
 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro  
 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg  
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp  
 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu  
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu  
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala  
 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro  
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala  
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe  
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys  
 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu  
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro  
 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の配列 No. 2 または配列 No. 3 と、免疫応答を誘導可能なペプチド配列または蛋白質とを含むハイブリッド蛋白質。

## 【請求項 4】

免疫応答が体液性応答および / または細胞性応答である請求項 3 に記載の蛋白質。

## 【請求項 5】

ペプチドまたは蛋白質が、ジフテリア毒素、破傷風毒素、HBV ウイルスの HB S 抗原またはポリオウイルスの VP 1 抗原もしくははその他任意の毒素または抗原の一部、特にエピトープである請求項 3 または 4 に記載の蛋白質。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするオリゴヌクレオチド。

## 【請求項 7】

下記の配列 No. 1 を有する請求項 6 に記載の DNA :

## 【化 3】

GT GCTCGGGCCC AACGGTGCGG GCAAGTCCAC CGCCCTGCAT  
 GTTATCGCGG GGCTGCTTCG CCCCCGACGC GGGCTTGGTA CGTTTGGGGG  
 ACCGGGTGTT GACCGACACC GAGGCCGGGG TGAATGTGGC GACCCACGAC  
 CGTCGAGTCG GGCTGCTGTT GCAAGACCCG TTGTTGTTTC CACACCTGAG  
 CGTGGCCAAA AACGTGGCCT TCGGACCACA ATGCCGTGCG GGGATGTTTG  
 GGTCCGGGCG CGCGCTAGGA CAAGGGCGTC GGCCTGCGA TGGCTGCGCG  
 AGGTGAACGC CGAGCAGTTC GCCGACCGTA AGCCTCGTCA GCTATCCGGG  
 GGCCAAGCCC AGCGCGTCGC CATCGCGCGA GCCTTGGCGG CCGAACCGBA  
 TGTGTTGCTG CTCGACGAGC CGCTGACCCG ACTCGATGTG GCCCGGGCCG  
 CGGGTATCCG TTCGGTGTTC CGTAGTGTTC TCGCGAGGAG CGGTTGCGCG  
 GTAGTCCTGA CGACCCATGA CCTGCTGGAC GTGTTTACGC TGGCCGACCG  
 GGTATTTGGTG CTCGAGTCCG GCACGATCGC CGAGATCGGC CCGGTTGCCG  
 ATGTGCTTAC CGCACCTCGC AGTCGTTTCG GAGCCCCGTAT CGCCGGAGTC  
 AACCTGGTCA ATGGGACCAT TGGTCCGGAC GGCTCGCTGC GCACCCAGTC  
 CGGCGCCAC TGGTACGGCA CCCCAGTCCA GGATTTGCCT ACTGGGCATG  
 AGGCAATCGC GGTGTTCCCG CCGACGGCGG TGGCGGTGTA TCCGGAACCG  
 CCGCACGGAA GCCCGCGCAA TATCCTCGGG CTGACGGTGG CCGAGGTGGA  
 TACCCGCGGA CCCACGGTCC TGGTGGCGG GCATGATCAG CCTGGTGGCG  
 CGCCTGGCCT TGCCGCATGC ATCACCGTCG ATGCCGCCAC CGAACTGCGT  
 GTGGCGCCCG GATCGCGCGT GTGGTTCAGC GTCAAGGCGC AGGAAGTGGC  
 CCTGCACCCG GCACCCACC AACACGCCAG TTCATGAGCC GACCCGCGCC  
 GTCTTTGCGT CGCGCCGTTA ACACGGTAGG TTCTTCGCCA TGCATCAGGT  
 GGACCCCAAC TTGACACGTC GCAAGGGACG ATTGGCGGCA CTGGCTATCG  
 CGGCGATGGC CAGCGCCAGC CTGGTGACCG TTGCGGTGCC CCGGACCGCC  
 AACGCCGATC CGGAGCCAGC GCCCCCGGTA CCCACAACGG CCGCCTCGCC  
 GCCGTCGACC GCTGCAGCGC CACCCGCACC GGCAGACACCT GTTGCCCCC  
 CACCACCGGC CGCCGCCAAC ACGCCGAATG CCCAGCCGGG CGATCCCAAC  
 GCAGCACCTC CGCCGGCCGA CCCGAACGCA CCGCCGCCAC CTGTCATTGC  
 CCCAAACGCA CCCCAACCTG TCCGGATCGA CAACCCGGTT GGAGGATTCA  
 GCTTCGCGCT GCCTGCTGGC TGGGTGGAGT CTGACGCCGC CCACTTCGAC  
 TACGGTTCAG CACTCCTCAG CAAAACCACC GGGGACCCGC CATTTCCCGG  
 ACAGCCGCCG CCGGTGGCCA ATGACACCCG TATCGTGCTC GGCCGGCTAG  
 ACCAAAAGCT TTACGCCAGC GCCGAAGCCA CCGACTCCAA GGCCGCGGCC  
 CGGTTGGGCT CGGACATGGG TGAGTTCTAT ATGCCCTACC CGGGCACCCG  
 GATCAACCAG GAAACCGTCT CGCTCGACGC CAACGGGGTG TCTGGAAGCG  
 CGTCGTATTA CGAAGTCAAG TTCAGCGATC CGAGTAAGCC GAACGGCCAG  
 ATCTGGACGG GCGTAATCGG CTCGCCCGCG GCGAACGCAC CCGACGCCGG  
 GCCCCCTCAG CGCTGGTTCG TGGTATGGCT CCGGACCGCC AACAACCCGG  
 TGGACAAGGG CGCGGCCAAG GCGCTGGCCG AATCGATCCG GCCTTTGGTC  
 GCCCCGCCGC CGGCGCCGGC ACCGGCTCCT GCAGAGCCCG CTCCGGCGCC  
 GGGCGCGGCC GGGGAAGTCG CTCCTACCCC GACGACACCG ACACCGCAGC  
 GGACCTTACC GGCCTGACC

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質を産生する微生物。

【請求項 9】

上記蛋白質の少なくとも一部が表面に存在する請求項 8 に記載の微生物。

【請求項 10】

細菌である請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 11】

細菌、特に *M. bovis* B C G である請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 12】

結核抗体を含有すると思われる生物液体を請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質と接触させることを特徴とする結核特異的抗体の検出方法。

【請求項 13】

蛋白質を担体に固定する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質の調製物と、プロセスを実施するための緩衝液とからなる請求項 12 または 13 に記載の方法を実施するための試験キット。

【請求項 15】

生成した抗体 - 蛋白質複合体を検出するための試薬を含む請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の蛋白質と特異的に反応する抗体。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/105 (2006.01)	C 0 7 K 14/105	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 K 39/05 (2006.01)	A 6 1 K 39/05	
A 6 1 K 39/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/08	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 39/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/13	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	F

(72)発明者 パスカル ペシエ

フランス国 7 5 0 1 8 パリ リュ ダンレモン 1 2 4

(72)発明者 フェリックス ロマン

フランス国 9 1 6 4 0 フォントネー - レ - ブリ ベレ - エール リュ セ . エフ . - ドレ  
フュス 4 9 ビス

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA33 BA34 BA38 BA61 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05  
DA06 DA11 EA04 GA01 GA11 HA08 HA19  
4B065 AA01X AA01Y AA23Y AA26X AA36X AA36Y AA57X AA87X AA95Y AA96Y  
AB01 AB02 BA02 BA08 CA24 CA45  
4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA22 BA23 BA41 CA01 CA04 NA14  
ZA592 ZB022 ZB052 ZB352  
4C085 AA03 BA09 BA10 BA12 BA53 BA89 CC07 CC08 CC21  
4C087 AA01 AA03 BC29 BC30 BC68 BC72 BC83 NA14 ZA59 ZB02  
ZB05 ZB35  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA41 CA01 CA02 CA11 CA40 DA75  
DA86 EA31 FA74

专利名称(译)	微生物蛋白，产生这种蛋白质的微生物，用于检测结核病的蛋白质疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007044045A</a>	公开(公告)日	2007-02-22
申请号	JP2006241160	申请日	2006-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	安妮菊研究所巴斯德		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu巴斯德		
[标]发明人	アンラクイレリー ジルマルシャル パスカルベシエ フェリックスロマン		
发明人	アン ラクイレリー ジル マルシャル パスカル ベシエ フェリックス ロマン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/35 C07K14/33 C07K14/34 C07K14/02 C07K14/105 C07K16/12 C12N1/21 C07K19/00 A61K38/00 A61K35/74 A61K39/00 A61K39/04 A61K39/05 A61K39/08 A61K39/29 A61K39/13 A61P31/06 G01N33/569 G01N33/53 A61P31/04 C12N15/31 C12P21/02 C12R1/32		
CPC分类号	A61K38/00 A61P31/04 A61P31/06 C07K14/35 C07K2319/00 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/35 C07K14/33 C07K14/34 C07K14/02 C07K14/105 C07K16/12 C12N1/21 C07K19/00 A61K37/02 A61K35/74.A A61K39/00.H A61K39/04 A61K39/05 A61K39/08 A61K39/29 A61K39/13 A61P31/06 G01N33/569.F A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA33 4B024/BA34 4B024/BA38 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA19 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA23Y 4B065/AA26X 4B065/AA36X 4B065/AA36Y 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA95Y 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/CA01 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZB022 4C084/ZB052 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA09 4C085/BA10 4C085/BA12 4C085/BA53 4C085/BA89 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BC29 4C087/BC30 4C087/BC68 4C087/BC72 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA59 4C087/ZB02 4C087/ZB05 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA02 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA74		
优先权	08/382184 1995-02-01 US		
其他公开文献	JP4276670B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供可用于疫苗或检测结核病特异性抗体的蛋白质。解决方案：公开了分子量为28,799Da的结核分枝杆菌蛋白质和含有至少部分蛋白质序列的杂合蛋白质。 Z

