

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-519605

(P2006-519605A)

(43) 公表日 平成18年8月31日(2006.8.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
CO7K 14/195 (2006.01)	CO7K 14/195	4B063
CO7K 16/12 (2006.01)	CO7K 16/12	4C085
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C086
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-506942 (P2006-506942)	(71) 出願人	502200830
(86) (22) 出願日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		チルドレンズ ホスピタル, インコーポ レイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月26日 (2005.8.26)		アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/007001	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02004/078949		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/453,134		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成15年3月6日 (2003.3.6)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 類型不能HAEMOPHILUS INFLUENZAEの中耳炎単離株の遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、Haemophilus influenzae (NTHi) の類型不能株のポリヌクレオチド配列、そのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドならびにその使用に関する。本発明はまた、中耳または鼻咽頭のNTHi感染の間またはその感染に応じて、アップレギュレートされるNTHi遺伝子に関する。本発明はまた、NTHi関連障害を処置および予防するワクチンおよび方法を含む、これらのNTHiポリヌクレオチドおよびNTHiポリペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、配列番号 577 ~ 579、配列番号 589 ~ 614、配列番号 675 ~ 685、配列番号 615、配列番号 617、配列番号 619、配列番号 621、配列番号 623、配列番号 625、配列番号 627、配列番号 629、配列番号 631、配列番号 633、配列番号 635、配列番号 637、配列番号 639、配列番号 641、配列番号 643、配列番号 645、配列番号 647、配列番号 649、配列番号 651、配列番号 653、配列番号 655、配列番号 657、配列番号 659、配列番号 661、配列番号 663、配列番号 665、配列番号 667、配列番号 669、配列番号 671、配列番号 673、配列番号 686、配列番号 688、配列番号 692、配列番号 694、配列番号 696、配列番号 698、配列番号 700、配列番号 702、配列番号 704、配列番号 706、配列番号 708、配列番号 710、配列番号 712、配列番号 714、配列番号 716、配列番号 718、配列番号 720、配列番号 722、配列番号 724、配列番号 726、配列番号 728、配列番号 730、配列番号 732、配列番号 734、配列番号 736、配列番号 738、配列番号 740、配列番号 742、配列番号 744、配列番号 746、配列番号 748、配列番号 750、配列番号 752、配列番号 754、配列番号 756、配列番号 758、配列番号 760、配列番号 762、配列番号 764、配列番号 766、配列番号 768 または配列番号 770 のいずれか一つのヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

請求項 1 に示されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドまたはそのフラグメント。

20

【請求項 3】

単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 616、配列番号 618、配列番号 620、配列番号 622、配列番号 624、配列番号 626、配列番号 628、配列番号 630、配列番号 632、配列番号 634、配列番号 636、配列番号 638、配列番号 640、配列番号 642、配列番号 644、配列番号 646、配列番号 648、配列番号 650、配列番号 652、配列番号 654、配列番号 656、配列番号 658、配列番号 660、配列番号 662、配列番号 664、配列番号 666、配列番号 668、配列番号 670、配列番号 672、配列番号 674、配列番号 687、配列番号 689、配列番号 691、配列番号 693、配列番号 695、配列番号 697、配列番号 699、配列番号 701、配列番号 703、配列番号 705、配列番号 707、配列番号 709、配列番号 711、配列番号 713、配列番号 715、配列番号 717、配列番号 719、配列番号 721、配列番号 723、配列番号 725、配列番号 727、配列番号 729、配列番号 731、配列番号 733、配列番号 735、配列番号 737、配列番号 739、配列番号 741、配列番号 743、配列番号 745、配列番号 747、配列番号 749、配列番号 751、配列番号 753、配列番号 755、配列番号 757、配列番号 759、配列番号 761、配列番号 763、配列番号 765、配列番号 767、配列番号 769 または配列番号 771 のいずれか一つのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

30

40

【請求項 4】

請求項 2 または請求項 3 に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項 5】

請求項 2 もしくは請求項 3 に記載のポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する抗体。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項 7】

生物学的サンプル中の N T H i 細菌を検出するための方法であって、該方法は、

50

(a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントと生物学的サンプルとを接触させる工程、および

(b) 該サンプル中の該ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 8】

生物学的サンプル中の N T H i 細菌を検出するための方法であって、該方法は、

(a) 請求項 5 に記載の抗体と生物学的サンプルとを接触させる工程、および

(b) 該サンプル中の該抗体の結合を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 9】

前記生物学的サンプルは、血清、唾液、耳の分泌液、血液、尿、リンパ液、および脳脊髄液からなる群より選択される、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

N T H i 細菌に対する免疫応答を誘導するための方法であって、該方法は、免疫原的に有効量の請求項 2 もしくは 3 に記載のポリペプチドまたはそのフラグメントを N T H i 細菌感染の危険にある患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 11】

請求項 2 もしくは 3 に記載のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび薬学的に適切なキャリアを含むワクチン。

【請求項 12】

N T H i 細菌感染を防止するための方法であって、該方法は、N T H i の細胞接着をブロックする請求項 2 または 3 に記載のポリペプチドを N T H i 細菌感染の危険にある患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 13】

N T H i 細菌感染を防止するための方法であって、該方法は、N T H i の細胞接着をブロックする請求項 5 に記載の抗体を N T H i 細菌感染の危険にある患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 14】

前記 N T H i 感染は、中耳内である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

N T H i 細菌感染を処置または防止するための方法であって、該方法は、請求項 2 もしくは 3 に記載のポリペプチドの発現または活性を阻害する分子を必要とする患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法であって、前記 N T H i ポリペプチドは、h i s B、l p p B、s a p A、r b s C、p u r e、r i b、a r c B、u x u A、l i c C、i s p Z、m u k F、g l p R、i h f B、c s p D、l a v、H I 1 6 4 7、H I 0 0 9 4、H I 1 1 6 3、H I 0 6 6 5、H I 1 2 9 2、H I 1 0 6 4、H I 1 3 8 6、H I 1 4 6 2、H I 1 3 6 9、および H I 1 5 9 8 からなる群より選択される N T H i 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 17】

請求項 15 に記載の方法であって、前記 N T H i ポリペプチドは、配列番号 6 1 6、配列番号 6 1 8、配列番号 6 2 0、配列番号 6 2 2、配列番号 6 2 4、配列番号 6 2 6、配列番号 6 2 8、配列番号 6 3 4、配列番号 6 3 8、配列番号 6 4 2、配列番号 6 4 4、配列番号 6 4 6、配列番号 6 5 0、配列番号 6 5 2、配列番号 6 5 6、配列番号 6 5 8、配列番号 6 6 0、配列番号 6 6 2、配列番号 6 6 4、配列番号 6 6 6、配列番号 6 6 8、配列番号 6 7 0、配列番号 6 7 2 および配列番号 6 7 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 18】

前記必要とする患者に投与される前記分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、

10

20

30

40

50

請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記必要とする患者に投与される前記分子は、抗体である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

前記必要とする患者に投与される前記分子は、低分子である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 NTHi 感染は、中耳内である、請求項 15 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、2003年3月6日出願の米国仮特許出願第60/453,134号(これは、その全体が本明細書に参考として援用される)の優先権の利益を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、Haemophilus influenzae (NTHi) ゲノムの類型不能株のポリヌクレオチド配列、そのゲノム内に含まれるNTHi 遺伝子およびそのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに関する。本発明はまた、NTHi 関連障害を処置および予防するワクチンおよび方法を含む、これらのNTHi ポリヌクレオチドおよびNTHi ポリペプチドの使用に関する。本発明はまた、中耳または鼻咽頭のNTHi 感染の間またはその感染に応じて、アップレギュレートされるNTHi 遺伝子に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

中耳炎(OM)は、全世界で非常に優勢な小児疾患であり、小児が救急室に運ばれる主な原因である(Infante-Rivand and Fernandez, Epidemiol. Rev., 15:444-465, 1993)。最近の統計では、1990年に、OMが原因で2億4500万回の通院(physician office visit)があったことが示されている。このことは、1980年代において報告されたものより200%を超えて増大していることを示している。もはや死と関連することは稀であるが、OMと関連する罹患率は、重大である。聴覚喪失は、この疾患と関連する一般的な問題であり、しばしば、小児の行動、教育および言語能力の発達に影響を与える(Baldwin, Am. J. Otol., 14:601-604, 1993; Hunter et al., Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl., 163:59-61, 1994; Teele et al., J. Infect. Dis., 162:685-694, 1990)。OMのその社会経済的な影響もまた大きく、OMを診断および管理する直接的および間接的な費用は、米国単独で年間50億ドルを超えている(Kaplan et al., Pediatr. Infect. Dis. J., 16:S9-11, 1997)。

【0004】

抗生物質療法は、一般的かつ中耳腔換気用チューブの外科手術による置換は、滲出液を排出すること、感染を除去すること、および中耳に流体が蓄積することと関連する頭痛を緩和することという観点から好結果であったが、多剤耐性細菌の出現およびチューブの置換と関連するその侵襲的性質によって、OMの管理、より好ましくはOMの予防に対するより有効かつ容認されたアプローチが必要であることが明らかにされた。慢性OMの外科手術的管理は、小児に全身麻酔をかけている間に、鼓膜を通して中耳腔換気用チューブを挿入することを包含する。この手順は平凡であり(普及率は約13%である; Bright et al., Am. J. Public Health, 83(7):1026-8, 1993)、蓄積した流体を中耳から排出することによって、痛みの伴う症状を軽減するという点で非常に有効であるが、これは、その手順の侵襲的性質およびその伴う危険性に起因して、

10

20

30

40

50

数多くの批判を受けている (Bermanら, *Pediatrics*, 93(3):353-63, 1994; Brightら, 前出; Cimonis, *ASM News*, 60:527-528; Paap, *Ann. Pharmacother.*, 30(11):1291-7, 1996)。

【0005】

ワクチン開発における進歩は、7価の莢膜結合体ワクチンであるPREVNAR(登録商標)(EskolaおよびKilpi, *Pedriatr. Infect. Dis. J.* 16:S72-78, 2000)が最近認可および解放されたことによって明らかのように、*Streptococcus pneumoniae*(OMの主な原因となる因子)について最も促進されている(AOM)。PREVNAR(登録商標)は、侵襲性の肺炎球菌疾患に非常に有用であったが、OMについての適用範囲は、そのワクチンに含まれない血清型に起因して、数が増大したOMの症例の報告によって期待が裏切られている(6~8%)(Blackら, *Pedriatr. Infect. Dis. J.*, 19:187-195; Eskolaら, *Pedriatr. Infect. Dis. J.*, 19:S72-78, 2000; Eskolaら, *N. Engl. J. Med.* 344:403-409, 2001; Snowら, *Otol. Neurotol.*, 23:1-2, 2002)。類型不可*Haemophilus influenzae*(NTHi)(滲出液を伴う慢性OM中で優勢なグラム陰性病原体(Klein, *Pedriatr. Infect. Dis. J.*, 16:S5-8, 1997; Spinolaら, *J. Infect. Dis.*, 154:100-109, 1986)については、あまり進歩していない。NTHiに対する有効なワクチン開発の妨害は、NTHi誘導性中耳疾患の病原の現在の不完全な理解である。この遅れの一因は、その疾患が、良性鼻咽頭共生生物の宿主の免疫学的寛容性のうちの1つから進行するので、微生物が発現する毒性因子と宿主の免疫応答との間の動的な相互作用の理解が欠如していることであり、通常は無菌の中耳腔の日和見的な侵入物に対する活発な防御反応の欠如に起因している。

10

20

【0006】

現在では、小児においてNTHiがどのようにOMを引き起こすかということの理解は乏しい。OMの誘導に必要な推定毒性因子の同定は、その宿主-病原体相互作用の理解、最終的には、潜在的なワクチン候補および化学療法の標的の同定に大きく寄与する。中耳炎の管理、好ましくは、その予防により有効かつ容認されたアプローチを開発することは非常に必要とされている。ワクチン開発は、この目的を達成するための非常に有望なかつ費用効果的な方法である(Giebank, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13(11):1064-8, 1994; Karmaら, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 32(Suppl.):S127-34, 1995)。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、NTHiである*H. influenzae*株86-028NPのゲノム配列の同定および特徴付け、ならびにこれらによりコードされるポリペプチド配列を提供する。NTHiゲノム配列の三倍分析(3-fold analysis)を、配列番号1~576として示される一連のコンティグ配列において設定し、その後のゲノム配列の八倍分析(8-fold analysis)を、配列番号675~685として示される一連の11個のコンティグ配列において設定する。これらのコンティグは、稀なデータであり、当業者は、重複する配列を比較して、慣用的な方法を使用して、NTHi株86-028NPの完全ゲノムを構築することによって、これらのコンティグを組み立て得る。

40

【0008】

本発明はまた、本発明のNTHiポリペプチドに特異的な抗体を提供する。ヒトにおいて、またはサンプル(例えば、血清、精液、耳からの分泌液(ear fluid)、血液、尿、リンパ液および脳脊髄液)において、NTHi細菌を検出する方法が、企図され

50

る。これらの方法は、NTHiポリヌクレオチドを、特異的ポリヌクレオチドプローブで検出する工程、またはNTHiポリペプチドを特異的抗体で検出する工程を包含する。本発明はまた、NTHi細菌を検出するこれらの方法を利用する診断キットを企図する。

【0009】

本発明はまた、本発明のNTHiポリペプチドまたはそのNTHiペプチドを投与することによって、免疫応答を誘発する方法を企図する。これらの方法は、NTHiポリペプチドまたはNTHiペプチドを、NTHi感染によって引き起こされる疾患（例えば、OM）の処置および/または予防のためのワクチンとして投与する工程を包含する。以下のNTHi遺伝子は、中耳および/または鼻咽頭の感染の間またはその感染に応答してアップレギュレートされ；これらの遺伝子によってコードされるポリペプチドおよびそのペプチドは、あり得るOMワクチン候補および/または化学療法の標的として企図される：hisB、lppB、sapA、lolA、rbsC、purE、ribB、arcB、uxuA、dsbB、ureH、licC、HI1647、ispZ、radC、mukF、glpR、ihfB、argR、cspD、HI0094、HI1163、HI1063、HI0665、HI1292、HI1064。NTHi hisB遺伝子は、配列番号615のヌクレオチド配列として表され、配列番号616として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi sapA遺伝子は、配列番号617のヌクレオチド配列として表され、配列番号618として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi rbsC遺伝子は、配列番号619のヌクレオチド配列として表され、配列番号620として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi purE遺伝子は、配列番号621のヌクレオチド配列として表され、配列番号622として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi ribB遺伝子は、配列番号623のヌクレオチド配列として表され、配列番号624として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi arcB遺伝子は、配列番号625のヌクレオチド配列として表され、配列番号626として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi uxuA遺伝子は、配列番号627のヌクレオチド配列として表され、配列番号628として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi dsbB遺伝子は、配列番号629のヌクレオチド配列として表され、配列番号630として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi ureH遺伝子は、配列番号631のヌクレオチド配列として表され、配列番号632として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi licC遺伝子は、配列番号633のヌクレオチド配列として表され、配列番号634として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1647遺伝子は、配列番号635のヌクレオチド配列として表され、配列番号636として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi ispZ遺伝子は、配列番号637のヌクレオチド配列として表され、配列番号638として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi radC遺伝子は、配列番号639のヌクレオチド配列として表され、配列番号640として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi mukF遺伝子は、配列番号641のヌクレオチド配列として表され、配列番号642として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi glpR遺伝子は、配列番号643のヌクレオチド配列として表され、配列番号644として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi ihfB遺伝子は、配列番号645のヌクレオチド配列として表され、配列番号646として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi argR遺伝子は、配列番号647のヌクレオチド配列として表され、配列番号648として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi cspD遺伝子は、配列番号649のヌクレオチド配列として表され、配列番号650として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1163遺伝子は、配列番号651のヌクレオチド配列として表され、配列番号652として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1063遺伝子は、配列番号653のヌクレオチド配列として表され、配列番号654として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI0665遺伝子は、配列番号655のヌクレオチド配列として表され、配列番号656として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1292遺伝子は、配列番号657のヌクレオチド配列として表され、配列番号658として表されるアミノ酸配列をコードする

。

【0010】

配列番号1～576、配列番号675～685として示されるポリヌクレオチド配列ならびに表4および表4Bにおいて示されるポリヌクレオチド配列中に含まれる新規なNTHi遺伝子はまた、中耳および/または鼻咽頭の感染の間にアップレギュレートされ、従って、OMワクチン候補および/または化学療法の標的をコードすると予測される。さらに、以下のNTHi遺伝子は、毒性関連遺伝子であると予測され、従って、あり得るOMワクチン候補および/または化学療法の標的をコードすることが予測される：HI1386、HI1462、HI1369、lav、HI1598。NTHi HI1386遺伝子配列は、配列番号659として表され、配列番号660として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1462遺伝子配列は、配列番号661として表され、配列番号662として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1369遺伝子配列は、配列番号665として表され、配列番号666として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi lav遺伝子配列は、配列番号663として表され、配列番号664として表されるアミノ酸配列をコードする。NTHi HI1598遺伝子配列は、配列番号669および配列番号671として表され、配列番号670および配列番号672として表されるアミノ酸配列をコードする。毒性と関連したさらなるNTHi遺伝子としては、配列番号667および配列番号673として示されるポリヌクレオチド配列が挙げられる。

10

【0011】

NTHi感染を処置または予防する方法として、本発明は、その感染の間にアップレギュレートまたは活性になるNTHiポリペプチドの発現または活性を阻害する分子を投与することを企図する。特に、本発明は、NTHi感染を処置または予防する方法を企図し、この方法は、NTHi感染の間にアップレギュレートされるNTHi遺伝子に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することによって、NTHiタンパク質発現を調節する工程を包含する。このような遺伝子としては、hisB、lppB、sapA、lolA、rbsC、purE、ribB、arcB、uxuA、dsbB、ureH、licC、HI1647、ispZ、radC、mu、glpR、ihfB、argR、cspD、HI0094、HI1163、HI1063、HI0665、HI1292、HI1064が挙げられる。本発明はまた、NTHi感染を処置または予防する方法を企図し、この方法は、これらの遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を調節する抗体または低分子を投与する工程を包含する。配列番号1～576、配列番号675～685として示されるポリヌクレオチド配列ならびに表4および表4Bに示されるヌクレオチド配列に含まれる新規なNTHi遺伝子もまた、中耳および/または鼻咽頭の感染の間にアップレギュレートされ、従って、これらのポリヌクレオチド配列に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、企図される。

20

30

【0012】

(本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド)

本発明は、NTHi株86-028NPゲノムの配列を提供する。このゲノム配列は、本明細書中で「コンティグ1～576」として表される一連のコンティグ配列として示される。各コンティグは、その「コンティグ番号」と関連して配列識別番号を割り当てられる。従って、本発明のコンティグは、配列番号1～576として表される。これらのコンティグポリヌクレオチド配列は、慣用的な方法を使用して、NTHi株86-028NPの完全ゲノム配列に組み立てられ得る。NTHi株82-028NPゲノムの八倍配列分析の完了の際に、そのゲノム配列は、配列番号675～685として本明細書中で表される11のコンティグに組み立てられた。

40

【0013】

本発明は、NTHiポリヌクレオチド配列および配列番号1～576、配列番号675～685のコンティグ内に含まれるオープンリーディングフレーム、ならびに表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列を提供する。本発明はまた、本発明のNTHi

50

i ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列（例えば、表 3 B、表 4 B および表 5 に示されるアミノ酸配列）を提供する。本発明は、(a) 配列番号 1 ~ 576 のヌクレオチド配列の相補体；配列番号 675 ~ 685 のヌクレオチド配列の相補体および本明細書中の表 3 B、表 4 B および表 5 に示されるヌクレオチド配列の相補対；(b) 上記のポリヌクレオチドの対立遺伝子改変体であるポリヌクレオチド；(c) 上記のタンパク質のいずれかの種ホモログをコードするポリヌクレオチド；あるいは(d) 本発明の NTHi ポリペプチドの特定のドメインまたは短縮を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

本発明の NTHi ポリヌクレオチドはまた、上記のポリヌクレオチドに実質的に等価なヌクレオチド配列を包含する。本発明に従うポリヌクレオチドは、上記の NTHi ポリヌクレオチドに対して、例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または 89%、より代表的には、少なくとも 90%、91%、92%、93%、または 94%、およびより代表的には、少なくとも 95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有する。

【0015】

本発明の核酸配列の範囲内に含まれるのは、配列番号 1 ~ 576、配列番号 675 ~ 685 の NTHi ヌクレオチド配列、ならびに本明細書中の表 3 B、表 4 B および表 5 に示されるヌクレオチド配列、またはそれらの相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列フラグメントであり、これらのフラグメントは、約 5 ヌクレオチドより大きく、好ましくは 7 ヌクレオチド、より好ましくは、9 ヌクレオチドより大きく、最も好ましくは 17 ヌクレオチドより大きい。例えば、選択的な（すなわち、本発明のポリヌクレオチドのいずれか 1 つに特異的にハイブリダイズする）15 ヌクレオチド以上、17 ヌクレオチド以上、または 20 ヌクレオチド以上のフラグメントが、企図される。ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズし得るプローブは、本発明の NTHi ポリヌクレオチド配列を、遺伝子の同じファミリーにおける他のポリヌクレオチド配列から区別することができるか、または NTHi 遺伝子を他の細菌遺伝子から区別することができ、より好ましくは、独特のヌクレオチド配列に基づく。

【0016】

用語「ストリンジェント」とは、当該分野でストリンジェントとして一般に理解されている条件をいうために使用される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、原理的に、温度、イオン強度、および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のためのストリンジェントな条件の例は、65 ~ 68 °C での 0.015 M 塩化ナトリウム、0.0015 M クエン酸ナトリウムまたは 42 °C での 0.015 M 塩化ナトリウム、0.0015 M クエン酸ナトリウム、および 50% ホルムアミドである。Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) を参照のこと。よりストリンジェントな条件（例えば、より高温、より低いイオン強度、より高いホルムアミドもしくは他の変性剤）もまた、使用され得るが、ハイブリダイゼーションの速度は影響を受ける。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが考慮される場合において、さらなる例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、37 °C（14 塩基オリゴについて）、48 °C（17 塩基オリゴについて）、55 °C（20 塩基オリゴについて）および 60 °C（23 塩基オリゴについて）での 6 × SSC 0.05% リン酸ナトリウム中での洗浄が挙げられる。

【0017】

他の薬剤は、非特異的ハイブリダイゼーションかつ/またはバックグラウンドハイブリダイゼーションを減少させる目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液中

10

20

30

40

50

に含まれ得る。例は、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニル - ピロリドン、0.1% ピロリン酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム NaDodSO₄ (SDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA (または他の非相補的DNA)、および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーに実質的に影響を及ぼすことなく、変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8 ~ 7.4で行われるが、代表的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHとはほとんど関係ない。Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を適合させ、異なる配列関連性のDNAにハイブリッドを形成させるために、当業者によって調節され得る。

10

20

30

【0018】

本発明の範囲内にある配列は、これらの特定の配列に限定されず、それらの対立遺伝子および種改変体もまた包含する。対立遺伝子および種改変体は、配列番号1 ~ 576、配列番号675 ~ 685に示される配列、および本明細書中の表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列 (好ましくはそれらのオープンリーディングフレーム、それらの代表的なフラグメント)、あるいは配列番号1 ~ 576、配列番号675 ~ 685に示される配列および本明細書中の表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%同一 (好ましくは95%同一) のヌクレオチド配列を、同種の別の単離体由来する配列と比較することによって規定どおりに決定され得る。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラムとしては、GCGプログラムパッケージ (Devereuxら、Nucl. Acid. Res., 12: 387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN、およびFASTA (Altschulら、J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990) が挙げられる) が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、全米バイオテクノロジー情報センター (NCBI) および他の供給元 (BLAST Manual, Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschulら、前出) から公的に入手可能である。公知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0019】

さらに、コドン可変性に適応するために、本発明は、同じアミノ酸配列をコードする核酸分子を包含し、本明細書中に開示される特定のオープンリーディングフレーム (ORF) もまた包含する。換言すると、ORFのコード領域において、あるコドンの、同じアミノ酸をコードする別のコドンへの置換は、明示的に包含される。

【0020】

本発明の単離されたポリペプチドとしては、以下：
配列番号1 ~ 576、配列番号675 ~ 685として示されるポリヌクレオチド配列に含まれるヌクレオチドならびに表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列、あるいは対応する全長タンパク質または成熟タンパク質を含むポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドとしては、本明細書中の表3B、表4Bおよび表5に示される配列番号616、配列番号618、配列番号620、配列番号622、配列番号624、配列番号626、配列番号628、配列番号630、配列番号632、配列番号634、配列番号636、配列番号638、配列番号640、配列番号642、配列番号644、配列番号646、配列番号648、配列番号650、配列番号652、配列番号654、配列番号656、配列番号658、配列番号660、配列番号662、配列番号664、配列番号666、配列番号668、配列番号670、配列番号672、配列番号674、配列番号687、配列番号68

40

50

9、配列番号691、配列番号693、配列番号695、配列番号697、配列番号699、配列番号701、配列番号703、配列番号705、配列番号707、配列番号709、配列番号711、配列番号713、配列番号715、配列番号717、配列番号719、配列番号721、配列番号723、配列番号725、配列番号727、配列番号729、配列番号731、配列番号733、配列番号735、配列番号737、配列番号739、配列番号741、配列番号743、配列番号745、配列番号747、配列番号749、配列番号751、配列番号753、配列番号755、配列番号757、配列番号759、配列番号761、配列番号763、配列番号765、配列番号767、配列番号769または配列番号771のアミノ酸配列が挙げられる。

【0021】

本発明のポリペプチドはまた、好ましくは以下：

(a) 配列番号1～576、配列番号675～685として示されるヌクレオチド配列ならびに表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列に含まれるオープンリーディングフレーム、あるいは

(b) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で(a)のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチド

によってコードされる生物学的活性または免疫学的活性を有するポリペプチドを包含する。

【0022】

本発明はまた、本発明のアミノ酸配列の生物学的または免疫学的に活性な改変体；ならびに生物学的活性および/または免疫学的活性を保持するそれらの「実質的な等価物」(例えば、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、代表的には、少なくとも約95%、96%、97%、より代表的には、少なくとも約98%、または最も代表的には、少なくとも約99%アミノ酸同一性を有するもの)を提供する。対立遺伝子改変体によってコードされるポリペプチドは、配列番号1～576、配列番号675～685に示されるヌクレオチド配列ならびに本明細書中で表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列に含まれるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、および本明細書中で表3B、表4Bおよび表5に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較して、類似の、増加した活性もしくは減少した活性を有し得る。

【0023】

NTHiペプチドとは、配列番号1～576、配列番号675～685に示されるヌクレオチド配列あるいは本明細書中で表3B、表4Bおよび表5に示されるヌクレオチド配列によってコードされるNTHiポリペプチドのフラグメント、および本明細書中で表3B、表4Bおよび表5に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントをいう。好ましいNTHiペプチドは、生物学的および/または免疫学的に活性である。

【0024】

本発明はさらに、本発明のNTHi核酸フラグメントまたは本発明の核酸フラグメントの縮重改変体によってコードされる、単離されたNTHiポリペプチドまたはNTHiペプチドを提供する。用語「変性改変体」とは、ヌクレオチド配列により本発明の核酸フラグメント(例えば、ORF)とは異なるが、遺伝暗号の縮重に依存してNTHiポリペプチド配列をコードするヌクレオチドフラグメントをいう。本発明の好ましい核酸フラグメントは、タンパク質をコードするORFである。

【0025】

本発明はまた、NTHiポリペプチドを提供し、このNTHiポリペプチドは、そのポリペプチドの生物学的活性および/または免疫学的活性に影響を及ぼさない1以上の保存的アミノ酸置換を有する。あるいは、本発明のNTHiポリペプチドは、保存的アミノ酸置換を有することを包含し、この保存的アミノ酸置換は生物学的活性を変化させても変化させなくてもよい。用語「保存的アミノ酸置換」とは、その置換位置においてアミノ酸の

10

20

30

40

50

極性または電荷にほとんど影響を及ぼさないかもしくは全く影響を及ぼさないように、ネイティブでない残基（天然のアミノ酸および非天然のアミノ酸が挙げられる）を有する天然のアミノ酸残基の置換をいう。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の無極性残基の、任意の他の無極性残基との交換から生じる。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基もまた、「アラニンスキャニング変異誘発」の方法に従って、アラニンに置換され得る。天然のアミノ酸は、以下：

塩基性：アルギニン、リジン、ヒスチジン；

酸性：グルタミン酸、アルパラギン酸；

無電荷で極性：グルタミン、アスパラギン、セリン、スレオニン、チロシン；および

無極性：フェニルアラニン、トリプトファン、システイン、グリシン、アラニン、バリン、プロリン、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン 10

のように、それらの側鎖に基づいて特徴付けられる。アミノ酸置換についての一般的な規定は、以下の表 1 に記載されている。

【 0 0 2 6 】

【 表 1 】

表 1
アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換	
Ala	Val, Leu, Ile	Val	20
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys	
Asn	Gln	Gln	
Asp	Glu	Glu	
Cys	Ser, Ala	Ser	
Gln	Asn	Asn	
Glu	Asp	Asn	
Gly	Pro, Ala	Ala	30
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg	
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu	
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met,	Leu	
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸	Arg	
Met	Leu, Phe, Ile	Leu	
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Arg	
Pro	Ala	Gly	
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr	40
Thr	Ser	Ser	
Trp	Tyr, Phe	Tyr	
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe	
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala,	Leu	

N T H i ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して相補的なアンチセンスポリヌクレオチドもまた、提供される。

【 0 0 2 7 】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドが、増幅または発現のためにベクターに挿入され 50

得ることを包含する。発現のために、ポリヌクレオチドは、必要に応じて、適切な発現制御配列（例えば、プロモーター配列およびポリアデニル化シグナル配列）に連結される。本発明のポリヌクレオチドを含む細胞が、さらに提供される。例示的な真菌宿主としては、*E. Coli*、*Bacillus*、*Streptomyces*、*Pseudomonas*、*Salmonella*および*Serratia*のような細菌が挙げられる。

【0028】

用語「単離された」とは、それが天然に存在する環境から取り出され、かつそれが天然に存在する環境の他の成分を実質的に含まない実体をいう。例えば、ポリペプチドは、他の細胞タンパク質から分離されるか、またはDNAは、それが天然に生じるゲノムにおいてそれに隣接する他のDNAから分離される。

10

【0029】

（抗体および免疫応答を誘発するための方法）

本発明は、NTHiポリペプチドに特有の（すなわち、NTHiポリペプチドに特異的な）抗原性エピトープに結合する抗体を提供する。また、複数のH. influenzaeサブタイプ間で共通だが、任意の他の抗原性エピトープに関して特有である抗原性エピトープに結合する抗体が提供される。その抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それらの特有のエピトープに結合する能力を保持する抗体フラグメント（例えば、Fvフラグメント、FabフラグメントおよびF(ab)2フラグメント）、一本鎖抗体およびヒト抗体もしくはヒト化抗体であり得る。抗体は、当該分野で標準的な技術によって生成され得る。

20

【0030】

当該分野において、H. influenzaeの莢膜多糖類に対する抗体が、インビトロアッセイで細菌を殺す能力を示すことが公知である。これらの抗体はまた、動物モデル系において、H. influenzaeを用いるチャレンジから保護することが公知である。これらの研究は、莢膜多糖類に対する抗体がヒトにおいて防御免疫反応を誘導する可能性を有することを示す。本発明は、本発明のNTHiポリペプチドおよびそれらのフラグメントに特異的な抗体を提供し、それは、H. influenzae細菌を殺す活性およびヒトをNTHi感染から守る活性の両方を示す。本発明はまた、本発明のNTHiポリペプチドに特異的な抗体を提供し、それは、毒性を減少し、付着を阻害し、細胞分裂を阻害し、そして/あるいはH. influenzae細菌の上皮への侵入を阻害するかまたはH. influenzae細菌の食作用を促進する。

30

【0031】

インビトロ補体媒介性殺菌アッセイシステム（Musherら、*Infect. Immun.* 39:297-304、1983；Andersonら、*J. Clin. Invest.* 51:31-38、1972）が、抗NTHi抗体の殺菌活性を測定するために使用され得る。NTHiポリペプチドおよびNTHiペプチドの防御抗体反応を誘導する活性におけるさらなるデータは、本明細書中に記載されるチンチラモデル系のような感染の動物モデルを使用することによって、生成され得る。

【0032】

NTHiのエピトープに対して予備形成された抗体（例えば、NTHi、OMP、LOSまたは非被膜タンパク質に対する抗体）の投与を介する受動免疫治療によって宿主に短期間の防御を与えることもまた、可能である。従って、意図されたワクチン処方物が、受動免疫治療で使用するための抗体を産生するために使用され得る。ヒト免疫グロブリンがヒト医薬では好ましい。なぜなら、異種免疫グロブリンは、その外来の免疫原成分に対して免疫応答を誘発し得るからである。そのような受動免疫付与は、特別な危険性に曝された非免疫性の個体の即時的保護のための緊急性を根拠に使用され得る。あるいは、これらの抗体は、抗イデオタイプ抗体の産生に使用され得、それは次にNTHiエピトープに対する免疫応答を刺激するための抗体として使用され得る。

40

【0033】

本発明は、個体においてNTHiに対する免疫応答を誘導する方法を包含する。これら

50

の方法は、NTHi細菌を殺す免疫応答、および細胞へのH. influenzae附着をブロックする免疫応答を包含する。1つの実施形態において、その方法は、本発明のNTHiタンパク質またはNTHiペプチドを含む組成物の免疫原性用量を投与する工程を包含する。別の実施形態において、その方法は、本発明のNTHiタンパク質またはNTHiペプチドを発現する細胞を含む組成物の免疫原性用量を投与する工程を包含する。なお別の実施形態において、その方法は、本発明のNTHiタンパク質またはNTHiペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物の免疫原性用量を投与する工程を包含する。そのポリヌクレオチドは、任意の他の核酸とは無関係の裸の(naked)ポリヌクレオチドであっても、プラスミドまたはウイルスベクター(例えば、アデノ随伴ウイルスベクターまたはアデノウイルスベクター)のようなベクター中に存在していてもよい。組成物の投与は、当該分野で標準的な経路(例えば、非経口、静脈内、経口、口腔、鼻、肺、直腸、または膣)によってであり得る。その方法は、単一の個体において組み合わせて使用され得る。その方法は、個体のNTHi感染前または感染後に使用され得る。

10

【0034】

「免疫学的用量」は、上記個体をNTHi感染(特に、中耳および/または鼻咽頭もしくは下気道のNTHi感染)から守るために抗体免疫応答および/またはT細胞免疫応答を発生させるのに十分な用量である。そのような免疫学的応答が細菌複製を遅延させる方法もまた、提供される。本発明のさらなる局面は、免疫学的組成物に関し、それは、個体に取り込まれた場合に免疫学的応答を誘導し得るかまたは誘導する。その免疫学的応答は、治療的または予防的に使用され得、そしてCTLまたはCD4+ T細胞から生じるような抗体免疫または細胞免疫の形態を取り得る。NTHiタンパク質またはその抗原性ペプチドは、補タンパク質と融合され得、その補タンパク質は、それ自体抗体を産生し得ないが、第1のタンパク質を安定化し得、そして免疫原性特性および保護特性を有する融合タンパク質を生成し得る。従って、融合組換えタンパク質は、好ましくは、免疫原性の補タンパク質(例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)または-ガラクトシダーゼ、タンパク質を可溶化させその生成および精製を促進する比較的大きな補タンパク質)をさらに含む。さらに、補タンパク質は、免疫系の一般的な刺激を提供するという意味でアジュバントとして作用し得る。補タンパク質は、第1のタンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに結合し得る。本発明のポリヌクレオチドまたはその免疫原性ペプチドによってコードされるNTHiポリペプチドを含む組成物(特にワクチン組成物)、および方法が、本発明によって提供される。

20

30

【0035】

本発明は、それに対応して、NTHi感染に対する免疫応答を誘導するのに適切な組成物を提供し、ここで、誘導される抗体は、宿主細胞へのNTHi細菌の結合をブロックする。その組成物は、本発明のNTHiタンパク質もしくはNTHiペプチド、NTHiポリペプチドを発現する細胞、またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。その組成物はまた、キャリアおよびアジュバントのような他の成分を含み得る。

【0036】

中耳および/または鼻咽頭のNTHi感染においてアップレギュレートされる遺伝子、ならびにNTHi毒性に関連する遺伝子が、本明細書中に記載される。これらのNTHi遺伝子によってコードされるそれらのポリペプチドおよびペプチドは、OMのようなNTHi感染に関連する障害を処置または予防するために免疫応答を誘導するのに有用であることが意図される。これらの遺伝子によってコードされるポリペプチドのいくつかとしては、以下が挙げられる: ヒスチジン生合成タンパク質、リポタンパク質B、ペプチドABCトランスポーター、ペリプラスム SapA 前駆体、外膜リポタンパク質キャリアタンパク質前駆体、リボース輸送系パーミアゼタンパク質、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼ触媒性サブユニット、PurE、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼ触媒性サブユニット、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ、マンノネートデヒドラターゼ、ジスルフィドオキシドレダクターゼ、ウレアーゼ補タンパク質、ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ、推定ピリドキシン生合成タンパク質、

40

50

一重項酸素耐性タンパク質、細胞内隔壁タンパク質 (intracellular septation protein)、DNA修復タンパク質、MukFタンパク質、グリセロール-3-ホスフェートレギュロンリプレッサー、融合宿主因子 サブユニット、アルギニンリプレッサー、低温ショック様タンパク質、ストレス反応タンパク質、LicA、MukF、RadAおよびHI0094、HI1163、HI0665、HI1292、HI1064、HI186、HI0352遺伝子によってコードされるそれらの仮想タンパク質。NTHi OMP、LOSおよび非被膜タンパク質もまた、NTHi感染に関連する障害の予防および処置のための免疫応答を誘導すると意図される。

【0037】

本発明の組成物の「免疫原性用量」は、投与前に検出可能な免疫応答と比較してか、または投与前の標準的な免疫応答と比較して、投与後に、検出可能な体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を生じる用量である。本発明は、方法から生じる免疫応答が、予防的および/または治療的であり得ることを意図する。

10

【0038】

本発明は、個体において宿主細胞に対するNTHi細菌の結合をブロックする方法を包含する。その方法は、NTHi細胞の付着の結合をブロックする本発明の抗体またはポリペプチドを投与する工程を包含する。あるいは、NTHi細胞付着の結合をブロックする1以上の低分子の投与が意図される。インビトロアッセイは、本発明の抗体、ポリペプチドまたは低分子がNTHi細胞付着をブロックする能力を示すために使用され得る。

【0039】

NTHi細胞の付着をブロックする本発明の抗体、本発明のポリペプチドおよび/または本発明の低分子を含む薬学的組成物が提供される。その薬学的組成物は、上記の活性成分のうちの1つ単独からなっても、上記の活性成分の組み合わせを含んでも、細菌感染を処置するために使用されるさらなる活性成分を含んでもよい。その薬学的組成物は、薬学的に有効なキャリアのような1以上のさらなる成分を含み得る。薬学的組成物の投与の投薬量および頻度は、標準的な技術によって決定され、例えば、個体の体重および年齢、投与経路、ならびに症状の重篤度に依存する。薬学的組成物の投与は、当該分野で標準的な経路(例えば、非経口、静脈内、経口、口腔、鼻、肺、直腸、または膣)によってであり得る。

20

【0040】

個体におけるNTHi感染を検出するための方法もまた、提供される。1つの実施形態において、これらの方法は、サンプル中の本発明のNTHiポリヌクレオチドに特異的に結合するプライマーまたはプローブを使用して、そのポリヌクレオチドを検出する工程を包含する。そのポリヌクレオチドの検出は、例えば、ハイブリダイゼーションおよびPCRに関連する当該分野での多くの技術的慣用法によって達成され得る。

30

【0041】

本発明の抗体はまた、H. influenzaeの感染が疑われる個体の種々の体液中でNTHi抗原(NTHiポリペプチドおよびそのペプチド)を検出するための診断アッセイにおける用途のための試薬を提供するのに使用され得る。別の実施形態において、本発明のNTHiタンパク質およびNTHiペプチドは、種々の患者の組織および体液中でのNTHiの検出のためのイムノアッセイにおける抗原として使用され得る。これらの組織および流体としては、血液、血漿、耳滲出液(ear fluid)、脊髄液、唾、尿、リンパ液、および脳髄液が挙げられるが、これらの限定されない。本発明の抗原は、当該分野で公知のイムノアッセイのいずれかにおいて使用され得る。これらのイムノアッセイとしては、ラジオイムノアッセイ、ELISAアッセイ、サンドウィッチアッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、発光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイおよび免疫電気泳動アッセイが挙げられるが、これらの限定されない。

40

【0042】

(ワクチン化学療法標的)

50

本発明の1つの局面は、個体（特に哺乳類）における免疫応答を誘導するための方法に関連し、この方法は、NTHi抗原タンパク質またはそれらの抗原性ペプチドをその個体に接種する工程を包含する。

【0043】

本発明はまた、本発明の免疫原性組換えNTHiタンパク質またはNTHiペプチドを適切なキャリアとともに含むワクチン処方物を提供する。ワクチン候補および/または化学療法の標的として企図される、NTHiポリペプチドおよびそれらのペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ヒスチジン生合成タンパク質、リポタンパク質B、ペプチドABCトランスポータ、ペリプラズムSapA前駆体、外膜リポタンパク質キャリアタンパク質前駆体、リポース輸送系透過酵素タンパク質、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシレース触媒サブユニット、PureE、3,4-ジヒドロキシ(hydroxyl)-2-ブトン4-ホスフェートシンターゼ、オミチンカルバモリルトランスフェラーゼ、マンノエートデヒドラターゼ、ジスルフィドオキシドレダクターゼ、ウレーゼ、オミチンカルバモリルトランスフェラーゼ(omitthine carbamolytransferase)、マンノネートデヒドラターゼ(mannonate dehydratase)、ジスルフィドオキシドレダクターゼ(disulfide oxidoreductase)、ウレアーゼ修飾タンパク質(urease accessory protein)、ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ(phosphocholine cytidylyltransferase)、推定ピリドキシン生合成タンパク質、一重項酸素耐性タンパク質(single oxygen resistance protein)、細胞内隔膜タンパク質(intracellular septation protein)、DNA修復タンパク質、MUKFタンパク質、グリセロール-3-ホスフェートレギュロンリプレッサー、組込み宿主因子サブユニット、アルギニンリプレッサー、冷ショック様タンパク質、ストレス応答性タンパク質、LicA、RadA、ならびにHI0094遺伝子、HI1163遺伝子、HI0665遺伝子、HI1292遺伝子、HI1064遺伝子、HI1386遺伝子、HI0352遺伝子によってコードされるそれらの推定タンパク質、NTHiOMP、NTHiLOSおよびNTHi非カプセル状タンパク質および配列番号1~576、配列番号675~685に示されるヌクレオチド配列、ならびに本明細書中の表3B、表4および表5に示されるヌクレオチド配列において存在するその新規NTHiポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、ならびに本明細書中の表3B、表4B、および表5に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【0044】

このタンパク質は、胃の中で分解され得るので、好ましくは、このタンパク質は、非経口的に投与され、この投与としては、例えば、皮下、筋肉内、静脈内、皮内である投与が挙げられる。非経口投与にとって適切な処方物としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、およびその個体の体液、好ましくは血液と等張である処方物を与える溶質を含み得る、水溶性および非水溶性の滅菌注入溶液；ならびに懸濁剤または濃化剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁物が挙げられる。これらの処方物は、単位用量の容器または複数回用量の容器中に提供され得る。これらの容器としては、例えば、密閉したアンプルおよびバイアルである。そして、これらの処方物は、使用直前に、滅菌液体キャリアの添加のみが必要とされる凍結乾燥条件で貯蔵され得る。このワクチン処方物はまた、その処方物の免疫原性を増強するためのアジュバント系（例えば、水中油系および当該分野で公知の系）を包含し得る。この投与は、そのワクチンの比活性に依存し、そして、慣用的な実験によって容易に決定され得る。

【0045】

(A. ペプチドワクチン)

ペプチド治療剤（例えば、ペプチドワクチン）は、当該分野において周知であり、薬学分野において使用が増加している。このようなペプチド化合物の非経口投与の一貫した欠点は、破壊または変性が速いことである。注入ポンプあんならびびワックスまたはオイル移

植物は、ペプチド様治療剤の存在を長引かせることおよびこのような薬剤の完全性を保存することの両方のために、治療剤の長期投与のために使用されている。さらに、ペプチド様薬剤は、(ペプチド様薬剤の各エピトープに対する特定の参照とともに)長期間、天然の状態の構成を理想的に維持し、さらに、チャレンジされた動物または免疫されたヒトにおいて免疫原性応答を誘発するために適した様式で提示されるべきである。

【0046】

本発明のNTHi抗原性ペプチドは、多くの従来の方法で調製され得る。短いペプチド配列は、標準的な手段を使用する化学合成によって調製され得る。固相技術(例えば、Eriksonら、The Proteins (1976) v. 2, Academic Press, New York, p255を参照のこと)が特に簡便である。自動固相合成機は、市販される。さらに、配列の変更は、適切な残基の置換、付加または省略によって容易になされる。例えば、システイン残基は、カルボキシ末端に付加されて、キャリアタンパク質への簡便な連結のためのスルフヒドリル基を提供し得るか、またはスペーサー要素(例えば、追加のグリシン残基)が、C末端の連結アミノ酸とペプチドの残りとの間の配列内に組み込まれ得る。短いNTHiペプチドはまた、組換え技術によって産生され得る。この長さのペプチドについてのコード配列は、化学技術(例えば、Matteucciら、J Am Chem Soc., 103:3185 (1981)に記載されるホストトリエステル法)によって容易に合成され得る。

10

【0047】

本明細書中で企図されるNTHiペプチド配列のうちのいくつかは、免疫原性であるには小さすぎると考えられ得、これらは、それらにこの特質を与えるためにキャリア物質に連結され得る。当該分野で公知のこのような連結を作製するための任意の方法が使用され得る。連結は、一方の官能基末端にジスルフィド連結を生成し、そして他方のペプチド連結を生じるヘテロ二官能性剤(例えば、ジスルフィドアミド形成剤(例えば、N-スクシジミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロプリオネート(SPDP)(例えば、Janzenら、, Immun. Rev. 62:185, 1982を参照のこと))およびジスルフィド連結以外のチオエーテルを形成する二官能性連結剤(例えば、6-マレイミドカブロン酸、2-プロモ酢酸、2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸など)、ならびにカルボキシル基をスクシンイミドまたは1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸(スクシンイミジル4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)のようなナトリウム塩に対して)と組み合わせることによってカルボキシル基を活性化するカップリング剤を用いて形成され得る。

20

30

【0048】

(B. ワクチン組成物および投与)

プライミング用量の免疫原(これは、免疫原への一回以上のブースター曝露が続く)は、有効ワクチンであることが必要であり得る(Krampら、Infect. Immun., 25:771-773, 1979; Davisら、Immunology Letters, 14:341-8, 1986, 1987)。同時投与される場合、免疫応答を有利に増強し得るタンパク質またはポリペプチドの例としては、サイトカイン(例えば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サイトカイン誘導分子(例えば、Leaf)または同時刺激分子が挙げられる。ヘルパー(HTL)エピトープは、細胞内標的化シグナルに連結され得、CTLエピトープから別々に発現され得る。これにより、CTLエピトープとは異なる細胞区画へのHTLエピトープの指向が可能になる。必要な場合、これは、HTLエピトープのMHCクラスII経路へのより効率的な進入を容易にし得、それによって、CTL誘導を改善する。CTL誘導と対照的に、免疫抑制分子(例えば、TGF-β)の同時発現による免疫応答を特異的に減少することは、特定の疾患において有利であり得る。

40

【0049】

理想的には、免疫原は、2つ特性を示す; 対応する抗体の形成を刺激する能力、および

50

これらの抗体と特異的に反応する傾向。免疫原は、抗体の部位を組み合わせることによって認識可能な免疫原の最も小さな部分である1つ以上のエピトープを有する。特定の場合において、免疫原、免疫原の画分または免疫原が提示される条件は、促進するには不適切であり、不十分な免疫を生じる。これは、しばしば、免疫原として使用されるペプチドまたは他の低分子の場合である。他の物質（例えば、免疫調節剤（例えば、インターロイキンのようなサイトカイン）は、同様にワクチンにおいて組み合わせられ得る。

【0050】

上記のワクチンの分野は、免疫原と組み合わせて使用した場合に免疫応答を増強する特定の物質（アジュバントと呼ばれる）の使用を認識する。アジュバントは、そのアジュバントを使用することなく惹起されるよりも速いかまたは大きい免疫応答を惹起するために、さらに使用される。さらに、アジュバントは、アジュバントを含まずに必要とされるよりも少ない免疫原を使用して免疫学的応答を生成するため、免疫学的防御を与える特定の抗体物質の生成を増加するため、またはその免疫応答（例えば、体液性免疫応答、細胞性免疫応答）の成分を増強するために、使用され得る。公知のアジュバントとしては、エマルジョン（例えば、フロイントアジュバントおよび他のエマルジョン）、Bordetella pertussis、MF59、Quillaja saponaria由来の精製サポニン（QS21）、アルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびミョウバン）、リン酸カルシウム（および他の金属塩）、ゲル（例えば、水酸化アルミニウム塩）、マイコバクテリア生成物（ムラミルジペプチドを含む）、固体物質、粒子（例えば、リポソームおよびビロソーム）が挙げられる。アジュバントとして使用されることが公知である天然生成物および細菌生成物の例としては、モノホスホリルリピドA（MPL）、RC-59（合成MPL様アシル化単糖）、OM-174（これは、E. coli由来のリピドA誘導體である）、ホロ毒素（例えば、コレラ毒素（CT）もしくはその誘導體のうちの一つ、破傷風毒素（PT）、およびE. coliの易熱性毒素（LT）、もしくはその誘導體のうちの一つ）、ならびにCpGオリゴヌクレオチドが挙げられる。アジュバント活性は、多数の要因（例えば、キャリア効果、デポー（depot）形成、変化したリンパ球動員、Tリンパ球の刺激、Bリンパ球の直接刺激、およびマクロファージの刺激）によって影響を受け得る。

【0051】

ワクチンは、代表的には、注射可能な物質として、液体溶液または液体懸濁液のいずれかとして、調製される。注射前に液体中の溶液または懸濁液のために適切な固体形態もまた、調製され得る。その調製物はまた、乳濁され得る。その活性な免疫原性成分は、しばしば、賦形剤（これは、薬学的に受容可能であり、そしてその活性成分と適合性である）と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。さらに、望ましい場合、そのワクチンは、少量の補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、またはアジュバント（これは、そのワクチンの有効性を増強する）を含み得る。このワクチンは、注射（例えば、皮下注射または筋肉内注射のいずれか）によって、従来のように非経口投与される。他の投与様式のために適切なさらなる処方物としては、坐剤が挙げられ、時には、経口処方物が挙げられる。坐剤について、従来は結合剤およびキャリアとしては、例えば、ポリアルカレングリコールまたはトリグリセリドが挙げられ得る。そのような坐剤は、0.5%~10%、好ましくは1~2%の範囲で上記活性成分を含む混合物から形成され得る。経口処方物は、通常使用される賦形剤（例えば、薬剤グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど）を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁物、錠剤、ピル剤、カプセル剤、徐放処方物または散剤の形態を採り得、10%~95%（好ましくは25~70%）の活性成分を含む。

【0052】

ワクチンはまた、ジェット注射器、微小針、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微小カプセル化、ポリマーまたはリポソームを使用して経皮経路を介して、噴霧器、

10

20

30

40

50

エアロゾル、および鼻スプレーを使用して経粘膜経路および鼻腔内経路を介して、投与され得る。天然ポリマーまたは合成ポリマー（例えば、デンプン、アルギネート、およびキトサン、D-ポリL-ラクテート（PLA）、D-ポリDL-乳酸-co-グリコール酸、マイクロスフェア、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ無水物、およびポリホスファゼン、ポリホスファタザン）を使用するマイクロカプセル化が、経皮投与および経粘膜投与の両方のために有用である。合成ポリ-オルニチン、ポリ-リジン、およびポリ-アルギニンまたは両親媒性ペプチドを含む、ポリマー性複合体は、経皮送達系のために有用である。さらに、それらの両親媒性の性質に起因して、リポソームは、経皮ワクチン送達系、経粘膜ワクチン送達系、および鼻腔内ワクチン送達系のために企図される。ワクチン送達のために使用される一般的脂質としては、N-(1)2,3-(ジオレイル-ジヒドロキシプロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウム-メチルスルフェート（DOTAP）、ジオレイルオキシ-プロピル-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウム（DMRIE）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（DDAB）、および9N（N',N'-ジメチルアミノエタン）カルバモイルコレステロール（DC-Chol）が、挙げられる。ヘルパー脂質とリポソームとの組み合わせは、皮膚を通してのそのリポソームの取り込みを増強する。これらのヘルパー脂質としては、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン（DLPE）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）が挙げられる。さらに、トリテルペノイドグリコシドまたはチリセッケンボク（*Quillaja saponaria*）由来のサポニン、鼻腔内ワクチン送達および経粘膜ワクチン送達のための有用なアジュバントとして企図されている。

【0053】

タンパク質は、中性形態または塩形態としてワクチンに処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基と共に形成される）が挙げられ、これは、例えば、塩酸もしくはリン酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸と共に形成される。遊離のカルボキシ基と共に形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第2鉄のような無機塩、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、およびプロカインのような有機塩に由来し得る。

【0054】

ワクチンは、投薬処方物に適合する様式、そして治療的に有効かつ免疫原的な量で投与される。投与される量は、処置される被験体、被験体の免疫系が抗体を合成する能力、および所望される防御の程度に依存する。投与するのに必要な活性成分の正確な量は、開業医の判断に依存し、各個体で特有である。しかし、適切な投薬量範囲は、1個体当たり数百マイクログラムの活性成分のオーダーである。初回投与およびブースター投与のための適切なレジメンもまた可変性であるが、初回投与後1~3ヶ月の間隔に次いでその後の注射もしくは他の投与に代表される。

【0055】

本明細書中に記載されるようにワクチン組成物で免疫化する際に、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な大量のCTLを産生することによってワクチンに応答し、そしてその宿主は、少なくとも部分的に免疫化されて感染を遅らせるかまたは発生している慢性的感染に耐性を示す。本発明のNTHiポリペプチドまたはNTHiペプチドを含むワクチン組成物は、細菌感染に感受性であるかもしくはそれ以外では細菌感染の危険性を有する患者に投与されて、その抗原に対する免疫応答を誘発する。従って、患者自身の免疫応答が増強される。そのような量は、「免疫原的に有効な用量」として規定される。この使用において、正確な量は、この場合もまた、患者の健康状態および年齢、投与形式、処方物の性質などに依存するが、一般的には、70kgの患者1人当たり約1.0μg~約5000、より一般には70kgの体重当たり約10~500mgである。治療目的または

免疫目的のために、本発明の N T H i ポリペプチドまたは N T H i ペプチドはまた、弱毒化したウイルス宿主（例えば、ワクチンまたは鶏痘）によって発現され得る。このアプローチは、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するためのベクターとして、ワクチンウイルスの使用を含む。急性にかもしくは慢性的に感染した宿主への導入、または非感染宿主への導入の際、組換えワクチンウイルスは、免疫原性ペプチドを発現し、それによって、宿主 C T L 応答を促進する。

【 0 0 5 6 】

体液性免疫応答は、多くの周知の方法（例えば、単一放射状免疫拡散アッセイ（S R I D）、酵素免疫アッセイ（E I A）、および赤血球凝集阻害アッセイ（H A I）によって測定され得る。詳細には、S R I Dは、試験される免疫原を含むゲル（例えば、アガロース）の層を利用する。ウェルが、そのゲル中に切除され、試験される血清が、そのウェル中に配置される。そのゲルの外から中への抗体の拡散は、沈殿環の形成をもたらす。その沈殿環の領域は、試験される血清中の抗体濃度に比例する。E I A（E L I S A（酵素結合イムノアッセイとしても公知）は、サンプル中の全抗体を決定するために使用される。その免疫原は、マイクロタイタープレートの表面に吸着される。その試験血清は、そのプレートに暴露され、その後、酵素結合した免疫グロブリン（例えば、I g G）に暴露される。そのプレートに付着する酵素活性は、従来 of 任意の手段（例えば、分光光度法）によって定量され、その活性は、その試験サンプル中に存在する免疫原に対する抗体の濃度に比例する。H A Iは、免疫原（例えば、ウイルスタンパク質）がニワトリ赤血球（など）を凝集する能力を利用する。このアッセイは、中和抗体（すなわち、赤血球凝集を阻害可能な抗体）を検出する。その試験血清の希釈物が、標準濃度の免疫原とともにインキュベートされ、その後、上記赤血球が添加される。中和抗体の存在は、その免疫原による赤血球の凝集を阻害する。細胞性免疫応答を測定するための試験としては、遅延型過敏症の決定または標的免疫原に対するリンパ球の増殖応答の測定が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

（分類不能型インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）（N T H i））

H . i n f l u e n z a e は、小さい非運動性のグラム陰性細菌である。他の *H . i n f l u e n z a e* 株とは異なり、分類不能型 *H . i n f l u e n z a e*（N T H i）下部は、多糖莢膜を欠き、時には、「非カプセル型」と示される。N T H i 株は、カプセル型株とは遺伝的に別個であり、b型 *H . i n f l u e n z a e* 単離株よりも異種である。N T H i は、ヒト宿主に対して複雑した抗原群を提示する。防御を惹起し得る可能な抗原としては、OMP、リポ多糖、リポタンパク質、接着タンパク質、および非莢膜タンパク質が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

ヒトは、*H . i n f l u e n z a e* のための唯一の宿主である。N T H i 株は、呼吸管上部（鼻咽頭および口腔咽頭部後部を含む）、呼吸管下部および女性生殖管に一般的に存在する。N T H i は、ヒトにおいて広範なスペクトルの疾患を引き起こす。その疾患としては、中耳炎、肺炎、静脈洞炎、敗血症、心内膜炎、喉頭蓋炎、化膿性関節炎、髄膜炎、分娩後感染症および新生児感染症、分娩後敗血症および新生児敗血症、急性卵管炎および慢性卵管炎、喉頭蓋炎、心膜炎、蜂巣炎、骨髄炎、心内膜炎、胆嚢炎、腹内感染、泌尿器管感染、乳様突起炎、大動脈移植片感染、結膜炎、プラジル紫斑熱、潜在性菌血症、ならびに基礎となる肺疾患（例えば、慢性肺炎、気管支炎、および嚢胞性線維症）の憎悪が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 9 】

N T H i の疫学的研究は、この株が、外膜タンパク質プロフィール（B a r e n k a m p ら、*Infect . Immun .* 36 : 535 ~ 40 , 1982）、酵素アロタイプ（M u s s e r ら、*Infect . Immun .* 52 : 183 ~ 191 , 1986）および他の一般的に使用される疫学的ツールに関して、不均質であることを示した。N T H i をサブタイプに分けるいくつかの試みが存在したが、それらの方法論はいずれも、完全には

10

20

30

40

50

満足のいくものではなかった。NTHiの外膜タンパク質の組成は、約20種のタンパク質からなる。すべてのNTHi株は、2種の共通するOMPを含み、これらは、分子量が30,000ダルトンおよび16,600ダルトンである。NTHi株は、32,000~42,000ダルトンの範囲内にある2種のOMPに基づいてサブタイプ分けされ得る。そのNTHiリボ多糖プロフィールは、腸内グラム陰性細菌とは基本的に異なり、20,000ダルトン未満の範囲の1~4つの別個のバンドへと分かれる。

【0060】

プロトタイプNTHi単離株は、慢性中耳炎に罹患していた子供から回収された、低継代単離株86-028NPである。この株は、インビトロで(Bakaletzら、Infect. Immun. 53:331~5, 1988; Holmesら、Microb. Pathog. 23:157~66, 1997)ならびにチンチラOMモデル(本明細書中に記載される)(Bakaletzら、Vaccine 15:955~61, 1997; Suzukiら、Infect. Immun. 62:1710~8, 1994; DeMariaら、Infect. Immun. 64:5187~92, 1996)で、十分に特徴付けられている。この86-028NP株は、本明細書中に記載されるように、チンチラ中耳炎モデルにおいて発現がアップレギュレートされる遺伝子を同定するため、およびそのチンチラの中耳におけるNTHiの生存のために必要な遺伝子を同定するために、使用された。

【0061】

(DFI戦略)

差次的蛍光誘導(DFI)戦略が、本明細書中において、チンチラ動物モデルにおいてOMの間に誘導されるNTHi遺伝子を同定するために使用された。いくつかの方法が、感染の間の生物の毒性に寄与する細菌遺伝子を同定するために開発されている。そのような方法としては、細菌プロモーターが、宿主における生存のために必要な必須栄養素の合成のために必要とされる遺伝子の発現を調節する、インビボ発現方法(I-VET);変異した場合に微生物のビルレンス特性を変化させる遺伝子のタグ特異的同定を可能にする、サイン(signature)タグ化変異誘発(STM);転写的に活性ない電子について全体的にスクリーニングするためのDNAマイクロアレイ技術、および転写的に活性なプロモーターについて選択するためにFACS分析を使用するDFI(Chiangら、Ann. Rev. Microbiol. 53:129~154, 1999)。DFIは、基礎発現レベルに関わらず差次的に調節される遺伝子の同定を可能にし、かつインビトロでの増殖のために必須の遺伝子は排除しない、高スループット方法である。

【0062】

DFIは、多くの微生物において首尾良く利用されている。例えば、GFプレポーター系およびフローサイトメトリーが、マクロファージと相互作用する際の微生物遺伝子発現を研究するために使用された(Dhandayuthapaniら、Mol. Microbiol. 17:901~912, 1995)。インビボ増殖を刺激する環境にSalmonellaが供された場合、および培養マクロファージ様細胞によりインターナライズされた場合に、転写が増加される遺伝子を同定するために、プロモータートラップ系が、使用された(ValdiviaおよびFalkow, Mol. Microbiol. 22:367~378, 1996; ValdiviaおよびFalkow, Science, 277:2007~2011, 1997; ValdiviaおよびFalkow, Curr. Opin. Microbiol. 1:359~363, 1998)。さらに、DFIは、感染を模倣する変化したインビトロ状態で増殖した場合にS. pneumoniaeおよびS. aureusにおいて発現されるプロモーターを同定するために、使用された。さらに、DFIは、Bacillus cereusにおいて、環境刺激に応答した遺伝子調節を研究するために(DunnおよびHandelman, Gene, 226:297~305, 1999)、S. pneumoniaeにおいてコンピテンス刺激ペプチドに応答した遺伝子調節を研究するために(Bartilsonら、Mol. Microbiol. 39:126~135, 2001)、Bartonella henselae

10

20

30

40

50

lae (LeeおよびFalkow, *Infect. Immun.* 66:3964~3967, 1998)、*Listeria monocytogenes* (Wilsonら、*Infect. Immun.* 69:5016~5024, 2001)、*Brucella abortus* (Eskraら、*Infect. Immun.* 69:7736~7742, 2001)、および*Escherichia coli* (Badgerら、*Mol. Microbiol.* 36:174~182, 2000)における宿主細胞との相互作用および宿主細胞の侵襲の際の遺伝子調節を研究するために、使用された。

【0063】

DFIは、感染の細胞培養モデルまたはインビボ環境を刺激するように設計されたインビトロ条件において活性なプロモーターを同定するために首尾良く使用されているが、動物全体において特定の生物学的ニッチにおいて調節されるプロモーターを同定するためには、DFIはほとんど適用されていない。このことは、おそらく、インビボ環境から選別することに関連する多数の難問に起因する。宿主の免疫応答、感染部位からの細菌細胞の蔓延および/または除去、ならびに上皮細胞に対する細菌の付着(おそらく、バイオフィルム形成を介する)は、細菌を、生存動物から回収するために接近不能にし得る。これらの要因は、とりわけ、細菌がこれらの難問を感知して応答する場合に、微小環境の複雑性および遺伝子発現の不均一性に寄与する。最近、DFIは、最近が、呼吸器管感染のマウスモデルおよびOMのアレチネズミ感染モデルにおいてスクリーニングされた場合に、*S. pneumoniae*において発現されるプロモーターを同定するために使用されている(Marraら、*Infect. Immun.* 70:1422~33, 2002; Marraら、*Microbiol.* 148:1483~91, 2002)。

【0064】

(動物モデル)

上記チンチラモデルは、OMについての広範に受容されている実験モデルである。特に、NTHi誘導性OMのチンチラモデルは、十分に特徴付けられており(Bakaletzら、*J. Infect. Dis.* 168:865~872, 1993; BakaletzおよびHolmes, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:223~225, 1997; SuzukiおよびBakaletz, *Infect. Immun.* 62:1710~1718, 1994)、OMに対する痘苗原としての、いくつかのNTHi外膜タンパク質、外膜タンパク質の組み合わせ、キメラ合成ペプチドワクチン成分、およびアジュバント処方物の防御効力を決定するために使用されている(Bakaletzら、*Vaccine* 15:955~961, 1997; Bakaletzら、*Infect. Immun.* 67:2746~2762, 1999; Kennedyら、*Infect. Immun.* 68:2756~2765, 2000)。

【0065】

特に、アデノウイルスが、チンチラを*H. influenzae*誘導性中耳炎に対して罹りやすくする独特のインビボモデルが存在し、これにより、NTHiの生物学的評価についての関連する細胞、組織、および器官の培養系の確立が可能になった(Bakaletzら、*J. Infect. Dis.* 168:865~72, 1993; Suzukiら、*Infect. Immunity* 62:1710~8, 1994)。アデノウイルス感染単独が、鼓室中への誘導された血清抗体の漏出について評価するために使用され(Bakaletzら、*Clin. Diagnostic Lab Immunol.* 4(2):223~5, 1997)、NTHiとともに共病原体として使用されて、中耳炎に対する痘苗原として種々のNTHi外膜タンパク質、OMPの組み合わせ、キメラ合成ペプチドワクチン成分、およびアジュバント処方物を標的とするいくつかの能動的免疫化レジメンおよび受動的免疫化レジメンの防御効力が決定された(Bakaletzら、*Infect. Immunity*, 67(6):2746~62, 1999; Kennedyら、*Infect. Immun.* 68(5):2756~65, 2000; Novotnyら、*Infect. Immunity* 68(4):2119~28, 2000; Poolmanら、*Vaccine* 19(補遺1):S108~15, 2000)。

【0066】

(中耳炎のNTHi感染に应答してインピボでアップレギュレートされる遺伝子)

中耳炎のNTHi感染に应答して差次的に調節されるプロモーターを同定するために、プロモーターライブラリーが、構築され、そして選別パラメーターが、規定された。上記プロモーターライブラリーの一部分が、上記チンチラ中耳に直接接種され、OM発症が、ビデオ耳鏡検査法およびティンパノメトリによって24時間目および48時間目にモニターされた。さらに、中耳液が、感染の24時間後および48時間後に回収された。二色FACS分析が、浸出に関連する他の細胞および破片から、GFPを発現している細菌を単離するために使用された。単離後、gfpmut3遺伝子の5'側にあるHaemophilus挿入物のDNA配列が、決定され、分析された。この様式で、本発明者らは、NTHiがAOMの間にチンチラ中耳の環境を感知して应答する場合にアップレギュレートされる遺伝子を同定した。以下の遺伝子が、同定され、NTHi感染の間にそれらの遺伝子がアップレギュレートされることに起因して、それらの遺伝子は、NTHi感染および毒性において一定の役割を果たし得る。

10

【0067】

下記実施例7に記載されるように、上記のDFI手順およびその後のgfp発現クローンのFACS分析の後、可能性のあるインピボで調節されるプロモーターを含む52候補クローンが、単離された。これらのクローンが制御する遺伝子は、一般的に内容およびその細胞中での機能に基づいて分類された。それらとしては、一般的代謝プロセス、環境情報処理および膜輸送、膜タンパク質、および仮想タンパク質が挙げられる。これらの52個のクローンのうち8個が、NTHi株86-028NPについて独特である配列を含む。重要なことには、3つのクローンが、1つよりも多い動物において独立したスクリーニングから単離され、それによって、単離方法が確認された。

20

【0068】

上記のFACSデータを独立して確認するために、本発明者らは、定量的RT-PCRによる候補遺伝子の相対的発現を決定した。親株86-028NPを、これらの研究のために使用した。従って、遺伝子調節に対するプラスミドコピー数の影響を伴わない野生型遺伝子発現が、分析され、これにより、FACSによる擬陽性クローン同定を同定することが可能になった。H. influenzae株Rdにおいて同定された配列に類似する配列を含む44個の候補クローンのうち、インピトロおよびインピボでの遺伝子発現の定量的比較により、チンチラ中耳中に存在する環境的合図にNTHiが应答する場合に、26個の遺伝子についてのアップレギュレートされた遺伝子発現(60%)が確認された。この分析により、膜輸送、環境情報処理、細胞代謝、遺伝子調節、ならびに未知の機能を有する仮想タンパク質に関連する遺伝子の発現を駆動する、インピボで調節されるプロモーターが同定された。(実施例6における表4参照)。

30

【0069】

定量的RT-PCRは、1o1A発現の2倍の増加を示し、これは、内膜から外膜へのリボタンパク質輸送を可能にした。細菌は、中耳環境ちゅうで迅速に増殖して、48時間以内に、中耳液1ml当たり 5.0×10^8 GFU NTHiに達する。その細菌は、その環境を感知して应答し、増殖および生存のために必要な栄養素を獲得または合成する。リボース糖輸送における膜成分をコードする遺伝子であるrbsC(配列番号619)は、インピトロで増殖する細胞と比較して、インピボでの発現の5倍増加を示した。さらに、代謝プロセスに関連する多くの遺伝子は、インピトロで増殖する細胞と比較して、インピボでの遺伝子発現の劇的な増加を示す。これらとしては、リボフラビン合成遺伝子ribB(配列番号623)、プリンヌクレオチド生合成遺伝子purE(配列番号621)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼarcB(配列番号625)(これは、尿素サイクルを介するアルギニン分解に関連する)、およびuxuA(配列番号627)(これは、D-グルクロネートの取り込みおよびグリセルアルデヒド3リン酸への変換に必要な、マンノエートヒドロラーゼをコードする)が、挙げられる。さらに、より弱い程度ではあるが、ヒスチジン生合成についての遺伝子(hisB;配列番号615)、DN

40

50

A修復についての遺伝子 (*radC*; 配列番号639) および推定細胞内中隔形成膜貫通タンパク質についての遺伝子 (*ispZ*; 配列番号637) が、アップレギュレートされた。

【0070】

ジスルフィド結合形成は、細菌における多くの分泌タンパク質のフォールディングおよびアセンブリのために重要である。原核生物において、*DsbA* および *DsbB* は、ジスルフィドの形成を担う酸化経路を構成する。*DsbB* は、DNAを再酸化する。これは、フォールディングしていないポリペプチドへとジスルフィド結合を直接提供する。*DsbB* は、酸化キノンからジスルフィドを新規に生成することが示されている (*Collet* および *Bardwell*, *Mol. Microbiol.* 44:1~8, 2002)。H. *influenzae* 株 Rd において、*DsbA* は、形質転換のためのコンピテンスのために必要である (*Tomb*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 10252~10256, 1992)。本明細書中で、*dsbB* 遺伝子 (配列番号629) の転写の約3倍の増加が、示された。これは、中耳環境において増殖する *NTHi* についてのジスルフィド交換のための重要な役割に光を当てる。

【0071】

中耳の細菌コロニー形成 (通常の滅菌環境) は、宿主炎症応答を生じ、引き続いて、好中球浸潤を生じる。細菌は、この宿主応答と戦うために、多くの戦略を引き起こす。*NTHi* は、*ureH* (配列番号631) (酸耐性に関与することが示されている (*Young*ら、*J. Bacteriol.*, 178:6487-6495, 1996)、*Helicobacter* 中の活性ウレアーゼの発現に必要な遺伝子のホモログ) の遺伝子発現を増加する (4倍)。最近、ウレアーゼ活性が、感染で生じる pH の低下を中和することによって、慢性 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 完成においてある役割を果たし得ることが報告されている (*Balters*ら、*Infect. Immun.*, 69:472-478, 2000; *Balters*ら、*Infect. Immun.*, 69:472-478, 2001; *Bosse* および *MacInnes*, *Can. J. Vet. Res.*, 64:145-150)。中耳浸出液からの *NTHi* 単離物に対する生物型分析は、87%がウレアーゼ陽性であることを実証した (*DeMaria*ら、*J. Clin. Microbiol.*, 20:1102-1104, 1984)。しかし、*NTHi* 毒性におけるウレアーゼの役割は未知である。同様に、産物が、*S. pneumoniae* におけるピリドキシン生合成タンパク質に対して88%の配列同一性を示し、抗酸化剤として機能し得る推定一重項酸素耐性タンパク質に60%の相同生を示す遺伝子の発現が増加した。ホスホリルコリン (*Chop*) は、*NTHi* の病因に関わっている (*Weiser*ら、*Infect. Immun.* 65:943-950, 1997)。*NTHi* は、相変動によって *Chop* 発現を調節し、細胞表面上に LOS を装飾する。*Chop* は、抗微生物ペプチドに対する減少した感受性を介して気道における *NTHi* 残存に寄与し得 (*Lysekko*ら、*Infect. Immun.*, 68:1664-1671, 2000)、そして C 反応性タンパク質 (*CRP*) により媒介される血清殺傷に対する感受性を変化させる (*Weiser*ら、*J. Exp. Med.* 187:631-640, 1998)。鼻咽腔および中耳腔の微環境は、*Chop* + 菌株がチンチラ鼻咽腔のより多くのコロニー形成を示すので、*Chop*⁺ 表現型を選択し得る (*Tong*ら、*Infect. Immun.*, 68:4593-4597, 2000)。*licC* 遺伝子 (配列番号633) の発現もまた増加した。*licC* 遺伝子は、ホスホリルコリン誘導体化 LOS の生合成におけるある役割を果たすホスホリルコリンシチジルトランスフェラーゼをコードする (*Rock*ら、*J. Bacteriol.*, 183:4927-4931, 2001)。

【0072】

産物が引き続いて遺伝子発現または DNA 複製を調節するセットがまた、インビボ誘導遺伝子に含まれる。これらの遺伝子は、*glp* リプレッサー、*glpR* (配列番号643)、アルギニンリプレッサー遺伝子、*argR* (配列番号647)、および組込み宿主因

10

20

30

40

50

子 (IHF) サブユニット、ihfB (配列番号645) によるグリセロール代謝の転写調節を含む。IHFは、特定の配列においてDNAに結合するヒストン様タンパク質 (複製、部位特異的組換えおよび転写に関与し、多数のオペロンの活性を変化させる補助因子) である (Goosenおよびvan de Putte, Mol. Microbiol. 161-7, 1995)。さらに、CspDは、E. coliにおける静止期誘導ストレス応答の間のDNA複製を阻害し (Yamanakara, Mol. Microbiol., 39:1572-1584, 2001)、そしてmukF (配列番号641) 遺伝子タンパク質ホモログは、細胞分離の前により緻密な形態へのヌクレイド構造のリモデリングに寄与する (SawitzkeおよびAustin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 62:1710-1718, 2000)。本明細書中に記載されるDFI戦略は、未知の機能についてインピボで誘導されるプロモーターを同定した。10
仮想タンパク質HI0094は、初期OMの間、遺伝子発現の8倍の増加を示したが、その役割は未知のままである。HI1163 (配列番号651) は、E. coliの推定オキシダーゼである仮想YdiJタンパク質と58%のアミノ酸同一性を示した。

【0073】

高密度トランスポゾン突然変異誘発戦略は、高栄養培地上で増殖するために必須のH. influenzae遺伝子を同定するために使用された (Akerleyら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99:966-971, 2002)。本明細書において記載されるスクリーニングにおいて、Akerleyら (上述) に記載された必須の遺伝子セットに含まれる6つの遺伝子が同定された (hisB、lppB、l10
o1X、ispZ、mukFおよび未知のHI0665)。最近、2種類のヒト気道由来上皮細胞株との相互作用によって発現される、分類不可能なH. influenzaeの遺伝子が同定された。これらの遺伝子は、代謝プロセス、ストレス応答、遺伝子発現、細胞エンベロップ合成、DNA関連プロセス、細胞分裂、および機能未知のORFがコードするタンパク質に関与する遺伝子を含んだ (Ulsenら, Mol. Microbiol., 45:485-500, 2002)。同様に、ストレス応答遺伝子、cspD (配列番号649)、プリンおよびリボフラビン合成に関与する遺伝子、ならびに機能未知のタンパク質、vapAが、本明細書において記載されるスクリーニングで同定された。vapAの発現は、インピボで検出され、さらにvapA遺伝子発現は、インピボで210
倍に増加した。これらの独自のアプローチは、NTHi誘導性OMにおいてアップレギュレートされ、したがってNTHiの感染およびビルレンスに役割を果たす可能性があり; かつワクチン治療およびアンチセンス治療、ならびにNTHi関連障害の処置の、他の治療法の潜在的な候補であり得る、既知の遺伝子を同定した。

【0074】

DFI戦略は、その上、機能未知の遺伝子のための、インピボで誘導されるプロモーターの同定という結果を生じた。仮説的タンパク質、HI0094は、初期OMの間、遺伝子発現における8倍の増加を示したが、その機能は未知のままである。HI1163 (配列番号651) は、E. coliの仮説的YdiJタンパク質 (推定上のオキシダーゼ) と58%のアミノ酸同一性を示した。したがって、これらの仮説的遺伝子は、NTHi感染によって誘導されるOMに役割を果たす可能性がある。40

【0075】

(詳細な説明)

以下の実施例は、本発明を説明する。ここで、実施例1は、NTHiゲノムの配列を記載し、実施例2は、同定されたコンティグおよび最初の遺伝子発見を記載し、実施例3は、NTHiプロモーターライブラリーの構築を記載し、実施例4は、GFPを発現する86-028NP誘導体の分析を記載し、実施例5は、中耳の流体由来の細菌の直接標識を示し、実施例6は、急性中耳炎においてインピボで誘導されたプロモーターの同定を記載し、実施例7は、ビルレンス関連遺伝子の同定を記載し、そして実施例8は、固有のNTHi遺伝子配列の同定を記載する。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0076】

(実施例1)

(分類不可能な *Haemophilus influenzae* ゲノムの配列)

NTHi 86-028NP株は、コロンバスの Children's Hospital において鼓膜切開術および慢性OMのための管挿入を受けた小児科患者から得られた、最小限に継代された臨床単離物である (Bakaletzら, *Infection and Immunity*, 56(2):331-335, 1988)。86-028NP株は、2002年10月16日に American Tissue Collection (Manassas, VA 20108 USA) に寄託され、そして受託番号 PTA-4764 を割当てられた。

10

【0077】

NTHi におけるビルレンス決定因子の同定により広範に近づくための試みにおいて、NTHi 86-028NP株のゲノムを3倍の適用範囲 (3-fold coverage) でシーケンシングした。染色体DNA、86-028NP株から Puregen プロトコルを用いて調製し、そして HydroShear 装置 (Gene Machines) によって 2 kb ~ 4 kb のサイズにせん断した。Chissoeら (*Methods: a Companion to Methods of Enzymology* 3:55-65, 1991) および Sambrookら (*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 第2版 Cold Spring Harbor, NY, 1989) に記載されたように、せん断したDNAを、エタノール沈殿し、クレノウ酵素の混合物を用いて末端修復し、そしてアガロースゲル電気泳動によってサイズ選別して、2 kb ~ 4 kb のフラグメントを得た。これらのフラグメントを、SmaI 制限酵素認識部位 (ホスファターゼ処理されている) を用いて pUC18 ベクター中にクローニングし、そして *E. coli* XL-1 Blue に形質転換し、アンピシリン耐性について選択する。X-gal を含有する LB-Amp プレート上での青/白スクリーニングによって、インサートを含むコロニーを同定し、そして 1.5 ml の TB-Amp (TB = Ternfic Broth) プロスを含む 96 ディープウェルプレートに移す。ディープウェルプレート培養物を、37 で一晩増殖させる。テンプレート調製、シーケンシングおよびコンティグアセンブリを行った。

20

【0078】

Chissoeら (上述) に記載されるように、Beckman Biomek 2000 自動ロボットワークステーション上で、自動テンプレート調製を行った。簡単に言うと、上記で調製されたクローンを含む各 96 ディープウェルプレートを遠心し、細胞をペレット化した。上清をデカントし、細胞を (必要な場合) -20 で凍結した。Chissoeら (上述) に記載されるように、4つの 96 ディープウェルブロックを Biomek テーブル上に配置し、液体ハンドリングロボットを使用して、代表的な SDS-NaOH 溶解プロトコルの自動バージョンを用いてテンプレートを調製した。最終的なエタノール沈殿テンプレートを、50 μ l の ddH₂O に各々溶解し、そしてDNAシーケンシングのために使用した。

30

【0079】

Robbins Hydra 96 ロボットを用いて、上記テンプレートを (96 ウェルプレートから) 384 ウェルプレートへと再整列化することによって、シーケンシング反応を実行した。PE Big-Dye^{T M} ターミネーターおよびユニバーサルプライマー (M13 フォワードおよびリバース) を用いてサイクルシーケンシング反応を実行し、Sephadex G50 カラムを通して浄化し、そして PE Biosystems 3700 キャピラリー電気泳動DNAシーケンサー上で、製造者の指示に従って分析した。シーケンシングの読み (8219) を、576 のコンティグ (本明細書における配列番号 1 ~ 576) に組み立てた。3倍 (3-fold) シーケンシングについての統計を、表 2A に示す。アセンブリ 17 の全固有配列は、1.74 Mb である。

40

【0080】

50

(表 2 A)

【 0 0 8 1 】

【表 2 A】

コンティグサイズ	総数	全長	累積%
0-1 kb	65	55961	3.2%
1-2 kb	228	333665	19.2%
2-3 kb	101	243059	14.0%
3-4 kb	49	172385	9.9%
4-5 kb	45	196699	11.3%
5-10 kb	74	515152	29.6%
10-20 kb	11	144591	8.3%
20-30 kb	3	77352	4.4%

10

続いて、NTHiゲノムの8倍(8-fold)シーケンシング分析を行った。8倍シーケンシングは、NTHiゲノムを11のコンティグに組み立てた。コンティグ5、8、9、10、12~18を、本明細書において配列番号675~685として示す。8倍シーケンシングについての統計を、表2Bに示す。

20

【 0 0 8 2 】

(表 2 B)

【 0 0 8 3 】

【表 2 B】

コンティグサイズ	総数	全長	累積%
0-1 kb	5	3950	0.2%
1-2 kb	3	4316	0.2%
2-3 kb	0	0	0.0%
3-4 kb	1	3964	0.2%
4-5 kb	0	0	0.0%
5-10 kb	0	0	0.0%
10-20 kb	1	15147	0.8%
20-30 kb	2	51888	2.7%
30-40 kb	0	0	0.0%
40-50 kb	0	0	0.0%
50-100 kb	1	85814	4.5%
>100 kb	5	1760339	91.4%

30

40

(実施例 2)

(コンティグ説明および最初の遺伝子発見)

3倍配列分析によって同定された、長さ5000bp以上を有する88個のコンティグ中75個は、BLASTNを介して、H.influenzae Rd株に対する有意な類似性を示す。H.influenzae 86-028NP株における遺伝子順とH.influenzae Rd株における遺伝子順との間の潜在的な関係を可視化するため、86-028NP 3倍コンティグセットおよびRd遺伝子セットを、BLASTNを用いて双方向性に比較した。結果を、ヒットしたRd遺伝子の遺伝子座標に基づいてコンティグをソーティングし、Rayら(Bioinformatics 17:1105-

50

12, 2001)に記載されるように、見出された最小の座標で各コンティグを固定することによって、遺伝子順 対 コンティグ空間にプロットした。この様式で比較し、完全に既知のゲノムに対して同一の遺伝子順を有するゲノムの不完全なアセンブリを、単調増加する階段状の形態で表示した。

【0084】

B L A S T Xを使用して、R d株ゲノムにおける遺伝子に対して相同性を有する配列、およびH . i n f l u e f z z a e R d株に見出されない遺伝子に対して相同性を有する配列に対するヒットを同定した。

【0085】

R d株配列へのヒットをデータセットから除去し、そして他のセットを表3 Aにまとめた。データは以下のように提示される：コンティグ番号(=配列番号)、カラム1；各ヒットについてのEスコア、カラム2；引用されたコンティグのアミノ酸翻訳部分に対する相同性を有したタンパク質の名前、カラム3；上記ホモログを産生する生物体、カラム4；そして、カラム3に引用されたタンパク質の各々についてのG e n b a n kタンパク質識別子、カラム5；コンティグ内の対応するヌクレオチド(配列番号によって参照される)。ほとんどの例においていくつかのホモログが同定されたが、明確化のため、最も相同性の高いタンパク質を表3 Aに引用する。

【0086】

表3 Aに列挙した遺伝子のいくつかについての配列を、N T H iゲノムの8倍シークエンシング内で同定した。表3 Bは、11コンティグ内のこれらの遺伝子の配置、全長オープンリーディングフレーム配列(配列番号によって同定される)、上記オープンリーディングフレームによってコードされる生成されたアミノ酸配列、およびB L A S T Xによって同定された高相同性を有する遺伝子(表3 Aで列挙されたようなもの)を列挙する。

【0087】

N T H iおよびR d株中における比較的短い遺伝子の配置を検査するため、詳細に記載されている2つの遺伝子クラスター中の遺伝子順を比較した。第一に、血液凝集性線毛(L K P)遺伝子領域中に存在する遺伝子を検査した(M h l a n g a - M u t a n g a d u r aら, J B a c t e r i o l . 1 8 0 (1 7) : 4 6 9 3 - 7 0 3 , 1 9 9 8)。線毛遺伝子クラスターは、p u r E遺伝子とp e p N遺伝子との間に位置する。これらのフラグメントのみを、図1に記載する。血清型b株、E a g a nは、h i f A B C D E遺伝子クラスターを含み、そして血液凝集性線毛を生成する。R d株は、h i c A B遺伝子およびh i f A B C D E遺伝子クラスターを欠損している。一般的に、既に検査した分類不可能な株は、h i c A B遺伝子を含むが、血液凝集性線毛をコードするh i f遺伝子を含まない。86-028NP株配列(本明細書において記載される)は、この領域において、N T H i R 3 0 0 1株の配列と同一である(図1)。r f a D遺伝子は、エンドトキシンの生合成に関与する酵素をコードする。さらに、N T H i 2 0 1 9株由来のr f a D遺伝子は、N i c h o l sら(I n f e c t I m m u n i t y 6 5 (4) : 1 3 7 7 - 8 6 , 1 9 9 7)によって特徴付けられている。2019株において、r f a D遺伝子は、エンドトキシン生合成に関与する別の酵素をコードするr f a F遺伝子のすぐ上流にある。R d株における遺伝子配置は、様々である；r f a D遺伝子およびr f a F遺伝子は、およそ11kbの配列によって分離されている。検査された最も分類不可能な株は、2019株において見られる遺伝子配置を含んでいた。対照的に、86-028NP株は、R d株に見られる遺伝子配置と同一の遺伝子配置を有する(図2)。

【0088】

現行のアセンブリの全体的な分析は、遺伝子の内容および順序が、R d株における内容および順序と類似することを示す。より詳細な分析は、P a s t e u r e l l a c e aにおいて以前見られなかったかなりの数のN T H i遺伝子が存在すること、そしてN T H i遺伝子の内容および順序がR d株において見られる内容および順序と異なるいくつかの領域が存在することを、明らかにした。したがって、現行のデータは、86-028NP株ゲノムが、R d様性質と非R d様性質との複雑なモザイクを含むことを示唆する。

10

20

30

40

50

【0089】

DFI戦略はまた、遺伝子発現を増加させる新規のNTHi配列を同定した。他の生物体（主にグラム陰性細菌）のORFに対して相同性を有する遺伝子または遺伝子フラグメントを含む、これらの新規コンティグ配列のリストを、表3Aに示す。例えば、コンティグ442（配列番号442）のヌクレオチド配列、ヌクレオチド1498～1845は、*H. influenzae* Rd株リポタンパク質B（LppB）のアミノ酸1～116をコードする配列に対して、高度に相同性である。この遺伝子は、静止期生存遺伝子、*sure*と、ビルレンスに関連している、最近同定された細菌リポタンパク質、LppB/NlpDに対して高度に相同性である、43kDの抗原外膜リポタンパク質をコードする遺伝子との間に位置する（Padmalayamら，*Infect. Immun.*，68：4972-4979，2000）。最近、Zhangおよび共同研究者らは、*Thermotoga maritima*において、nlpD遺伝子および*sure*遺伝子の発現が、細胞増殖の静止期に誘導されることを示した（Zhangら，*Structure (Camb)*，9：1095-1106，2001）。したがって、中耳でのストレス誘導条件下において、このNTHiリポタンパク質が発現される。

10

【0090】

【表 3 A - 1】

コンティグ	Eスコア	同一性ヒット	生物	Genbank タンパク質	配列番号
104	4.00E-59	CpdB	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246953.1	配列番号 104 のヌクレオチド 204-659
106	9.00E-10	仮想タンパク質 PH0217 -	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	G71244	配列番号 106 のヌクレオチド 40-309
106	1.00E-08	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246871.1	配列番号 106 のヌクレオチド 605-694
106	2.00E-20	Orf122	<i>Chlorobium tepidum</i>	AAG12204.1	配列番号 106 のヌクレオチド 7-210
110	3.00E-05	ArdC 抗制限タンパク質	IncW プラスミド pSa	AAD52160.1	配列番号 110 のヌクレオチド 959-1162 の相補体
110	1.00E-33	仮想タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458676.1	配列番号 110 のヌクレオチド 181-825 の相補体
111	5.00E-12	推定膜タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458664.1	配列番号 111 のヌクレオチド 45-287 の相補体
111	6.00E-41	仮想タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458658.1	配列番号 111 のヌクレオチド 1091-1480 の相補体
114	7.00E-80	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245828.1	配列番号 114 のヌクレオチド 118-696 の相補体
115	2.00E-09	A111R	<i>Paramecium bursaria</i> <i>Chlorella virus 1</i>	NP_048459.1	配列番号 115 のヌクレオチド 555-869
118	5.00E-45	DNA メチラーゼ HsdM, 推定	<i>Vibrio cholerae</i>	NP_231404.1	配列番号 118 のヌクレオチド 44-439
122	2.00E-18	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245314.1	配列番号 122 のヌクレオチド 865-1302
123	4.00E-99	RNA ポリメラーゼ σ 32 因子	<i>Proteus mirabilis</i>	P50509	配列番号 123 のヌクレオチド 351-782
124	9.00E-58	アセトラクテートシンターゼ (アセトヒドロキシ酸シンターゼ) (ALS)	<i>Spirulina platensis</i>	P27868	配列番号 124 のヌクレオチド 603-1025
130	0	制限修飾系 R タンパク質	<i>Neisseria meningitidis</i>	CAA09003.1	配列番号 130 のヌクレオチド 495-1559
131	6.00E-91	ウロン酸イソメラーゼ (グルクロン酸イソメラーゼ)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_457532.1	配列番号 131 のヌクレオチド 661-1380 の相補体
133	3.00E-30	GyrA	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245778.1	配列番号 133 のヌクレオチド 1447-1626 の相補体
133	1.00E-27	DNA キラーゼ サブユニット A	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	P41513	配列番号 133 のヌクレオチド 1302-1442 の相補体
138	7.00E-06	KicA	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245545.1	配列番号 138 のヌクレオチド 92-157 の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 2】

138	1.00E-148	I I 型制限酵素 H A E I I (エンドヌクレアーゼ H A E I I) (R. H A E I I)	Haemophilus aegyptius	O30869	配列番号138のヌクレオチド164-1045の相補体
143	4.00E-06	Gifsy-1 プロファージタンパク質	Salmonella typhimurium LT2	NP_461555.1	配列番号143のヌクレオチド228-632の相補体
143	1.00E-14	仮想タンパク質	Bacteriophage VT2-Sa	NP_050531.1	配列番号143のヌクレオチド778-1248の相補体
143	5.00E-09	仮想タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	CAD09979.1	配列番号143のヌクレオチド715-1026の相補体
143	6.00E-10	仮想の14.9kdのタンパク質	Escherichia coli	NP_065324.1	配列番号143のヌクレオチド3-173
147	1.00E-38	GTP結合伸長因子、膜内タンパク質であり得る	Escherichia coli O157:H7 EDL933	NP_289127.1	配列番号147のヌクレオチド172-342の相補体
147	2.00E-14	GTP結合膜タンパク質 (lepA)	Borrelia burgdorferi	NP_212222.1	配列番号147のヌクレオチド17-181の相補体
148	6.00E-17	ガラクトキナーゼ	Homo sapiens	AAC35849.1	配列番号148のヌクレオチド746-1246の相補体
148	7.00E-96	ガラクトキナーゼ (ガラクトースキナーゼ)	Actinobacillus pleuropneumoniae	P94169	配列番号148のヌクレオチド232-741の相補体
149	1.00E-92	GTP結合タンパク質 TypA/BipA	Buchnera sp. APS	NP_240245.1	配列番号149のヌクレオチド265-1077の相補体
15	2.00E-21	ORF 1	Escherichia coli	CAA39631.1	配列番号15のヌクレオチド665-850
150	6.00E-17	未知	Pasteurella multocida	NP_245919.1	配列番号150のヌクレオチド171-665
153	7.00E-07	膜外タンパク質A	Rickettsia conorii	T30852	nt. 51-623 of SEQ ID NO: 153
155	7.00E-40	シトクロム d ユビキノールオキシターゼサブユニット I I	Vibrio cholerae	NP_233259.1	配列番号155のヌクレオチド583-1002
157	7.00E-13	未知	Pasteurella multocida	NP_245490.1	配列番号157のヌクレオチド1170-1367の相補体
157	2.00E-05	グリコシルトランスフェラーゼ	Neisseria gonorrhoeae	AAA68012.1	配列番号157のヌクレオチド85-189
158	1.00E-152	MitC	Pasteurella multocida	NP_246259.1	配列番号158のヌクレオチド36-530の相補体
161	3.00E-25	リボタンパク質、推定	Vibrio cholerae	NP_230232.1	配列番号161のヌクレオチド870-1439
163	9.00E-53	コリスミ酸シンターゼ	Caulobacter crescentus	NP_421948.1	配列番号163のヌクレオチド1283-2029
168	3.00E-13	銅運搬 ATPase 1 (銅ポンプ)	Mus musculus	Q64430	配列番号168のヌクレオチド66-995
168	2.00E-22	Cu 運搬 ATPase P	Homo sapiens	2001422A	配列番号168のヌクレオチド135-989
174	8.00E-48	マグネシウム/コバルト運搬タンパク質	Mesorhizobium loti	NP_103977.1	配列番号174のヌクレオチド918-1205
175	5.00E-26	vacB タンパク質	Buchnera sp. APS	NP_240369.1	配列番号175のヌクレオチド1-1587の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 3】

176	3.00E-21	推定ABC運搬系パーミアアーゼタンパク質	Campylobacter jejuni	NP_282774.1	配列番号176のヌクレオチド259-1089の相補体
183	5.00E-29	推定ATPシンターゼA鎖膜貫通Eタンパク質	Ralstonia solanacearum	NP_521442.1	配列番号183のヌクレオチド42-677の相補体
185	6.00E-85	推定運搬タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458655.1	配列番号185のヌクレオチド162-1529の相補体
187	2.00E-05	トランスケトララーゼ	Homo sapiens	AAA61222.1	配列番号187のヌクレオチド709-819
188	1.00E-116	リボヌクレアーゼE	Xylella fastidiosa 9a5c	NP_299884.1	配列番号188のヌクレオチド280-1704の相補体
192	1.00E-38	ImpA	Pasteurella multocida	NP_245829.1	配列番号192のヌクレオチド35-448
193	3.00E-08	Orf80	Enterobacteria phage 186	NP_052285.1	配列番号193のヌクレオチド1612-1818
193	1.00E-06	ホリン	Haemophilus somnus	AAC45168.1	配列番号193のヌクレオチド370-576
193	0.007	未知	Enterobacteria phage 186	NP_052260.1	配列番号193のヌクレオチド1376-1609
193	2.00E-48	リゾチーム	Haemophilus somnus	AAC45169.1	配列番号193のヌクレオチド608-1093
199	4.00E-21	未知のタンパク質	Escherichia coli O157:H7 EDL933, prophage CP-933V	NP_288675.1	配列番号199のヌクレオチド398-778
199	2.00E-49	仮想タンパク質	バクテリオファージ 933W	NP_049495.1	配列番号199のヌクレオチド1907-2392の相補体
20	1.00E-62	RpL14	Pasteurella multocida	NP_246344.1	配列番号200のヌクレオチド233-601の相補体
200	2.00E-62	仮想タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458658.1	配列番号200のヌクレオチド431-997の相補体
200	3.00E-16	仮想タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458657.1	配列番号200のヌクレオチド1028-1264の相補体
201	2.00E-26	TsaA	Pasteurella multocida	NP_245732.1	配列番号201のヌクレオチド1618-1809の相補体
209	6.00E-16	TsaA	Pasteurella multocida	NP_245732.1	配列番号209のヌクレオチド2-136の相補体
211	2.00E-15	未知	Pasteurella multocida	NP_245535.1	配列番号211のヌクレオチド23-211の相補体
211	1.00E-70	推定ATPaseタンパク質	Ralstonia solanacearum	NP_520082.1	配列番号211のヌクレオチド475-915の相補体
212	3.00E-18	仮想タンパク質	Escherichia coli O157:H7	NP_309775.1	配列番号212のヌクレオチド895-1035の相補体
216	1.00E-173	未知	Pasteurella multocida	NP_245069.1	配列番号216のヌクレオチド35-1543
217	9.00E-18	ジアシルグリセロールキナーゼ	Vibrio cholerae	NP_233101.1	配列番号217のヌクレオチド2083-2208

10

20

30

40

【表 3 A - 4】

221	4.00E-34	末端特異的プロテアーゼ	<i>Chlamydia trachomatis</i>	NP_219953.1	配列番号221のヌクレオチド849-1421
222	4.00E-23	AGR_C_3689p	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (Cereon)	NP_355005.1	配列番号222のヌクレオチド940-1305の相補体
224	9.00E-19	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245536.1	配列番号224のヌクレオチド15-308
225	1.00E-89	ファージ P2 [<i>Salmonella typhimurium</i> LT2] 中のポータルベクター様タンパク質	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2Fels-2 prophage	NP_461651.1	配列番号225のヌクレオチド31-750
229	2.00E-25	嫌気性リボヌクレオチドレタクターゼ	<i>Salmonella typhimurium</i>	CAB62266.1	配列番号229のヌクレオチド1806-2108
234	3.00E-08	保存性仮想タンパク質	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	NP_299850.1	配列番号234のヌクレオチド1680-2048
234	1.00E-42	メチオニンスルホキシドレタクターゼ、C末端ドメイン関連タンパク質、YPPQ相同分子種	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NP_348177.1	配列番号234のヌクレオチド415-654の相補体
235	4.00E-16	ファージ関連末端タンパク質	<i>Wolbachia endosymbiont of Drosophila melanogaster</i>	AAK85310.1	配列番号235のヌクレオチド931-1929の相補体
235	6.00E-56	ファージ186, <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 のorf6タンパク質に類似	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2, Fels-2 prophage	NP_461625.1	配列番号235のヌクレオチド313-1863の相補体
236	6.00E-20	保存性仮想タンパク質	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NP_252693.1	配列番号236のヌクレオチド1572-1916
240	5.00E-27	改変メチラーゼBEP1	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	P10283	配列番号240のヌクレオチド922-1305の相補体
241	2.00E-15	ファージ関連タンパク質	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	NP_299573.1	配列番号241のヌクレオチド865-1305の相補体
241	4.00E-08	仮想タンパク質	ファージ SPP1	T42296	配列番号241のヌクレオチド73-636
241	4.00E-07	仮想タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458686.1	配列番号241のヌクレオチド10-468
242	2.00E-29	翻訳伸長因子 EF-G	クロロプラスト-ダイズ	S35701	配列番号242のヌクレオチド18-1085の相補体
247	3.00E-23	GTPシクロヒドロラーゼ I (GTP-CH-I)	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Q54769	配列番号247のヌクレオチド1009-1257の相補体
248	6.00E-05	ホスホ-N-アセチルムラモイルペンタペプチドトランスフェラーゼ	<i>Aquifex aeolicus</i>	NP_213025.1	配列番号248のヌクレオチド830-1747
25	2.00E-86	推定運搬膜貫通Eタンパク質	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NP_522358.1	配列番号25のヌクレオチド309-854の相補体
25	7.00E-06	主要な促進因子ファミリートランスポーター	<i>Caulobacter crescentus</i>	NP_419155.1	配列番号25のヌクレオチド134-283の相補体
250	1.00E-150	CpdB	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246953.1	配列番号250のヌクレオチド36-1016の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 5】

252	3.00E-57	アラニール-tRNAシンターゼ	Vibrio cholerae	AAA99922.1	配列番号252のヌクレオチド1418-1951の相補体
253	1.00E-108	グルタチオンレダクターゼに類似	Listeria monocytogenes EGD-e	NP_464432.1	配列番号253のヌクレオチド411-1358の相補体
259	3.00E-39	仮想タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458654.1	配列番号259のヌクレオチド342-1037の相補体
259	3.00E-17	推定運搬タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458653.1	配列番号259のヌクレオチド1251-1607の相補体
261	5.00E-74	仮想タンパク質 6 - Haemophilus influenzae	Haemophilus influenzae	S27582	配列番号261のヌクレオチド3-422の相補体
263	1.00E-94	推定トランスボザーゼ	Haemophilus paragalinarum	AAD01406.1	配列番号263のヌクレオチド2142-2672
264	1.00E-126	未知	Actinobacillus actinomycetemcomitans	NP_067554.1	配列番号264のヌクレオチド40-714
264	1.00E-103	未知	Actinobacillus actinomycetemcomitans	NP_067555.1	配列番号264のヌクレオチド695-1309
264	2.00E-21	未知	Actinobacillus actinomycetemcomitans	NP_067556.1	配列番号264のヌクレオチド1302-1448
265	6.00E-27	アミノペプチダーゼ 2	クロロプラスト	Q42876	配列番号265のヌクレオチド556-1539
268	1.00E-116	MutY	Pasteurella multocida	NP_246257.1	配列番号268のヌクレオチド1003-1581
272	1.00E-07	仮想タンパク質	バクテリオファージ 933W	NP_049495.1	配列番号272のヌクレオチド77-232の相補体
274	3.00E-13	未知	Pasteurella multocida	NP_246952.1	配列番号274のヌクレオチド1658-1975の相補体
275	3.00E-20	CafA	Neisseria gonorrhoeae	AAG24267.1	配列番号275のヌクレオチド1299-1571
276	1.00E-45	mukEタンパク質	Vibrio cholerae	NP_231351.1	配列番号276のヌクレオチド650-1390の相補体
276	1.00E-69	KicA	Pasteurella multocida	NP_245545.1	配列番号276のヌクレオチド647-1321の相補体
278	2.00E-56	3-オキソアシル-[アシル-キャリア-タンパク質]シンターゼ111	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_455686.1	配列番号278のヌクレオチド1366-1944
281	5.00E-56	未知	Pasteurella multocida	NP_246261.1	配列番号281のヌクレオチド31-678の相補体
282	3.00E-09	orf25; P2のT遺伝子に類似	バクテリオファージ φ CTX	NP_490625.1	配列番号282のヌクレオチド511-1032の相補体
282	1.00E-08	orf11; P2 遺伝子S様生成物に類似 これは、末端合成に関与	Haemophilus somnus	AAC45165.1	配列番号282のヌクレオチド1450-1584の相補体
282	9.00E-27	推定バクテリオファージ末端タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_457167.1	配列番号282のヌクレオチド3-509の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 6】

286	5.00E-18	プラスミド関連タンパク質	<i>Listeria innocua</i> plasmid	NP_471066.1	配列番号286のヌクレオチド887-1501の相補体
287	8.00E-20	GTP加水分解酵素 I I	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	NP_287920.1	配列番号287のヌクレオチド2-145
289	1.00E-168	改変メチラーゼ HAEII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	O30868	配列番号289のヌクレオチド138-1091の相補体
289	5.00E-11	I I型制限酵素 HAEII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	O30869	配列番号289のヌクレオチド22-132の相補体
289	6.00E-47	mukF ホモログ	<i>Haemophilus influenzae</i> biotype aegyptius	AAB70828.1	配列番号289のヌクレオチド1107-1385の相補体
294	1.00E-171	LICA タンパク質	<i>Haemophilus influenzae</i> RM7004	P14181	配列番号294のヌクレオチド677-1564の相補体
297	1.00E-158	DNAメチラーゼ Hsd M、推定	<i>Vibrio cholerae</i>	NP_231404.1	配列番号297のヌクレオチド12-1136の相補体
302	0	HEME 結合タンパク質 A	<i>Haemophilus influenzae</i> DL42	P33950	配列番号302のヌクレオチド3-1316
304	6.00E-19	仮想タンパク質 6	<i>Haemophilus influenzae</i>	S27582	配列番号304のヌクレオチド121-267
305	6.00E-40	推定リコンビナーゼ-ファージ関連	<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS	NP_269557.1	配列番号305のヌクレオチド65-805
305	7.00E-22	一本鎖DNA結合タンパク質	<i>Shewanella</i> sp. F1A	AAB57886.1	配列番号305のヌクレオチド1607-2014
305	1.00E-43	ファージ関連タンパク質	<i>Bacillus halodurans</i>	NP_244410.1	配列番号305のヌクレオチド92-751
312	1.00E-28	推定バクテリオファージ関連膜貫通タンパク質	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NP_518994.1	配列番号312のヌクレオチド1819-2673
312	9.00E-25	基底膜特異的ヘパラン硫酸プロテオグリカンコアタンパク質前駆体 (HSP G) に類似	<i>Homo sapiens</i>	XP_068727.1	配列番号312のヌクレオチド27-1001
315	2.00E-45	ウラシルパーミアーゼ	<i>Deinococcus radiodurans</i>	NP_296001.1	配列番号315のヌクレオチド525-1592の相補体
318	7.00E-15	CzcD	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246276.1	配列番号318のヌクレオチド3-227の相補体
320	2.00E-60	orf3; ファージP2ターミナーゼ (遺伝子M) のエンドヌクレアーゼサブユニットに類似	<i>Haemophilus somnus</i>	AAC45159.1	配列番号320のヌクレオチド606-1241の相補体
320	2.00E-09	orf4; ファージP2の頭部完全/安定化タンパク質 (遺伝子L) に類似	<i>Haemophilus somnus</i>	AAC45160.1	配列番号320のヌクレオチド52-285の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 7】

320	3.00E-35	orf2; ファージP2の主要なキャ プシドタンパク質前駆体 (遺 伝子N) に類似	Haemophilus sommus	AAC45158.1	配列番号320のヌクレ オチド1271-162 4の相補体
323	4.00E-37	dedC タンパク質	Escherichia coli	AAA23966.1	配列番号323のヌクレ オチド74-463の相 補体
324	1.00E-153	保存性仮想タンパク質	Neisseria meningitidis MC58	NP_274972.1	配列番号324のヌクレ オチド930-1943 の相補体
326	5.00E-52	リン酸セレンシジンターゼ	Eubacterium acidaminophilum	CAB53511.1	配列番号326のヌクレ オチド1186-229 2の相補体
328	1.00E-129	分泌タンパク質 SecD	Pseudomonas aeruginosa	NP_252510.1	配列番号328のヌクレ オチド8-625の相補 体
333	3.00E-08	未知	Pasteurella multocida	NP_245489.1	配列番号333のヌクレ オチド5-418の相補 体
336	6.00E-38	推定メチルトランスフェ ラーゼ	Pseudomonas aeruginosa	NP_253353.1	配列番号336のヌクレ オチド2547-281 9の相補体
338	2.00E-98	Pmi	Pasteurella multocida	NP_245766.1	配列番号338のヌクレ オチド144-842
339	2.00E-07	1rNA ヌクレオチジルトランスフ ェラーゼ	Escherichia coli	QQECEPE	配列番号339のヌクレ オチド2331-254 0
340	0	DNAギラーゼ、サブユニ ットA、11型トポイソメ ラーゼ	Salmonella typhimurium LT2	NP_461214.1	配列番号340のヌクレ オチド93-1799の 相補体
342	4.00E-12	tolA タンパク質	Haemophilus influenzae	JC5212	配列番号342のヌクレ オチド980-1318
344	1.00E-07	改変メチラーゼ HPHIA	Haemophilus parahaemolyticus	P50192	配列番号344のヌクレ オチド849-1034 の相補体
344	8.00E-05	ABC運搬タンパク質1	Leishmania major	AAF31030.1	配列番号344のヌクレ オチド17-205の相 補体
349	3.00E-44	保存性仮想タンパク質	Neisseria meningitidis MC58	NP_273467.1	配列番号349のヌクレ オチド1397-190 3の相補体
349	8.00E-09	仮想タンパク質	Pseudomonas aeruginosa	NP_252667.1	配列番号349のヌク レオチド795-11 21の相補体
349	9.00E-10	保存性仮想分泌タンパク質	ヘリコバクターピロリ 26695	NP_207009.1	配列番号349のヌクレ オチド1319-181 6の相補体
349	2.00E-06	推定TPR繰り返しタンパ ク質	Salmonella typhimurium LT2	NP_463149.1	配列番号349のヌクレ オチド2244-255 8の相補体
35	1.00E-23	I型制限改変系特異性決定 因子	Xylella fastidiosa 9a5c	NP_300003.1	配列番号35のヌクレ オチド29-388の相補 体
352	1.00E-116	推定ペプチターゼ	Escherichia coli K12	NP_416827.1	配列番号352のヌクレ オチド951-1640 の相補体
352	0	未知	Pasteurella multocida	NP_245275.1	配列番号352のヌクレ オチド86-946の相 補体
354	5.00E-86	推定ウロン酸イソメラーゼ	Salmonella typhimurium LT2	NP_462052.1	配列番号354のヌクレ オチド168-914の 相補体
356	1.00E-07	イソメラーゼ様タンパク質 (DsbD) -	Escherichia coli	S57220	配列番号356のヌクレ オチド5-73

10

20

30

40

【表 3 A - 8】

358	1.00E-07	USG タンパク質	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CAC16793.1	配列番号358のヌクレオチド534-1307
358	0.005	HsdSタンパク質	<i>Escherichia coli</i>	CAA10700.1	配列番号358のヌクレオチド26-205
361	1.00E-152	マルトデキストリンホスホリラーゼ	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	NP_289957.1	配列番号361のヌクレオチド77-922の相補体
363	6.00E-06	BH2505~未知の保存性タンパク質	<i>Bacillus halodurans</i>	NP_243371.1	配列番号363のヌクレオチド554-844
368	1.00E-12	H02F09.3.p	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_508295.1	配列番号368のヌクレオチド1069-1977の相補体
368	6.00E-27	仮想グリシンリッチタンパク質	<i>Mesorhizobium loti</i>	NP_102360.1	配列番号368のヌクレオチド1201-1986の相補体
37	6.00E-09	輸送系の推定ATP結合構成要素	<i>Escherichia coli</i> K12	NP_415469.1	配列番号37のヌクレオチド455-691の相補体
372	7.00E-18	保存性仮想タンパク質	<i>Clostridium perfringens</i>	BAB80319.1	配列番号372のヌクレオチド1763-1924の相補体
376	7.00E-24	推定バクテリオファージタンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_456379.1	配列番号376のヌクレオチド158-808の相補体
376	8.00E-10	仮想タンパク質	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	NP_298882.1	配列番号376のヌクレオチド1129-1671の相補体
376	9.00E-06	lin1713	<i>Listeria innocua</i>	NP_471049.1	配列番号376のヌクレオチド913-1557の相補体
377	6.00E-05	Vng1732c	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	NP_260487.1	配列番号377のヌクレオチド2378-2587
377	1.00E-11	インバジン前駆体 (膜外アドヘンシ)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	P31489	配列番号377のヌクレオチド127-345の相補体
382	4.00E-16	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246871.1	配列番号382のヌクレオチド967-1068の相補体
383	4.00E-36	推定トランスボザーゼ	<i>Streptomyces avermitilis</i>	BAB69302.1	配列番号383のヌクレオチド488-1162
383	3.00E-58	リコンビナーゼ	IncN プラスミド R46	NP_511241.1	配列番号383のヌクレオチド1-393の相補体
383	4.00E-24	トランスボザーゼ	<i>Escherichia coli</i>	I69674	配列番号383のヌクレオチド1294-1740
383	0	tnpA	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CAA73750.1	配列番号383のヌクレオチド1782-2834
385	2.00E-31	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246065.1	配列番号385のヌクレオチド1515-1772
386	5.00E-65	cydC [<i>Escherichia coli</i>	AAA66172.1	配列番号386のヌクレオチド3438-4115の相補体
386	4.00E-33	ABCトランスポーター、ATP結合タンパク質	<i>Mesorhizobium loti</i>	NP_105463.1	配列番号386のヌクレオチド2569-3390の相補体
388	3.00E-45	60 kDaの膜内タンパク質ホモログ	<i>Coxiella burnetii</i>	P45650	配列番号388のヌクレオチド3211-3759の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 9】

390	4.00E-25	推定DNA結合タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458175.1	配列番号390のヌクレオチド1051-1416
390	3.00E-13	転写レギュレーター	Bacillus halodurans	NP_241773.1	配列番号390のヌクレオチド84-578の相補体
390	3.00E-06	DNAトランスロカーゼ ステージ111 胞子形成タンパク質ホモログ	Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50	NP_372265.1	配列番号390のヌクレオチド620-871の相補体
395	7.00E-31	ATPase, Cu++ 運搬, β ポリペプチド	Homo sapiens	NP_000044.1	配列番号395のヌクレオチド615-1406の相補体
397	3.00E-23	ターミナーゼ 大サブユニット	バクテリオファージ HK620	NP_112076.1	配列番号397のヌクレオチド2363-2725の相補体
397	3.00E-16	仮想タンパク質	Xylella fastidiosa 9a5c	NP_297824.1	配列番号397のヌクレオチド1517-1744の相補体
398	4.00E-07	orf32	Haemophilus phage HP2	NP_536839.1	配列番号398のヌクレオチド1288-1866の相補体
398	8.00E-24	推定細胞質タンパク質	Salmonella typhimurium LT2	NP_463063.1	配列番号398のヌクレオチド798-1220の相補体
398	2.00E-83	orf31	Haemophilus phage HP1	NP_043502.1	配列番号398のヌクレオチド1881-2510の相補体
399	1.00E-94	ヘム/ヘモベキシン結合タンパク質	Haemophilus influenzae N182	P45355	配列番号399のヌクレオチド88-774
401	3.00E-63	Sty SBLI	Salmonella enterica	CAA68058.1	配列番号401のヌクレオチド1690-2742
401	3.00E-06	制限改変酵素サブユニット M3	Mycoplasma pulmonis	NP_325912.1	配列番号401のヌクレオチド79-489
402	2.00E-13	不明瞭なタンパク質OP A66前駆体	Neisseria gonorrhoeae	Q05033	配列番号402のヌクレオチド2634-2915の相補体
406	8.00E-13	I型制限酵素 EcoR124II R	Neisseria meningitidis MC58	NP_273876.1	配列番号406のヌクレオチド281-520
407	6.00E-65	未知	Pasteurella multocida	NP_246237.1	配列番号407のヌクレオチド938-2450
407	5.00E-99	PepE	Pasteurella multocida	NP_245391.1	配列番号407のヌクレオチド1216-1917
407	1.00E-16	ヘモグロビン-ハプトグロビン結合タンパク質A	Haemophilus influenzae Tn106	Q48153	配列番号407のヌクレオチド1-141
409	1.00E-106	仮想タンパク質1	Haemophilus influenzae	S27577	配列番号409のヌクレオチド2524-3159の相補体
411	4.00E-29	ヘム抑制性ヘモグロビン結合タンパク質	Haemophilus influenzae, type b, strain HI689	AAB46794.1	配列番号411のヌクレオチド391-615
411	0	ヘモグロビン-ハプトグロビン結合タンパク質A	Haemophilus influenzae Tn106	Q48153	配列番号411のヌクレオチド651-3263
412	2.00E-07	調節タンパク質CRO (抗リプレッサー)	バクテリオファージ 434	P03036	配列番号412のヌクレオチド59-259の相補体
412	4.00E-06	仮想タンパク質	バクテリオファージ P27	CAC83535.1	配列番号412のヌクレオチド1436-1654

10

20

30

40

【表 3 A - 1 0】

413	8.00E-07	仮想タンパク質	Deinococcus radiodurans	NP_294301.1	配列番号413のヌクレオチド791-1012の相補体
414	9.00E-65	保存性仮想タンパク質	Vibrio cholerae	NP_230092.1	配列番号414のヌクレオチド1696-2103
414	3.00E-93	未知	Pasteurella multocida	NP_246834.1	配列番号414のヌクレオチド1777-2109
416	2.00E-17	未知	Pasteurella multocida	NP_246629.1	配列番号416のヌクレオチド2565-2831の相補体
416	4.00E-26	仮想タンパク質 o154	Escherichia coli	S30728	配列番号416のヌクレオチド1928-2254の相補体
416	3.00E-37	運搬タンパク質 TatC	Pseudomonas aeruginosa	NP_253757.1	配列番号416のヌクレオチド1494-2018の相補体
417	1.00E-66	メチルトランスフェラーゼにわずかに類似	Listeria innocua	NP_471073.1	配列番号417のヌクレオチド999-1928の相補体
417	5.00E-05	DNA結合タンパク質 RDGA	Pectobacterium carotovorum	Q47587	配列番号417のヌクレオチド3526-4212の相補体
417	2.00E-29	推定ファージ関連タンパク質	Yersinia pestis	NP_407132.1	配列番号417のヌクレオチド2546-2938の相補体
417	3.00E-06	アデニン特異的DNAメチラーゼ	Thermoplasma acidophilum	NP_393798.1	配列番号417のヌクレオチド826-1020の相補体
43	9.00E-16	PcnB	Pasteurella multocida	NP_245801.1	配列番号43のヌクレオチド511-870
434	2.00E-97	RNAポリメラーゼのβサブユニット	Nephroselmis olivacea	NP_050840.1	配列番号434のヌクレオチド32-1534の相補体
435	4.00E-52	改変メチラーゼBEP1	Brevibacterium epidermidis	P10283	配列番号435のヌクレオチド11-565の相補体
435	4.00E-57	5機能的芳香族ポリペプチド (以下を含む: 3-デヒドロキナ酸シンターゼ、3-デヒドロキナ酸デヒドラーターゼ (3-デヒドロキナーゼ)、シキミ酸5-デヒドロゲナーゼ、シキミ酸キナーゼおよびepsPシンターゼ)	Saccharomyces cerevisiae	NP_010412.1	配列番号435のヌクレオチド757-2064の相補体
437	5.00E-70	ジヒドロ葉酸レタクターゼ	Haemophilus influenzae (臨床分離株 R1042)	S52336	配列番号437のヌクレオチド2393-2767
438	1.00E-106	ポリAポリメラーゼ	Vibrio cholerae	NP_230244.1	配列番号438のヌクレオチド3-1124
439	6.00E-60	ホルフィリン合成タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_457816.1	配列番号439のヌクレオチド2343-2783
441	5.00E-73	RimM	Pasteurella multocida	NP_246234.1	配列番号441のヌクレオチド151-441の相補体
442	9.00E-31	リボタンパク質 NLPD	Salmonella typhimurium	P40827	配列番号442のヌクレオチド3362-3520の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 1 1】

444	6.00E-24	グリシンベタイントランスポーター	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50	NP_371872.1	配列番号444のヌクレオチド2242-2514の相補体
452	6.00E-28	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245616.1	配列番号452のヌクレオチド533-883の相補体
452	0	I型制限酵素EcoPrrI Mタンパク質	<i>Escherichia coli</i>	Q47163	配列番号452のヌクレオチド3291-4154
452	2.00E-75	I型制限酵素 Mタンパク質	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	NP_077929.1	配列番号452のヌクレオチド4156-4662
455	9.00E-56	推定バクテリオファージタンパク質	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NP_520059.1	配列番号455のヌクレオチド2028-2774
455	2.00E-55	orf2; ファージP2の主要キャプシドタンパク質前駆体 (遺伝子N) に類似	<i>Haemophilus somnus</i>	AAC45158.1	配列番号455のヌクレオチド2864-3490
455	1.00E-175	gpP	<i>Enterobacteria</i> ファージP2	NP_046758.1	配列番号455のヌクレオチド127-1812の相補体
456	1.00E-38	仮想タンパク質	<i>Pseudomonas putida</i>	NP_542872.1	配列番号456のヌクレオチド1010-1282の相補体
456	1.00E-172	仮想タンパク質	<i>Pseudomonas putida</i>	NP_542873.1	配列番号456のヌクレオチド1443-2006の相補体
457	1.00E-116	仮想タンパク質 (galE5'領域) - <i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	S15287	配列番号457のヌクレオチド62-961の相補体
457	1.00E-134	dTDPグルコース4,6-デヒドラターゼ	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	T00102	配列番号457のヌクレオチド2637-3656
459	2.00E-10	RNAポリメラーゼαサブユニット	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	NP_441586.1	配列番号459のヌクレオチド25-117
461	9.00E-51	保存性仮想タンパク質	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50	NP_370593.1	配列番号461のヌクレオチド4124-4624
462	9.00E-06	NADHデヒドロゲナーゼ	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	AAG01016.1	配列番号462のヌクレオチド703-828
465	3.00E-41	GTP結合タンパク質 Era	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	NP_441951.1	配列番号465のヌクレオチド2470-2787の相補体
466	1.00E-15	推定バクテリオファージタンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_455548.1	配列番号466のヌクレオチド837-1478
466	1.00E-90	orf31	<i>Haemophilus influenzae</i> ファージHP1	NP_043502.1	配列番号466のヌクレオチド2396-3199
469	0	ヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプログロビン結合タンパク質C前駆体	<i>Haemophilus influenzae</i> HI689	Q9X442	配列番号469のヌクレオチド427-3459の相補体
471	8.00E-05	推定トランスホザゼ	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	NP_274608.1	配列番号471のヌクレオチド2957-3217
472	6.00E-08	仮想タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458660.1	配列番号472のヌクレオチド2881-3270の相補体
472	5.00E-23	抗制限タンパク質	<i>Mesorhizobium loti</i>	NP_106707.1	配列番号472のヌクレオチド4908-5324

10

20

30

40

【表 3 A - 1 2】

472	1.00E-75	仮想タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458661.1	配列番号472のヌクレオチド1931-2776の相補体
472	9.00E-72	仮想タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458662.1	配列番号472のヌクレオチド544-1689の相補体
475	3.00E-25	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_244952.1	配列番号475のヌクレオチド3207-3626
476	8.00E-73	推定DNA結合タンパク質	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_458175.1	配列番号476のヌクレオチド3339-4310の相補体
476	6.00E-47	アンチコドンヌクレアーゼ	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	NP_273873.1	配列番号476のヌクレオチド4397-4885の相補体
478	3.00E-06	メチオニンジントナーゼ様酵素	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB38313.1	配列番号478のヌクレオチド3554-3679の相補体
478	3.00E-05	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245444.1	配列番号478のヌクレオチド164-250の相補体
479	1.00E-18	保存性仮想タンパク質	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	NP_298841.1	配列番号479のヌクレオチド2302-2658
48	3.00E-19	Dca	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AAF12796.1	配列番号48のヌクレオチド225-746の相補体
482	1.00E-06	仮想タンパク質	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	NP_275122.1	配列番号482のヌクレオチド2055-2189
482	9.00E-28	保存性仮想タンパク質	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	NP_274383.1	配列番号482のヌクレオチド1689-1898
487	5.00E-75	保存性仮想タンパク質	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	NP_284304.1	配列番号487のヌクレオチド2541-2978
488	2.00E-64	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246617.1	配列番号488のヌクレオチド2983-3540
488	8.00E-93	1-デオキシ-D-キシロース 5-ホスフェート レダクトイソメラーゼ	<i>Zymomonas mobilis</i>	AAD29659.1	配列番号488のヌクレオチド1344-1830
491	5.00E-51	ルブレドキシジオキソレダクターゼホモログ	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AAB50346.1	配列番号491のヌクレオチド1690-2439の相補体
492	1.00E-27	ホスホトランスフェラーゼ系酵素 IIA様タンパク質	<i>Staphylococcus aureus</i>	AAK83253.1	配列番号492のヌクレオチド755-970の相補体
493	2.00E-84	未知	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AAC70895.1	配列番号493のヌクレオチド3333-3935
493	4.00E-49	未知	ヘリコバクターピロリ J99	NP_223898.1	配列番号493のヌクレオチド3345-4010
493	9.00E-31	転写因子MdcH	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AAF20290.1	配列番号493のヌクレオチド1885-2793
493	6.00E-30	HimA	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245565.1	配列番号493のヌクレオチド1129-1260
494	4.00E-85	推定プロファージインテグラーゼ	<i>Yersinia pestis</i>	NP_404712.1	配列番号494のヌクレオチド900-2099
494	4.00E-63	DNAメチルトランスフェラーゼ	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	NP_299063.1	配列番号494のヌクレオチド5544-6170の相補体
494	6.00E-19	改変メチラーゼ SCRFIA	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	P34877	配列番号494のヌクレオチド5019-6113の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 1 3】

497	0	トランスフェリン結合タンパク質1	Haemophilus influenzae (PAK 12085 株)	S70906	配列番号497のヌクレオチド3251-4999
50	5.00E-07	AcpP	Pasteurella multocida	NP_246856.1	配列番号50のヌクレオチド2-136
501	7.00E-50	保存性仮想タンパク質	Vibrio cholerae	NP_231403.1	配列番号501のヌクレオチド3649-4872の相補体
501	0	I型制限酵素HsdR、推定	Vibrio cholerae	NP_231400.1	配列番号501のヌクレオチド1551-3440の相補体
501	4.00E-13	ATP依存性DNAヘリカゼ RecG関連タンパク質	Deinococcus radiodurans	NP_295921.1	配列番号501のヌクレオチド5317-5844の相補体
501	5.00E-11	保存性仮想タンパク質	Ureaplasma urealyticum	NP_077868.1	配列番号501のヌクレオチド5098-5769の相補体
504	2.00E-44	膜外タンパク質P2前駆体 (OMP P2)	Haemophilus influenzae AG30010	Q48218	配列番号504のヌクレオチド4681-5019の相補体
507	0	SpoT	Pasteurella multocida	NP_245857.1	配列番号507のヌクレオチド3685-5316の相補体
51	6.00E-87	グルコサミン-フルクトース-6-リン酸アミノトランスフェラーゼ (異性化)	Vibrio cholerae	NP_230141.1	配列番号51のヌクレオチド30-470
512	2.00E-28	ジペプチド輸送系パーミアゼタンパク質	Yersinia pestis	NP_407439.1	配列番号512のヌクレオチド1095-1580の相補体
512	3.00E-82	SapC	Pasteurella multocida	NP_245850.1	配列番号512のヌクレオチド730-1095の相補体
514	9.00E-06	推定の不可欠な膜タンパク質	Campylobacter jejuni	NP_281236.1	配列番号514のヌクレオチド577-684の相補体
514	3.00E-11	orf 仮想タンパク質	Escherichia coli O157:H7 EDL933	NP_286004.1	配列番号514のヌクレオチド449-568の相補体
518	0	推定膜内トランスアシラーゼタンパク質	Neisseria meningitidis Z2491	NP_284893.1	配列番号518のヌクレオチド92-1927
519	4.00E-30	仮想タンパク質	Mesorhizobium loti	NP_108196.1	配列番号519のヌクレオチド2221-3159の相補体
519	2.00E-12	保存性仮想タンパク質	Listeria innocua	NP_471067.1	配列番号519のヌクレオチド3994-5241の相補体
519	6.00E-20	仮想タンパク質	Mesorhizobium loti	NP_108198.1	配列番号519のヌクレオチド707-1552の相補体
519	4.00E-26	推定バクテリオファージタンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_455526.1	配列番号519のヌクレオチド3982-5163の相補体
52	3.00E-94	膜外タンパク質P2前駆体 (OMP P2)	Haemophilus influenzae	Q48218	配列番号52のヌクレオチド45-788

10

20

30

40

【表 3 A - 1 4】

520	0	切除ヌクレアーゼサブユニットA	<i>Escherichia coli</i> K12	NP_418482.1	配列番号520のヌクレオチド6309-7745の相補体
521	5.00E-08	亜鉛/マンガン ABCトランスポーター基質結合タンパク質	<i>Rickettsia conorii</i>	NP_359651.1	配列番号521のヌクレオチド2236-2652
521	1.00E-140	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245865.1	配列番号521のヌクレオチド338-1390
521	1.00E-86	ORF_f432	<i>Escherichia coli</i>	AAB40463.1	配列番号521のヌクレオチド203-1390
522	3.00E-22	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246093.1	配列番号522のヌクレオチド670-885
526	5.00E-33	エキソデオキシリボヌクレアーゼV α 鎖	<i>Yersinia pestis</i>	NP_404635.1	配列番号526のヌクレオチド5582-6202
526	1.00E-62	エキソデオキシリボヌクレアーゼV、67kDaサブユニット	<i>Vibrio cholerae</i>	NP_231950.1	配列番号526のヌクレオチド5675-6193
527	1.00E-147	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245980.1	配列番号527のヌクレオチド4283-5203
527	0	Mfd	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245978.1	配列番号527のヌクレオチド7545-8759
527	0	転写-修復結合因子 (TrcF)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	NP_455708.1	配列番号527のヌクレオチド7611-8762
527	0	推定転写修復結合因子タンパク質	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NP_519763.1	配列番号527のヌクレオチド7611-8870
528	1.00E-48	ウンデカプレニルピロホスフェートシンターゼ	<i>Chlamydia muridarum</i>	NP_297109.1	配列番号528のヌクレオチド2918-3712
528	0	ロイシル-tRNAシンターゼ	<i>Vibrio cholerae</i>	NP_230603.1	配列番号528のヌクレオチド180-2822の相補体
529	1.00E-104	DNAプライマーゼ	<i>Legionella pneumophila</i>	P71481	配列番号529のヌクレオチド3316-3960の相補体
534	9.00E-29	推定インテグラーゼ	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	NP_461690.1	配列番号534のヌクレオチド4668-5009
534	6.00E-18	仮想タンパク質 NMA0153	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	NP_283002.1	配列番号534のヌクレオチド5933-6337の相補体
534	2.00E-23	仮想タンパク質	<i>Deinococcus radiodurans</i>	NP_294868.1	配列番号534のヌクレオチド6908-7654
534	1.00E-88	プロファージCP4-57インテグラーゼ	<i>Escherichia coli</i> K12	NP_417111.1	配列番号534のヌクレオチド5057-5875
535	1.00E-115	ホスフェートアセチルトランスフェラーゼ	<i>Buchnera</i> sp. APS	NP_240007.1	配列番号535のヌクレオチド3385-4596
536	3.00E-35	コバルト膜輸送タンパク質CbiQ	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	AAD49727.1	配列番号536のヌクレオチド3531-4136の相補体
536	6.00E-37	未知	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245305.1	配列番号536のヌクレオチド6478-6921の相補体
539	2.00E-26	Orf122	<i>Chlorobium tepidum</i>	AAG12204.1	配列番号539のヌクレオチド1778-2008の相補体
540	1.00E-77	ヒートショックタンパク質 HtpX	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	NP_273864.1	配列番号540のヌクレオチド2567-3481の相補体
541	0	IleS	<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246601.1	配列番号541のヌクレオチド3167-4549

10

20

30

40

【表 3 A - 1 5】

545	2.00E-09	DNA結合タンパク質 RDGB	Pectobacterium carotovorum	Q47588	配列番号545のヌクレ オチド3816-397 7
545	2.00E-11	推定トランスポザゼ	Sinorhizobium meliloti	NP_437741.1	配列番号544のヌクレ オチド2786-301 9の相補体
545	2.00E-07	thrW-ar gF遺伝子 間領域仮想42.5kdタ ンパク質	Escherichia coli	BAA77933.1	配列番号545のヌクレ オチド2814-281 1の相補体
545	4.00E-18	推定ISエレメントトラン スポザゼ	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_454711.1	配列番号545のヌクレ オチド1955-223 0
546	0	ヘム/ヘモベキシン結合タ ンパク質	Haemophilus influenzae	P45354	配列番号546のヌクレ オチド5551-780 9
546	0	ヘム/ヘモベキシン利用タ ンパク質B	Haemophilus influenzae	P45356	配列番号546のヌクレ オチド3842-553 6
546	0	ヘム/ヘモベキシン利用タ ンパク質C	Haemophilus influenzae	P45357	配列番号546のヌクレ オチド1638-317 6
546	2.00E-12	HasR	Pasteurella multocida	NP_246561.1	配列番号546のヌクレ オチド3149-376 3
549	0	未知	Pasteurella multocida	NP_246821.1	配列番号549のヌクレ オチド2526-351 2
549	1.00E-121	推定膜タンパク質	Yersinia pestis	NP_404859.1	配列番号549のヌクレ オチド605-1108
549	0	未知	Pasteurella multocida	NP_246822.1	配列番号549のヌクレ オチド1122-166 4
551	1.00E-157	I型制限改変系エンドヌク レアーゼ	Xylella fastidiosa 9a5c	NP_300016.1	配列番号551のヌクレ オチド7396-832 2の相補体
552	1.00E-100	バリル- tRNAシンテター ゼ	Deinococcus radiodurans	NP_293872.1	配列番号552のヌクレ オチド6691-868 8の相補体
552	0	バリル- tRNAシンテター ゼ	Haemophilus parainfluenzae	P36432	配列番号552のヌクレ オチド5850-664 7の相補体
553	0	DNA関連RNAポリメラ ーゼ、βサブユニット	Vibrio cholerae	NP_229982.1	配列番号553のヌクレ オチド2668-669 9
554	0	鉄利用タンパク質B	Haemophilus influenzae	T10887	配列番号554のヌクレ オチド991-2508
559	1.00E-100	プレタンパク質トランスロ カーゼ SECAサブユニ ット	Bacillus firmus	P96313	配列番号559のヌクレ オチド3420-447 2
56	2.00E-23	RpL30	Pasteurella multocida	NP_246336.1	配列番号56のヌクレオ チド656-832の相 補体
56	9.00E-13	RpS5	Pasteurella multocida	NP_246337.1	配列番号56のヌクレ オチド843-106 4の相補体
560	1.00E-157	Na ⁺ /H ⁺ アンチポーター	Vibrio cholerae	NP_231535.1	配列番号560のヌクレ オチド279-2989 の相補体
562	1.00E-72	推定ピオチンシルホキシド レクターゼ2	Yersinia pestis	NP_404419.1	配列番号562のヌクレ オチド7862-887 8
562	1.00E-125	制限改変系Rタンパク質	Neisseria meningitidis	CAA09003.1	配列番号562のヌクレ オチド2-985
563	0	免疫グロブリンA1プロテア ーゼ	Haemophilus influenzae HK715	P45384	配列番号563のヌクレ オチド4127-950 8の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 1 6】

563	0	3-イソプロピルリンゴ酸 デヒドラターゼ (IPMT)	Schizosaccharom yces pombe	O14289	配列番号563のヌクレ オチド1980-398 3
564	2.00E-79	orf32	Haemophilus ファージ HP2	NP_536839.1	配列番号564のヌクレ オチド6241-683 1
564	7.00E-33	推定可変末端線維タンパク 質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_457882.1	配列番号564のヌクレ オチド3707-417 7
564	2.00E-14	M タンパク質	Enterobacteria ファージ 186	NP_052264.1	配列番号564のヌクレ オチド1905-2213
564	4.00E-44	ファージ P2 の末端線維タン パク質 (gpH) に類似	Salmonella typhimurium LT2, Fels-2 プロファージ	NP_461635.1	配列番号564のヌクレ オチド3171-369 2
564	2.00E-85	gpJ	Enterobacteria ファージ P2	NP_046773.1	配列番号564のヌクレ オチド2267-3166
564	1.00E-24	仮想タンパク質	Neisseria meningitidis Z2491	NP_284534.1	配列番号564のヌク レオチド6852-7 334
564	4.00E-26	gpV	Enterobacteria ファージ P2	NP_046771.1	配列番号564のヌク レオチド1337-1 912
564	2.00E-47	[SwissProt P44255 に類似	Escherichia coli	BAA16182.1	配列番号564のヌク レオチド11383-11 961
564	2.00E-51	仮想タンパク質 NMA1315	Neisseria meningitidis Z2491	NP_284066.1	配列番号564のヌク レオチド10452-11 180
564	0	orf31	Haemophilus ファージ HP1	NP_043502.1	配列番号564のヌク レオチド4160-6226
564	2.00E-09	rep	Haemophilus ファージ HP2	NP_536816.1	配列番号564のヌク レオチド9986-102 34の相補体
565	2.00E-57	レソルバーゼ/インテグラ ーゼ様タンパク質	Haemophilus influenzae 生物型 aegyptius	AAL47097.1	配列番号565のヌク レオチド11885-12 445
565	1.00E-93	インテグラーゼ	Actinobacillus actinomycetemco mitans	AAC70901.1	配列番号565のヌク レオチド4118-490 0の相補体
565	6.00E-35	推定ファージインテグラ ーゼ	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458745.1	配列番号565のヌク レオチド4148-499 0の相補体
565	1.00E-107	仮想タンパク質	Xylella fastidiosa 9a5c	NP_299042.1	配列番号565のヌク レオチド5066-681 7の相補体
566	1.00E-126	仮想タンパク質 (galE 5' 領域)	Haemophilus influenzae	S15287	配列番号566のヌク レオチド10726-11 607の相補体
567	0	未知	Pasteurella multocida	NP_246387.1	配列番号567のヌク レオチド5343-768 8
568	1.00E-151	多剤耐性膜トランスロカー ーゼ	Escherichia coli O157:H7	NP_311575.1	配列番号568のヌク レオチド6-1403
568	1.00E-141	YhbX/YhjW/YjP/Yj dBファミリータンパク質	Neisseria meningitidis MC58	INP_275002.1	配列番号568のヌク レオチド11213- 12634の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 1 7】

570	1.00E-180	仮想タンパク質 3 (ksgA-lic2B 遺伝子間領域)	Haemophilus influenzae (菌株 RM7004)	S71024	配列番号 570 の nt. 12845-13720 の相補体
571	0	グリセロホスホジエス テル ホスホジエステラーゼ	Haemophilus influenzae (単離物 772)	A43576	配列番号 571 の nt. 1656-2693
571	1.00E-137	外膜タンパク質 P 4 前駆体 - Haemophilus influenzae	Haemophilus influenzae	A43604	配列番号 571 の nt. 6145-6909
571	2.00E-72	CG8298 遺伝子産物 [alt 1]	Drosophila melanogaster	AAF58597.1	配列番号 571 の nt. 3813-5339
572	1.00E-40	仮想タンパク質 TC0130	Chlamydia muridarum (菌株 Nigg)	G81737	配列番号 572 の nt. 3734-4099
572	5.00E-10	仮想タンパク質	Pyrococcus horikoshii	NP_142215.1	配列番号 572 の nt. 4472-4888
572	3.00E-11	109aa 長 仮想タンパク質	Sulfolobus tokodaii	NP_377117.1	配列番号 572 の nt. 7303-7470
572	8.00E-43	仮想タンパク質	Chlamydia pneumoniae AR39	NP_445524.1	配列番号 572 の nt. 4289-4618
572	9.00E-08	CDH1-D	Gallus gallus	AAL31950.1	配列番号 572 の nt. 7183-7521
575	1.00E-173	トポイソメラーゼ B	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458624.1	配列番号 575 の nt. 18980-20923
575	1.00E-100	DNA ヘリカーゼ	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458617.1	配列番号 575 の nt. 10399-11706
65	2.00E-53	SufI	Pasteurella multocida	NP_245041.1	配列番号 65 の nt. 3-821
67	4.00E-39	推定 MFS ファミリータンパク質 (1st mdule)	Salmonella typhimurium LT2	NP_462786.1	配列番号 67 の nt. 125-1033 の相補体
7	4.00E-29	推定膜タンパク質	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	NP_458664.1	compliment of nt. 2-559 of SEQ ID NO: 7
72	2.00E-51	セリントランスポータ -	Vibrio cholerae	NP_230946.1	nt. 18-803 of SEQ ID NO: 72
74	3.00E-90	仮想 21.8K タンパク質 (形質転換 に含まれる遺伝 子座内) -	Haemophilus influenzae	JH0436	配列番号 74 の nt. 248-766 の相補体
77	2.00E-18	RecX タンパク質	Legionella pneumophila	CAC33485.1	配列番号 77 の nt. 480-920
82	4.00E-95	未知	Pasteurella multocida	NP_246414.1	配列番号 82 の nt. 128-955
83	2.00E-66	未知	Pasteurella multocida	NP_246777.1	配列番号 83 の nt. 5-556
83	6.00E-33	CTP シンターゼ	Helicobacter pylori J99	NP_223042.1	配列番号 83 の nt. 1027-1338 の相補体
83	4.00E-34	CTP シンターゼ	Campylobacter jejuni	NP_281249.1	配列番号 83 の nt. 1024-1275 の相補体
84	1.00E-16	リプレッサー タンパク質 Cl	Bacteriophage phi-80	P14819	配列番号 84 の nt. 823-1233
84	2.00E-05	orf, 仮想タンパク質	Escherichia coli K12	NP_415875.1	配列番号 84 の nt. 533-700 の相補体

10

20

30

40

【表 3 A - 1 8】

84	4.00E-11	orf33	バクテリオファージ phi CTX	NP_490633.1	配列番号84の nt. 32-466 の相補体
85	3.00E-42	SpoT	Pasteurella multocida	NP_245857.1	配列番号85の nt. 899-1261
90	1.00E-103	推定メチラーゼ	Bacteriophage Tuc2009	NP_108695.1	配列番号90の nt. 478-1206 の相補体
90	4.00E-11	もっともらしいアデニン特異的DNAメチルトランスフェラーゼ	Thermoplasma acidophilum	NP_394624.1	配列番号90の nt. 397-1140 の相補体

10

【表 3 B - 1】

表 3B

ヒット同一性	全長ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	コンティグの位置	Genbankタンパク質に対する相同性
CpdB	配列番号 686	配列番号 687	配列番号681の nt. 38041-36068 (コンティグ 14)	NP_246953.1
推定膜タンパク質	配列番号 688	配列番号 689	配列番号685の nt. 906601-908094 (コンティグ 18)	NP_458664.1
GTP結合タンパク質 TypA/BipA	配列番号 690	配列番号 691	配列番号683の nt. 42557-40995 (コンティグ 16)	NP_240245.1
外膜プロテイン A	配列番号 692	配列番号 693	配列番号685の nt. 7000420-704187 (コンティグ 18)	T30852
vacB タンパク質	配列番号 694	配列番号 695	配列番号683の nt. 39184-36836 (コンティグ 16)	NP_240369.1
推定 ABC 輸送系パーミアゼ タンパク質	配列番号 696	配列番号 697	配列番号685の nt. 59155-58370 (コンティグ 18)	NP_282774.1
推定輸出タンパク質	配列番号 698	配列番号 699	配列番号685の nt. 901142-902542 (コンティグ 18)	NP_458655.1
ImpA	配列番号 700	配列番号 701	配列番号685の nt. 348187-347747 (コンティグ 18)	NP_245829.1
TsaA	配列番号 702	配列番号 703	配列番号684の nt. 74941-75548 (コンティグ 17)	NP_245732.1
もっともらしい輸送膜 貫通タンパク質	配列番号 704 配列番号 706	配列番号 705 配列番号 707	配列番号685の nt. 74436-75176 (コンティグ 18) 配列番号685の nt. 75160-75660 (コンティグ 18)	NP_522358.1
可能性のある輸出タン パク質	配列番号 708	配列番号 709	配列番号685の nt. 899618-900262 (コンティグ 18)	NP_458653.1
LICA タンパク質	配列番号 710	配列番号 711	配列番号685の nt. 356917-355958 (コンティグ 18)	P14181
ヘム結合 プロテイン A	配列番号 712	配列番号 713	配列番号683の NT. 26114-27739 (コンティグ 16)	P33950

20

30

40

【表 3 B - 2】

基底膜特異的ヘパラン スルフェートプロテオ グリカン前駆体 (HSPG) に類似	配列番号 714	配列番号 715	配列番号 685 の nt. 311610-312683 (コンティグ 18)	XP_068727.1
CzcD	配列番号 716	配列番号 717	配列番号 681 の nt. 34865-35542 (コンティグ 14)	NP_246276.1
保存仮想タンパク質	配列番号 718	配列番号 719	配列番号 685 の nt. 194993-193977 (コンティグ 18)	NP_274972.1
分泌タンパク質 SecD	配列番号 720	配列番号 721	配列番号 683 の nt. 203707-201857 (コンティグ 17)	NP_252510.1
ABC トランスポー タータンパク質 1	配列番号 722	配列番号 723	配列番号 681 の nt. 3943-5859 (コンティグ 14)	AAF31030.1
保存仮想タンパク質	配列番号 724 配列番号 726 配列番号 728	配列番号 725 配列番号 727 配列番号 729	配列番号 685 の nt. 331090-331749 (コンティグ 18) 配列番号 685 の nt. 331938-332492 (コンティグ 18) 配列番号 685 の nt. 332681-33232 (コンティグ 18)	NP_273467.1
インパシン前駆体 (外膜付着因子)	配列番号 730	配列番号 731	配列番号 685 の nt. 416757-417020 (コンティグ 18)	P31489
ヘム/ヘモベキシン結 合タンパク質	配列番号 732	配列番号 733	配列番号 384 の nt. 229430-232195 (コンティグ 17)	P45355
不透明タンパク質 OPA66 前駆体	配列番号 734	配列番号 735	配列番号 384 の nt. 375592-375879 (コンティグ 17)	Q05033
ヘモグロビン-ハプト グロビン結合プロテ イン A	配列番号 736	配列番号 737	配列番号 681 の nt. 45709-42566 (コンティグ 14)	Q48153
輸送タンパク質 TatC	配列番号 738	配列番号 739	配列番号 384 の nt. 134452-135222 (コンティグ 17)	NP_253757.1
リポタンパク質 NLPD	配列番号 740	配列番号 741	配列番号 682 の nt. 18895-20112 (コンティグ 15)	P40827
ヘモグロビンおよびヘ モグロビン-ハプトグ ロビン結合プロテイン C 前駆体	配列番号 742	配列番号 743	配列番号 682 の nt. 34181-31041 (コンティグ 15)	Q9X442
HimA	配列番号 744	配列番号 745	配列番号 685 の nt. 382795-383085 (コンティグ 18)	NP_245565.1
トランスフェリン結 合タンパク質 1	配列番号 746	配列番号 747	配列番号 683 の nt. 178537-175799 (コンティグ 16)	S70906
SapC	配列番号 748	配列番号 749	配列番号 685 の nt. 197754-196867 (コンティグ 18)	NP_245850.1

10

20

30

40

【表 3 B - 3】

熱ショックタンパク質 HtpX	配列番号 750	配列番号 751	配列番号 682 の nt. 40414-41265 (コンティグ 15)	NP_273864.1
ヘム/ヘモベキシン結合タンパク質	配列番号 752	配列番号 753	配列番号 684 の nt. 229430-232195 (コンティグ 17)	P45354
ヘム/ヘモベキシン利用プロテインB	配列番号 754	配列番号 755	配列番号 684 の nt. 227721-229418 (コンティグ 17)	P45356
ヘム/ヘモベキシン利用プロテインC	配列番号 756	配列番号 757	配列番号 684 の nt. 225516-227645 (コンティグ 17)	P45357 NP_246561.1
鉄利用プロテインB	配列番号 758	配列番号 759	配列番号 684 の nt. 32076-33611 (コンティグ 17)	T10887
プレプロテイントランスロカーゼ SECA サブユニット	配列番号 760	配列番号 761	配列番号 683 の nt. 82314-84785 (コンティグ 16)	P96313
免疫グロブリンA1プロテアーゼ	配列番号 762	配列番号 763	配列番号 683 の nt. 171647-166263 (コンティグ 16)	P45384
多剤耐性膜トランスロカーゼ	配列番号 764	配列番号 765	配列番号 683 の nt. 74524-72992 (コンティグ 16)	NP_311575.1
YhbX/YhjW/YijP/YjdBファミリータンパク質	配列番号 766	配列番号 767	配列番号 683 の nt. 61734-63200 (コンティグ 16)	NP_275002.1
推定膜タンパク質	配列番号 768	配列番号 769	配列番号 685 の nt. 906601-908094 (コンティグ 18)	NP_458664.1
推定膜タンパク質	配列番号 770	配列番号 771	配列番号 683 の nt. 16185-17942 (コンティグ)	NP_404859.1

10

20

(実施例 3)

(NTHi プロモータートラップライブラリーの構築)

NTHi の潜在的なビルレンス決定因子を同定するために、細菌遺伝子発現を、NTHi 誘導中耳炎 (OM) のチンチラモデルの 1 つの特定の解剖学的くぼみ (niche) における初期疾患の進行の間の微分蛍光誘導 (DFI) によって、モニターした。NTHi 菌株 86-028NP 由来のゲノム DNA フラグメントを、プロモータートラップライブラリーを使用して、プロモーターレス *gfpmut3* 遺伝子上流にクローニングした。プラスミド *pGZRS39A* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* から単離した *pGZES-1* の誘導體) は、*A. pleuropneumoniae* - *Escherichia coli* シャトルベクターである。このプラスミドは、*A. pleuropneumoniae* 由来の複製起点、*pUC19* 由来の *lacZ* 遺伝子および *Tn903* 由来のカナマイシン耐性遺伝子を含む (Westら、Genes, 160: 81-86, 1995)。

30

40

【0091】

プロモータートラップベクターを、GTP 変異 *gfpmut3* 遺伝子を、EcoRI フラグメントに対する BamHI として、*pGZRS-39A* 内にクローニングして *pRSM2167* を形成することによって構築した。この変異 GTP 遺伝子は、2 つのアミノ酸変化 (S65G および S72A) を含み、これは、488nm で励起される場合、蛍光発光を増強する。この変異体はまた、高い溶解性および発色団形成の速い動力学を有する (Cormackら、Gene, 173: 33-38, 1996)。このプラスミドは、NTHi 菌株 86-028NP 内へのエレクトロポレーションによって形質転換され、親のプラスミド菌株 86-028NP / *pRSM2167* を生成する。

【0092】

50

ランダムゲノムDNAフラグメント(実施例1に記載される)を、puroモータープロ-
ベクター内への連結のために調製した。ゲノムDNAを、製造業者のプロトコルに従
って、Puregene DNA単離キット(Gentra Systems, Minne-
apolis, MN)を使用して、菌株86-028NPから単離した。制限障壁に起因
して、プラスミドDNAを単離し、これをライブラリー作製のために使用することが必要
であった。この単離されたDNAを37で1時間、Sau3AI(NEB, Bever-
ly, MA; 0.25単位/ μ g DNA)を用いて部分的に消化し、ゲル電気泳動によ
って分離し、そしてDNAフラグメント(0.5~1.5kbのサイズ)を、Qiagen
ゲル抽出キットを使用して、回収した。ベクター調製のために、pRSM2167を、
製造業者のプロトコルに従って、Wizard Plus Maxiprep DNA精
製システム(Promega, Madison WI)を使用して、一晩の培養物から単
離した。

【0093】

プラスミドDNAを、BamHI消化によって線形化し、そして5'リン酸基を、ウシ
腸アルカリホスファターゼ(CIAP; GibcoBRL Life Technolo-
gies)を用いる処置によって除去した。ゲノムDNAフラグメントを、線形化されホ
スファターゼで処理されたベクターを用いて連結し、そして改変プロトコルに従ってエレ
クトロポレーションのための調製したコンピテントNTHi菌株86-028NP内エレ
クトロプレートした(Mitchellら、Nucleic Acids Res., 1
9:3625-3628, 1991)。プラスミドDNAをNTHi菌株86-028N
P内にエレクトロポレーションで戻した場合、形質転換効率は、千倍改善した。簡単に述
べると、細胞を、sBHI(脳心臓注入物)プロスにおいて37、220rpmで、O
D₆₀₀ = 0.3まで増殖させた。細胞を、30分間、氷において冷やし、引き続いて、
4で、等量の0.5xSG(1xSG:15%グリセロール、272mMスクロース)
を用いて洗浄した。洗浄を合計3回繰り返した。引き続いて、細胞を、1xSG中で、1
00x濃縮用量に希釈した。細胞を、200オーム、2.5kVおよび25 μ Fで、Bi-
oRad Gene Pulser IIセットを使用して、エレクトロポレーションし
、次いで、1mlの予め温めたsBHI中に希釈し、37、5%CO₂で2時間インキ
ュベートし、そして形質転換体の一晩の増殖のためにチョコレート寒天にプレートした。

【0094】

形質転換体を選択し、20%グリセロール(容積/容積)を含む脱脂乳中、1000ク
ローンのプール中に凍結させた。68,000メンバーのgfpプロモータープロブラ
イブラリーを作製した。ClarkeおよびCarbon(Cell, 9:91-99,
1976)の確率計算を使用して、菌株86-028NP DNAの300bpフラグメ
ントのライブラリー(1.8x10⁶ bp/ゲノム)に表される所定のDNA配列の99
%確率を達成するために、27,629クローンのライブラリーを必要とした。従って、
本発明のライブラリーは、86-028NPゲノムの2.5倍の適用範囲を表す。

【0095】

ライブラリーの質を評価するために、50クローンをランダムに選択し、チョコレート
寒天で一晩増殖させ、そしてプラスミドを単離し、そして挿入DNAを配列決定した。選
択されたクローンの大部分(64%)は、200bpと500bpとの間の範囲挿入サイ
ズを有したが、32%は、500bpを超えた。挿入物の大部分は、独特のH.infl
uenzae菌株Rdオープンリーディングフレーム(ORF)と相同性を示し、そして
15クローンが、菌株86-028NP DNAに対して独特の配列を有した。菌株Rd
に対して相同性を有するこれらのクローンのうち、60%が、正しい方向であり、その3
6%が、ORFの上流に配列を含んだ。クローンの大部分が500bp未満の挿入サイ
ズを有したが、小さな挿入サイズと増加したGFP発現との間に相関は見出されなかつた。
実際、4つのクローンは、インピトロにおいて、わずかから中程度の蛍光を示し、これら
の3つが、200塩基対~500塩基対の間の挿入サイズを有し、1つが、700塩基対
よりも長い挿入物を有した。

10

20

30

40

50

【0096】

ライブラリーの画分(約1000クローン)を、チョコレート寒天で増殖させ、PBS中で収集し、GFP蛍光についてフローサイトメトリーによって分析した。挿入DNAの無いプロモータートラップベクターを含む菌株86-028NP/pRSM2169と比較して、ライブラリークローンのプールは、増加した蛍光強度を示す。従って、ライブラリーは、種々のレベルの活性でプロモーターを有するクローンを含む。

【0097】

(実施例4)

(GFPを発現する86-028NP誘導体の分析)

gfp発現細菌を同定および分類するために必要なFACSプロモーターを確立するために、種々のレベルのgfp発現を示すパネル単離物を利用した。バックグラウンド蛍光を、菌株86-028NP/pRSM2169(ネガティブコントロール)を使用して評価し、従って、任意の観察された蛍光は、lacZプロモーター駆動gfp発現に起因している。しかし、この菌株は、検出可能なレベルのGFPを生成せず、実際、親の菌株86-028NPと比較した場合、増加した蛍光を示さない。高レベルのgfp発現単離物を、外膜タンパク質P2発現に対する強力なプロモーターを含む500bpフラグメントを、Sai-BamHI消化pRSM2167にクローニングすることによって作製した。このプラスミドを、エレクトロポレーションによって86-028NP内に形質転換し、高レベルのgfp発現菌株86-028NP/pRSM2211(高い蛍光コントロール)を生成する。この菌株は、菌株86-028NP/pRSM2169と比較して、GFP蛍光において約100倍増加を示した。中程度の蛍光誘導体クローン、86-028NP/pKMM4B5(中程度の蛍光コントロール)を、FACS分析によって単離し、そして予備的実験および細胞選別のためのコントロールとして使用した。インビトロでgfp発現を駆動するプロモーターを含むDNAフラグメントは、他の生物のDNAに対して公知の相同を有さない、菌株86-028NPに対して独特である。このクローンは、菌株86-028NP/pRSM2169と比較して、蛍光において約10倍の増加を示す。

【0098】

コントロール菌株をチョコレート寒天上での増殖物から再懸濁させ、4で30分間、交差反応性Phycoprobe R-PE抗ヒトIgG(H+L)抗体(100µl PBS中、10µg/ml; Biomedica Corp)を用いて標識した。未結合の抗体を除去するための3回の連続洗浄に続いて、細菌をFACS分析のために、300µl DPBS中で再懸濁させた。これらのコントロール調製物を使用して、488nmを発するアルゴンレーザーを備えるCoulter Epics Eliteフローサイトメーター(Coulter Corp.)を使用して、適切なサイズおよび蛍光ゲートを設定した。細菌を、ログフォワードアングル(log forward angle)および側方散乱検出に基づくサイズ、ならびに細菌のFITC/PE標識による選別のためにゲート(gate)した。選別された細胞を、冷却したsBHI中に収集し、そしてチョコレート寒天上にプレートした。一晚の増殖後、細胞を、第2回の感染のために収集するか、または個々に選択し、一晚増殖させ、インビトロで増殖する場合、蛍光について個々のクローンによってスクリーニングし、そしてプラスミド単離の前に、20%(容積/容積)グリセロールを含む脱脂乳中で凍結させ、そして挿入物DNAを配列決定した。コントロール菌株の選別効率を、Coulter EPICSフローサイトメーター(Coulter Corp.)を使用して確認した。

【0099】

多くのプラスミドを、抗生物質選択の非存在下でインビトロで迅速に分離した。従って、本明細書中で使用されるプロモータートラップベクターがこの事象の傾向があるか否かを評価するために、菌株86-028NP/pRSM2211(高い蛍光コントロール)の単一のクローンを、チョコレート寒天上で単離し、抗生物質選択の非存在下で20回継代させた。抗生物質の存在下で増殖された細菌と比較した場合、蛍光強度の有意な減少は

、観察されなかった。さらに、プラスミドをインビボでの抗生物質選択の非存在下で維持する。チンチラから収集された細菌含有中耳分泌液を、カナマイシン無しまたは有りでチョコレート寒天上にプレートした場合、類似の細菌カウントが観察された。これらのデータは、プロモーターラップベクターが抗生物質選択の非存在下で安定に維持されたことを実証する。

【0100】

プラスミドの安定性に問題に加えて、宿主-病原体相互作用を研究するためのレポーターとしてのGFPの使用についての初期の研究は、GFPが、細菌細胞-表面動力学に対して最小の効果を有する低い毒性で、細胞質タンパク質として連続的に合成され得ることを実証した(Chalfieら、Science, 263: 802-805, 1994)。高いレベルのgfp発現誘導体の構築は、NTHiに対するGFP毒性の評価を可能にした。野生型菌株(86-028NP)および高いGFP産生菌株86-028NP/pRSM2211の両方の増殖曲線を、類似の条件下で増殖した場合と比較した。増殖速度は類似し、GFP発現が細胞に対して毒性でないことを示す。

10

【0101】

86-028NP gfp発現誘導体を使用して、効率的な細胞選別についてのパラメーターを規定した。菌株86-028NP/pRSM2169を、中程度gfp発現誘導体、菌株86-028NP/pKMM4B5と、100:1の比で混合し、細菌集団の合計に対して小さな割合のgfp発現クローンを含むことが予想されるインビボ環境をシミュレートした。この混合物をFACS分析に供し、1.8%最大蛍光集団および52%最小蛍光集団を収集する。選別された集団のフローサイトメトリー分析は、細菌集団の65%まで、菌株86-028NP/pKMM4B5の富化を示し、これは、ネガティブ集団での選別の場合に観察されない減少である。引き続く回の選別は、この中程度蛍光集団をさらに富化させることを期待される。ネガティブ選別において蛍光細菌の量を減少させることができないことは、ネガティブ選別についてのゲート設定のサイズに起因した。GFP-ネガティブ細胞を、10%の最小蛍光集団でゲーティングすることによって富化した。

20

【0102】

(実施例5)

(中耳分泌液からの細菌の直接的標識)

類似の戦略(実施例5に記載されるとおり)を、AOMの間にチンチラの中耳から得られた浸出液から蛍光クローンを選別するために適用した。インビボの微分蛍光誘導(DFI)を使用する本発明者らの能力は、非蛍光細菌、蛍光および非経口細胞細片、ならびに真核生物細胞からgfp発現細菌を選別する本発明者らの能力に依存した。

30

【0103】

耳鏡検査法またはティンパノメトリーのいずれによっても中耳感染の証拠のない健常な成体チンチラ(Chinchilla lanigera)を使用して、インビボのプロモーター活性についてライブラリーをスクリーニングした。NTHi/pRSM2169ライブラリーの2つのプール(それぞれ1000クローン)を、カナマイシンを含むチョコレート寒天上で一晩増殖させた。このライブラリーを組合せ、冷却10mM滅菌PBS中に 3.3×10^6 CFU/mlまで希釈し、300 μ l(1.0×10^6 CFU; 500 CFU/クローン)を使用して、左および右のチンチラトランスブラーキャビティー(transbullar cavity)を播種した(2000クローン/耳)。OM発生(development)を、24時間および48時間で、ビデオ耳鏡検査法およびティンパノメトリーによってモニターした。細菌を中耳腔において増殖させ、予想されるように、48時間で、接種材料用量の500倍の濃度に達した(Bakalietzら、Infect. Immunity 67: 2746-62, 1999)。宿主環境に対するこの細菌の適応は、炎症応答を生じ、これは、紅斑、脈管拡大および鼓膜の隆起、多形核球細胞(PMS)の浸潤、ならびに回収される浸出液の耳鏡検査および顕微鏡検査によって観察されるような中耳腔の分泌液の蓄積によって示される。24時間後および48時間後

40

50

、中耳分泌液を上鼓室タップによって回収し、そしてFACSのために調製した。

【0104】

この分析が中耳分泌液中で回収可能な細菌に制限されたことに注意することが重要である。いくつかの場合において、FACS分析のために細菌を収集するために、中耳腔を洗浄することが重要であった。従って、この分析は、NTHiが粘膜にゆるく付着する場合、アップレギュレートされる遺伝子を含む。NTHiは、OMのチンチラモデルにおいて中耳腔内に生物膜を形成することが観察された(Erhlichら、JAMA, 287; 1710-5, 2002)。本明細書中に記載されるプロトコルがプランクトンの集団から回収されるクローンを選択するので、細菌が粘膜生体膜と関連する場合、遺伝子がアップレギュレートされるクローンを回収することは予期されない。しかし、中耳粘膜の均質化および引き続く細菌細胞の単離によって、本発明者らは、これらのクローンを回収し得る。いくつかのGFP発現クローンがこの浸出液において回収されたが、剥離した細胞として浸出液中にまたは凝集物中に存在する真核生物細胞に付着したこともあり得る。これらの細菌は、選別効率を損なうことなく浸出液から回収することは困難である。従って、中耳分泌液を粘液溶解剤を用いて処理し、次いで、遠心分離して、標識化する前に、大きな凝集物および真核生物細胞を除去した。

10

【0105】

必要な場合に、チンチラの中耳の分泌液を、滅菌した生理食塩水を用いて250 μ lまで希釈した。等量のDPBS中のN-アセチル-L-システイン(0.5%; w/v)(pH 7.4)を、粘液溶解剤として室温で5分間添加した(MiyamotoおよびBakalatz, Microb. Pathog., 21:343~356 1996)。分泌液を、細胞の残屑、赤血球、および炎症性細胞を除去するために遠心分離し(300 \times g、5分間)、そして細菌を含有する上清を、新しいチューブへ移した。細菌を、NTHi菌株86-028NPに由来する、全OMP調製物に対して指向されるチンチラ抗血清(1:50希釈)と共に、4 \times で45分間インキュベートし、遠心分離(2000 \times g、5分間)によってペレット化し、そして0.05%ウシ血清アルブミンを含有する冷DPBSを用いて2回洗浄した。続いて、細菌を、交差反応性フィコプローブ(phyco probe) R-PE抗ヒトIgG(H+L)抗体(100 μ l DPBS中10 μ g/ml; Biomed Corp)を用いて、4 \times で30分間標識した。非結合の抗体を除去するために連続して3回洗浄し、続いて、細胞を、FACS分析のために300 μ l DPBSに再懸濁した。

20

30

【0106】

(実施例6)

(急性中耳炎におけるインビボで誘導したプロモーターの同定)

プロモーターライブラリーを用いて形質転換したH. influenzae 86-028NPを、チョコレート寒天で一晩増殖させた。インビトロでgfpを発現したプロモーターを含有するこれらクローンを選択するために、上記ライブラリーを、1回のFACS分析に供し(実施例6に記載するように)、低レベル量のGFPを発現しているこれらのクローンのみを回収した。これらのクローンを、プールして、チンチラの中耳の骨髄を経由して(transbulbarly)接種するために用いた。注射の24時間および48時間の後、細菌含有滲出液を、鼓室または鼓膜の上部の穿刺によって除去した。細菌をR-PE標識化抗体を用いて間接的に標識し、蛍光タグ化された細菌のゲーティングによるが、発現もしている細菌について選別することによってFACS分析に供した。これらのクローンを、さらに富化するために動物を再感染させるために用いた。最終回の選別の後、単一のコロニー単離体を、蛍光の欠如についてインビトロでスクリーニングした。

40

【0107】

インビトロで蛍光を発していなかった、FACS分析によって単離したこれらのクローン(インビボでGFP蛍光について陽性)を、プラスミド単離および挿入したDNA配列の同定のために調製した。これらのクローンを、カナマイシンを含有するチョコレート寒

50

天プレートで一晩増殖させ、製造者のプロトコルに従って Qiaprep Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミド単離のために調製した。プラスミド挿入 DNA を、gfpmut3 遺伝子に相補的であり、かつ挿入 DNA の下流であるプライマー 5' - TGCCCATTAACATCACCATCTA - 3' (配列番号 588) を用いて配列決定した。配列決定反応を、製造者のプロトコルに従って、ABI Prism BigDye (登録商標) ターミネーター・サイクル・シーケンシング・レディー・リアクション・キット (Applied Biosystems) を使用して、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて実施した。この配列を次いで、96 ウェル・マルチスクリーン HV プレート (Millipore) 中のセファデックス G-50 を通過させることによって精製し、続いて ABI Prism 3100 DNA アナライザー (Applied Biosystems) で分析した。 10

【0108】

挿入配列を、H. influenzae 菌株 Rd の注釈をつけた全配列と比較した。菌株 Rd とヌクレオチド相同性を有さないこれらの挿入物を続いて、BLASTN および BLASTX アルゴリズムを用いて分析した。さらに配列分析を、DNASTAR (Madison, Wisc) を用いて実施した。正しい向きでかつ推定 ORF の 5' 側配列を含む挿入物は、NTHi 細菌が、チンチラの中耳に存在する場合、優先的に活性化した推定プロモーターを含有した。

【0109】

インビボで調節される推定プロモーターを有する 52 個のクローンを、単離した。H. influenzae 菌株 Rd に同定された配列と類似する配列を含む 44 個の候補クローンの、インビトロおよびインビボでの遺伝子発現の定量的な比較によって、NTHi が、チンチラの中耳内に存在する周囲のきっかけに応答する場合、26 個の遺伝子 (60%) がアップレギュレートした遺伝子発現があることを確認した。これらの遺伝子を以下の表 4A に要約した。遺伝子発現を駆動するインビボ調節プロモーターは、膜輸送、周囲の情報のプロセッシング、細胞の代謝、遺伝子調節、および未知の機能を有する仮想タンパク質に関係していると予測される。 20

【0110】

インビボで推定プロモーター候補の誘導を確認するために、NTHi 菌株 86-028 NP が、インビトロで中間対数期まで、またはインビボで 48 時間増殖させた場合に、メッセンジャー RNA 発現の相対量を、比較した。この RNA を、製造者のプロトコルに従って、TRIzol LS 試薬 (Gibco Life Technologies) を用いて単離した。DNA を、製造者のプロトコルに従って、DNA フリー・キット (Ambion) を用いて RNA 調製物から除去した。DNase I 処理した RNA サンプルを、Qiagen RNeasy カラムを通過させることによって精製した。RNA の純度および完全性を、260/280 nm 分光光度計読み取りおよび Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) によってそれぞれ、調べた。 30

【0111】

FACS データを独立に確認するために、本発明者らは、定量的 RT-PCR によって候補遺伝子の相対的な発現を決定した。親株 86-028 NP を、これらの研究に用いた。製造者の説明書に従って、ワン・ステップ QuantiTect SYBR Green RT-PCR キット (Qiagen) を用いるリアル・タイム定量的 RT-PCR によって、転写レベルを調べた。簡単に言えば、FACS 分析によって同定した推定上のインビボで誘導されるプロモーターのオープン・リーディング・フレームの下流に作製したプライマーを用いて、遺伝子特異的 mRNA を、ABI Prism 7700 シーケンシング・ディテクション・システム (Applied Biosystems) での RT-PCR によって、逆転写し、増幅した。産物の量を、ジャイレース (gyr) 遺伝子のフラグメントを増幅することによって、既知量の細菌のゲノム DNA ($10^2 \sim 10^7$ 個のゲ 40 50

ノムコピーDNA)について作製した検量線を用いて計算した。RNA調製物(-RTコントロール)中にDNAが存在しないことおよび鋳型RNAのないコントロールサンプル中にプライマーダイマーが無いことを確認するために、コントロールを、同時に分析した。さらに、RT-PCR産物を、ゲル電気泳動によって分析した。全ての場合において、単一の産物を、適切な塩基対サイズで観察した。サンプル間の細菌RNAの量を、インビトロで本発明者らが試験した種々の増殖条件の下、構成的に発現することを示す、gyr発現に対して標準化した。既知量の細菌ゲノムDNA($10^2 \sim 10^7$ 個のゲノムコピーDNA)を用いて、ジャイレース(gyr)遺伝子のフラグメントを増幅することによるRT-PCR定量のための標準曲線を作製した。ジャイレースは、種々の増殖条件の下インビトロで構成的に発現し、そのためサンプル間の全細菌RNAレベルの標準化のために用いた。インビボでの相対的な遺伝子発現を、インビトロでの遺伝子発現と比較し、倍率増加(fold-increase)データを、表4に要約する。

10

【0112】

NTHiゲノムの8倍の配列決定は、表4Aに列挙した大部分の遺伝子についての全長オープン・リーディング・フレームを同定した。表4Bは、NTHiゲノムおよび対応するアミノ酸配列内の全長ヌクレオチド配列を提供する。遺伝子の誘導倍率は、チンチラの中耳内に存在する周囲のきっかけに起因し、遺伝子の産物または機能を、便宜のために表4Bに繰り返す。

【0113】

【表 4 A】

表 4 A

カテゴリ	遺伝子 または ORF	配列番号	GenBank タンパク質ID	倍率誘導	産物または機能
アミノ酸代謝	<i>hisB</i>	589	NP_438632	2.9	ヒスチジン生合成 二機能性タンパク質
リポタンパク質	<i>lppB</i>	590	NP_438862.1	2.6	リポタンパク質Bホモログ
膜輸送	<i>sapA</i>	591	NP_439780.1	2.8	ペプチドABC輸送体； ペリプラスム <i>S p a A</i> 前駆体
	<i>lolA</i>	592	NP_439736.1	2.4	外膜リポタンパク質 キャリアタンパク質前駆体
	<i>rbsC</i>	593	NP_438661.1	5.1	リボース輸送系 パーミラーゼタンパク質
プリン合成	<i>purE</i>	594	NP_439757.1	51.7	ホスホリボシルアミノイミダゾール カルボキシラーゼ触媒サブユニット ； <i>P u r E</i>
合成および代謝機能	<i>ribB</i>	595	NP_438923.1	8.3	3, 4-ジヒドロキシ-2-ブタノ ン4-ホスフェートシンターゼ；リ ボフラビン合成
	<i>arcB</i>	596	NP_438753.1	10	オルニチン カルバモイルトランスフェラ ーゼ； アルギニン分解
	<i>uxuA</i>	597	NP_438228.1	3.1	マンノネートデヒドラターゼ； グリセルアルデヒド3-リン酸の産生
	<i>dsbB</i>	598	NP_438589.1	2.6	ジスルフィドオキシドレダクターゼ； ジスルフィド結合形成プロテインB
	<i>ureH</i>	599	NP_438693.1	3.9	ウレアーゼ副タンパク質
	<i>licC</i>	600	NP_439688.1	2.3	ホスホコリン (<i>C h o P</i>) シチジルトランスフェラーゼ
	HI1647	601	NP_439789.1	2.0	推定ピリドキシン生合成タンパク質； 一重項酸素抵抗性タンパク質
DNA複製、 修復	<i>ispZ</i>	602	P43810	2.5	可能性のある細胞内隔壁タン パク質
	<i>radC</i>	603	NP_439113.1	2.1	DNA修復タンパク質
	<i>mukF</i>	604	P45185	2.0	<i>M u k F</i> タンパク質ホモログ； ヌクレオチド構造のリモデリン グ
遺伝子調節	<i>glpR</i>	605	NP_438777.1, NP_439170.1	2.8	グリセロール-3-ホスフェート レギュロンレプレッサ
	<i>ihfB</i>	606	P43724	2.5	統合型宿主因子βサブユニット
	<i>argR</i>	607	NP_439365.1	2.7	アルギニンレプレッサ
	<i>cspD</i>	608	NP_439584.1	2.1	冷ショック様タンパク質； ストレス応答性タンパク質
仮想タンパク質または 未知のタンパク質	HI0094	609	NP_438267.1	8.3	仮想タンパク質
	HI1163	610	NP_439321.1	2.3	保存された仮定的タンパク質； 推定オキシターゼ
	HI1063	611	NP_439221.1	2.7	仮想タンパク質
	HI0665	612	NP_438824.1	2.8	仮想タンパク質
	HI1292	613	NP_439444.1	2.6	仮想タンパク質
HI1064	614	NP_439222.1	2.6	仮想タンパク質	

10

20

30

40

【 0 1 1 4 】

【表 4 B - 1】

表 4 B

カテゴリ	遺伝子 または ORF	全長 ヌクレオチド 配列	アミノ酸配列	コンティグの 位置	倍率誘導	産物または機能
アミノ酸 代謝	<i>hisB</i>	配列番号 615	配列番号 616	配列番号 680 (コンティグ13) の nt. 68378-67290	2.9	ヒステジン 生成 二機能性タンパク質
膜 輸 送	<i>sapA</i>	配列番号 617	配列番号 618	配列番号 685 (コンティグ18) の nt. 200403-198709	2.8	ペプチドABC 輸送体; 血漿膜 S p a A 前駆体
	<i>rbsC</i>	配列番号 619	配列番号 620	配列番号 680 (コンティグ13) の nt. 42773-41802	5.1	リボース輸送系 パーミアーゼ タンパク質
プリン合成	<i>purE</i>	配列番号 621	配列番号 622	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 219625- 219131	51.7	ホスホリボシルアミノ イミダゾールカルボキ シラーゼ触媒サブユニ ット; P u r E
生合成 および 代謝機能	<i>ribB</i>	配列番号 623	配列番号 624	配列番号682 (コンティグ15) の nt. 131537- 132184	8.3	3, 4-ジヒドロキシ -2-フタノン4-ホ スフェートシターゼ ; リボフラビン生合成
	<i>arcB</i>	配列番号 625	配列番号 626	配列番号D 681(コンティグ14) nt. 49710-48706	10	オルニチンカルバモイ ルトランスフェラーゼ ; アルギニン分解
	<i>uxuA</i>	配列番号 627	配列番号 628	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 840671- 841855	3.1	マンノネートデヒドラ ターゼ; グリセルアル デヒド3-リン酸の産生
	<i>dsbB</i>	配列番号 629	配列番号 630	配列番号384 (コンティグ17) nt. 388050- 388583	2.6	ジスルフィドオキシドレ ダクターゼ; ジスルフィ ド結合形成プロテインB
	<i>ureH</i>	配列番号 631	配列番号 632	配列番号 680 (コンティグ13) の nt. 4452-5267	3.9	ウレアーゼ 副タンパク質
	<i>licC</i>	配列番号 633	配列番号 634	配列番号385 (コンティグ18)の nt. 355083- 354382	2.3	ホスホコリン (Ch o P) シチジルトランスフ ェラーゼ
	HI1647	配列番号 635	配列番号 636	配列番号685 (コンティグ18) nt. 664017- 664892	2.0	推定ピリドキシン生合 成タンパク質; 一重項 酸素抵抗性タンパク質
DNA複製 、修復	<i>ispZ</i>	配列番号 637	配列番号 638	配列番号 683 (コンティグ16) nt. 4512-5069	2.5	可能性のある細胞内隔 壁タンパク質
	<i>radC</i>	配列番号 639	配列番号 640	配列番号683 (コンティグ16) の nt. 132695-132030	2.1	DNA修復タンパク質

10

20

30

40

【 0 1 1 5 】

【表 4 B - 2】

	<i>mukF</i>	配列番号 641	配列番号 642	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 504549-503215	2.0	MukFタンパク質ホモ ログ;ヌクレオチド構造 のリモデリング
遺伝子調節	<i>glpR</i>	配列番号 643	配列番号 644	配列番号 682(コンティグ15) nt. 72716-73483	2.8	グリセロール-3-ホス フェートレギュロンレプ レッサ
	<i>ihfB</i>	配列番号 645	配列番号 646	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 661004- 660720	2.5	統合型宿主因子 βサブユニット
	<i>argR</i>	配列番号 647	配列番号 648	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 178540- 178085	2.7	アルギニンレプレッサ
	<i>cspD</i>	配列番号 649	配列番号 650	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 435310- 435528	2.1	冷ショック様タンパク質 ; ストレス応答性タンパ ク質
仮想 タンパク質 または 未知の タンパク質	HI1163	配列番号 651	配列番号 652	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 137202-134119	2.3	保存された仮定的タン パク質; 推定オキシダ ーゼ
	HI1063	配列番号 653	配列番号 654	配列番号 685(コンティグ18) のnt. 35158-34937	2.7	仮想タンパク質
	HI0665	配列番号 655	配列番号 656	配列番号679 (コンティグ12) の nt. 17949-18980	2.8	仮想タンパク質
	HI1292	配列番号 657	配列番号 658	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 555002-555799	2.6	仮想タンパク質

10

20

(実施例7)

(ビルレンス関連遺伝子の同定)

多くの細菌種において、ビルレンス関連遺伝子のサブセットは、短いリピートの複製に
おける誤りによって調節される。これらのリピートは、遺伝子の5'またはコード配列内
であり得、これらの存在は、ビルレンスと関連することを示す遺伝子の制御発現の指標で
ある。リピートの付加または欠失は、特定のビルレンス決定因子の発現または発現を欠く
結果を生じる。

30

【0116】

NTHi H. influenzae 菌株86-028NPコンティグセットは、短い
オリゴヌクレオチド・リピートについて問い合わせた。このリピート周辺の領域を、この
リピートに関連する遺伝子を同定するために分析した。表5に、同定したリピートおよび
各リピートに関連するORF(BLASTによって同定した)を列挙する。

【0117】

さらに配列分析によって、ビルレンス関連遺伝子の全長ヌクレオチド配列およびORF
によってコードされる対応するアミノ酸配列を同定した。誘導したアミノ酸配列は、列挙
したGenbank配列と高い相同性である

40

【0118】

【表 5 - 1】

表 5

レポート	3倍の コンティグ の位置	8倍の コンティグ の位置	全長 ヌクレオチド 配列	アミノ酸配列	Genebank 受け入れ番号
配列番号 581	115 配列番号 115 の nt. 473-540	配列番号685 (コンティグ18) の nt. 484533- 483643	配列番号 659	配列番号 660	NP_439538.1
配列番号 582	377 配列番号 337 の nt. 546-597	配列番号 685 (コンティグ18) の nt. 416274- 414910	配列番号 661	配列番号 662	P45217
配列番号 583	505 配列番号 505 の nt. 310-393	配列番号 684 (コンティグ17) の nt. 414500- 416614	配列番号 663	配列番号 664	AAK76425
配列番号 584	508 配列番号 508 の nt. 2079- 2120	配列番号 685 (コンティグ18) の nt. 506516- 507913	配列番号 665	配列番号 666	NP_439520
配列番号 585	518 配列番号 518 の nt. 758-789	配列番号 684 (コンティグ18) の nt. 354274- 352406	配列番号 667	配列番号 668	NP_284893
配列番号 586	543 配列番号 543 の nt. 1814- 196	配列番号 685 (コンティグ18) の nt. 347864- 243236	配列番号 669	配列番号 670	AAA20524

10

20

30

40

【 0 1 1 9 】

【表 5 - 2】

リポート	3倍の コンティグ の位置	8倍の コンティグ の位置	全長 ヌクレオチド 配列	アミノ酸配列	Genebank 受け入れ 番号
配列番号 586	543 配列番号 543 の nt. 1814- 196	配列番号 685 (コンティグ18) の nt. 699709- 704187	配列番号 671	配列番号 672	AAD56660
配列番号 587	567 配列番号 567 の nt. 13309- 13320	配列番号 681 (コンティグ14) の nt. 85546- 84689	配列番号 673	配列番号 674	ZP_00053190

10

(実施例 8)

(独特の N T H i 遺伝子配列の同定)

N T H i 毒性に関連する遺伝子をまた、N T H i 細菌属が、組織に感染している場合の遺伝子発現レベルと N T H i を、人工的な検査室培地で増殖させた場合の同一遺伝子発現レベルとを比較することによって同定した。これらの新規遺伝子を、実施例 4 ~ 6 の上記プロモーター・トラップ技術を用いて同定し、続いて公知の R d ゲノムとの比較によってこれらの遺伝子が N T H i 菌株 8 6 - 0 2 8 N P に特有であることを示した。

20

【 0 1 2 0 】

このスクリーニング方法を用いて同定した D N A 配列を、配列番号 5 7 7 ~ 5 8 0 とし示す。これらの配列は、H . i n f l u e n z a e R d . ゲノム配列と相同性を有する遺伝子または遺伝子フラグメントを含まなかった。これらは、完全に新規配列であるが、チンチラの中耳における N T H i 感染の間の遺伝子の発現レベルに起因して、これら遺伝子の発現は、N T H i 毒性に関係する可能性がある。

【 図面の簡単な説明 】

30

【 0 1 2 1 】

【 図 1 】 図 1 は、H a e m o p h i l u s 単離物のパネルにおける L K P 遺伝子領域を示す。8 6 - 0 2 8 N P 株の配列は、この領域において、N T H i R 3 0 0 1 株における配列と同一である。これらの N T H i の両方は、血球凝集性線毛をコードする h i f 遺伝子クラスターを欠損している。

【 図 2 】 図 2 は、H a e m o p h i l u s 単離物のパネルにおける r f a D 領域を示す。8 6 - 0 2 8 N P 株のゲノムの r f a D 領域における遺伝子の配置は、R d 株のゲノムの配置と類似するが、検査したほとんどの N T H i のゲノムにおいて見られるこれらの遺伝子の配置とは異なる。

【 図 3 A 】 図 3 A ~ 図 3 M は、表 4 に示されるヌクレオチド配列 (配列番号 5 8 9 ~ 6 1 4) を提示する。これらは、O M 感染の間にアップレギュレートされたと同定された (実施例 6 を参照のこと) 。配列番号 1 ~ 5 7 6 として提示される、既知の遺伝子に対応するヌクレオチド (n t .) およびコンティグ配列に対応するヌクレオチド (n t .) もまた、示される。

40

【 図 3 B 】 図 3 A ~ 図 3 M は、表 4 に示されるヌクレオチド配列 (配列番号 5 8 9 ~ 6 1 4) を提示する。これらは、O M 感染の間にアップレギュレートされたと同定された (実施例 6 を参照のこと) 。配列番号 1 ~ 5 7 6 として提示される、既知の遺伝子に対応するヌクレオチド (n t .) およびコンティグ配列に対応するヌクレオチド (n t .) もまた、示される。

【 図 3 C 】 図 3 A ~ 図 3 M は、表 4 に示されるヌクレオチド配列 (配列番号 5 8 9 ~ 6 1

50

4) を提示する。これらは、O M 感染の間にアップレギュレートされたと同定された（実施例 6 を参照のこと）。配列番号 1 ~ 5 7 6 として提示される、既知の遺伝子に対応するヌクレオチド (n t .) およびコンティグ配列に対応するヌクレオチド (n t .) もまた、示される。

【 図 1 】

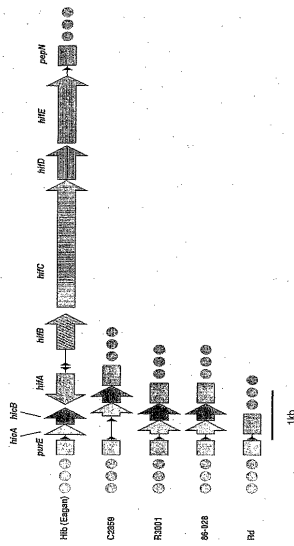


Figure 1

【 図 2 】

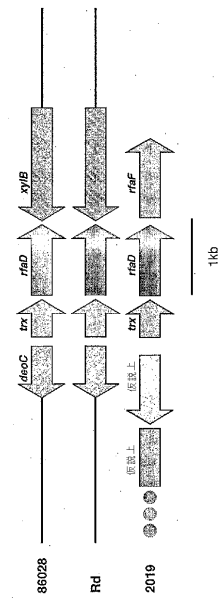


Figure 2

【 図 3 A 】

Figure 3A

配列番号 589

TTNAACAAGANATTGGGCAAACTCCAGTGAAAAGTTCCTCCTTACTCA
TATGTATATCTCCTCTTAAATCTAGAGGATCAAGCAACTTAAITTTGGT
TTGCGACATAGACAAATTTCTCGGGCTTATGCGGGCAATAGACTTCTCA
TCAAAGGTAATGCGCTGAGATTCAAATAATGCCATCATTACATTTGGGG
CTTATCAAAAATTTGTTGCGGAAAAGCATCCGTAACCAAGCCATCTTGATT
AGAAACTATCACAAAACGGTATTTTCGCTTTCAGTCTGAGGAGTGGGGAA
TCACITTCGGTCTAAATTTAGTTTCTTAAACTGTCATTTGGAAATCAGT
TTTTGGTTCATCAATTAATGTGCGCTCGCGTGCATAAAAAGAGTAGGTTG
CATAITTTCTCCGTGTATGTTATGAATGGTATGAGGTTTATCATTGCT
TTATACAAACAGTATAAACTAAATAATCTCGAATCGCTCTGTGACTTAA
ATAGGAGGTGGTTCATTTTACCTCTTAAATGCTTCAACAACCTTCTCACA
CTCATCTTGTGCCACAGTAATGGCAATCAATTTGT

配列番号 589 の nt 80-410 は、hisB 遺伝子の nt 1-331 の相補体に相当する
配列番号 589 の nt 80-600 は、コンテイング 532 (配列番号 532) の nt 4655-5175 に相当する

TAAACAAGAACTGGGCAAAAGNCCAGTAAAAGTTCCTCCTTACTCA
TATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCAGCATCACATCGGGCGGAA
TAGGAAAAAATATGCGCTCGATAAAAACCTTACAAAAGAGAGCCAAAAAAC
AGCAAAACGATGTTTGGACATTCATCGTTTATCGTACATCGTGCCGAA
AATTTTCATATTTTCTCTAATTTGGTAAATTTCTGCTTAAACCAATTTTGA
AAGAAAGCAATGAATGATATGCGGTAAAGTCTCTAGAGTGCAGCTGCAG
GCATCAAGCTTGGCGTAAATCATGGTCTATAGCTGTTTCTGTGTGAAAATTG
TTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAA
AAGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTCACATTAATTTGGCTTGGCG
TCACTGGCCGCTTCCAGTGGGAAAACCTGCTGCGCAGCTGCATTAAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTGGCTATTTGGCGCCAGATACC
GGCTCCATCGGAGAACTGTCGAGGTTATGTTGACCTGCAGGG

配列番号 590 の nt 78-210 は、lppB 遺伝子の nt 1-133 の相補体に相当する
配列番号 590 の nt 78-285 は、コンテイング 442 (配列番号 442) の nt 1423-1630c
の相補体に相当する

【 図 3 B 】

Figure 3B

配列番号 591

NACAGATTGGGCAAACTCCAGTGAAAAGTTCCTCCTTACTCATATGTA
TATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCCACAATAATATGTTCTATCTGGCTT
CTTTTTTCCAATAGTTTTCGTTACGCACTAAGCGAACAATATGGTTATATA
CATAATCTTTTACTTGTATAAGGCCCTGTCCTACTGGGTGGGTATCAAT
GAGCAAGGTTGCTACTGCGCTTAAATGATAGGCATATTTCTGTGAAAAA
ATAATGGCATACTGGTGGCAAGATGCGCAAAAATGGAGGAATCTGGTGC
AAATAATCAATTTTACTTGTATAAGCGAAAAGTGGCGTACAGATTTGAT
TTTTTCGTTAAGITTAATGCTATCAAAAATAAGGAAAACGCACITTTCTTGC
TTGTTGTTGAAACACTCTATTTGTTGATTTACTATAGGNAACCATNCCGCT
CTGCTAAGGTTGGTAAATAAGTATTATGCCCTAATACAGGATTAATCGAA
AATACTTCNGNTTCAGNGNTAAAAACACCNNTGNNGGGGNAANCNANG
GGGTTTGGGGGAAATTTTACCCCGGGACGTAATNAATAAA

配列番号 591 の nt 74-514 は、sapA 遺伝子の nt 369-811 の相補体に相当する
配列番号 591 の nt 74-514 は、コンテイング 512 (配列番号 512) の nt 3458-3897 に相当する

配列番号 592

TAAACAAGNAATTGGGCAAACTCCAGTGAAAAGTTCCTCCTTACTCAT
ATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGTAGAACCAATAAGGTTTAC
CATCAGAAAATAATCTGGGTTCTTGGGGGTTTATGCTCCATACGGAAATA
AATTTGGGCGTTAATTTGAAGTTTGGCACTTCTGTTGAACATTTTTC
ACTTCCAGAAAGTCACTGTTTGCACAAAATTTGCGACTTAATACATCGACTT
AGCTAAACGCAATTTGTAATTCACITGGCGCATCAGCCAAATGCCAAATTA
CAACCAAGTAAGGTAAGTGGCGGCAAAATTTTAAAGGTTGTTTTTTCATTT
ACTTCTCTTAAATTAGTATTCTGGACGATGCGATAAAAATTTACGCTTA
CCATTTTGCATTGGGCTGACAACTCCCTGCTTCCATTTGATCCCTAGAG
TCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCCTATCATGTTGATAGCTGTTTCT
GTGTGAAATTTGNTATCCGNTTCAATTTCCCAACATACAGAGCCNAGAGC
ATAAAGTGTAAAGCTGGGGGNCNTNATGAGGGAGCTA

配列番号 592 の nt 78-345 は、lolA 遺伝子の nt 11-278 の相補体に相当する
配列番号 592 の nt 78-454 は、コンテイング 360 (配列番号 360) の nt 1039-1415
の相補体に相当する

【 図 3 C 】

Figure 3C

配列番号 593

TTAACAGAATTGGGCAAACTCCAGTGAAAAGTTCCTCCTTACTCATAT
GTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCTATACCTGCAATTAATAAAGC
AAAGTCAATACCCTGCAATAATCGCATTAACCGAAGTTTGGCGTAAAAAT
ATTCAAAATATTATCTACGCTAAAATAAATCAGGATAATCAATGATACAA
TCGGGATAAGAATAATCAACGCAATAAAGAAGCGTGTTCATCAAAAAT
CTTCTTATTGAAAATTAGATGTTTCAATCATCACTTACTACTTCTT
ATTTACCAATAGCTGCTGCTAATTTTCTTGTGTTGCTCTTTCCGAG
AAAATTTGCACTAATTTTACCTTACCGCATTAACAACACTCTATCGCTCA
TACCAAGCACTTCTGGCATATCAGATGAGATCTCTAGAGTGCAGCTGCA
GGCATGCAAGCTTGGCGTAAATGATGTTGATGCTGTTTCTGTTGTAAT
GNTATCCGNTCACAATTTNACACAACAATACGAGCCNAGCATAAAAGGG
GAANNCCGGGGGCTAANGGGNGCTACNNNATTTNATNGGGTG

配列番号 593 の nt 77-290 は、rbsC 遺伝子の nt 1-214 の相補体に相当する
配列番号 593 の nt 77-438 は、コンテイング 445 (配列番号 445) の nt 1813-2174
の相補体に相当する

配列番号 594

AAGTACTCTGNTNCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGGGATATCAAGC
ACAATCTCGTTTGGCTTCCAGGAAAAGATTGCAAGCGTGAAGCAACTT
CTGCATCCCAACTTGGCTAAGAAATTTGCGGGCTAACAAATCCAGCAITTTGCGC
CACCCGCAAGGCAATAGCAATGTTCCGACTGGGATTCCTTTGGCATTT
GCACAAATGAATAAAGGCTATCTACGCACTTAAACATAGAACITTTTACTG
GCACACCCAGCACAGGCACAAAGGTTTGGCTGCGATCATGCCGGTAA
TGTGCGCACCGCCAGCCAGCAATAATTACTTTATAGCCATTTTITGT
GCATTTTCAGCAAAATTTCAAAAAGTTTATCAGCGCTACGATGAGCAGAGAC
GATTTCCACATGATAAGGTACTTTTAAATCTTAAATCTGAGTTGCTCT
TTGCATGGTACGCCAATCGCTTTTGGAAACCCATCACAAACAGCAATTTGTCG
AGTTTTGACATGCTATTTTCAATTTTCTAATTTAAAAGGTTGGCGTAGA
ATAGCATAGATTACATATATAGGCAACCGTTTGTCTATNTAT

配列番号 594 の nt 105-519 は、purE 遺伝子の nt 1-415 の相補体に相当する
配列番号 594 の nt 34-281 は、コンテイング 536 (配列番号 536) の nt 286-40
の相補体に相当する

【 図 3 D 】

Figure 3D

配列番号 595

TTATGNGACCNNTGGGCAAGTCCAGTGAAAAGTTCCTCCTTACTCATAT
TGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCTTATCATCTTAAACTAATAC
GCCAGTTCATGTTTGAAGCAATTAATGCAATTAAGTACCGGCTTCTCAGC
GGTGTGGCGAATGGAGATAAATTAAGTACTGACTGATAGTAAATTTCTAAT
TGAGATTTCAATTAATACCAGAAATCGGCTGAGAAATGCAAAATAAAT
GAACGATTTGGGAACCCAACTCGTTTATTTCTTTCATCCAGACTTTACT
GTGCGCTTTGGAAATTTCAACAAATCTGCTGACTTTAAAAGTGAATAACAG
GACAAATTTGCAAGGAAAATTTGCCAAAATTTGACCGCACTTTTAAACGC
TCTGTTGGCTTTACCACCGGTAGGAAATTTCCACCTGCGCTGAGAAATGCGA
GCTAAGTATAACGCAAAATACCTAGGCACTAAATCAGCAAGTGAATAATA
TTTTCAATTTAGCTTACAATAAACACACTCAATTTCTACGCTATCAAGAGCA
GATTATGTCAAAAACAAGAGAAAAAAGTTCGGTGTCACTTTTCG

配列番号 595 の nt 78-189 は、ribB 遺伝子の nt 1-112 の相補体に相当する
配列番号 595 の nt 237-565 は、コンテイング 290 (配列番号 290) の nt 2216-2544
の相補体に相当する

配列番号 596

TNACAGNAATTGGGCAAACTCCAGTGAAAAGTTCCTCCTTACTCATAT
GTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCTAAGAGATATTTAATTTACGTT
CTGTGTGATGAACAAGCACTAAGTAAATGTCATTTTTCATATTTGAAAGCC
ATAAATACTCCTTGTGTTTGTACTATACATTTGGGATAAACAATACATCA
TTCGAGATACTGCTTGTGTTGCGAACAGTGTCAATTAAGAGAGGTAATAA
GAAATTTGTTGCTGTTTTCAACTGGTAAATGCCAGTATGTAGAAATTTTATT
CCGAGATTTTATGATTTATGAAATTTAATAAATAATCTTAACTCTTAT
TGTATTTTGTGATTTCTAATAGTATGATTAATAAAGCAAAATATGTTT
TAGTTATTTTGTGTAAGAGGAAATGNGTCTACTATNTCTTAAATAAAGNG
CGGNTATTTTATGNTAGNTTTTAAATATATATGATTTTATGAGAGGCGACCC
NCAGCNGTGGCNGCTTGGGCGCAGCATGGGCGATATAGTITGTTCCCTGTG
NNAANGTGTATCCGTTTACANTTCCCAACAAAANAGAN

配列番号 596 の nt 77-155 は、arcB 遺伝子の nt 1-79 の相補体に相当する
配列番号 596 の nt 77-494 は、コンテイング 461 (配列番号 461) の nt 772-1189 の
相補体に相当する

【 図 3 E 】

Figure 3E

配列番号 597

```
AACAGNATGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATGT
ATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCAGTACGAGTCCAGCTCAAACAG
GCATAAAATTTGAACAAACAGTGTCAATCCCGATTGAGCAAGCATTGCG
AGAGAGTTTGTATAGTTATTAATCCATTTTGTATAATTTCCAGTACTGA
GTTTTAATCTCTTCAAGTGGTACACTTCCACTACTGACCAAGCTTAAA
CCAGCATCTCTAATTCAGTTTTCAGTTTTTAAATTTCTCGTACTCCAC
ACTTACCCTTAGGAATATGGTAAAGTGCAGTACTATACCAGTTGCGCC
TGCTTGACGAATATCAGATAAAGAAACAGGATCTCTANAGTCGACCTGC
AGGCATGCAAGCTTGGCGTAATATGGTCAATAGCTGNTTCTGTGNGAAA
CTGGTATCCGCTCACAAITCCACCNAACATACGAGCCNGAAGNCATAAAG
NGNTAANCNTGGGGGCCAATAGTGTAGCTAATCACAATTAATGNGT
TGGGCTTACTGCCGTTTTCAGNNGGAAACCTGGCGGCCAGCT
```

配列番号 597 の nt 83-388 は、*uxaA* 遺伝子の nt 34-335 の相補体に相当する

配列番号 597 の nt 156-388 は、コンテイング 5 (配列番号 5) の nt 779-1008 の相補体に相当する

配列番号 598

```
TNACAAGNAATGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATA
TGATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCCAACCTCGTAACTTAGCAAAAT
CAGTTACGCTTGAATAAAGTGGCGTTGATTTAAATGTAATAAAAAAAGC
GTGAAATTTACCGTATTTTTTATGTTAAATAATCTTCTTGTTCGGGTGT
TTAATCACTTGTGGGATTAACAATAATGTGAGAAATAACCACATATAGTGA
AAAAATAACCCTAGCCATTGCACCATCGTTAAACCAAAATAATGACCATT
GGCTTTTATTACAAGAGCCAGTTGGGTTTAAATATAAATGGAAACCATTTGA
TGAAATGGTAAAGTCTCGGGAAAAATTTGGAATAAACTCACATTTGTTTCCA
AGGAGCTGGATTTCAATTTGCAAACTCAAGATGACGAAATGAAATCAATAAGC
CCTTAATCTGCTGAATAAACCTAAAGCCAAAGGGCGATTAATCGAAGTATG
AAAGCAAGAGGTTGAAATGCAATATATGCGCCCTACAAATAAGCAATG
CAATGCTAAACGTTTATAAACACAGACACAAAGGTTGTAAGCCC
```

配列番号 598 の nt 176-600 は、*dbbB* 遺伝子の nt 108-532 の相補体に相当する

配列番号 598 の nt 78-600 は、コンテイング 560 (配列番号 560) の nt 819-1341 に相当する

【 図 3 F 】

Figure 3F

配列番号 599

```
NACAAGATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATGT
ATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGCCCGCCAGCACCCAGGGGAGG
AGGACATCTGCATCGCATCAAGCCATTCGCCACGCATCATCTGAACTTG
GCAACGTTATCACTTTAAACGGTGGCGTCGCAAAAGTATTCAGCAAGCTGG
GTTTTACCCTGGAGGAAAGTTTGGTGAAAAGGGATAATTTGCTGTTCAT
AGATTTTGTAGGGGCTAATTCATTAAGCCCGATATTTCCACAAATAAITGG
GCAAAITGTAATTTGCCCTACGATTAACGAAACCAAGATGCAAGTTCTTC
CACATTTCTCAACAACGCATATTTTTTCGATCTCTAGAGTCCAGCTGCAGG
CATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTG
TATCCGCTCACAAITCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAA
AGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGTAGCTAATCACAATTAATGCGTTGGCTC
ACTGCCGCTTCCAGTCCGGAACCTGTCTGCCAGCTGCATT
```

配列番号 599 の nt 75-252 は、*wreH* 遺伝子の nt 1-178 の相補体に相当する

配列番号 599 の nt 75-385 は、コンテイング 258 (配列番号 258) の nt 825-1135 に相当する

配列番号 600

```
TANACAAGNAATGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCAT
ATGATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCCAATCTCAATACGTAATCT
TGCCCACTACTATTTAAATCGGTAGCCATTCATTGTGGCTTTTAGAACCG
ATAACCGTGAATATTTGCTGTGTATGGTTCGTTAGAAAAATATTACGA
TTAAGCACTACATCCGCATCAATAACATAACAATCACTAAAGAAAGTCTTG
TGCCAGAGAAAAGGAATAAATGCTGTATATTCGCGATATTTTCGTTGTA
AATCAAGGTGCAATATTTTCTTTAGATACTCGAATTTGTCGTGTA
ATACCTGTAAACAATGACAAATTTGCGATATTTGCTTGACGTAGAAAAATG
GAGTGTCCGTTCAAGTTAGGTGTGCCGTGAATATCTAACAAATTAATG
TGTGCTTTGTGTATGCTTTAAACGACCCGCTTAANTCNTGACGCTAAAA
TAATCGCATTCATTTTGTCCCTTTTAAAGAAAGGTTGCAAGTCTCTCTA
GAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAAATCATGNN
```

配列番号 600 の nt 82-482 は、*licC* 遺伝子の nt 40-440 の相補体に相当する

相当する配列は、コンテイングセット内がない

【 図 3 G 】

Figure 3G

配列番号 601

```
TNACAAGANITGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATAT
GTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGCTCATTCGAGAGCACCTCCA
ACAGCAGCAATATCTCGAGGAATTCGTTCCAAAGCCATCACTGCAGCTGC
ACCAGCAGCTCTCGCAATGCGAGCTTGTTCAGGGTTTGAACATCCATGAT
AACACCACCTTTGAGCATCTGTGCTAAGTTTTTATTTAGTTCATAACGATT
TTCAGCCATTTCTTGTCTCTAATTTTGGTTATTTGATTTGATAGCTACGT
TTTTTATTTGTAATGTAGAAAAGTCTTAGAACAAAGTTTGAAAAAATGCGTA
TATATTAAGGCAATAATGCTAGTGTGCTTAAITTCAGTTTTTTGTATAA
ACGAAAGTGTAGAACGTCAGAAAGGATTTGCAATTTAATAATAGAAAAAAG
AGCTACTTTAGCTGAAAGAAATTTGCTCTTAAAGTGCACAAATAGTTATTA
AAAAACCTTGAAATGTTTTTAAAAACCTTTTCTATGTGGTTAGATTTTTCT
GAAATTTAAGAAAAGCTTGAAGGGGAGTTTACGCTTTTC
```

配列番号 601 の nt 75-263 は、HI1647 遺伝子の nt 1-189 の相補体に相当する

配列番号 601 の nt 75-600 は、コンテイング 471 (配列番号 471) の nt 1035-1560 の相補体に相当する

配列番号 602

```
TTNACAAGGAATCGGGACAACCTAGCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCA
CATATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCTGCAAAATTTGTCAC
CACTAATACGATGGCTGCTTACGCTACACCACCGAGTTTGTAAAGTGATAA
AAAAATAAATTAAGGGATTAAGTCAAGGAGTGTGTTTCAATATGATTAAT
CTTCATAAATAAGCTGTAGAAAACGATAAGTCACTACTAGCATGAAAAATA
TTAAGTAATGCGGTGAAAATGCTTATACCATATCAAATATACGATTAATTTG
GAAAATGCGCTTAAATGGAATAAAGAAATGGCAGGAGAAAATAAACA
GTAGGGTGTAAATAAACAATACGCTTTTCGAGTATTTCTCGCATCCAAA
TTTTTCGGATAGTTTGGGAAAGTGCCTTTGAGTGAAGAAATAATGTTACTA
CGTTAAATTTTAAACGGACAAGAAACCAAAACGCCAACCAAGCATCGCGAT
AAGTGACATAATAGAGGGCGATTTTTTTGTGAGTAAATGCANCAAGGGCTT
CACCAGNACCAGTAACATTTGGTGAACCAATTAATAGATCCTCTTAG
```

配列番号 602 の nt 81-191 は、*ispZ* 遺伝子の nt 1-111 の相補体に相当する

配列番号 602 の nt 81-593 は、コンテイング 418 (配列番号 418) の nt 850-1361 の相補体に相当する

【 図 3 H 】

Figure 3H

配列番号 603

```
NACAAGANTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATG
TATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGCTTGAACATCACTCAGATTTA
ATCAATCTGTGGATCTTATCCAAAGAAAAGTACCACGAAATTTCTCTTTCC
TCATTACCTAATAGTTTGAATAATAGAGTTTAGCTATTTGATGGCTCAGTA
AATTCCTGTGCACTTGGTAAAAGGGCTTTCTCCATCACITTAGTTAAA
ATAACCTGTGCCTGTCTAAAATAGCTTGTGTGCTCGTTAATTTAAAC
ATTGATATTTCTTCTAAAATAGGGAATATCGCCCAATAGGGAATATATCC
CTATGGGTAAAGGCGGAAAAGATGCTTATCGCACATTAAGGATTAATGTT
ATTAATCAGAAGTTTTTAAACTGTGCTAATCTGTTTAAITTTTGTGCGAA
ATTTCAAAATCGTGTGCTCAGATTCATCATCTATACAATTTCCAAATAATTC
TCATATCAGCAATAGTGTCTCTTTTGTGGGGAAGTGTGGAACATAATTTG
ATCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAA
```

配列番号 603 の nt 65-525 は、*radC* 遺伝子の nt 18-477 の相補体に相当する

配列番号 603 の nt 76-564 は、コンテイング 575 (配列番号 576) の nt 23606-23869 の相補体に相当する

配列番号 604

```
TTAACAAGNAATGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCAT
ATGATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGGCTTCAACATTTCCGCCGT
CTAAACGTTCTGTTGTATAAAATGCAATCGCCAGCAGGAAAACCAAGCGT
TCGGTAGGTAAATCAAAGAAAACCGCGATCTTTTGGCCAAAGAGACGAG
TTCAGGAATAGTTTGGGATGTTTCAATCATTTGAATTCAAAAGGTTAAAT
TGAACAAAAAATTTGGAAGATTAACAGGATTTTTTGGCGATCTCTAGA
GTGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGGTAATCATGTTGATAGCTGTTTCC
TGTGTGAAATTTGTTTCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGAA
GCATAAAGTGTAAAGCTTGGGGTGCCTAATGAGTGTAGCTAATCACAATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCCGGAACCTGTTCGTGCCAG
CTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTGTGCTATTGG
GCOCAGATACCCGNTCCATNNGNAAAACNCTGACCGGGGNTNT
```

配列番号 604 の nt 79-296 は、*mukF* 遺伝子の nt 30-247 の相補体に相当する

配列番号 604 の nt 79-296 は、コンテイング 508 (配列番号 508) の nt 4026-4243 の相補体に相当する

【 図 3 I 】

Figure 3I
配列番号 605

```
TAACAGNATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATG
TATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCCAGTAATCAGAATTTCTCGAG
AAGATGGCGATGCCGCCACCCTGATGGCGGCGAATAAATCTAACTCC
GCCAAAATATTCAAATCACGACGAATCGTTGAGGGCTAACATCTAAGGC
AGCAACCAATCTCCGCTTAAATAGCCAGATGTTCCACCAAGTTAAT
AATTTTTGATGGCGTAACGATGTTTCATAGCGAATCCTTTATCCAAAT
AAACGGACTTACTAGCGAATTTTGGCGAATTTGCTATCAATAAATCCC
CAAATCAAGCCGACAATCAAGCTGAAATATGTGCGAGATTTCCCATTC
AACACCAATAAGGGGCTAATAAACCTAATGCGATCTCTAGAGTCGAC
CTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTCGTGTG
AAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA
AGTGNAAGCCTGGGGNCCCTAAGGTGAGCTAACTACCATTAAT
```

配列番号 605 の nt 76-283 は、*gipR* 遺伝子の nt 1-208 の相補体に相当する

相当する配列は、コンティグセット内に見出されない

配列番号 606

```
TAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATAT
GTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCACCATTTTCAAGAGATTGAGAA
ATAAACTCAAAATATCTTTTACCATATTTTCAATTTCTTTGCGAGATAAA
GTGGCTGTTTTGCTGACAATTTTCCATAAGTCTGACTTAGTCATCCTCT
TACTCTCTTAAATTTTAAATTAAGATTCCTCTAGAGTCGACCTGCGAGG
CATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGCTGTGAAAATGT
TATCCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAAGTTAA
AGCCTTGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTTGCTTGGCTC
ACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT
CGGCCAACCGCGGGGAGAGGGCGTTTGGCTATTGGGCGCCAGATACCGG
CTCCATCGGAGAAACTGTCGAGGTTATGTTGACCTGCAAGGGGGGGGG
GGCCCTGAGGCTGCTCNGNAGAAAGGGGTTGCTGACT
```

配列番号 606 の nt 77-200 は、*ihfB* 遺伝子の nt 1-124 の相補体に相当する

配列番号 606 の nt 77-236 は、コンティグ 408 (配列番号 408) の nt 1455-1614 の相補体に相当する

【 図 3 J 】

Figure 3J
配列番号 607

```
NACAGNNTTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATG
TATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCAACATCTAAGACAAGATTTTTTAA
TGGACTACTGGTATTGGGAACACTTAATCAITTTGGTAAGCAATAGACCAT
TTCCATTTTGTATTACGAGTGGCAACCCGACCAAAATTTGCTGAGCATTC
CGATATTTTGTATTGATTAATACCAAGTAAAGCCCTGTTTTTAAAGGCATC
GACAATTCATTTTIGAGAACCAAGCGTCTTGTATGAGTAAITCTTTAAA
AGCAGGATTAATTTGTCAGTCACTTTTATTTTTTAAATAGTCAAAAATTTGC
ATAAGAATTGCATAAAAAATNNNCTTTCATCAACTGGAATATGNTGNTNGN
ACNNGGGGAAAGAAATTTTTTNNNAAAATNGGAACNAGATCCNTNAA
GNCAACCTGCAGGCATGCAAGCTNNGGCGNAATCANGGCATAGCTGNTTCC
TGGGAAAATGNTATCCGTTANAATTTCCNCNACATNCNANCCGNAGCAT
AAGNAAAGCCTGGGGGNTANGANGNGCTACCCCATNAT
```

配列番号 607 の nt 75-330 は、*argR* 遺伝子の nt 1-256 の相補体に相当する

相当する配列は、コンティグセット内に見出されない

配列番号 608

```
TTTAAACAAGGAATCCGGGCACAACCTACCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTA
CTCATATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCCITTTATCGCTGGGA
GAACCTCAAAATTTGACTTTTGGACCTGCTTTTAAATGAAACGATACCGCTCA
TTTCAATCACTGAATAAATGTGCAAAAATATCCGGCATCTACACCTCTCGGG
AAATGAAACCAAACTCTTTTGTCAATTTGAAACCTTTTACAATACCAATTT
CCATAAAGACCTCTCTAGGCTTACGCTTATAAACAATAAATCAACAAG
ACTCTCGCTTATCACTACTAATTAAGTCCGTTATGTTTAAATTTTGA
CGGTTATGCAACGAGCAATATCAAAAATGATAAGTAGATCCTCTAGAGT
CGACTGCAAGGCATGCAAGCTTGGGTAATCATGGTCAATAGCTGTTNCTC
NGTGAATTTGTTATCCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAG
CATAAAGTNTAAGCNTGGGGTGCCTAATGAGTGNCTCACTNACATAAA
TTGAGTTANGCTCACTGCCCTTTTCCAGNNGNANCCNG
```

配列番号 608 の nt 84-259 は、*ihfB* 遺伝子の nt 1-176 の相補体に相当する

相当する配列は、コンティグセット内に見出されない

【 図 3 K 】

Figure 3K
配列番号 609

```
TAACAGCATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATG
TATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCATTACAGAACCAATCATTCCCC
AAATCAAGAAATAGCTTTGATGAAAATAAGTAAATCGTAAAGACAATAG
GAATACTCACGACATAGCCCGTAATGGCTAAATGCCATTTCTCTTTTCT
TACCTAGAAAATTTGATAAACTGAACGCCATTTTTCAGCAACTGGGCGAG
AATGAAATTTCCACATGTAAGGTTCTCGAATAATGCTACTACAAAAGGA
AGAAATCGCTTTATTTGGTTTTCTGGACGGATACAAAATTTGAGCAGGGC
AACACAGAGACCATCAACAAAACCTTTCTTGTATAGTCAATTAATAAGTA
ATTACTCTATTGCTTTTGTGCAACATAAGTCGATTTGTTGGCTTACAGCAG
TAGAATCTGAAATAATTTCTGGTAAATACCCACCAATACAGCAAGTGAA
CTAGAAAAAATAAAACGAATTTAGTATCAGATTCATCAAAATATGAGAA
AGTGGCGACATTCATATTTGCCACTAACAAATTTTATCCTCTA
```

配列番号 609 の nt 93-413 は、HI0094 遺伝子の nt 1-321 の相補体に相当する

配列番号 609 の nt 76-595 は、コンティグ 379 (配列番号 379) の nt 1467-1985 に相当する

配列番号 610

```
TTNNACAAGNAATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCA
TATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCATCAAGATAATCAAGTACA
TATTTTCAATTTGAGAAATGCGATTTAGACTTGGCAACATAGATTTAAC
TCAATTAAGGTAATAATGGCAGTTATGATAAATCTTAAAGGGGTTAAT
GATGTCGAATTAAGTTTGTAGCATTTTAAAGGATGTTTTATGGAGTAAAT
GAGTCAAGAAAAGTGTGTTTGGATGAAAAATAAACNAAAATTTCAAA
AGAATTTGATCCTTAGAGTGCAGCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGNTTCTGTGTGAAATTTGNTATCCGCTCACAATTTCC
ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTAGCTAACTCACATTAATTTGCGNNGCGCTCNCNTNCCCTTTNCA
GGGGAACCCCTGNCGNCACGCTGCNTTAAATGAAATCNGCCNCCGCGG
GGGAGGGGNGNTTGGGNTTGGGCGCCANANCCGNCCTCCATCG
```

配列番号 610 の nt 80-143 は、HI1163 遺伝子の nt 1-64 の相補体に相当する

配列番号 610 の nt 80-316 は、コンティグ 513 (配列番号 513) の nt 117-353 の相補体に相当する

【 図 3 L 】

Figure 3L
配列番号 611

```
NACAAGNAATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCATATG
TATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCGTCACTTTACGATATTTTTCAT
CAATTCGTTTTGCAATCCAAAGTCATTTTTATCCGATTCGTTAGAAAAATA
AATCTTCTGTTTGGGTTAATGGAGATTTTGAATTTCTATCCAATTTGCAAT
CCCTTCAAGAAAATTTAAACCTGATTTAAACACCTTATAATTTTGGCTTCC
ATATCTGTATGAAATTTTGAATAGCCGAATATTATGGTGCTCGGGCTG
AAACAGTTTGTATTGAAACAAAAGTATATTGTTTTTTCATCTTGTGGTGG
CACAAACCGTATCTCTAGAGTGCAGCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTC
CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCCTGGGTCCTA
ATGAGTGAAGTCACTACATTAATTTGGGTTGCCCTCACTGCCCNTTCCCA
GTCGGGAAANCCCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG
```

配列番号 611 の nt 76-260 は、遺伝子 HI1063 の nt 1-185 の相補体に相当する

配列番号 611 の nt 76-374 は、コンティグ 48 (配列番号 48) の nt 229-527 に相当する

配列番号 612

```
ATTNNACAAGNAATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTTACTCA
TATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCATCTTTGATAATAAGCT
GTAATTTGGTTGAAAACCTGAAATGGCTATCCCTTGTCTGTTTTGGGGTIT
TCACTGTAATAAAATTTGGCGAGAAAAGGGCAATTCAGGATTAATAATGT
TTATTCGCTGTAAGATAGTGAACCTTTTGTGCTGTAACAGAAATGAACT
TCATTTTTTTCAATGGCTTTAATAAAAATACGACAAAAATTCATGTTTTTC
TTCTGAAATTTGCAGCTGCGCCTAACATATTTCCCCGTTAATTAAGTAAAA
GCGAAACATATCGTTTTCAATCAATTCGTTGATGAAGTGCATATTTGTGTTT
TAGCCAGCTTCTGGGACGAGGGATGCAAAAATAAGGGAATAAGGTTGTA
GAATGAAAAGGACTTTGCTCAATAGAAAAGCTGAGAGAGAGCCGATTTCC
TTGATAATCGGGATTGTAAGCAAAATGAAAACCTCGATGATCTCTAGAG
TCACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAAATCGTCAATCGTCAATCGTCA
```

配列番号 612 の nt 84-298 は、HI0665 遺伝子の nt 1-215 の相補体に相当する

配列番号 612 の nt 82-549 は、コンティグ 557 (配列番号 557) の nt 4726-5193 の相補体に相当する

【 図 3 M 】

Figure 3M

配列番号 613

```

NACAGNATGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTACTCATATGT
ATATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCACTGCATTGAGTAAACGACTTTGT
GATTCAATATTATTTTCGAGTCAGTCAGGGGAAAATAGGTTTCGATTAAA
TACATAAATTTTTAAATGCTGTCGATTGGTTTAAAGCCGTTTAAACGCAT
TTCACTTAAACGTTTGAAAATGCCGAGTTCGCTAAAAAAGGCAATAATAT
CAAAITGATTCAATTCATCCGCTGTTTTGCCATTGATTIGATTGAATAAAA
TCCAAAGCAAGCCATTCATAATTCGGCTTCGCTAAATCCGCTGAATTGAA
AAGTGCAGGTCATGTTIAGGCATAATTTGAAACCACATTTGTGCTTCGCAGC
CAGNNAATAGGTTGCATTTGAGCGAGTTCATTATCGCTTGGGCGAGGNNNA
ANNTTTTGNCTNCNCGGAAAAATCAGGNNAATNGCGATCCTTTAGAGTCG
ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCNGTAATCATGGNCATAGCTGNTTTCCTG
GGGAAAATNGTTNTCCGNINCAATCCCCACAACATACGAGC

```

配列番号 613 の nt 75-158 は、HI1292 遺伝子の nt 1-84 の相補体に相当する

配列番号 613 の nt 142-455 は、コンティグ 313 (配列番号 313) の nt 12-324 に相当する

配列番号 614

```

CAAGACTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTCTTCTCCTTACTCATATGTA
TATCTCCTTCTTAAATCTAGAGGATCTACAGTTGGTTCTGTAAACATCCCA
GAACCGATTAAAATAAAATAACCCGCGAATGCGGCACAAATCACCCGCAA
AAAGTGCAGGCAAAAATTTGGCTTGTTTTTTTCGTGTTCAATGTTCTCC
TGAAAAGAAAATATCGCTATTATCCACCTTTCACCTCAGAAATTCATATTT
AACTTCTTCACTCTGAGCGGTTATTTATAGAAATGAGCCAATTTTTTAA
GCCAGAAGGAAAACCAATGAGCCAACCAATTTATAAACGTATTTTATTG
AAATTAAGCGGTGAAGCATTACAAGGAGAGATGGTCTTGGTATCGATCC
TCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTTCTGTGTGAAATTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC
ACATTAATTCGCTTGCCTCAGTCCCGCTTTCAGTCGGGAAA

```

配列番号 614 の nt 83-265 は、HI1064 遺伝子の nt 1-181 の相補体に相当する

配列番号 614 の nt 74-406 は、コンティグ 178 (配列番号 178) の nt 440-772 に相当する

【 配列表 】

[2006519605000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/007001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/285 C12N15/31 C07K16/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UNIPROT 'Online! 1 November 1995 (1995-11-01), FLEISCHMANN, R.D. ET AL.: "Histidine biosynthesis bifunctional protein hisB" XP002296614 retrieved from EBI Database accession no. P44327 * There is 98,895% identity in 362 aa overlap (total 362 aa) of P44327 with SEQ ID NO: 616 of the present application * abstract -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 September 2004		Date of mailing of the international search report 17.02.05
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/007001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>-& FLEISCHMANN R D ET AL: "WHOLE-GENOME RANDOM SEQUENCING AND ASSEMBLY OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE RD" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 269, 28 July 1995 (1995-07-28), pages 496-512, XP002916664 ISSN: 0036-8075</p> <p>-----</p> <p>DATABASE EMBL 'Online! 9 August 1995 (1995-08-09), FLEISCHMANN, R.D. ET AL.: "Haemophilus influenzae RD KW20 section 45 of 163 of the complete genome" XP002296615 retrieved from EBI Database accession no. U32730 * There is 99.449 % identity in 1089 nt overlap (total 1089 nt) of U32730 (gene H10471 encoding P44327) with SEQ ID NO: 615 * abstract</p> <p>-----</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/007001**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 10 and 12-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-21, all partially

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/007001

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-21, all partially

An isolated polypeptide from Haemophilus influenzae presented by SEQ ID NO: 616 the corresponding isolated polynucleotide presented by SEQ ID 615.

Invention 2-112 : claim 1-21, all partially

This group of different inventions comprises isolated polypeptides from Haemophilus influenzae as listed in claim 3 starting with SEQ ID NO: 618 to SEQ ID NO: 771 and isolated polynucleotides as listed in claim 1 encoding said polypeptides starting from SEQ ID 617 to SEQ ID NO: 770 (71 different inventions). Furthermore, claim 1 is directed to polynucleotides starting with SEQ ID NO: 577 to SEQ ID NO: 685 (40 different inventions).

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/569	B

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

(72) 発明者 バカレッツ, ローレン オー.

アメリカ合衆国 オハイオ 43026, ヒリアード, カンターウッド コート 4825

(72) 発明者 マンソン, ロバート エス., ジュニア

アメリカ合衆国 オハイオ 43026, ヒリアード, カンターウッド コート 4825

(72) 発明者 ダイヤー, デービッド ダブリュー.

アメリカ合衆国 オクラホマ 73118, オクラホマ シティ, エヌダブリュー 33アー
ルディー ストリート 221

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA31 BA61 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12
DA06 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA19 HA03 HA08 HA12
HA14 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ06 QQ42 QQ53 QR08 QR14 QR32 QR36
QR42 QR55 QR62 QR75 QR82 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36
QX02 QX07
4C085 AA03 AA13 BA55 BB12 CC08 CC21
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA34 ZB33
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA75 DA86 EA20 EA29 EA52
FA72 FA74

专利名称(译)	伤寒的基因不可能HAEMOPHILUSINFLUENZAE中耳炎分离		
公开(公告)号	JP2006519605A	公开(公告)日	2006-08-31
申请号	JP2006506942	申请日	2004-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	儿童医院有限公司		
申请(专利权)人(译)	儿童医院有限公司		
[标]发明人	バカレッツローレンオー マンソンロバートエスジュニア ダイヤーデービットダブリュー		
发明人	バカレッツ, ローレン オー. マンソン, ロバート エス., ジュニア ダイヤー, デービット ダブリュー.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C07K16/12 C12Q1/68 C12Q1/04 A61K39/00 A61K31/711 A61K39/395 A61P27/16 A61P31/12 G01N33/53 G01N33/569 A61K38/00 C07H21/04 C07K14/285 C12N1/21 C12N15/31 C12N15/74		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P27/16 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/04 C07K14/285 C07K16 /1242 C12N15/113 C12Q1/689 G01N33/56911		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C07K16/12 C12Q1/68.A C12Q1/04 A61K39/00.H A61K31/711 A61K39 /395.D A61K39/395.N A61P27/16 A61P31/12 G01N33/53.M G01N33/569.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024 /CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063 /QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR82 4B063 /QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/BA55 4C085/BB12 4C085/CC08 4C085/CC21 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086 /EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA34 4C086/ZB33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA29 4H045 /EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/453134 2003-03-06 US		
其他公开文献	JP2006519605A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及流感嗜血杆菌 (NTHi) 的不可分型染色体的多核苷酸序列和由该多核苷酸编码的多肽及其用途。本发明还涉及NTHi基因，其在中耳和/或鼻咽的NTHi感染期间或响应于中耳和/或鼻咽的NTHi感染而上调。

アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asn
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met,	Leu
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酸	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Arg
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala,	Leu

4 i ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して相補的なアンチヌクレオチドもまた、提供される。

2 7 1

明は、本発明のポリヌクレオチドが、増幅または発現のためにベクターに