

(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2007-503845  
(P2007-503845A)

(43) 公表日 平成19年3月1日(2007.3.1)

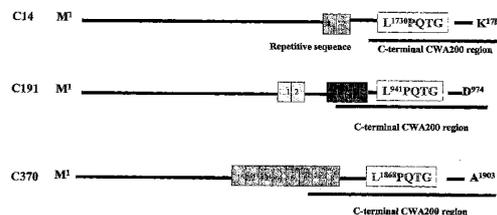
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A	4 C O 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-532269 (P2006-532269)	(71) 出願人 505284828 オセル, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 950 54, サンタ クララ, ワイアット ドライブ 1800, スイート 14
(86) (22) 出願日 平成16年1月28日 (2004.1.28)	
(85) 翻訳文提出日 平成17年9月14日 (2005.9.14)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2004/002460	
(87) 国際公開番号 W02005/012491	
(87) 国際公開日 平成17年2月10日 (2005.2.10)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号 60/443, 619	(74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明
(32) 優先日 平成15年1月29日 (2003.1.29)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(72) 発明者 チャン, チアーフア アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 43, マウンテン ビュー, イージー ストリート 231, ナンバー5 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌における生物学的に活性なタンパク質の表面発現

(57) 【要約】

異種ポリペプチドが細菌細胞壁を標的とするための方法および組成物を提供する。本発明は、発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌を提供する。この発現カセットは、シグナル配列と生物活性ポリペプチドとをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、この生物活性ポリペプチドは、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、この異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で以下：細胞壁関連配列；L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ；および疎水性配列を含む。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌であって、該発現カセットはシグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、該生物活性ポリペプチドは異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、該異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：

細胞壁関連配列；

L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ；および

疎水性配列、

を含む、乳酸杆菌属細菌。

10

## 【請求項 2】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも 50 個のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 3】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも 200 個のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 4】

前記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、該領域のカルボキシル末端において、荷電した配列をさらに含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 5】

前記乳酸杆菌属細菌が、腔コロニー形成株である、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

20

## 【請求項 6】

前記乳酸杆菌属細菌が、L . j e n s e n i i、L . g a s s e r i、および L . c a s e i からなる群より選択される、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 7】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q S G を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 8】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q A G を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

30

## 【請求項 9】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q T G を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 10】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q T A を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 11】

前記細胞壁標的領域が、配列番号 7 を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 12】

前記細胞壁標的領域が、配列番号 8 を含む、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

40

## 【請求項 13】

前記生物活性ポリペプチドが、細菌の細胞壁において発現される、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 14】

前記生物活性ポリペプチドが、10 アミノ酸と 600 アミノ酸との間である、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 15】

前記生物活性タンパク質が病原体と接触する場合、該生物活性タンパク質が該病原体と結合する、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

## 【請求項 16】

50

前記病原体が、細菌病原体である、請求項 15 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 17】

前記病原体が、真菌病原体である、請求項 15 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 18】

前記病原体が、ウイルス病原体である、請求項 15 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 19】

前記ウイルス病原体が、HIVである、請求項 18 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 20】

前記生物活性タンパク質が、CD4またはCD4のHIV結合フラグメントである、請求項 19 に記載の乳酸杆菌属細菌。

10

【請求項 21】

前記生物活性タンパク質が、2D-CD4である、請求項 19 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 22】

前記生物活性タンパク質が、シアノピリン-Nまたはシアノピリン-Nのウイルス結合フラグメントである、請求項 18 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 23】

前記ウイルス病原体が、単純疱疹ウイルスである、請求項 18 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 24】

前記生物活性タンパク質が、単純疱疹ウイルス侵入媒体C(HveC)であるか、またはHveCのウイルス結合フラグメントである、請求項 18 に記載の乳酸杆菌属細菌。

20

【請求項 25】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌から放出される、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 26】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌の細胞壁に固定される、請求項 4 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 27】

乳酸杆菌属細菌の細胞壁中において生物活性ポリペプチドを発現する方法であって、該方法は、以下：

発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌を提供する工程であって、該発現カセットは、シグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、該生物活性ポリペプチドは異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、そして該異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：

30

細胞壁関連配列；

L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ; および

疎水性配列

を含む、工程；ならびに

該ポリペプチドの発現を誘導するための条件下で細菌を培養する工程であって、該工程により、乳酸杆菌属細菌の細胞壁中で生物活性ポリペプチドを発現する、工程、を包含する、方法。

40

【請求項 28】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも50個のアミノ酸を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも200個のアミノ酸を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、該領域のカルボキシル末端において、荷電した配列をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記提供する工程が、前記発現カセットを前記細菌中に輸送する工程を包含する、請求項

50

27に記載の方法。

【請求項32】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQSGを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQAGを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項34】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQTGを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項35】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQTAを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項36】

前記細胞壁標的領域が、配列番号7を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項37】

前記細胞壁標的領域が、配列番号8を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項38】

前記細胞壁標的領域が、少なくとも200個のアミノ酸を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項39】

前記乳酸杆菌属細菌が、腔コロニー形成株である、請求項27に記載の方法。

【請求項40】

前記乳酸杆菌属細菌が、L.jensenii、L.gasseri、およびL.cas  
20  
seiからなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項41】

前記生物活性ポリペプチドが、10アミノ酸と600アミノ酸との間である、請求項27  
に記載の方法。

【請求項42】

前記生物活性タンパク質が病原体と接触する場合、該生物活性タンパク質が該病原体に結  
合する、請求項27に記載の方法。

【請求項43】

前記病原体が、細菌病原体である、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記病原体が、真菌病原体である、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

前記病原体が、ウイルス病原体である、請求項42に記載の方法。

【請求項46】

前記ウイルス病原体が、HIVである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記生物活性タンパク質が、CD4またはCD4のHIV結合フラグメントである、請求  
項46に記載の方法。

【請求項48】

前記生物活性タンパク質が、2D-CD4である、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

前記生物活性タンパク質が、シアノピリン-Nまたはシアノピリン-Nのウイルス結合フ  
ラグメントである、請求項45に記載の方法。

【請求項50】

前記ウイルス病原体が、単純疱疹ウイルスである、請求項45に記載の方法。

【請求項51】

前記生物活性タンパク質が、単純疱疹ウイルス侵入媒体C(HveC)またはHveCの  
ウイルス結合フラグメントである、請求項45に記載の方法。

【請求項52】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌から放出される、請求項27に記載の方法 50

。

## 【請求項 5 3】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌の細胞壁に固定される、請求項 3 0 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

生物活性タンパク質を哺乳動物粘膜表面に提供する方法であって、該方法は、以下：

粘膜表面と、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域に結合された生物活性ポリペプチドに結合されたシグナル配列を発現するように組み換えで変化した乳酸杆菌属細菌とを、接触させる工程を包含し、該異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：

細胞壁関連配列；

L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ；および

疎水性配列

を含み、

ここで、該生物活性ポリペプチドは、該粘膜表面から収集されたサンプル中で、検出可能な量で発現される、方法。

## 【請求項 5 5】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも 5 0 個のアミノ酸を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸を含む、請求項 5 4 に記載の方法

## 【請求項 5 7】

前記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、該領域のカルボキシル末端において、荷電した配列をさらに含む、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

前記乳酸杆菌属細菌が、*L . j e n s e n i i*、*L . g a s s e r i*、および *L . c a s e i* からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

前記粘膜表面が、腔内に存在する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 0】

前記粘膜表面が、胃腸管内に存在する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

前記接触させる工程が、前記乳酸杆菌属細菌を経口投与する工程を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

前記接触させる工程が、前記乳酸杆菌属細菌を腔投与する工程を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 3】

前記接触工程が、前記乳酸杆菌属細菌を直腸投与する工程を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

シグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合するプロモーターを含む発現カセットであって、ここで、該生物活性ポリペプチドが、配列番号 7 または配列番号 8 に結合する、発現カセット。

## 【請求項 6 5】

請求項 6 4 に記載の発現カセットを含む、ベクター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

( 関連出願の相互参照 )

10

20

30

40

50

本願は2003年1月29日出願の米国特許仮出願番号60/443,619に対する優先権の利益を請求する。米国特許仮出願番号60/443,619は、全ての目的でその全体を参考として援用する。

【0002】

(連邦政府後援研究開発下で行われた発明に対する権利に関する記載)

本発明はNational Institutes of Healthにより認可された補助金番号2 R44 AI46203-02の下で政府支援により行われた。政府は、本発明に一部権利を有する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

グラム陽性菌におけるペプチドグリカンとの共有結合を介するタンパク質の表面発現は、独自の識別信号とソルターゼ依存性機構とに關与する(Mazmanianら、Science 285:760-763(1999))。最も良く研究されたシステムの一つは、M6構造タンパク質をコードするStreptococcus pyogenesのemm6遺伝子である(Fischettiら、1990、Mol. Microbiol. 4:1603-1605(1990))。M6タンパク質は、標示(signature)細胞壁識別信号、Leu-Pro-X-Thr-Gly(LPXTG)モチーフ、それに続く疎水性アミノ酸伸長、および最後に荷電残基を含む配列(KRKEEN)を有し、これは細胞表面保持信号として働く。これらの細胞壁識別モチーフは、Staphylococcus、EnterococcusおよびListeria、ならびに乳酸杆菌属を含む他のグラム陽性菌において同定されている(NavarreおよびSchneewind、Microbio. Mol. Biol. Rev. 63:174-229(1999))が、ヒトの腔でコロニーを形成する乳酸杆菌属種においては同定されていない。

【0004】

全てのヒトの粘膜には自然に細菌がコロニーを形成している(Tannock、Clin. Rev. Allergy Immunol. 22:231-53(2002))。最近の科学的証明は、これらの細菌が体の細胞および組織と緊密に相互作用し、天然の生物学的プロセスを調節しているという事実を示した。この粘膜微生物叢がまた、ヒトの細胞および組織に影響する多くの疾病に実質的に寄与することが次第に明らかとなっている。

【0005】

一般に、腔および消化管内で乳酸桿菌および関連する細菌による微生物叢が優位になることは、良い健康状態と関連している(Redondo-Lopezら、Rev. Infect. Dis. 12:856-72(1990); Tannock、Clin. Res. Allergy Immunol. 22:231-53(2002))。乳酸桿菌の天然株は、これらの場所内で健康な微生物叢を保ち、感染を防止するために、「プロバイオティクス」として長年投与されてきた。これらの「健康な細菌」が細菌、ウイルスおよび真菌等の病原性微生物と競合し、病気に関連する病因の発生と進行を制限するということが十分に確立されている。それにもかかわらず、この微生物叢は脆弱であり、健康な微生物叢の自然な代謝回転、および破壊を伴う動的環境が、日和見感染の発症と関連付けられている。結果として、疾患を予防するかまたは処置する手段として、微生物叢の完全性および天然の性質を維持、またはさらには増強するためのアプローチは、生物医学界が切望するところである。

【0006】

粘膜微生物叢は粘膜表面に影響する多くの局所疾患に寄与する。例えば、HIVおよび他の性感染病原体は腔粘膜を迂回しなければならない。さらに、潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患の病因は、破壊された粘膜微生物叢と宿主の細胞および組織との間の不適切な相互作用から生じ得る。粘膜叢内の細菌の性質を調節する手段は、これらの疾患ばかりでなく、粘膜表面に影響する関連する病状の予防または処置の助けになり得る。生物活性タンパク質がこれらおよび他の微生物の細胞壁を標的とすることは、この様

10

20

30

40

50

な疾患の処置に役立ち得る。

【0007】

本発明はこれらおよび他の問題に取り組む。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の簡単な要旨)

本発明は、発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌を提供する。この発現カセットは、シグナル配列と生物活性ポリペプチドとをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、この生物活性ポリペプチドは、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、この異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で以下：細胞壁関連配列；LPQ(S/A/T)(G/A)；および疎水性配列を含む。

10

【0009】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁関連配列は、少なくとも50個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁関連配列は、少なくとも200個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、上記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、その領域のカルボキシル末端に荷電した配列をさらに含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、乳酸杆菌属細菌は、腔コロニー形成株である。いくつかの実施形態では、この細菌は、L.jensenii、L.gasserii、L.casei およびL.crispatusからなる群より選択される。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQSGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQAGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTGを有する。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTAを有する。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、配列番号7を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、配列番号8を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドは、細菌の細胞壁で発現される。いくつかの実施形態では、この生物活性ポリペプチドは、10アミノ酸～600アミノ酸の間である。いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドが病原体と接触した場合、この生物活性ポリペプチドが病原体と結合する。

30

【0013】

いくつかの実施形態では、上記病原体は、細菌病原体である。いくつかの実施形態では、この病原体は、真菌病原体である。いくつかの実施形態では、この病原体は、ウイルス病原体である。

【0014】

いくつかの実施形態では、上記ウイルス病原体は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)である。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、CD4またはCD4のHIV結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、2D-CD4である。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、シアノピリン-N(CV-N)またはCV-Nのウイルス結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、上記ウイルス病原体は、単純疱疹ウイルスである。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、単純疱疹ウイルス侵入媒体C(HveC)またはHveCのウイルス結合フラグメントである。

40

【0015】

いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドは、乳酸杆菌属細菌から放出される。いくつかの実施形態では、この生物活性ポリペプチドは乳酸杆菌属細菌の細胞壁に固定される。

50

## 【0016】

本発明はまた、乳酸杆菌属細菌の細胞壁中で生物活性ポリペプチドを発現する方法を提供する。いくつかの実施形態では、その方法は以下を包含する：発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌を提供する工程であって、この発現カセットはシグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、この生物活性ポリペプチドは、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、この異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：細胞壁関連配列；LPQ(S/A/T)(G/A)；および疎水性配列を含む工程；ならびにこのポリペプチドの発現を誘導する条件下で細菌を培養する工程であって、該工程により、乳酸杆菌属細菌の細胞壁中で生物活性ポリペプチドを発現する工程、を有する。

10

## 【0017】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁関連配列は、少なくとも50個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁関連配列は、少なくとも200個のアミノ酸を含む。

いくつかの実施形態では、上記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、この領域のカルボキシル末端に荷電した配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記提供する工程は、上記発現カセットを上記細菌中に輸送する工程を包含する。

## 【0018】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQSGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQAGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTAを有する。いくつかの実施形態では、細胞壁標的領域は配列番号7を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は配列番号8を含む。

20

## 【0019】

いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、少なくとも200個のアミノ酸を有する。

## 【0020】

いくつかの実施形態では、上記細菌は、腔コロニー形成株である。いくつかの実施形態では、この細菌は*L. jenseni*、*L. gasserii*、*L. casei*および*L. crispatus*からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドは10~600アミノ酸の間である。いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドが病原体と接触した場合、この生物活性ポリペプチドが病原体に結合する。

30

## 【0021】

いくつかの実施形態では、上記病原体は、細菌病原体である。いくつかの実施形態では、この病原体は、真菌病原体である。いくつかの実施形態では、この病原体は、ウイルス病原体である。

## 【0022】

いくつかの実施形態では、上記ウイルス病原体は、HIVである。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、CD4またはCD4のHIV結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、この生物活性タンパク質は、2D-CD4である。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、シアノピリン-Nまたはシアノピリン-Nのウイルス結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、上記ウイルス病原体は、単純疱疹ウイルスである。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、単純疱疹ウイルス侵入媒体C(HveC)またはHveCのウイルス結合フラグメントである。

40

## 【0023】

いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドは、乳酸杆菌属細菌から放出される。いくつかの実施形態では、この生物活性ポリペプチドは、乳酸杆菌属細菌の細胞壁に固定される。

50

## 【0024】

本発明はまた、生物活性タンパク質を哺乳動物粘膜表面に提供する方法を提供する。いくつかの実施形態では、その方法は、粘膜表面と、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域に結合された生物活性ポリペプチドに結合されたシグナル配列を発現するように組み換えで変化した乳酸杆菌属細菌とを、接触させる工程を包含し、この異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で以下：細胞壁関連配列；LPQ(S/A/T)(G/A)；および疎水性配列を含み、ここで、この生物活性ポリペプチドが、粘膜表面から収集されたサンプル中で、検出可能な量で発現される。

## 【0025】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁関連配列は、少なくとも50個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁関連配列は、少なくとも200個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、上記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、カルボキシル末端領域に荷電した配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記乳酸杆菌属細菌は、L.jensenii、L.gasseri、L.caseiおよびL.crispatusからなる群より選択される。

## 【0026】

いくつかの実施形態では、上記粘膜表面は、腔内に存在する。いくつかの実施形態では、この粘膜表面は、消化管内に存在する。

## 【0027】

いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は乳酸杆菌属細菌を経口投与する工程を包含する。いくつかの実施形態では、この接触させる工程は、乳酸杆菌属細菌を腔投与する工程を包含する。いくつかの実施形態では、この接触させる工程は乳酸杆菌属細菌を直腸投与する工程を包含する。

## 【0028】

本発明は、シグナル配列と生物活性ポリペプチドとをコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合されたプロモーターを含む発現カセットを提供し、ここで、この生物活性ポリペプチドは、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、この異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が以下の順番で以下：細胞壁関連配列；LPQ(S/A/T)(G/A)；および疎水性配列を含む。いくつかの実施形態では、上記細胞壁関連配列は、少なくとも50個のアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、この細胞壁関連配列は、少なくとも200個のアミノ酸を有する。

## 【0029】

いくつかの実施形態では、上記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域はさらに領域のカルボキシル末端に荷電配列を有する。

## 【0030】

いくつかの実施形態では、細胞壁標的領域はアミノ酸配列LPQSGを含む。いくつかの実施形態では、細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQAGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTGを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTAを含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、配列番号7を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は配列番号8を含む。いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドは10~600アミノ酸の間である。

## 【0031】

いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質が病原体と接触した場合、この生物活性タンパク質は病原体と結合する。いくつかの実施形態では、上記病原体は、細菌病原体である。いくつかの実施形態では、この病原体は、真菌病原体である。いくつかの実施形態では、病原体はウイルス病原体である。いくつかの実施形態では、このウイルス病原体は、HIVである。

## 【0032】

いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、CD4またはCD4のHIV結

合フラグメントである。いくつかの実施形態では、上記生物活性タンパク質は、2D - CD4である。いくつかの実施形態では、この生物活性タンパク質は、シアノピリン - Nまたはシアノピリン - Nのウイルス結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、この生物活性タンパク質は、単純疱疹ウイルス侵入媒体C (HevC)またはHveCのウイルス結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、上記細胞壁標的領域は、乳酸杆菌属中で機能する。

【0033】

本発明はまた、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域に結合した生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合するプロモーターを含む発現カセットを有するベクターであって、この異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、以下の順番で、以下：細胞壁関連配列；LPQ(S/A/T)(G/A)；および疎水性配列を含むベクターを、提供する。

10

【0034】

(定義)

「生物活性タンパク質」とは、天然の細胞の内または外でアミノ酸配列の生物活性を有する(すなわち分子機構に關与し得る)アミノ酸配列をいう。タンパク質の活性としては例えばその免疫原性、触媒活性、結合親和性等が挙げられる。ポリペプチドワクチンは用語「生物活性タンパク質」に包含される。代表的には、このアミノ酸配列は、天然細胞の内または外でアミノ酸配列により形成される3次元構造を形成する。

【0035】

「2D CD4」とは、ヒトCD4の最初の約183アミノ酸をいう(Arthosら、Cell、1989、57:469-81(1989))。CD4は、成熟ヘルパーT細胞および未成熟胸腺細胞、ならびに単球およびマクロファージ上に見出される、細胞表面糖タンパク質である。2D - CD4は、インタクトタンパク質と同じ親和性でHIV-1 gp120と結合し、gp120に対する結合部位を含む。CD4は、アミノ末端細胞外ドメイン(アミノ酸残基1~371)、膜貫通領域(372~395)、および細胞質内末端(tail)テール(396~433)を含む。

20

【0036】

「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子(単数または複数)で実質的にコードされるポリペプチド、または分析物(抗原)と特異的に結合して、その分析物を認識するそれらのフラグメントをいう。認められた免疫グロブリン遺伝子は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、および $\alpha$ 、および $\mu$ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 $\kappa$ または $\lambda$ のいずれかに分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、または $\alpha$ に分類され、それぞれ免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを規定する。

30

【0037】

例示的な免疫グロブリン(抗体)の構造単位は、4量体を含む。各4量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対で構成され、各対は1個の「軽」鎖(約25kDa)と1個の「重」鎖(約50~70kDa)とを有する。各鎖のN-末端は、抗原認識を主として担う、約100~110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖( $V_L$ )および可変重鎖( $V_H$ )という用語は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖を指す。

40

【0038】

抗体は、例えば、インタクト免疫グロブリン、または様々なペプチダーゼでの消化により生成される、性質が十分特徴付けられた多くのフラグメントとして存在する。従って、例えば、ペプシンはヒンジ領域中のジスルフィド結合下で抗体を消化し、F(ab')<sub>2</sub>(それ自体がジスルフィド結合で $V_H - C_H1$ に連結した軽鎖であるFabの2量体である)を生成する。F(ab')<sub>2</sub>は、緩やかな条件下で還元されてヒンジ領域のジスルフィド結合を切断し得、それによって、F(ab')<sub>2</sub>ダイマーをFab'モノマーに変える。Fab'モノマーは、本質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである(Paul(編)Fundamental Immunology、第3版、Raven Press、NY(1993)参照)。様々な抗体フラグメントが、インタクト抗体の消化の観点

50

から定義されているが、当業者は、このようなフラグメントを、化学的に、または組み換えDNA方法論を利用して、新たに合成し得ることを理解する。従って、本明細書で用いる場合、抗体という用語には、抗体全体の改変により生成されるか、または組み換えDNA方法論を用いて新たに合成されるかのいずれかである抗体フラグメント（例えば1本鎖F<sub>v</sub>）も含まれる。

**【0039】**

「単離された」という用語は核酸またはタンパク質に应用する場合、核酸またはタンパク質が本質的に自然状態で結合する他の細胞成分を含まないことを意味する。均一な状態が好ましいが、乾燥状態でも水溶液でも良い。代表的には、ポリアクリルアミド電気泳動または高速液体クロマトグラフィー等の分析化学技術を用いて、純度および均一性が測定される。調製物中に存在する優勢な種であるタンパク質が、実質的に精製される。特に、単離される遺伝子は、その遺伝子に隣接し、目的の遺伝子以外のタンパク質をコードする、オープンリーディングフレームから、分離される。「精製された」という用語は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲル中で本質的に1個のバンドを生じることを意味する。特に、この用語は、核酸またはタンパク質が、少なくとも純度85%であり、より好ましくは少なくとも純度95%であり、最も好ましくは少なくとも純度99%であることを意味する。

10

**【0040】**

「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、および1本鎖または2本鎖の形態のそれらのポリマーをいう。特に限定しない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似の様式で代謝される天然ヌクレオチドの既知のアナログを含む核酸を包含する。特に示さない限り、ある特定の核酸配列はまた、保存的に改変されたその変異体（例えば縮重コドン置換）、および相補配列、ならびに明示された配列もまた暗黙のうちに含む。具体的には、1つ以上の選択された1個の（または全ての）選ばれたコドンの第3位が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することにより、縮重コドン置換が行われ得る（Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); およびRossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994)）。「核酸」という用語は「ポリヌクレオチド」と互換的に使用される。

20

30

**【0041】**

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学模倣体であるアミノ酸ポリマー、および天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。本明細書で用いる場合、この用語は、全長タンパク質（すなわち抗原）を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含し、ここでこのアミノ酸残基は共有ペプチド結合で連結している。

**【0042】**

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣体をいう。天然に存在するアミノ酸は遺伝子暗号でコードされるものならびに、その後改変されるアミノ酸（たとえばヒドロキシプロリン、 $\beta$ -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリン）である。アミノ酸アナログとは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造（すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基に結合する炭素）を有する化合物（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）をいう。このようなアナログは、改変されたR基（例えばノルロイシン）または改変されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保有している。「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を

40

50

有するが、天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能する化合物をいう。

【0043】

本明細書では、アミノ酸は、一般的に知られた3文字記号で表され得か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号で表され得る。ヌクレオチドも同様に、その一般に受け入れられている1文字表記で表され得る。

【0044】

以下に述べるように、最大一致のために整列させた場合に、2つの配列中でヌクレオチドまたはアミノ酸残基の配列がそれぞれ同じであるならば、2つの核酸配列またはポリペプチドは「同一」とされると言われる。2個以上の核酸またはポリペプチド配列に関して、用語「同一」または「同一性」パーセントとは、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いるか、または手動整列および目視検査によって測定して比較ウィンドウ上での最大一致のために比較し整列させた場合、同一であるか、あるいは特定のパーセントの同一なアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する、2つ以上の配列または部分配列をいう。配列同一性パーセントをタンパク質またはペプチドに関連して用いる場合、同一でない残基の位置が、多くの場合保存的アミノ酸置換により異なり、その場所では、アミノ酸残基が類似の化学的性質（例えば荷電または疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されており、従って分子の機能的性質を変化させないことが認識される。保存的置換で配列が異なる場合、配列同一性パーセントを上方に調節して置換の保守的性質について補正し得る。この調整を行うための手段は当業者に公知である。代表的に、これは保存的置換を完全なミス

10

20

【0045】

2個の核酸またはポリペプチドについての「実質的に同一」という語句は、参照配列と少なくとも70%の配列同一性を有する配列または部分配列をいう。または、同一性パーセントは40%~100%の任意の整数であり得る。より好ましい実施形態としては、以下に述べる標準パラメータを用いるBLAST等の本明細書に記載のプログラムを用いて、参照配列（例えば配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8、またはそのフラグメント）と比較して、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%が挙げられる。

30

【0046】

配列比較のため、代表的には、1つの配列が参照配列として働き、それと試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピューターに入力し、必要あれば部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用することができるか、または別なパラメータを指定することができる。次いでプログラムパラメータに基づき、参照配列に対する配列比較アルゴリズムが試験配列についての現在の配列同一性パーセントを計算する。

40

【0047】

本明細書で用いる場合、「比較窓」には、20~600、通常は約50~約200、より通常は約100~約150個からなる群より選ばれた連続位置数のいずれか一つのセグメントに対する参照が含まれ、その中で2つの配列を最適に整列した後、一つの配列が、連続位置が、同数の参照配列と比較され得る。比較のための配列の整列法は当該分野で周

50

知である。比較のために最適な配列の整列は、例えば、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同アルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同整列アルゴリズム、PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実施(Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison、WI中におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、または手動整列および目視検査により行われ得る。

10

## 【0048】

配列同一性パーセントと配列類似性の決定に適したアルゴリズムの例は、Altschulら、J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)に記載のBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationから公に入手可能である。このアルゴリズムには、最初にクエリ(query)配列中の長さWのショートワードを同定することによってハイスコア配列対(HSP)を同定する工程を包含する。データベース配列中の同じ長さのワードと整列した場合、HSPは、ある正の値の閾値スコアTと一致するか、またはそれを満たすかのいずれかである。Tは、近隣ワードスコア閾値(neighborhood word score threshold)と呼ばれる(Altschulら、前出)。最初の近接ワードヒットは、それらのワードを含むより長いHPSを見出すための検索を開始するシードとして働く。累積整列スコアが増加し得る限り、ワードヒットは各配列に沿って両方の方向に延長される。累積整列スコアがその最大達成値から量Xだけ低下した場合、1つ以上の負スコア残基整列の蓄積のために累積スコアがゼロ以下になった場合、またはいずれかの配列の末端に達した場合、各方向へのワードヒットの延長を停止する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは整列の感度と速度を決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、ワード長(W) 11、BLOSUM62スコアリングマトリックス(HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)参照)整列(B) 50、期待値(E) 10、M = 5、N = 4、および両方の鎖の比較を使用する。

20

30

## 【0049】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析を行う(例えば、KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)参照)。BLASTアルゴリズムが提供する類似性の基準の1つは、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率を示す最小和確率(P(N))である。例えば、参照核酸に対する試験核酸の比較における最小和確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、その核酸は参照配列に類似すると考えられる。

## 【0050】

例えば細胞、核酸、タンパク質またはベクターに関して用いられる場合、「組み換え」または「組み換えで変化された」という用語は、その細胞、核酸、タンパク質またはベクターが異種核酸もしくは異種タンパク質の導入によってかまたはネイティブ核酸もしくはネイティブタンパク質の変化によって改変されたか、あるいは細胞がそのようにして改変された細胞に由来することを示す。従って、例えば、組み換え細胞は、その細胞のネイティブ(非組み換え)形態に見出されない遺伝子を発現するか、さもなければ異常発現するか、発現量が少ないか、またはまったく発現しないネイティブ遺伝子を発現する。

40

## 【0051】

核酸またはポリペプチドの部分に関して使用される「異種」という用語は、核酸またはポリペプチドが天然で相互に同じ関係で見出されない2個以上の部分配列を有することを

50

示す。例えば、その核酸は、代表的には組み換えで製造され、新しい機能性核酸を生成するように配置された無関係の遺伝子由来の2個以上の配列（例えばある起源由来のプロモーターおよび別の起源由来のコード領域）を有する。同ように、異種タンパク質とは、タンパク質が天然で相互に同じ関係で見出されない2以上の部分配列を含むことを示す（例えば融合タンパク質）。

【0052】

「発現カセット」とは、宿主細胞内における特定の核酸の転写が可能である一連の特定核酸要素を有する、組み換えまたは合成で生成される核酸である。発現カセットはプラスミド、ウイルスまたは核酸フラグメントの一部であり得る。代表的には、発現ベクターとしては、プロモーターに作動可能に結合して転写されるべき核酸が挙げられる。

10

【0053】

（発明の詳細な説明）

（I．はじめに）

本発明は乳酸杆菌属等のグラム陽性菌の細胞壁に異種ポリペプチドを発現するための新規なモチーフおよび方法を提供する。本発明のモチーフを目的のタンパク質と融合され、次いで細菌中の融合タンパク質として発現され、その結果、融合タンパク質が、細胞壁の標的となるか、埋め込まれるか、および/または表面に提示されるか、あるいは生物学的に活性であり、かつ安定な融合タンパク質が、細胞外マトリックスに放出され得る。

【0054】

モチーフは、例えば、腔を含むヒト粘膜でコロニーを形成する乳酸杆菌属細菌の細胞壁上にタンパク質を発現するために有用である。例示的な粘膜細菌としては、*L. jensenii*、*L. gasserii*および*L. casei*等の乳酸杆菌属種が挙げられる。

20

【0055】

（II．細胞壁標的領域）

乳酸杆菌属等のグラム陽性菌の細胞壁に共有結合された目的のポリペプチドを発現し、標的とするために、細胞壁標的領域は、目的の異種ポリペプチドにC-末端で結合している。腔関連乳酸杆菌および他の乳酸杆菌において異種タンパク質を表面提示し得る細胞壁標的領域は、4つの部分：細胞壁関連領域、LPQ(S/A/T)(G/A)配列、および疎水性配列から、代表的にはこの順番で構成される。必要に応じて細胞壁標的領域は、カルボキシル末端またはその近くに荷電領域を含む。この荷電領域は、細胞膜中で移動停止配列として作用し、それによって培地中への放出を阻止する。もちろん、アンカー配列がタンパク質の残りの部分から切り取られた場合、やはり培地中への放出が生じ得る。

30

【0056】

（A．細胞壁関連領域）

細胞壁関連領域は、LPQ(S/A/T)(G/A)識別シグナルに先行する。細胞壁関連領域の長さは変化し得る。細胞壁関連領域は代表的には、40アミノ酸と1,000アミノ酸との間である。いくつかの実施形態では、細胞壁関連領域は、少なくとも約30、50、80、100、150および200アミノ酸または、それより大きい。いくつかの実施形態では、細胞壁関連領域は約500、400、300、250、200、150、100またはそれ未満のアミノ酸を有する。*Lactobacillus jensenii*では、pOSEL268中のC-末端細胞壁識別シグナルと融合する一縦列反復を含む95アミノ酸伸長（実施例に記載）により、CD4の表面提示が可能になる。しかしながら、フィブロネクチン結合タンパク質の約90アミノ酸が*S. carnosus*中で想定されている（StraussおよびGotz、Mol. Microbiol. 21: 491-500(1996)）一方で、ペプチドマッピングに基づいて*S. pyogenes*のM6タンパク質中の約50アミノ酸長が同定された（PancholiおよびFischetti、J. Bacteriol. 170: 2618-2624(1988)）。従って、約50アミノ酸以下の配列が、乳酸杆菌属中で機能性であり得る。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、細胞壁関連領域は疎水性である。いくつかの実施形態では、

50

細胞壁関連領域は長さで配列が変化し得る不完全縦列反復を含む。例えば、L. j e n s e n i i C 3 7 0 の細胞壁関連領域は、2.5個の縦列反復を含む。しかし、縦列反復は、細胞壁関連領域に起こり得るが、必要ではない。例えばC 1 4 の細胞壁関連領域は、反復を含まない。機能的には、細胞壁関連領域は、ペプチドグリカン層と相互作用して、それを貫通 (span) する。従って、その領域は細胞壁貫通 (spanning) ドメインまたは細胞壁付着ドメインとも呼ばれ、膜結合ソルターゼで固定されるタンパク質と細胞壁識別シグナルとの間のスペーサーとして作用する。

【0058】

本発明は、C 3 7 0 配列：

【0059】

【化1】

KKAEVVKNNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNLDLGGQTTDKSKLDEAIKSADDTKSTD  
KYNNASDDTKSKFDEALKKAEVVKNNNSNATQKEVDDATKLNKQAQNLDLGGQTTN  
KDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDTKSKFDDALKKAEDVKNDSNANQKEVDD  
ATKLNKNTLNNLKGQPAKKANLIASKDNAKIHKQTL ( 配列番号 :4).

と実質的に同一の細胞壁関連領域を提供する。ある場合は、細胞壁関連領域は少なくともC 3 7 0 配列の約40、50、75、90、100、120、150、175、200アミノ酸フラグメントを有する。例えば、活性細胞壁関連フラグメントは、以下の配列：

【0060】

【化2】

GQTTNKDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDTKSKFDDALKKAEDVKNDSNANQK  
EVDDATKLNKNTLNNLKGQPAKKANLIASKDNAKIHKQTL ( 配列番号 :5). The

を有し得る。C 3 7 0 配列 ( 配列番号 4 ) は、75個の荷電アミノ酸残基 ( K、R、D、E ) を含み、Pro - Gly 富化配列が欠失している。

【0061】

いくつかの実施形態では、細胞壁関連領域は、実質的にC 1 4 配列：

【0062】

【化3】

VTRTINVDPITGKISTSVQTAFTREDKNSNAGYTDPVTGKTTMNPWTPAKQGLRA  
VNVEQIKGYVAKVDGNVDVAVVTPDSANMVVTTYQANKPEGQNITVKKDTPDP  
ADGIKNKDDLDPGTYKWTWKEVPDVNSVGEKTGIVTVTFPDGTSVDVKVTVYVDPVV  
ESNRDTLSKEANTGNTNVAKAATVTSSKVESKKT ( 配列番号 :6).

と同一である。ある場合は、細胞壁関連領域は、C 3 7 0 配列の少なくとも約40、50、75、90、100、120、150、175、200アミノ酸フラグメントを含む。配列番号6は、51個の荷電アミノ酸残基 ( K、R、D、E ) を含む。

【0063】

ある場合は、細胞壁関連領域は、乳酸杆菌属以外の細菌、または脛と関連しない乳酸杆菌属株由来である。

【0064】

( B . L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) )

配列L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) は乳酸杆菌属の脛関連株において細胞壁局在化シグナルとして作用する。モチーフL P Q ( S / A / T ) ( G / A ) の少なくとも1個のコピーは細胞壁標的領域内にある。モチーフ中の括弧はその位置の別なアミノ酸を示す ( 例えばL P Q S G、L P Q A G、L P Q T G、L P Q S A、L P Q A A、L P Q T A ) 。

【0065】

10

20

30

40

50

## ( C . 疎水性配列 )

細胞壁に固定されるポリペプチドのカルボキシル末端は細菌膜 ( bacterial membrane ) を貫通するように機能する疎水性領域を含む。疎水性領域は少なくとも約 50 %、ある実施形態では少なくとも 60 %、70 %、80 % または 90 % の疎水性アミノ酸を含む。天然起源疎水性アミノ酸にはアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファンおよびバリンが含まれる。グリシン、トレオニンおよびセリンを含む、より疎水性の少ないアミノ酸もこれらの配列の一部を構成し得る ( 例えば Pallenら、Trends Microbiol . 9 : 97 - 101 ( 2001 ) 参照 )。ソルターゼ様タンパク質の可変 LPXTG 含有基質の間で疎水性配列は一般に長さが約 10 ~ 約 30 アミノ酸、場合によっては 13 ~ 24 アミノ酸の間である ( Pallenら、Trends Microbiol . 9 : 97 - 101 ( 2001 ) )。典型的な疎水性配列には例えば C14 中の V<sup>1 7 4 0</sup> G I L G L A I A T V G S L L G L G L V<sup>1 7 5 8</sup>、および C370 中の P<sup>1 8 7 7</sup> L T A I G I G L M A L G A G I F A<sup>1 8 9 4</sup> が含まれる。

10

## 【 0066 】

または、グラム陽性細菌由来の任意の細胞壁アンカータンパク質の疎水性領域を用いることができる。他の疎水性配列には例えば米国特許第 5,821,088 号の図 1 に記載のもの、またはそれと実質的に同一の配列が含まれる。さらに別な配列が Pallenら、Trends Microbiol . 9 : 97 - 100 ( 2001 ) の表 2 にも示されている。

20

## 【 0067 】

## ( D . 荷電配列 )

荷電領域が細胞壁標的タンパク質のカルボキシル末端、代表的には疎水性膜貫通領域の直後に任意に存在し得る。カルボキシル末端荷電領域の存在によりポリペプチドが膜に固定され、その結果膜から解離し培地中へ漏れ出すタンパク質の量が大いに減少する。荷電領域は少なくとも 40 %、ある実施形態では少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 % または 90 % の荷電アミノ酸を有する。天然起源荷電アミノ酸にはアルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。荷電配列は例えば長さで 2 ~ 20 アミノ酸残基の間、ある実施形態では 4 ~ 12 または 5 ~ 11 アミノ酸の間である。典型的な荷電配列には例えば C191 中の K<sup>9 6 9</sup> K R K E D<sup>9 7 4</sup>、C14 中の R<sup>1 7 6 0</sup> K K R Q K<sup>1 7 6 5</sup> および C370 中の K<sup>1 8 9 5</sup> K K R K D D E A<sup>1 9 0 3</sup> が含まれる。

30

## 【 0068 】

または、グラム陽性細菌由来の任意の細胞壁アンカータンパク質の荷電領域を使用できる。別な荷電配列には例えば米国特許第 5,821,088 号の図 1 に記載のもの、およびそれと実質的に同一の配列が含まれる。また別な配列が Pallenら、Trends Microbiol . 9 : 97 - 100 ( 2001 ) の表 2 にも示される。

## 【 0069 】

## ( I I I . 組み換え技術 )

## ( A . 分子生物学法 )

本発明は組み換え遺伝子学の分野における慣用的な技術に依存している。本発明において使用する一般的な方法を開示する基本的なテキストには Sambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual ( 第 3 版、2001 ) ; Kriegl er、Gene Transfer and Expression : A Laboratory Manual ( 1990 ) ; および Current Protocols in Molecular Biology ( Ausubelら、編集、1994 ) が含まれる。

40

## 【 0070 】

核酸では、サイズはキロベース ( kb ) または塩基対 ( bp ) で与えられる。これらはアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動、配列決定された核酸、または公開された

50

DNA配列から見積もられる。タンパク質では、サイズはキロダルトン(kDa)またはアミノ酸残基数で与えられる。タンパク質のサイズはゲル電気泳動、配列決定されたタンパク質、導かれたアミノ酸配列、または公開されたタンパク質配列から見積もられる。

**【0071】**

市販されていないオリゴヌクレオチドを、BeaucageおよびCaruthers、Tetrahedron Letts. 22:1859-1862(1981)に最初に記載された固相ホスホラミダイトリエステル法に従って、Van Devanterら、Nucleic Acids Res. 12:6159-6168(1984)に記載の様に自動合成装置を用いて化学的に合成することができる。オリゴヌクレオチドの精製はPearsonおよびReanier、J. Chrom. 255:137-149(1983)に記載の通りに天然アクリルアミドゲル電気泳動または陰イオン交換HPLCによって行われる。

10

**【0072】**

クローン化された遺伝子、および合成オリゴヌクレオチドの配列を、例えばWallaceら、Gene 16:21-26(1981)の二重鎖テンプレートの配列決定のための鎖停止法を用いてクローニング後に確認することができる。

**【0073】**

(B. 所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を単離するためのクローニング法)

一般に、目的とするタンパク質をコードする核酸を、cDNAまたはゲノムDNAから作製したDNAライブラリーからクローニングする。特定の配列の位置をオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズすることにより決定することができるが、その配列は本明細書に開示した配列または当該分野で公知の配列から導かれ、PCRプライマーの参考となり、遺伝子特異的プローブを単離するために適当な領域を規定する。または、配列が発現ライブラリー中にクローニングされる場合は、本明細書に開示されるポリペプチドを含め目的のポリペプチドに対して作製された抗血清または精製抗体を用いて発現組み換えタンパク質を免疫学的に検出し得る。

20

**【0074】**

ゲノムおよびcDNAライブラリーを作製およびスクリーニングする方法は当業者に周知である(例えばGulberおよびHoffman、Gene 25:263-269(1983); BentonおよびDavis、Science、196:180-182(1977);およびSambrook、前出参照)。目的のタンパク質を発現する細胞はcDNAライブラリーを作製するための有用なRNA源である。

30

**【0075】**

簡単に言えば、cDNAライブラリーを作製するため、mRNAに富んだ起源を選ばなければならない。次いでmRNAをcDNAに変換し、組み換えベクター中に連結し、増殖、スクリーニングおよびクローニングのために組み換え宿主中に形質導入する。ゲノムライブラリーでは、DNAを適当な組織または細胞から抽出し、機械的に剪断するか酵素的に消化して好ましくは約5~100kbの断片を生成する。次いで断片を望ましくないサイズのものから濃度勾配遠心で分離し、バクテリオファージラムダベクター中に構築させる。これらのベクターおよびファージはインビトロでパッケージングされ、組み換えファージをブラスターハイブリダイゼーションで分析する。コロニーハイブリダイゼーションはGrunsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:3961-3965(1975)に一般的に記載されている様に行われる。

40

**【0076】**

別な方法では、合成オリゴヌクレオチドプライマーの使用と、mRNAまたはDNAテンプレート上でのポリメラーゼ延長とが組み合わされる。このポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法では、目的のタンパク質をコードする核酸がmRNA、cDNA、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから直接増幅される。プライマー中には制限エンドヌクレアーゼ部位が組み込まれ得る。ポリメラーゼ連鎖反応法、または他のインビトロ増幅

50

法も、例えば特定のタンパク質をコードする核酸のクローニングおよびそのタンパク質の発現、生理学試料中で本発明のポリペプチドをコードするmRNAの存在を検出し、核酸の配列を決定する、または他の目的のためのプローブとして使用される核酸の合成に有用であり得る（米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号参照）。PCR反応によって増幅された遺伝子はアガロースゲルから精製され、そして適当なベクター中にクローン化され得る。

【0077】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を組織または細胞試料から同定するための適当なプライマーおよびプローブを、当該分野で記載の配列から導くことができる。PCRの概説としてはInnisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press、San Diego (1990) 参照。

10

【0078】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、乳酸杆菌属中に形質転換する前に中間ベクターを使用してクローニングすることができる。これらの中間ベクターは代表的には原核生物ベクターまたはシャトルベクターである。

【0079】

(C. 形質転換技術)

適当な細菌宿主株を、例えばその形質転換能、異種タンパク質発現能、および/または粘膜表面でのコロニー形成能で選択される。細菌宿主を塩化ルビジウム法またはエレクトロポレーション等の標準技術を用いて形質転換受容性にする（例えばWeiら、J. Microbiol. Meth. 21:97-109 (1995) 参照）。

20

【0080】

エレクトロポレーションによる*L. jensenii*の形質転換を、例えばLuchanskyら(J. Dairy Sci. 74:3293-3302 (1991)); Changら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:11672-11677 (2003))に規定される様な標準法を改変して行うことができる。簡単に言えば、新しく接種した*L. jensenii*をブロス中で培養する（例えば37、5% CO<sub>2</sub>でOD<sub>600</sub>が0.6~0.7まで）。細菌細胞を収集し、洗浄し、スクロースとMgCl<sub>2</sub>の冷溶液（例えば4）中に再懸濁する。コンピテント細胞を次いでDNAと混合し、冷却したギャップキュベット中にいれ、エレクトロポレーションする。その後、選択試薬以外の抗生物質を含む選択寒天プレート上に接種する前に、予め加熱したブロス中で細胞を回収する（例えば37で約2時間）。

30

【0081】

(D. 発現)

本発明の発現カセットは、本発明のポリペプチドの発現と位置決めを制御するための様々な成分を含み得る。例えば、発現カセットはプロモーター要素、シグナル配列をコードする配列、目的のポリペプチドに対するコード配列、およびアンカー配列を含むことができる。

【0082】

異種ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現は構成的であり得る（例えばP59 (Van der Vossenら、Appl. Environ. Microbiol. 58:3142-3149 (1992))もしくはP23 (Elliotら、Cell. 36:211-219 (1984))プロモーター、またはより高い強度を有する乳酸杆菌属由来の天然プロモーターを用いて)。または、発現は誘導性プロモーターの制御下に行うことができる。例えば、*Bacillus* アミラーゼ (Weickertら、J. Bacteriol. 171:3656-3666 (1989)) またはキシロース (Kimら、Gene. 181:71-76 (1996)) プロモーターの他、*Lactococcus* ナイシンプロモーター (Eichenbaumら、Appl. Environ. Microbiol. 64:2763-2769 (1998)) を誘導性発現を推進するた

40

50

めに使用することができる。さらに、酸またはアルカリ誘導プロモーターを使用することもできる。例えば、腔の比較的酸性の条件下で活性なプロモーターを使用し得る。または、精子に反応する腔内の変化で誘導されるプロモーターも使用し得る。例えば、精子の導入の結果である腔のアルカリ条件の増大に反応して発現を誘導するために、アルカリ誘導プロモーターを使用する。

#### 【0083】

様々なシグナル配列がポリペプチドの発現を膜、細胞外空間または細胞壁に導くことが知られている（例えばペプチドグリカンへの共有結合付着により）。例示的なシグナル配列には *L. amylovorus* の - アミラーゼ由来のシグナル配列（*Giraud* および *Cuny*、*Gene*、198：149 - 157（1997））または *L. crispatus* の S - 層遺伝子（*cbSA*）由来のシグナル配列（例えば *MKKNLRIVSAA* *AAAAALLAVAPVAA* または *MKKNLRIVSAA* *AAAAALLAVATVSA*）が含まれる。シグナル配列は代表的にはポリペプチドのアミノ末端に位置している。

10

#### 【0084】

ポリペプチドの正確な位置と折り畳みを標準法を用いて決定し得る。例えば、細菌を緩衝液（例えば25%スクロース、1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH 8.0）に懸濁し、次いで細胞壁分解酵素（例えばリゾチームおよびムタノリシン）で処理し、次いで得られたプロトプラストを分画遠心法で分離することにより、乳酸杆菌属の細胞壁富化画分を得ることができる。画分をウエスタンブロッティングでスクリーニングして細胞壁内の発現を確認し得る。

20

#### 【0085】

発現したポリペプチドの折り畳みと生物活性も、標準法を用いて決定し得る。例えば、天然の折り畳みポリペプチド特異性抗体を用いる ELISA アッセイを用いてポリペプチドの折り畳みと3次元構造を確認することができる。生物活性アッセイも、ポリペプチドの活性に応じて当然変化する。例えば、ウイルスタンパク質に結合するポリペプチドでは、標準結合アッセイを用いて発現したポリペプチドのウイルスタンパク質結合能を試験することができる。抗炎症分子では、発現したポリペプチドの炎症促進する物質との拮抗能をアッセイすることができる。

#### 【0086】

宿主細胞中の発現を改善するための遺伝子を合成する場合、そのコドン利用頻度を宿主細胞の好ましいコドン利用頻度に近づける様に遺伝子を設計することが望ましい。合成遺伝子に対する好ましいコドン利用頻度の、宿主細胞が使用する頻度からの偏差率が、1個のコドンの利用頻度の宿主細胞の利用頻度からの偏差率をまず測定し、次いでコドン全体の平均偏差を得て計算される。

30

#### 【0087】

特定のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、特定の宿主のコドン利用と一致する様に变化させることができる。例えば、乳酸杆菌属のコドン利用を使用して、本発明のポリペプチドをコードし、好ましい乳酸杆菌属のコドンを持つポリヌクレオチドを誘導することができる。宿主細胞が提示する好ましいコドンの利用頻度を、宿主細胞が発現する多数の遺伝子中の好ましいコドンの利用頻度を平均して計算することができる。この解析は宿主細胞で高度に発現する遺伝子に限定することが好ましい。例えば、*Pouwels* ら（*Nucleic Acids Res.* 22：929 - 936（1994））は様々な乳酸杆菌属種が示す高度発現遺伝子によるコドン利用頻度を提供している。コドン利用表はインターネットを通じても入手できる。

40

#### 【0088】

（IV. 本発明のタンパク質）

本発明のポリペプチド、例えば本発明の細胞壁標的領域に融合する生物活性ポリペプチドは、任意のポリペプチドであり得る。代表的には、本発明のポリペプチドはポリペプチドの生物活性を考慮した条件下で発現する。ある実施形態では、発現ポリペプチド中にジスルフィド結合が存在する。ある実施形態では、ポリペプチドの生物活性にジスルフィド

50

結合が必要である。

【0089】

本発明のポリペプチドは任意のサイズの分子量であり得る。例えば、ポリペプチドは約100～200,000ダルトンの間、約500～40,000ダルトンの間、約500～10,000ダルトンの間、約10,000～50,000ダルトンの間、または約50,000～200,000ダルトンの間であり得る。

【0090】

病原体感染を予防または治療するために本発明の方法に従って使用し得るポリペプチドクラスの例には、例えば抗体、抗体断片、または1本鎖抗原を含め抗ウイルスポリペプチド、抗菌ポリペプチド、抗真菌ポリペプチド、およびウイルス、細菌または真菌に結合するポリペプチドが含まれる。

10

【0091】

ある場合は、本発明のポリペプチドはウイルスまたは細菌病原体が結合して宿主を感染させるレセプターである。または、ポリペプチドは例えば病原体の複製、生存率、侵入またはさもなければ病原体への結合を阻害する薬剤である。ある実施形態では、本発明のポリペプチドは性的に伝播する病原体、および膣から伝播、または膣へ伝播する他の病原体に結合またはそれらを阻害する。例えば、ウイルスは感染のために標的細胞表面上のレセプターに結合することが必要であるので、ウイルスとその宿主レセプターとの相互作用を阻害することを目的とする戦略は、感染防止に有効である。

【0092】

典型的な抗ウイルスポリペプチドには例えばCD4またはそのウイルス結合断片（例えば2D-CD4：例えばOrloffら、J. Virol. 67:1461-1471 (1993)）、3量体モチーフを経由して生成する安定なCD4の3量体（例えばYangら、J. Virol. 76:4634-4642 (2002)）、CD4-Ig融合タンパク質12量体（Arthosら、J. Biol. Chem. 277:11456-11464 (2002)）、 $\alpha$ -デフェンシン（例えばZhangら、Science、298:995-1000 (2002)）、17bmAbの1本鎖可変領域と融合したCD4（Deyら、J. Virol. 77:2859-2865 (2003)）、シアノピリン-Nまたは改変体（例えばBolmstedtら、Mol. Pharmacol. 59:949-954 (2001)；Moriら、Protein Expr. Purif. 26:42-49 (2002)）、単純疱疹ウイルス侵入メディエーターC（HVEC：例えばCocchiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:15700-15705 (1998)）、およびICAM-1が含まれる。他の実施形態には例えばウイルスレセプターまたはヘパリンまたはヘパリン様分子、樹状細胞特異性ICAM-3グラビングノンインテグリン（例えばGeijtenbeekら、Cell、100:587-597 (2000)；Feinbergら、Science、294:2163-2166 (2001)）を含むマンノース結合レクチン、抗HSV-1 gp120 1本鎖抗体（例えばMarascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:7889-7893 (1993)；McHughら、J. Biol. Chem. 277:34383-34390 (2002)）、HIV-1 gp120のCD4結合部位を認識するヒトmAb b12（例えばSapphireら、Science、293:1155-1159 (2001)）、またはHSVに結合する中和抗体を含む同様な特異性を有する他の分子（例えばBurioniら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:355-359 (1994)）、およびHIV-1侵入阻害タンパク質（例えばRootら、Science、291:884-888 (2001)；Siaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:14664-14669 (2002)）が含まれる。

20

30

40

【0093】

ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）による感染は頸部癌の発症に関連する因子である（例えばzur Hausen、Virology、184:9-13 (1991)；Stan

50

ley、Best Prat. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 15: 663 - 676 (2001))。従って、HPVを阻害する、またはそれに結合する分子の存在は、HPV感染と頸部癌の発症の両方の阻止に有用である。典型的な抗HPVポリペプチドには例えばヒト乳頭腫ウイルス16型タンパク質E6またはE7に結合する中和抗体(例えばMannhartら、Mol. Cell Biol. 20: 6483 - 6495 (2000))、HPV-結合タンパク質、またはウイルス指向免疫反応を誘発するために使用し得るHPVタンパク質が含まれる。

#### 【0094】

ウイルスまたは細菌等の病原体に結合する能力を、少なくとも数個の方法で本発明の細菌に授け得る。その第1はヒトライノウイルスHRV(主要グループ)に対するICAM-1およびHIVに対するCD4等の、ウイルスに対する正常な宿主レセプターを細菌の表面に発現させることである。これらは正常なヒトタンパク質であり、これらの遺伝子の完全な配列の多くが決定され、データベースGenBankに保存されている。

第2の方法は、ポリオウイルス上のVP4またはHIV上のgp120等のウイルス表面上の保存性抗原決定基に結合する抗体断片または他のポリペプチドを細菌表面に発現することである。本質的に任意の抗原に特異性のある抗体断片(およびペプチド)を、例えばファージ提示ライブラリー(Marksら、J. Biol. Chem. 267: 16007 - 16010 (1992))から選ぶことができる。抗体を任意の病原体上のエピトープまたは病原体と結合するエピトープの他、以下に議論するエピトープ等の他のエピトープを指向させることができる。

#### 【0095】

第3の方法には、細菌表面上の炭水化物結合ポリペプチドの発現が含まれる。これらの分子の例にはヘパリン結合ポリペプチド、またはマンノース結合ポリペプチドが含まれる。

#### 【0096】

抗細菌ポリペプチドには尿路病原性E. coliに結合する、またはその生育もしくはそれによるコロニー形成を阻害するポリペプチドが含まれる。典型的な抗細菌ポリペプチドには例えばグラム陰性細菌に対する透過性増大タンパク質(Levy、Expert Opin. Investig. Drugs、11: 159 - 167 (2002))、哺乳動物抗微生物ペプチド、-デフェンシン(GarzおよびLehrer、Pharmacol. Ther. 66: 191 - 205 (1995))、バクテリオシン(例えばLoefflerら、Science、294: 2170 - 2172 (2001))、および細菌に特異的に結合する抗体が含まれる。

#### 【0097】

抗真菌ポリペプチドにはCandida等の真菌に結合する、またはその生育もしくはそれによるコロニー形成を阻害するポリペプチドが含まれる。

#### 【0098】

本発明に記載の有用な生物活性ポリペプチドのさらに別な例には抗炎症分子、成長因子、成長因子に結合するかまたはそれに拮抗する分子、治療用酵素、抗体(例えば抗体断片または1本鎖抗体を含む)、および子宮頸部癌を含む癌を阻害するかまたは治療する分子等の治療用ポリペプチドまたは薬剤が含まれる。数多くの他の治療活性ポリペプチドを容易に引用することができるので、これらの例は制限的であることを意図するものではない。

#### 【0099】

抗炎症分子には例えばTNFまたはIL-8に特異的に結合する抗体または他の分子が含まれる。他の例示的な抗炎症分子には、IL-10およびIL-11が含まれる。

#### 【0100】

本発明で有用な成長因子には例えばKGF、HB-EGF、FGFおよびTGF-等の局所組織修復に係わる因子、またはこれらの分子の拮抗剤が含まれる。

#### 【0101】

10

20

30

40

50

治療用酵素には例えば一酸化窒素 (NO) シンターゼが含まれる。

【0102】

抗癌性分子にはアポトーシスを誘導する分子、p53等の細胞周期を調節する分子、または癌特異性エピトープを標的とするワクチンとして作用する分子が含まれる。

【0103】

本発明で有用なワクチン分子にはウイルス、細菌または真菌に対する免疫反応を誘起するポリペプチドが含まれる。典型的なウイルスワクチンは例えばHIV、HPV、HSV-2または天然痘に対する反応を誘発する。典型的な抗原にはHSV-2の糖タンパク質D、ヒト乳頭腫ウイルスのタンパク質E6およびE7、Chlamydia trachomatisの主要外膜タンパク質(KimおよびDeMars、Curr. Opin. Immunol. 13: 429-436 (2001))、およびCandida albicansのアスパルチルプロテアーゼ(De Bernardisら、Infect. Immun. 70: 2725-2729 (2002))；尿路病原性E. coliのFimH(Langermannら、Science、276: 607-611 (1997))；腸管外病原性E. coliのIronN(Russoら、Infect. Immun. 71: 7164-9 (2003))が含まれる。

【0104】

(V. 送達)

遺伝子組み換え細菌の所望の粘膜表面への送達は、その領域への近づき易さと局部条件に依存する。例えば、遺伝子組み換え細菌を食塩水、または腔粘膜上へ送達するための発泡体の中に入れ得る。発泡体には例えば1種以上の疎水性に修飾したセルロース誘導體またはキトサン等の多糖が含まれ得る。セルロース誘導體には例えばヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース等が含まれる。キトサンには例えば以下のキトサン塩：乳酸キトサン、サリシル酸キトサン、ピロリドンカルボン酸キトサン、イタコン酸キトサン、ナイアシン酸キトサン、蟻酸キトサン、酢酸キトサン、没食子酸キトサン、グルタミン酸キトサン、マロン酸キトサン、アスパルギン酸キトサン、グリコール酸キトサン、および4級アミン置換キトサンおよびその塩などが含まれる。発泡体にはまた水、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、グリセリン、グリセロール、プロピレングリコールおよびソルビトール等の他の成分も含まれ得る。殺精子剤は細菌組成物に任意に含まれる。発泡体および発泡体送達ビヒクルのさらに別な例は例えば米国特許第5,595,980号および同第4,922,918号に記載されている。

【0105】

または、細菌を坐薬またはペッサリーとして送達することもできる。例えば米国特許第4,322,399号を参照のこと。ある実施形態では、本発明の細菌は溶解性で選ばれた可溶性ポリマー材料および/または複合炭水化物材料で製造された可溶性要素として送達されるが、それは使用前は実質的に固形物のままであり、使用中にヒトの体温と水分で溶解して所望の徐放および投与量で薬剤物質が放出される。例えば米国特許第5,529,782号参照。細菌はまた、米国特許第4,693,705号に記載の様にスポンジ送達ビヒクル中で送達される。

【0106】

ある実施形態では、細菌は経口投与される。例えば、約 $10^8$ 個の乳酸桿菌の毎日の用量を、正常な泌尿生殖器微生物相を回復するために使用し得る。例えばReidら、FEMS Immunol. Microbiol. 32: 37-41 (2001)参照。

【0107】

ある実施形態では、遺伝子組み換え細菌の粘膜表面への投与には定期的な繰り返しが必要である：最適投薬間隔は日常的に決定されるが、粘膜環境と細菌株によって異なる。投薬間隔は1日1回から2~4週ごとに1回まで変化し得る。

【0108】

10

20

30

40

50

天然型乳酸杆菌属を形質転換するためにバクテリオファージが導入される場合、選択したバクテリオファージの核酸を操作して、異種遺伝子がバクテリオファージ被覆タンパク質をコードする遺伝子を置換し、バクテリオファージを複製不能 ( r e p l i c a t i o n - d e f e c t i v e ) とすることができる。これらの組み換えDNA分子を機能性バクテリオファージタンパク質を含む細胞溶解物に加えることにより、異種遺伝子を含む機能性バクテリオファージ粒子を組み立てることができる。次いでこれらの複製不能バクテリオファージ粒子を所望の粘膜表面上に導入し、選択した細菌叢に感染させることができる。粘膜表面への典型的な投薬量は  $10^8 \sim 10^{12}$  PFU/ml であると思われる。処置表面に対する溶液の割合は、粘膜表面平方センチあたり約  $0.1 \sim 1.0$  ml である必要がある。ビヒクルは細菌に対する上記ビヒクルと同様である。

10

## 【実施例】

## 【0109】

以下の実施例は説明のために提供されるものであり、本発明を制限するものではない。

## 【0110】

ほとんどのウイルスは鼻、口、消化器または泌尿生殖器等の粘膜を通して感染する。これらの粘膜には、健康な女性の腔内の *L. jensenii*、*L. gasseri* および *L. crispatus* を含む膨大な数の共生細菌が自然にコロニーを形成している。細菌表面に固定された生物活性ウイルス結合タンパク質を発現する遺伝子組み換え *L. jensenii* が粘膜内でウイルスを捕捉し、従ってウイルスが下層の上皮細胞やリンパ球に接近することを妨害するものと、本発明者らは予想している。これらの捕捉されたウイルスは感染を中止し、そして/または乳酸桿菌が分泌する乳酸および過酸化水素等の抗ウイルス化合物で局所的に不活性化され、その結果感染性ウイルス粒子の数をかなり減少する。従って、遺伝子組み換え乳酸杆菌属が HIV 結合リガンド、2-ドメイン CD4 およびシアノピリン N を高濃度で表面に発現するためのモジュール発現アプローチを行った。  $10 \sim 600$  アミノ酸のポリペプチドが効果的に細胞壁に固定されて提示されることは、*L. jensenii* の天然タンパク質由来のタンパク質ドメインへ融合することにより達成され得ることを本発明者らは見出した。

20

## 【0111】

M6 タンパク質は標識細胞壁識別シグナルである LPXTG モチーフと、その後に一続きの疎水性アミノ酸、最後に臨界細胞表面保持シグナルとなる荷電残基 (KRKEEN) を有する。2 個の良く性質が分かった *S. pyrogenes* の M6 タンパク質 (emm6) または *L. paracasei* の PrtP プロテアーゼ由来の細胞壁アンカーモチーフ、または *S. pyrogenes* の M6 タンパク質由来のアンカーモチーフ、さらに M6 タンパク質の天然配列由来の N-末端 100 アミノ酸伸長部 (CWA100) を利用して、*L. jensenii* 表面に CD4 を発現するためのプラスミドベースのモジュールアプローチを本発明者らは最初に試みた。M6 タンパク質と異なり、PrtP に対する局在化シグナルは LPKTA である。大量の 2D CD4 が馴化培地中に放出されたが、馴化培地中のタンパク質、および細胞壁アンカーとしての M6 または PrtP または CWA100 を有する修飾 *L. jensenii* 中の細胞壁またはプロトプラスト会合タンパク質プールのウエスタン分析により、検出し得る細胞壁関連 2D CD4 は見出されなかった。フローサイトメトリー分析でも、陽性の表面露出 2D CD4 は同定されなかった。

30

40

## 【0112】

(推定細胞壁アンカー配列の同定)

*L. jensenii* のゲノム配列のデータベース検索により、推定細胞壁アンカーモチーフを有する約 30 個のコンティグが同定された。National Center for Biotechnology のウェブサイトを利用し得る非冗長データベース中のより詳細な配列相同性検索に基づき、本発明者らは C14, C191 および C370 と名付けられる 3 個の配列を選択した。それらはそれぞれ、*Lactobacillus fermentum* の R1p (Turner ら、Appl. Environ. Microbiol. 69: 5855 - 5863 (2003))、またはストレプトコッカル表面タ

50

ンパク質のファミリー (Wastfeltら、J. Bio. Chem. 271:18892-18897 (1996)) である L. reuteri 中の粘膜結合タンパク質 (Ros および Jonsson、Microbiol. 148:433-442 (2002))、および S. thermophilus 中の細胞壁アンカータンパク質 (Fernandez-Esplara、Appl. Environ. Microbiol. 66:4772-4778 (2000)) と低い配列類似性 (23~27%の同一性) を共有していた。3個の配列の全ては疎水性領域に先行する LPQTG 局在化シグナルと、荷電 C 末端テイルを有する (図1参照)。これらの特徴はグラム陽性細菌中のソルターゼ認識 C 末端細胞壁アンカー配列間に共通である (Navarre および Schneewind、Microbiol. Mol. Bio. Rev. 63:174-229 (1999))。グラム陽性細菌中に見出される LPXTG 細胞アンカーモチーフ間で、これらの L. jenseni タンパク質中ではわずか 7% の LPQTG 配列の一致が見出された。C14、C191 および C370 タンパク質はすべて細胞壁アンカー領域に隣接したタンデム反復ドメインを含み、既知の細胞壁アンカータンパク質中にしばしば存在する構造上の特徴である (Navarre および Schneewind、Microbiol. Mol. Bio. Rev. 63:174-229 (1999))。C14、C191 および C370 の配列を図2A~Cに示す。

### 【0113】

(推定細胞壁アンカー配列のエピトープタグ化)

C14、C191 および C370 が異種融合タンパク質を L. jenseni の細胞壁に固定する効率を決定するため、本発明者らは約 200 個のアミノ酸を直接的に LPQTG 局在化シグナルの N-末端に選んだ。しばしば細胞壁アンカータンパク質中の細胞壁関連 (CWA) ドメインと定義されるこの領域は、基質配列の保持または延長、従って膜会合ソルターゼによる適切なタンパク質分解性の切断を促進し得る。免疫検出を促進するため、c-Myc エピトープ (EQKLISEEDL) を pOSEL239、240 および 241 それぞれの C14、C191 および C370 の CWA 200 領域の N-末端と融合した。ウエスタンおよびフローサイトメトリー分析を用いて、c-Myc タグ化タンパク質が生成され、細胞壁を標的としたかどうかを検討した。ウエスタン分析を行うため、pOSEL175、239、240 および 241 を有する修飾 L. jenseni を MRS および Rogosa SL プロスの両方の中で対数期まで生育させた。次いで 1-4 グリコシル結合を成熟ペプチドグリカン中のグリカン鎖の MurNAc-GlcNAc 間で切断する N-アセチルムラミダーゼである ムタノリシンで細胞壁を消化した。代表的には、SDS-PAGE クロマトグラフィー後に細胞壁アンカータンパク質は大きなスペクトルの断片として移動する (Perryら、J. Biol. Chem. 277:16241-16248 (2002))。pOSEL239 (C14 アンカー) および 241 (C370 アンカー) を有する細菌細胞中の細胞壁富化画分中のタンパク質のウエスタン分析から、細菌細胞を MRS および Rogosa プロスの両方の中で培養した場合、還元性 SDS-PAGE 上で c-Myc タンパク質のラダーを示した (図3)。これらのパターンは pOSEL240 (C191 アンカー) を有する細菌細胞中の細胞壁富化画分中には見られず、試験した LPQTG 含有配列間で異なったアンカー効率を示している。

### 【0114】

ウエスタンプロット陽性 c-Myc エピトープが pOSEL239 および 241 を有する L. jenseni 細胞中で表面に露出しているかどうかを決定するため、コントロールプラスミド pOSEL175 を有する細菌細胞を参照して抗 c-Myc 抗体結合のフローサイトメトリー分析を行った。pOSEL239 を有する細菌細胞中の平均蛍光強度はコントロールプラスミド pOSEL175 を有する細菌細胞中の平均蛍光強度と区別できなかったが、pOSEL241 を有する細菌細胞中では 160 倍に増加した。C14 配列の c-Myc タグ CWA 200 領域の表面接近性に立体傷害が影響するかどうかは不明であるが、本発明者らの分析により C370 配列の CWA 200 領域の N-末端における表面露出が明らかに示された。この結果は、異種ペプチドとタンパク質とを細菌細胞表面

に共有結合で固定するためにC370のこの特定の領域を利用し得ることを示している。

【0115】

(L. jenseniiの細菌表面上の2D CD4の表面発現)

2D CD4がC14のCWA200領域およびC370配列を経由して表面発現し得るかどうかを決定するため、本発明者らはウエスタンブロットとフローサイトメトリー分析を行った。ウエスタン分析を行うため、POSEL175(コントロールプラスミド)、651(細胞アンカーのない2D CD4プラスミド; Changら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 11672-11677(2003))、237(C14アンカーに融合した2D CD4)、242(C191アンカーに融合した2D CD4)、および249(C370アンカーに融合した2D CD4)を有するL. jensenii細胞中のタンパク質を細胞壁消化により細胞壁富化画分に分画した。細胞壁富化タンパク質画分では、POSEL237および249を有する細菌細胞の双方でより大きな分子量の種のスペクトルがpAb T4-4に対し免疫反応性であったが、POSEL651ではそうでなかった(図4)。ムタノリシン消化後に観測されるSDS-PAGE上のこのような梯子状パターンは、他のグラム陽性細菌の細菌表面由来の既知の細胞壁アンカータンパク質のパターンと類似している(Perryら、J. Biol. Chem. 277: 16241-16248(2002))。

10

【0116】

2D CD4が細胞表面上に発現するかどうかを決定するため、POSEL175、651、237および249を有するL. jensenii株をpAb T4-4で探索し、次いでフローサイトメトリー分析により抗体結合を分析した。期待された通り、この分析によりPOSEL175および651を有する細菌細胞における平均蛍光強度が区別できないことが明らかとなった。対照的に、POSEL175および651に対してPOSEL237および249を有する細菌細胞で平均蛍光強度の有意な増加が見られ、2D CD4分子の共有結合および表面露出に結果であると思われる(図5A)。上記アプローチをさらに確認するため、乳酸杆菌属の好ましいコドンを含む再コードしたシアノピリンN(CV-N)遺伝子を2D CD4の成功した固定に用いたものと同じC末端アンカードメインに融合した。CV-N発現プラスミドを有する修飾L. jenseniiのフローサイトメトリー分析により、POSEL175を有する細菌に対し平均蛍光強度で30~50倍の増加が検出された(データ示さず)。静電相互作用により抗体反応性CV-N分子が表面会合している可能性を調べるため、修飾細菌を5M LiClで抽出した。フローサイトメトリー分析により、PBSおよび2% FBSで洗浄した細胞を参照して、CV-N発現プラスミドを有する塩抽出L. jensenii中の平均蛍光強度が区別できないことが明らかとなった。表面提示CV-N分子の5M LiCl抽出に対する耐性は、細菌表面上の共有結合で固定されたタンパク質の挙動を反映している。

20

30

【0117】

表面に発現した2D CD4分子がgp120を結合するために正しい折り畳み立体構造をとっているか否かを確認するため、POSEL175、237および249を有する細菌細胞を立体構造依存性エピトープを認識する抗CD4モノクローナル抗体Sim.4で探索した後に、さらにFACS分析を行った。POSEL175と比較してPOSEL237および249を有する細菌細胞中で平均蛍光強度の有意な増加が見られ、2D CD4が機能的な形でL. jenseniiの表面に発現していることが示された(図5B)。

40

【0118】

モジュール発現アプローチにおいて2D CD4の表面発現が修飾L. jensenii中の天然細胞表面会合タンパク質の発現に影響するかどうかは不明であった。この問題を解決するため、POSEL175および237を有する細菌細胞をスルホNH<sub>2</sub>-ビオチンで探索し、次いで細胞表面会合タンパク質を0.4% SDSおよび10mM DTTを含む緩衝液中で抽出した。アルカリホスファターゼ共役アビジンによるプローブ後のSDS抽出タンパク質のウエスタン分析により、見かけの分子量10~200kDa未満の

50

ビオチン化タンパク質のスペクトルが検出された。p O S E L 2 3 7を有する細菌細胞中の可溶性ビオチン化タンパク質種のパターンは、p O S E L 1 7 5中のものと類似しており、天然の細胞表面発現が影響を受けていないことを示している。

#### 【0119】

(L. jensenii中の広いpH範囲における活性2D CD4の表面発現)

乳酸菌が自然にコロニーを形成している場合、ヒト腔腔のpHはほとんどの女性で3.6~4.5の間で変化し(Boskeyら、Infect. Immun. 67:5170-5175(1999))、男性の射出物が存在する場合、一時的に中性または弱アルカリ性になる。修飾L. jenseniiでpH変化がどのように活性2D CD4分子の表面発現に影響するかを調べるために実験を行った。細菌細胞をRogosa SLブロス中に、その通常用いられるpH(5.4)または100mM HEPESでpH7.4に緩衝して接種した。OD<sub>600</sub>約0.4までの活性生育中、培地のpHは実質的に変化しなかった。p O S E L 2 3 7および249を有する細菌細胞へのmAb Sim.4の結合のフローサイトメトリー分析により、pH5.4および7.4の双方でp O S E L 1 7 5中のコントロールバックグラウンドを超える有意に高い平均蛍光強度が検出された。さらに、修飾L. jenseniiをヒト腔腔内のpHに類似する酸性pHで培養した場合、表面に発現したCV-Nのレベルは上昇したままであった(データを示さず)。

#### 【0120】

(長さ36アミノ酸のC末端アンカーモチーフのみを経由する融合で発現する2D CD4の表面提示の欠失)

LPQTGシグナル、疎水性領域およびC14またはC370配列の荷電テールを含む36アミノ酸C末端アンカーモチーフが、L. jensenii中の2D CD4の効率的な表面発現を支持するに十分であるかどうかは不明である。この疑問を解決するため、C14のC末端アンカーモチーフを有するp O S E L 2 3 8、およびC370のC末端アンカーモチーフを有するp O S E L 2 6 2として設計された2個の構築物を調製し、ネガティブコントロールp O S E L 1 7 5および651、ならびにポジティブコントロールp O S E L 2 3 7を参照して分析した。pAb T4-4でプローブ後のp O S E L 2 3 8を有するL. jensenii中の細胞壁富化画分のウエスタン分析で、p O S E L 2 3 7に類似する梯子状パターンが検出されなかった。さらに、p O S E L 2 3 8を有する細菌細胞へのmAb Sim.4の結合のフローサイトメトリー分析により、p O S E L 1 7 5を有する細胞中のバックグラウンドコントロールと比較して平均蛍光強度の増加は全く検出されなかった(図6)。同様に、p O S E L 1 7 5を有する細胞およびポジティブコントロールp O S E L 2 4 9と比較して、p O S E L 2 6 2を有する細菌細胞のFACS分析は同様な負の結果をもたらした。これらの観察と一致して、S. pyogenesおよびL. paracasei由来の同様な長さのC末端アンカーモチーフを用いた場合、2D CD4の表面発現は行われなかった。このことは特徴的なLPQTGモチーフの上流のタンパク質配列が細胞壁固定プロセスに有意に寄与し、L. jenseniiの細胞壁上に生物活性タンパク質を提示するために必要であることを示唆している。

#### 【0121】

(生物活性タンパク質の最適表面提示のための、LPQTGモチーフ上流の反復細胞壁貫通配列の規定の長さの必要性)

天然のC370配列は、LPQTGモチーフの上流のC末端領域中にグラム陽性細菌中の多くの細胞壁アンカータンパク質の特性である8個のほぼ同一の縦列反復を含む(図1)。2.5回反復配列がp O S E L 2 4 9のアンカー配列中に含まれるが、異なった長さの上流配列が表面タンパク質提示を最大にするために使用し得るかどうかは、決定しなければならないことである。従って、C370配列の0、1、2、4、7および8個の反復を有する数個の構築物を調製した。それらはそれぞれ、p O S E L 2 6 2、268、278、280、281および276と名付けられた。正しく折り畳まれた立体構造をとる2D CD4分子のレベルを決定するため、形質転換細菌をフローサイトメトリー分析のためにmAb Sim.4で探索した(図7)。細菌を有するp O S E L 2 6 2(ゼロ反復

10

20

30

40

50

）では、平均蛍光強度はネガティブコントロール p O S E L 1 7 5 と区別できず、異種タンパク質を適切に表面発現するためには反復配列が必要であることを示唆している。さらに、反復数を p O S E L 2 6 2 の 0 から p O S E L 2 7 8 の 3 へ増加すると、蛍光強度が有意に増加した。反復数をさらに増加しても、蛍光強度は一定のままであった。

#### 【 0 1 2 2 】

（様々な乳酸杆菌種におけるタンパク質の表面提示を支持する *L. jensenii* のネイティブアンカー配列の利用）

*L. jensenii* 1153 に由来する C 3 7 0 のアンカー配列が、他の *L. jensenii* 株またはヒト起源の乳酸杆菌種中でタンパク質の表面提示を提供するか否かを決定するため、c - Myc エピトープを C 3 7 0 配列の C W A 2 0 0 に融合するために設計された p O S E L 1 7 5 または p O S E L 2 4 1 ( 図 8 A ) を *L. jensenii* X n a 、 *L. gasserii* 1151 、および *L. casei* Q 中にエレクトロポレーションにより導入した。p O S E L 2 4 1 を有するポジティブコントロール *L. jensenii* 1153 を参照して、形質転換細菌をウエスタン分析およびフローサイトメトリー分析で分析した。c - Myc に対する m A b による探索後の細胞壁消化物のウエスタン分析により、*L. jensenii* 1153 中のパターンと類似しているが *L. casei* Q 中のパターンとはあまり似ていない、p O S E L 2 4 1 を有する形質転換 *L. jensenii* X n a および *L. gasserii* 1151 におけるラダーパターンを検出した ( 図 8 B ) 。細菌細胞を c - Myc に対する m A b で免疫染色した後のフローサイトメトリー分析により、p O S E L 1 7 5 を有する全ての乳酸杆菌種で低レベルの蛍光を検出したが ( 図 8 C ) 、表面提示 c - Myc エピトープに結合する抗体への結合の結果、p O S E L 2 4 1 を有する *L. jensenii* X n a および *L. gasserii* 1151 中での蛍光強度の上昇を検出した。さらに、p O S E L 1 7 5 を有する *L. casei* と比較して、241 を有する *L. casei* Q の蛍光強度は、さらに約 19 倍増加していた。これらのデータをまとめると、*L. jensenii* 1153 に由来するアンカー配列は、ヒト起源の乳酸杆菌種も含めた多様な乳酸杆菌種中で、タンパク質の表面提示の支持に広く有用であることを明らかに示す。

#### 【 0 1 2 3 】

（*L. jensenii* 中の 2 D C D 4 の表面発現に対する L P X T G モチーフの突然変異誘発の効果）

よく研究された細胞壁アンカータンパク質である *Staphylococcus aureus* のプロテイン A が、L P E T G 細胞壁分類モチーフ上で突然変異した場合、L P Q T G 中のアミノ酸プロリン ( P ) をアミノ酸アスパラギン ( N ) で置換することによりタンパク質表面提示の効率が減少したが、トレオニン ( T ) のセリン ( S ) による置換は、タンパク質表面提示の効率にほとんど影響がないことが見出された ( N a v a r r e および S c h n e e w i n d 、 M i c r o b i o l . M o l . B i o l . R e v . 6 3 : 1 7 4 - 2 2 9 ( 1 9 9 9 ) ) 。この研究は、P 残基が L P X T G モチーフ中でおそらく最も重要な残基であり、T 残基を類似のアミノ酸である S で置換し得ることを示した。C 1 4 および C 3 7 0 中の L P Q T G モチーフが実際に重要な分類信号であるか否かを決定するため、L P Q T G 配列中の P および T の重要性を検討した。C 1 4 配列および C 3 7 0 配列双方上の L P Q T G モチーフ内に点突然変異を P C R により生じさせた。P 残基をアラニン ( A ) またはアスパラギン ( N ) に突然変異させ；アミノ酸 T を、A、S またはグリシン ( G ) に突然変異させ；L P X T G モチーフ中のアミノ酸 G を A に突然変異させた。変化した L P Q T G モチーフを有するプラスミドをそれぞれ p O S E L 2 3 7 P ( A ) 、 p O S E L 2 3 7 P ( N ) 、 p O S E L 2 3 7 T ( A ) 、 p O S E L 2 3 7 T ( G ) 、 p O S E L 2 3 7 T ( S ) 、 p O S E L 2 3 7 G ( A ) 、 p O S E L 2 4 9 P ( A ) 、 p O S E L 2 4 9 P ( N ) 、 p O S E L 2 4 9 T ( A ) 、 p O S E L 2 4 9 T ( G ) 、 p O S E L 2 4 9 T ( S ) および p O S E L 2 4 9 G ( A ) と名付けた。突然変異した構築物を有する *L. jensenii* 1153 のウエスタン分析およびフローサイトメトリー分析を行った。親 p O S E L 2 3 7 および p O S E L 2 4 9 を有する *L. jensenii*

iと比較して、p O S E L 2 3 7 P ( A )、p O S E L 2 3 7 P ( N )、p O S E L 2 4 9 P ( A )およびp O S E L 2 4 9 P ( N )を有する*L. jensenii*は、p A b T 4 - 4による細胞壁富化タンパク質画分のウエスタンブロットにおいて、特徴的な、より高分子量種のスペクトルを示さなかった。一方、2 D C D 4 - C W A 2 0 0融合タンパク質の馴化培地中への分泌は顕著に増加し、2 D C D 4 - C W A 2 0 0融合タンパク質が細胞壁に共有結合していないことを示した。野生型p O S E L 2 3 7およびp O S E L 2 4 9で観察された結果と同様に、p O S E L 2 3 7 T ( S )およびp O S E L 2 4 9 T ( S )を有する*L. jensenii*の細胞壁消化において、より高分子量種の特徴的なスペクトルは明瞭であり、このことは、C 1 4およびC 3 7 0由来のL P Q T G内のアミノ酸Tを、Sによって効果的に置換し得ることを示唆していた(データ示さず)。

10

## 【0124】

L P X T Gの突然変異誘発の*L. jensenii*表面タンパク質提示に対する効果をさらに決定するため、p O S E L 1 7 5、6 5 1、2 3 7、2 4 9を有する*L. jensenii*株と一緒に様々な突然変異構築物をp A b T 4 - 4またはm A b S i m . 4で探索し、次いでフローサイトメトリーで抗体結合を分析した。p O S E L 2 3 7を有する細菌細胞と比較してp O S E L 2 3 7 P ( A )、p O S E L 2 3 7 P ( N )を有する細菌細胞、およびp O S E L 2 4 9を有する細菌細胞と比較してp O S E L 2 4 9 P ( A )、p O S E L 2 4 9 P ( N )を有する細菌細胞では平均蛍光強度がかなり減少し、このことは、細胞表面の2 D C D 4タンパク質の提示が、あったとしても、はるかに少ないことを示していた。しかしながら、p O S E L 2 3 7 T ( S )、p O S E L 2 3 7 ( T ) A、p O S E L 2 4 9 T ( S )およびp O S E L 2 4 9 ( T ) Aを有する細菌細胞の平均蛍光強度はp O S E L 2 3 7および2 4 9を有する*L. jensenii*に匹敵し、このことは、TをSまたはAに置換することが細胞壁固定の効率にほとんど効果がないことを示した(図9)。

20

## 【0125】

ウエスタンブロットおよびフローサイトメトリー分析のデータは、C 1 4およびC 3 7 0のL P Q T Gモチーフ内に含まれるアミノ酸Pは容易に置換され得ないことを示す。対照的に、アミノ酸Tは、SまたはAで置換され得、乳酸杆菌属の細胞壁に効率的に固定されるタンパク質を生成する。

## 【0126】

(*L. jensenii*における2 D C D 4の表面発現に対するC末端正荷電テールの欠失の効果)

グラム陽性細胞壁アンカードメインの特徴の一つは、正に荷電したアミノ酸がタンパク質のC末端極に伸びていることである。M 6タンパク質では、この配列(K R K E E N)が重要な細胞表面保持信号として働く。これらの標示配列は、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)、エンテロコッカス属、リステリア属および乳酸杆菌属を含む他のグラム陽性細菌でも見出されている(NavarreおよびSchneewind、*Microbio. Mol. Biol. Rev.* 63: 174 - 229 (1999))。2つの配列R K K R Q K<sup>1 7 6 5</sup>およびK K K R K D D E A<sup>1 9 0 3</sup>がそれぞれ、C 1 4推定アンカー配列およびC 3 7 0推定アンカー配列中の正に荷電したテールとして同定された(図1)。これらの2個の配列が細胞表面保持信号として働くか否かを定めるため、一連の欠失構築物を作製した(図10)。それらは、それぞれp O S E L 2 3 7 - 5、p O S E L 2 3 7 - 6、p O S E L 2 3 7 - 7、p O S E L 2 4 9 - 8、p O S E L 2 4 9 - 9およびp O S E L 2 4 9 - 10と名付けられた。

30

40

## 【0127】

これらの構築物を有する*L. jensenii*のウエスタン分析およびフローサイトメトリー分析を行った。C W A 2 0 0と融合して2 D C D 4を表す、4 8 k D aで移動するタンパク質種、S D S - P A G E後、p A b T 4 - 4によって、荷電テールノックアウト構築物を有する全ての*L. jensenii*で検出され得る。分泌タンパク質は、p O S E L 2 3 7 - 5、p O S E L 2 3 7 - 6、p O S E L 2 3 7 - 7、p O S E L 2 4 9

50

- 8、p O S E L 2 4 9 - 9 および p O S E L 2 4 9 - 1 0 を有する *L. j e n s e n i i* 細胞において、親の p O S E L 2 3 7 および p O S E L 2 4 9 を有する細胞よりも多かった。全欠失突然変異体に由来する細胞壁富化画分中のタンパク質のウエスタン分析は、p O S E L 2 3 7 または 2 4 9 を有する *L. j e n s e n i i* で観察された特徴的なラダーパターンを検出しなかった（データを示さず）。これらのデータは、2 D C D 4 - C W A 2 0 0 融合タンパク質が細胞壁に共有結合していないことを示唆した。

【 0 1 2 8 】

抗 C D 4 p A b T 4 - 4 または m A b S i m . 4 による探索後の改変 *L. j e n s e n i i* のフローサイトメトリー分析は、親の p O S E L 2 3 7 または 2 4 9 を有する細菌細胞と比較して、これらの突然変異プラスミドを有する細菌細胞における平均蛍光強度の顕著な減少を検出した（図 1 1）。これらのデータは、C 1 4 および C 3 7 0 双方の正に荷電した C 末端の欠失が、細胞壁に固着して異種タンパク質を提示するそれらの能力を阻害したことを、結論として示した。

10

【 0 1 2 9 】

（細胞壁アンカーシグナルとしての L P Q T G モチーフの柔軟性）

グラム陽性細菌由来のほとんどの細胞壁に固定されたタンパク質は、同じ識別信号 L P X T G を共有するが、一部タンパク質は、異なったモチーフを有する。例えば、*L. p a r a c a s e i* の P r t P に対する識別信号は、L P K T A である（H o l c k および N a e s、*J. Gen. Microbiol.* 138: 1353 - 1364 (1992)）。*p e p t o s t r e p t o c o c c u s m a g n u s* のプロテイン L およびヒト血清アルブミン結合タンパク質は、L P X A G のモチーフを共有する（d e C h a t e a u および L . B j o r c k、*J. Biol. Chem.* 269: 12147 - 12151 (1994)；K e l l e r ら、*EMBO J.* 11: 863 - 874 (1992)；M u r p h y ら、*DNA Seq.* 4: 259 - 265 (1994)）。C 1 4 アンカータンパク質または C 3 7 0 アンカータンパク質中で L P Q T G が L P Q A G または L P Q S G に突然変異した場合、S D S - P A G E 後にフローサイトメトリーまたはウエスタンブロットで測定した 2 D C D 4 の表面提示の減少は僅かであった。しかしながら、以下の証拠に基づくように、これらの配列のみでは、腔由来の乳酸桿菌の細胞壁へタンパク質を固定するには不十分である：1) 36 アミノ酸の C 末端アンカードメイン単独では、c - M y c エピトープまたは 2 D C D 4 を細胞表面に固定しなかった、2) 200 アミノ酸までの上流配列が含まれる場合でさえも、プロトタイプ M 6 細胞壁アンカー配列（*S. p y o g e n e s* の e m m 6 遺伝子によりコードされる）は腔由来乳酸桿菌の細胞壁へ異種タンパク質を固定しなかった（本発明者らは、*L. p a r a c a s e i* 由来の L P X T A モチーフを用いて同様な結果を見出した）、および 3) C 1 9 1 タンパク質は、有効なアンカーではなかった。これらの知見は、C 1 4 および C 3 7 0 の C W A 2 0 0 領域内に含まれる他の上流配列もまた、細胞壁固定プロセスに大きく寄与することを示している。

20

30

【 0 1 3 0 】

（C 1 4 および C 3 7 0 の C W A 2 0 0 と融合した場合の 2 D C D 4 生物活性の増大）

生物活性を評価するため、p O S E L 2 3 7 - 7 および p O S E L 2 4 9 - 1 0 を有する *L. j e n s e n i i* 1 1 5 3 から放出された C 1 4 タンパク質および C 3 7 0 タンパク質の 2 D C D 4 - C W A 2 0 0 を、C D 4 E L I S A により分析した。p O S E L 6 5 1、p O S E L 2 3 7 - 7 および p O S E L 2 4 9 - 1 0 を有する細菌細胞を、R o g o s a S L プロス中で種々の細胞密度に生育させた。次いで、無細胞馴化培地を回収した。O D<sub>600</sub> = 0.8 で、ウエスタンブロットで測定した培地中に放出された p O S E L 6 5 1 からの 2 D C D 4 の量と p O S E L 2 3 7 - 7 または 2 4 9 - 1 0 からの 2 D C D 4 - C W A 2 0 0 の量とは類似していた。それにもかかわらず、p O S E L 2 3 7 - 7 および p O S E L 2 4 9 - 1 0 を有する細菌細胞から放出された 2 D C D 4 - C W A 2 0 0 は、p O S E L 6 5 1 を有する細菌細胞からの 2 D C D 4 タンパク質と比較した場合、約 2 ~ 3 倍高い活性を示した。C 1 4 または C 3 7 0 の C W A 2 0 0 領域の

40

50

2D CD4への融合は、おそらくはタンパク質折り畳みプロセスを補助することにより、このタンパク質の生物活性を増強する様にみえた。この同じ知見は、gp120結合アッセイを用いて確認された(データ示さず)。これらのタンパク質のウエスタンブロット分析は、2D CD4-CWA200が、2D CD4よりも有意に安定であり、おそらくその生物活性の増強に寄与しているということを示唆する。

#### 【0131】

(材料および方法)

(細菌株および培養)

*L. jenseni*、*L. crispatus*、*L. gasseri*および*L. casei*のヒト膣株を健康な女性から得た膣サンプルの細菌培養により単離した。乳酸杆菌rRNAに特異的な2つのプライマーを用いて、16S-23S遺伝子間スペーサー領域の増幅後に、GenBankに保存された参照株のDNA配列に対して細菌株の遺伝型決定した(Tannockら、Appl. Environ. Microbiol. 65: 4264-4267 (1999))。株をMRSまたはRogosa SLブロス(Difco、Detroit、MI)中、またはMRS寒天プレート上で、37、5%CO<sub>2</sub>で常法により生育させた。

10

#### 【0132】

(*Lactobacillus jenseni* 1153のゲノムDNAの単離)

*L. crispatus* JCM 5810から染色体DNAを単離するために先に用いたプロトコル(Sillanpaaら、J. Bacteriol. 182: 6440-6450 (2000))の改変に基づいて、*L. jenseni* 1153の染色体DNAを単離した。*L. jenseni*細菌を200mlのMRS培地中、37、5%CO<sub>2</sub>で600nmにおける光学密度1.0(OD<sub>600</sub> = 1.0)まで増殖させた。6,600×g、10分間の遠心により細胞を収集し、25mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA、50mMグルコース中で1回洗浄し、細菌培養液100mlあたり2.5mlの20mM Tris(pH8.0)、5mlの24%エチレンジグリコール8000、および2.5mlのリゾチーム(4mg/ml、Sigma Chemical Co., St Louis、Mo)を加えた後に懸濁した。得られた細胞懸濁液を37で1時間インキュベーションした。0.2M EDTAを5ml添加し、細胞を4、1000×gで10分間遠心し、50μlのムタノリシン(15,000U/ml、Sigma Chemical Co.)を含む20mM Tris(pH8.0)10ml中に再懸濁した。37で1時間インキュベーションした後、1.5mlの9% Sarkosyl (Sigma Chemical Co.)および3mlの5M NaClを添加して細胞を溶解した。次いで細胞溶解液を2.9mlの5M過塩素酸ナトリウムと混合した。染色体DNAを、17.5mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1 v/v)で抽出し、エタノールで沈殿し、風乾し、1.5mg/mlの濃度で100mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTA中に再懸濁した。最後にゲノムDNA調製物をDNaseを含まないRNaseで処理した。

20

30

#### 【0133】

(*L. jenseni*ゲノムライブラリーの構築)

*L. jenseni* 1153のゲノムDNAをHydroShear(Gene Machines、San Carlos、CA)を用いて所望のサイズ範囲に機械的に剪断した。剪断DNA断片をT4 DNAポリメラーゼとKlenow酵素で平滑断端化し、3Kbおよび8KbのDNA断片を、アガロースゲル電気泳動後に単離し、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen、Valencia、CA)を用いて精製した。得られたDNA断片をpUC18ベクター中に連結し、*E. coli* DH10B細胞(Invitrogen、Carlsbad、CA)中に形質転換して3Kbおよび8Kbゲノムライブラリーを作製した。細菌形質転換体をX-galの存在下でLBプレート上で選択し、得られたコロニーをQ-pixロボット(Geneticx Ltd.、UK)を用いて96ウエルプレート中に配列した。96クローンからなるプレートを挿入サイズの

40

50

均一性および非組み換え体の割合について試験して、ライブラリーの品質を決定した。どちらのライブラリーも、5%未満の非組み換え体を含み、90%を超える挿入体は、期待サイズの20%以内であった。

#### 【0134】

(*L. jensenii* ゲノムの配列決定および組み立て)

*L. jensenii* ゲノム配列を、全ゲノムショットガン法を用いて決定した。ゲノムライブラリーから選択したクローンのプラスミドDNAを、磁気ビーズまたはローリングサークル(rolling circle)法のいずれかで精製し、ABI BigDyeターミネーターキット(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて両端から配列決定した。全ての配列決定反応を、ABI PRISM 3700自動DNA配列決定装置(Applied Biosystems)上で行った。合計15,360個の配列の読み、または160個の配列プレートを行って、*L. jensenii* 1153ゲノムの3倍カバレッジを得た。50塩基を越えるQ20(100塩基あたり予測誤差1)を生成する場合、またはより高い精度を満たす場合のみ、配列決定の読みが成功したと考えられる。配列クロマトグラフを、Phred(Ewingら、Genome Research、8:175-185(1998))を用いる塩基呼び出しおよび品質評価のために、自動的にUNIX(登録商標)システムに転送した。合格率は80%以上であり、平均読み取り長さは400~500塩基の範囲である。配列アセンブリをParacel Genome AssemblerまたはCAP4を用いて行った(Paracel, Inc., Pasadena, CA)。合計484のコン

10

20

#### 【0135】

(*L. jensenii* 1153ゲノム中の細胞壁アンカーモチーフを有するタンパク質配列の同定)

グラム陽性細菌の細胞壁固定タンパク質は、保存的C末端LPXTGXモチーフを有する(Fischettiら、Mol. Microbiol. 4:1603-1605(1990))。このヘキサペプチドの後には、アミノ酸の疎水性伸長と、短い荷電テールとがあり停止転送配列として知られる(Schneewindら、Cell、70:267-281(1992))。さらに、別の独自のLPXTA識別モチーフが*Lactobacillus paracasei*中で同定された(HolckおよびNaes、J. Gen. Microbiol. 138:1353-1364(1992))。ネイティブの細胞壁アンカー配列を同定するため、組み立てられたコンティグ(*L. jensenii* 1153の、推定75%完全なゲノム配列から得られる)の全てのリーディングフレーム中のLPXTGおよびLPXTAに類似のモチーフを同定するためのコンピュータスク립トが作成された。推定細胞壁アンカーモチーフを有する得られたコンティグを、グラム陽性細菌中の細胞壁アンカータンパク質に対する配列相同性に対するBLAST検索によりさらに検証した。

30

#### 【0136】

(シャトルベクターの構築)

これらの研究に用いられた1次シャトルベクターは、pLEM7(Fonsら、Plasmid、37:199-203(1997))の改変バージョンであるpOSEL175であった。部分IS要素を、まずSmaIで切断することによって除去し、NdeIで部分的に消化し、Klenow断片で平滑末端化し、再連結した。最後に、pOSEL144のerm遺伝子内の2個のMfeI部位を除去するため、プラスミドを部位指向性突然変異誘発に供した(Changら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、100:11672-11677(2003))。得られたpOSEL175プラスミドは*E. coli*中の複製開始点(ColE1)と乳酸杆菌属中の複製開始点(repA)の双方を有し、従って様々な乳酸杆菌属種中の異種タンパク質の発現のために用いられるシャトルベクターの骨格を含む。

40

#### 【0137】

50

(*L. jenseni* 中の発現カセットの構築)

*L. jenseni* においてアンカータンパク質を都合よく表在化するために、発現カセットを構築し、pOSEL175のSacI部位およびXbaI部位中にサブクロニングした。このカセットは、乳酸杆菌適合性P<sub>23</sub>プロモーター、*L. crispatus*のCbsAシグナル配列、異種タンパク質をコードするDNA、およびグラム陽性細菌中の既知、または推定細胞表面タンパク質由来の共有結合性細胞壁アンカードメインを含む4つの構成要素を含む。本発明者らの、一連のプロモーターおよびシグナル配列を有する構築物の詳細な分析により、*Lactococcus lactis*由来のP<sub>23</sub>プロモーター(*van der Vossenetら*、*Appl. Environ. Microbiol.* 53:2452-2457(1987))と、*L. crispatus*のCbsA由来のシグナル配列(CbsAss)との組み合わせにより、pOSEL651として設計された構築物中で2DCD4の最高レベルのタンパク質発現が駆動されることが示された(*Changら*、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、100:11672-11677(2003))。SacI、EcoRI、NheI、MfeIおよびXbaIを含む独自の制限部位は、それぞれ5'末端から3'末端へと各構成要素の間に置かれた。PCRによる各構成要素の増幅は、Pfu DNAポリメラーゼを用いて行われた。本研究で詳細に述べられる融合構築物の様々な部分のPCR増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーとしては、以下が挙げられる：

10

【0138】

【化4】

20

P23.f 5'-GTGGAGCTCCCGAAAAGCCCTGACAACCC-3'  
 P23.r 5'-GGAAACACGCTAGCACTAACTTCATT-3'  
 2DCD4.f 5'-GCGGCTAGCAAGAAAGTTGTTTTAGGTAAA-3'  
 2DCD4.r 5'-GCACAATTGTGATGCCTTTTGAAAAGCTAA-3'  
 CbsAss.f 5'-GCGAATTC AAGGAGGAAAAGACCACAT-3'  
 CbsAss.r 5'-TCCAGCTAGCTGAAACAGTAGAAACGGC-3'

表面発現のために設計されたタンパク質としては、10アミノ酸c-Mycペプチド(EQKLISEEDL)およびヒトCD4のN末端の2個の細胞外ドメイン(2DCD4)を含む最初の183残基が含まれる。2DCD4タンパク質は、好ましい乳酸杆菌コドンの使用に従うように再コード化された。全ての発現構築物は、*L. jenseni* 中へ形質転換する前にDNA配列分析により確認された。

30

【0139】

(*L. jenseni* の推定細胞壁アンカー配列へのc-Myc融合の構築)

タンパク質発現レベル、および生物活性タンパク質の表面提示のために規定の長さの推定細胞壁アンカー配列を使用することが実行可能であるか否かを決定するため、本発明者らは、最初にエピトープタグ化を選んだ。C末端分類モチーフの機能を乱さないために、5'末端に10アミノ酸c-Mycエピトープ(EQKLISEEDL)を含むオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、*L. jenseni* 1153のゲノム由来のC14、C191およびC370を含む推定細胞壁アンカー配列のN末端にc-Mycエピトープを融合させた。c-Myc配列をこれらのタンパク質(C14、C191またはC370のC末端30アミノ酸)の細胞壁アンカーモチーフに直接融合するか、またはC末端細胞壁アンカードメインを含む配列および様々な長さの隣接上流アミノ酸に融合させた。最も注目すべきは、c-Mycが細胞壁アンカードメインと上流アミノ酸(CWA200と命名)とを含む200アミノ酸配列と融合したことである。

40

【0140】

## 【化5】

Myc14nhe (5'プライマー)

(GCGCTAGCGAACAGAACTGATCTCCGAAGAGGACCTGGTAACTC

GTACTATCAATGTA)

Myc14mfe (3'プライマー)

(CGCCAATTGCTACTTTTGACGTTTCTTTCT)

Myc191nhe (5'プライマー)

(GCGCTAGCGAACAGAACTGATCTCCGAAGAGGACCTGGACGTAG

TAATTCCAGGAA)

Myc191mfe (3'プライマー)

(GCGCAATTGTTAATCTTCTTTTCTCTTCTT)

Myc370nhe (5'プライマー)

(GCGCTAGCGAACAGAAA

CTGATCTCCGAAGAGGACCTGTTGAAGAAGGCAGAAGAAGT)

Myc370mfe (3'プライマー)

(CCGCAATTGTTATGCTTCATCATCTTTTCT)

10

20

期待したサイズを有する全てのPCR産物をゲルで精製し、MfeIおよびNheIの両方で消化した。得られた断片を、MfeI/NheI二重消化POSEL651と連結し、POSEL239(C14配列のCWA200経由)、POSEL240(C191配列のCWA200経由)およびPOSEL241(C370配列経由)それぞれの中にc-Myc融合体を作製した。得られたプラスミドはL.jenseni 1153中へエレクトロポレーションした。

## 【0141】

(細胞壁固定配列のシャトルベクター中へのサブクローニング)

C末端LPQTGアンカーモチーフを含む3個の推定表面タンパク質を選び、L.jenseni 1153の細胞壁に外来タンパク質を発現する能力を決定した。これらの表面タンパク質のC末端LPQTGドメインを含むDNA領域、およびその上流の200アミノ酸(暫定的にCWA200領域と呼ぶ)を、下記の3組のプライマーによって増幅した:

30

## 【0142】

## 【化6】

C14: 5'プライマー-(GCGCAATTGGTAACTCGTACTATCAATGTA)

3'プライマー-(CGCTCTAGATACACAACTATTTTACGGTC)

C191: 5'プライマー-(GCGCAATTGGACGTAGTAATTCCAGGAACA)

3'プライマー-(CGGTCTAGACCAAGCAATTTATATATTGCT)

40

C370: 5'プライマー-(GCGCAATTGAAGAAGGCAGAAGAAGT)

3'プライマー-(CCGTCTAGATTATGCTTCATCATCTTTTCT)

C14アンカードメインの内部MfeI部位とC370ドメインの内部XbaI部位を、酵素的制限の前に部位指向性突然変異誘発により突然変異させた。予期されたサイズのPCR産物の全てをゲルで精製し、MfeIおよびXbaIの両方で消化した。得られた断片を、P23-調節性分泌2D CD4を含むMfeI/XbaI二重消化POSEL651と連結し、プラスミドPOSEL237(C14配列のCWA200経由)、POSEL242(C191配列のCWA200経由)およびPOSEL249(C370配

50

列のCWA300経路)をそれぞれ作製した。あるいは、以下の2個のプライマーを用いてC14配列のC末端36アミノ酸アンカーモチーフを、同様にシャトルベクター中にクローニングした。

【0143】

【化7】

Mfec14up: 5' GCGCAATTGCCACAAACTGGTTCTAAGACT

Xnac14lo: 3'プライマー-(CGCTCTAGATACACAAACTATTTTACGGTC)

DNA配列の検証後に得られたプラスミドの全てを、*L. jenseni*、*L. gasserii*および*L. casei*中にエレクトロポレーションした。

10

【0144】

(C370配列の反復細胞壁貫通領域のサブクローニング)

C370LPQTGMモチーフの上流の種々の反復細胞壁貫通領域を、*L. jenseni* 1153のゲノムDNAから増幅した。各PCR反応について同じ3'プライマー(5'-CCGTCTAGATTATGCTTCATCATCTTTTCT-3')を、以下の5'プライマーと対で使用した。

【0145】

【化8】

ゼロ反復: 5'-CGGCAATTGCCTCAAACTGGTACTGA-3'

1反復: 5'-CGGCAATTGGGTCAAACTACAAATAAAGAT-3'

2反復: 5'-CGCCAATTGGGTCAAACTACTGATAAGAGT-3'

3反復: 5'-GCGCAATTGGGTCAAACTACAAATAAAGAT-3'

4~8反復: 5'-CGGCAATTGGGTCAAACTACTGACAAGAGC-3'

20

これらのプライマー中のMfeI部位およびXbaI部位の両方に下線が引かれている。

【0146】

予想したサイズのPCR産物の全てをゲル精製し、MfeIおよびXbaIの双方で消化した。得られた断片を、P23調節性分泌2D CD4を含むMfeI/XbaI二重消化POSEL237と連結し、プラスミドPOSEL262(反復無し)、POSEL268(1反復)、POSEL278(2反復)、POSEL284(3反復)、POSEL280(4反復)、POSEL275(6反復)、POSEL281(7反復)およびPOSEL276(8反復)をそれぞれ作製した。

30

【0147】

(細菌形質転換)

*E. coli* DH12S(Invitrogen)中に、プラスミドをエレクトロポレーションにより導入した。シャトルプラスミドを構築し維持するため、形質転換*E. coli* DH12S細胞を、100μg/mlのアンピシリンまたは300μg/mlのエリスロマイシンを補充したLBブロス(Difco)中で、37°Cで増殖させた。DNA配列検証後、*E. coli*由来プラスミドを、改変したLuchanskyら(J. Dairy Sci. 74:3293-3302(1991))の方法に従って*L. jenseni*、*L. gasserii*および*L. casei*中に形質転換した。簡単に言えば、新たに播種した*L. jenseni*を、MRSブロス中、37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>でOD<sub>600</sub> 0.6~0.7まで培養した。細菌細胞を収集し、洗浄して952mMスクロースおよび3.5mM MgCl<sub>2</sub>中に、4°Cで再懸濁した。予冷した0.2cmギャップキュベットを用いて、コンピテント細胞に1~2μgのDNAを添加し、直ちにGene Pulser II(Bio-Rad、Hercules、CA)を用いて、2.5kV/cmおよび200オームでエレクトロポレーションした。その後、20μg/mlのエリスロマイシン(液体培地中で形質転換*L. jenseni*を常法で増殖させる

40

50

ためにも使用される濃度である)を含む選択MRS寒天プレート上に播種する前に、37で2時間予め温めたMRSブロス中で細胞を回復させた。

【0148】

(推定細胞壁アンカー配列のLPXTGモチーフの部位指向性突然変異誘発)

Stratagene提供のQuickChange(登録商標)XL Site-Directed Mutagenesisキット(La Jolla, CA)を用いて点突然変異を生じさせた。プラスミドpOSEL237(C14配列のCWA200を経由して固定した2D CD4を発現)とプラスミドpOSEL249(C370配列のCWA200を経由して固定した2D CD4を発現)をテンプレートとして使用した。LPQTG、およびそのC14およびC370上の隣接配列に対応するヌクレオチド配列に基づき、突然変異誘発プライマーを設計した。 10

【0149】

【化9】

C14-GAAAGTAAGAAGACTTTACCACAAACTGGTTCTAAGACTGAA  
C370-CATAAGCAAACTCTATTGCCTCAAACCTGGTACTGAAACTAACCCAC

L. jensenii 1153の好ましいコドンを用いて置換ヌクレオチドを選択した。

【0150】

237P(A): C14のLPQTG上のプロリンをアラニンで置換した。 20

【0151】

【化10】

5'-GAAAGTAAGAAGACTTTAGCACAAACTGGTTCTAAGA-3'  
5'-GTCTTAGAaccAGTTTGIGCTAAAGTCTTCTTACTTTC-3'

237P(N): C14のLPQTG上のプロリンをアスパラギンで置換した。

【0152】

【化11】

5'-GAAAGTAAGAAGACTTTAAATCAAACCTGGTTCTAAGAC-3'  
5'-GTCTTAGAACCAGTTTGATTTAAAGTCTTCTTACTTTC-3'

30

237T(A): C14のLPQTG上のトレオニンをアラニンで置換した。

【0153】

【化12】

5'-AGAAGACTTTACCACAAGCIGGTTCTAAGACTGAAC-3'  
5'-GTTTCAGTCTTAGAACCAGCTTGTGGTAAAGTCTTCT-3'

237T(G): C14のLPQTG上のトレオニンをグリシンで置換した。

【0154】

【化13】

5'-AGAAGACTTTACCACAAGGTGGTTCTAAGACTGAAC-3'  
5'-GTTTCAGTCTTAGAACCACCTTGTGGTAAAGTCTTCT-3'

40

237T(S): C14のLPQTG上のトレオニンをセリンで置換した。

【0155】

【化14】

5'-AGAAGACTTTACCACAAAGTGGTTCTAAGACTGAAC-3'  
5'-GTTAGTTTCAGTACCACCTTGTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

237G(A): C14のLPQTG上のグリシンをアラニン(Alanine)で置換し 50

た。

【 0 1 5 6 】

【 化 1 5 】

5'-GACTTTACCACAAACTGCTTCTAAGACTGAACAAG-3'

5'-CTTGTTTCAGTCTTAGAAGCAGTTTGTGGTAAAGTC-3'

2 4 9 P ( A ) : C 3 7 0 の L P Q T G 上のプロリンをアラニン ( A l a i n e ) で置換した。

【 0 1 5 7 】

【 化 1 6 】

5'-CATAAGCAAACCTCTATTGGCTCAAACCTGGTACTGAAAC3'

5'-GTTTCAGTACCAGTTTGAGCCAATAGAGTTTGCTTATG-3'

10

2 4 9 P ( N ) : C 3 7 0 の L P Q T G 上のプロリンをアスパラギンで置換した。

【 0 1 5 8 】

【 化 1 7 】

5'-CATAAGCAAACCTCTATTGAATCAAACCTGGTACTGAAAC3'

5'-GTTTCAGTACCAGTTTGATTCAATAGAGTTTGCTTATG-3'

2 4 9 T ( A ) : C 3 7 0 の L P Q T G 上のトレオニンをアラニンで置換した。

【 0 1 5 9 】

【 化 1 8 】

5'-CAAACCTCTATTGCCTCAAAGTGGTACTGAAACTAA-3'

5'-GTTAGTTTCAGTACCAGTTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

20

2 4 9 T ( G ) : C 3 7 0 の L P Q T G 上のトレオニンをグリシンで置換した。

【 0 1 6 0 】

【 化 1 9 】

5'-CAAACCTCTATTGCCTCAAAGTGGTACTGAAACTAAC-3'

5'-GTTAGTTTCAGTACCACCTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

30

2 4 9 T ( S ) : C 3 7 0 の L P Q T G 上のトレオニンをセリンで置換した。

【 0 1 6 1 】

【 化 2 0 】

5'-CAAACCTCTATTGCCTCAAAGTGGTACTGAAACT-3'

5'-GTTAGTTTCAGTACCACCTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

2 4 9 G ( A ) : C 3 7 0 の L P Q T G 上のグリシンをアラニンで置換した。

【 0 1 6 2 】

【 化 2 1 】

5'-CTCTATTGCCTCAAACCTGCTACTGAAACTAACCCAC-3'

5'-GTGGGTTAGTTTCAGTAGCAGTTTGAGGCAATAGAG-3'

40

ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) サイクル条件は 9 5 で 5 0 秒、 6 0 で 5 0 秒、および 6 8 で 1 2 分、全体で 1 6 サイクルであった。

【 0 1 6 3 】

P C R 反応後に D p n I 酵素を、増幅混合物に添加し、親プラスミドを分解した。新たに合成されたプラスミドを製造業者の推奨に従って化学コンピテント E . c o l i T o p 1 0 細胞 ( I n v i t r o g e n ) 中に導入した。2 0 0 μ g / m l のエリスロマイシンを補充した L B ブロス ( D i f c o ) 中でプラスミドを維持し、増幅した。D N A 配列

50

を検証後、改変した Luchansky らの方法 ( J . Dairy Sci . 74 : 3293 - 3302 ( 1991 ) ) に従って E . coli 由来のプラスミドを L . jensenii 中へ形質転換した。突然変異原性プラスミドを含む形質転換 L . jensenii を選択し、増殖するために、20 µg / ml のエリスロマイシンを含む MRS を使用した。

#### 【0164】

( 推定細胞壁アンカータンパク質の正に荷電した C 末端配列の欠失の分析 )

正に荷電したアミノ酸が C14 および C370 の C 末端に位置する一連の欠失突然変異体を、PCR 増幅により作製した。プラスミド pOSEL237 および pOSEL249 を、テンプレートとして使用した。pOSEL237 および pOSEL249 上の 2D CD4 配列に相補性のオリゴヌクレオチド ( CD4F 5' - GATCGTGCTGATTCACGTCGT - 3' ) をフォワードプライマーとして使用した。以下のオリゴヌクレオチド ( 制限部位に下線 ) を、2D CD4 cDNA の C 末端および完全 C14 および C370 CWA200 配列を増幅するためのリバースプライマーとして使用した：

#### 【0165】

#### 【化22】

C14-7 5'-GCGCTCTAGACTAAACACCTAAGCCTAATAAGC-3'  
 C14-6 5'-GCGCTCTAGACTAGTTAACACCTAAGCCTAATAAG-3'  
 C14-5 5'-GCGCTCTAGACTATCTGTAAACACCTAAGCC-3'  
 370-10 5'-GCGCTCTAGATTAAAAAATTCCTGCGCCTAATG-3'  
 370-9 5'-GCGCTCTAGATTATGCAAAAATTCCTGCGCCTAATG-3'  
 370-8 5'-GCGCTCTAGATTACTTTGCAAAAATTCCTGCGCC-3'

全てのリバースプライマーは、XbaI 制限部位を含んでいた。サイクル条件は、94 で45秒、60 で45秒、72 で90秒、合計18サイクルであった。PCR産物をゲル精製し、MfeI および XbaI の両方で消化し、次いで MfeI / XbaI 二重消化 pOSEL237 および pOSEL249 中へ、それぞれサブクローニングした。配列をヌクレオチド配列決定によって検証し、タンパク質分析のために、構築物を L . jensenii 中へエレクトロポレーションした。

#### 【0166】

( L . jensenii 中の異種タンパク質発現のウエスタン分析 )

遺伝的に改変した L . jensenii 細胞を、100 mM HEPES ( pH 7 . 1 ) で緩衝した Rogosa SL プロス中、37、5% CO<sub>2</sub> で増殖させた。可溶性タンパク質のレベルを決定するため、12,000 × g で遠心後に馴化培地を集め、最終濃度 20% の TCA でタンパク質を沈殿させた。TCA 沈殿物をエタノールで洗浄し、風乾し、50 mM Tris - HCl ( pH 6 . 8 )、0 . 4% SDS、6% スクロース、10 mM ジチオトレイトールおよび 0 . 01% プロモフェノールブルー ( 1 × 還元 SDS - PAGE 緩衝液 ) 中で熱変性させた。L . jensenii 中の細胞結合タンパク質の相対量を決めるため、細胞溶解を誘起することなく、OD 600 単位あたり 100 µL の 1 × SDS - PAGE 緩衝液中、37、30 分間で細菌細胞を抽出した。12,000 × g で 5 分間遠心して収集した抽出タンパク質を、次いで熱変性した。14,000 × g で遠心して可溶性タンパク質を細菌細胞から分離し、製造業者の推奨に従い、抗酸化剤の存在下で、4 ~ 12% の NuPAGE システム ( Invitrogen ) 中で SDS - PAGE で分離した。電気泳動による分離後、20% メタノール、20 mM Tris および 50 mM グリシン中の 2 フッ化ポリビニリデン膜 ( Millipore ) 上にタンパク質をエレクトロブロットングした。次いで、このブロットをポリクローナルウサギ抗 CD4 抗体、T4 - 4 ( NIH AIDS Research and Reference Reagent Program ) またはウサギ抗 CV - N pAb、および c - Myc に対するモノクローナル抗体 ( Invitrogen ) で探索した。抗原 - 抗体反応を、アルカリホスファターゼ結合抗ウサギ IgG 用 ( CD4 検出用 ) に対する色素生成検出試薬

(Promega, Madison, WI)、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 共役抗マウスIgG用 (c-Myc検出用) の増強化学発光試薬 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いて可視化した。同様に、c-Mycタグ化タンパク質のレベルを抗c-Mycに対するmAb (Invitrogen) で探索し、結合抗体を、HRP結合抗マウス2次抗体 (Amersham Biosciences) で検出した。

#### 【0167】

(ムラミダーゼによる*L. jensenii*細胞壁の酵素消化)

10<sup>9</sup>個の細菌を含む細菌培養液を、12,000×gで5分間遠心した。得られた細胞ペレットを、20mM HEPES (pH7.2) で1回洗浄し、100μLの10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、25%スクロース中に懸濁した (Piardら、J. Bacteriol. 179:3068-3072 (1997))。細菌細胞壁を、最終濃度15単位/mlのムラミダーゼ、ムタノリシン (Sigma Chemical Co.) の存在下で、37℃で1時間消化した。その後、細胞を、2,500×gで10分間遠心し、プロトプラスト富化画分から細胞壁富化画分を単離した。細胞壁またはプロトプラスト富化画分それぞれに、25μLの4×還元SDS-PAGE緩衝液または125μLの1×還元SDS-PAGE緩衝液を添加後、得られたサンプルを熱変性した。あるいは、さらなるサンプル処理なしに細胞壁富化画分中のタンパク質を分析するため、CD4 ELISAを用いた。

#### 【0168】

(*L. jensenii*中の表面露出タンパク質のスルホ-NHS-ビオチンによる標識)

*L. jensenii*中の表面タンパク質の表面露出リシル残基を、膜不透過スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) - ビオチンの使用によって探索した。NHS-ビオチンによるグラム陰性細菌*Helicobacter pylori*の表面標識により、真の細胞表面タンパク質の同定が可能になる (Sabarthら、J. Biol. Chem. 277:27896-27902 (2002))。対数期の約10<sup>9</sup>個の*L. jensenii*細菌を1回洗浄し、PBS中に懸濁した。スルホ-NHS-ビオチンを1mlの細胞懸濁液に最終濃度1mMで加え、連続的に回転させながら室温で30分間インキュベーションした。その後、ビオチン化反応を、50mM Tris、pH8.0を加えてクエンチし、細胞を、20mM HEPES、pH7.2で1回洗浄した。細胞溶解を誘起することなく、細胞に結合したタンパク質を、125μLの0.4% SDS、6%スクロース、10mM DTT、50mM Tris-HCl (pH6.8) 中で、37℃で30分間抽出した。抽出されたタンパク質を、14,000×g、5分間の遠心により細菌細胞から分離した。熱変性後、タンパク質を、4~12% NuPAGE (Invitrogen) 中で分離した。ビオチン化タンパク質およびその移動度シフトを決定し、その後アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジン (streptavidin) または他の免疫プローブで探索した。

#### 【0169】

(フローサイトメトリーによる2D CD4の表面発現の分析)

pOSEL651中に表面タンパク質発現またはタンパク質分泌のためのプラスミドを有する形質転換*L. jensenii*を、20μg/mlのエリスロマイシンの存在下で、37℃、5%CO<sub>2</sub>で、MRSブロス中で一晚増殖させた (OD<sub>600</sub>>3)。特に指定しない限り、100mM HEPES、pH7.1で緩衝したエリスロマイシン含有MRSまたはRogosalブロス中、1:50~100希釈で一晩培養物を培養し、次いで、継代培養した。OD<sub>600</sub>~0.4の1mlの細胞培養液を、12,000×gで5分間遠心した。得られた細胞ペレットを2回洗浄し、2%FBSを含む1×PBS中に懸濁した。その後、特異性抗体 (2×10<sup>8</sup>個の細胞あたりウサギポリクローナルT4.4に対し1:1000希釈、またはモノクローナルSim.4に対し50μg/ml) を用いて、細胞を、1×PBS中の2%FBS中で30分間表面染色し、その後FITC

Cまたはフィコエリスリン結合抗ウサギ抗体またはフィコエリスリン結合抗マウス抗体 (Becton - Dickinson、Mountain View、CA) で表面染色した。表面発現CV-Nの検出のため、同様なプロトコールを開発した。コントロールはアイソタイプが適合するモノクローナル抗体 (Becton Dickinson) から構成した。標識細胞を、1% (v/v) パラホルムアルデヒドで固定し、CellQuestソフトウェアと共に作動するFACS Caliburシステム (Becton - Dickinson) で解析した。バックグラウンドコントロール中の密度プロット出力 (側方散乱または前方散乱 対 蛍光) を、POSEL175を有するL. jensenii から得た。プロット間の平均蛍光強度の変化を、細菌表面に結合する抗体の基準とし、FLOWJOソフトウェアを用いて計算した。

10

## 【0170】

(酵素結合免疫吸着アッセイ)

正しく折り畳まれた2D CD4タンパク質の濃度を、McCallusら (Viral Immunol. 5: 209 - 219 (1992)) に従って改変したCD4捕捉酵素結合免疫吸着分析 (ELISA) で決定した。細菌馴化培地中の正しい立体配座を有する2D CD4タンパク質を、2.5 µg/mlのモノクローナル抗体Sim.4により、MaxiSorp 96ウエルプレート (Nalge Nunc International、Denmark) 上に捕捉した。0.05% Tween 20を含む1x Tris緩衝生理食塩水中での洗浄後、E. coli由来のリフォールディングされた2D CD4標準を参照して、結合CD4分子を、ウサギポリクローナル抗体で探索し、次いで、T4-4を、3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン (Neogen Corp., Lexington, KY) の存在下で、室温で暗所に30分間置いて、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG (Amersham Biosciences) で検出した。100 µlの0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加した後反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices、Sunyvale、CA) を用いて450nmでの吸光度を読み取った。

20

## 【0171】

上記実施例は、本発明を説明するために提供されるが、その範囲を制限するものではない。本発明の他の変法は当業者に容易に明らかであり、かつ添付の特許請求の範囲によって包含される。本明細書において引用する全ての刊行物、データベース、GenBank配列、特許および特許出願は、本明細書によって参考として援用される。

30

## 【0172】

(配列表)

## 【0173】

【化 2 3】

配列番号 1

C14 配列

<sup>1</sup>MNDSSIGTTNITNDITITGKVNGLTTSGISDINKHFLYLQSEGSARDLTINGNGHRINFA  
GYSIALQNKNYTNAAANPWNITLKDMTIEGSKYDYSPISFYGRKSNTENSKLTFDGV  
ANLNDRPLVDKYGENLPVHFAGENNITLNNMSIGYNLVTGKTVKFDSGNTTFNV  
KVTGNSINPDNWVIRSTENASNSNPSTLINEGATVTINAKSDDLGRGIYAGRQLTAGQ  
PIYGVTVINGTLNAKMAAGHSTAIWSDLEIGKKGNVTIHTKQTNQADGVENGTSNS  
VTNYNGTHYAPISLGVGPISVVASPLSKQTVSLINNGSLTIIRD<sup>10</sup>TAKKTLVPLISMGDGS  
LSSNTTLKFSVAGATLDLQDKAGTFRYGIEPSTPLNGLVTLWGTS<sup>10</sup>SGTDLLEFLTPAY  
VNLQRTGDIRGTLIRMEGVYNSTTVNGPTPVAQWDQGNKTTTPNDVWYVRYLISAN  
QWGNNSGQFMGKDQHPNTVVAKKGVD<sup>10</sup>TLYNSNATVLM<sup>10</sup>SKNQGADKYENGTMPT  
EVQQALHLNSFLN<sup>10</sup>FNFWRPQRMAMGSKLNDNPDVKIDDFDKYHAEAQTIDGTR  
QTLSDL<sup>10</sup>DANKGLKDLIGPDEQPITDFKDIVKHVTWYNSATDKDEW<sup>10</sup>NKIMIQPTDSKD  
PSARVPYEPQNP<sup>10</sup>TGNLKT<sup>10</sup>TDGFAWAKV<sup>10</sup>TYADGSVDFVKIPLKVTEKKYSEELTPSY  
PGVSV<sup>10</sup>EQGKSDSVDP<sup>10</sup>SFKDENDKAADAPAGTKYTAGENTPDWIKVDPDTGKVTVSP  
TDDTSV<sup>10</sup>GSHDISVTVTYPDSSTDQLTVPVTVTEKSNLAEKYPVSYDKLNVEKPSGDT  
PATGA<sup>10</sup>VDPKAAADMPEGAITGYEKGDFDAPAGVTIDVNHDTGKVTASV<sup>10</sup>GKNATLG  
SFEV<sup>10</sup>PVKV<sup>10</sup>TYSDGTYAEVKVPV<sup>10</sup>SITGNKVD<sup>10</sup>PGSGDVVY<sup>10</sup>YGDQSMV<sup>10</sup>VFNGLTTVH  
KTDSHEL<sup>10</sup>SAKDSAFQTTITYSDWNKKGNIVSDYNKHVIYKLSADG<sup>10</sup>TKYVNEADAT  
DSFDASAISFNWQKGYEVNTGVDNFSNGSADTLYQLEKGA<sup>10</sup>VNSEEQTDANDPSGLA  
GNSKYRYDFSISDTNVLQKLGLSPAGYNAWANVY<sup>10</sup>YNFLGATGKINIPVNYGSEVSTD  
EAGIKNYLATNSISGKTFVNGNPTGIKWAENGMPGKDGKFAASNMTGIVEFTFDNGT  
KLN<sup>10</sup>VQVTFKTGSHVSTSGSKVND<sup>10</sup>DTNLYVERTIEYDVTGTGHSPINSVTQKVHYVRD  
GYHKINADGTDAGEI<sup>10</sup>WNEWK<sup>10</sup>LADGQTAEFPEYSVDQITGYDAYINGAKATQVDA  
KVAETNGTPQNGQ<sup>10</sup>NITV<sup>10</sup>TYKKQNSTPVPYKPGKDG<sup>10</sup>VNDAINRYVTRTIIVKEPGKEP  
QTITQTVHFTNEDKDGNSGYKDPVTGEIKYNTDWHVASDLNAKTGSWEEYTAPSVT  
GYTPSQAKVEAKTVTAETEAASVTISYTKNADIPVPYKPGKDG<sup>10</sup>VNDAINRYVTRTIIV  
KEPGKEPQTITQTVHFTNEDKDGNSGYKDPVTGEIKYNTDWHVASDLNAKTGSWEE  
YTAPSVTGYTPSQAKVEAKTVTAETEAASVTISYTKNADIPVPFDPSNKDMYREVTR  
TINVDPITGKISTSVQTAKFTREDKNSNAGYTD<sup>10</sup>PVTGKTTMNPWTPAKOGLRAVNV  
EQIKGYVAKVDGNVDAVVVTPDSANMVVTITYQANKPEGONITVKKDTPDPADGI  
KNKDDLDPGTYTWKEVPDVNSVGEKTGIVTVTFPDGTSVDVKVTVYVDPV<sup>10</sup>VESN  
RD<sup>10</sup>TLSKEANTGNTNVAKAATVTSSKVESK<sup>10</sup>TLPQTGSKTEQVGLGLAIATVGSLLG  
LGVNRKKRQK<sup>1765</sup>

10

20

30

【 0 1 7 4 】

## 【化 2 4】

配列番号 2

## C191 配列

<sup>1</sup>MPVANKPEGTVHTTYSWKDNIPDTTKPGTKYGIVEVNFDPDGSTKDVPEVKVTSL  
 ASDYQNKIDTKQIIAKYKGNIPQASDGIANKDQATKEGDKDFPSLADVLPNGIQWK  
 KNFEPDLSKPGLTSGEAILTFKDGSTAEVTPVLVQTDADRNPETQTIKTLPGQTVNP  
 EDGVINLHKPGENNPQLPDGTVTFDNQSDVDDFTKHGMPGSDKSFDATVTPDGT  
 TDKIKLPVHITADNEVNTPIQGIITPKDSVPDANKGIANLKKATTKEGKTYPALPENT  
 TVEWVNPQQMKTENAKGGTTKNYDAVVIYPDKSTEIVSIPVTVAATDADTYKVVT  
 QPIDLKDRNLPDNADDGITNLHKPADFKTPQLPDGTHAEWQDKDAAQEVVKNLKP  
 ETVKLPATVVFPDGSKKGEGIDVSVHLHGQSDDYNIETQPVNTDKDGNLPENADSGI  
 KNLGKLPEGTHASWGDGAQDIKLNKPGETKDVPAATVFPDGSKKEITIPVHREGQS  
 DGYDVEPQLVNTDKNGQLPNAKEGIKNLADLPEGTNPTWADRAQDKINKTKPGTDT  
 TAQVVVTFPDGSTKEVTVPVHKGQSDDYGDKIVTQRVETDSHGQLPENADSGIKN  
 LGDLPEGTHAVWGQAQTIVDGMKPGETKDVPAATVFPDGSKKEITIPVHREGQS  
 GTLNPPTDKVSVDDTKHITDEDK GKVIDNVKKSNDPKDITDAHVDDDGTFHGKVDG  
 QDVVIPGTETVVEKQKESLNPPTDKVPVDDTKHITDEDK GKVIDNVKKSNDPKDITD  
 AHVDDDGTFHGKVDGQDVVIPGTETVVEKQKESLNPPTDKVPVDDTKHITDEDK GK  
 VIDNVKKSNDPKDITDAHVDDDGTFHGKVDGQDVVIPGTETVVEKSTNNQKSDTNK  
 GLISNDNSEKNSHMINANVNTKSRNSLSAKQNRLPQTGSETSGLSALGLAMLSLVGL  
 GFLIKRKED<sup>974</sup>

10

20

## 【 0 1 7 5 】

【化 2 5】

配列番号 3

C370 配列

<sup>1</sup>MFYQIDPALAPYIDKIVFSRALLSDGEATKDTSNVPGATNVWTSGLTTQNGPIRA  
 ALAGSTSSTYKIYLKADTPNSILSKPLSFTMWARYSSGHDMVSDFSKNLILNDNETTT  
 FSSNNFFKSLDIVNNDGPILDNMSVDYSNKTVNTRYRVNGSLLGDKSNLTLRIRGND  
 NLLKLIDKVKISNKTYTLANNTLKYRTGELYINDIGGSLGFLSSLSNRQDFNVTFYLK  
 NGKSFADALTSESQKFDQFGIYDTTDYATAFHSLDVTNSLSTKYTTGDKYNNQT  
 YDLSTFKTILDKLIKQKQDNPTTYLSFEDKKISATENNPYEAVKLALESPTFTNISIAKS  
 LVNAADCKQLDNTAKWAWDNGARDDLKYLDVATKVASYIHLEFPTKPTDFSGLL  
 LRYTRAGTFISAVDSDRDGVLDITEIDNSYGMNPSVYD TDGDGIGSDGQELREGRDPG 10  
 VAPFNWTDANGNQLSIDVDTTTISGQLGNHNYHNEVMQPRTVNLYKVDDTGKKTLI  
 AYTTSVDQNGSFTLSKFTLNKGDKLVIGYVTPRTNKS LTDKDTILQQAFPT EQFSNE  
 IIVK GKQVTVTFNMNGVSDDENQDIKVEKDSSFNKDSLTLPTPTMKTGYSFKEWNTQ  
 ADGKGT VVTADTIFD TDTTVY AIGEKIKLPNPTNIKAETR TDDKTKS QETIITGKATPG  
 ATVTIKDNLGNEIGTGVANDAGNFEIKTTSPLAEATKVSVEATKGGESSDAVEATVE  
 QNNFQKGNPLIQPASPTAVTAVTIKASDGTNNSTTVTGKAAAGETVTVKDSSGNEIG  
 TGVVGEDGTFTITTNKPIAENERIQVVTKDDAESEPTAEVVTAKTEPTNPTEVTAKT  
 LPDGNSDSTIVAGKKGAGE  
 VVTVKNDAGKVIGTGKVSDDGTFSIKTDEVIEPGKQVSVITTNDGMD SIPVPVTVSGE  
 TITSIKQSAKAAVDNLTYLNAQKQSAKDAIDSAANTVDEITTAKNNAVSTDTNMKDL  
 SEDTKLAADKTQDPYLNADLDKQAYDKAVEEAQKLLNKETGTSVGADKDPAEVA 20  
 RIKQAVDDAYDALNGNSSLDDAKQAKDAVDKNYTNLNDKQKETAKKRIDS AKSE  
 DEVNNADKINSGLNEKMGELKEVSNLSDKIETTSNYSNADSDKKQAYKETADKIHET  
 VAPSGDDLTTDDVNNLITDEATKRAALNGDAREKARQE  
 LENNYNSGKSLQDGSTLDPRYYNASEEKKQAFQKALD NAKKALDNSETTEAEYKSA  
 NDELQKAKADLDGQTTDKSKLDDAIKDANNAKGTDKYKNASDDTKSKFDEALKKA  
 EEVKNNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNNLNGQTTDKSKLDDAIKDANNAKGTDKY  
 KNASDDTKSKFDDALKKAEEVKNNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNDLDGQTTDKS  
 KLDEAITDANNTKLDKYNNASDDTKSKFDEALKKAENVKND SNATQKEVDDATN  
 NLKQAQNDLDGQTTDKSKLDEAITDANNTKSTD KYNNASDDTKSKFDEALKKAEE  
 VKNNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNNLDGQTTDKSKLDEAITDANNTKSTD KYKNA  
 SDDTKSKFDDALKKAEEVKNNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNDLDGQTTNKD TLND  
 AIKDANDAKGTDKYKNASDDTKSKLDETLKKAEEVKNNNSNATQKEVDDATNNLKQ 30  
AQNDLDGQTTDKSKLDEAIKSADDTKSTD KYNNASDDTKSKFDEALKKAEEVKNN  
NATQKEVDDATKNLQAQNDLDGQTTNKDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDT  
KSKFDDALKKAEDVKND SNANQKEVDDATKNLKNLNNLKGOPAKKANLIASKDN  
AKIHKOTLLPOTGTETNPLTAIGIGLMALGAGIFAKKKR KDDEA<sup>1903</sup>

【 0 1 7 6】

## 【化 2 6】

## 配列番号 4

KKAEVKNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNLDGQTTDKSKLDEAIKSADDTKSTD  
 KYNNASDDTKSKFDEALKKAEEVKNNNSNATQKEVDDATKNLKQAQNLDGQTTN  
 KDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDTKSKFDDALKKAEDVKNDSNANQKEVDD  
 ATKNLKNTLNNLKGQPAKKANLIASKDNAKIHKQTL

## 配列番号 5

GQTTNKDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDTKSKFDDALKKAEDVKNDSNANQK  
 EVDDATKNLKNTLNNLKGQPAKKANLIASKDNAKIHKQTL

10

## 配列番号 6

VTRTINVVDPITGKISTSVQTAKFREDKNSNAGYTDPTGKTTMNPWTPAKQGLRA  
 VNVEQIKGYVAKVDGNVDAVVVTPDSANMVVTITYQANKPEGQNITVKKDTPDP  
 ADGIKNKDDLPDGTKYTWKEVPDVNSVGEKTGIVTVTFPDGTSVDVKVTVYVDPVV  
 ESNRDTLSKEANTGNTNVAKAATVTSSKVESKKT

## 配列番号 7

VTRTINVVDPITGKISTSVQTAKFREDKNSNAGYTDPTGKTTMNPWTPAKQGLRA  
 VNVEQIKGYVAKVDGNVDAVVVTPDSANMVVTITYQANKPEGQNITVKKDTPDP  
 ADGIKNKDDLPDGTKYTWKEVPDVNSVGEKTGIVTVTFPDGTSVDVKVTVYVDPVV  
 ESNRDTLSKEANTGNTNVAKAATVTSSKVESKKTLPQTGSKTEQVGILGLAIAVGS  
 LLGLGVN

20

## 配列番号 8

KKAEVKNNSNATQKEVDDATNNLKQAQNLDGQTTDKSKLDEAIKSADDTKSTD  
 KYNNASDDTKSKFDEALKKAEEVKNNNSNATQKEVDDATKNLKQAQNLDGQTTN  
 KDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASDDTKSKFDDALKKAEDVKNDSNANQKEVDD  
 ATKNLKNTLNNLKGQPAKKANLIASKDNAKIHKQTLPLPQTGTETNPLTAIGIGLMAL  
 GAGIFA

## 【図面の簡単な説明】

30

## 【0177】

【図1】図1は *L. jenseni* 1153 のゲノム配列決定後に同定された3種の細胞壁アンカータンパク質の構造を示す。3つのタンパク質の全ては疎水性領域および荷電C-末端テールに先行するLPQTG識別シグナルを有し、独自の長い繰り返し配列を有する。CWAはLPQTGモチーフの上流の推定細胞壁関連領域を示す。

【図2A】図2Aは *L. jenseni* 1153 のゲノム配列決定から得られた細胞壁アンカー配列(C14、C191およびC370)を示す。CWA200領域と共にアンカーモチーフに下線が引かれている。CWA200はLPQTGモチーフの上流の約200アミノ酸の推定細胞壁関連領域または推定細胞壁貫通領域を表す。

【図2B】図2Bは *L. jenseni* 1153 のゲノム配列決定から得られた細胞壁アンカー配列(C14、C191およびC370)を示す。CWA200領域と共にアンカーモチーフに下線が引かれている。CWA200はLPQTGモチーフの上流の約200アミノ酸の推定細胞壁関連領域または推定細胞壁貫通領域を表す。

40

【図2C】図2Cは *L. jenseni* 1153 のゲノム配列決定から得られた細胞壁アンカー配列(C14、C191およびC370)を示す。CWA200領域と共にアンカーモチーフに下線が引かれている。CWA200はLPQTGモチーフの上流の約200アミノ酸の推定細胞壁関連領域または推定細胞壁貫通領域を表す。

【図3】図3は、MRSプロス(A)またはRogosa SLプロス(B)中、37および5%CO<sub>2</sub>で培養した場合の、形質転換 *L. jenseni* 1153 のムタノリシン消化後の、SDS抽出可能タンパク質および細胞壁富化画分のウエスタン分析の結

50

果を示す。還元性 SDS - PAGE での分離後、これらのタンパク質を c - Myc に対するモノクローナル抗体 ( mAb ) を用いて探索するために、P V D F 膜にエレクトロブロットティングした。

【図 4】図 4 は、R o g o s a S L プロセス中で 37、5% CO<sub>2</sub> で培養した場合の、形質転換 L . j e n s e n i i 1153 のムタノリシン消化後の、細胞壁富化画分のウエスタン分析の結果を示す。還元性 SDS - PAGE 中で分離後、C D 4 ( T 4 - 4 ) に対するポリクローナル抗体 ( pAb ) で探索するために、タンパク質を P V D F 膜にエレクトロブロットティングした。発現構築物は以下の要素を含んでいた：p O S E L 651 中の P<sub>23</sub> プロモーター - C b s A シグナル配列 ( C b s A s s ) - 2 D C D 4 ; p 237 中の C 14 配列の P<sub>23</sub> プロモーター - C b s A s s - 2 D C D 4 - C W A 200 - アンカー；p O S E L 242 中の C 191 配列の P<sub>23</sub> プロモーター - C b s A s s - 2 D C D 4 - C W A 200 - アンカー；p O S E L 249 中の C 370 配列の P<sub>23</sub> プロモーター - C b s A s s - 2 D C D 4 - C W A 200 - アンカー。C W A 200 は、C - 末端アンカードメインの上流の約 200 アミノ酸を表す。

10

【図 5】図 5 は、2 D C D 4 の分泌または表面固定のために設計した L . j e n s e n i i 1153 を有するプラスミドのフローサイトメトリー分析の結果を示す。細菌細胞を、C D 4 に対する ( T 4 - 4 ) ウサギ pAb で探索し、次いで F I T C 結合抗ウサギ抗体 ( A ) で探索した。あるいは細菌細胞を、mAb S i m . 4 で探索し、次いで P E 結合抗マウス I g G ( B ) で探索した。コントロールは、未染色細胞またはフルオロクローム結合 2 次抗体で探索した細胞である。細菌表面へ結合する抗体の基準としての蛍光濃度を、F L O W J O ソフトウェアを用いて計算した。

20

【図 6】図 6 は、長さが 36 アミノ酸である C - 末端アンカーモチーフが、2 D C D 4 の表面発現を駆動するのは不十分であることを示す。( A ) L . j e n s e n i i 中のネイティブアンカー配列を用いる 2 D C D 4 の表面発現用に設計された構築物。( B ) p O S E L 238 または p O S E L 237 を有する L . j e n s e n i i 1153 のフローサイトメトリー分析。細菌細胞を C D 4 に対する mAb S i m . 4 で探索し、次いでフィコエリスリン ( P E ) 結合抗マウス抗体で探索した。コントロールは無染色細胞または P E 結合 2 次抗体で探索した細胞である。

【図 7】図 7 は、C 370 配列中の L P Q T G 識別シグナルの上流の種々の数の繰り返し細胞壁貫通配列により影響を受ける場合の L . j e n s e n i i 1153 中における 2 D C D 4 の表面発現を示す。正しく折り畳まれた立体構造をとる表面露出 2 D C D 4 分子を、以下のプラスミドを有する細菌細胞中のフローサイトメトリー分析のために、mAb S i m . 4 で探索した：175、陰性コントロール；249、2.5 回反復；262、反復なし；268、1 回反復；278、2 回反復；280、4 回反復；281、7 回反復；276、8 回反復。

30

【図 8】図 8 は、ヒト起源の様々な乳酸桿菌種における c - Myc タグ化タンパク質の表面提示を示す。( A ) P 23 プロモーターおよび C b s A シグナル配列 ( C b s A s s ) の制御下における C 370 配列の c - Myc タグ化 C W A 200 の発現のために設計された p O S E L 241 の概念図。( B ) 形質転換された L . j e n s e n i i、L . g a s s e r i および L . c a s e i のムタノリシン消化後の細胞壁富化画分のウエスタン分析。還元性 SDS - PAGE 中で分離後、c - Myc に対する mAb で探索するためにタンパク質を P V D F 膜にエレクトロブロットティングした。( C ) p O S E L 241 を有するヒト腔の乳酸桿菌単離物のフローサイトメトリー分析。細菌細胞を c - Myc に対する mAb で探索し、次いでフィコエリスリン ( P E ) 結合抗マウス抗体で探索した。コントロールは、非染色細胞または P E 結合 2 次抗体で探索した細胞から構成された。

40

【図 9】図 9 は、L . j e n s e n i i 1153 中の 2 D - C D 4 - C W A 200 の表面提示上の C 14 配列および C 370 配列の L P Q T G モチーフにおける点突然変異の効果を示す。細菌細胞を、あらかじめ力価を測定した mAb S i m . 4 ( A ) または pAb T 4 - 4 ( B ) を用いて表面染色し、次いで P E 結合抗マウス抗体または F I T C 結合抗ウサギ抗体で探索した。フローサイトメトリー分析を F A C S c a l i b u r システ

50

ム中に行った。p O S E L 2 3 7 および p O S E L 2 4 9 の細胞表面上に提示されたタンパク質と、突然変異誘発性構築物を有する細菌細胞中のタンパク質との間の差を、平均蛍光強度で表した。p O S E L 2 3 7 または p O S E L 2 4 9 を有する細菌細胞中の 2 D C D 4 の表面提示を、任意に 1 0 0 % と設定した。

【図 1 0】図 1 0 は、C 1 4 配列および C 3 7 0 配列の C - 末端荷電テール中の欠失構築物の概念図を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、2 D C D 4 - C W A 2 0 0 の表面提示上の C 1 4 および C 3 7 0 の C - 末端荷電テール中の配列欠失の影響を示す。細菌細胞をあらかじめ力価を測定した p A b T 4 - 4 ( A ) または m A b S i m . 4 ( B ) を用いて表面染色し、次いで F I T C 結合抗ウサギまたは P E 結合抗マウス抗体で探索した。細胞壁アンカータンパク質への抗体の結合を F A C S c a l i b u r システムを用いるフローサイトメトリーで分析した。p O S E L 2 3 7 または p O S E L 2 4 9 の細胞表面上に提示されるタンパク質と、突然変異誘発構築物を有する細菌細胞中のタンパク質との間の差を、平均蛍光強度として表した。p O S E L 2 3 7 および p O S E L 2 4 9 を有する細菌細胞中の 2 D C D 4 の表面提示を、任意に 1 0 0 % と設定した。

10

【図 1 2】図 1 2 は、p O S E L 6 5 1 を有する L . j e n s e n i i 1 1 5 3 由来の 2 D C D 4 に対する、p O S E L 2 3 7 - 7 および p O S E L 2 4 9 - 1 0 を有する L . j e n s e n i i 1 1 5 3 中の分泌 2 D C D 4 - C W A 2 0 0 の活性の比較を示す。無細胞馴化培地中で正しく、適切に折り畳まれた立体構造をとるタンパク質を認識するために、C D 4 E L I S A を設計した。タンパク質量を、その p A b T 4 - 4 に対する免疫応答性に基づいて正規化した。p O S E L 6 5 1 を有する細菌細胞から放出される可溶性 2 D C D 4 タンパク質を、任意に 1 0 0 % に設定した。

20

【 図 1 】

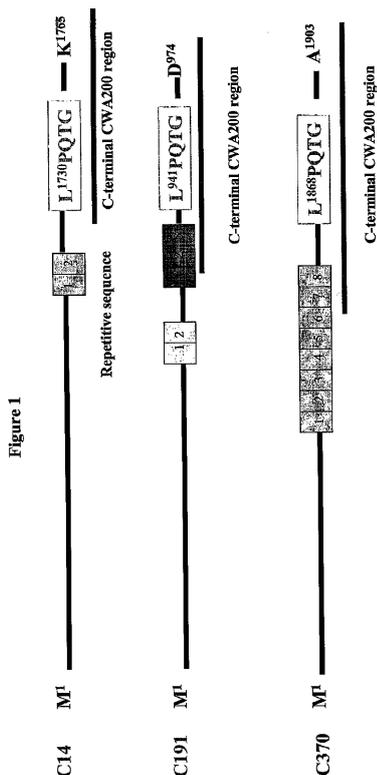


Figure 1

【 図 2 A 】

Figure 2A

C14 SEQUENCE RESULTING FROM GENOMIC SEQUENCING OF L. JENSENII 1153 (CWA200 REGION ALONG WITH ANCHOR MOTIF UNDERLINED)

```

^MNDSSGTTNITNDITITGKVNGLTTSGISDINKHFLYLQSEGSARDLTINGNGHERINFA
GYSIALQNKNYTNAANPWNTILKDMTIEGSKYDYSPISFYGRKSNTEKSLTFDGVTV
ANLNDRPLVDKYGENLPVHFAGENNITLNNMSIGVNLVTKGTVKFDPSGNTTFNVVG
KVTGNSINPDNWNVIRSTENASNSNPSTLINEGATVITNAKSDDLRGIYAGRLTAGQ
PIYGVTVINGTLNAKMAAGHSTAIWSDLEIGKKGNVTIHTKQTNQADGVNNGTSSNS
VTNYNGTHYAPISLGVGPISVVASPLSKQTVSLNNGSLTIIRDITAKKTLVPLISMGDGS
LSSNTTLKFSVGAGATLDDLDKQAGTFRYGIPTPLNGLVTLWGTSGIDLLEFLTPAY
VNLQRTGDIRGTLIRMBEYVNSTTVNGPFPVAQWDQGNKTTTPNDVWYVYRILISAN
QWGNNSGQFMGKDKQHPNTVVAKKGVDITLYNSNATVLM5KKNQGADKYENGTMTPT
EYQQALHLSNIFLNFWRFQRMAMGSKLNNDPDKDDDKYHAEAQITDGTTR
QTLSDLDANKGLKDLIGFDEQPIITDFKDIVKHVTFWYNSATDKDEWNKIMIQPTDSKD
PSARVPYPBPQNPNTGNLKTDDGFAWAKVTYADGSDVDFVKIPLVTEKYSBELTPSY
PGVSVBQKSDSDVPSFKDENDKAADAPAGTKYTAGENTPDWIKVDFDTGKVTVSP
TDDTSVSGHSDISVTYTPDSSDQLTVPVTVTEKSNLAEKYVPSYDKLNVEKPSGDT
PATGAVDPKAAADMPBGAITGYEKGDFDAPAGVTIDVNHDTGKVTASVGKNAITLG
SFEVPVKVYSDGTYAEVKVPSITGNKVDPGSGDVVYVYGDQSMVVINGNLTIVH
KTDSHEL5AKDSAFQITTYSDWNKKNIVSDYNKHVIYKLSADGTYVNEADAT
DSFDASAI5FNWQKGYEVNTYVDNFKSNGSADTLYQLEKAVNS5EQTDANDP5GLA
GNSKYR5YDF5ISD5TNVLQKLG5LSPAGYNAWANVY5Y5N5FLGATGKINIPV5Y5G5E5V5D
EAGIKNYL5ATN5ISGK5TFV5NG5NPT5GIK5WA5ENG5MP5GK5D5GK5FA5ASN5MP5GIV5E5FT5D5NGT
KLN5VQ5T5FK5G5H5V5T5S5G5K5N5DD5IN5LY5VER5ITE5YD5VT5GT5G5H5P5INS5TV5Q5RV5HY5VRD
GY5HK5IN5AD5G5TD5AG5HI5W5NE5W5KL5AD5G5QT5AE5FF5Y5SD5Q5IT5GY5DA5Y5NG5AK5AT5Q5V5DA5
KVA5ET5NG5TP5Q5NG5Q5N5IT5Y5Y5K5Q5NS5TP5PY5K5PK5G5KD5GV5ND5AIN5Y5TR5TI5V5K5EP5K5EP
Q5IT5Q5TV5H5FT5N5ED5K5D5G5NS5GY5K5DP5VT5GE5K5Y5NT5D5WH5V5AS5DL5NA5K5G5W5EE5Y5AP5SY5T
GY5TP5Q5AK5VE5AK5VT5AE5TE5A5S5Y5IS5Y5TK5NA5DIP5V5Y5K5PK5KD5GV5ND5AB5RY5TR5TI5V
KE5G5K5EP5Q5IT5Q5T5H5FT5N5ED5K5D5G5NS5GY5K5DP5VT5GE5K5Y5NT5D5WH5V5AS5DL5NA5K5T5G5W5EE
YT5AP5SV5T5GY5TP5Q5AK5VE5AK5VT5AE5TE5A5S5Y5IS5Y5TK5NA5DIP5V5Y5K5PK5ND5MY5RE5V5TR
TIN5V5DIP5IT5G5K5IS5IS5V5OT5AK5F5I5RED5K5NS5AG5Y5TD5P5TG5K5T5M5NP5W5TP5AK5Q5L5RA5NV
EQ5IK5GY5V5AK5VD5GN5V5DA5V5Y5TP5DS5AN5MV5Y5T5Y5Q5ANK5P5EG5Q5N5IT5V5K5DT5VP5D5AD5GI
KN5K5DDL5PD5GT5KY5TW5KE5VP5DV5NS5V5G5E5K5T5G5H5V5T5FP5D5G5IS5DV5KV5TV5Y5V5DP5V5ES5N
RD5TL5SK5H5ANT5G5NT5V5AK5A5AT5T5SS5K5V5ES5K5TL5P5OT5G5K5TE5Q5V5G5IL5GL5AI5AT5V5G5LL5G
L5GV5NR5KK5K5R5K5

```

【 2 B 】

Figure 2B

C191 SEQUENCE RESULTING FROM GENOMIC SEQUENCING OF *L. JENSENI* 1153 (WITH CWA200 REGION ALONG WITH ANCHOR MOTIF UNDERLINED)

MPVANKPEGTVHTTYSWKDNIIPDTIKPGTKYGVVFNPDGSKTDVPEVVKVITSL
ASDYQNKIDTKQIAKYKGNPQASDGIANKDQATKEGDKDFPSLADVLAPNGIQWK
KNFEPDLKPGLSGAEAILFKNDGSTAEVTPVLVQTDADRNTPETQTKITLPGQTVNP
EDGVNLRHKGGENNPQLPDGTVKVIIPDNQSDVDDFTKHGMPPGSDKSFDAVTYDPDGT
TDKIKLPVHITADNEVNTPIQGHIPKDSVDPANKGIANLKKATTKGKTYPALPENT
TVEVWNPQMKTLENAKGGTITKNYDAVVIYDPKSTEVISIPVTVATDADTYKVVV
QPIDLKDRNLFPDADGHTNLHKPADFKTPQLPDGTHAEWQDKDAAQBVVKNLKP
ETVKLPATVVFDPGSKKGEIDVSVHLHGQSDDYNIETQPVNTDKDGNLFPENADSGI
KNLGLKLPFGTHASWGDGAQDIANKLKPGETKDVPAIVVFDPGSKKEITPVEHREGQS
DGYDVPEQLVNTDKNGQLPNAKFGKLNADLPEGTNPTWADRAQDKINKTKPGTDT
TAQVVVTFPDGSKTEVTVFPHKHGSDSDYGDKIVTQRVEIDSHGQLPENADSGIKN
LGDLPBGTHAVWGQGAQITVDGMKPGETKDVPAITRFDPGSKTDVTPVYKTSRDO
GTLNPTDKVSVDDTKHTDEDEKGVINDVVKSNPDKDITDAHVDDDGTFHKGVDG
QDVVPEGTETVVEKQESLNPPDKVPVDDTKHITDEDEKGVINDVVKSNPDKDIT
AHVDDDGTFHKGVDGQDVVPEGTETVVEKQESLNPPDKVPVDDTKHITDEDEKGV
VIDNVKSNPDKDITDAHVDDDGTFHKGVDGQDVVPEGTETVVEKQESLNPPDKDIT
GLISDNDNSEKNSHMINANVNTKSRNSLSAKONRLPOTGSETSLGALGLAMLSLVLG
LQFLIKKRKED<sup>194</sup>

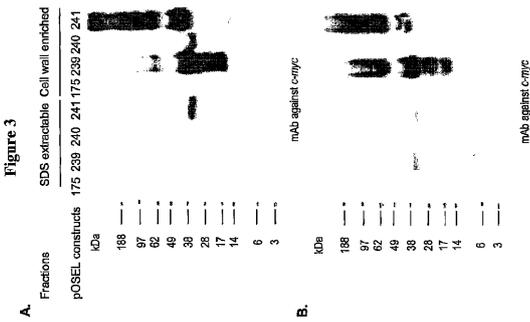
【 2 C 】

Figure 2C

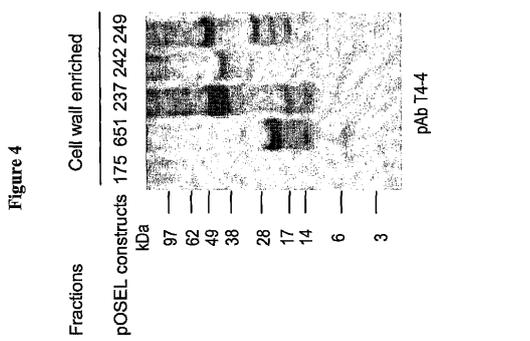
C370 SEQUENCE RESULTING FROM GENOMIC SEQUENCING OF *L. JENSENI* 1153 (WITH CWA200 REGION ALONG WITH ANCHOR MOTIF UNDERLINED)

MFYQIDPALAPYDIKIVFRRALLSDGEATKDSNEVPGATNWTSGVLTQNGPIRA
ALAGSTSYTYKYLKADTPNSLSKPLSFTMWARYSSGHDMVSDPSKLNLDNDNETTT
FSSNPFKSLDIVNNDGPILDNMSVDYSNKTVNTRYVNGSLLGDYSNLTLRKGN
NLLKLDKVKISNKTYTLANNTLKYRTGELVINDIGSGLGFLSSLNRQDENVTFYLLK
NGKSFADALTSSEKQDFQGIYDITDYATAFHSLDITVNTSLSTKTYTGDKNYNT
YDLSFKTILDKLQKQDNPTVYLSFHDKKSATENNPEYAVKLALESPTFNISIAKS
LVNAADCKQLDNTAKWAWDNGARDLLKYLVDVATKVASYHLEFPKPTDFSGLL
LRYTRAAGTFISAVDSRDRDGLDTEIDNSYGMNPSVYDGDGIDSGQLREGRDGP
VAFNWDANDGNQLSIDVDTTISGQLGNHNYNHEVMQPRVNLKYVDVDTGKTKLI
AYTTSAVDQNGSFTLSKFTLNKGDKLVIGYVTPRINKSLDKDITLQQAPEQFSNE
IIVKGGQVTVTFNMGVSDDENQDKVEKDSFNDLSLTPITMKTGYSFKEWNTQ
ADGKGTVVADTIFDITDVTVAIGEIKLNPNTIKAEITRIDDKTKSQETIIGKATPG
ATVTKDNLGNEIGTVANDAGNFEIKTSPLEABATKVSVEATKGGSSEDAVEATVE
QNNFQKGNPLIQPASPTAVTAVTIKASDGTNNTTIVTGKAAAGETVTVKDSGSEIIG
TGVVGEDGTFITITNKPIAENRIVVTKDDAESPEEAVVTAKEPTNPTVEVTAKT
LPDGNSSDSTIVAGKKGAGE
VVTVKNDAGKVIQTKVSDDGTFHSIKTDEVIEPGKQVSVITINDGMSIPVPTVSGE
TISIKQSAKAAYDNLTYLNAQKQSAKDAIDSANTVDEITAKNNAVSTDTNMRDL
SEDTKLAADKTQDPTLNADLDKQAVDKAVEEAQKLLNKETGTSVGAADKPAEVA
RIKQAVDDADYALGNSSLDLAKQAKADAVDKNYTNLNDKQKETAKRKIDSAKSE
DEVNNAKINSGLNEKMGELKEVSNLSDKIETTSNYSNADSDKQAYKETADKIHET
VAPSGDILLTDDVNNLITDEAKRAALNGDAREKARQE
LENNYNSGKSLQDGTLDPRYVYNASEEKQAFQKALDNAKALDNETTEAEYKSA
NDELQKAKADLQDGTIDKSKLDDAJKDANNAKGTDKYKNASDDTKSKFDEALKKA
EEVKNSNATQKEVDDATNLLKQANNLNGQTDKSKLDDAIKDANNAKGTDKY
KNASDDTKSKFDDALKKAEVKNNSNATQKEVDDATNLLKQANNLNGQTDKSK
KLDEAITDANNTKLDKYNASDDTKSKFDEALKKAEVKNNSNATQKEVDDATN
NLKQANNLNGQTDKSKLDEAITDANNTKLDKYNASDDTKSKFDEALKKAE
VKNNSNATQKEVDDATNLLKQANNLNGQTDKSKLDEAITDANNTKLDKYNAS
SDDTKSKFDDALKKAEVKNNSNATQKEVDDATNLLKQANNLNGQTDKSKLDE
AIKDANDAKGTDKYKNASDDTKSKLDEITKKAEEVKNNSNATQKEVDDATNLLKQ
AONDLGQTDKSKLDEAITDANNTKLDKYNASDDTKSKFDEALKKAEVKNNS
NATQKEVDDATNLLKQANNLNGQTDKSKLDEAITDANNTKLDKYNASDDTK
KSKFDDALKKAEVKNNSNATQKEVDDATNLLKQANNLNGQTDKSKLDEAITDAN
LASKDN
AKHKOTLIPOTGETNPLTAIGLIGMALGAGIAKKRQDEA<sup>193</sup>

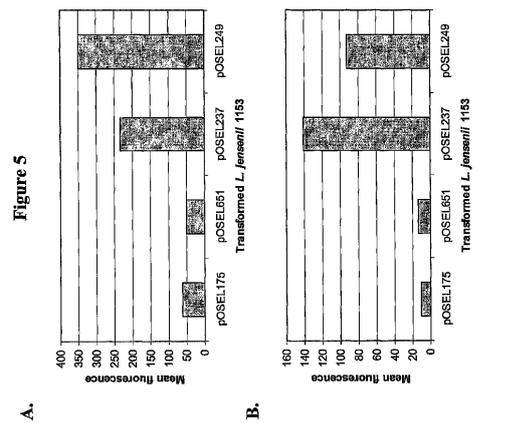
【 3 】



【 4 】

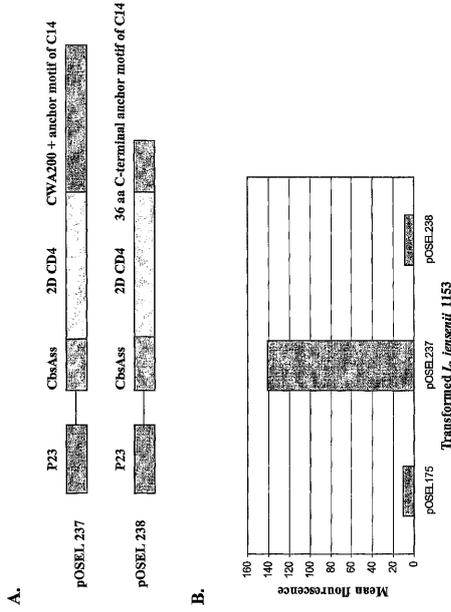


【 5 】



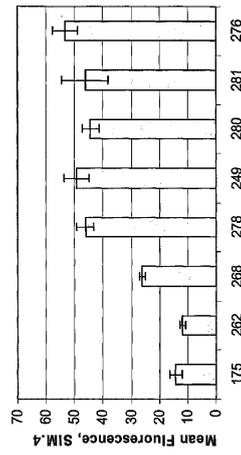
【 6 】

Figure 6



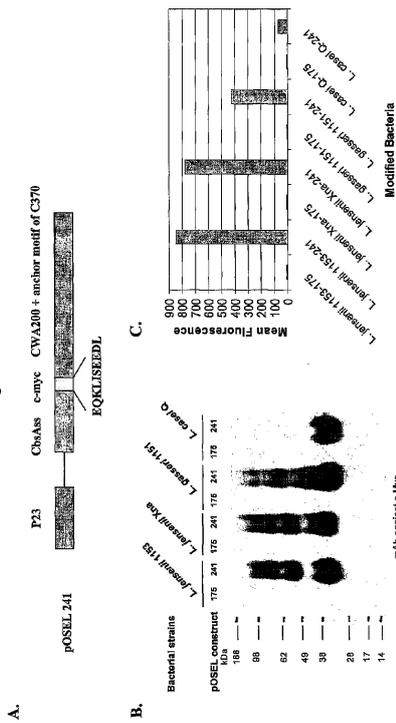
【 7 】

Figure 7



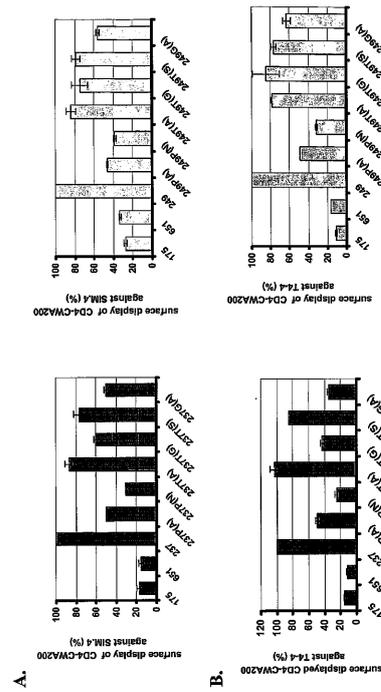
【 8 】

Figure 8



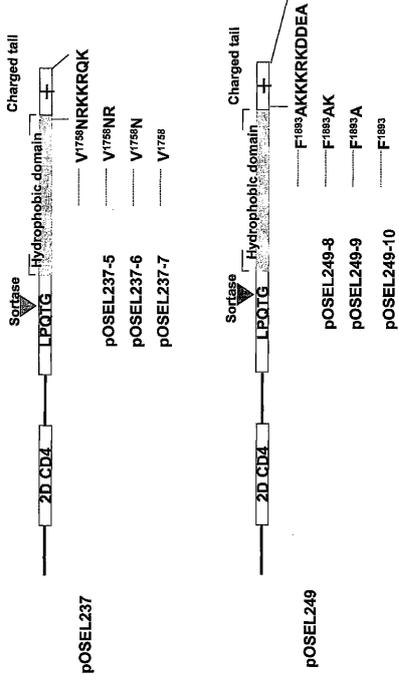
【 9 】

Figure 9



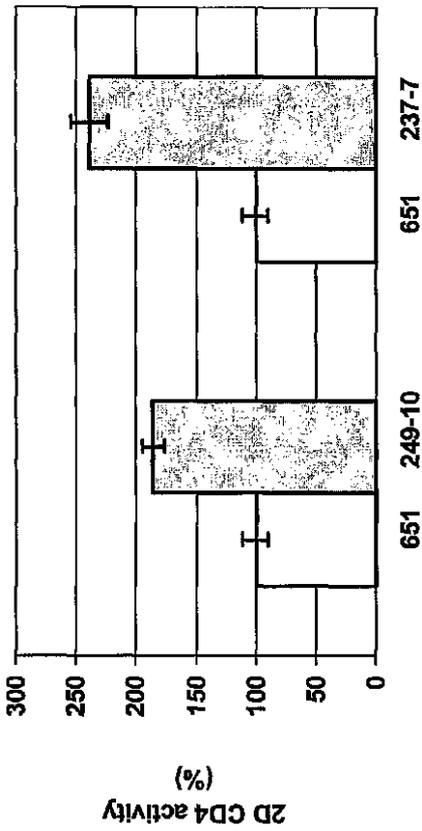
【 10 】

Figure 10



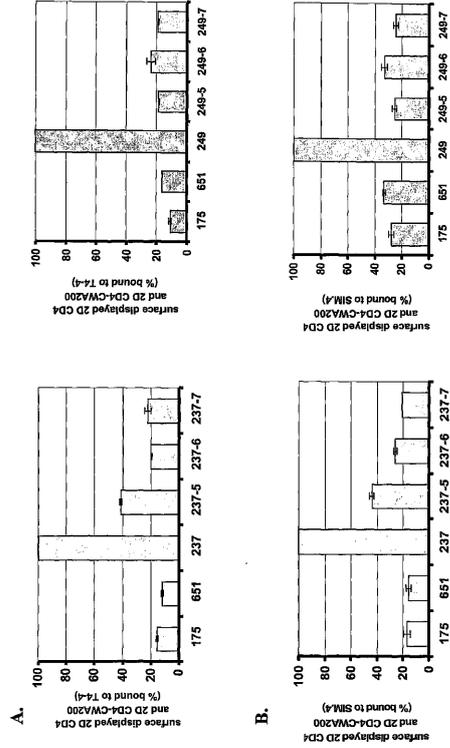
【 12 】

Figure 12



【 11 】

Figure 11



## 【配列表】

2007503845000001.xml

## 【手続補正書】

【提出日】平成17年10月4日(2005.10.4)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌であって、該発現カセットはシグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、該生物活性ポリペプチドは異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、該異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：

細胞壁関連配列；

L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ；および

疎水性配列、

を含む、乳酸杆菌属細菌。

【請求項2】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも50個のアミノ酸を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項3】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも200個のアミノ酸を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項4】

前記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、該領域のカルボキシル末端において、荷電した配列をさらに含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項5】

前記乳酸杆菌属細菌が、腔コロニー形成株である、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項6】

前記乳酸杆菌属細菌が、*L. jensenii*、*L. gasserii*、および*L. casei*からなる群より選択される、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項7】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q S G ( 配列番号 1 1 ) を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項8】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q A G ( 配列番号 1 2 ) を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項9】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項10】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列 L P Q T A ( 配列番号 1 4 ) を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項11】

前記細胞壁標的領域が、配列番号7を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項12】

前記細胞壁標的領域が、配列番号8を含む、請求項1に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項13】

前記生物活性ポリペプチドが、細菌の細胞壁において発現される、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 1 4】

前記生物活性ポリペプチドが、10アミノ酸と600アミノ酸との間である、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 1 5】

前記生物活性タンパク質が病原体と接触する場合、該生物活性タンパク質が該病原体と結合する、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 1 6】

前記病原体が、細菌病原体である、請求項 1 5 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 1 7】

前記病原体が、真菌病原体である、請求項 1 5 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 1 8】

前記病原体が、ウイルス病原体である、請求項 1 5 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 1 9】

前記ウイルス病原体が、HIVである、請求項 1 8 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 0】

前記生物活性タンパク質が、CD4またはCD4のHIV結合フラグメントである、請求項 1 9 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 1】

前記生物活性タンパク質が、2D-CD4である、請求項 1 9 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 2】

前記生物活性タンパク質が、シアノピリン-Nまたはシアノピリン-Nのウイルス結合フラグメントである、請求項 1 8 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 3】

前記ウイルス病原体が、単純疱疹ウイルスである、請求項 1 8 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 4】

前記生物活性タンパク質が、単純疱疹ウイルス侵入媒体C(HveC)であるか、またはHveCのウイルス結合フラグメントである、請求項 1 8 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 5】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌から放出される、請求項 1 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 6】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌の細胞壁に固定される、請求項 4 に記載の乳酸杆菌属細菌。

【請求項 2 7】

乳酸杆菌属細菌の細胞壁中において生物活性ポリペプチドを発現する方法であって、該方法は、以下：

発現カセットを含む乳酸杆菌属細菌を提供する工程であって、該発現カセットは、シグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合するプロモーターを含み、該生物活性ポリペプチドは異種カルボキシル末端細胞壁標的領域と結合し、そして該異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：

細胞壁関連配列；

L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ；および

疎水性配列

を含む、工程；ならびに

該ポリペプチドの発現を誘導するための条件下で細菌を培養する工程であって、該工程により、乳酸杆菌属細菌の細胞壁中で生物活性ポリペプチドを発現する、工程、を包含する、方法。

【請求項 2 8】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも50個のアミノ酸を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも200個のアミノ酸を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

前記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、該領域のカルボキシル末端において、荷電した配列をさらに含む、請求項27に記載の方法。

【請求項31】

前記提供する工程が、前記発現カセットを前記細菌中に輸送する工程を包含する、請求項27に記載の方法。

【請求項32】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQSG (配列番号11)を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQAG (配列番号12)を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項34】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQTG (配列番号13)を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項35】

前記細胞壁標的領域が、アミノ酸配列LPQTA (配列番号14)を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項36】

前記細胞壁標的領域が、配列番号7を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項37】

前記細胞壁標的領域が、配列番号8を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項38】

前記細胞壁標的領域が、少なくとも200個のアミノ酸を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項39】

前記乳酸杆菌属細菌が、腔コロニー形成株である、請求項27に記載の方法。

【請求項40】

前記乳酸杆菌属細菌が、*L. jensenii*、*L. gasserii*、および*L. casei*からなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項41】

前記生物活性ポリペプチドが、10アミノ酸と600アミノ酸との間である、請求項27に記載の方法。

【請求項42】

前記生物活性タンパク質が病原体と接触する場合、該生物活性タンパク質が該病原体に結合する、請求項27に記載の方法。

【請求項43】

前記病原体が、細菌病原体である、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記病原体が、真菌病原体である、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

前記病原体が、ウイルス病原体である、請求項42に記載の方法。

【請求項46】

前記ウイルス病原体が、HIVである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記生物活性タンパク質が、CD4またはCD4のHIV結合フラグメントである、請求

項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記生物活性タンパク質が、2 D - C D 4 である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記生物活性タンパク質が、シアノピリン - N またはシアノピリン - N のウイルス結合フラグメントである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ウイルス病原体が、単純疱疹ウイルスである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記生物活性タンパク質が、単純疱疹ウイルス侵入媒体 C ( H v e C ) または H v e C のウイルス結合フラグメントである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌から放出される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記生物活性ポリペプチドが、乳酸杆菌属細菌の細胞壁に固定される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】

生物活性タンパク質を哺乳動物粘膜表面に提供する方法であって、該方法は、以下：

粘膜表面と、異種カルボキシル末端細胞壁標的領域に結合された生物活性ポリペプチドに結合されたシグナル配列を発現するように組み換えで変化した乳酸杆菌属細菌とを、接触させる工程を包含し、該異種カルボキシル末端細胞壁標的領域は、以下の順番で、以下：

細胞壁関連配列；

L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) ；および

疎水性配列

を含み、

ここで、該生物活性ポリペプチドは、該粘膜表面から収集されたサンプル中で、検出可能な量で発現される、方法。

【請求項 5 5】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも 5 0 個のアミノ酸を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞壁関連配列が、少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記異種カルボキシル末端細胞壁標的領域が、該領域のカルボキシル末端において、荷電した配列をさらに含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記乳酸杆菌属細菌が、L . j e n s e n i i 、 L . g a s s e r i 、 および L . c a s e i からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記粘膜表面が、腔内に存在する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記粘膜表面が、胃腸管内に存在する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記接触させる工程が、前記乳酸杆菌属細菌を経口投与する工程を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記接触させる工程が、前記乳酸杆菌属細菌を腔投与する工程を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 3】

前記接触工程が、前記乳酸杆菌属細菌を直腸投与する工程を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

シグナル配列および生物活性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合するプロモーターを含む発現カセットであって、ここで、該生物活性ポリペプチドが、配列番号 7 または配列番号 8 に結合する、発現カセット。

## 【請求項 6 5】

請求項 6 4 に記載の発現カセットを含む、ベクター。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 3】

(発明の背景)

グラム陽性菌におけるペプチドグリカンとの共有結合を介するタンパク質の表面発現は、独自の識別信号とソルターゼ依存性機構とに關与する (Mazmanianら、Science 285:760-763 (1999))。最も良く研究されたシステムの一つは、M6構造タンパク質をコードするStreptococcus pyogenesのemm6遺伝子である (Fischettiら、1990、Mol. Microbiol. 4:1603-1605 (1990))。M6タンパク質は、標示(signature)細胞壁識別信号、Leu-Pro-X-Thr-Gly(LPXTG;配列番号9)モチーフ、それに続く疎水性アミノ酸伸長、および最後に荷電残基を含む配列(KRKEEN;配列番号10)を有し、これは細胞表面保持信号として働く。これらの細胞壁識別モチーフは、Staphylococcus、EnterococcusおよびListeria、ならびに乳酸杆菌属を含む他のグラム陽性菌において同定されている (NavarreおよびSchneewind、Microbio. Mol. Biol. Rev. 63:174-229 (1999))が、ヒトの腔でコロニーを形成する乳酸杆菌属種においては同定されていない。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 1】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQSG(配列番号11)を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQAG(配列番号12)を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTG(配列番号13)を有する。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQTA(配列番号14)を有する。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、配列番号7を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、配列番号8を含む。

## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 8】

いくつかの実施形態では、上記細胞壁標的領域は、アミノ酸配列LPQSG(配列番号

1 1 ) を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列 L P Q A G ( 配列番号 1 2 ) を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列 L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列 L P Q T A ( 配列番号 1 4 ) を有する。いくつかの実施形態では、細胞壁標的領域は配列番号 7 を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は配列番号 8 を含む。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 0】

いくつかの実施形態では、細胞壁標的領域はアミノ酸配列 L P Q S G ( 配列番号 1 1 ) を含む。いくつかの実施形態では、細胞壁標的領域は、アミノ酸配列 L P Q A G ( 配列番号 1 2 ) を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列 L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、アミノ酸配列 L P Q T A ( 配列番号 1 4 ) を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は、配列番号 7 を含む。いくつかの実施形態では、この細胞壁標的領域は配列番号 8 を含む。いくつかの実施形態では、上記生物活性ポリペプチドは 1 0 ~ 6 0 0 アミノ酸の間である。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 4】

( B . L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) )

配列 L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) は乳酸杆菌属の脛関連株において細胞壁標識シグナルとして作用する。モチーフ L P Q ( S / A / T ) ( G / A ) の少なくとも 1 個のコピーは細胞壁標的領域内にある。モチーフ中の括弧はその位置の別なアミノ酸を示す ( 例えば L P Q S G 、 L P Q A G 、 L P Q T G 、 L P Q S A 、 L P Q A A 、 L P Q T A ( それぞれ、配列番号 1 1 、 配列番号 1 2 、 配列番号 1 3 、 配列番号 1 8 、 および配列番号 1 9 ) ) 。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 5】

( C . 疎水性配列 )

細胞壁に固定されるポリペプチドのカルボキシル末端は細菌膜 ( bacterial membrane ) を貫通するように機能する疎水性領域を含む。疎水性領域は少なくとも約 5 0 % 、ある実施形態では少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % または 9 0 % の疎水性アミノ酸を含む。天然起源疎水性アミノ酸にはアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファンおよびバリンが含まれる。グリシン、トレオニンおよびセリンを含む、より疎水性の少ないアミノ酸もこれらの配列の一部を構成し得る ( 例えば P a l l e n ら、T r e n d s M i c r o b i o l . 9 : 9 7 - 1 0 1 ( 2 0 0 1 ) 参照 ) 。ソルターゼ様タンパク質の可変 L P X T G ( 配列番号 9 ) 含有基質の間で疎水性配列は一般に長さが約 1 0 ~ 約 3 0 アミノ酸、場合によっては 1 3 ~ 2 4 アミノ酸の間である ( P a l l e n ら、T r e n d s M i c r o b i o l . 9 : 9

7 - 1 0 1 ( 2 0 0 1 ) )。典型的な疎水性配列には例えば C 1 4 中の V<sup>1 7 4 0</sup> G I L G L A I A T V G S L L G L G L V<sup>1 7 5 8</sup> (配列番号 2 0)、および C 3 7 0 中の P<sup>1 8 7 7</sup> L T A I G I G L M A L G A G I F A<sup>1 8 9 4</sup> (配列番号 2 1) が含まれる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 7】

( D . 荷電配列 )

荷電領域が細胞壁標的タンパク質のカルボキシル末端、代表的には疎水性膜貫通領域の直後に任意に存在し得る。カルボキシル末端荷電領域の存在によりポリペプチドが膜に固定され、その結果膜から解離し培地中へ漏れ出すタンパク質の量が大いに減少する。荷電領域は少なくとも 4 0 %、ある実施形態では少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % または 9 0 % の荷電アミノ酸を有する。天然起源荷電アミノ酸にはアルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。荷電配列は例えば長さで 2 ~ 2 0 アミノ酸残基の間、ある実施形態では 4 ~ 1 2 または 5 ~ 1 1 アミノ酸の間である。典型的な荷電配列には例えば C 1 9 1 中の K<sup>9 6 9</sup> K R K E D<sup>9 7 4</sup> (配列番号 2 2)、C 1 4 中の R<sup>1 7 6 0</sup> K K R Q K<sup>1 7 6 5</sup> (配列番号 2 3) および C 3 7 0 中の K<sup>1 8 9 5</sup> K K R K D D E A<sup>1 9 0 3</sup> (配列番号 2 4) が含まれる。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 3】

様々なシグナル配列がポリペプチドの発現を膜、細胞外空間または細胞壁に導くことが知られている (例えばペプチドグリカンへの共有結合付着により)。例示的なシグナル配列には L . a m y l o v o r u s の - アミラーゼ由来のシグナル配列 ( G i r a u d および C u n y、G e n e、1 9 8 : 1 4 9 - 1 5 7 ( 1 9 9 7 ) ) または L . c r i s p a t u s の S - 層遺伝子 ( c b s A ) 由来のシグナル配列 (例えば M K K N L R I V S A A A A L L A V A P V A A (配列番号 2 5) または M K K N L R I V S A A A A A L L A V A T V S A (配列番号 2 6) ) が含まれる。シグナル配列は代表的にはポリペプチドのアミノ末端に位置している。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 1】

M 6 タンパク質は標示細胞壁識別シグナルである L P X T G (配列番号 9) モチーフと、その後に一続きの疎水性アミノ酸、最後に臨界細胞表面保持シグナルとなる荷電残基 ( K R K E E N ; 配列番号 1 0 ) を有する。2 個の良く性質が分かった S . p y r o g e n e s の M 6 タンパク質 ( e m m 6 ) または L . p a r a c a s e i の P r t P プロテアーゼ由来の細胞壁アンカーモチーフ、または S . p y r o g e n e s の M 6 タンパク質由来のアンカーモチーフ、さらに M 6 タンパク質の天然配列由来の N - 末端 1 0 0 アミノ酸伸長部 ( C W A 1 0 0 ) を利用して、L . j e m s e n i i 表面に C D 4 を発現するためのプラスミドベースのモジュールアプローチを本発明者らは最初に試みた。M 6 タンパク質と異なり、P r t P に対する識別シグナルは L P K T A (配列番号 2 7) である。大量の 2 D C D 4 が馴化培地中に放出されたが、馴化培地中のタンパク質、および細胞壁アン

カーとしてのM6またはPr t PまたはCWA100を有する修飾L. jensenii中の細胞壁またはプロトプラスト会合タンパク質プールのウエスタン分析により、検出し得る細胞壁関連2D CD4は見出されなかった。フローサイトメトリー分析でも、陽性の表面露出2D CD4は同定されなかった。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0112

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0112】

(推定細胞壁アンカー配列の同定)

L. jenseniiのゲノム配列のデータベース検索により、推定細胞壁アンカーモチーフを有する約30個のコンテグが同定された。National Center for Biotechnologyのウェブサイトを利用し得る非冗長データベース中のより詳細な配列相同性検索に基づき、本発明者らはC14, C191およびC370と名付けられる3個の配列を選択した。それらはそれぞれ、Lactobacillus fermentumのR1p (Turnerら、Appl. Environ. Microbiol. 69: 5855-5863 (2003))、またはストレプトコッカル表面タンパク質のファミリー (Wastfeltら、J. Bio. Chem. 271: 18892-18897 (1996))であるL. reuteri中の粘膜結合タンパク質 (RosおよびJonsson、Microbiol. 148: 433-442 (2002))、およびS. thermophilus中の細胞壁アンカータンパク質 (Fernandez-Esplaraら、Appl. Environ. Microbiol. 66: 4772-4778 (2000))と低い配列類似性 (23~27%の同一性)を共有していた。3個の配列の全ては疎水性領域に先行するLPQTG (配列番号13) 識別シグナルと、荷電C末端テイルを有する (図1参照)。これらの特徴はグラム陽性細菌中のソルターゼ認識C末端細胞壁アンカー配列間に共通である (NavarreおよびSchneewind、Microbiol. Mol. Bio. Rev. 63: 174-229 (1999))。グラム陽性細菌中に見出されるLPXTG (配列番号9) 細胞アンカーモチーフ間で、これらのL. jenseniiタンパク質中ではわずか7%のLPQTG (配列番号13) 配列の一致が見出された。C14、C191およびC370タンパク質はすべて細胞壁アンカー領域に隣接したタンDEM反復ドメインを含み、既知の細胞壁アンカータンパク質中にしばしば存在する構造上の特徴である (NavarreおよびSchneewind、Microbiol. Mol. Bio. Rev. 63: 174-229 (1999))。C14、C191およびC370の配列を図2A~Cに示す。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

(推定細胞壁アンカー配列のエピトープタグ化)

C14、C191およびC370が異種融合タンパク質をL. jenseniiの細胞壁に固定する効率を決定するため、本発明者らは約200個のアミノ酸を直接的にLPQTG (配列番号13) 識別シグナルのN-末端に選んだ。しばしば細胞壁アンカータンパク質中の細胞壁関連 (CWA) ドメインと定義されるこの領域は、基質配列の保持または延長、従って膜会合ソルターゼによる適切なタンパク質分解性の切断を促進し得る。免疫検出を促進するため、c-Mycエピトープ (EQKLISEEDL; 配列番号15) をPOSEL239、240および241それぞれのC14、C191およびC370のCWA200領域のN-末端と融合した。ウエスタンおよびフローサイトメトリー分析を用

いて、c-Mycタグ化タンパク質が生成され、細胞壁を標的としたかどうかを検討した。ウエスタン分析を行うため、pOSEL175、239、240および241を有する修飾*L. jenseni*をMRSおよびRogosaSLブロスの両方の中で対数期まで生育させた。次いで1-4グリコシル結合を成熟ペプチドグリカン中のグリカン鎖のMurNAc-GlcNAc間で切断するN-アセチルムラミダーゼであるムタノリシンで細胞壁を消化した。代表的には、SDS-PAGEクロマトグラフィー後に細胞壁アンカータンパク質は大きなスペクトルの断片として移動する(Perryら、*J. Biol. Chem.* 277、16241-16248(2002))。pOSEL239(C14アンカー)および241(C370アンカー)を有する細菌細胞中の細胞壁富化画分中のタンパク質のウエスタン分析から、細菌細胞をMRSおよびRogosaブロスの両方の中で培養した場合、還元性SDS-PAGE上でc-Mycタンパク質のラダーを示した(図3)。これらのパターンはpOSEL240(C191アンカー)を有する細菌細胞中の細胞壁富化画分中には見られず、試験したLPQTG(配列番号13)含有配列間で異なったアンカー効率を示している。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

(長さ36アミノ酸のC末端アンカーモチーフのみを経由する融合で発現する2D CD4の表面提示の欠失)

LPQTG(配列番号13)シグナル、疎水性領域およびC14またはC370配列の荷電テールを含む36アミノ酸C末端アンカーモチーフが、*L. jenseni*中の2D CD4の効率的な表面発現を支持するに十分であるかどうかは不明である。この疑問を解決するため、C14のC末端アンカーモチーフを有するpOSEL238、およびC370のC末端アンカーモチーフを有するpOSEL262として設計された2つの構築物を調製し、ネガティブコントロールpOSEL175および651、ならびにポジティブコントロールpOSEL237を参照して分析した。pAb T4-4でプローブ後のpOSEL238を有する*L. jenseni*中の細胞壁富化画分のウエスタン分析で、pOSEL237に類似する梯子状パターンが検出されなかった。さらに、pOSEL238を有する細菌細胞へのmAb Sim.4の結合のフローサイトメトリー分析により、pOSEL175を有する細胞中のバックグラウンドコントロールと比較して平均蛍光強度の増加は全く検出されなかった(図6)。同様に、pOSEL175を有する細菌細胞およびポジティブコントロールpOSEL249と比較して、pOSEL262を有する細菌細胞のFACS分析は同様な負の結果をもたらした。これらの観察と一致して、*S. pyogenes*および*L. paracasei*由来の同様な長さのC末端アンカーモチーフを用いた場合、2D CD4の表面発現は行われなかった。このことは特徴的なLPQTG(配列番号13)モチーフの上流のタンパク質配列が細胞壁固定プロセスに有意に寄与し、*L. jenseni*の細胞壁に生物活性タンパク質を提示するために必要であることを示唆している。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

(生物活性タンパク質の最適表面提示のための、LPQTGモチーフ上流の反復細胞壁貫通配列の規定の長さの必要性)

天然のC370配列は、LPQTG(配列番号13)モチーフの上流のC末端領域中に

グラム陽性細菌中の多くの細胞壁アンカータンパク質の特性である8個のほぼ同一の縦列反復を含む(図1)。2.5回反復配列がpOSEL249のアンカー配列中に含まれるが、異なった長さの上流配列が表面タンパク質提示を最大にするために使用し得るかどうかは、決定しなければならないことである。従って、C370配列の0、1、2、4、7および8個の反復を有する数個の構築物を調製した。それらはそれぞれ、pOSEL262、268、278、280、281および276と名付けられた。正しく折り畳まれた立体構造をとる2D CD4分子のレベルを決定するため、形質転換細菌をフローサイトメトリー分析のためにmAb Sim.4で探索した(図7)。細菌を有するpOSEL262(ゼロ反復)では、平均蛍光強度はネガティブコントロールpOSEL175と区別できず、異種タンパク質を適切に表面発現するためには反復配列が必要であることを示唆している。さらに、反復数をpOSEL262の0からpOSEL278の3へ増加すると、蛍光強度が有意に増加した。反復数をさらに増加しても、蛍光強度は一定のままであった。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

(L. jensenii中の2D CD4の表面発現に対するLPXTG(配列番号9)モチーフの突然変異誘発の効果)

よく研究された細胞壁アンカータンパク質である*Staphylococcus aureus*のプロテインAが、LPETG(配列番号28)細胞壁分類モチーフ上で突然変異した場合、LPQTG(配列番号13)中のアミノ酸プロリン(P)をアミノ酸アスパラギン(N)で置換することによりタンパク質表面提示の効率が減少したが、トレオニン(T)のセリン(S)による置換は、タンパク質表面提示の効率にほとんど影響がないことが見出された(NavarreおよびSchneewind、*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:174-229(1999))。この研究は、P残基がLPXTG(配列番号9)モチーフ中でおそらく最も重要な残基であり、T残基を類似のアミノ酸であるSで置換し得ることを示した。C14およびC370中のLPQTG(配列番号13)モチーフが実際に重要な分類信号であるか否かを決定するため、LPQTG(配列番号13)配列中のPおよびTの重要性を検討した。C14配列およびC370配列双方上のLPQTG(配列番号13)モチーフ内に点突然変異をPCRにより生じさせた。P残基をアラニン(A)またはアスパラギン(N)に突然変異させ；アミノ酸Tを、A、Sまたはグリシン(G)に突然変異させ；LPXTG(配列番号9)モチーフ中のアミノ酸GをAに突然変異させた。変化したLPQTG(配列番号13)モチーフを有するプラスミドをそれぞれpOSEL237P(A)、pOSEL237P(N)、pOSEL237T(A)、pOSEL237T(G)、pOSEL237T(S)、pOSEL237G(A)、pOSEL249P(A)、pOSEL249P(N)、pOSEL249T(A)、pOSEL249T(G)、pOSEL249T(S)およびpOSEL249G(A)と名付けた。突然変異した構築物を有する*L. jensenii* 1153のウエスタン分析およびフローサイトメトリー分析を行った。親pOSEL237およびpOSEL249を有する*L. jensenii*と比較して、pOSEL237P(A)、pOSEL237P(N)、pOSEL249P(A)およびpOSEL249P(N)を有する*L. jensenii*は、pAb T4-4による細胞壁富化タンパク質画分のウエスタンプロットにおいて、特徴的な、より高分子量種のスペクトルを示さなかった。一方、2D CD4-CWA200融合タンパク質の馴化培地中への分泌は顕著に増加し、2D CD4-CWA200融合タンパク質が細胞壁に共有結合していないことを示した。野生型pOSEL237およびpOSEL249で観察された結果と同様に、pOSEL237T(S)およびpOSEL249T(S)を有する*L. jensenii*

の細胞壁消化において、より高分子量種の特徴的なスペクトルは明瞭であり、このことは、C 1 4 および C 3 7 0 由来の L P Q T G (配列番号 1 3) 内のアミノ酸 T を、S によって効果的に置換し得ることを示唆していた(データ示さず)。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 4】

L P X T G (配列番号 9) の突然変異誘発の L . j e n s e n i i 表面タンパク質提示に対する効果をさらに決定するため、p O S E L 1 7 5、6 5 1、2 3 7、2 4 9 を有する L . j e n s e n i i 株と一緒に様々な突然変異構築物を p A b T 4 - 4 または m A b S i m . 4 で探索し、次いでフローサイトメトリーで抗体結合を分析した。p O S E L 2 3 7 を有する細菌細胞と比較して p O S E L 2 3 7 P ( A )、p O S E L 2 3 7 P ( N ) を有する細菌細胞、および p O S E L 2 4 9 を有する細菌細胞と比較して p O S E L 2 4 9 P ( A )、p O S E L 2 4 9 P ( N ) を有する細菌細胞では平均蛍光強度がかなり減少し、このことは、細胞表面の 2 D C D 4 タンパク質の提示が、あったとしても、はるかに少ないことを示していた。しかしながら、p O S E L 2 3 7 T ( S )、p O S E L 2 3 7 ( T ) A、p O S E L 2 4 9 T ( S ) および p O S E L 2 4 9 ( T ) A を有する細菌細胞の平均蛍光強度は p O S E L 2 3 7 および 2 4 9 を有する L . j e n s e n i i に匹敵し、このことは、T を S または A に置換することが細胞壁固定の効率にほとんど効果がないことを示した(図 9)。

【手続補正 1 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 5】

ウエスタンブロットおよびフローサイトメトリー分析のデータは、C 1 4 および C 3 7 0 の L P Q T G (配列番号 1 3) モチーフ内に含まれるアミノ酸 P は容易に置換され得ないことを示す。対照的に、アミノ酸 T は、S または A で置換され得、乳酸杆菌属の細胞壁に効率的に固定されるタンパク質を生成する。

【手続補正 1 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 6】

( L . j e n s e n i i における 2 D C D 4 の表面発現に対する C 末端正荷電テールの欠失の効果 )

グラム陽性細胞壁アンカードメインの特徴の一つは、正に荷電したアミノ酸がタンパク質の C 末端極に伸びていることである。M 6 タンパク質では、この配列 ( K R K E E N ; 配列番号 1 0 ) が重要な細胞表面保持信号として働く。これらの標示配列は、ブドウ球菌属 ( S t a p h y l o c o c c u s )、エンテロコッカス属、リステリア属および乳酸杆菌属を含む他のグラム陽性細菌でも見出されている ( N a v a r r e および S c h n e e w i n d、M i c r o b i o . M o l . B i o l . R e v . 6 3 : 1 7 4 - 2 2 9 ( 1 9 9 9 ) )。2 つの配列 R K K R Q K <sup>1 7 6 5</sup> (配列番号 2 3) および K K K R K D D E A <sup>1 9 0 3</sup> (配列番号 2 4) がそれぞれ、C 1 4 推定アンカー配列および C 3 7 0 推定アンカー配列中の正に荷電したテールとして同定された(図 1)。これらの 2 個の配列が細胞表面保持信号として働くか否かを定めるため、一連の欠失構築物を作製した(図 10)。

それらは、それぞれ p O S E L 2 3 7 - 5、p O S E L 2 3 7 - 6、p O S E L 2 3 7 - 7、p O S E L 2 4 9 - 8、p O S E L 2 4 9 - 9 および p O S E L 2 4 9 - 1 0 と名付けられた。

【手続補正 1 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 9】

(細胞壁アンカーシグナルとしての L P Q T G モチーフの柔軟性)

グラム陽性細菌由来のほとんどの細胞壁に固定されたタンパク質は、同じ識別信号 L P X T G (配列番号 9) を共有するが、一部タンパク質は、異なったモチーフを有する。例えば、*L. paracasei* の PrtP に対する識別信号は、L P K T A (配列番号 2 7) である (Holck および Naes、*J. Gen. Microbiol.* 138: 1353 - 1364 (1992))。 *Peptostreptococcus magnus* のプロテイン L およびヒト血清アルブミン結合タンパク質は、L P X A G (配列番号 2 9) のモチーフを共有する (de Chateau および L. Bjorck、*J. Biol. Chem.* 269: 12147 - 12151 (1994); Kellera、*EMBO J.* 11: 863 - 874 (1992); Murphyら、*DNA Seq.* 4: 259 - 265 (1994))。 C14 アンカータンパク質または C370 アンカータンパク質中で L P Q T G (配列番号 1 3) が L P Q A G (配列番号 1 2) または L P Q S G (配列番号 1 1) に突然変異した場合、SDS-PAGE 後にフローサイトメトリーまたはウエスタンブロットで測定した 2 D C D 4 の表面提示の減少は僅かであった。しかしながら、以下の証拠に基づくように、これらの配列のみでは、腔由来の乳酸桿菌の細胞壁へタンパク質を固定するには不十分である: 1) 36 アミノ酸の C 末端アンカードメイン単独では、c-Myc エピトープまたは 2 D C D 4 を細胞表面に固定しなかった、2) 200 アミノ酸までの上流配列が含まれる場合でさえも、プロトタイプ M6 細胞壁アンカー配列 (*S. pyogenes* の emm6 遺伝子によりコードされる) は腔由来乳酸桿菌の細胞壁へ異種タンパク質を固定しなかった (本発明者らは、*L. paracasei* 由来の L P X T A (配列番号 3 0) モチーフを用いて同様な結果を見出した)、および 3) C191 タンパク質は、有効なアンカーではなかった。これらの知見は、C14 および C370 の C W A 2 0 0 領域内に含まれる他の上流配列もまた、細胞壁固定プロセスに大きく寄与することを示している。

【手続補正 2 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 5】

(*L. jensenii* 1153 ゲノム中の細胞壁アンカーモチーフを有するタンパク質配列の同定)

グラム陽性細菌の細胞壁固定タンパク質は、保存的 C 末端 L P X T G X (配列番号 3 1) モチーフを有する (Fischettiら、*Mol. Microbiol.* 4: 1603 - 1605 (1990))。このヘキサペプチドの後には、アミノ酸の疎水性伸長と、短い荷電テールとがあり停止転送配列として知られる (Schneewindら、*Cell*、70: 267 - 281 (1992))。さらに、別の独自の L P X T A (配列番号 3 0) 識別モチーフが *Lactobacillus paracasei* 中で同定された (Holck および Naes、*J. Gen. Microbiol.* 138: 1353 - 1364 (1992))。ネイティブの細胞壁アンカー配列を同定するため、組み立てられたコンティグ (*L. jensenii* 1153 の、推定 75% 完全なゲノム配列から得ら

れる)の全てのリーディングフレーム中のLPXTG(配列番号9)およびLPXTA(配列番号30)に類似のモチーフを同定するためのコンピュータスクリプトが作成された。推定細胞壁アンカーモチーフを有する得られたコンティグを、グラム陽性細菌中の細胞壁アンカータンパク質に対する配列相同性に対するBLAST検索によりさらに検証した。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0137

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0137】

(L.jenseni i中の発現カセットの構築)

L.jenseni iにおいてアンカータンパク質を都合よく表在化するために、発現カセットを構築し、pOSEL175のSacI部位およびXbaI部位中にサブクロニングした。このカセットは、乳酸杆菌適合性P<sub>23</sub>プロモーター、L.crispat usのCbsAシグナル配列、異種タンパク質をコードするDNA、およびグラム陽性細菌中の既知、または推定細胞表面タンパク質由来の共有結合性細胞壁アンカードメインを含む4つの構成要素を含む。本発明者らの、一連のプロモーターおよびシグナル配列を有する構築物の詳細な分析により、Lactococcus lactis由来のP<sub>23</sub>プロモーター(vander Vossen et al., Appl. Environ. Microbiol. 53: 2452-2457 (1987))と、L.crispat usのCbsA由来のシグナル配列(CbsAss)との組み合わせにより、pOSEL651として設計された構築物中で2DCD4の最高レベルのタンパク質発現が駆動されることが示された(Chang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 11672-11677 (2003))。SacI、EcoRI、NheI、MfeIおよびXbaIを含む独自の制限部位は、それぞれ5'末端から3'末端へと各構成要素の間に置かれた。PCRによる各構成要素の増幅は、Pfu DNAポリメラーゼを用いて行われた。本研究で詳細に述べられる融合構築物の様々な部分のPCR増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーとしては、以下(配列番号32~配列番号37)が挙げられる:

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0138

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0138】

【化4】

P23.f 5'-GTGGAGCTCCCGAAAAGCCCTGACAACCC-3'  
P23.r 5'-GGAAACACGCTAGCACTAACTTCATT-3'  
2DCD4.f 5'-GCGGCTAGCAAGAAAAGTTGTTTTAGGTAAA-3'  
2DCD4.r 5'-GCACAATTGTGATGCCTTTTGAAAAGCTAA-3'  
CbsAss.f 5'-GCGAATTCAAGGAGGAAAAGACCACAT-3'  
CbsAss.r 5'-CCAGCTAGCTGAAACAGTAGAAACGGC-3'

表面発現のために設計されたタンパク質としては、10アミノ酸c-Mycペプチド(EQKLISEEDL; 配列番号15)およびヒトCD4のN末端の2個の細胞外ドメイン(2DCD4)を含む最初の183残基が含まれる。2DCD4タンパク質は、好ましい乳酸杆菌コドンの使用に従うように再コード化された。全ての発現構築物は、L.

j e n s e n i i 中へ形質転換する前に DNA 配列分析により確認された。

【手続補正 23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0139】

( L . j e n s e n i i の推定細胞壁アンカー配列への c - M y c 融合の構築 )

タンパク質発現レベル、および生物活性タンパク質の表面提示のために規定の長さの推定細胞壁アンカー配列を使用することが実行可能であるか否かを決定するため、本発明者らは、最初にエピトープタグ化を選んだ。C 末端分類モチーフの機能を乱さないために、5' 末端に 10 アミノ酸 c - M y c エピトープ ( E Q K L I S E E D L ; 配列番号 15 ) を含むオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、L . j e n s e n i i 1153 のゲノム由来の C 14、C 191 および C 370 を含む推定細胞壁アンカー配列の N 末端に c - M y c エピトープを融合させた。c - M y c 配列をこれらのタンパク質 ( C 14、C 191 または C 370 の C 末端 30 アミノ酸 ) の細胞壁アンカーモチーフに直接融合するか、または C 末端細胞壁アンカードメインを含む配列および様々な長さの隣接上流アミノ酸に融合させた。最も注目すべきは、c - M y c が細胞壁アンカードメインと上流アミノ酸 ( C W A 200 と命名 ) とを含む 200 アミノ酸配列と融合したことである。

【手続補正 24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0140

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0140】

【化 5】

Myc14nhe (5' プライマー) (配列番号 38)

(GCGCTAGCGAACAGAACTGATCTCCGAAGAGGACCTGGTAACTC

GTACTATCAATGTA)

Myc14mfe (3' プライマー) (配列番号 39)

(CGCCAATTGCTACTTTTGACGTTTCTTTCT)

Myc191nhe (5' プライマー) (配列番号 40)

(GCGCTAGCGAACAGAACTGATCTCCGAAGAGGACCTGGACGTAG

TAATTCCAGGAA)

Myc191mfe (3' プライマー) (配列番号 41)

(GCGCAATTGTTAATCTTCTTTTCTTCTT)

Myc370nhe (5' プライマー) (配列番号 42)

(GCGCTAGCGAACAGAAA

CTGATCTCCGAAGAGGACCTGTTGAAGAAGGCAGAAGAAGT)

Myc370mfe (3' プライマー) (配列番号 43)

(CCGCAATTGTTATGCTTCATCATCTTTTCT)

期待したサイズを有する全ての PCR 産物をゲルで精製し、M f e I および N h e I の両方で消化した。得られた断片を、M f e I / N h e I 二重消化 p O S E L 6 5 1 と連結し、p O S E L 2 3 9 ( C 14 配列の C W A 200 経由 )、p O S E L 2 4 0 ( C 191 配列の C W A 200 経由 ) および p O S E L 2 4 1 ( C 370 配列経由 ) それぞれの中に

c - M y c 融合体を作製した。得られたプラスミドは L . j e n s e n i i 1 1 5 3 中へエレクトロポレーションした。

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 1】

(細胞壁固定配列のシャトルベクター中へのサブクローニング)

C 末端 L P Q T G (配列番号 1 3) アンカーモチーフを含む 3 個の推定表面タンパク質を選び、L . j e n s e n i i 1 1 5 3 の細胞壁上に外来タンパク質を発現する能力を決定した。これらの表面タンパク質の C 末端 L P Q T G (配列番号 1 3) ドメインを含む DNA 領域、およびその上流の 2 0 0 アミノ酸 (暫定的に C W A 2 0 0 領域と呼ぶ) を、下記の 3 組のプライマー (配列番号 4 4 ~ 配列番号 4 9) によって増幅した:

【手続補正 2 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 2】

【化 6】

C14: 5'プライマー-(GCGCAATTGGTAACTCGTACTATCAATGTA)

3'プライマー-(CGCTCTAGATACACAAACTATTTTACGGTC)

C191: 5'プライマー-(GCGCAATTGGACGTAGTAATTCCAGGAACA)

3'プライマー-(CGGTCTAGACCAAGCAATTTATATATTGCT)

C370: 5'プライマー-(GCGCAATTGAAGAAGGCAGAAGAAGT)

3'プライマー-(CCGTCTAGATTATGCTTCATCATCTTTTCT)

C 1 4 アンカードメインの内部 M f e I 部位と C 3 7 0 ドメインの内部 X b a I 部位を、酵素的制限の前に部位指向性突然変異誘発により突然変異させた。予期されたサイズの P C R 産物の全てをゲルで精製し、M f e I および X b a I の両方で消化した。得られた断片を、P 2 3 - 調節性分泌 2 D C D 4 を含む M f e I / X b a I 二重消化 p O S E L 6 5 1 と連結し、プラスミド p O S E L 2 3 7 (C 1 4 配列の C W A 2 0 0 経路)、p O S E L 2 4 2 (C 1 9 1 配列の C W A 2 0 0 経路) および p O S E L 2 4 9 (C 3 7 0 配列の C W A 3 0 0 経路) をそれぞれ作製した。あるいは、以下の 2 個のプライマー (配列番号 5 0 および配列番号 5 1) を用いて C 1 4 配列の C 末端 3 6 アミノ酸アンカーモチーフを、同様にシャトルベクター中にクローニングした。

【手続補正 2 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 3】

【化 7】

Mfec14up: 5' GCGCAATTGCCACAAACTGGTTCTAAGACT

Xnac14lo: 3'プライマー-(CGCTCTAGATACACAAACTATTTTACGGTC)

DNA 配列の検証後に得られたプラスミドの全てを、L . j e n s e n i i、L . g a s s e r i および L . c a s e i 中にエレクトロポレーションした。

## 【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0144

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0144】

(C370配列の反復細胞壁貫通領域のサブクローニング)

C370LPQTGMモチーフの上流の種々の反復細胞壁貫通領域を、L. jensenii 1153のゲノムDNAから増幅した。各PCR反応について同じ3'プライマー(5'-CCGTCTAGATTATGCTTCATCATCTTTTCT-3';配列番号49)を、以下の5'プライマー(配列番号52~配列番号56)と対で使用した。

## 【手続補正29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0148

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0148】

(推定細胞壁アンカー配列のLPXTG(配列番号9)モチーフの部位指向性突然変異誘発)

Stratagene提供のQuickChange(登録商標)XL Site-Directed Mutagenesisキット(La Jolla, CA)を用いて点突然変異を生じさせた。プラスミドPOSEL237(C14配列のCWA200を経由して固定した2DCD4を発現)とプラスミドPOSEL249(C370配列のCWA200を経由して固定した2DCD4を発現)をテンプレートとして使用した。LPQTG(配列番号13)、およびそのC14およびC370(配列番号57および配列番号58)上の隣接配列に対応するヌクレオチド配列に基づき、突然変異誘発プライマーを設計した。

## 【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

237P(A)(配列番号59および配列番号60):C14のLPQTG(配列番号13)上のプロリンをアラニンで置換した。

## 【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

【化10】

5'-GAAAGTAAGAAGACTTTAGCAAACTGGTTCTAAGA-3'

5'-GTCTTAGAaccAGTTTGTGCTAAAGTCTTCTTACTTTC-3'

237P(N)(配列番号61および配列番号62):C14のLPQTG(配列番号13)上のプロリンをアスパラギンで置換した。

## 【手続補正32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

【化11】

5'-GAAAGTAAGAAGACTTTAAATCAAACTGGTTCTAAGAC-3'

5'-GTCTTAGAACCAGTTTGATTTAAAGTCTTCTACTTTC-3'

237T(A) (配列番号63および配列番号64) : C14のLPQTG (配列番号13) 上のトレオニンをアラニンで置換した。

【手続補正33】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

【化12】

5'-AGAAGACTTTACCACAAGCTGGTTCTAAGACTGAAC-3'

5'-GTTTCAGTCTTAGAACCAGCTTGTGGTAAAGTCTTCT-3'

237T(G) (配列番号65および配列番号66) : C14のLPQTG (配列番号13) 上のトレオニンをグリシンで置換した。

【手続補正34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0154

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0154】

【化13】

5'-AGAAGACTTTACCACAAGGTGGTTCTAAGACTGAAC-3'

5'-GTTTCAGTCTTAGAACCACCTTGTGGTAAAGTCTTCT-3'

237T(S) (配列番号67および配列番号68) : C14のLPQTG (配列番号13) 上のトレオニンをセリンで置換した。

【手続補正35】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0155

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0155】

【化14】

5'-AGAAGACTTTACCACAAAGTGGTTCTAAGACTGAAC-3'

5'-GTTAGTTTCAGTACCACTTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

237G(A) (配列番号69および配列番号70) : C14のLPQTG (配列番号13) 上のグリシンをアラニンで置換した。

【手続補正36】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0156

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 5 6 】

【 化 1 5 】

5'-GACTTTACCACAAACTGCTTCTAAAGACTGAACAAG-3'

5'-CTTGTTTCAGTCTTAGAAGCAGTTTGTGGTAAAGTC-3'

2 4 9 P ( A ) ( 配列番号 7 1 および配列番号 7 2 ) : C 3 7 0 の L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) 上のプロリンをアラニンで置換した。

【 手続補正 3 7 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 1 5 7

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 1 5 7 】

【 化 1 6 】

5'-CATAAGCAAACCTCTATTGGCTCAAACCTGGTACTGAAAC-3'

5'-GTTTCAGTACCAGTTTGAGCCAATAGAGTTTGCTTATG-3'

2 4 9 P ( N ) ( 配列番号 7 3 および配列番号 7 4 ) : C 3 7 0 の L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) 上のプロリンをアスパラギンで置換した。

【 手続補正 3 8 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 1 5 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 1 5 8 】

【 化 1 7 】

5'-CATAAGCAAACCTCTATTGAATCAAACCTGGTACTGAAAC-3'

5'-GTTTCAGTACCAGTTTGATTCAATAGAGTTTGCTTATG-3'

2 4 9 T ( A ) ( 配列番号 7 5 および配列番号 7 6 ) : C 3 7 0 の L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) 上のトレオニンをアラニンで置換した。

【 手続補正 3 9 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 1 5 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 1 5 9 】

【 化 1 8 】

5'-CAAACCTCTATTGCCTCAAAGTGGTACTGAAACTAA-3'

5'-GTTAGTTTCAGTACCAGTTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

2 4 9 T ( G ) ( 配列番号 7 7 および配列番号 7 8 ) : C 3 7 0 の L P Q T G ( 配列番号 1 3 ) 上のトレオニンをグリシンで置換した。

【 手続補正 4 0 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 1 6 0

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 1 6 0 】

## 【化19】

5'-CAAACTCTATTGCCTCAAGGTGGTACTGAACTAAC-3'5'-GTTAGTTTCAGTACCACCTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

249 T ( S ) ( 配列番号79および配列番号80 ) : C370のLPQTG ( 配列番号13 ) 上のトレオニンをセリンで置換した。

## 【手続補正41】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0161

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0161】

## 【化20】

5'-CAAACTCTATTGCCTCAAAGTGGTACTGAACT-3'5'-GTTAGTTTCAGTACCACTTTGAGGCAATAGAGTTTG-3'

249 G ( A ) ( 配列番号81および配列番号82 ) : C370のLPQTG ( 配列番号13 ) 上のグリシンをアラニンで置換した。

## 【手続補正42】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0164

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0164】

( 推定細胞壁アンカータンパク質の正に荷電したC末端配列の欠失の分析 )

正に荷電したアミノ酸がC14およびC370のC末端に位置する一連の欠失突然変異体を、PCR増幅により作製した。プラスミドPOSEL237およびPOSEL249を、テンプレートとして使用した。POSEL237およびPOSEL249上の2DCD4配列に相補性のオリゴヌクレオチド(CD4F 5' - GATCGTGCTGATTCACGTCGT - 3' ; 配列番号83)をフォワードプライマーとして使用した。以下のオリゴヌクレオチド(配列番号84~配列番号89) (制限部位に下線)を、2DCD4 cDNAのC末端および完全C14およびC370 CWA200配列を増幅するためのリバースプライマーとして使用した:

## 【手続補正43】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0177

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0177】

【図1】図1は*L. jenseni* 1153のゲノム配列決定後に同定された3種の細胞壁アンカータンパク質の構造を示す。3つのタンパク質の全ては疎水性領域および荷電C-末端テールに先行するLPQTG (配列番号13) 識別シグナルを有し、独自の長い繰り返し配列を有する。CWAはLPQTG (配列番号13) モチーフの上流の推定細胞壁関連領域を示す。

【図2A】図2Aは*L. jenseni* 1153のゲノム配列決定から得られた細胞壁アンカー配列(C14 (配列番号1)、C191 (配列番号2) およびC370 (配列番号3))を示す。CWA200領域と共にアンカーモチーフに下線が引かれている。CWA200はLPQTG (配列番号13) モチーフの上流の約200アミノ酸の推定細胞壁関連領域または推定細胞壁貫通領域を表す。

【図2B】図2Bは*L. jenseni* 1153のゲノム配列決定から得られた細胞

壁アンカー配列 (C14、C191およびC370)を示す。CWA200領域と共にアンカーモチーフに下線が引かれている。CWA200はLPQTGモチーフの上流の約200アミノ酸の推定細胞壁関連領域または推定細胞壁貫通領域を表す。

【図2C】図2Cは*L. jenseni* 1153のゲノム配列決定から得られた細胞壁アンカー配列 (C14、C191およびC370)を示す。CWA200領域と共にアンカーモチーフに下線が引かれている。CWA200はLPQTGモチーフの上流の約200アミノ酸の推定細胞壁関連領域または推定細胞壁貫通領域を表す。

【図3】図3は、MRSブロス(A)またはRogosa SLブロス(B)中、37および5%CO<sub>2</sub>で培養した場合の、形質転換*L. jenseni* 1153のムタノリシン消化後の、SDS抽出可能タンパク質および細胞壁富化画分のウエスタン分析の結果を示す。還元性SDS-PAGEでの分離後、これらのタンパク質をc-My cに対するモノクローナル抗体(mAb)を用いて探索するために、PVDF膜にエレクトロブロットティングした。

【図4】図4は、Rogosa SLブロス中で37、5%CO<sub>2</sub>で培養した場合の、形質転換*L. jenseni* 1153のムタノリシン消化後の、細胞壁富化画分のウエスタン分析の結果を示す。還元性SDS-PAGE中で分離後、CD4(T4-4)に対するポリクローナル抗体(pAb)で探索するために、タンパク質をPVDF膜にエレクトロブロットティングした。発現構築物は以下の要素を含んでいた：pOSEL651中のP<sub>23</sub>プロモーター-CbsAシグナル配列(CbsAss)-2D CD4；p237中のC14配列のP<sub>23</sub>プロモーター-CbsAss-2D CD4-CWA200-アンカー；pOSEL242中のC191配列のP<sub>23</sub>プロモーター-CbsAss-2D CD4-CWA200-アンカー；pOSEL249中のC370配列のP<sub>23</sub>プロモーター-CbsAss-2D CD4-CWA200-アンカー。CWA200は、C-末端アンカードメインの上流の約200アミノ酸を表す。

【図5】図5は、2D CD4の分泌または表面固定のために設計した*L. jenseni* 1153を有するプラスミドのフローサイトメトリー分析の結果を示す。細菌細胞を、CD4に対する(T4-4)ウサギpAbで探索し、次いでFITC結合抗ウサギ抗体(A)で探索した。あるいは細菌細胞を、mAb Sim.4で探索し、次いでPE結合抗マウスIgG(B)で探索した。コントロールは、未染色細胞またはフルオロクローム結合2次抗体で探索した細胞である。細菌表面へ結合する抗体の基準としての蛍光濃度を、FLOWJOソフトウェアを用いて計算した。

【図6】図6は、長さが36アミノ酸であるC-末端アンカーモチーフが、2D CD4の表面発現を駆動するのは不十分であることを示す。(A)*L. jenseni*中のネイティブアンカー配列を用いる2D CD4の表面発現用に設計された構築物。(B)pOSEL238またはpOSEL237を有する*L. jenseni* 1153のフローサイトメトリー分析。細菌細胞をCD4に対するmAb Sim.4で探索し、次いでフィコエリスリン(PE)結合抗マウス抗体で探索した。コントロールは無染色細胞またはPE結合2次抗体で探索した細胞である。

【図7】図7は、C370配列中のLPQTG(配列番号13)識別シグナルの上流の種々の数の繰り返し細胞壁貫通配列により影響を受ける場合の*L. jenseni* 1153中における2D CD4の表面発現を示す。正しく折り畳まれた立体構造をとる表面露出2D CD4分子を、以下のプラスミドを有する細菌細胞中のフローサイトメトリー分析のために、mAb Sim.4で探索した：175、陰性コントロール；249、2.5回反復；262、反復なし；268、1回反復；278、2回反復；280、4回反復；281、7回反復；276、8回反復。

【図8】図8は、ヒト起源の様々な乳酸桿菌種におけるc-My cタグ化タンパク質の表面提示を示す。(A)P23プロモーターおよびCbsAシグナル配列(CbsAss)c-My cタグEQKLISEEDL(配列番号15)の制御下におけるC370配列のc-My cタグ化CWA200の発現のために設計されたpOSEL241の概念図。(B)形質転換された*L. jenseni*、*L. gasserii*および*L. casei*の

ムタノリシン消化後の細胞壁富化画分のウエスタン分析。還元性 SDS - PAGE 中で分離後、c - Myc に対する mAb で探索するためにタンパク質を PVDF 膜にエレクトロブロッティングした。(C) pOSEL 241 を有するヒト膾の乳酸桿菌単離物のフローサイトメトリー分析。細菌細胞を c - Myc に対する mAb で探索し、次いでフィコエリスリン (PE) 結合抗マウス抗体で探索した。コントロールは、非染色細胞または PE 結合 2 次抗体で探索した細胞から構成された。

【図 9】図 9 は、L . j e n s e n i i 1153 中の 2D - CD4 - CWA 200 の表面提示上の C14 配列および C370 配列の LPQTG (配列番号 13) モチーフにおける点突然変異の効果を示す。細菌細胞を、あらかじめ力価を測定した mAb Sim . 4 (A) または pAb T4 - 4 (B) を用いて表面染色し、次いで PE 結合抗マウス抗体または FITC 結合抗ウサギ抗体で探索した。フローサイトメトリー分析を FACS caliber システム中に行った。pOSEL 237 および pOSEL 249 の細胞表面上に提示されたタンパク質と、突然変異誘発性構築物を有する細菌細胞中のタンパク質との間の差を、平均蛍光強度で表した。pOSEL 237 または pOSEL 249 を有する細菌細胞中の 2D CD4 の表面提示を、任意に 100% と設定した。

【図 10】図 10 は、C14 配列および C370 配列 LPQTG (配列番号 13) の C - 末端荷電テール (配列番号 16 および配列番号 17) 中の欠失構築物の概念図を示す。

【図 11】図 11 は、2D CD4 - CWA 200 の表面提示上の C14 および C370 の C - 末端荷電テール中の配列欠失の影響を示す。細菌細胞をあらかじめ力価を測定した pAb T4 - 4 (A) または mAb Sim . 4 (B) を用いて表面染色し、次いで FITC 結合抗ウサギまたは PE 結合抗マウス抗体で探索した。細胞壁アンカータンパク質への抗体の結合を FACS caliber システムを用いるフローサイトメトリーで分析した。pOSEL 237 または pOSEL 249 の細胞表面上に提示されるタンパク質と、突然変異誘発構築物を有する細菌細胞中のタンパク質との間の差を、平均蛍光強度として表した。pOSEL 237 および pOSEL 249 を有する細菌細胞中の 2D CD4 の表面提示を、任意に 100% と設定した。

【図 12】図 12 は、pOSEL 651 を有する L . j e n s e n i i 1153 由来の 2D CD4 に対する、pOSEL 237 - 7 および pOSEL 249 - 10 を有する L . j e n s e n i i 1153 中の分泌 2D CD4 - CWA 200 の活性の比較を示す。無細胞馴化培地中で正しく、適切に折り畳まれた立体構造をとるタンパク質を認識するために、CD4 ELISA を設計した。タンパク質量を、その pAb T4 - 4 に対する免疫応答性に基づいて正規化した。pOSEL 651 を有する細菌細胞から放出される可溶性 2D CD4 タンパク質を、任意に 100% に設定した。

【手続補正 44】

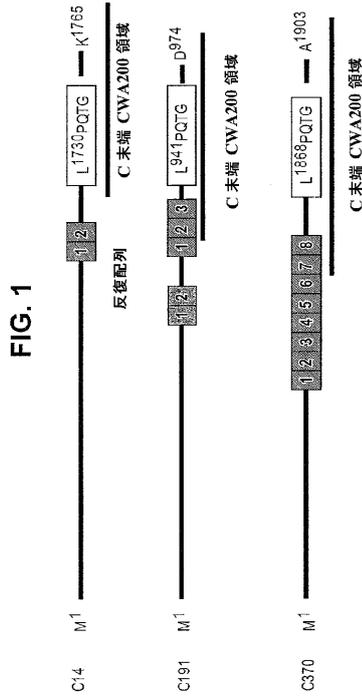
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 1 】



【 図 2 A 】

FIG. 2A

L. JENSENII 1153 のゲノム配列決定から得られた C14 配列 (アンカーモチーフに加えて CWA200 領域に下線)

1MNDSSIGTINITNDIIITGKVNGLITSGISDINKHFLYLQSEGSARDLITNGNGHRINFAG  
2YSIAI QNK NY I NA ANPWNIILKDMITIEGSKYDYSPISFYGRKSNITENSKLITDQVIT  
3ANLNDRLPLVDKYGENLPVHFAGENNII LNMSIGYNLYTGKTVKFDSDGNTIFNVGDK  
4VTGNSINPDNWWIRSTENASNSNPISLINEGATVITINAKSDDLRGVYAGRQLTAGQ  
5PIYGVIVINGITNAKMAAGIISIAIWSHDLIEGKGNVTHITKQTNQADGVENGISNS  
6VSNYNGHTHYAPISLGVPISSVASPLSKQTVSLINNGSLIIRDI AKKTLVPLISMGDGS  
7LSNITLTKFSVGAGATLDDLQDKAGTFRYGIEPSTPLNGLVILWGTSGIDLLELTPAYV  
8NLQRTGDIRGLIRMEGVYNSITVNGPTPPVAQWDQGNKTTIPNDVYVYVRLISANO  
9WGNNSGQIMGKDQHPNIVVAKKGVDFLYNSNA TVLMSKNQAGDKYENGTMPTEV  
10QQALHLSNLFNFWRPORMAMGSKLNDNPDVKIDDFDKYHAFQAHQIIRQIILS  
11DLANKGLKDLIGPDEQITDFKDIVKHVIVYNSAIDKDFWNKIMQPTDSKDPARSV  
12PPYFNPQINLNLKITDGF AWA KV I YADGVSDFVFKIPIKVIEKKYSEELTPSY  
13PGVSVGEQKSDSVDPSFKDENDKAADAPAGIKYIAGENIPDWIKVDPDITGKVI VSPIT  
14DDTSVGSHTDISVIVYVDPSSIDQLVTPVITVTEKSNLAEKYPVSYDKLVNPKVSGDI  
15PATIGAVDPKAAADMPGAIHGYEKGDDEAPAGVITD VNHDTGKVTASVGNKATLGSF  
16EVYKVTYSDGTAEVYKVPVSHGNKVDIPGSGIYVYGGQSMVYVNGNLIIVH  
17KITDSHEL SAKDSAFQITTYSDWNKGNIVSDYKHKVYKLSADGKTYVNEADAT  
18DSFDASAI SFNWQKGYEVNTGVDNFSNGSADTLYQLEKGA VNSEQITDANDPSGLA  
19GNSKYRYDFISIDTNVLQKLGSPAGYNAWVYVYNI GA I GKINIPVYVNSEVSD  
20EAGIKNYLAINSIGKIFVNGNPTGKWAENGMGPKDGGKFAASNMTGIVEFITDNGTKL  
21NVQVTFKGTGSHVSI GSKVNDNTLYVERTIEYDVTGIGHSPINSVTQKVHYVRD  
22GYHKINADGIDAGHIWNEFKIADGGQIAEFPEYSDVQITGYDAYINGAKATQVDA  
23KVAEINGTPQNGQNIITVYKKQNSTPVPYKPKGDGVNDAINRYVIRIHKVKEPKGPE  
24QIITQVHFHNEDKDGNSGYKDPVIGKYNIDWHVASDLNAKIGSWEETAPSVI  
25GYTPSQAKVEAKTVIAETFAASVISHYIKNADIPVYKPKGDGVNDAINRYVIRIHKV  
26KEPKQEQIITQVHFHNEDKDGNSGYKDPVIGKYNIDWHVASDLNAKIGSWEETAPSVI  
27YTPASVIGYTPSQAKVEAKTVIAETFAASVISHYIKNADIPVYKPKGDGVNDAINRYVIRI  
28TINVVDPITGKISTVQTAKTREDKNSNAGYTDVPTGKTI MNPWPAPKQGLRAVNVVE  
29IKGYVAKVDGNDAVVVYVPSANMVTIYQANKPEGQNIIVKDDIVPDAADGI  
30KNKDDL PDGKTWKEVDPVNSVGEKGTGIVTIFPDGTSVVDKVIYVYVDPVVESEN  
31RDTLSKEANTGNINVAKAATVISSKVESKTLPTQTSKTEQVGHGLAIATVGSLLG  
32LGNVNRKRKQ<sup>1765</sup>

【 図 2 B 】

FIG. 2B

L. JENSENII 1153 のゲノム配列決定から得られた C191 配列 (アンカーモチーフに加えて CWA200 領域に下線)

1MPVANKPEGIVHITYSWKDNIIPDTIKPGTKYGIVEVNFDPDGSIKDVPVVEVVTSL  
2ASDYQNKIDIKQIAKYKGNPQASDGLANKDQATEKGGDKDFPSLADVLAPNGIQWK  
3KNFEPDLSPGLTSGEAILFKDGSIAEVIIPVIVQITDADRNPETQIKTLPGQTVNP  
4EDGVINLHKPGENNPQLPDGKIVTFDNQSDVDDFTKHGMPSGSKSFDATVYIPDGI  
5TDKIKI PVHITADNEVNTPIITQGHIPKDSVPDANKGANLKKATIKEGKTYPALPENTITV  
6EWVNPQGMKIELENAKGGIKNYDAVVIYDPKSTIEIVSIPVVAIDADTYKVVV  
7QPIDLKDRNLPDNDAGDITNLHKPADFKIPQLPDGHAFWQDKDAAQEVVKNLKPGEI  
8VKLPATVVPFDGSKKGEIGIVSVHLHGQSDDYNIETQPVNTDKDGNL PENADSGI  
9KNI GKIPGITHASWGDAQDIANKPKGTEKDVPAIVVFPDGSKKEHIPVHREGQS  
10DGYDVEPOLVNTDKNGQLPNAKIGKNIADLPEGTPTWADRAQDKINKIKPGDITIA  
11QVVVIFPDGSIKEVIVPVHKGQSDDYDGVKIVTQRVETDSHGQLPENADSGIKN  
12LGDLPEGIHAHVWGGAQIIVDGMKPGETKDVPAITIEFPDGSIKDVTIPVYKTSIRDOGI  
13LNPPDKVSDDTIKHITDEDKGVVIDNVKSNPKDITDAHVDDDDGTFHGKVDG  
14QDVVPIGIEIVVEKQKESLNPTIKVYVDDTKHITDEDKGVVIDNVKSNPKDITDAH  
15AHVDDDDGTFHGKVDGQDVVPIGIEIVVEKQKESLNPTIKVYVDDTKHITDEDKGV  
16VIDNVKSNPKDITDAHVDDDDGTFHGKVDGQDVVPIGIEIVVEKSTNNOKSDTNK  
17GLISDNSEKNSHMNANVNTKSRNSLAKONRLPQIGSEITSGLSALGLAML SLVGL  
18GLIKKRKED<sup>974</sup>

【 図 2 C 】

FIG. 2C

L. JENSENII 1153 のゲノム配列決定から得られた C370 配列 (アンカーモチーフに加えて CWA200 領域に下線)

1MFYQIDPALAPYIDKIVSRALLSDGEATKDTSNVEPGATNVWISGLVITQNGPIRA  
2ALAGTSSTYKIVLKADIPNSILSKPLSFI MWARYSSGHDVMSDFSKNLIINDNETIT  
3FSSNFFKSIDVINDGPIIDNMSVDYSNKTVNTRVRYNGLSGDKSNLIRLRGND  
4NLLKLDKVKISNKIVILANNILKYRTGELYINDIGGSLGLSSLSNRQDFNVTFYK  
5NGKSFADALTSSEKQDFQGIYDITDYAIAFHSLDIVINSLSTKIYIIGDKYNNQI  
6YDLSTFKHLDKLIKQKQDNPTIYLSFEDKJISATENNPYEAVALAESPTFINISIAKS  
7LVNAADCKQLDNTAKAWDNGARDLLKYLDAIKVASYTHLEPTKPIIDFSGILL  
8LRVTRAGTFISAVDSRRDGVIDIEIDNSYGMNPSVYDITDGGISDQGEI REGRPDG  
9VAPFNWTDANGNQLSIDVDTTISGQLGNHNYHNEVMQPRI VNLVYVDDTGKKTII  
10AYTISAVDQNGSFTLSKFTLNKGDKLVIGYVTPRINKSLTDKDTILQQAFTPEQFSNE  
11HYKGGQVTVIPNMNGVSDDENQDIKVEKDSFNKDSLTLPITPMKIGYSFKEWNTQ  
12ADGKGVVADTIFDITDIYVYAGEKIKLPNINIKAEITRDDKTKSQEITIGKATPG  
13ATVITKDNLNEIGTGVANDAGNFEKITISPLAEATKVSVEAIKGGHSSDAVEAIVE  
14QNNFQKGNPLIQPASPVAIVTIAKASDGNINSTVTKGAAGGETVTKDSSGNEIG  
15TGVVGEDGTFITINPKIAENERIQVVVTKDDAESEPIAVVIAKTEPTNPIEIVTAKT  
16LIJGNSDSTIVAGKGAKE  
17VVTVKNDAGKVIIGKVSDDGIFSIKTDVIEIPGKQVSVIINDGMSIPVPTVSGE  
18THSIKQSAKA AVDNILYLNNAQKQSAKDAIDANVDEITIAKNNAVSTIDINMKDL  
19SEDTKLAADKIQDPYLNADL DKQAYDKAVEEAQKLNKEITGIVSGADKDPAEVA  
20RIKQAVDDAYDAINGNSLDDAKQAKAVDKNYTNLNDKQKETA KRDSAKSE  
21DEVNADKINSGLNEKMGELKEVNSLSDKIEITSNYSNADSDKQAYKETADKIHET  
22VAPSGDDLTDDVNNLITDEATKRAALNGDAREKARQE  
23LENNYNSGKSLQDGSITDPRYNASEEKQAFQKALD NAKKALD NSETIEAFYKSA  
24NDELQKAKADLDGQITDKSKLDDAIKANNAGIDKYKNASDDTKSKFDEALKKA  
25EEVKNSNAIQKEVDDATNLLKQAQNNLNGQITDKSKLDDAIKANNAGIDKYKNASDD  
26KNASDDTKSKFDDALKKAEVKNNSNAIQKEVDDATNLLKQAQNDLDGQITDKS  
27KLDEAITDANNTKLTDKYNNASIDDKSKFDEALKKAENVKNSNAIQKEVDDATN  
28NLKQAQNDLDGQITDKSKLDEAITDANNTKSDKYNNASDDTKSKFDEALKKAEV  
29VKNNSNAIQKEVDDATNLLKQAQNNLNGQITDKSKLDEAITDANNTKSDKYKNA  
30SDDTKSKFDDALKKAEVKNNSNAIQKEVDDATNLLKQAQNDLDGQITDKNDILND  
31AIKDANDAKGTDKYKNASDDTKSKLDEITLKKAEVKNNSNAIQKEVDDATNLLKQ  
32AQNDLDGQITDKSKLDEAITDANNTKSDKYNNASDDTKSKFDEALKKAEVKNNS  
33NATOKFVDDATNLLKQAQNDLDGQITDKNDAINDAIKDANNAKGTDKYNNASIDDT  
34ESKFDALKKAEDVKNNSNAIQKEVDDATNLLKNTLNLLKQAPKKNANLIASKDN  
35AKIHKQTLPTIGTETINPLTAIGLIMALGAGIFAKKRKDEAI<sup>903</sup>

【 図 3 】

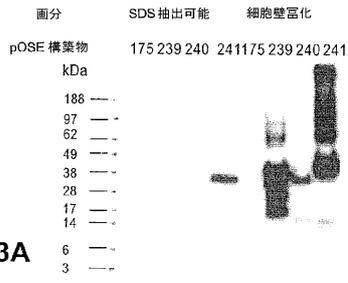


FIG. 3A

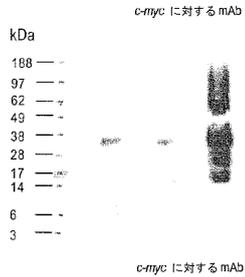
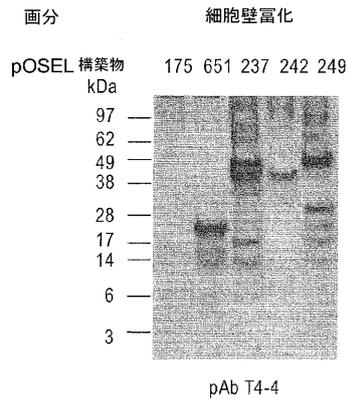


FIG. 3B

【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 】

FIG. 5A

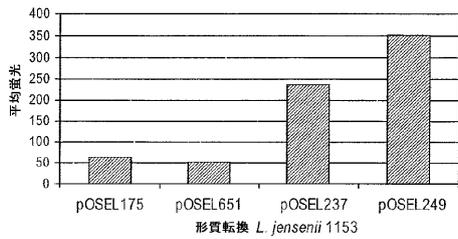
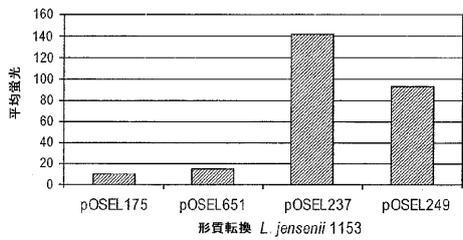


FIG. 5B



【 図 6 】

FIG. 6A

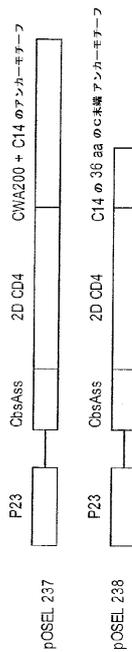
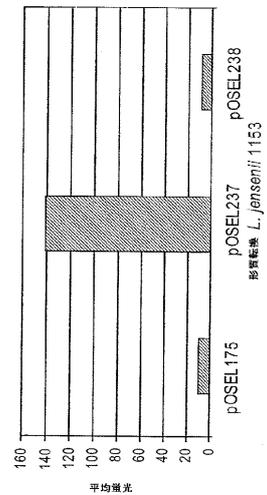
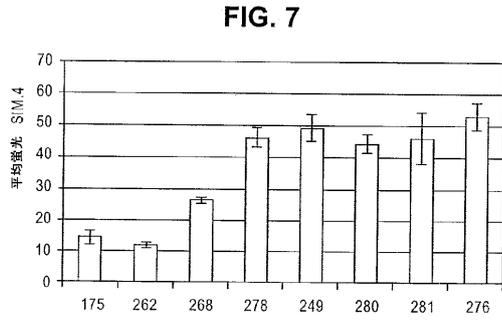


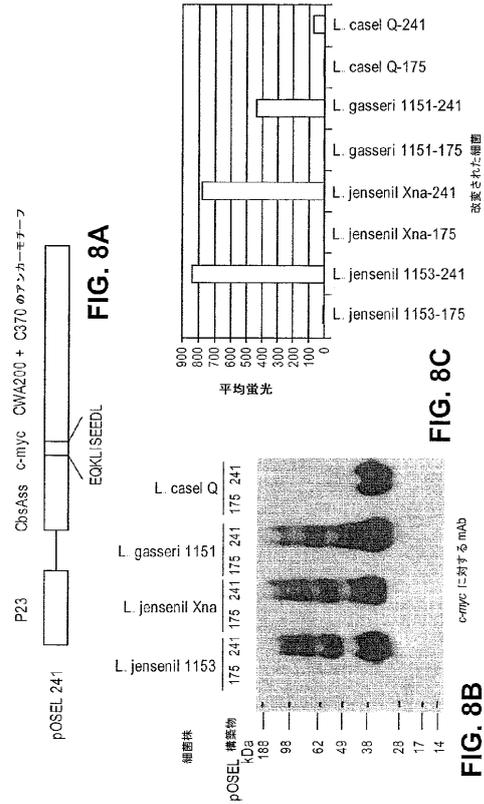
FIG. 6B



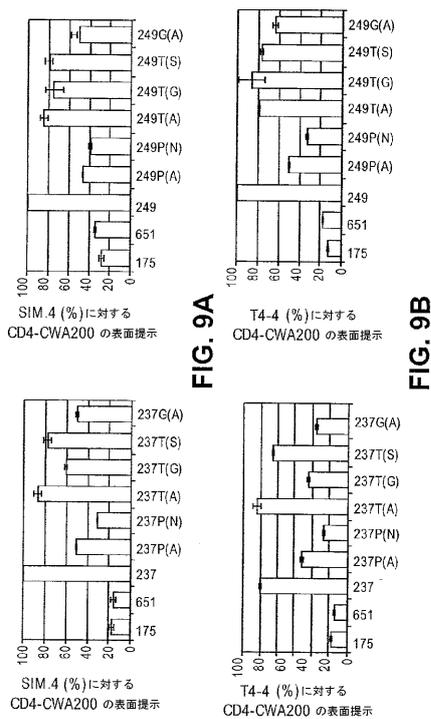
【 図 7 】



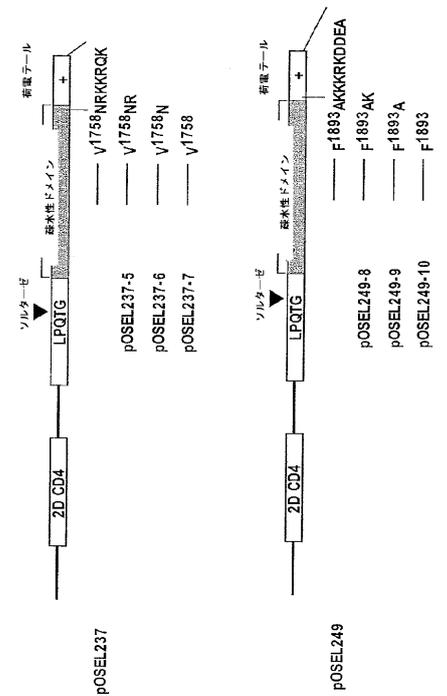
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】

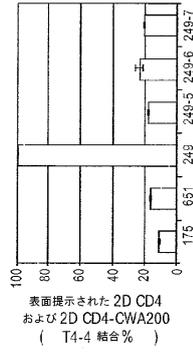


FIG. 11A

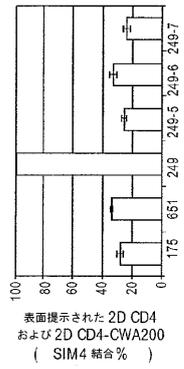
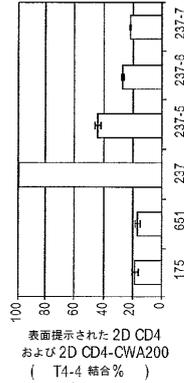
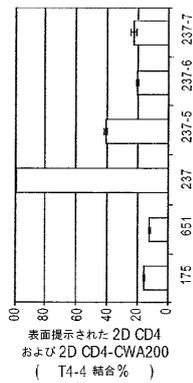
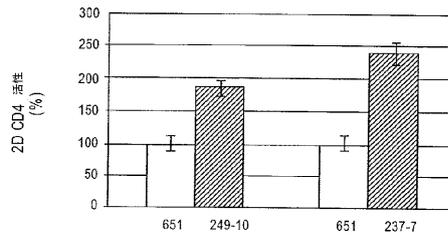


FIG. 11B



【 図 1 2 】

FIG. 12



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成 19 年 1 月 11 日 ( 2007.1.11 )

【 手続 補正 1 】

【 補正 対象 書類 名 】 明 細 書

【 補正 対象 項目 名 】 配 列 表

【 補正 方法 】 追 加

【 補正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2007503845000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2004/002460

60601310014



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 16976-8-1PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US04/02460	International filing date (day/month/year) 28 January 2004 (28.01.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29 January 2003 (29.01.2003)
Applicant OSEL, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed.  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3.  Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.  
 the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant.  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b.  none of the figures is to be published with the abstract.

Form PCT/ISA/210 (first sheet) (April 2005)

30.10.2006

PCT/US2004/002460

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/02460

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item I.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- a sequence listing  
 table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- on paper  
 in electronic form

c. time of filing/furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments: SEQ ID NOs are not provided for all the specific sequences present in the specification.

PCT/US2004/002460

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/02460

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC: C12P 21/06(2006.01);C12N 1/22(2006.01);C07H 21/02(2006.01),21/04(2006.01)		
USPC: 435/69.1,252;536/23.4,23.5		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 252; 536/23.4, 23.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched US provisional 60/433619		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, PALM, Medline -search in file		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/11277 (Tagliabue et al) 18 April 1996, entire application.	1-65
A	VALLOR ET AL. J. Infect Dis 2001 Vol. 184, pages 1431-1436, entire reference for the general use of Lactobacillus as a therapeutic agent.	1-65
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
04 August 2006 (04.08.2006)	14 SEP 2006	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer <i>Joseph T. Wolfach</i> Joseph T. Wolfach Telephone No. (571) 272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	
<b>A 6 1 P 31/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/10	
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/18	
<b>C 0 7 K 14/705 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/705	

(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, 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 リュー, シャオウエン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 1 4, クパチーノ, インペリアル アベニュー 1  
0 1 6 4

(72) 発明者 レウィッキ, ジョン エー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 3 2, ロス ガトス, エスコバー アベニュー 3  
0 8

(72) 発明者 シュ, チャン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 1 4, クパチーノ, オリーブ アベニュー 2 1 6  
8 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA05 CA04 DA05 EA04 FA01 FA20 GA11 HA01  
4B065 AA01X AA93Y AB01 BA01 CA42 CA44  
4C084 AA07 AA13 BA22 CA04 CA53 CA56 MA05 MA31 MA34 MA52  
MA56 NA05 NA10 NA14 ZB311 ZB331 ZB351 ZC551  
4C087 AA01 AA02 AA03 BC56 CA16 MA31 MA34 MA52 MA56 NA05  
NA10 NA14 ZB31 ZB33 ZB35 ZC55  
4H045 AA30 BA13 BA19 CA40 DA50 EA20 FA72 FA74