

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-151084

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月8日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 39/02	A F F	A 6 1 K 39/02 A F F
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
// (C 1 2 N 1/21		
C 1 2 R 1:01)		

審査請求 有 請求項の数 2 F D (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-333767

(22) 出願日 平成9年(1997)11月19日

(71) 出願人 591111248

農林水産省家畜衛生試験場長
茨城県つくば市観音台3-1-1

(71) 出願人 597169292

下地 善弘
茨城県つくば市吾妻4-209-601

(71) 出願人 597169306

森 康行
茨城県つくば市吾妻2-809-101

(71) 出願人 597169317

関崎 勉
茨城県つくば市吾妻1-405-202

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豚丹毒菌の荚膜欠損変異株 Y S - 1 株

(57) 【要約】

【課題】 病原性復帰のおそれなく遺伝的に安定した、豚丹毒菌感染症の生ワクチン株を開発すること。

【解決手段】 豚丹毒菌強毒株 Fujisawa-SmR のトランスポゾン変異株に由来し、テトラサイクリン感受性を示す豚丹毒菌荚膜欠損変異株 Y S - 1 株 (F E R M P - 1 6 4 6 6) 並びに該 Y S - 1 株を豚丹毒菌感染症の生ワクチンとして使用する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 豚丹毒菌強毒株 Fujisawa-SmR のトランスポゾン変異株に由来し、テトラサイクリン感受性を示す豚丹毒菌莢膜欠損変異株 YS-1株 (FERM P-16466)。

【請求項2】 請求項1記載の豚丹毒菌莢膜欠損変異株 YS-1株 (FERM P-16466)を豚丹毒菌感染症の生ワクチンとして使用する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、豚丹毒菌莢膜欠損変異株 YS-1株及び該YS-1株を豚丹毒菌感染症の生ワクチンとして使用する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】豚丹毒は、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)に起因する感染症である。現在、豚丹毒菌感染症の生ワクチンとして、様々な方法で弱毒化した弱毒菌が用いられているが、その弱毒菌の弱毒化のメカニズムは不明である。また、これらの弱毒生ワクチン株は、病原性の復帰が危惧されており、接種により逆に感染させてしまうおそれが払拭できない。したがって、病原性が安定した弱毒菌、すなわち病原遺伝子を不活化したワクチン株の開発が望まれている。

【0003】わが国では、豚の豚丹毒菌感染症のワクチン株として、アクリフラビン色素耐性菌を利用した小金井株が用いられている。しかしながら、アクリフラビン耐性は、マーカーとして用いるアクリフラビン色素製品のメーカーによって異なることが報告されている。そのため、アクリフラビンは、生ワクチンのマーカーとしての信頼性は低い。それ故、アクリフラビンに代わる信頼度の高い遺伝的マーカーを持ったワクチン株の開発が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の第1の目的は、病原性復帰のおそれなく遺伝的に安定した、豚丹毒菌感染症の生ワクチン株を開発することである。さらに、本発明の第2の目的は、豚丹毒菌生ワクチンのマーカーとして、従来用いられていたアクリフラビンに代わる、信頼度の高い遺伝的マーカーを持ったワクチン株を開発することである。

【0005】本発明者らは、既に豚丹毒菌の有する莢膜が病原性に關与していることを究明すると共に、その莢膜形成に關与する遺伝子群の塩基配列を決定した (特願平9-166642号明細書)。本発明者らは、さらに研究を重ねた結果、莢膜が欠失した変異株を作出することに成功した。このようにして得られた変異株の遺伝子の塩基配列を利用してプライマーを設計することにより、該変異株と他の豚丹毒菌との鑑別がポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR法)により可能になる。また、この変異株と強毒株とで菌体表層抗原の違いを比較することに

より、表現形質マーカーによる識別が可能である。

【0006】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、豚丹毒菌強毒株 Fujisawa-SmR のトランスポゾン変異株由来で、テトラサイクリン感受性を示す豚丹毒菌莢膜欠損変異株 YS-1株 (FERM P-16466)である。請求項2記載の本発明は、上記の豚丹毒菌莢膜欠損変異株 YS-1株 (FERM P-16466)を豚丹毒菌感染症の生ワクチンとして使用する方法である。

【0007】

【発明の実施の態様】以下に本発明について詳しく説明する。本発明に係る豚丹毒菌莢膜欠損変異株 YS-1株 (FERM P-16466) (以下、単にYS-1株と略記することがある。)の作出は、以下の手順により行うことができる。

【0008】まず、豚丹毒菌強毒株 Fujisawa-SmR の染色体上にトランスポゾン Tn916を導入する。トランスポゾン Tn916は、腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)のある株で発見されたテトラサイクリン耐性遺伝子を保有し、接合伝達により目的とする細菌の染色体に導入することが可能な転移遺伝子である。トランスポゾン Tn916の導入方法の概略を述べると、トランスポゾン Tn916を保有する *Enterococcus faecalis* CG110株と豚丹毒菌の親株である Fujisawa-SmR 株をメンブランフィルター上で培養した後、テトラサイクリンとストレプトマイシンの入った培地を用いて、トランスポゾン Tn916の接合伝達された Fujisawa-SmR 株を選択した。

【0009】得られるトランスポゾン Tn916挿入変異株の中から、親株である Fujisawa-SmR 株とコロニー形態が異なる変異株 (33H6株)を選択した。33H6株は、テトラサイクリン耐性遺伝子であるトランスポゾン Tn916が導入されているため、テトラサイクリン感受性を示さない。また、この株は親株である Fujisawa-SmR 株が有する莢膜の形成能を有していない上、親株の有する病原性をも失っている。

【0010】Tn916は染色体から脱落すると、その際に、挿入されていた場所に変異を起こすことが知られている。この性質を利用して、莢膜形成に關与する遺伝子に変異の起こった変異株を作成した。すなわち、この33H6株を継代して、コロニー形態が親株である Fujisawa-SmR 株と異なり、莢膜形成能を有しておらず、かつテトラサイクリン感受性を有するようになったものを選択し、この変異株をYS-1株と命名した。YS-1株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-16466である。

【0011】このYS-1株の病原性を調べるために、マウスに接種して50%致死量 (LD₅₀)を求めたとこ

る、病原性を失っていることが明らかとなった。そこで、YS-1株について、莢膜形成に關する遺伝子領域に変化が生じているか否か検討した。本発明者らは、豚丹毒菌(Fujisawa株)の莢膜形成に關する遺伝子群の塩基配列をすでに決定し、特許出願をした(特願平9-166642号明細書)。該塩基配列に基づきプライマーを設計してPCRを行い、Sangerらの方法(DNA sequencing with chain terminating inhibitors; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 699-703, 1977)に従って変異が予想される領域の塩基配列を決定した。

【0012】すなわち、豚丹毒菌(Fujisawa株)の莢膜形成に關する遺伝子群の塩基配列を基にして作成した配列表の配列番号1及び2に示すプライマーを用いてPCRを行った。PCR法の条件は、94で1分間、55で30秒間、72で1分間の3ステップを25サイクル行った。その結果得られたYS-1株の染色体DNAの塩基配列の決定は、Sanger, F., Nickson, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 86, 699-703に記載の方法に従い、オリゴヌクレオチドプライマーを作成し、2本鎖の両方向から300~500塩基ずつ決定した。

【0013】33H6株において、トランスポゾンTn916は、Fujisawa-SmR株の莢膜形成遺伝子の塩基配列の1435番目と1436番目の間に挿入されていた。ここで、Fujisawa-SmR株の塩基配列は、Fujisawa株の莢膜形成遺伝子の塩基配列(平成9年特許願第166642号明細書参照)と同じである。そこで、このトランスポゾンTn916挿入部位の遺伝子領域の塩基配列をYS-1株とFujisawa株の塩基配列(平成9年特許願第166642号明細書参照)とで比較したところ、1430番目~1435番目の6塩基の置換が起きていたことが判明した(配列表の配列番号3参照)。このことは、YS-1株の莢膜形成能喪失は、病原性を有するFujisawa株の莢膜形成遺伝子の塩基配列のうちの6塩基のみが置換されていることに起因することを示す

第1表〔YS-1株のマウスにおける感染防御能〕

免疫菌量 (cfu)	生残数 (匹) / 試験数 (匹)
2×10^8	10 / 10
2×10^7	10 / 10
2×10^6	10 / 10
2×10^5	10 / 10
2×10^4	10 / 10
コントロール	0 / 10

【0019】表から明らかのように、豚丹毒強毒株による攻撃に対し、コントロールのマウスは全てが死亡したのに対し、YS-1株で免疫されたマウスは全く発病せ

ものである。

【0014】したがって、この6塩基の置換部分を利用して設計したプライマーを用いたPCR法により、病原性を有しないYS-1株を他の菌の中から正確、かつ迅速に鑑別することが可能である。具体的には、被検菌から常法により抽出したDNAについて、配列表の配列番号2及び4記載の塩基配列を有するプライマーを用いたPCR法を行う。PCR法の条件は特に限定されないが、例えば94で1分間、55で30秒間、72で1分間の3ステップを25サイクル行えばよい。

【0015】また、YS-1株とFujisawa-SmR株の菌体表層抗原を、モノクローナル抗体を用いて、イムノ・プロット法により解析した。その結果、YS-1株はFujisawa-SmR株に見られる17~27キロダルトンの抗原を欠失していることが判明した(図2)。このことは、この抗原が欠失した株は、生ワクチンとして有効である可能性が高いことを意味している。

【0016】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

実施例1〔YS-1株のマウスに対するワクチン効果〕7~9週齢のマウス(メス)60匹を10匹ずつ6区にわけ、そのうちの5区にYS-1株を第1表に示す量(約 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^4$ 個)で皮内接種(免疫)した。残りの1区については、培地のみを接種し、コントロールとした。その結果、YS-1株を接種した群のマウスは、いずれも豚丹毒の臨床症状を全く示さなかった。このことから、YS-1株はマウスに対して病原性を有さないことが確認された。

【0017】次に、接種から3週間後、豚丹毒強毒株約 3×10^3 個(約100LD₅₀)による攻撃試験を行い、攻撃後2週目における生残数を調べ、YS-1株のワクチン効果を検定した。結果を第1表に示す。

【0018】

【表1】

ず、すべて生存した。この結果から、YS-1株のワクチン効果が証明された。したがって、YS-1株は生ワクチン株として有効である。

【0020】実施例2〔PCR法によるYS-1株の鑑別〕

配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち、1430番目から1435番目の塩基配列を利用して、配列表の配列番号2及び4に示すPCRのプライマー（それぞれプライマーA及びプライマーBとする。）を設計した。このプライマーを用いてPCR法を行った。供試菌として豚丹毒菌野外株30株を用い、Galan and Timoney

(1990)の方法あるいはInstaGene (Bio-RAD) に準じた方法で各菌株からDNAを抽出した。PCR法は、第2表に示すような組成及び濃度から成る反応液中で、94で1分間、55で30秒間、72で1分間の3ステップを25サイクル実施した。

【0021】

【表2】

第2表〔PCR反応液の組成及び濃度〕

組 成	濃 度
K C l	5 0 m M
M g C l ₂	1. 0 m M
Tris - H C l	1 0 m M
B S A	1 0 μ g / m l
d N T P	各0. 2 m M
Triton X-100	0 . 1 %
Primer A, B	各1. 0 μ M
Taq DNA Polymerase	2. 5 Units

【0022】PCRの結果を図1に示す。図1より、YS-1株のDNAのみが目的のサイズに増幅されたのに対して、他の豚丹毒菌野外株のDNAは増幅されなかったことが分かる。以上の結果から、プライマー設計の基礎として用いたYS-1株の遺伝子のうち、変異した6塩基は、YS-1株の生ワクチン遺伝マーカーとして有効であることが示された。

【0023】実施例3〔YS-1株菌体表層抗原の観察〕

YS-1株と Fujisawa-SmR 株とを培養後、Triton X-100を用いて菌体表層抗原を可溶化抽出した。その抗原をSDS-PAGEにより泳動・分離した。その後、常法によりモノクローナル抗体ER21を用いてイムノ・プロット法による抗原解析を行った。結果を図2に示す。図2より、YS-1株は Fujisawa-SmR 株にみられた17~27キロダルトンの抗原を欠失していることが分かる。この結果は、この抗原を欠失させた株は生ワクチン株として有効である可能性が高いことを示唆するものである。

【0024】

【発明の効果】本発明に係る豚丹毒菌の荚膜欠損変異株

YS-1株は、病原性が低下しており、しかも病原性復帰の危惧がなく、遺伝的に安定である。そのため、本菌は豚丹毒菌感染症に対する生ワクチンとして有効に利用することが可能である。また、本菌の変異した遺伝子内の塩基配列を利用してプライマーを設計し、該プライマーを用いたPCR法を行うことにより、他の豚丹毒菌からYS-1株を特異的に鑑別することができる。よって、YS-1株を用いることにより、遺伝学的に病原性

が安定し、かつ信頼度の高い遺伝的マーカーを保有する豚丹毒菌感染症に対する生ワクチンの実用化を図ることができる。

【0025】また、YS-1株が欠損した抗原は、ワクチン株の表現形質マーカーと成り得ると考えられることから、この抗原による菌の識別が可能なワクチン株の実用化が期待される。さらに、YS-1株は、豚丹毒菌感染症に対する生ワクチンとして利用するばかりでなく、他の微生物の遺伝子や生理活性物質遺伝子などの外来遺伝子を組み込んで、他の疾病に対しても免疫効果を付与するためのベクターとして利用することが可能である。

【0026】

【配列表】

【0027】配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源：豚丹毒菌

生物名：Erysipelothrix rhusiopathiae

直接の起源：Erysipelothrix rhusiopathiae Fujisawa株

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

配列

T A T C T T T G T A G C G G T A G T T G G

【0028】配列番号：2

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源：豚丹毒菌

生物名：Erysipelothrix rhusiopathiae直接の起源：Erysipelothrix rhusiopathiae Fujisawa 株

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

配列

CAATAAAAGG AAATACCAAGT GC

【0029】配列番号：3

配列

ATC GAT AAA GTG ATT ATT GGT GGT GGT GGC GCA TAT AAT CCC GTA TTG	48
Ile Asp Lys Val Ile Ile Gly Gly Gly Gly Ala Tyr Asn Pro Val Leu	
1 5 10 15	
CTC GAA GAA ATA CGA ATG ATG TTA CCT GAT GAC ATC ATG GTT TGT ACT	96
Leu Glu Glu Ile Arg Met Met Leu Pro Asp Asp Ile Met Val Cys Thr	
20 25 30	
CAA GAA GAC CTC GGT TTT TCA AGT GAT GCA AAA GAA GCC ATT GCG TTT	144
Gln Glu Asp Leu Gly Phe Ser Ser Asp Ala Lys Glu Ala Ile Ala Phe	
35 40 45	
GCA ATA TTG GGT AAT GAA ACA TTG GCG GGC AGG TCA AGT AAT GTG CCA	192
Ala Ile Leu Gly Asn Glu Thr Leu Ala Gly Arg Ser Ser Asn Val Pro	
50 55 60	
TCT GCA ACA GCT TCG AAA GAA CAT ATG ATC CTT GGT CAA ATC TGC CCA	240
Ser Ala Thr Ala Ser Lys Glu His Met Ile Leu Gly Gln Ile Cys Pro	
65 70 75 80	
AAC CCG TGG TCA TCA CTA ACA GAA TCA GAT TGA TTCTGTTTTT TTTTATTGTT	293
Asn Pro Trp Ser Ser Leu Thr Glu Ser Asp	
85 90	
TCTTAACAAT TACTGAAGAC GTCCTATCAA TATTGAATCT AATACGTCAA AATGATATAA	353
TTGACAAGGA TAAATAGGTT ATCTACTGTG TTTTATACAA AATGATTCCA TTGAAACATG	413
ATTCACCAC TTCAATGGAA TTTATTGTGA TTACTTTA TCTATAACGT ATTTGATTAC	473
TAAAAATATA AAAATGTTTC TATATGAAAA CGAATTTGTG TTTTACGAGT AGTAGTTAAT	533
AATTAGGAGA AAAT ATG AGT AAA AAT CTA AAG TCA TTA GTA ATT GTG GCT	583
Met Ser Lys Asn Leu Lys Ser Leu Val Ile Val Ala	
91 95 100	
CTA AAG GGA TTT ATC TTT GTG TTT TTA GCA GCG GTA TTC TTT TAT CTC	631
Leu Lys Gly Phe Ile Phe Val Phe Leu Ala Ala Val Phe Phe Tyr Leu	
105 110 115	
TTT GGA AAA GAA AAT ATT GCG CTA CAA AAT TGG TCA AGA ACA GCG GTC	679
Phe Gly Lys Glu Asn Ile Ala Leu Gln Asn Trp Ser Arg Thr Ala Val	
120 125 130	
ATT ACA GGA TCG ACC TTT ATC TTG ATT GGC ATT TTA ATG CTT AAG GTT	727
Ile Thr Gly Ser Thr Phe Ile Leu Ile Gly Ile Leu Met Leu Lys Val	
135 140 145 150	
TAC GGA CCT TTT GAA ATT GGT GTA AAA AAG AGC AAA CCA ATT ATT TAT	775
Tyr Gly Pro Phe Glu Ile Gly Val Lys Lys Ser Lys Pro Ile Ile Tyr	

配列の長さ：4458

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：豚丹毒菌

生物名：Erysipelothrix rhusiopathiae直接の起源：Erysipelothrix rhusiopathiae Fujisawa 株

配列の特徴

特徴を表す記号：cps genes

特徴を決定した方法：E

	155	160	165	
AAT TCA ACG ATT GCA ATT ATG TTA ACG GAT TTA GCG ACA TTT TTT CAA				823
Asn Ser Thr Ile Ala Ile Met Leu Thr Asp Leu Ala Thr Phe Phe Gln				
	170	175	180	
TTG ATG GTC ATG AAT ACA AAT CCT AAT AAC AAT CAA TCT TTT AAA ATT				871
Leu Met Val Met Asn Thr Asn Pro Asn Asn Asn Gln Ser Phe Lys Ile				
	185	190	195	
GAG CAA TTG GAT TTA TTA TTC TAT ACC ATA CTC ATT CAG ATT ATT GGG				919
Glu Gln Leu Asp Leu Leu Phe Tyr Thr Ile Leu Ile Gln Ile Ile Gly				
	200	205	210	
ATT GTG ATT TTT GCC TAT TTA GGC AAT TAT ATT TAC TTC AAG ATG TAC				967
Ile Val Ile Phe Ala Tyr Leu Gly Asn Tyr Ile Tyr Phe Lys Met Tyr				
	215	220	225	230
AAG CCG TCT CGT ACT ATT ATT GTA TAT GAT GAA AAC GAC CAA GTG AGT				1015
Lys Pro Ser Arg Thr Ile Ile Val Tyr Asp Glu Asn Asp Gln Val Ser				
	235	240	245	
TTA GGA AAA GTT AAA CAT TAT TTA GAG CGT TTT AAG CTG CAA TAT GAT				1063
Leu Gly Lys Val Lys His Tyr Leu Glu Arg Phe Lys Leu Gln Tyr Asp				
	250	255	260	
ATT TTA GGA TGC ATT GCT GTT GAT GAT CCG AAT TTG GAA GCA ATG CTT				1111
Ile Leu Gly Cys Ile Ala Val Asp Asp Pro Asn Leu Glu Ala Met Leu				
	265	270	275	
TAC AAT GTT GAT TAT GTT GTA ATC TTA GAA ACA CCT ATA AGT GAG CGA				1159
Tyr Asn Val Asp Tyr Val Val Ile Leu Glu Thr Pro Ile Ser Glu Arg				
	280	285	290	
AAA CGT CTG GTT GAT CTT TGT TAC AAG CAT CAA TTA AAT TTC ATG TTT				1207
Lys Arg Leu Val Asp Leu Cys Tyr Lys His Gln Leu Asn Phe Met Phe				
	295	300	305	310
GCG CCT TCG ATT TCG GAT ATT GTT GAA TTA TCA GGG TTC TCG ATG GTT				1255
Ala Pro Ser Ile Ser Asp Ile Val Glu Leu Ser Gly Phe Ser Met Val				
	315	320	325	
GTC GAT GAT AAG GCT ATG GTT GAG GTA AAT ATT CAA GGT CTA TCT TTC				1303
Val Asp Asp Lys Ala Met Val Glu Val Asn Ile Gln Gly Leu Ser Phe				
	330	335	340	
GAA CAA CGT GTT TTA AAA CGA ATT CTC GAT ATC TTT GTA GCG GTA GTT				1351
Glu Gln Arg Val Leu Lys Arg Ile Leu Asp Ile Phe Val Ala Val Val				
	345	350	355	
GGT GCC ATT TTA TCA TCA CCA ATT TGG ATT ATC GCA GCA ATT GCT ATC				1399
Gly Ala Ile Leu Ser Ser Pro Ile Trp Ile Ile Ala Ala Ile Ala Ile				
	360	365	370	
AAA CTT AAT GAT GGT GGC TCA ATT CTT TTT <u>GTA TTA</u> AAA AGA GCG ACA				1447
Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser Ile Leu Phe <u>Val Leu</u> Lys Arg Ala Thr				
	375	380	385	390
ATT GAC GGA CGC ATT TTC GAT GTT TAT AAA TTC AGA ACA ATG AAA GAA				1495
Ile Asp Gly Asp Ile Phe Asp Val Tyr Lys Phe Arg Thr Met Lys Glu				
	395	400	405	
AAT GTT GAA AAT TAT TCT GCT ACA GAG CAT GAT GAC CGA ATC ACA TCA				1543
Asn Val Glu Asn Tyr Ser Ala Thr Glu His Asp Asp Arg Ile Thr Ser				
	410	415	420	
GTT GGA AAG GTT CTT CGT AAA ATT CGT ATG GAT GAA CTT CCC CAA CTC				1591

Val Gly Lys Val Leu Arg Lys Ile Arg Met Asp Glu Leu Pro Gln Leu
 425 430 435
 ATC AAT ATA CTT AAA GGT GAA ATG AGC ATT GTA GGT CCT CGT CCT GAA 1639
 Ile Asn Ile Leu Lys Gly Glu Met Ser Ile Val Gly Pro Arg Pro Glu
 440 445 450
 ATG CTT GAA AAT GTC GAT TCT TAT CAA AAA GTG TTG CCC GAA TTT GCT 1687
 Met Leu Glu Asn Val Asp Ser Tyr Gln Lys Val Leu Pro Glu Phe Ala
 455 460 465 470
 TAC CGC TTG AAG GTT AAA GCA GGC TTA ACA GGT CTA GCG CAG ATC GAG 1735
 Tyr Asp Leu Lys Val Lys Ala Gly Leu Thr Gly Leu Ala Gln Ile Glu
 475 480 485
 GGT AAG TAC AAT ACA TCT CCA AAA GAT AAA CTT CTT ATG GAT CTT ATG 1783
 Gly Lys Tyr Asn Thr Ser Pro Lys Asp Lys Leu Leu Met Asp Leu Met
 490 495 500
 TAT ATA GAA AAC TAT TCA ATT TGG ACT GAT TTT AAA TTA ATC TTA CGC 1831
 Tyr Ile Glu Asn Tyr Ser Ile Trp Thr Asp Phe Lys Leu Ile Leu Asp
 505 510 515
 ACT GTT GTA GTT ATT TTT AAA AAA GAC AGT ACA GAA GGG TTT TAA 1876
 Thr Val Val Val Ile Phe Lys Lys Asp Ser Thr Glu Gly Phe
 520 525 530 532
 ACTCGTTTAA GTCTTAGGGA ATTTATCTTT AAGACTTATT ATTTTATATT ATTTTATTGG 1936
 AGGTAATT ATG TAC TAT TTT GCA CTG GTA TTT CCT TTT ATT GTT AGT TTA 1986
 Met Tyr Tyr Phe Ala Leu Val Phe Pro Phe Ile Val Ser Leu
 533 535 540 545
 TTA CCA AAA TTA ACA AAA AAG CAA AAG TTT TAT TTG GCA ACG GTC CCA 2034
 Leu Pro Lys Leu Thr Lys Lys Gln Lys Phe Tyr Leu Ala Thr Val Pro
 550 555 560
 CTT TTT ATT ATC GTA ATT TTT AGA GTA GGT GTA GGT ACA GAT TAT TTT 2082
 Leu Phe Ile Ile Val Ile Phe Arg Val Gly Val Gly Thr Asp Tyr Phe
 565 570 575
 TCC TAT GAG TAT CTC TAT AAT TTA CAA AAC GTA ACA ACG TTT GGG AAA 2130
 Ser Tyr Glu Tyr Leu Tyr Asn Leu Gln Asn Val Thr Thr Phe Gly Lys
 580 585 590
 ATG TTA GAC CAT CAA AGC AAC ATT GAA CTC GGA TTT CGC ATT TTT ATA 2178
 Met Leu Asp His Gln Ser Asn Ile Glu Leu Gly Phe Asp Ile Phe Ile
 595 600 605 610
 TTT ATA TTT AAA TCC ATT GGT TTA CCA TTC CAA TTT TTT ATT GGT TTT 2226
 Phe Ile Phe Lys Ser Ile Gly Leu Pro Phe Gln Phe Phe Ile Gly Phe
 615 620 625
 TTT GGA GCC GTT ACA CTC GGT TTC TTT GTA AAA TGG ATT GAT GAG ACG 2274
 Phe Gly Ala Val Thr Leu Gly Phe Phe Val Lys Trp Ile Asp Glu Thr
 630 635 640
 ACG GAT TCA TCA CTC GTT TCG CTG ATT CTC TTT ATT GGT ATG TTT TTC 2322
 Thr Asp Ser Ser Leu Val Ser Leu Ile Leu Phe Ile Gly Met Phe Phe
 645 650 655
 TTT GTT TGG AAT TTA AGT GCA ATT CGT CAA GGT CTT GTT ATG GCA GTT 2370
 Phe Val Trp Asn Leu Ser Ala Ile Arg Gln Gly Leu Val Met Ala Val
 660 665 670
 GCG TCC TAT TAC TTC TTT AAT CCT CAA AAA AAT CTA TCC AAA AAG CAA 2418
 Ala Ser Tyr Tyr Phe Phe Asn Pro Gln Lys Asn Leu Ser Lys Lys Gln

675	680	685	690	
TCA ATC TTA CTT GTA GCA GCA CTT GCG CTA TTC CAT ATT TCT GTA TTA				2466
Ser Ile Leu Leu Val Ala Ala Leu Ala Leu Phe His Ile Ser Val Leu				
	695	700	705	
TTC TAC CTA CCG ATT ATA TTC TTA GCA CGC AAC GTT AAA TGG AAT AAA				2514
Phe Tyr Leu Pro Ile Ile Phe Leu Ala Asp Asn Val Lys Trp Asn Lys				
	710	715	720	
AAA ACA CTG ATC ATT GTT CTT GGT ATT TCT TTT GTT TTT GCA TTC ATT				2562
Lys Thr Leu Ile Ile Val Leu Gly Ile Ser Phe Val Phe Ala Phe Ile				
	725	730	735	
CCA TGG CAA CGC GTA CTC ACA CAC CTT CCA TTT ATT CCA GGA TCT AAG				2610
Pro Trp Gln Asp Val Leu Thr His Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ser Lys				
	740	745	750	
AAA ATA ATG GGA TAT ATT GAT GCG AAG ACA CAA GTC TTG AAC TTT GCA				2658
Lys Ile Met Gly Tyr Ile Asp Ala Lys Thr Gln Val Leu Asn Phe Ala				
	755	760	765	
GGA ATT GTC CGT ATT GCA TTC GCT ACA GTA ATT CTT TAT CAC TAC GAT				2706
Gly Ile Val Arg Ile Ala Phe Ala Thr Val Ile Leu Tyr His Tyr Asp				
	775	780	785	
AAA ATC ACG GAT TCC GTA TTT AAG AAA TTC ATC GTT GAT TCG ACT TTA				2754
Lys Ile Thr Asp Ser Val Phe Lys Lys Phe Ile Val Asp Ser Thr Leu				
	790	795	800	
CTT GGA TTT GCA GTT TAC TTT TGT TTG AAA TTC TCA GAA TTA ATT GCT				2802
Leu Gly Phe Ala Val Tyr Phe Cys Leu Lys Phe Ser Glu Leu Ile Ala				
	805	810	815	
GGT CGA ACA ACG ATT TAT ACG TTT ATT CTC TGC ATC GTC GTA TTC AAA				2850
Gly Arg Thr Thr Ile Tyr Thr Phe Ile Leu Cys Ile Val Val Phe Lys				
	820	825	830	
TAT ATA CTT GAC CAC TAT TTC TTA AAA GAC TCA AAA GTT CTA AAT GGA				2898
Tyr Ile Leu Asp His Tyr Phe Leu Lys Asp Ser Lys Val Leu Asn Gly				
	835	840	845	
TTA ATC TAT ACA GGA CTC GCA TGT TTT ACA GGT TTG TTT CTC TAC AAA				2946
Leu Ile Tyr Thr Gly Leu Ala Cys Phe Thr Gly Leu Phe Leu Tyr Lys				
	855	860	865	
GAT ATT AAT GCC TAC ATG CAC CAA TCT AAT TAT CGT GGA CCA AAC AAG				2994
Asp Ile Asn Ala Tyr Met His Gln Ser Asn Tyr Arg Gly Pro Asn Lys				
	870	875	880	
CTA TTA CGA TTT AAC ACA ATT TTC AAT CGT CCG AGC TAT GAT GAT TAT				3042
Leu Leu Arg Phe Asn Thr Ile Phe Asn Arg Pro Ser Tyr Asp Asp Tyr				
	885	890	895	
GAC AAT CGT TTT GCA TAT CTA ACA GTT CGA CGT AAT TGT AAT GAT GAG				3090
Asp Asn Arg Phe Ala Tyr Leu Thr Val Arg Arg Asn Cys Asn Asp Glu				
	900	905	910	
CGC GAT GAG CTT TTA GAT TCT CAA GCC GCG TTA CCT TCA TCT TCA AAG				3138
Asp Asp Glu Leu Leu Asp Ser Gln Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Lys				
	915	920	925	
TAT CAA GAG AAT CTT TCC TAT TAT GCA ATG TGG GAT CAT GAA TCA GAA				3186
Tyr Gln Glu Asn Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Trp Asp His Glu Ser Glu				
	935	940	945	
CTG TAT GGA ATT TTA GGA ACC GAT CGA ACT TGG ATT GTA GAA CCG ACC				3234

Leu Tyr Gly Ile Leu Gly Thr Asp Arg Thr Trp Ile Val Glu Pro Thr
 950 955 960
 TTT AAA CGT AAA CCA ACA GTC TAT GGT TCG CTG GTT GCA TTT ACT CCT 3282
 Phe Lys Arg Lys Pro Thr Val Tyr Gly Ser Leu Val Ala Phe Thr Pro
 965 970 975
 AAT GAT GAC TTA AAA CAA GCT TTT AAA TCT ACA GAG TAT CTT GAT TTA 3330
 Asn Asp Asp Leu Lys Gln Ala Phe Lys Ser Thr Glu Tyr Leu Asp Leu
 980 985 990
 TCG GGT AAA GAA GTC ACC GAA GAA CAC ATT CAA GAA GCT TTA AGC AAG 3378
 Ser Gly Lys Glu Val Thr Glu Glu His Ile Gln Glu Ala Leu Ser Lys
 995 1000 1005 1010
 GAT TCA CTT GAA CGT CAA GAA ATC ACA ACA CAA GCA CTT GAT GTC AAA 3426
 Asp Ser Leu Glu Arg Gln Glu Ile Thr Thr Gln Ala Leu Asp Val Lys
 1015 1020 1025
 TCT TAC GAT GTT GAG AAA CTT CCT GAA AGC ATT GTT AAT ATG TTT CCT 3474
 Ser Tyr Asp Val Glu Lys Leu Pro Glu Ser Ile Val Asn Met Phe Pro
 1030 1035 1040
 TAT AAA GAT GAA ATC ATA AGT GCA AAA TAT GTT GAA TTC AAC AAA CCT 3522
 Tyr Lys Asp Glu Ile Ile Ser Ala Lys Tyr Val Glu Phe Asn Lys Pro
 1045 1050 1055
 TAT GCC TAC AAG ATT CTA GAT CTT GAA TAC ATT GAT TAT CAT TTC TTT 3570
 Tyr Ala Tyr Lys Ile Leu Asp Leu Glu Tyr Ile Asp Tyr His Phe Phe
 1060 1065 1070
 ATT TAT GTA GAT GAG TCA TTT GAA CCC ATT GTA CCT GTT TTA AGT AAT 3618
 Ile Tyr Val Asp Glu Ser Phe Glu Pro Ile Val Pro Val Leu Ser Asn
 1075 1080 1085 1090
 GAT TTT TAT CGG ATT GCA CCG GAT GGT GTT ATC ACT GTA GAT ACA TAT 3666
 Asp Phe Tyr Arg Ile Ala Pro Asp Gly Val Ile Thr Val Asp Thr Tyr
 1095 1100 1105
 TGT CGT CAA CGC CTT TAC AAT AAA GAT GGT TCT TTA TTG TGG CAA TAT 3714
 Cys Arg Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Leu Leu Trp Gln Tyr
 1110 1115 1120 1122
 TAA GGAGTCCT ATG AAA GTA CTT TAT TTA AGT TCA ACA AAT TCA GGG ATG 3765
 Met Lys Val Leu Tyr Leu Ser Ser Thr Asn Ser Gly Met
 1123 1125 1130 1135
 CAT CGT CAC AGT ATT TAC TTT GAT CTA CTT TCT GAA TTT CAG AAA AAA 3813
 His Arg His Ser Ile Tyr Phe Asp Leu Leu Ser Glu Phe Gln Lys Lys
 1140 1145 1150
 GGA CAT GAT GTT ACG ATT GCA TAT GCT CGT GAA AAA CGT TTA GGC CAA 3861
 Gly His Asp Val Thr Ile Ala Tyr Ala Arg Glu Lys Arg Leu Gly Gln
 1155 1160 1165
 GAA ACA GAG TAT TAT GAA CAA TTT GGC ATG CAC TAT CTT GGC ATT AAA 3909
 Glu Thr Glu Tyr Tyr Glu Gln Phe Gly Met His Tyr Leu Gly Ile Lys
 1170 1175 1180
 ACT GGA AAT TTA ACG AAA AAT AGT AAT TTA ATT GAT AAA GGC ATC GCA 3957
 Thr Gly Asn Leu Thr Lys Asn Ser Asn Leu Ile Asp Lys Gly Ile Ala
 1185 1190 1195
 ACA CTT CGA ATT GAT TCA CAA TTC AAG AAT GCG CTG AAA AAA CAT CTG 4005
 Thr Leu Arg Ile Asp Ser Gln Phe Lys Asn Ala Leu Lys Lys His Leu
 1200 1205 1210 1215

GGA CAT GAA TCG TTT GAT CTT ATT CTG TAT TCA ACG CCC CCT ATA ACA 4053
 Gly His Glu Ser Phe Asp Leu Ile Leu Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1220 1225 1230

CTA CTA AAA ACC GTT AAT TAT CTT AAA ACA AAG AAT CCA AAC GCG TTA 4101
 Leu Leu Lys Thr Val Asn Tyr Leu Lys Thr Lys Asn Pro Asn Ala Leu
 1235 1240 1245

CTC TAC TTA ATG CTC AAG GAT ATC TTT CCG CAA AAT GCC GTT GAT CTT 4149
 Leu Tyr Leu Met Leu Lys Asp Ile Phe Pro Gln Asn Ala Val Asp Leu
 1250 1255 1260

GGA TTT ATG AAA GAA ATG GGT TTG ATT CAT CGT TTC TTC TCT CAT AAA 4197
 Gly Phe Met Lys Glu Met Gly Leu Ile His Arg Phe Phe Ser His Lys
 1265 1270 1275

GAA AAA GCA CTC TAC AAA ATG TTT GAT GTG ATT GGC ACG ATG TCG CCT 4245
 Glu Lys Ala Leu Tyr Lys Met Phe Asp Val Ile Gly Thr Met Ser Pro
 1280 1285 1290 1295

GCG AAC CTA AAC TAT ATG GAA AAA CAT CAT CCA TCT ACC GTA GGA CGA 4293
 Ala Asn Leu Asn Tyr Met Glu Lys His His Pro Ser Thr Val Gly Arg
 1300 1305 1310

CTC GAA ATC TTA CCA AAC GCA TTA GAT ATT AAC GAA AAC AAT ACG GCT 4341
 Leu Glu Ile Leu Pro Asn Ala Leu Asp Ile Asn Glu Asn Asn Thr Ala
 1315 1320 1325

CAT GAC AGC ATT TCC ATT CGT GAG ACG TAT TCC ATT CGT GAT GAC CAA 4389
 His Asp Ser Ile Ser Ile Arg Glu Thr Tyr Ser Ile Arg Asp Asp Gln
 1330 1335 1340

ACG ATT CTT CTC TAT GGC GGT AAC TTA GGG GCA CCA CAG GCA ATT CCA 4437
 Thr Ile Leu Leu Tyr Gly Gly Asn Leu Gly Ala Pro Gln Ala Ile Pro
 1345 1350

TTT GTG ATC GAA TGT ATC GAT 4458
 Phe Val Ile Glu Cys Ile Asp
 1360 1365

【0030】配列番号：4

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源：豚丹毒菌

生物名：*Erysipelothrix rhusiopathiae*

直接の起源：*Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1株

配列の特徴

特徴を決定した方法：E

配列

GTGGCTCAAT TCTTTTGTATTT

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例2の結果を示す電気泳動写真である。

【符号の説明】

上部のWild type *E. rhusiopathiae* strains 及びYS-1は、それぞれ豚丹毒菌野外株、豚丹毒菌莢膜欠損変異株YS-1株を示す。また、両端のMはサイズマーカー(単位：kb)を示し、右下部の矢印は、豚丹毒菌莢膜欠損変異株YS-1株のDNA増幅産物の存在を示す。

【図2】 実施例3の結果を示す電気泳動写真である。

【符号の説明】

上部の数字1、2はレーン1、レーン2を示す。Mはマーカーを示す。レーン1及びレーン2は、それぞれ豚丹毒菌莢膜欠損変異株YS-1株及び豚丹毒菌強毒株Fujisawa-SmR株の菌体表層抗原の解析結果を示す。また、左部の数字は分子量標準(単位：キログルトン)を示す。

(72)発明者 新井 啓五
茨城県稲敷郡笠崎町桜が丘18 - 1