

Studies on Genes Responsible for Synthesis of Capsule-like Serotype b-Specific Polysaccharide Antigen of Actinobacillus

吉田, 康夫
九州大学歯学研究科歯学臨床系専攻

<https://doi.org/10.11501/3134981>

出版情報 : 九州大学, 1997, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

Actinobacillus actinomycetemcomitans の

血清型b特異莢膜様多糖抗原合成遺伝子群に関する研究

吉 田 康 夫

①

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*の

血清型b特異莢膜様多糖抗原合成遺伝子群に関する研究

Studies on Genes Responsible for Synthesis of Capsule-like
Serotype b-Specific Polysaccharide Antigen of *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans

1997年

吉田 康夫

九州大学歯学部予防歯科学講座

(指導：古賀敏比古教授)

対 象 論 文

Identification of a genetic locus essential for the serotype b-specific antigen synthesis in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

YASUO YOSHIDA, YOSHIO NAKANO, YOSHIHISA YAMASHITA, AND
TOSHIHIKO KOGA

Infect. Immun. 66 (1): 107-114, 1998.

Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors.

YOSHIO NAKANO, YASUO YOSHIDA, YOSHIHISA YAMASHITA, AND
TOSHIHIKO KOGA

Gene 162: 157-158, 1995.

目 次

	頁
要旨	1
緒言	4
材料と方法	8
結果	24
考察	62
総括	72
謝辞	73
参考文献	74

略 語

ABC、ATPバインディングカセット

FITC、フルオレセインイソチオシアネート

HPLC、高速液体クロマトグラフィー

LB、Luria-Bertani

LPS、リポ多糖

NBT、ニトロブルーテトラゾリウム

ORF、オープンリーディングフレーム

PBS、リン酸緩衝食塩水

PEG、ポリエチレングリコール

SPA、血清型特異多糖抗原

SDS、ドデシル硫酸ナトリウム

TBS、トリス緩衝食塩水

TBST、0.05% Tween 20を含むTBS

THYブロス、Todd-Hewittブロスに1%酵母エキスを加えた液体培地

TSBYEブロス、Trypticase soyブロスに0.6%酵母エキスと

0.04%炭酸水素ナトリウムを加えた液体培地

X-リン酸、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸

要 旨

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*は若年性歯周炎の原因菌の一つと考えられている。同菌が有する数ある病原性因子の中で、菌体表層に局在する血清型特異多糖抗原 (SPA) は特に重要なものとして注目されている。本研究では、b型のSPAがラムノース残基とフコース残基から構成されていることに着眼して、血清型bの代表的な菌株である*A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNAから、SPAの生合成に関与する遺伝子群をクローニングし、その構造と機能の解析を行った。

まず、同じグラム陰性菌である*Shigella flexneri* 2a株のラムノース合成に関与する遺伝子をプローブとして用いて、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のコスミドライブラリーからプローブとハイブリダイズする38 kb断片を含むプラスミドを単離した。このプラスミドで形質転換を行った*Escherichia coli* DH5 α 株から得たオートクレーブ抽出抗原のウェスタンブロッティング分析を行ったところ、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAに特異的なモノクローナル抗体と反応するバンドを認めた。このバンドと*A. actinomycetemcomitans* Y4株から得たオートクレーブ抽出抗原において反応したバンドはほぼ同じ分子量であったことから、この38 kb断片上には*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に関与する遺伝子群が存在すると考えられた。

次に、クローニングした38 kbの遺伝子断片を種々の制限酵素で切断して、様々な長さの遺伝子断片を含む欠失プラスミドを作製した。これらのプラスミドを保持する*E. coli* DH5 α 株の形質転換株は、プラスミドが含む領域によってSPAを産生するものとしなないものに区別することができた。この結果より、*E. coli* DH5 α 株内でSPAを産生するために不可欠な領域が13 kbの*Bss*HIII-*Bsp*HI断片に含まれていることが明らかとなった。そこで、この13 kbの断片とその周辺領域を含む約25 kb断片の塩基配列を決定した。その結果、塩基配列を決定した遺伝子断片上には、近接した同方向の

オープンリーディングフレーム (ORF) が24個見つかった。それぞれのORFの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を用いて相同性の検索を行ったところ、多くのORFの推定アミノ酸が、既に報告されている*A. actinomycetemcomitans*以外の菌種の菌体表層多糖の合成や、菌体表層への輸送に関与するタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示した。また、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の全染色体DNAの平均G+C比が45.6%であるのに対して、この塩基配列の決定を行った約25 kb断片の平均G+C比は37.7%であった。とくに、塩基配列を決定した約25 kb断片の中央部には、平均G+C比が27.0%と著しく低い領域が存在した。この平均G+C比が著しく低い領域は、*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの産生に不可欠な領域を含む13 kbの*Bss*HII-*Bsp*HI断片上に存在していた。

次に、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの産生に関与している遺伝子群の機能を調べるために、高速液体クロマトグラフィーを用いてSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株中に含まれる多糖の組成分析を行った。この形質転換株から得られた多糖は、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの構成成分であるラムノースとフコースをほぼ1:1の割合で含有していた。さらに、ORF6、ORF7、ORF8およびORF9をそれぞれ含むプラスミドで形質転換した*E. coli* S ϕ 874株から得た菌体抽出物を用いて、これらのORFの遺伝子産物の機能について調べたところ、これらの4つのORFがコードするタンパク質は、dTTPとD-グルコース-1-リン酸からdTDP-ラムノースを合成することに関与する一連の酵素であることが示唆された。また、SPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株における同多糖抗原の局在部位を調べるために菌体凝集試験を行ったところ、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAに特異的なモノクローナル抗体存在下で、SPA産生形質転換株の全菌体は強く凝集した。この結果から、*E. coli* DH5 α 株の形質転換株が産生するSPAは菌体の表層に局在していることが明らかとなった。この所見は、レーザー顕微鏡を用いて、蛍光抗体で処理した菌体表層を観察して得られた結果とも一致した。さらに、生体分子特異的相互作用測定機を用いて、培養上清中に遊離しているSPAと菌体に結合しているSPAの量を測定したところ、SPA産生*E.*

coli DH5 α 株の形質転換株において、*A. actinomycetemcomitans* Y4株とは異なり、SPAは培養上清中にほとんど遊離していなかった。この結果から、同形質転換株の産生するSPAは、菌体表層に強く結合していることが示唆された。

緒 言

近年、我が国においては歯科における二大疾患の一つであるう蝕が減少傾向にあり、もう一方の歯周炎への対策がなお一層重要視されるようになってきている。歯周炎は、これまで歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする高齢者に多くみられる疾患と考えられてきた。ところが、この疾患は必ずしも高齢者だけに発症するというわけではなく、我が国の平成5年度歯科疾患実態調査によると、15歳から24歳までの人の4.5%、25歳から34歳までの人の15.9%、35歳から44歳までの人の25.7%が歯周炎に罹患している（古賀、1994）。現在、厚生省や歯科医師会が展開している「8020運動」の目標の達成のためには、高齢者のみではなくより若い世代の人々に対する口腔疾患の予防対策が必要であろう。このような状況を考慮すると、歯周炎の原因の究明、予防法や診断、治療法の確立が、我が国における口腔保健の向上のために、緊急の課題であるといっても過言ではない。

近年、歯周炎は特定の口腔内細菌が惹起する感染症であるという認識が強まりつつある。たとえば、限局型若年性歯周炎の原因菌としては、非運動性のグラム陰性通性嫌気性桿菌である*Actinobacillus actinomycetemcomitans*が注目されている（Slotsら、1980; Zambon、1985）。さらに、同菌は成人性歯周炎（Slotsら、1986）や重度の非口腔感染症（Kaplanら、1989）の原因菌の一つであるとの報告もある。若年性歯周炎の明確な診断基準はいまだ確立されていないが、初発が第二次成長期前後であること、低年齢層における高度の歯周病変、全顎（広汎型）あるいは切歯部と第一大臼歯部（限局型）に生ずる骨吸収、プラークや歯石の蓄積が少ないこと等の特徴的な臨床症状を示す。その他に、家族性に発症することや、患者は1対3の割合で男性より女性に多いことなども知られている（池田ら、1992）。Zambonら（1983a）は健康な人の歯肉溝から17%、成人性歯周炎の患者の歯周ポケットから21%、限局型若年性歯周炎の患者の歯周ポケットから97%の割合でA.

*actinomycetemcomitans*を分離し、限局型若年性歯周炎と同菌の関係を強く示唆している。

ヒト口腔内から分離される*A. actinomycetemcomitans*はa、b、c、dおよびeの5つの血清型に分類されている（Gmürら、1993; Saarelaら、1992; Zambonら、1983b）。これらの血清型のうち、血清型bが他の血清型と比較して、限局型若年性歯周炎の患者の歯周ポケットから最も高頻度で分離される（Zambon、1985; Ashikainenら、1991）。さらに、歯周ポケットから血清型bの*A. actinomycetemcomitans*が分離された患者においては、血清型bの多糖抗原に特異的な血清抗体価が上昇することも知られている（Califanoら、1989; Simsら、1991）。

*A. actinomycetemcomitans*の病原性因子としては、ロイコトキシン（Taichmanら、1980）、リポ多糖（LPS）（Nishiharaら、1986; Masoudら、1991）、線毛（Rosanら、1988）、コラーゲナーゼ（Robertsonら、1982）、血清型特異多糖抗原（SPA）

（Califanoら、1989; Takahashiら、1991）などが注目されている。以前より、いくつかの研究グループは、*A. actinomycetemcomitans*の病原性因子の中でもとりわけSPAに研究の焦点をあててきた。Amanoら（1989）は、血清型bである*A.*

actinomycetemcomitans Y4株のSPAがL-ラムノースとD-フコースの二種類の単糖から構成される莢膜様多糖であると報告した（図1）。この報告に対して、Pageら

（1991）やWilsonとSchifferle（1991）は、SPAはLPSにおけるO抗原多糖部分であると反論している。さらにPerryら（1996a、1996b）は、Y4株のSPAはL-ラムノースとD-フコースとD-N-アセチルガラクトサミンの三種類の単糖から構成される多糖であると主張している。また、SPAに関する免疫学的な研究もいくつか報告されている。Yamaguchiら（1995）は*A. actinomycetemcomitans*のSPA欠損株を用いて、SPAにはヒト多形核白血球が*A. actinomycetemcomitans*を貪食するという宿主の防御機構に対して抵抗性を与える役割があることを明らかにしている。また、SPAはマウスマクロファージやヒト単球による様々な炎症性サイトカインの産生を誘導することも知られている（Takahashiら、1991; Yamaguchiら、1996）。さらに、マウスの骨髄細胞培

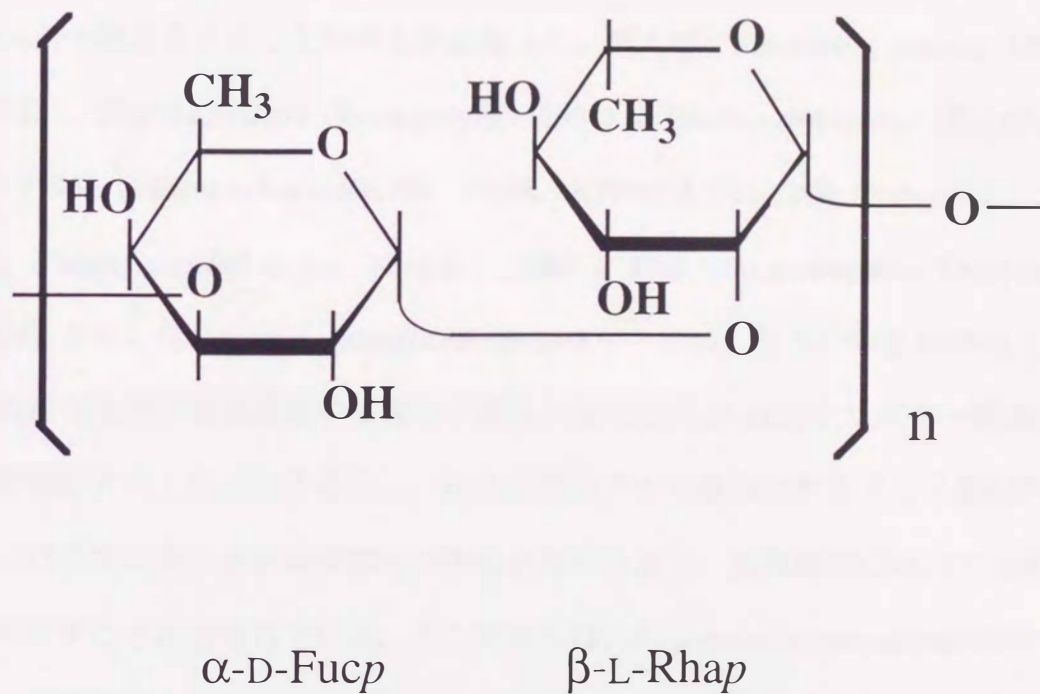


Figure 1. Structure of serotype b antigen of *A. actinomycetemcomitans* Y4.

α -D-Fucp, Fucopyranosyl residue; β -L-Rhap, rhamnopyranosyl residue (Amano et al., 1989).

養系において、SPAが破骨細胞様の細胞の形成を誘導するとの報告もある

(Nishiharaら、1995)。これらの所見から、SPAは*A. actinomycetemcomitans*による歯周炎の発病に、重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、*A. actinomycetemcomitans*のSPAの合成機構やSPAの合成に関与する遺伝子についての報告は、現在のところ全く存在しない。

1980年代後半以降、細菌の、特に病原性細菌の莢膜多糖やLPSのO抗原多糖を合成する遺伝子群がいくつかクローニングされ、菌体外多糖を合成する遺伝子群は一般にクラスター構造をとることが明らかとなった。例えば、*Salmonella enterica* (Jiangら、1991)、*Shigella flexneri* (Rajakumarら、1994)、*Erwinia amylovora* (BugertとGeider、1995)、*Escherichia coli* K1株、K5株、K7株およびK-12株 (Robertsら、1988)、*Haemophilus influenzae* (Krollら、1989)、*Klebsiella pneumoniae* (Arakawaら、1995)あるいは*Neisseria meningitidis* (Froschら、1989)などの染色体DNA上に存在する菌体表層多糖を産生する遺伝子群は、10 kbから25 kbのクラスター構造をとることが報告されている。さらに、一般的に遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、そのタンパク質が同一あるいは類似の機能を有する場合、異種菌間においても高い相同性を示すことが知られている。そこで我々は、*A. actinomycetemcomitans*のSPAを合成する遺伝子群もまた上記の細菌と同様にクラスター構造を示し、各々の遺伝子から産生されるタンパク質の一次構造は、同じ機能を持つ既報のタンパク質と高い相同性を示すものと推測した。今回このような予測をもとにして、数種類の菌種間で高い相同性を示す遺伝子をプローブとして用い、血清型bの代表的菌株である*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAを合成する遺伝子群とその周辺領域を約38 kbにわたってクローニングし、その構造と機能の一部を解明した。

材 料 と 方 法

1. 供試菌およびベクタープラスミド

本研究で用いた *A. actinomycetemcomitans* Y4株 (血清型b) は、Todd-Hewittブロス (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) に1%酵母エキスを加えた培地 (THYブロス)、またはTrypticase soyブロス (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) に0.6%酵母エキスと0.04%の炭酸水素ナトリウムを加えた培地 (TSBYEブロス) (Sreenivasanら、1991) を用いて、5%二酸化炭素存在下において37°Cで培養した。プラスミドDNAの宿主として、*E. coli* DH5 α 株 [*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]、あるいはXL1-Blue株 [*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac* /F' (*proAB*⁺ *lacF*⁺ *lacZ* Δ M15 Tn10)]を用いた (Sambrookら、1989)。また、ラムノースの合成に参与する酵素を発現させる際には、*E. coli* S ϕ 874株 (*lacZ2286 trp-49* Δ (*sbcB-rfb*)86 *upp-12 relA1 rpsL150* λ)を用いた (Jiangら、1991)。*E. coli*はLuria-Bertani (LB) 寒天培地または2 \times TYブロス (Sambrookら、1989) を用い、好氣的条件下にて37°Cで培養した。寒天培地を作製する際には、液体培地に2%になるようにアガロースを加えた。抗生物質は必要に応じて、アンピシリンは50 μ g/ml、クロラムフェニコールは20 μ g/mlの濃度にて加えた。クローニング用のコスミドベクターとしてはpMBLcos (Nakanoら、1995a) を、サブクローニング用のプラスミドとしてはpMCL200、pMCL210 (Nakanoら、1995a)、HSG399 (Takeshitaら、1987) などを用いた。また、発現ベクターには、pBluescript KS (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) とpTrc99A (Amannら、1988) を用いた。

2. モノクローナル抗体の作製

A. actinomycetemcomitans Y4株のSPAおよびLPSに特異的なモノクローナル抗体は、Kogaら (1990) の方法に従い調製した。すなわち、九州大学歯学部予防歯科学講座

に保存してあるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 (5×10^6 個) を、7日から10日前にプリスタンを腹腔内投与しておいたBALB/cマウスの腹腔内に接種し、接種1週間後腹水を採取し遠心を行った後、上清を回収した。本上清中のモノクローナル抗体を50%飽和硫酸で塩析し、リン酸緩衝食塩水 (0.12 M NaCl , $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5; PBS) に溶解した後、PBSに対して透析した。A.

actinomycetemcomitans Y4株のSPAおよびLPSに特異的なモノクローナル抗体を、それぞれモノクローナル抗体S5、モノクローナル抗体L2と名づけた。

3. DNAの操作

各種の制限酵素、T4 DNAリガーゼ、アルカリフォスファターゼ、*Taq* DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼ (クレノウフラグメント) などの遺伝子操作上必要な研究用試薬は、宝酒造 (京都)、東洋紡 (大阪)、New England Biolabs Inc.

(Beverly, Mass., USA)、Fermentas MBI (Vilnius, Lithuania)、GIBCO Laboratories (Grand Island, N.Y., USA)、Pharmacia Biotech Inc. (Uppsala, Sweden) などから購入した。試薬の反応条件は、各々に添付されている指示書に従った。DNAの電気泳動にはMupid-2 (コスモバイオ、東京) を用いた。泳動用緩衝液としては $1 \times \text{TAE}$ (40 mM Tris , $20 \text{ mM glacial acetic acid}$, 1 mM EDTA) を使用し、ゲルは0.8%または0.3%アガロースを用いた。その他の一般的なDNAの操作は、Sambrookら (1989) の記載に従った。

4. *A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNAの調製

A. actinomycetemcomitans Y4株をTHYプロスまたはTSBYEプロス中において、5%二酸化炭素存在下で 37°C 、一昼夜培養した。定常期に達した菌液に等量の培地を加えて、さらに同じ条件下で約4時間培養した。その後、培養液を遠心して上清を取り除き、培養液の1/50容量の緩衝液 (25 mM Tris-HCl , 50 mM glucose , 10 mM EDTA ; pH 7.5) に菌体を浮遊させた。同浮遊液にリゾチーム (和光純薬工業、大阪) を最終濃

度が100 µg/mlになるように加え、37°Cで5分間反応させた。その後、Proteinase K (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., USA) を3.3 U/mlになるように混合し、37°Cで30分間反応させた。溶液中のRNAを除去するために、リボヌクレアーゼ (ニッポンジー、富山) を10 µg/mlになるように加え、37°Cで5分間反応させた。続いて同反応液にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を1%になるように加え、穏やかに混合した。この反応液を用いて、フェノール・クロロホルム (1:1, v/v) 混合溶液による抽出を4回程度行い、さらにクロロホルムによる抽出を1回行った。この抽出液と等量のイソプロパノールを緩やかに混合した際、白雲状に認められる染色体DNAをガラス棒で絡め取り70%エタノールで洗浄した後、適当量のTE溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に溶解し、使用時まで4°Cで保存した。

5. *E. coli*からのプラスミドの調製

1) 煮沸法

組み換えプラスミドの確認等は、HolmesとQuigley (1981) の急速煮沸法にほぼ従って行った。すなわち、*E. coli*の培養液500 µlを遠心によって集菌し、上清を取り除いた後、250 µlのSTET緩衝液 (8% sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl; pH 8.0) に菌体を浮遊させた。次に、リゾチーム (和光純薬工業) を最終濃度が40 µg/mlになるように加え、室温で1分間反応させた。反応液を含むチューブを沸騰した湯に40秒間浸した後、5分間遠心した。変性したタンパク質を含むペレットを爪楊枝にて一塊として取り除き、イソプロパノール沈澱を行った。最後に、得られたプラスミドDNAを適当量のTE溶液に溶解し適切な制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動にてプラスミドの存在を確認した。

2) アルカリSDS法

組み換えプラスミドの調製は、BirboimとDoly (1979) の方法を一部改良して行った。すなわち、*E. coli*の培養液を遠心して集めた菌体を培養液の1/50容量のSolution 1 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8.0) に浮遊させた後、培養液の

1/25容量のSolution 2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) を加え、溶菌させた。ついで、その反応液に培養液の3/100容量のSolution 3 (3M potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid) を加え、穏やかに攪拌した後、氷上で10分間放置した。反応終了後、同反応液を遠心し上清を回収した。上清中のタンパク質成分を取り除くために、フェノール・クロロホルム (1:1, v/v) 混合溶液による抽出を1回行い、続いてクロロホルムによる抽出を1回行った。さらに、同抽出液をイソプロパノール沈澱し、沈澱物を適量のTE溶液で溶解した後、リボヌクレアーゼ (ニッポンジーン) を2 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、室温で5分間反応させた。反応終了後、PEG沈澱を行い、沈澱物を適量のTE溶液に溶解し、使用時まで -30°C にて保存した。

6. サザンハイブリダイゼーションとコロニーハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションは、Southern (1975) の方法を一部改良して行った。まず、制限酵素で切断したDNA断片を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを0.25 Mの塩酸に浸して室温にて5分間振盪した後、脱イオン水で2回洗浄した。同ゲルを1.5 M塩化ナトリウムを含む0.5 M水酸化ナトリウム中に浸して、室温にて20分間振盪した。この操作をさらに1回行った後、脱イオン水で2回洗浄した。続いて、同ゲルを3 M塩化ナトリウムを含む0.5 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中に浸して、室温にて10分間振盪した。本操作をさらに1回繰り返した後、Sambrookら (1989) の記載に従って、 $20\times\text{SSC}$ (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate; pH 7.0) に浸した濾紙上にゲルをのせ、その上にクリアブロット・N膜 (アトー、東京)、濾紙の順にのせた。その上にペーパータオルを数センチ重ね、上に重しをのせた。室温で12時間転写を行った後、膜上のDNAを固定するために、DNA-FIX (アトー) を用いて転写膜に紫外線を照射した。その後、膜をハイブリダイゼーション液 [$5\times\text{SSC}$, 0.1% *N*-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 50% formamide] に浸して、プレハイブリダイゼーション処理を 25°C にて1時間行い、続いてプローブを混合したハイブリダイゼー

ション液に浸して、ハイブリダイゼーション処理を25℃にて24時間行った。ハイブリダイゼーション処理後、同膜を0.1% SDSを含む2×SSCによって室温で5分間ずつ2回、0.1% SDSを含む0.1×SSCによって15分間ずつ2回洗浄した。この膜を簡単にBuffer 1 (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl; pH 7.5) に浸して平衡化した後、非特異的反応を防ぐために、Buffer 2 (0.5%のBlocking Reagentを含んだBuffer 1) に浸して20分間振盪した。その後、150 mU/mlの抗ジゴキシゲニン-アルカリフォスタファアーゼ標識抗体を含むBuffer 2に同膜を浸して、室温で30分間振盪して反応させた。反応終了後、Buffer 1で10分間ずつ2回洗浄し、未反応標識抗体を取り除いた。最後に、同膜をBuffer 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂; pH 9.5) に数分間浸した後、発色基質と試薬を加えた。検出には、ノンラジオシステムDNA標識および検出キット (Boehringer Mannheim GmbH) を用いた。すなわち、発色基質として175 μg/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (X-リン酸) と発色試薬として337.5 μg/mlのニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を含むBuffer 3に膜を浸して、暗所で発色させた。

コロニーハイブリダイゼーションはGrunsteinとHogness (1975) の記載を改良して行った。すなわち、アンピシリンを含むLB寒天培地に*E. coli* DH5α株の形質転換株を接種し、コロニーの直径が約1 mm程度に達するまで培養し、得られたコロニーをImmobilon-NC膜 (0.45 μm; Millipore, Bedford, Mass., USA) に転写した。転写膜を1.5 M塩化ナトリウムを含む0.5 M水酸化ナトリウム溶液に15分間浸し、続いて1.5 M塩化ナトリウムを含む1.0 Mトリス塩酸溶液 (pH 7.5) に5分間浸し、最後に0.1% SDSを含む3×SSCに15分間浸した。適度に膜を風乾した後、膜上のDNAを固定するために、DNA-FIXを用いて膜に紫外線を照射した。その後のプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、検出の操作は、サザンハイブリダイゼーションと全く同じ操作を行った。

7. pMBLcosの製作

pACYC177 (ChanとCohen, 1978) を *Hae*II で切断して得たアンピシリン耐性遺伝子とP15A複製開始領域を含む2510 bpの断片と、pUC18またはpUC19 (Yanisch-Perronら, 1985) を *Hae*II で切断して得たマルチクローニングサイトを含む445 bpの断片をライゲーションした。このようにして作製したベクタープラスミドは、pACYC177由来のアンピシリン耐性遺伝子の中に *Pst*I サイトを含んでいるために、マルチクローニングサイト上の *Pst*I サイトを使用することができない。アンピシリン耐性遺伝子中の同サイトを除去するために、これらのベクタープラスミドを *Bgl*II で切断してアンピシリン耐性遺伝子を含む1118 bpの断片を切り出し、pUC19由来のその断片と相当する断片に置き換えた。このようにして得られたマルチクローニングサイトの方向が異なる2つのベクタープラスミドを、pMBL18およびpMBL19と名づけた

(Nakanoら, 1995a)。次に、pMBL18を *Bst*1107I で切断して末端を平滑化した後、pHC79 (HohnとCollins, 1980) を *Bgl*II で切断して末端を平滑化したcos領域を含む1.8 kb断片を挿入した。このように製作したコスミドベクターをpMBLcosと名づけた (Nakanoら, 1995a) (図2)。

8. *A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPA合成に関与する遺伝子群のクローニング

1) ジゴキシゲニンで標識したPCRプローブの作製

A. actinomycetemcomitans Y4株のSPA合成に関与する遺伝子群をクローニングするためのプローブとして、*S. flexneri* 2a株のラムノース合成に関与する遺伝子の1つである *rmlA* 遺伝子 (Rajakumarら, 1994) を用いた。まず、既に決定されている同遺伝子の塩基配列から、PCR用のプライマーを設計した (フォワードプライマー: 5'-ATTCTGGCTGGTGGTTCCTTC-3'、リバープライマー: 5'-CAGCAGATACTGACCATAAGC-3')。PCR DIG labeling mix (Boehringer Mannheim GmbH) と上記のプライマーを使用して、Rajakumar博士より提供されたpSBA85 (Rajakumarら, 1994) に含まれている *rmlA* 遺伝子を増幅し、約600 bpのジゴキシゲ

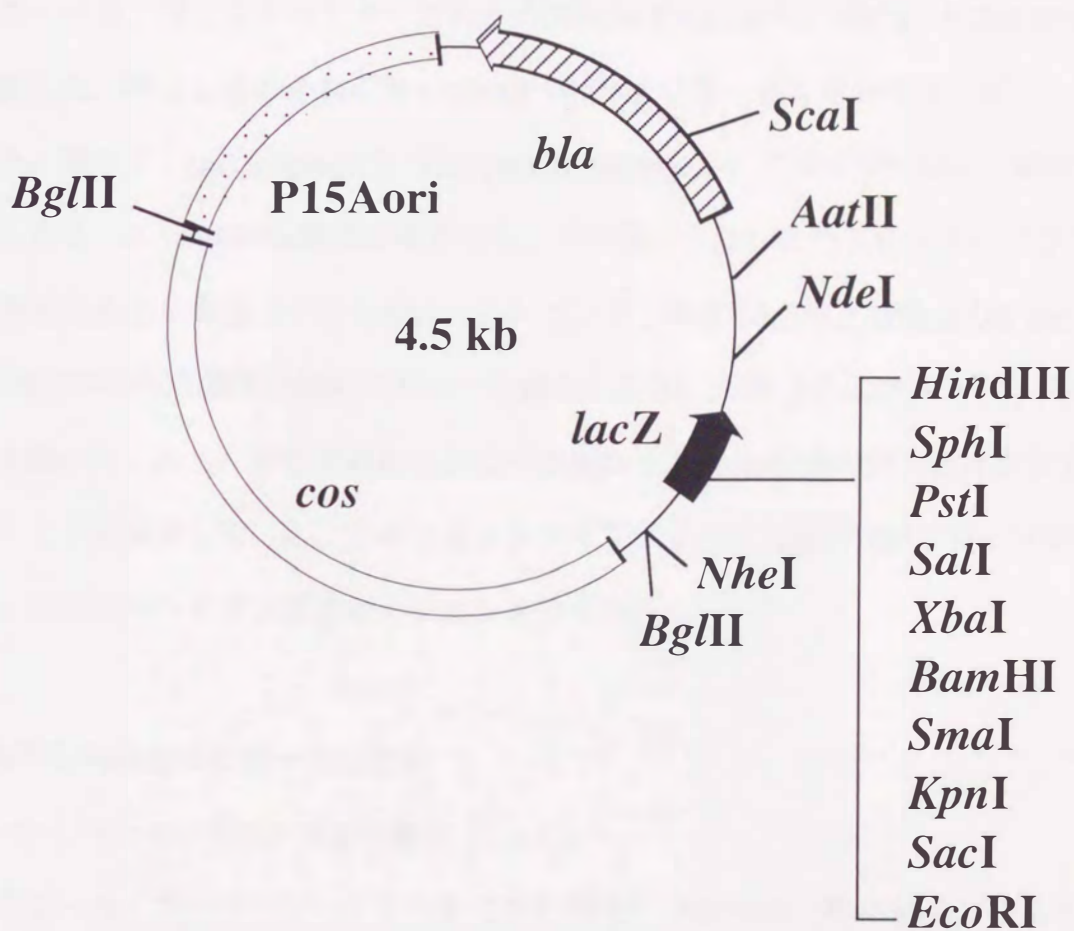


Figure 2. Restriction map of pMBLcos. Arrows within the plasmid indicate the direction of transcription. *bla*, a gene encoding a β -lactamase that confers ampicillin resistance in *E. coli* (Nakano et al., 1995a).

ニン標識断片を得た。反応の条件は94℃ 30秒、54℃ 30秒、72℃ 60秒で行い、このサイクルを28回繰り返した。PCR反応終了後には、未反応のdNTPを取り除くために、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を使用した。

2) *A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNAを使用したコスミドライブラリーの作製

A. actinomycetemcomitans Y4株の染色体DNAを*Sa*Ⅱで完全に切断した後、脱リン酸化した。一方、コスミドベクターであるpMBLcos (Nakanoら、1995a) も*Sa*Ⅱで完全に切断した。等モル量のそれぞれのDNAをT4 DNAリガーゼを用いてライゲーションした。続いて、bacteriophage λ (Gigapack II; Stratagene) にライゲーション産物を封入した後、*E. coli* DH5α株に感染させた。その後、作製したコスミドライブラリーが有効であることを確認するために、アンピシリンを含むLB寒天培地上の*E. coli* DH5α株の中から任意の16個のコロニーを純化した後、それらのコロニー中のプラスミドを調べたところ、それぞれのコロニーは異なった40 kb程度の挿入断片を有するプラスミドを保持していた。このコスミドライブラリーと上記のPCRプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行った。

9. 塩基配列決定法とデータの分析

1) デリレーションプラスミドの製作

コロニーハイブリダイゼーション法で得た陽性コロニーは、約42 kbのプラスミド (挿入断片は約38 kb) を保持していた。サブクローニング用のベクターを用いて、この約38 kbの断片から7個のサブクローンを得た。それぞれのサブクローンを、制限酵素切断部位が5'突出となる制限酵素と、3'突出となる制限酵素の2種類の制限酵素で切断した。切断終了後、用いた制限酵素を失活させたのち、エタノール沈澱を行った。沈澱物を100 μlのエキソヌクレアーゼIII専用緩衝液 (ニッポンジーン) に溶解し、180 UのエキソヌクレアーゼIIIを加え、37℃にて反応させた。反応開始から1分毎に、反応液を10 μlずつ異なるチューブに移し、それぞれのチューブを65℃の

温浴に15分間浸すことによってエキソヌクレアーゼIIIを失活させた。その後、それぞれのチューブにムングビーンヌクレアーゼ専用緩衝液（宝酒造）と50 Uのムングビーンヌクレアーゼを加え、37℃で30分間反応させた。反応終了後、65℃にてムングビーンヌクレアーゼを失活させ、PEG沈澱を行った。生じた沈澱物をDNAポリメラーゼ（クレノウフラグメント）専用緩衝液で溶解し、2 UのDNAポリメラーゼ（クレノウフラグメント）を加え、37℃で20分間反応させた。反応終了後、65℃にて酵素を失活させ、エタノール沈澱を行った。沈澱物を適当量のTE溶液に溶かし、それぞれをセルフライゲーションした。それらのプラスミドを*E. coli* DH5 α 株に導入して、形質転換株を得た。得られた形質転換株が保持するプラスミドを煮沸法で抽出し、プラスミドの長さを調べた。

2) 塩基配列決定

塩基配列の決定は、Sangerら（1977）のジデオキシ法を応用したDye Primer Cycle Sequencing Kit（パーキンエルマー・ジャパン、浦安）を用いて行った。サンプルの調製は、キットに添付されている指示書に従って行った。ただし、PCR反応を行う際の鋳型DNAの濃度は、80 μ g/mlに調製した。DNAシーケンサーは、ABI 373A DNAシーケンサー（パーキンエルマー・ジャパン）を用いた。泳動用緩衝液には1 \times TBE（90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2.2 mM EDTA）を、泳動用ゲルには50%の尿素と1 \times TBEを含む5.25% Long Ranger（FMC BioProducts, Rockland, Me., USA）を用い、42 W、40 mA、2500 Vの条件で18時間泳動した。得られた塩基配列は、DNASIS sequence analysis program（日立ソフトウェア・エンジニアリング、横浜）を用いて解析した。塩基配列または塩基配列から得られたアミノ酸配列の相同性の検索には、FASTA program（LipmanとPearson、1985）を使用した。また、アミノ酸のマルチプルアライメント解析にはCLUSTAL Vを用いた（HigginsとSharp、1988）。

10. ゲル内沈降反応

A. actinomycetemcomitans Y4株および*E. coli* DH5 α 株の形質転換株をそれぞれ約50

mlのTSBYEブロスと2×TYブロスで培養し、遠心して集めた菌体を等量のPBSで2回洗淨した。その後、湿重量で1.5 g/ml程度になるようにPBSに菌体を浮遊させた。これらの菌体浮遊液を121°Cで20分間オートクレーブ処理し、遠心により集めた上清を、オートクレーブ抽出液として用いた。ゲル内沈降反応には、PBSで溶解した1%アガロース平板を使用し、5 µlのオートクレーブ抽出液を平板内の穴に入れた。抗体には*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAに特異的なモノクローナル抗体S5を用いた。

11. ウェスタンブロッティング

A. actinomycetemcomitans Y4株および*E. coli* DH5α株の形質転換株のオートクレーブ抽出液を、等容量の電気泳動用サンプル緩衝液 (0.2 M Tris-HCl, 2% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 40% glycerol; pH 6.8) と混合し、100°Cにて5分間処理した。同サンプルを、0.1%SDSを含む12.5%ポリアクリルアミド分離ゲルと3%ポリアクリルアミド濃縮ゲルを使用し、室温でゲルあたり25 mAの条件で、1.5時間泳動した。泳動用緩衝液には400 mMグリシンと0.2% SDSを含む4 mMトリス緩衝液 (pH 8.3) を用いた。泳動終了後、Towbinら (1979) の方法を一部改良して、ウェスタンブロッティングを行った。すなわち、ゲル内の菌体成分をニトロセルロース膜 (Tran-Blot Transfer Medium; Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA) に電氣的 (5.5 mA/cm², 15V, 1.5時間) に転写した。その後、非特異的反応を防ぐために、転写膜を3%脱脂粉乳を含むトリス緩衝食塩水 (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5; TBS) 中に浸して、室温で1時間振盪した。この転写膜を0.05% Tween 20を含むTBS (TBST) で洗淨した後、TBSTで1/400に希釈したモノクローナル抗体S5と室温で振盪しながら1時間反応させた。さらに、同膜をTBSTで洗淨した後、TBSTで1/1000に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Zymed Laboratories, South San Francisco, Calif., USA) と、室温で振盪しながら2時間反応させた。同膜をTBSTにて洗淨した後、サザンハイブリダイゼーションにおける検出と同様に、X-リン酸とNBTを用いて検出した。蛋白分子量マーカーとして、高分子量マーカー

と低分子量マーカー (Bio-Rad Laboratories) を併用した。

12. 糖組成分析

糖組成分析を行うために、*A. actinomycetemcomitans* Y4株や*E. coli* DH5 α 株の形質転換株から抽出した多糖画分を加水分解した後、加水分解物中の構成単糖を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって同定した。すなわち、*A. actinomycetemcomitans* Y4株と*E. coli* DH5 α 株の形質転換株の全菌体をPBSで洗浄した後、凍結乾燥した。これらの乾燥菌体をデオキシリボヌクレアーゼ緩衝溶液 (0.1 M sodium acetate, 5 mM MgSO₄; pH 5.0) に80 mg/mlになるように浮遊させた。次に、500 μ lの菌体浮遊液をオートクレーブにて121°Cで20分間処理し、遠心により上清を集めた。DNAとRNAを除去するために、それぞれ10 μ g/mlになるようにデオキシリボヌクレアーゼ (Boehringer Mannheim GmbH) とリボヌクレアーゼ (ニッポンジーン) を上清に加え、37°Cで2時間処理した。ついで、フェノール・クロロホルム (1:1、v/v) 混合溶液による抽出を2回行い、クロロホルムによる抽出を1回行った。得られた抽出液をNAP-10 Column (Pharmacia Biotech Inc.) に通して低分子の混合物を取り除き、その後60°C減圧条件下にて乾固した。乾固した沈澱物を50 μ lの1 Mのトリフルオロ酢酸で溶解し、減圧条件下にて100°Cで3時間加水分解を行った後、減圧条件下50°Cにて乾固した。続いて、蒸留水で2回洗浄し、もう1度乾固した。最後に、50 μ lのピリジン・メタノール混合液 (ピリジン:メタノール:蒸留水=3:6:2) にて乾固した沈澱物を溶解し、2 μ lの無水酢酸を加えて室温で30分間N-アセチル化を行った。アセチル化終了後、反応液を減圧条件下にて35°Cで乾固した。

以上のようにして調製したサンプル中に含まれる単糖成分を、Suzukiら (1991) の記載のように、2-アミノピリジン (宝酒造) と結合させて検出した。すなわち、乾固したサンプルを、ドライヤー等で暖めながら10 μ lのカップリング試薬 (1 mlの酢酸中に0.67 gの2-アミノピリジンを溶かした溶液) に溶解して、90°Cで20分間反応させた。その後、余剰の試薬を60°Cにて窒素ガスを噴霧しながら乾固して取り除い

た。次に、還元試薬[1 mlの酢酸で0.06 gのボレイン-ジメチルアミン混合物（宝酒造）を溶かした溶液]を10 μ l加え、90°Cで35分間還元反応を行った。余剰の試薬を取り除くために、20 μ lのメタノールと40 μ lのトルエンを加えた後、50°Cにて窒素ガスを噴霧しながら乾固した。この操作をさらに1回繰り返した後、50 μ lのトルエンを加え同条件下で再び乾固した。このように調製したサンプルを1 mlの蒸留水に溶解した後、孔径0.2 μ mのフィルターで濾過した。HPLCの移動相には0.7 Mのほう酸（pH 9.0）とアセトニトリルの混合溶液（9:1）を用い、流速は毎分0.3 mlに設定した。分離カラムにはPALPAK Type A Column（宝酒造）を用い、検出には励起波長に310 nm、蛍光波長に380 nmを使用した。

13. 抗体を用いた菌体凝集試験

A. actinomycetemcomitans Y4株と*E. coli* DH5 α 株の形質転換株の菌体をPBSに浮遊させ、波長580 nmにおける濁度が1.5前後になるように調製した。各抗体（10 mg/ml）をPBSで2倍階段希釈した溶液を10 μ lずつ96ウェルのU底プレートに入れた後、各ウェルに上記の菌体浮遊液を90 μ l加えて混合した。このように調製した混合液を37°Cで2時間反応させ、肉眼で菌体の凝集の有無を確認した。抗体としては、SPAに特異的なモノクローナル抗体S5、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の熱ショックタンパク質の1つであるGroELタンパク質に特異的なモノクローナル抗体P3、および同タンパク質に特異的なウサギポリクローナル抗体を用いた（Nakanoら、1995b）。

14. 蛍光抗体法による菌体表層の観察

A. actinomycetemcomitans Y4株と*E. coli* DH5 α 株の形質転換株を、それぞれ1 mlずつTSBYEブロスと2 \times TYブロスで培養した。培養液を遠心し、菌体を2回PBSで洗浄した後、再び1 mlのPBSに浮遊させた。ついで、250 μ l（約 2.0×10^7 CFU）の菌体浮遊液を2穴スライドガラス（東新理興、東京）上で37°Cにて乾燥させた。乾燥した菌体を0.1%グルタルアルデヒドで固定後、PBSで3回洗浄した。さらに、アルデヒド基

とタンパク質との非特異的な結合を防ぐために、50 μ lの0.1 M L-リジンを用い室温で30分間処理し、その後PBSで3回洗浄した。続いて、抗体との非特異的な結合を防ぐために、1%ウシ血清アルブミンを含むPBS (100 μ l) 用いて室温下において30分間処理した後、PBSで3回洗浄した。このようにして調製した菌体と、一次抗体として100 μ g蛋白量のモノクローナル抗体S5または同量のマウス腹腔内液とを4 $^{\circ}$ Cで1.5時間反応させた。反応終了後、冷却したPBSで3回洗浄した。一次抗体を作用させた菌体は50 μ gのフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (EY Laboratories, Inc., San Mateo, Calif., USA) で、遮光下において4 $^{\circ}$ Cで1.5時間処理した後、冷却したPBSで3回洗浄した。サンプルは、レーザー顕微鏡 (LEICA TCS 4D; Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany) を用いて観察した。

15. 培養上清中に含まれるSPAと菌体結合SPAの測定

A. actinomycetemcomitans Y4株と*E. coli* DH5 α 株の形質転換株を、それぞれ2 mlの培地中において定常期に達するまで培養後、培養液を遠心した。遠心終了後、培養上清は菌体を混入させないように丁寧に回収した。一方、菌体はPBSにて2回洗浄した後、2 mlのPBSに浮遊させ、121 $^{\circ}$ Cで20分間オートクレーブ処理し、遠心によって上清を集めた。最後に、培養上清とオートクレーブ抽出液をそれぞれHBS緩衝溶液 (Pharmacia Biotech Inc.) で平衡化したNAP-10 Column (Pharmacia Biotech Inc.) にかけて低分子の混合物を取り除き、サンプルとして用いた。一方、リガンドとして用いるために、モノクローナル抗体S5 (10 mg/ml) をCentricon-10 (グレース・ジャパン、東京) にて約8倍に濃縮した後、HBS緩衝溶液で平衡化したNAP-10 Columnで処理した。この濃縮モノクローナル抗体標品を、Sensor Chip CM5 (Pharmacia Biotech Inc.) に固定した。各サンプル中の多糖とSensor Chipに固定したモノクローナル抗体との相互作用の測定には、BIAcore 2000 (Pharmacia Biotech Inc.) を用いた。測定物をリガンドから溶出する際には、50 mMの塩酸を用いた。

16. ラムノース合成遺伝子群の機能分析

1) ラムノース合成遺伝子群のサブクローニング

pARF100を*Eco*RIと*Bpu*1102Iで切断して得た約1 kb断片（ORF6を含む）の切断末端をDNAポリメラーゼ（クレノウフラグメント）にて平滑化した後、同断片を発現ベクターであるpBluescript KS（Stratagene）に*lac*プロモーターとORFの方向を一致させて挿入した。このように作製したプラスミドをpARF401と名づけた。

ORF7、ORF8、ORF9に関しては、PCRで増幅した断片をサブクローニングした。まず、決定した塩基配列からそれぞれのORFを完全に含むようにPCR用のプライマーを設計した（ORF7フォワードプライマー: 5'-TTAGCTCTTTTTTCGCAAA-3'、ORF7リバースプライマー: 5'-CTGCAGTTATTTCTCCTCGTTGAT-3'；ORF8フォワードプライマー: 5'-ATCAACGAGGAGAAATAA-3'、ORF8リバースプライマー: 5'-CTGCAGTTTACTCCGCATACGCTT-3'；ORF9フォワードプライマー: 5'-TTAAAGCGTATGCGGAGT-3'、ORF9リバースプライマー: 5'-CTGCAGTTAAAATTTTACCGTTTC-3'）。pARF100を鋳型DNAとして用い、上記のプライマーを使用してそれぞれのORFを下記の反応条件で増幅した。ORF7の増幅は94℃ 30秒、44℃ 30秒、72℃ 60秒、ORF8の増幅は94℃ 30秒、47℃ 30秒、72℃ 60秒、ORF9の増幅は94℃ 30秒、40℃ 30秒、72℃ 60秒で行い、これらのサイクルを28回づつ繰り返した。PCR反応終了後、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN GmbH）を使用して未反応のdNTPを取り除いた。それぞれの増幅断片をpGEM-Tベクター（Promega, Madison, Wis., USA）に一旦挿入した後、挿入方向を確認してマルチクローニングサイト内の*Nco*Iと*Pst*Iで再び切断した。切り出した断片を、発現ベクターpTrc99A（Amannら、1988）の*Nco*Iと*Pst*Iサイトに*lac*プロモーターとORFの方向を一致させて挿入した。このように作製したORF7、ORF8、ORF9を含むサブクローンをそれぞれpARF405、pARF411、pARF406と名づけた。

2) 粗酵素抽出物の調製

dTDP-L-ラムノース非合成株である*E. coli* Sφ874株にpARF401、pARF405、pARF411、pARF406、pBluescript KSまたはpTrc99Aをそれぞれ導入した形質転換株を、5 mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含む300 mlの2×TYブロスで培養した。波長550 nmの濁度が約1.0に達した時点で、これらの培養液を遠心した。菌体を冷却しておいたBuffer A (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA; pH 7.0) で2回洗浄した後、湿重量で1.5 g/mlになるように再びBuffer Aに浮遊させた。同浮遊液中の菌体を超音波にて破碎した後、遠心して上清を得た。ついで、本上清をBuffer B (20 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 22% glycerol; pH 8.0) にて平衡化したNAP-10 Column (Pharmacia Biotech Inc.) にかけて、低分子の混入物を除去した。最後に、最終濃度が約50%になるようにグリセロールを溶出液に加え、使用時まで-30℃にて保存した。上記のようにして調製した粗酵素抽出物に含まれるタンパク質は、0.1% SDSを含む15%ポリアクリルアミド分離ゲルと3%ポリアクリルアミド濃縮ゲルを用いて電気泳動した後、クーマシーブリリアントブルー (Sigma Chemicals) にて染色を行い確認した。泳動用緩衝液には400 mMグリシンと0.2% SDSを含む4 mMトリス緩衝液 (pH 8.3) を用いた。蛋白分子量マーカーとして、低分子量マーカー (Pharmacia Biotech Inc.) を使用した。

3) ラムノース合成反応と検出

ラムノース合成反応は、Tsukiokaら (1997) の方法を一部改良して行った。すなわち、50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) 、12 mM塩化マグネシウム、12 mM α-D-グルコース-1-リン酸、6 mM dTTP、8 mM NADPH、10.4 Uインオーガニックピロホスファターゼ (Boehringer Mannheim GmbH) を含む300 μlの溶液に、それぞれ2 μg (総蛋白量) の粗酵素抽出物を加え、37℃にて2.5時間反応させた。酵素反応終了後、反応液に1 M塩酸を30 μl加え減圧条件下で80℃にて1時間加水分解反応を行った。その後、同反応液を減圧条件下で50℃にて乾固して、蒸留水で洗浄後さらにもう一度同条件で乾固した。以上のようにして調製したサンプル中に含まれるラムノースを、

上述したように、2-アミノピリジン（宝酒造）と結合させた後HPLCを用いて検出した。

結 果

1. SPAの合成に関与している遺伝子群のクローニング

*A. actinomycetemcomitans*の血清型b特異抗原はD-フコースとL-ラムノースから構成されている多糖であるという報告 (Amanoら、1989) をもとに、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNA上にL-ラムノースを合成する遺伝子群が存在していることを推測した。そこで、*S. flexneri* 2a株のグルコース-1-リン酸-チミジリルトランスフェラーゼをコードする*rmlA*遺伝子 (Rajakumarら、1994) (dTDP-ラムノースを合成する4つの遺伝子のうちの1つ) の一部をプローブとして用いて、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNAのサザンハイブリダイゼーション分析を行った。その結果、*S. flexneri*の*rmlA*遺伝子とハイブリダイズする遺伝子は、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNA上の約38 kbの*SalI*断片に存在していることが明らかとなった (データ省略)。

この結果に基づき、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNAを*SalI*で完全に切断して、コスミドライブラリーを作製した。コスミドベクターには、長い断片を挿入しても*E. coli* DH5 α 株の内部で安定に維持できるように、著者らのグループ (Nakanoら、1995a) が作製したコピー数が少ないpMBLcosを用いた。このコスミドライブラリーと*S. flexneri*の*rmlA*遺伝子に特異的なPCRプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、800個のコロニーから2個の陽性コロニーを得た。モノクローナル抗体S5を用いたイムノプロットによって、2個のコロニーのいずれもがSPAを産生していることを確認した (データ省略)。これらのコロニーからアルカリSDS法によってプラスミドを単離し、適当な数種類の制限酵素で切断した後アガロースゲル電気泳動を行ったところ、両プラスミドとも全く同じ約38 kbの挿入断片を持つが、挿入断片の方向が互いに異なることが判明した。そこで、それぞれのプラスミドをpARF100およびpARF200と名づけた。pARF100とpARF200の

いずれのプラスミドを導入した*E. coli* DH5 α 株の形質転換株もSPAを産生していたので、それぞれのプラスミド上の遺伝子群を発現させるために必要なプロモーターはベクターに由来するのではなく、挿入断片上に存在していることが示唆された。

2. ウェスタンブロットング分析

一次抗体として*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAに特異的なモノクローナル抗体S5および同株のLPSに特異的なモノクローナル抗体L2を用いて、*A. actinomycetemcomitans* Y4株と、pARF100またはpMBLcosを保持する*E. coli* DH5 α 株のオートクレーブ抽出抗原のウェスタンブロットング分析を行った。*A. actinomycetemcomitans* Y4株のオートクレーブ抽出抗原において、モノクローナル抗体S5と反応する高分子量のバンドと、モノクローナル抗体L2と反応する低分子量のバンドを確認した。一方、クローニングした約38 kb断片を含んでいるプラスミドpARF100で形質転換させた*E. coli* DH5 α 株のオートクレーブ抽出抗原においては、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のサンプルと同様に、モノクローナル抗体S5と反応する高分子量のバンドが確認されたが、モノクローナル抗体L2と反応するバンドは確認できなかった。さらに、クローニングベクターであるpMBLcosを保持する*E. coli* DH5 α 株のオートクレーブ抽出抗原においては、モノクローナル抗体S5、またはモノクローナル抗体L2と反応するバンドを確認できなかった(図3)。これらの結果より、pARF100によって形質転換した*E. coli* DH5 α 株は高分子量であるSPAを産生したが、低分子量のLPSを産生しておらず、pARF100は*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に関与する遺伝子を含んでいることが明らかとなった。

3. *E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAを合成するために不可欠である領域の同定

約38 kbの挿入断片の中で、どの領域が*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAを発現させるために不可欠なのかを調べるため、いくつかの制限酵素を

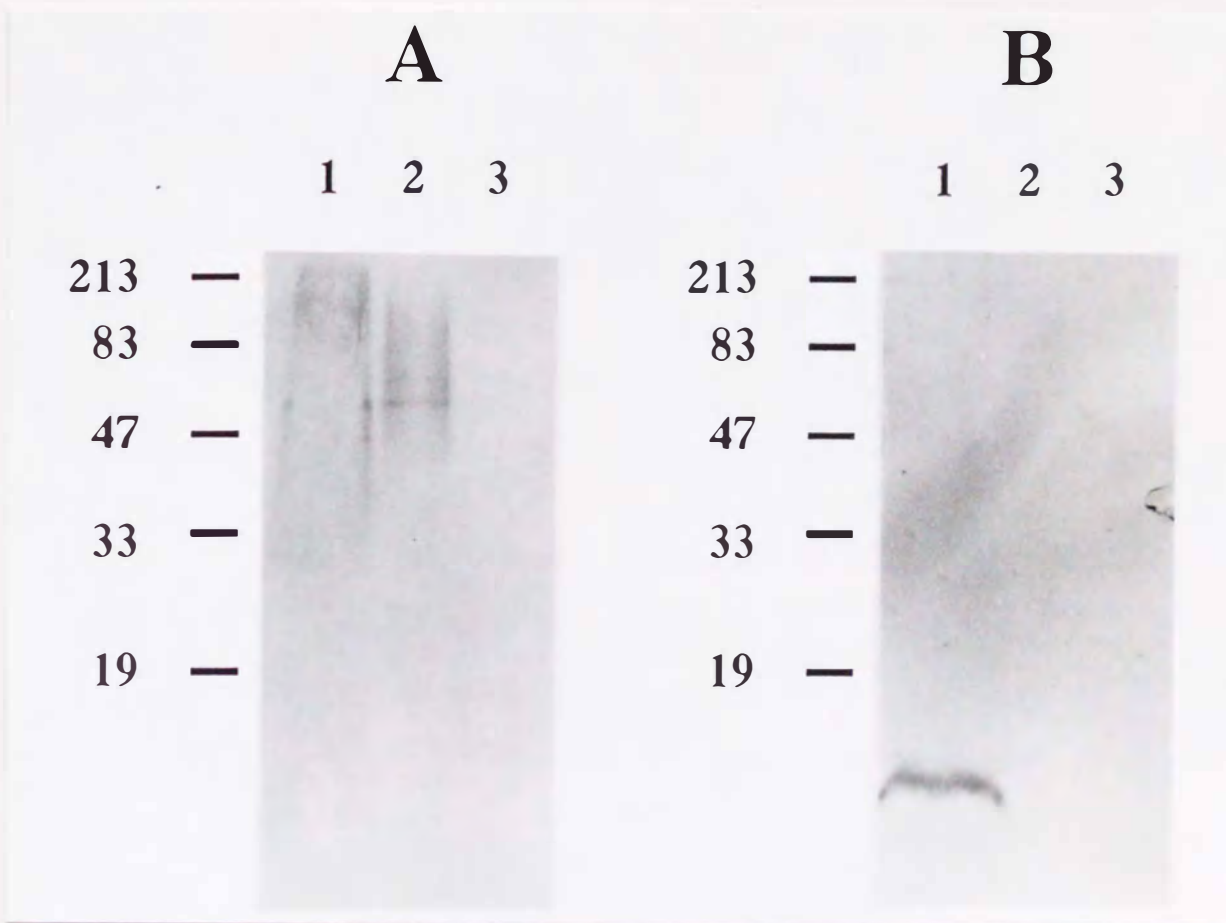
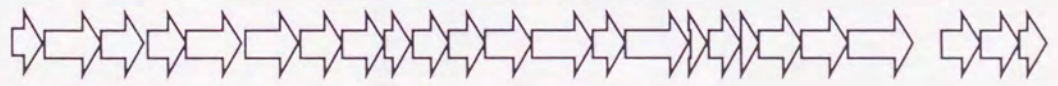
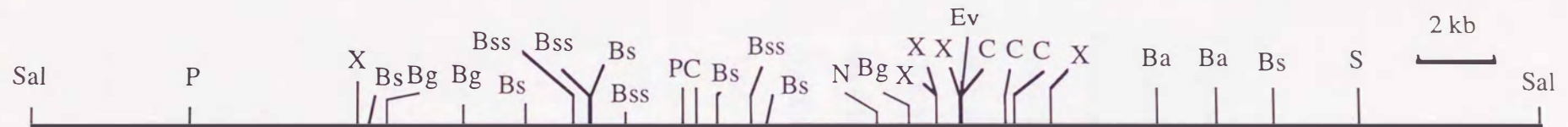


Figure 3. Western blotting analysis of autoclaved extracts of *A. actinomycetemcomitans* Y4 and *E. coli* transformants. (A) Immobilized antigens transferred to a nitrocellulose sheet by an electrophoretic blotting procedure were allowed to react with monoclonal antibody S5. (B) The antigens were allowed to react with monoclonal antibody L2. Lanes: 1, *A. actinomycetemcomitans* Y4 (positive control); 2, *E. coli* DH5 α containing pARF100; 3, *E. coli* DH5 α containing pMBLcos (negative control). Size markers are protein standards in kilodaltons.

用いて約38 kbの挿入断片の制限酵素地図を作製した(図4)。さらに、約38 kbの挿入断片を制限酵素を用いて切断し、セルフライゲーションさせて、様々な長さの断片を持つ数種類の欠失プラスミドを作製した(図4)。pARF210は、pARF200を*SacI*で切断した後、セルフライゲーションして作製した。pARF102は、pARF100を*BamHI*で切断後、セルフライゲーションして作製した。pARF303は、pARF100を*NheI*で切断後、セルフライゲーションして作製した。pARF304は、pARF100を*BglIII*で切断しセルフライゲーションして作製した。pARF220は、pARF200を*PstI*で切断した後、セルフライゲーションして作製した。pARF211は、pARF210を*BssHIII*と*PstI*で切断し末端を平滑化した後、セルフライゲーションして作製した。pARF213は、pARF210を*EcoRV*と*PstI*で切断し末端を平滑化した後、セルフライゲーションして作製した。pARF212は、pARF210を*Clal*と*PstI*で切断し末端を平滑化した後、セルフライゲーションして作製した。pARF300は、pARF210の*XbaI-SacI*断片を、同じ制限酵素で切断したベクタープラスミドpHSG399(Takeshitaら、1987)に挿入して製作した。新たに作製した上記の9個のプラスミドまたはpARF100をそれぞれ保持する*E. coli* DH5 α 株のオートクレーブ抽出抗原と、モノクローナル抗体S5を用いてゲル内沈降反応を行ったところ、pARF100、pARF210、pARF220およびpARF211のプラスミドを保持する*E. coli* DH5 α 株のオートクレーブ抽出抗原とモノクローナル抗体S5は沈降線を形成した(図5)。

さらに、*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAを発現させるために必要な領域の3'末端を詳細に調べるために、2つのプラスミドを作製した。

pARF301は、pARF300を*BamHI*で切断し、セルフライゲーションして作製した。一方pARF302は、ARF300を*BspHI*と*SacI*で切断し末端を平滑化した後、セルフライゲーションして作製した。pARF102を保持する*E. coli* DH5 α 株をpARF300、pARF301あるいはpARF302で形質転換したところ、pARF102とpARF300を同時に保持する*E. coli* DH5 α 株と、pARF102とpARF302を同時に保持する*E. coli* DH5 α 株から得られたオートクレーブ抽出抗原は、モノクローナル抗体S5と沈降線を形成したが、pARF102と



Fragment	SPA production
pARF100 (38-kb <i>SalI</i> fragment)	+
pARF210 (33-kb <i>SalI-SacI</i> fragment)	+
pARF102 (30-kb <i>SalI-BamHI</i> fragment)	-
pARF303 (17-kb <i>NheI-SalI</i> fragment)	-
pARF304 (16-kb <i>BglII-SalI</i> fragment)	-
pARF220 (22-kb <i>PstI-SalI</i> fragment)	+
pARF211 (15-kb <i>BssHIII-SacI</i> fragment)	+
pARF213 (10-kb <i>EcoRV-SacI</i> fragment)	-
pARF212 (8.6-kb <i>ClaI-SacI</i> fragment)	-
pARF300 (7.7-kb <i>XbaI-SacI</i> fragment)	-
pARF102 and pARF300	+
pARF102 and pARF301 (<i>BamHI</i> deletion of pARF300)	-
pARF102 and pARF302 (5.5-kb <i>XbaI-BspHI</i> fragment)	+

Figure 4. Restriction map and deletion analysis of pARF100. A linearized restriction map of the chromosomal 38-kb *Sall* fragment containing the SPA gene cluster is shown. The open arrows indicate the positions of ORFs. The horizontal lines below the map show the DNA inserts carried by the recombinant plasmids. Production of *A. actinomycetemcomitans* SPA in *E. coli* DH5 α is shown to the left of each fragment as follows: +, positive production of SPA; -, undetectable production of SPA. Production of SPA in each transformant was assayed by immunodiffusion analysis. Restriction enzyme abbreviation: Ba, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; Bs, *Bsp*HI; Bss, *Bss*HII; C, *Cla*I; Ev, *Eco*RV; N, *Nhe*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sal, *Sal*I; X, *Xba*I.

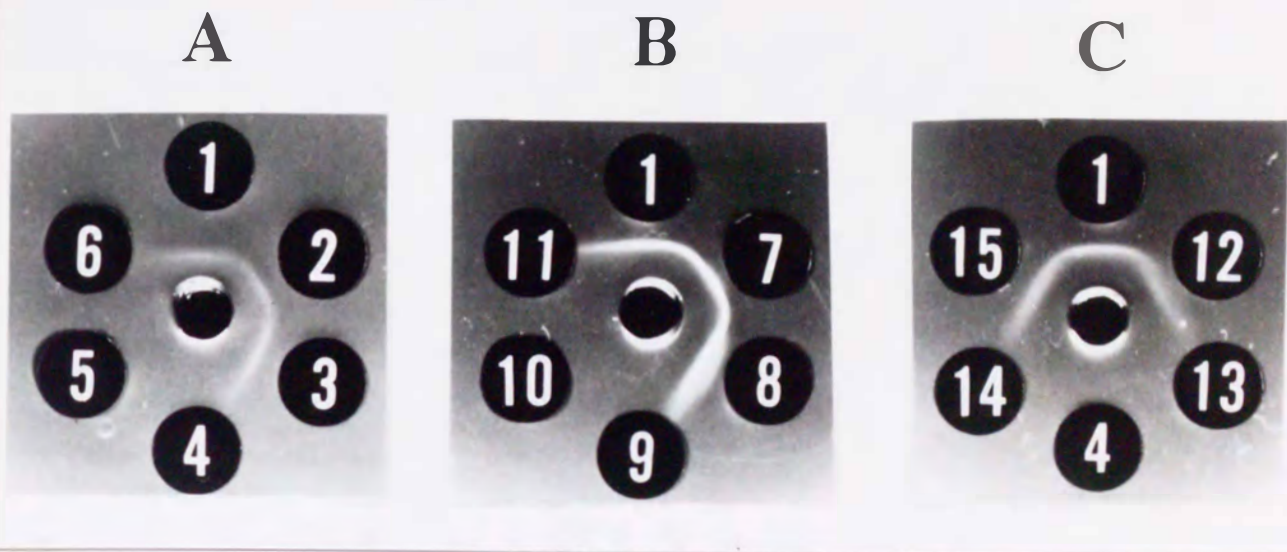


Figure 5. Immunodiffusion reaction of MAb S5 with autoclaved extracts prepared from *A. actinomycetemcomitans* Y4 and *E. coli* transformants. The center wells contain monoclonal antibody S5. The outer wells contain the autoclaved extracts from *A. actinomycetemcomitans* Y4 (well 1), *E. coli* DH5 α containing pARF100 (well 2), *E. coli* DH5 α containing pARF210 (well 3), *E. coli* DH5 α containing pARF102 (well 4), *E. coli* DH5 α containing pARF304 (well 5), *E. coli* DH5 α containing pARF303 (well 6), *E. coli* DH5 α containing pARF220 (well 7), *E. coli* DH5 α containing pARF211 (well 8), *E. coli* DH5 α containing pMBLcos (well 9), *E. coli* DH5 α containing pARF213 (well 10), *E. coli* DH5 α containing pARF212 (well 11), *E. coli* DH5 α containing both pARF102 and pARF300 (well 12), *E. coli* DH5 α containing pARF300 (well 13), *E. coli* DH5 α containing both pARF102 and pARF301 (well 14), and *E. coli* DH5 α containing both pARF102 and pARF302 (well 15).

pARF301を同時に保持する*E. coli* DH5 α 株から得られたオートクレーブ抽出抗原は、モノクローナル抗体S5と沈降線を形成しなかった（図5）。なお、pARF300、pARF301またはpARF302はクロラムフェニコール耐性遺伝子とColE1複製開始領域を含むプラスミドであり、アンピシリン耐性遺伝子とP15A複製開始領域を含むpARF102と同時に*E. coli* DH5 α 株内で安定に維持された。

pARF100とpARF102に存在する遺伝子群はベクターpMBLcosの*lac*プロモーターと同じ方向に位置しているが、pARF210の遺伝子群はpMBLcosの*lac*プロモーターと反対の方向に位置している。にもかかわらず、pARF100を保持している*E. coli* DH5 α 株と同様にpARF210を保持している*E. coli* DH5 α 株もSPAを合成していたので、pMBLcosの*lac*プロモーターとは異なるプロモーターがpARF210の挿入断片上に存在することが示唆された。図4と図5に掲載したプラスミド上のその他のORFと*lac*プロモーターの方向について述べると、pARF300、pARF301およびpARF302に存在する遺伝子群は、ベクターpHSG399（Takeshitaら、1987）の*lac*プロモーターと同じ方向に位置している。しかし、pARF220、pARF211、pARF213およびpARF212に存在する遺伝子群はpMBLcosの*lac*プロモーターと反対の方向に位置している。また、pARF303とpARF304に存在する遺伝子群はpMBLcosの*lac*プロモーターと同じ方向に位置しているが、*lac*プロモーターの一部が欠如している。そこで、pARF220、pARF211、pARF213、pARF212、pARF303およびpARF304の挿入断片をpMCL200（Nakanoら、1995a）にサブクローニングして、遺伝子群と完全な*lac*プロモーターとの方向を一致させたプラスミドを製作した。それらのプラスミドを保持する*E. coli* DH5 α 株の形質転換株のオートクレーブ抽出抗原と、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAに特異的なモノクローナル抗体S5を用いて行ったゲル内沈降反応では、沈降線形成の有無は遺伝子群と*lac*プロモーターの方向とは無関係だった（データ省略）。以上の結果から、*E. coli* DH5 α 株内でSPAの合成に不可欠の領域は、pARF211内の13 kbの*Bss*HII-*Bsp*HI断片に含まれていることが明らかとなった（図4）。

4. *E. coli* DH5 α 株内でSPAの合成に不可欠な領域およびその周辺領域の塩基配列の決定とその解析

E. coli DH5 α 株内でSPAを合成するために不可欠な領域とその周辺領域を含む約25 kbの *Xba*I-*Sac*I断片を適当な数種類の制限酵素で7つの断片に分割し、pMCL200、pMCL210 (Nakanoら、1995a) またはpHSG399 (Takeshitaら、1987) にサブクローニングした。得られたサブクローンからデリーションプラスミドを作製した後、塩基配列の決定を行った (図6)。決定した塩基配列は、国際的なデータベースであるDDBJに登録した (登録番号: AB002668)。

塩基配列を決定した25 kbの *Xba*I-*Sac*I断片中に、24個のオープンリーディングフレーム (ORF) が見つかり、それらはすべて同方向に存在していた。さらに、これらのORFはORF22を除いて、互いに20 bp以内で近接していた (図7)。すべてのORFのすぐ上流部には、Shine-Dalgarno配列 (ShineとDalgarno、1974) に相当する配列が確認された。24個のORFのうち、8つのORF (ORF2、ORF7、ORF8、ORF12、ORF13、ORF18、ORF19およびORF23) の開始コドンがその直前のORFの終止コドンと重なって位置しており、9つのORF (ORF3、ORF5、ORF9、ORF11、ORF14、ORF15、ORF16、ORF17およびORF20) の開始コドンがその直前のORFの終止コドンから10 bp以下の下流に位置していた。しかし、ORF22の開始コドンとORF21の終止コドンは541 bp離れており、他のORF間距離と比較して極めて長かった。開始コドンとして使用されていると考えられるコドンとして、GTGがORF4において1度使用されており、残りの23個のORFはATGが使用されていた。終止コドンとしては、TAAが18回、TAGが5回、TGAが1回それぞれ使用されていた。塩基配列を決定した全領域における平均G+C比は37.7%であり、中央部のORF10からORF19までの領域の平均G+C比は27.0%と極端に低かった (図7)。

続いて、それぞれのORFから推定されるアミノ酸配列に基づいて、相同性の検索を行った。その結果、16個のORFのアミノ酸配列が、これまで報告のあった配列と相同性があることが明らかになった。それらのほとんどが (ORF3、ORF4、ORF5、

5' TCT AGA CCA AAA CCC GGA TAA CTG ATG TTT TAA AGG TTC AGG ATT GCC TAA GCC 54
TTC GAA AGG TGA TCT GGT AAT ATT TTG GAT AAG TTT ATT AAT GCG CAA CAA CGT 108
CTT TTT ATC AAC TTG CTG CCA ATA AAG ATA ATC TTC CCA GGC GGT TTC CGT CCA 162
AGC TAA AAT CAT TCC TGG AGT TCC CGT TCG ATG ATT TTA CCT GAA TTG AGC TGG 216
TCA ATA GAG GCT AAT AAA CGC TCT CTA TTT TTG GGG CTG CGT AAT AAA TAA GCC 270
GTT TCT TCG TAA GCT GCG AAA TCT TCT AAA CTC ATT ACA ACA GCG TGT TTG CCA 324
TTT TGT CTG GTA ATC ATG ACT GGG CTA TGA TCT GCT ACC ACC TGA TCA AGT GTG 378
GTT GCC AAT TCT GCA CGA AAC GCA GAA TAA CTT ATT ACA TTC ATG TTA TTC TCC 432
TTA ATA AAA ACA TTG TAC AAA TTA TTG CAC AAT AAA AAG ATG TGC TCA ATA AAA 486
AAG CAC ACA TTT TAT GAT GTA TGC TTT CTG AAT ATG ATT TCT ACT TAT TTA TAA 540
AAC GTC ACA AAA TCC AAC CCT TTG GTC CAT AAA TTG GCG TAC CGT TAT TTT TGC 594
CGT AGT GTT ATC GCA GAC GAC ATT AGG GAT TTC CAA CAG GCT GGA GAA TAT ATG 648
TCC GTG CAG GCG GGT GGT GGT GAT GTT GTC GTA GCC GAG AAA ATC CTG CGC CAC 702
GCG TTT TAC AAT GCG CAG GGT GTA ATT TTT CCA GAC GAA CTG GAC GAG ATC TTT 756
TAA CCA GCA TAG TCG ATA TTT GTT GGC AAA TTT GGC TAA ACG CCA GCT TAG CGC 810
GAG AAC CAG GCT GTC GCG TTT GGA TAA GAT GTC ATC CCA GTC TTT AAT ATG GCT 864
ACC GGC AGG TAA TTG TGC GGT GAT GTT TTT TTC AAT GTC GCT GGC TTC AAT GTC 918
TTT GCG GAG AAA ATA CAG AGC TTT TCC GGT GTG TGT GTT TTT GGT AGG CAA GGT 972
ACC ATA CAG TTC GTG AGC CAT GTC CGG CGA TAA ATA CAC ATT TGG GGA AAA CGC 1026
TTC AAA GGC TTT TGC CGT AGC GTT CGT CCC GCG CCA ACA AAT GGC AAT CGG GAT 1080
GCT GGC GGA AAA GTG CGG TGG ATT TTT CCA GTG TTT TTG GGT TTT TAT AGA ACA 1134
GGG TTT GTG GCA AAA CAA TGA TGC GGT TGT TCG GGA ATG TTT GCA CAA TGG CTT 1188
CGC GCA GAT TTT GAT GTT GCG GGT AAA GAT CGC CGA AAT TAC CGC CGC CAT GCA 1242
GTA AAA TCG TGG TAT TCG GTG TGA TTT TTT GTT TGA TTT CGT CAA TAT TCG TAT 1296
CGT ATT CGC TAC GTT TTA ACC TCA CAT GAA TGT TGT GAT CGG TAA AAA ATT GTT 1350
CCG TTC CGT GAT AAA TCA ATA AAT CGC CCA CAT TTA AAT GTA ACG GAT AAT CCA 1404
GAT AAA ACA CGT CAT TTT TAT CTT TGA TTA AAT CCG CAA TGG GCG CCA CTT ATG 1458
TTT TAA ATC AAT AAG TTG TTG ATT CAT TTT CTC ACT CTT TTC AGT AAA TAG CTA 1512
AAT AAG ACG TTT TTT TCT GCT TTG TTT AAT CCG ATG AGC AGG ATG AGT GCA AAC 1566
AGA ACG ATT TCA ATA AGG ATG GCT TCG CCG ATA AAT TCC ACG AGG GAA TAC GTG 1620
CGT TGC GTG TTC GAT AAA TAA ATT AAA CCC AAT AAA AAG GCA AAA ATA ATG CCG 1674
ATA TTC AGT AAG TAT GAG ACA AAT TCT TTT CGA TTA AAT TTA ATT TTG TTG TTA 1728
ATA AAA TAC AGA CGG TAA ATT TGC ATG AGT GAG GCG GTG CAG AAT TTG CCG ATG 1782
AAC GCA AAC ACC GGA TTG TAG CCC AGT GTG AAT AAA TAA TAG GCG AGC GGT ACG 1836
GTG CAC AGG TCA ATG GTT GCC AAA ACG ACG TTG TAT CGT TTG ATG GTG TGC GAA 1890
CCG ATG GCA AGC GCC GTC ATC CAG AAG GAA CCC GCC ATG GCG CTG ATT AAG GAA 1944
CAA ACA ATG GTG GCT TGC ACC AGT TTA TCG GAA TAT TGC GGC ACA TGA TCG CCC 1998
AGC CAA AGG GTG AGC AAT GTA TGG CTG AAA TAC AAC ACC GGC GCC GAT AAA ATG 2052
GCG ATT AAA TAG AAG GAA TAT TTT GAC GTG CCT AAA ATT AAC TTT TTG TTG CGA 2106
TCG TAG TCT TTC GCG GCG TAA GAC TGT ACC AGT TGC GGA TTG AAC GCC ACC TGG 2160
AAA TTA TTG ACG AAA CTG TAC ACC GCC GTA TCG ACT TGT GTG GCA ATG CCC ACG 2214
GCG GCA TTG GCG GTG ACG CGA AGA AGA GAT TGG TCA CCA TAT TTA AGC CTT GGG 2268
TGG AAC CCA CAT AAG CTA CCT GCC CCA CCA ACA TCC AGC CGG AAA AAC GCA TCA 2322
TTT CTT TGA TTT TGC CGA GAT CTT TTT GAA ACT GAA AGC GGG TTT CTG CGT GAA 2376
AGG CGT TGC GGG TGA AAC GAA AAT ACA GGG TGA AAA CCA ATA AAC TTA CGC ACA 2430
GCA GCA GTA AAC TGT AAG AAA TCA ATT TAT CGT GGT TTT CTA TTT GCG TGA GAA 2484
TAA AAA TTG CGC CCA GTT TTA AGC CGG TTT CCG CCA ACC CGA GCC AGG CAT AAA 2538
AGG ACA TTC GCT CAT GCG CCA CGA TCA TAG CGT TAA AGG GTA CTT TAA TGA TTT 2592
CCA CCA ACG CAA TGA GCA ATG CTA CCT GGT ACA CAA TGT TGG CGG CGT TCA TAC 2646
GCG GGG CGG GAA TGT TCA ATT TAT GAT TTA AAA ACC ATA ATC CTG CCG TTT CCG 2700
CCA GAA TCA CCA CGA CCA GCA TAA TAA ACA GGT GAT TCA AGA TGC TGA TGT TAA 2754
AAA CCT GAT TTA CTC TGC TTG AGT CGT TTG AGG CTT TTT CCA CGT TAA TAA AAC 2808
GCT GGG TGG TTG CCG TCA TAG TGC CGT TGA AAA ACG AAA ACA AAA TCA CCA CGC 2862
CCA TCA CAA TGG TGT AAA TCC CGA AAT CTT CTA CGC CGA GCA CCC GTA GCA CCA 2916
CGC GTG AAA TAT ACA GCA TGG CGC CCA TAT TGA AGA GCA TTC GGA TAT AAA GAA 2970
ACA GGG TGT TTT TTG CGA TGG TTT TGT TGG ACA TGA TGA GAA TTA ATC TTG ACC 3024
TTT TTC CGT AAA ATA GGT GGG GGA TTA TAG TTT TCT TTA GTA TAA TCA GCA ATC 3078
TAT TAT GTA ATT ATT TAG ACT TCG CAT AAT CAA ATA TAC AAC AGA TTT TAA TTG 3132
AGA TGA TTA TGA ATA AAT ATT TGG TTT CAC TAG ACA AAG ACG TTC AGC GTC GTG 3186

ORF1 M N K Y L V S L D K D V Q R R E

AGC TGT TTT TTG CAC AGC CCG GTA CGG CGG AAT TTT CGG TTT TCC CGG CAA TAA 3240
 L F F A Q P G T A E F S V F P A I N
 ATA CCA TGC AAA AGG ATT GGG ATG TGC TGT CGG CGG TGT TTA ATC CGG TCA AAT 3294
 T M Q K D W D V L S A V F N P V K F
 TTG AAC AGC ACT ACG GGC GTA AAG TAA CCA AAG GTG AAA TCG GTT GTA CTC TGA 3348
 E Q H Y G R K V T K G E I G C T L S
 GTC ATC TTG AGG TTT ACC GCC AAA TTG TCG CTG ATG AAA AGG TGG CGG AAA AGG 3402
 H L E V Y R Q I V A D E K V A E K D
 ATT ATG CCT TGG TGT GTG AAG ACG ATG CCC TGT TCA ATA AAA ATT TAC CTG AAA 3456
 Y A L V C E D D A L F N K N L P E N
 ATC TGA CCG CAC TTT TGG CGC AAC ATT GTA CGG CGG ACA TCA TCC TTA TCG GGC 3510
 L T A L L A Q H C T A D I I L I G Q
 AAT CCA AAA TTG CCG GAT TTG ATG ACA TGG AAC TGG AAA TCA ATT ATC CGA CCA 3564
 S K I A G F D D M E L E I N Y P T T
 CGT TTG CCT TTT TAC GCG CCA ATG TGG GTG CCG CCA CTT ATG CCT ATC CGT ATA 3618
 F A F L R A N V G A A T Y A Y P Y K
 AAA GCT ATT TTG CCG GCA CCG TGG CGT ATT TAA TCA AAA AAT CCG CTG CAC GGA 3672
 S Y F A G T V A Y L I K K S A A R T
 CGT TTC TTG CCA TTT TGG AAC AGG AAA AAC CGT TTT GGC TCG CTG ACG ATT TTC 3726
 F L A I L E Q E K P F W L A D D F L
 TGT TAT TTG AAA CCC AAT TTA AGC TGA ACA ATA ACG TGG TGC GCC CGT TGA TGG 3780
 L F E T Q F K L N N N V V R P L M V
 TAA TTG AAA ACC CAC AAC TGG TGA GTA ATT TGG AAG CCG TGC GCG GGT CGA AGT 3834
 I E N P Q L V S N L E A V R G S K S
 CCA ATA ATT TAG CGA AAA AAC TGC TGA AAT ACC CGT TGA AAA AAC TGT TAG CCG 3888
 N N L A K K L L K Y P L K K L L A V
 TGA AGA AGA ACT TAG GAA AAT AAC GAA AAA AAT GAC CGC ACT TTT TAA TCT GTT 3942
ORF2 M T A L F N L F
 K K N L G K *
 TTA CCT TTA TGA TCC TTG GTT CTT CCA TTT TTT GCG AAT GTC GCT CAT TGC CGG 3996
 Y L Y D P W F F H F L R M S L I A G
 GCT GAT TGC GCT GGC AGT GTT GGC GTA TCG GTT AGT AAA AAA ACG GCA AAC CAA 4050
 L I A L A V L A Y R L V K K R Q T N
 CGG CAT TAT CGT GCC GTT AGA CAG CCT TGC CGT ATT ATG CGG CTT GAT TCT GTT 4104
 G I I V P L D S L A V L C G L I L F
 CAG TGT GAT CCC CTT GTT GGT TAA CGG CAC GCG GGA TCT TTC CGT CAT CAT GAT 4158
 S V I P L L V N G T R D L S V I M M
 GTA CGT GAA GGG CTT TGT GTT ATT TGT TTT GGG CAT CGG CAT CTA TAA CGT TTT 4212
 Y V K G F V L F V L G I G I Y N V F
 TTA TGC AGA TGC CCA CGG TCA GCA AAG AAT GGT GCG GGA TCT GCA AAT CGG CGT 4266
 Y A D A H G Q Q R M V R D L Q I G V
 GGT GAC GCA GTT CGT TCT GGG CTT ATT GGC GCT TTT CGG CGT GTC TTT TAT AAT 4320
 V T Q F V L G L L A L F G V S F I I
 TGA TTT CCT GCT TGC CAC GAA CGC GCT GCT GCC GGC GCG GTT TTA TGG TTC CGA 4374
 D F L L A T N A L L P A R F Y G S E
 ACA GGA ATA TCG CTT ATA TAA CGT GAC ATC GGC GGC TTT TTT CCA GCT AAG TTT 4428
 Q E Y R L Y N V T S A A F F Q L S L
 GTT CTA TTT AAT GCT GTT TCA TTT TCT GCT TGC CTA CAA CGC GAA ACA TAA CCG 4482
 F Y L M L F H F L L A Y N A K H N R
 CAT TCC AAG TTT GAT TAT CTT CTT TAT GTT GTG CAT CGG TTT GAT TTC CGG CAG 4536
 I P S L I I F F M L C I G L I S G R
 AAC CTT TTT GCT GCT TTC GGC GGT GAG CAT TTT GTT GTA CTT CAA AGT GCG GTA 4590
 T F L L L S A V S I L L Y F K V R Y
 TAT TCC GGT AGT GAT TTC GTT TGC CGT TTT GCT GCT ATT GTT GGC GTA TTT CCT 4644
 I P V V I S F A V L L L L A Y F L
 GCC GGG TAA TAA ATA TGT GGC GCA CGC CTT GGA GCC GGT GAT TAA TGT GTT ACA 4698
 P G N K Y V A H A L E P V I N V L H
 TGG TGC GGG CTT TGT CAG TTC TTC GAC AGA TAC GTT AGT GGA AAA ACA TTT ATT 4652
 G A G F V S S S T D T L V E K H L F

TAT GCC GAC ATT AAA ACA ATT TAT TTC CGG CGA CGG GCT TTA TAT GAC GGG GCA 4806
M P T L K Q F I S G D G L Y M T G Q
AAC GGA AGT GGG ACG TTA TTA CGG TCA CAC AGA TTC CGG GTT CTT GCG TCA GAT 4860
T E V G R Y Y G H T D S G F L R Q I
TTT GTA CGG CGG CGT GAC TTA TGC GCT GGT GTG TTT TTT AGT GAC TTT CTA TTT 4914
L Y G G V T Y A L V C F L V T F Y F
TGT GCG TAA AGT GGC GAT AAA TTG GTT TGA CGG CAG TTG GAA ATT CAT GCT TTC 4968
V R K V A I N W F D G S W K F M L S
CGC CTT TGT GAT TCT CGC CGC CTG CAA CGT GAA AGC CGA CAC TTT CGC TTT CCC 5022
A F V I L A A C N V K A D T F A F P
GGG CAT TAT GTT TGT AAT GTT GAT GTT CTT CTC TTT ATT TGG TTC ACA TGG CAA 5076
G I M F V M L M F F S L F G S H G K
ACA ACT TGT GTT ATT TAA ACA AAA GGA GGC GAA ATA ATG TTC AGT ATC ATC GTT 5130

ORF3

M F S I I V
Q L V L F K Q K E A K *
CCT TCT TAT AAT CGC AAA GAG GAA ATG CCC GCG CTG TTG GAA AGT TTA AGC CAA 5184
P S Y N R K E E M P A L L E S L S Q
CAA ACT GCG CAT GAT TTT GAA GTG GTG GTT GTG GAC GAT TGC TCG AAA GAA CCT 5238
Q T A H D F E V V V V D D C S K E P
GTT ACA GTG GTG CAA AAT TAT CCT TTC CCC GTG CGG GTG ATT CGC AAC GAA ATC 5292
V T V V Q N Y P F P V R V I R N E I
AAT CAG GGC GCG GCG GAA AGT CGC AAT ATC GGT GCG CGC CAT GCA CAA CAT GAC 5346
N Q G A A E S R N I G A R H A Q H D
TGG TTA TTG TTT TTA GAC GAT GAC GAT CGT TTC GCT AAT GAT AAA TGT GAA AAA 5400
W L L F L D D D D R F A N D K C E K
TTG GCA GCG ATG ATT GCC GAT CAT GCC GAC ATT AAC TTT ATC TAT CAC CCG GCG 5454
L A A M I A D H A D I N F I Y H P A
AAA TGC GAA ATG GTG AAT GAA GGC TTT ACT TAT GTC ACG CAT CCC ATT GAT CCG 5508
K C E M V N E G F T Y V T H P I D P
CAA CAT ATC AGC ATT GAA AGC ATT TTG TTG GCG AAT AAA ATC GCG GGT ATG CCG 5562
Q H I S I E S I L L A N K I G G M P
ATG ATC GGC GTG AAG AAA GAT TTG TTC TTA AAA ATA GGC GGA TTA TCC ACC GCA 5616
M I G V K K D L F L K I G G L S T A
CTT CGT TCT TTG GAA GAT TAT GAT TTT CTG TTG AAA TTG TTG CAG GAG CCC GAA 5670
L R S L E D Y D F L L K L L Q E P E
TTC ACG CCT TGC AAG GTA AAT GAA CCG CTG ACC TAT TGC ACC TTC CAC ACC AAA 5724
F T P C K V N E P L T Y C T F H T K
CGG GCA AGC GTT TCC ACA GAT ACC ACC AAT ACG CAA AAA GCC ATT GAT TAT ATT 5778
R A S V S T D T T N T Q K A I D Y I
CGT GAG CAT TAT GTA AAA ACG CCG GAA CAG GCG CGC AAT TTC AAG ATT AAC GCC 5832
R E H Y V K T P E Q A R N F K I N A
AGT TAT ATT CTG GCT TAT CCG CAT ATC ATG AAT TTA TCC CGC AAA GCG GCG AAA 5886
S Y I L A Y P H I M N L S R K A A K
TAT TAT TTT GAT ATT TTT AAA CAG ACC AGA AGT CTG AAA CAA TTA ATT ATT GCC 5940
Y Y F D I F K Q T R S L K Q L I I A
TTG GTA GTG CTG ATT TCG CCT AAA TTG GCG ATT AAT TTG AAG CGG TTT ATG TAA 5994
L V V L I S P K L A I N L K R F M *
ATA GCG CAT TGA TTG TAT GCG TCT CCG GAT GTG TAC CAT TGA AAT TGA AGA AGA 6048
AAA GAG TAG AGT AGT TGG TAG TGA AAT TTT CAG TGT TAA TGT CCT TAT ATA TTA 6102

ORF4

V K F S V L M S L Y I K
AGG AAA ATC CAC AAT ATT TAA GAG AAT GTT TGG AAA GTT TGG TGG CAC AAA CCT 6156
E N P Q Y L R E C L E S L V A Q T C
GCC CTG CCG ATG AAG TCG TAC TGG TGT TTG ATG GCG CGG TGA CGC CTG AAT TGG 6210
P A D E V V L V F D G A V T P E L E
AAG CGG TGG TTG CCG AGT TTG AAT CGA AGC TGC CGT TTA ATT TGG TGA AAT TAC 6264
A V V A E F E S K L P F N L V K L P
CGA ACA ATT TAG GTT TAG GCA AAG CTC TCA ACG AAG GTT TAA AAT ATT GCT CGC 6318
N N L G L G K A L N E G L K Y C S R
GCG ATT GGG TTC TGC GCA TGG ATA CCG ATG ATA TTT GCG TGC CGG AAC GTT TTG 6372
D W V L R M D T D D I C V P E R F A

CCA AAC AGG TGG CGT TTA TTG AAC AAC ATC CTG ATA CTA TAG TGT TCG GTG GGC 6426
 K Q V A F I E Q H P D T I V F G G Q
 AAA TTG CCG AAT TCG GTG AAA ATA TCC ATG ACA TAG TGG CAT ATC GAA ATG TGC 6480
 I A E F G E N I H D I V A Y R N V P
 CGA CTT CTG CGC AAG ACA TCG TTA CAT TTA CCC AAA AAC GCT GCC CGT TTA ATC 6534
 T S A Q D I V T F T Q K R C P F N H
 ACA TGA CGG TGG CGT ATC AAA AAA GTG CGG TCA TAA ATT GCG GCG GAT ATG AGG 6588
 M T V A Y Q K S A V I N C G G Y E D
 ATT TAC AGG AAG ATT ATT ATT TGT GGA TCA AAC TGG TGG CGC AAG GGC AGC GCG 6642
 L Q E D Y Y L W I K L V A Q G Q R V
 TAG CAA ATT TAC CCG ATA TTT TGG TCT ATG CGC GCG TCG GCA ACG GCA TGG TAG 6696
 A N L P D I L V Y A R V G N G M V G
 GGC GAC GCC GTG GTT TAA ACC AAG CCA AAG CGG AAT GGC GCT TAT TTA AGC TAA 6750
 R R R G L N Q A K A E W R L F K L K
 AAC ACC ATC TTG GCA TTC AGG GAT TTT TAT CCG GGC TAT TCA CTT TTG TCC TGC 6804
 H H L G I Q G F L S G L F T F V L R
 GTT CCG GTG CCA GAT TAT TGC CGA CAT CAT TAC TGA AAA ACA TCT ATC AAA CCT 6858
 S G A R L L P T S L L K N I Y Q T F
 TTT TAA GAA AAT AAC ATG ATG AAA TTA AAC TGT ATT TTA AAA ATA TCC GGA ATT 6912
 ORF5 M M K L N C I L K I S G I
 L R K *
 TCC ACC GCA CTT TTT CTA GCG GGT TGT TCC TCA AAT TCA AGT GCG CCG ACG CAA 6966
 S T A L F L A G C S S N S S A P T Q
 TCC TCT GAG CAG GCG AAT TCT GTT ACG GCT GTG AAT CCC ACT GCG GTG TAC AGT 7020
 S S E Q A N S V T A V N P T A V Y S
 AAG CCC CGC ACT TTG GAT AAC TTC AAC GAT TAT GTG AAT TTC TTA AAA GGT AAA 7074
 K P R T L D N F N D Y V N F L K G K
 GCA GCG GCA GAA GGC GTT TCT GCC GAC GTA TTG AAT GCA CAA AAT AAT ATT AAT 7128
 A A A E G V S A D V L N A Q N N I N
 TAT ATT CAA AAA TCC GTG GAT TTG GAC GAT CAG CAA GCG GGC AGA ATT CGC AAG 7182
 Y I Q K S V D L D D Q Q A G R I R K
 CGT GAT CCA AAT GCC CCG CCG ATC ATC AAT CCG AAC GGC ACG ACC AAT TAC TTA 7236
 R D P N A P P I I N P N G T T N Y L
 AAT CGT GTA TTA ACC AAG AAT AAA GTA GAC ACG GCA GAA GCA CGT TAT TGG GAA 7290
 N R V L T K N K V D T A E A R Y W E
 CAA TTG CCG CAG CTT GAA AAT GCT TCA AAG AAA TTC AGC GTA CCG AAA AAT TAT 7344
 Q L P Q L E N A S K K F S V P K N Y
 CTG TTA GCC TTG TGG GGC ATG GAG AGT AGC TTT GGC TAT TAT CAG GGC AAT TAC 7398
 L L A L W G M E S S F G Y Y Q G N Y
 GAT GTG TTA TCC ACC TTA GCC ACT CTT GCT TTT GAC GGA CGC CGT GAA GCC TTA 7452
 D V L S T L A T L A F D G R R E A L
 TTC AGC AAA GAA TTC ATC GCC GCC ATG AAA ATG CTA CAG CGC GAT CAT ATT CAA 7506
 F S K E F I A A M K M L Q R D H I Q
 CGC TAT AAA ATG CTG GGT TCA TGG GCA GGC GCC ATG GGA CAG ACC CAA TTC ATG 7560
 R Y K M L G S W A G A M G Q T Q F M
 CCA AGC TCT TAC CTC AGC TAC GCC GCA GAT GGC AAC AAT GAT GGC GAG AAA AAT 7614
 P S S Y L S Y A A D G N N D G E K N
 ATC TGG ACC GAT CAT TAT GAT GTT TTC GCC TCC ATC GCT AAT TAT TTA CAC ACC 7668
 I W T D H Y D V F A S I A N Y L H T
 GTC GGC TGG AAC GAA AAC CTG CCA TGG GGT GTA GAA GTT GCA CTA ACC CAA CCG 7722
 V G W N E N L P W G V E V A L T Q P
 TTA GAC ATG GCG CTT GCT GGC ACA GAG GAA AAT AAA AAA CGT TCT TTA AGC GAC 7776
 L D M A L A G T E E N K K R S L S D
 TGG CAA AAT ATG GGT GTC ACC CTA AAA TAC CAA ACT CCA CAA ACA CAA CAA AAA 7830
 W Q N M G V T L K Y Q T P Q T Q Q K
 CTG ACC GCA CTT TCC GGC GCA CAA GAC TTA TGG CTG GTA AGG CCG GAT CGT GAA 7884
 L T A L S G A Q D L W L V R P D R E
 TTA GGG CGT GCA TTT TTG GTC TCT AAT AAT TAC AGA ACC TTG CTA CAT TGG AAT 7938
 L G R A F L V S N N Y R T L L H W N

AAA TCC AAC TAT TTT GCT GTG AGT ATT GGA ATG TTT GCT GAT AGG ATT GAG CAA 7992
K S N Y F A V S I G M F A D R I E Q
AGA GTC AAA TAG GCT TAA ACA TTT AAA ATT AGG TCA TTT TAT AAA GTT GTG AGA 8046
R V K *
TAA TTT TTT AAA CCT AGA GGG ATA ATT ATG TTG AAA ACT ATT TTA GTT ACA GGC 8100
ORF6 M L K T I L V T G
GGT GCA GGT TTT ATA GGT TCT GCA GTA GTT CGC TAT ATT ATT GAG AAT ACG CAA 8154
G A G F I G S A V V R Y I I E N T Q
GAC AGC GTA GTT AAC GTT GAT AAA TTG ACC TAT GCA GGA AAT TTA GAA TCT CTT 8208
D S V V N V D K L T Y A G N L E S L
GAA GCA GTG AAA AAT AAT CCA CGT TAT ATA TTT GAA CAA GTG GAT ATT TGC GAT 8262
E A V K N N P R Y I F E Q V D I C D
GCA AAA GCA CTT GCT CGC ATA TTT GAA CAG CAC CAG CCT GAT GCA GTA ATG CAC 8316
A K A L A R I F E Q H Q P D A V M H
TTA GCC GCA GAA AGC CAC GTT GAC CGT TCT ATT GAT GGA CCT GCT ACT TTT ATT 8370
L A A E S H V D R S I D G P A T F I
GAA ACT AAT ATC GTG GGT ACT TAC ATT TTA TTA GAA GCC GCC CGT GCT TAT TGG 8424
E T N I V G T Y I L L E A A R A Y W
AGT AGT TTA ATC GAT GAG AAA AAA GCA GGA TTC CGT TTC CAT CAT ATT TCG ACC 8478
S S L I D E K K A G F R F H H I S T
GAT GAA GTT TAT GGC GAT TTA GAT GGG ACG AAC AAT CTT TTT ACT GAA ACC ACG 8532
D E V Y G D L D G T N N L F T E T T
CCT TAT TCC CCA AGT AGT CCT TAT TCT GCA TCA AAA GCC TCC AGC GAT CAT CTT 8586
P Y S P S S P Y S A S K A S S D H L
GTT CGT GCG TGG TTG CGT ACT TAC AGC TTG CCA ACG ATT GTG ACC AAC TGC TCA 8640
V R A W L R T Y S L P T I V T N C S
AAC AAC TAT GGG CCG AAA GTG TTT CCG GAA AAA TTG ATT CCA TTG ATA ATT TTA 8694
N N Y G P K V F P E K L I P L I I L
AAC GCC TTA GAT GGC AAA CCG CTT CCT GTG TAT GGT AAC GGC CAG CAA ATT CGT 8748
N A L D G K P L P V Y G N G Q Q I R
GAC TGG CTA TTT GTA GAG GAT CAT GCT CGT GCT TTA TAC AAA GTT GTG ACA GAA 8802
D W L F V E D H A R A L Y K V V T E
GGC AAA ATT GGA GAA ACC TAC AAT ATC GGT GGT CAC AAT GAA AAA GCG AAC ATT 8856
G K I G E T Y N I G G H N E K A N I
GAT GTA GTT CGC ACC ATC TGT GCT TTA TTA GAA GAA CTG GTT CCA GAT AAA CCT 8910
D V V R T I C A L L E E L V P D K P
GCT GGC GTT ACC AAA TAC GAA GAT TTA ATC ACT TAC GTT AAA GAC CGC CCT GGT 8964
A G V T K Y E D L I T Y V K D R P G
CAT GAT GTG CGT TAT GCC ATT GAT GCA ACC AAA ATC AGT CGT GAA TTA GGC TGG 9018
H D V R Y A I D A T K I S R E L G W
AAA CCG CAA GAA ACC TTT GAA TCA GGC ATT CGT AAA ACG GTG GAG TGG TAT CTA 9072
K P Q E T F E S G I R K T V E W Y L
AAT AAC CGA AAA TGG TGG AGC CGT GTG TTA GAT GGT TCT TAC AAT CGT GAG CGT 9126
N N R K W W S R V L D G S Y N R E R
TTA GGC AGT CAA TAA TTT TAC AAA CGG TTG GAT TTT AGC TCT TTT TCG CAA AAA 9180
L G S Q *
CAA CAC TAA ATA TGA CTG TAC TTT TTG AAG GTC TTT TTA TGA AGG GTA TTA TTC 9234
ORF7 M K G I I L
TTG CAG GTG GTT CTG GAA CTC GCC TTT ATC CTA TTA CTC GTG GTG TAT CAA AGC 9288
A G G S G T R L Y P I T R G V S K Q
AGC TTT TAC CTG TCT ATG ACA AAC CAA TGA TTT ACT ACC CCC TTT CTG TGC TGA 9342
L L P V Y D K P M I Y Y P L S V L M
TGT TAG CGG GGG TCC GTG ACA TTC TTA TTA TTA CTA CGC CAG AAG ATA ACG AAA 9396
L A G V R D I L I I T T P E D N E S
GTT TCA AAC GTT TGT TAG GTG ATG GTT CTG AAT TTG GTG TGA ATT TAC AAT ATG 9450
F K R L L G D G S E F G V N L Q Y A
CTA TTC AAC CTA GCC CGG ATG GCT TAG CAC AAG CAT TTC TCA TTG GGG AAG GGT 9504
I Q P S P D G L A Q A F L I G E G F
TTA TCA ATG GCG ATA GCT GTT GTT TAG TAT TAG GAG ATA ACA TTT TCT ATG GTC 9558
I N G D S C C L V L G D N I F Y G Q

AGA ATT TTA CCC AAA TGT TGC AGC AAG CTG TTG CTC GAC CTT ACG GTG CAA CAG 9612
 N F T Q M L Q Q A V A R P Y G A T V
 TGT TTG GAT ATT TAG TAA AAG ATC CTG GGC GTT TCG GTG TGG TGG AAT TTG ACG 9666
 F G Y L V K D P G R F G V V E F D E
 AAA ATT TCA AAG CTG TTT CTA TTG AAG AAA AAC CTG CTC AAC CTA AAT CTA ACT 9720
 N F K A V S I E E K P A Q P K S N Y
 ATG CTG TAA CAG GTT TAT ATT TCT ACG ATA ATC GTG TGG TCG ATT TCG CGA AAC 9774
 A V T G L Y F Y D N R V V D F A K Q
 AGG TGA AAC CAT CTG CGC GCG GTG AGC TTG AAA TCA CCA CAT TAA ATG AAA TGT 9828
 V K P S A R G E L E I T T L N E M Y
 ATC TAA AAG ATG GTT CAT TAA ATG TGC AAT TAC TCG GTC GTG GTT TTG CGT GGT 9882
 L K D G S L N V Q L L G R G F A W L
 TAG ACA CAG GAA CGC ACG AAA GCC TAC ACG AAG GGG CAT CTT TCG TTC GCA CTG 9936
 D T G T H E S L H E G A S F V R T V
 TTG AAA GCG TAC AAG GTT TGC AAG TTG CAT GTT TGG AAG AAA TTG CCT GGC GTA 9990
 E S V Q G L Q V A C L E E I A W R N
 ATG GTT GGC TAA CTT CTG AGC AAG TAG AAA CAT TAG CGA GAC CAA TGG TAA AAA 10044
 G W L T S E Q V E T L A R P M V K N
 ATG AAT ACG GTC AAT ACT TGC TAC GTT TAA TCA ACG AGG AGA AAT AAA TGG CAA 10098
 ORF8 M A K
 E Y G Q Y L L R L I N E E K *
 AAT TTC TGA TTA CAG GCG CAA ACG GGC AAG TGG GCT ACT GTT TAA CCC AAC AAT 10152
 F L I T G A N G Q V G Y C L T Q Q L
 TGC AAG GCA AAC ACG AAA TTT TAG CCG TCG ATC ATG ATG AGC TTG ATA TTA CAA 10206
 Q G K H E I L A V D H D E L D I T N
 ACC AAA ATG CGG TGA AAA AAA CGG TCG AAA ATT TTC GTC CTG ATG TAG TTA TCA 10260
 Q N A V K K T V E N F R P D V V I N
 ACG CCG CAG CAC ACA CTG CGG TAG ATC GTG CAG AAA CTG AAA TTG AGC TTT CCG 10314
 A A A H T A V D R A E T E I E L S E
 AGG CCA TTA ATG TAA AAG GTC CGC AAT ACT TGG CGG AAA CCG CGA AAA GTG TTG 10368
 A I N V K G P Q Y L A E T A K S V G
 GTG CAG CAA TTT TAC ATA TTT CAA CAG ACT ATG TTT TTG ACG GGC GGC GTG CAG 10422
 A A I L H I S T D Y V F D G R R A G
 GTA AAT ACA AAG AAA CTG ATG CAG TCG ATC CGC AAG GTA TTT ACG GCA AAA CCA 10476
 K Y K E T D A V D P Q G I Y G K T K
 AAC TAG CGG GCG AAC AAG CCG TTG TAG AAG CAA ACG ATA AAT TTA TCG TAT TGC 10530
 L A G E Q A V V E A N D K F I V L R
 GTA CCG CTT GGG TAT TCT GCG AAC ACG GCA GCA ATT TCG TTA AAA CAA TGC TGC 10584
 T A W V F C E H G S N F V K T M L R
 GTT TAG CCA AAA CTC GTG ACA CTT TAG GCG TAG TTG CTG ATC AGA TCG GCG GAC 10638
 L A K T R D T L G V V A D Q I G G P
 CGA CCT ATG CAG GAG ATA TTG CCG CTG CGT TAA TTC AAA TTG CAG AAA AAA TCA 10692
 T Y A G D I A A A L I Q I A E K I I
 TTG CAG GCG AAT CTG TTG AAT ATG GTA TTT ATC ACT TTA CGG GGG AAC CTT ATG 10746
 A G E S V E Y G I Y H F T G E P Y V
 TCA GCT GGT GTG ATT TTG CCA GAG CAA TTT TTG ATG AAG CTG TTT CGC AAA ATA 10800
 S W C D F A R A I F D E A V S Q N M
 TGT TAG AAA AAG CAC CGC TTG TCA ATG CAA TTA TCA CGG CGG ATT ATC CAA CAC 10854
 L E K A P L V N A I I T A D Y P T P
 CAG CCA AAC GCC CTG CGA ATT CTT GCT TAG ATT TGA CCA AAA TTC AAC AAG CAT 10908
 A K R P A N S C L D L T K I Q Q A F
 TCG GTA TCC AAC CAA GTG ATT GGC AAA GAG CTT TGA AAA ATA TTA AAG CGT ATG 10962
 G I Q P S D W Q R A L K N I K A Y A
 CGG AGT AAA GAT GAA AGT TAT TGA TAC TAA AAT TCC CGA TGT AAA ACT ATT AGA 11016
 ORF9 M K V I D T K I P D V K L L E
 E *
 ACC ACA AGT GTT CGG TGA TGA ACG CGG TTT CTT TAT GGA AAC TTT CCG TGA TGA 11070
 P Q V F G D E R G F F M E T F R D E
 ATG GTT TAG AAA AAA TGT AGC AGA TCG CAT ATT TGT ACA AGA AAA TCA TTC AAA 11124
 W F R K N V A D R I F V Q E N H S K

ATC CAT CAA AGG CGT GTT ACG CGG TTT ACA TTA TCA AAC AGA AAA TAC ACA AGG 11178
 S I K G V L R G L H Y Q T E N T Q G
 CAA ATT AGT TCG TGT TAT TTC TGG TGC GGT ATT TGA TGT GGC TGT GGA TAT GCG 11232
 K L V R V I S G A V F D V A V D M R
 TGG AAA CTC GTT AAC TTT TGG GCA ATG GGT AGG TGA AAT CTT ATC TGC CGA GAA 11286
 G N S L T F G Q W V G E I L S A E N
 TAA GCA CCA ACT ATG GGT GCC GGA AGG TTT TGC TCA CGG TTT TTA TGT GTT GAC 11340
 K H Q L W V P E G F A H G F Y V L T
 AGA TGA AGC TGA ATT TAC TTA TAA ATG TAC GGA TTA CTA CAA TCC AAA AGC CGA 11394
 D E A E F T Y K C T D Y Y N P K A E
 ACA TTC ACT GAT TTG GAA TGA TGA AAC GAT TGG TAT TGA ATG GCC GCT TTA TGG 11448
 H S L I W N D E T I G I E W P L Y G
 TGA ACC GAG TTT ATC GGC TAA GGA CTT AGC AGG TAA AGT ATT GGC AGA AAC GGT 11502
 E P S L S A K D L A G K V L A E T V
 AAA ATT TTA ATT AGT AAA TTA CTC TTA GCA TAG ATT AAT TAG TAT GAT TAA ATT 11556
 K F * **ORF10** M I K F
 CTT ATT AGA TAA AAC AAA TAA TTT TTT TTC CTA CAG AGA GCT ATT TAA ACA ACT 11610
 L L D K T N N F F S Y R E L F K Q L
 AAT TTA TAG AGA TAT TAA ATT AAA ATA TAG ACG TAG CTA TCT AGG GTA TCT ATG 11664
 I Y R D I K L K Y R R S Y L G Y L W
 GAG CAT TTT AAA TCC ATT AAT GGT AAT GTT TGT TTT ATT AAT TGT TTT CTC TAA 11718
 S I L N P L M V M F V L L I V F S N
 TTT ATT TAA ATT TGA TAT TCC GAA TTT TTC CTT ATA TCT TTT ATC TGG ACA AAT 11772
 L F K F D I P N F S L Y L L S G Q I
 ACT ATT TAA CTT TAT GGT TGA AGC AAC CAC ACT ATC TGT AAG TTC CAT AAC AGG 11826
 L F N F M V E A T T L S V S S I T G
 TAA CGG TTC ATT GCT AAA AAA GAT ATA TGT ACC AAA ATA TAT TTT CAC CAT ATC 11880
 N G S L L K K I Y V P K Y I F T I S
 TAA AGT TGG AAG TTC ATT AGT AAA TCT AAT TTT TTC ATT TGG CGC ATT GCT AAT 11934
 K V G S S L V N L I F S F G A L L I
 TGT AAT GCT GTT TAC TGA CGC AAA TTT CTC AAT AAA TAT TCT TTT TAT ACC TTT 11988
 V M L F T D A N F S I N I L F I P F
 TAT TCT ATT GCA AAT ATT TAT TTT TAG TTT AGG ATT AGG ATT ATG GTT AGC CTC 12042
 I L L Q I F I F S L G L G L W L A S
 TAT TTC TGT TTT TTT TAG GGA TAT TCA GTA TCT CTG GGG AGT TTT CTT AAC AAT 12096
 I S V F F R D I Q Y L W G V F L T M
 GTG GAT GTA TCT TAC GCC TAT ATT TTA TCC TGT TTC AAT TAT ATC AGA GAG CTA 12150
 W M Y L T P I F Y P V S I I S E S Y
 TCA AGC TAT TTA TAA AAA TCT TAA CCC TAT GTT CTC ATA CAT AGA ACA ATT TAG 12204
 Q A I Y K N L N P M F S Y I E Q F R
 ACA AAT TGT TTT ATT TTC AAA ATT TCC AGA AAC AAA TTT TAT TTT ATT AGG CAT 12258
 Q I V L F S K F P E T N F I L L G I
 ATT TTT TTC TTT GAT AAC ATT GTT TTT AGG TAC TTG GTA TTT TAA CAA GAA ACA 12312
 F F S L I T L F L G T W Y F N K K Q
 AGA TGA ATT TAT ATT GTA CAT ATA GCT ATG AAT ACA GAA ATA ATT AAC GTT GAA 12366
ORF11 M N T E I I N V E
 D E F I L Y I *
 AAT GCT ACT GTT CGC TTT AAT AAA GCA ATG GAA AAT TAT AGC GGC TTA AAA GAC 12420
 N A T V R F N K A M E N Y S G L K D
 TAC ATT ATA AAA ATG CTA AAA GGA AAG TTA ATG TTC CAA GAA TTT TTA TCA TTA 12474
 Y I I K M L K G K L M F Q E F L S L
 AAT GAT GTT TCT TTT AAA GTT AAA AAG GGT GAA TCT TGG GGA TTG ATT GGT ACT 12528
 N D V S F K V K K G E S W G L I G T
 AAT GGC TCA GGA AAA TCT ACA CTA CTA AAA CTT ATC TGT GGA ATT CTA AAA CCA 12582
 N G S G K S T L L K L I C G I L K P
 TAT AAA GGA AAA CTT GAA GTT CAT GGA AAG ATT TCT CCT CTT ATA GAG CTA GGA 12636
 Y K G K L E V H G K I S P L I E L G
 GCT GGA TTT GAT GGA GAA TTA ACG GCA AGA GAA AAC ATA TAT TTA AAT GGG GCA 12690
 A G F D G E L T A R E N I Y L N G A

TTG TTA GGA TAT GAT AAA TCT TTA ATG GAT ACT CAT TTT GAA GAA ATA ATT GAA 12744
 L L G Y D K S L M D T H F E E I I E
 TTT GCT GAA TTA AAC GAG TTT ATT GAT GTT CCT ATT AAA AAC TTT TCT TCG GGA 12798
 F A E L N E F I D V P I K N F S S G
 ATG TCT GCT AGA TTA GGT TTT TCC ATT GCT ACA ATA GTT AAA CCT GAA ATC CTT 12852
 M S A R L G F S I A T I V K P E I L
 ATC ATT GAC GAG GTG CTA GCT GTT GGT GAT GCG GCA TTT CAG GAA AAA TGT AAA 12906
 I I D E V L A V G D A A F Q E K C K
 AAG AGA ATG ACC GAA ATG TTA GAA AGT GGG ACA ACT TTA TTA TTT GTA TCT CAC 12960
 K R M T E M L E S G T T L L F V S H
 TCT GTC GAT CAG GTA AAA GAG CTT TGC CAA AAA GCT ATA TGG TTA GAT AAA GGA 13014
 S V D Q V K E L C Q K A I W L D K G
 AAT GTC AAA GCT ATT GGT GAT GTT GAA GAA ATT ACA AAT TTA TAC ATG GGA AAA 13068
 N V K A I G D V E E I T N L Y M G K
 AAT GCA TGA AAG CCT CAA TAA TCA TTC CAC TCA AAA ATG GTG GAG ATA TTT TTA 13122
ORF12 M K A S I I I P L K N G G D I F K
 N A *
 AGC AAG TTT TAT CTA GTG TTT TAT TAC AAA AAT TAG ACG CTC CAT TTG AGG TTA 13176
 Q V L S S V L L Q K L D A P F E V I
 TTG TAA TTG ATT CTG GTT CTA AAG ATG GTT CTG TTG AAT ATT TAA ATA ATA TTA 13230
 V I D S G S K D G S V E Y L N N I I
 TAA AAA ACC ATG ATA ATG TTA GAT TAT ATC AAA TTA AAC CTT ATG AAT TTG GGC 13284
 K N H D N V R L Y Q I K P Y E F G H
 ATG GAA AAA CAA GAA ATT ATG GAG CAA GCT TAT CCA AAG GTG AAT TTT TAG TTT 13338
 G K T R N Y G A S L S K G E F L V F
 TCA TCA CTC AAG ATG CCC TTC CTG CAA ATG AAT TTT GGC TAG AAG AAA TGA TTA 13392
 I T Q D A L P A N E F W L E E M I K
 AAC CAT TTT CCT TAG ACG AAA ACA TTC AAG GAG TAT TTG GTA AGC ATC TGC CAT 13446
 P F S L D E N I Q G V F G K H L P Y
 ATG AAG ATT GTG ATA TAT TTG AAA AAA ACA ATC TCT ATA CGC ATT TTA ATA ATT 13500
 E D C D I F E K N N L Y T H F N N F
 TTG GTA AAG GAA TTG TAG TTT ATA AAA TAG AAG ATA AAG CAC GCT ATG ACT CAG 13554
 G K G I V V Y K I E D K A R Y D S D
 ATG AAG GAT ATA GAC ATC TGC TTT GTT TCT ATT CTG ATA ATT CTT CGG CAA TGA 13608
 E G Y R H L L C F Y S D N S S A M R
 GAA AAT GTA TTT GGG ACA AGT ATC CAT ATG ATG ATG TCG ATT TTG CTG AAG ATC 13662
 K C I W D K Y P Y D D V D F A E D Q
 AAA TCT GGG CTA AAC GAA TAA TCG AAT TAG GAT ATT TTA AAG CAT ATA ATG AAA 13716
 I W A K R I I E L G Y F K A Y N E N
 ATG CCA TTG TAT TTC ACT CAC ATA ATT ATT CTT TTA AAG AAA TGC TGA TGA GAT 13770
 A I V F H S H N Y S F K E M L M R S
 CTT TTG ACG ATC ACA AAG GAT TGT ATA AGA TTT ATG GAT ATA AAT CTG TTA AAA 13824
 F D D H K G L Y K I Y G Y K S V K N
 ATA TTT TTT ATC TAC CTA TTT ATA TCA TAA AAC ATA CAA TTA ATG ATA TGA GAT 13878
 I F Y L P I Y I I K H T I N D M R F
 TTC TAA AAA CAA AAA AAT TAT CTA AGA AAG AAA AAT TGT ATT GGT CAT ATT TTT 13932
 L K T K K L S K K E K L Y W S Y F S
 CTC TAA TAA AAA ATA CTG TTA AAT ATA CAG GTG CAT ATT TTG GAC CAA AAG GCA 13986
 L I K N T V K Y T G A Y F G P K G T
 CAA ATA ATA AAT TAA TTA CTA AGT TAT TCT CTC GTG AAT TAA TTC TAA GGA ATA 14040
 N N K L I T K L F S R E L I L R N K
 AAT AAT GAA TAA AAT TAA AAA GAC ATT TTC AGT CTT AAA TGA GCA TGG ACT TTT 14094
ORF13 M N K I K K T F S V L N E H G L F
 *
 TAG AGG TTC TTT AAT TAT CTT AAG AAA AAT ATT GAA GAA ATC CCC AGA TAA TAT 14148
 R G S L I I L R K I L K K S P D N I
 TAT TTT AGG TAA AAC TGA TAT TTT AAA ATT CTA CAA TTT TAT TAA TTA TTC AGC 14202
 I L G K T D I L K F Y N F I N Y S A
 AAA CCC ACC TAA ATT AAA ACA ATC AAT TAA TAT AAG CTC TCC TAA AAT AAT TTG 14256
 N P P K L K Q S I N I S S P K I I W

GTT TAT TCC TGA TTT TGG GAT AGG CTC TGG AGG GCA CCT TAA TAT CTT TAG AAT 14310
 F I P D F G I G S G G H L N I F R M
 GAT TTA TAA TTT AGA AAA ATT AGA TAT TCA TTC AGA TAT TAC TGT ATG TGG TTC 14364
 I Y N L E K L D I H S D I T V C G S
 TAG CCA GTG GGG AAC AGA GGA AGT GAT CAA AGA CAT ACT ATC GAA ACA TTT CTT 14418
 S Q W G T E E V I K D I L S K H F F
 TCC TTT GAA TTC TAG AAT TTT TAT TCT AGA AGA TGA CTC TGA TTT TGA ACA ATT 14472
 P L N S R I F I L E D D S D F E Q L
 AAC AAG CTA TGA TAT TGC TAT GGC GAC TTC TTG GCA AAC AGC ATA TTA TGT AAA 14526
 T S Y D I A M A T S W Q T A Y Y V N
 TAA ATT TAA TAA TTG CTA TAA GAA AGC ATA CTT TGT GCA AGA TTA CGA ACC ATA 14580
 K F N N C Y K K A Y F V Q D Y E P Y
 TTT TAC TGC CTT AGG AAG TGT TTA TTC TTT TGC TGA AGA AAC ATA TAA ATT TGG 14634
 F T A L G S V Y S F A E E T Y K F G
 ATT TTT TGG AAT TAC CGC TGG AAA CTG GTT ATC TGA GAA ACT TGA AAA AAA GTA 14688
 F F G I T A G N W L S E K L E K K Y
 TTC GAT GCC TTG TAA GCC ATT TTC TTT TTC TTA CGA TAG AGA ATT ATA CGG AAT 14742
 S M P C K P F S F S Y D R E L Y G I
 ACA TAA AAG AAA TGA GCC GAG TAA AAA ACA TAT TTT CTT CTA TGC TAG ACC ACC 14796
 H K R N E P S K K H I F F Y A R P P
 GAC AGA AAG GAG AGC TTT TGA ACT AGG TTT GTT AGT TTT AGA TAA GGT AAC AAA 14850
 T E R R A F E L G L L V L D K V T K
 GAA AAG ACC TGA TAT TAG TAT TAT TTT TGC AGG ATG GGA TGT TTC TAG TTA TGA 14904
 K R P D I S I I F A G W D V S S Y E
 AAT CCC ATT TCA TCA TTT AAA TGC AGG TAT TGT GAA ACT AGA TGA GTT ATC TAA 14958
 I P F H H L N A G I V K L D E L S N
 CTT ATA CTC TCA ATG TGA CGC AGC TCT TGT TTT ATC TTT TAC TAA TTT ATC TTT 15012
 L Y S Q C D A A L V L S F T N L S L
 ACT TCC TCT AGA ATT ACT AGC GAG TGG TTG CCC TGT CGT GAT GAA CAA AGG GAA 15066
 L P L E L L A S G C P V V M N K G N
 TAA TAA TGA TTG GAT TGA TAT CGA TAA AAA ATT ATT TAT CTA TTC TAA TAA TAT 15120
 N N D W I D I D K K L F I Y S N N I
 AGA TGA ACT AGC CAA TAC ATT AAT TGA TGT TGT AGA TAA AAA AAT AAA TGT AGA 15174
 D E L A N T L I D V V D K K I N V D
 TTT TGA TTA TGT AAA TCA GTT TTT GTC TAG CAC ATC TTG GGA AAA TGA AGC AAG 15228
 F D Y V N Q F L S S T S W E N E A R
 AAA AGT TAA ATC AAT TAT TCA TTC TAT TCT AAA TGA GGA AAC TGA TGA TAA TCG 15282
ORF14 M I I G
 GAA ATG GAA TGC TTG CTA AAG CAT TTG AGA GTT TTC ATA AGC GTA CTT ATA ATT 15336
 N G M L A K A F E S F H K R T Y N Y
 K W N A C *
 ATA TTA TTT TTG CCA GTG GTG TAT CTA ATT CTA ATG AAA CGT CTT TTG AAA ATT 15390
 I I F A S G V S N S N E T S F E N F
 TTA ATA GAG AAA AAG AAC TTT TAT TAG AAG TAT TGG AGC AGT ATA AAG ATA AAA 15444
 N R E K E L L L E V L E Q Y K D K T
 CAA TTG TTT ATT TTA GTA GCT GTA GCA TTT ATG ATT CTA GTT TAA CTA ATT CAT 15498
 I V Y F S S C S I Y D S S L T N S L
 TAT ACG TTT ATC ATA AAA TGT GTA TGG AAA GAT TGG TTC GAG AAA ATT CTA AAA 15552
 Y V Y H K M C M E R L V R E N S K N
 ACT ATT TAA TTG CTA GGC TTC CTC AGG TTA TAG GAA AAA CTT ATT CTC CTA CAA 15606
 Y L I A R L P Q V I G K T Y S P T I
 TAG TCA ATT TTT TAT TTA ATA AAA TAA AGA ATA GAG AAT GTT TTT CTA TTT TTG 15660
 V N F L F N K I K N R E C F S I F G
 GTA AAG CAC ATA GAA ATT TTA TAG ATG TAG ATG ATG TTG TAA AAG TTA CTA ATT 15714
 K A H R N F I D V D D V V K V T N Y
 ACC TGC TTA AGG AAG GGC TGT TTA TTA ATT CTA TTG TTA ATT TAG CAT CTA CAC 15768
 L L K E G L F I N S I V N L A S T H
 ATC ATA CGT CAA TGT ATG AAC TTA TTC TTT ATC TTG AAA AAA TTT CTA ACC AAA 15822
 H T S M Y E L I L Y L E K I S N Q R

GAG CTT TTT ATA ATG TGG AAA ATA AAG GAA GTA GAT ATT TTA TAG ATG TTT CTA 15876
A F Y N V E N K G S R Y F I D V S I
TAT TAC AGG ATG TTT ATC AAA AAT TAG GTA TCA AAT TTG ATA AAG ACT ATG TTG 15930
L Q D V Y Q K L G I K F D K D Y V E
AAA AGG TAA TTA ATA AAT ATT ATG CTA TTA AAT AAA TTT TAT TCT AAA TTA TTT 15984
ORF15 M L L N K F Y S K L F
K V I N K Y Y A I K *
ATT TTA TTT TAT TTT ATT TTG ACT TTT ATT ATT GGC GTT ATT ATA ACG CCT CCA 16038
I L F Y F I L T F I I G V I I T P P
TAT CAG TCA CCA GAT GAG TTT TAT CAC TTT CAG AGA GGT TAT GCT ATA TCA AAT 16092
Y Q S P D E F Y H F Q R G Y A I S N
GGC CAA ATA ATA CCC TCA TCT ACA GAA AAA TTA GAT AAA GCT ATG ATG AAG ATG 16146
G Q I I P S S T E K L D K A M M K M
TTA TCG ATA TAT GAG GGA ATC CCT TAT CGA AGT GAA AAT AAA GTA ACT CAT TTT 16200
L S I Y E G I P Y R S E N K V T H F
TTA GAA AAT GAA GCA CAA AAT GTA GCT TGG GAG AAG GAA TAT ATT CTT GAT GAA 16254
L E N E A Q N V A W E K E Y I L D E
TCT GCA AAT ACC AAT GTC TAT TTC CCT TTG ATT TAT TTA CCT CAG GCA TTG GGG 16308
S A N T N V Y F P L I Y L P Q A L G
AGT TTT CTA GGA AGC ACA TTA GAT TTA TCA CTA TAT AAT ATG TAC TAT CTA GCC 16362
S F L G S T L D L S L Y N M Y Y L A
AAG ATT TTT ACT TTA TTA GTA TCG ATA GCT ATT TTA TAT TTT GCT AGT GTT CAA 16416
K I F T L L V S I A I L Y F A S V Q
TAT AGA TTA AGT ATT CCT GTA TTA TTA ATC CTT TCT TTA CCC ATG ACA ATG TTT 16470
Y R L S I P V L L I L S L P M T M F
CAG ATG GGG TCA ACA AAT CCA GAT AGT ATT ATA TTT TCT CTG TCA GTG TTT ATT 16524
Q M G S T N P D S I I F S L S V F I
GGT TCC TTA CTA GCC AGA GGA TTA GAT TCA AAC TAT AAT TTT ACT CAT AAG GAT 16578
G S L L A R G L D S N Y N F T H K D
TTC TGT AAA TTA CTA TTT TCT ATA TTT TTA TGT GTG ACA GTT AAA TTT AAT ATG 16632
F C K L L F S I F L C V T V K F N M
CTC GTA TTG TTA CTA CTA CCA TTC TTT ATT TCA AAA AGA AGA GAA ATT AGA CAT 16686
L V L L L L P F F I S K R R E I R H
GGT TCT ATG TAT TCT ATT TTT ATA ATC ATT CTA TCA ATT TTG TGG ATA GTT TTG 16740
G S M Y S I F I I I L S I L W I V L
GCT ATG AAA TTA ACT GAG GCT CAA TCT CAC TTC AAA GAA GGC GCA TTA CAT AAT 16794
A M K L T E A Q S H F K E G A L H N
TTC TCT TAT TAT ATT TTT CAT ATG GAT GAC TTA TTT GAA ATT TTT AAA AAT ACT 16848
F S Y Y I F H M D D L F E I F K N T
TTA AAT CTT ACT TAT TTA AAA TCT TTG CTG AGA ATG TTT TTA GGC GTT CTT GGA 16902
L N L T Y L K S L L R M F L G V L G
TGG GTT GAT ACG AAA TTT ACT ATA AAT GAG TAT CTA TTT TTC GGT TCT ACT TCA 16956
W V D T K F T I N E Y L F F G S T S
TTA TTG GCT TAT ATT TTT CTA TTC ATT CAC AAC TTG TAT AAA CTA AAA TAT GTT 17010
L L A Y I F L F I H N L Y K L K Y V
ATA GTA AGT GTT CTT TTA GTA GGA GTT GTA TTT TTA TTT ACC CAT TTT ATT CTC 17064
I V S V L L V G V V F L F T H F I L
TTG ATT ACT TAT AAT GAA ATT GGC ACA ACA CAA ATA GTA GGA GTT CAA GGA CGC 17118
L I T Y N E I G T T Q I V G V Q G R
TAT TTT ATT CCG ATC ATG CTT ATT ATT TTT TCT TCT TTT ATT TTA AAA AAA TCA 17172
Y F I P I M L I I F S S F I L K K S
GAA AAG ACC AGT AAT AAT AAA ACT ATT TCT AAA TAT TTT ATA ATT GTA CCT TTC 17226
E K T S N N K T I S K Y F I I V P F
TTG TTC TTA TTT ATA TCT AGT TTT ATT ACA ATT AAC ACT CTT GTT TCT AGA TAC 17280
L F L F I S S F I T I N T L V S R Y
TAT ATG GGA TAG TTA TGA AAA TCT GGC AGC TAG TTA AAT TTT TTT CTG TAG GCG 17334
ORF16 M K I W Q L V K F F S V G G
Y M G *
GTA TAT CAG CTT TAG TTG ATA TAG GAT GCT TAT ATT TAT TTA GTA AGA TTT TGC 17388
I S A L V D I G C L Y L F S K I L L

TAT GGA ATA ATG AGT TAT CTA TTT CAT TAG CAT TTA TAT TAG GAT TGG TAT TTA 17442
W N N E L S I S L A F I L G L V F N
ACT ATT TTT CAC ATA CAT ACT TCA CTT TCC AAG AAA AAG CAA ATG TTG GAA ATC 17496
Y F S H T Y F T F Q E K A N V G N L
TAG TAA AAT ATC TTA TTC TTT TTT TAT TAA ATT ATA TTA ATA CAA TCG TAT TAA 17550
V K Y L I L F L L N Y I N T I V L M
TGT ATC TTC TAA TAG AGC TTT TAC ATA TTG ACA TCA TTG TAG CAA AAG TAA TTA 17604
Y L L I E L L H I D I I V A K V I T
CAC TTC CAA TTA TTG CAG TTA CTA CTT TTG TTA TTT CTA AAG TCT GGG TTT ATA 17658
L P I I A V T T F V I S K V W V Y K
AAT AGG CGT TTA AAT GAA AAT ATT GTT GAT AAT ACC TTG TTA TAA TGA ATC TGA 17712
ORF17 M K I L L I I P C Y N E S E
*
GTC TAT AAT TTC ATT ATT AGA TGA ACT AAA AGA TTA TCC TGA ATA TGA TTA TAT 17766
S I I S L L D E L K D Y P E Y D Y I
TGT TAT TAA TGA CTG TTT TAA GGA TAA TAC ATC GAA AAT TGT AAG AAA TTA TGG 17820
V I N D C F K D N T S K I V R N Y G
AGC TAA CGT TAT TGA TCT TCC TAT AAA TTT AGG TTT ATC TGG TGG TGT TCA AAC 17874
A N V I D L P I N L G L S G G V Q T
TGG AAT GAT GTA CGC AAC TAA AAA TGA TTA TGA TAT TTG TAT ACA GAT TGA TGG 17928
G M M Y A T K N D Y D I C I Q I D G
TGA TGG ACA ACA TAT GCC ATC AGA AAT CTA TAA ACT AGT TGA CAA AAT TAA AGA 17982
D G Q H M P S E I Y K L V D K I K D
TGG TGT TGA TAT TGC AAT TAG TTC AAG ATT TTT AGA ATC TAA AGA TAG CTA TTC 18036
G V D I A I S S R F L E S K D S Y S
TCA AAC GTT TCT AAG AGC CTT AGG TGC AAA ACA TAT TCA ATT TTG CAT TAA ACT 18090
Q T F L R A L G A K H I Q F C I K L
TTT CTC AGG GCT TAC TCT TAC AGA TCC AAC TAG CGG AAT GAG AGC ATT TAC TAA 18144
F S G L T L T D P T S G M R A F T K
AAA TGT ATT TCA ACA GAT GGC TTA TGC AAC TAA TGA AAG ACC TGA ACC AGA TAC 18198
N V F Q Q M A Y A T N E R P E P D T
AAT GCT ATA TTT TGC TCG ATT GGG TTA TAG GAT AGA AGA AGT TCA AGT AAC AAT 18252
M L Y F A R L G Y R I E E V Q V T M
GAG GGA GCG CTT TGC TGG AGA ATC TTA TTT AAC GCC TAT TAA AGC AGC TAA GTA 18306
R E R F A G E S Y L T P I K A A K Y
TAT GAT TGA AAA TAC AGT ATC ATT TTT GTT TGT CGT ATT TAA AAC TTT AGG AAA 18360
M I E N T V S F L F V V F K T L G K
AAG AGG TAA AAA GTA ATG ACT GCT ACT TTA CAA GTT TTG CTA GTT ATA TTT AGT 18414
ORF18 M T A T L Q V L L V I F S
R G K K *
GTT TTA TTA TTG ATT TTA ATT ATT CGT GAT GTC AGC CGC TCA AAA ATT ATT TTC 18468
V L L L I L I I R D V S R S K I I F
TCA GAT TTT AGT TAT TGG CTT CTT TTC TCT ATA TTT CTA ATA TTA ATT GCT ATT 18522
S D F S Y W L L F S I F L I L I A I
TTC CCA AAA ATA ACA GAA TGG CTC GCA TTG TTA ATG GGT ATT AAA ACC GTT GCA 18576
F P K I T E W L A L L M G I K T V A
TTC TCA GTT TTT TTA ATG GTT GTT ACT ATG TTG ATT ATG TTA ACA TTG AGT TTA 18630
F S V F L M V V T M L I M L T L S L
TCT TTT AGA ATA TCT ATT TTG AAT CGC CGT TTT ATA CAA TTA ACT CAG AAC TTA 18684
S F R I S I L N R R F I Q L T Q N L
GCA TTG TTA GAA AAT GAG AAT GCT AGA CGA TTA GAT AAA TTA GAA AAA AAT TTA 18738
A L L E N E N A R R L D K L E K N L
AAA ATC ATT AAT GCC TAA ATT TAG TTA TTC TGT CAT CGT ATG CAC CCT CAA CGG 18792
ORF19 M P K F S Y S V I V C T L N G
K I I N A *
TGC ATC TTT TAT ATC TGC ACA GTT AAA AAG TAT TTT GAC TCA ATC AAT TTT GCC 18846
A S F I S A Q L K S I L T Q S I L P
ACA AAA AAT TAT TGT GTC TGA TGA TGG TTC AAC TGA TGG CAC ATT GGA TGT TGT 18900
Q K I I V S D D G S T D G T L D V V

TCA ACA GAC TTT TTT AGA AGC AAA TTT TAC TGA TTA TGA AAT TGT TCA AGG TCC 18954
Q Q T F L E A N F T D Y E I V Q G P
GAA AAA AGG TGT GAT TGC TAA TTT TTT ATC GGC ATT GGC TTA TAG TTC AGC AGA 19008
K K G V I A N F L S A L A Y S S A D
CTT TAC TTT TTT AGC CGA TCA AGA TGA TAT TTG GCA TCA TAA AAA AGC TGT AAC 19062
F T F L A D Q D D I W H H K K A V T
ATT TTC AAA AAT GGC ACA AAC ACA ATC GCC TGA TGT ACC AAC ACT CAC TTT CAG 19116
F S K M A Q T Q S P D V P T L T F S
CGA TGC ACG TTT GAT TGA TGA ATA TAA TCA AGA AAT TAC ATC GAG TTT TTT TGT 19170
D A R L I D E Y N Q E I T S S F F V
TTA TCA AGC TTT AAC AGC AGA TTG TTT GGT AGA TGA CTC TAT TTT GTA TAA AAA 19224
Y Q A L T A D C L V D D S I L Y K N
TTG TGT GCA AGG CGC AGC TTG TAT GAT TAA TCG TGC ATT GCG AAA CTT AGC ATT 19278
C V Q G A A C M I N R A L R N L A L
GGA TTC CTT ACC TTA TAT TAA TTT ATC TGA ACT TTA TAT GCA CGA TTG GTG GCT 19332
D S L P Y I N L S E L Y M H D W W L
GGC GTT GTT GGC ACG TTA TTA CGG CAA CAC GCA ATT TAT TGA TTT ACC TTT GTT 19386
A L L A R Y Y G N T Q F I D L P L L
AGA TTA TCG TCA ACA TAG CCG CAA TCA AGT AGG CGT GTT TAA TTA TAA ATG GCG 19440
D Y R Q H S R N Q V G V F N Y K W R
TTT ATT TCG TTT CCA TGC TTA TTG GAA AAA CTT TCA GCA AGC TAT TCG GCA AGT 19494
L F R F H A Y W K N F Q Q A I R Q V
AAA AAT GTT TGA ACA ATT TGT CAA ACA ATA TGG AAA GCC ACA TAA CTT GCT AAT 19548
K M F E Q F V K Q Y G K P H N L L I
TCG TTC AAA ACG ACA ATA CCT TTC AGT GCC AAA ATT AAA GCG AGT TTT ATT ATT 19602
R S K R Q Y L S V P K L K R V L L L
GCT ATT CGC AAA ATA AGG AAG AAA AAT GAC CGC TCT TTC ATT TGT GTT GTG TGT 19656
L F A K * **ORF20** M T A L S F V L C V
GCC TAC CTA CAA CGC AGA CCA GCA ATG GCA AGA TTG GAT TGC AAC CTA TCA GCA 19710
P T Y N A D Q Q W Q D W I A T Y Q Q
ACA AAC CAG AAA AGC CGA TGA GGT GAT TGT GGT AGA TTC TTC CTC CGA CCA 19764
Q T R K A D E V I V V D S S S S D Q
AAC GGT AAA ATG GGC GGA GGA GGC GGG TTT TTC TGT ACA TAG TAT TTC GCA AAT 19818
T V K W A E E A G F S V H S I S Q M
GGA ATT TAA TCA TGG TGG CAC GCG CAA TCA AGC TGT TAA ATT TGC TAA AAG TTT 19872
E F N H G G T R N Q A V K F A K S F
TGC AGA TAT TGT TGT GTT TAT GAC ACA AGA TGC GAT TTT AGC TTC GCC TGA TTC 19926
A D I V V F M T Q D A I L A S P D S
ATT GGC AAA TTT ATT AGC GCC TTT TGC GGA TCC TGA GGT AAC GAC GGT GTA TGG 19980
L A N L L A P F A D P E V T T V Y G
TAA ACA GTT GCC ACA CGC TAA TTC CAC GCC TGT TGC CGC TCA CGC ACG CTA TTT 20034
K Q L P H A N S T P V A A H A R Y F
TAA TTA CCC GGC GCA ATC GAA ATT AAA ATC AAA AGC AGA TAT TCC CTC TTT AGG 20088
N Y P A Q S K L K S K A D I P S L G
CAT TAA AAC GGC TTT TAT GTC GAA CTC TTT TGC GGC GTA TCG TCG CTC GGT GTT 20142
I K T A F M S N S F A A Y R R S V F
TGA AGA ACT TGG GGG CTT TCC TGA TAA TAC AAT TTT AGC GGA AGA TAT GTA CTT 20196
E E L G G F P D N T I L A E D M Y L
AAC CGC CAA AAT GGT GTT AGC AGG TTA TAA AGT TGC CTA TTG TGC GGA AGC AAC 20250
T A K M V L A G Y K V A Y C A E A T
GGT ATT TCA TAG CCA CAA CTA TAC CTT AAG CCA GGA ATT ACA ACG CTA TTT TGA 20304
V F H S H N Y T L S Q E L Q R Y F D
CAC AGG CGT GTT TCA GCA AGA ACA AGG GTG GAT TCA GCA AAC CTT TGG AAA AAT 20358
T G V F Q Q E Q G W I Q Q T F G K M
GGC TTC AGA AGG AAA GAA GTT TGT GCT TTC TGA ACT CAA ATT TCT TGT AAA AAA 20412
A S E G K K F V L S E L K F L V K N
TGC ACC GCA CTT GTT ACC CAA AGC CTT GCT ATC AAC CTT TGC CAA ATG GAT TGG 20466
A P H L L P K A L L S T F A K W I G
CTT TCA ACT GGG GTA TCA TTA TCA AAA ATT GCC TTA TGC GTG GTG TAA GGC ATT 20520
F Q L G Y H Y Q K L P Y A W C K A L

AAG TAT GCA CAA AGG ATA TTG GAA AGA TGA GAA AAA CAG AAG GCT CCG CGC CCC 20574
 S M H K G Y W K D E K N R R L R A P
 TCA TCA ATA AGA TCA GTT TGA TTT TCA CCG ATA TGA TTT CGT ATG TTT TTG CGA 20628
 ORF21 M I S Y V F A I
 H Q *
 TTG CGG TGG GCT ACT GGC TTT CAC CTT TAG ATG ATT TTT CTC GCG ATA TTT TGG 20682
 A V G Y W L S P L D D F S R D I L E
 AAC TGA AAG GTT CTA TCT ATC GGG CGG GTT CCT TTT TCT TGG CGA TGT TAG CAA 20736
 L K G S I Y R A G S F F L A M L A S
 GCA TTG GGA TTT TGT GGG TAT TTT ATC GTC ATT ACA CTT ACC GTA AGC CAT TTT 20790
 I G I L W V F Y R H Y T Y R K P F W
 GGG ACG AAT TGA AAG ACA CCT ATT TTT CAC TCT TTG TGA TTG CCT TTG TTA ATT 20844
 D E L K D T Y F S L F V I A F V N L
 TGG CGC TAT TGG TGT TTG CCA AAG TAC CCG ATC CTA TGG AAA CGT GGA TTT ATG 20898
 A L L V F A K V P D P M E T W I Y V
 TCT ATG GCG TGC TTT TTC TCT GTT TTC CTC TTT TTC GGA TCA TTT GCA AAA AAG 20952
 Y G V L F L C F P L F R I I C K K V
 TCC TCA AAT TTA ACT GTT TGT GGG ATA TGC CAA GCG TGA TCA TCG GCA CGG GGC 21006
 L K F N C L W D M P S V I I G T G R
 GCA ATG CTT TTC GTG CAT ACA AGG CGA TTC AAG CTG AGT CTA ACC TTG GTT ATA 21060
 N A F R A Y K A I Q A E S N L G Y K
 AAG TGC AAA CCT TTG TTT CTC AAC AAG AAA GTT GTG TGC TGG CAA AAC ACC TAG 21114
 V Q T F V S Q Q E S C V L A K H L D
 ATT TTA TAT CTG AGC AGG AAT TTT TAA AAC ATT TGC ACC GTT ATG AAA AAG TAT 21168
 F I S E Q E F L K H L H R Y E K V F
 TTA TTG CCT TAG AAC ACG ATC AGG CAG ATT TAT TGG CAT ATT GGG TGA AAA AAC 21222
 I A L E H D Q A D L L A Y W V K K L
 TCT CGG CGC TGA ATT TTC GCA ATG TAT CTA TTA TTC CGT CGT TGC AAG GCA TCC 21276
 S A L N F R N V S I I P S L Q G I P
 CAC TTT ATG GGG CGG AAA TTT CGC ATT TCT TTA GCT CTG AAA CCA TTG TGC TGC 21330
 L Y G A E I S H F F S S E T I V L R
 GGA TCC CCA ATA AGC TCG CTA AGC GCT CAA CCC GTT TGA TGA AAC GTA CTT TTG 21384
 I P N K L A K R S T R L M K R T F D
 ATA TTG TGG TTT CCA GCC TAT TGT TGA TTC TGC TTG CCC CGC TTT TCT TGG TGC 21438
 I V V S S L L L I L L A P L F L V L
 TAT TTT TGA TGA TTC GTA AAG ATG GTG GAA AAG CAG TGT ATA GCC AAG TTC GTG 21492
 F L M I R K D G G K A V Y S Q V R V
 TCG GGC GAA ATC GCA AAG TCT TCA AAT GCT ATA AAC TCC GTA CGA TGG TGG TTA 21546
 G R N R K V F K C Y K L R T M V V N
 ATT CTC AAC AAG TGC TGC GTG AAT TAT TGG CGA AAG ATG AGG AAG CCC GCG AGC 21600
 S Q Q V L R E L L A K D E E A R E Q
 AGT GGA ATA AAG AGT TTA AAC TCA AGA ATG ACC CTA GAA TCA CGC CAA TCG GCA 21654
 W N K E F K L K N D P R I T P I G K
 AAA TTT TGC GTA AAA CCA GCC TTG ATG AGC TGC CGC AGT TAT GGA ACG TCT TTA 21708
 I L R K T S L D E L P Q L W N V F K
 AAG GTG AAA TGA GCC TTG TTG GCC CTC GCC CTG TAA CGA GGC AAG AGT TGA AAT 21762
 G E M S L V G P R P V T R Q E L K Y
 ACT ATG GCG ATG ACT TAA TTT ACT ACG AAA TGG TTC GCC CTG GGC TTT CAG GCT 21816
 Y G D D L I Y Y E M V R P G L S G L
 TAT GGC AAG TGA GCG GGC GTA ATG ACA TTG GCT ACG CCA CCC GCG TAT ATT TAG 21870
 W Q V S G R N D I G Y A T R V Y L D
 ATG CAT GGT ATG TGA AAA ACT GGT CGT TGT GGA ATG ATA TTG TGA TCT TGG CAA 21924
 A W Y V K N W S L W N D I V I L A K
 AAA CCG TCA ACA TTG TGT TGA GAA GAA AAG GGG CAT ATT AGC CCA AGC AGC TGA 21978
 T V N I V L R R K G A Y *
 TTG ATT TTC TCT GAT AAA ATG CAA AAC ATA CTA AGC TCA AAC TTA GTG CGT TTT 22032
 TTT ATT TAC TCA CTG CTA CAT TCT TAA AGG CGA GTA TTT TTC TCA CTT TGA TAT 22086
 GTT GAC GAT GTA GCT CAT TGG TTC CGT ATT TTT CAA GCG TTG CAA CCA AAC TAT 22140
 AAC AGA AGA ATG GGC ATC GTG TTG TGT GAC TTC ACG AAT GCC TCA ATG CTC TTC 22194
 TAA AAT AAG TTT GAT GAT GTG ATG TTT GAA TTT GAT TGA ATA ATG TTT ACC CAT 22248

AAA AAG CTG CAC CTT AAC TGG TTA GGT GTG GTA TCC AAT TTT TGG GTG GCA GAT 22302
 CAT CAA TGT CGG TAT GTT AAA AAT TGG TCT TTG TGG AAT GAT TTT GCC ATT TTA 22356
 TGC TGA ACC TTA AAA ACT GTA TTA GTT CGA AAT GGG ACT TAT TAA AAG CTT GTT 22410
 CAT TGG ATA AGC GTA TCA AAA AAG CAG AAT AAA CTT CTG TTT TTT TGT TTG TTG 22464
 CAA GTA TAA TGT TGC CCC AAC ACA AAG CAA AGG AAC AAA ACA TGA AAA TCA TGT 22518

ORF22 M K I M S

CGT TTA ACA TAA ACG GAT TAA GAG CCA GAC CAC ATC AAT TAG AAG AAA TTA TTA 22572
 F N I N G L R A R P H Q L E E I I N
 ATA AAT ATC AAC CGG ATG TGC TGG GAT TAC AGG AAA TCA AAG TGT CGG ATG AGG 22626
 K Y Q P D V L G L Q E I K V S D E V
 TCT TTC CGT ATG ATT TGG TGG ATC ATC TTG GCT ACC ACG TCA ATC ATT TCG GGC 22680
 F P Y D L V D H L G Y H V N H F G Q
 AAA AGG GGC ATT ACG GCG TTG CGT TAT TGA GTA AGC AGG TGC CAT TGT CGG TGA 22734
 K G H Y G V A L L S K Q V P L S V R
 GAA AAG GGT TTC CGA CAG ATG ATG AGG AAG CGC AAA AGC GGA TCA TCA TGA TTG 22788
 K G F P T D D E E A Q K R I I M I D
 ATT TAG AGA CGA AAT TCG GTC AAC TGA CTG TTA TTA ATG GCT ATT TCC CGC AGG 22842
 L E T K F G Q L T V I N G Y F P Q G
 GGG AAA GCC GTG AAC ACC CGA CTA AAT TCC CGG CGA AAC AAA AAT TTT ATG CAG 22896
 E S R E H P T K F P A K Q K F Y A D
 ATT TAC AGC GTT ATT TGG AGC AAG ATC ATA ACG CGC AAA ACC CGG TCA TTA TCA 22950
 L Q R Y L E Q D H N A Q N P V I I M
 TGG GCG ATA TGA ATA TCA GTC CTT CCG ATT TAG ACA TTG GTA TCG GCG AGG AAA 23004
 G D M N I S P S D L D I G I G E E N
 ATC GTA AAC GTT GGT TGC GGA CCG GCA AAT GCT CTT TCC TGC CGG AAG AAC GCG 23058
 R K R W L R T G K C S F L P E E R E
 AAT GGT ATC AGC GTT TAT ATG CGT ACG GCT TGG AAG ATA CCT TCC GCC ACA TGA 23112
 W Y Q R L Y A Y G L E D T F R H M N
 ATC CGA CGG TTA ATG ATA AAT TCT CCT GGT TTG ATT ATC GTT CCA AAG GGT TTG 23166
 P T V N D K F S W F D Y R S K G F D
 ATG ATA ATC GCG GTT TGC GTA TTG ACC ACA TTT TGG CAA ATA AAG CCT TGG TGG 23220
 D N R G L R I D H I L A N K A L V A
 CAC ATT GTG TGG ATA CCG GTA TTG CCT TGG ATA TTC GCG CCA TGA ATA AGC CTT 23274
 H C V D T G I A L D I R A M N K P S
 CTG ATC ACG CAC CGA TTT GGG CGG AGT TTA AAT AAT GCC GTT GAA AAA TCC CGA 23328

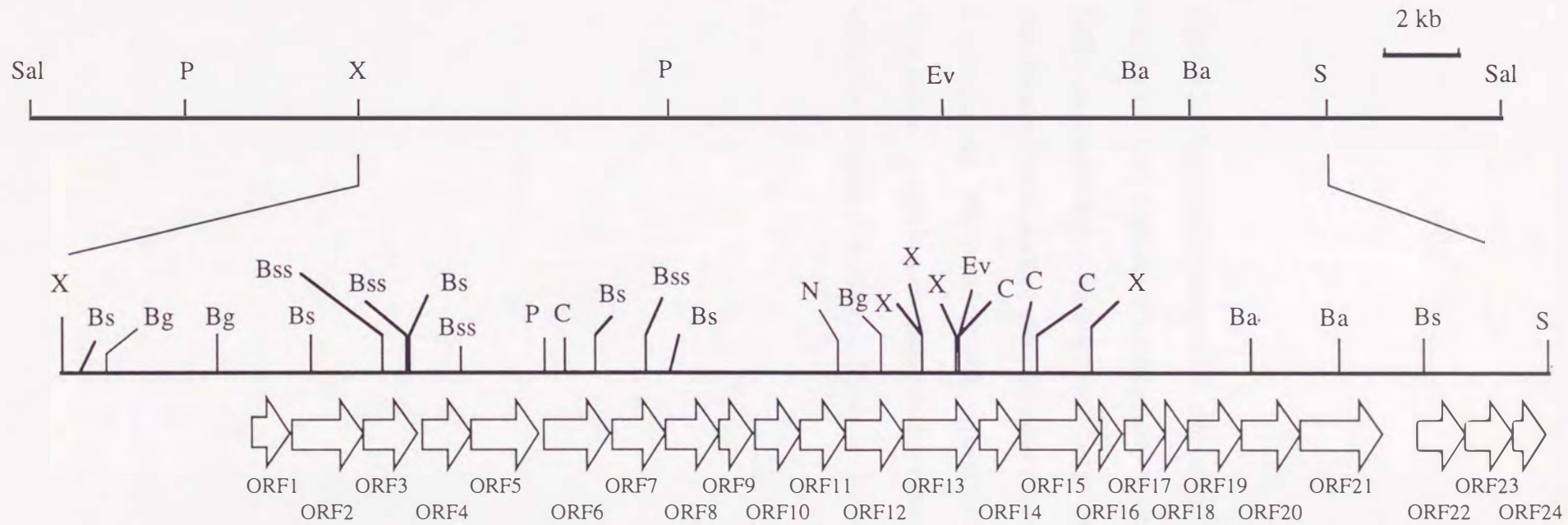
ORF23 M P L K N P E

D H A P I W A E F K *

ACA GAA TTG GCA AAA TTA CCG CAC ATT AAT TAA CGG TAA AAT CGC CAG TTG CAC 23382
 Q N W Q N Y R T L I N G K I A S C T
 GGT TAA TTT GGA TAT TTT TGA GGC ATT TTC TCC ACA AAA ATA CAA TAA AGT CGT 23436
 V N L D I F E A F S P Q K Y N K V V
 GCA GGT TTC TCT ACC TTA TGA GCC TGA TGA AAA TGC TAT GCC GAC CTT GGA TGA 23490
 Q V S L P Y E P D E N A M P T L D E
 ACA TCA TCG TGT TAT CAC GGA ATT GTT CAA AAT TCT GAT TCA GGT TTC GGC ACT 23544
 H H R V I T E L F K I L I Q V S A L
 ATC CGA TGT GCT TTA TGC CGG GCA TAT CAT TGG TGA CGG GCA TTT GCA GTT GCA 23598
 S D V L Y A G H I I G D G H L Q L H
 TTT TTA TTG CGA TAA ACC GAC CGC ACT TTT TGA TGT GCT TGA CCA ATT CAA GGA 23652
 F Y C D K P T A L F D V L D Q F K E
 ACA TAT TGA TCA TAC GGG CGT GCA GGA TGA TCC GAA TTG GGA CAC TTA TTT TGA 23706
 H I D H T G V Q D D P N W D T Y F D
 CTT TTT GCT GCC GTC GCC ATT GGA AAT GAA GCT TAA CGT TAC GGA AGA AAT TCT 23760
 F L L P S P L E M K L N V T E E I L
 CGA TAT GTT ATT GCA AAA CGG CAG AAA TTT GGC GGA TAA CTA TCT CAT CGA ACA 23814
 D M L L Q N G R N L A D N Y L I E H
 TAC CTT TCA ATT TGC CGA TGA ACA GCT GAT GTA TCA ATT CAT GGA AGA AAC CAA 23868
 T F Q F A D E Q L M Y Q F M E E T N
 TCT CAG TGA CAT TTA TTT CAA CAC CAT GAG TTA CAG CAA TGC ACC TAT TAT CTT 23922
 L S D I Y F N T M S Y S N A P I I F

TTC TGC TTC TGA CGA GGA AGA CAA AGA AAG TTT TTA TAT CGT TAA AAT TGA ACA	23976
S A S D E E D K E S F Y I V K I E Q	
GGA AAT GTC TTT GGA TAC GGA TGA AAT TTT TGC TTA TGT TGA ACA GTT TGA GCG	24030
E M S L D T D E I F A Y V E Q F E R	
TTT GGC GGA AAA ATT TTC CGG TGA ATA TGT GGG CTG GGA GAG TGA CAC GAT TAA	24084
L A E K F S G E Y V G W E S D T I N	
TCA GGT GAA AGC GAA TTA ATC CTT TTA TAA CAA <u>TAA</u> GTA ATC TAT GCA ATT TCT	24138
Q V K A N *	
	ORF24
	M Q F L
CAT TAC CGG CGG TGC CGG TTT TAT CGG TTC GGC CTT GAT TCG GTG GCT GAT TCA	24192
I T G G A G F I G S A L I R W L I Q	
ACA TAC TGA GCA CGA CAT CAT TAA TGT TGA CAA GCT TAC CTA CGC CGG TAA TTT	24246
H T E H D I I N V D K L T Y A G N L	
ATG TGC TTT GTA CAG CGT AGA AAC CCA TCC GCG TTA TCA TTT TGA ACA GAC GGA	24300
C A L Y S V E T H P R Y H F E Q T D	
TAT TTG CGA TGG ACA AAT GAT GGC GCA TAT ATT GTC GCA ATA TCG TCC TGA TGC	24354
I C D G Q M M A H I L S Q Y R P D A	
CGT CAT CCA TTT GGC AGC CGA AAG CCA TGT GGA TCG GTC GAT TGA CGC ACC TGC	24408
V I H L A A E S H V D R S I D A P A	
CGC GTT TAT GCA AAC CAA TAT TAT CGG CAC TTA CAC TTT GTT GGA AGC TGC CCG	24462
A F M Q T N I I G T Y T L L E A A R	
TAA TTA TTA CGA GAA ATT GAC TGC CGA AAA AAA GCG GAA TTT CGT TTT TTA CAT	24516
N Y Y E K L T A E K K R N F V F Y I	
ATT TCT ACC GAT GAA GTG TAT GGC GAT GTG GCG GAA AAT CAC GCC TTA TCC AAG	24570
F L P M K C M A M W R K I T P Y P R	
GAA GAT GCT GCG TAT GCG CCA AGT AGT CCG TAT TCC GCT TCA AAA GCC TCT GCC	24624
K M L R M R Q V V R I P L Q K P L P	
GAT CAT TTG GCT CAC GCT TGG CAC CGC ACT TAT GGC TTG CCG ATA ATA ATC ACT	24678
I I W L T L G T A L M A C R *	
AAT TGC GCC AAT AAT TAC GGC CCT TAT CAA TAT CCT GAA AAG CTG ATT CCG TTT	24732
ATG ATC TCC AAT GCA TTG AAT GGC AAC GGG CAG CAG ATT CGT GAT TTG CTT TAT	24786
GTG GAA GAC CAT GTT CGC GCC TTG TAT TTG GTG CTT ATG AAA GGC AAT GTA GGC	24840
GAA AGC TAC AAT ATC AGC AGC CAT TGC GAA AAA ACA AAT TTG GCT GTG ATT TGT	24894
GCC ATT TGT GAG CTC 3'	24909

Figure 6. Nucleotide sequences of genes located on the 24909-bp *Xba*I-*Sac*I fragment and the deduced amino acid sequences. Base position is shown on the right. The putative ribosomal binding sites are underlined. The termination codon of each ORF is shown by asterisk.



48

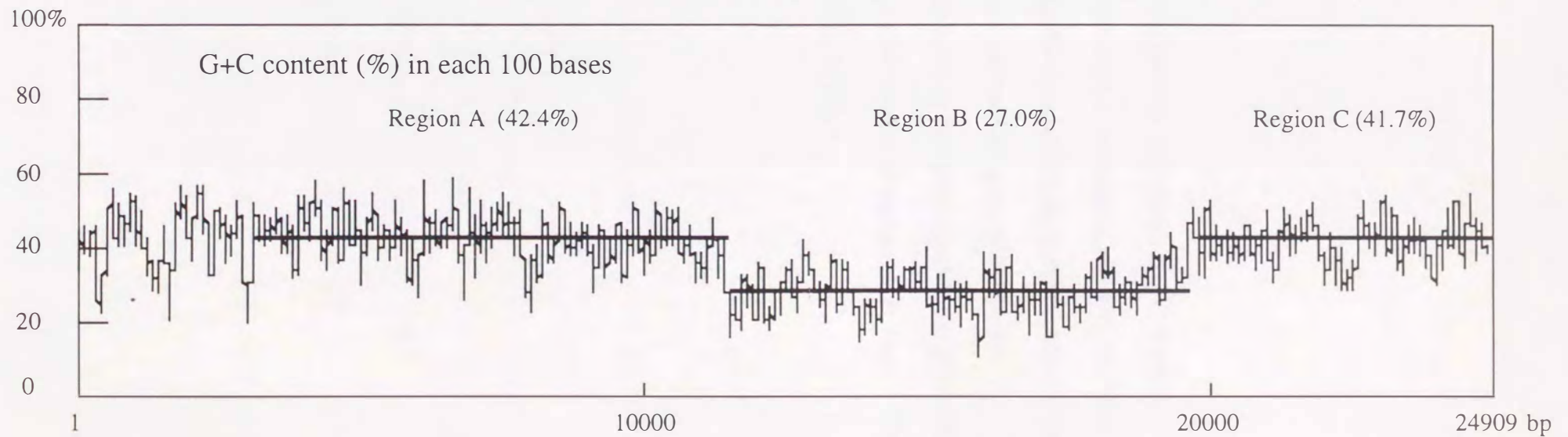


Figure 7. Open reading frames in *A. actinomycetemcomitans* SPA region and its flanking regions and G+C contents of the fragments responsible for *A. actinomycetemcomitans* SPA. ORFs are represented by open arrows. The percent G+C contents in the area sequenced were calculated for each block of 100 nucleotide residues, and they are graphed below the restriction map. The three segments hypothesis is shown by bars crossing over the plot of the SPA region. Values in parentheses are the average G+C content of regions A, B, and C. The restriction enzyme abbreviations are the same as those in Fig. 4.

ORF6、ORF7、ORF8、ORF9、ORF10、ORF11、ORF12、ORF13、ORF19およびORF20)、他の菌種の多糖の合成に関与していると予想される酵素のアミノ酸配列と高い相同性を示した。一方、8個のORFのアミノ酸配列は (ORF1、ORF2、ORF14、ORF15、ORF16、ORF17、ORF18およびORF23) これまで報告のあった配列と相同性が認められなかった (表1)。

5. 菌体多糖の糖組成分析

A. actinomycetemcomitans Y4株と、pARF102、pARF211またはpMBLcosを保持する *E. coli* DH5 α 株に含まれる多糖の組成を、HPLCを用いて分析した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株菌体をオートクレーブ抽出して得た多糖からは、ラムノース、フコース、グルコース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミンとその他のいくつかの未同定の糖が検出された (表2)。pARF102 (*E. coli* DH5 α 株内でSPAの合成に不可欠な領域の一部を欠く断片を含むプラスミド) (図4) を保持する *E. coli* DH5 α 株と、クローニングベクターを保持する *E. coli* DH5 α 株のオートクレーブ抽出物中の多糖からは、ラムノースとフコースのいずれも検出できなかった。一方、pARF211を保持して、SPAに特異的なモノクローナル抗体と反応する多糖を合成する *E. coli* DH5 α 株から得られたオートクレーブ抽出物中には、ラムノースとフコースがほぼ1:1の割合で含まれていた。しかし、このSPA産生 *E. coli* DH5 α 株の形質転換株のオートクレーブ抽出物から得られたラムノースとフコースの量は、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の量と比較して5分の1程度であった。以上の結果から、pARF211はラムノースとフコースから構成される多糖の合成に関与する遺伝子群を含むことが示唆された。

6. *E. coli* DH5 α 株の形質転換株における産生SPAの局在

SPA産生 *E. coli* DH5 α 株の形質転換株における同多糖の局在を調べるために、抗体による菌体凝集試験と蛍光抗体法による観察を行った。菌体凝集試験においては

Table 1. Profiles of the genes in the region responsible for SPA synthesis and its flanking regions

Potential ORF identified in SPA gene cluster	Amino acids of protein	%G+C	Homologous gene	Potential function	Bacterium	Protein sequence identity (%)	Reference
ORF1	256	44.4	— ^a				
ORF2	398	45.1	—				
ORF3	293	42.8	<i>amsB</i>	Glycosyl-transferase	<i>E. amylovora</i>	22.6	Bugert and Geider, 1995
ORF4	267	44.3	<i>amsE</i>	Unknown	<i>E. amylovora</i>	44.8	Bugert and Geider, 1995
ORF5	376	44.3	<i>mltB</i>	Lytic trans-glycosylase	<i>E. coli</i>	23.5	Dijkstra et al., 1995
ORF6	355	41.3	ORF2 (<i>rmlB^b</i>)	dTDP-D-glucose-4, 6-dehydratase	<i>N. meningitidis</i>	79.6	Hammer-schmidt et al., 1994
ORF7	290	41.0	ORF1 (<i>rmlA^b</i>)	Glucose-1-phosphate-thymidyl-transferase	<i>N. meningitidis</i>	79.2	Hammer-schmidt et al., 1994
ORF8	292	43.3	<i>rfbC</i> (<i>rmlD^b</i>)	dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase	<i>E. coli</i>	43.8	Stevenson et al., 1994
ORF9	179	38.2	<i>rfbD</i> (<i>rmlC^b</i>)	dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3, 5-epimerase	<i>S. flexneri</i>	58.6	Rajakumar et al., 1994
ORF10	263	25.2	<i>tagG</i>	ABC transport protein	<i>Bacillus subtilis</i>	24.7	Lazarevic et al., 1994
ORF11	245	31.6	<i>abcA</i>	ABC transport protein	<i>Aeromonas salmonicida</i>	26.6	Chu and Trust, 1993
ORF12	323	27.3	<i>rfbN</i>	Rhamnosyl-transferase	<i>S. enterica</i>	26.6	Jiang et al., 1991

Table 1— *Continued-1.*

ORF13	418	29.3	<i>rfbH</i>	Unknown	<i>Yersinia enterocolitica</i>	23.5	Zhang et al., 1993
ORF14	230	25.1	—				
ORF15	446	26.9	—				
ORF16	122	25.1	—				
ORF17	234	30.2	—				
ORF18	126	26.7	—				
ORF19	289	34.3	<i>rfbG</i>	Unknown	<i>S. flexneri</i>	21.0	Morona et al., 1994
ORF20	318	42.7	<i>rfbN</i>	Rhamnosyl-transferase	<i>S. enterica</i>	54.4	Jiang et al., 1991
ORF21	452	42.5	<i>wbaP</i>	Galactosyl-transferase	<i>S. enterica</i>	43.3	Whang et al., 1996
ORF22	267	43.9	<i>xth</i>	Exodeoxy-ribonuclease	<i>E. coli</i>	69.7	Saporito et al., 1988
ORF23	264	39.5	—				
ORF24	180	46.4	<i>rfbB</i> (<i>rmlB</i> ^b)	dTDP-D-glucose-4, 6-dehydratase	<i>S. enterica</i>	59.6	Jiang et al., 1991

^a —, no significant homology to previously reported genes.

^b The genes for the dTDP-L-rhamnose pathway were renamed *rmlA*, *rmlB*, *rmlC*, and *rmlD* (Reeves et al., 1996; Tsukioka et al., 1997)

Table 2. Sugar composition of polysaccharide preparations from *A. actinomycetemcomitans* Y4 and *E. coli* transformants

Strain	Sugar content ^a				
	Rhamnose	Fucose	Glucose	Galactose	<i>N</i> -acetylglucosamine
<i>A. actinomycetemcomitans</i>					
Y4	5,881 ± 263	5,460 ± 229	728 ± 27	644 ± 30	127 ± 3
<i>E. coli</i>					
DH5α (pMBLcos)	ND ^b	ND	2,630 ± 53	1,435 ± 29	467 ± 9
DH5α (pARF102)	ND	ND	2,723 ± 91	3,937 ± 114	908 ± 27
DH5α (pARF211)	916 ± 23	902 ± 26	2,003 ± 50	1,278 ± 33	291 ± 7

^a Values are nmol per 1 g (dry weight) of whole cells. Means ± standard deviations from three independent experiments.

^b ND, not detectable by HPLC.

菌体として、*A. actinomycetemcomitans* Y4株、クローニングベクターであるpMBLcosを保持する*E. coli* DH5 α 株の形質転換株、およびpARF211を保持してSPAを産生することのできる*E. coli* DH5 α 株の形質転換株などの全菌体を用いた。抗体としては、SPAに特異的なモノクローナル抗体S5、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の熱ショックタンパク質の1つであるGroELタンパク質に特異的なモノクローナル抗体P3、および同タンパク質に特異的なウサギポリクローナル抗体を用いた（Nakanoら、1995b）。なお、GroELタンパク質は、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の菌体内に局在していることが知られている。予測どおり、GroELタンパク質に特異的なモノクローナル抗体とポリクローナル抗体のいずれを使用しても、*A. actinomycetemcomitans* Y4株は菌体凝集を起こさなかった。また、pMBLcosを保持する*E. coli* DH5 α 株の形質転換株は、モノクローナル抗体S5存在下で菌体凝集を起こさなかった。一方、*A. actinomycetemcomitans* Y4株菌体はモノクローナル抗体S5存在下で凝集した。さらに、SPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株も*A. actinomycetemcomitans* Y4株と同様に、モノクローナル抗体S5存在下で凝集を起こした（図8）。

つぎに、菌体凝集試験に用いたものと同じ菌体をサンプルとして用い、蛍光抗体にて処理した後、菌体の表層をレーザー顕微鏡にて観察した。一次抗体としてモノクローナル抗体S5、二次抗体としてFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体を使用して観察したところ、*A. actinomycetemcomitans* Y4株とSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株の菌体表層がFITCで染色されていた。一方、pMBLcosを保持する*E. coli* DH5 α 株の形質転換株では、FITCを観察することはできなかった（図9）。また、上記と全く同じ条件で、一次抗体としてマウス腹腔内液を用いてこれらの菌体表層を観察したところ、いずれの菌体の表層にもFITCは結合していなかった（データ省略）。以上の結果から、SPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株において、同多糖抗原はその菌体表層に局在していることが明らかとなった。

Dilution

1 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64

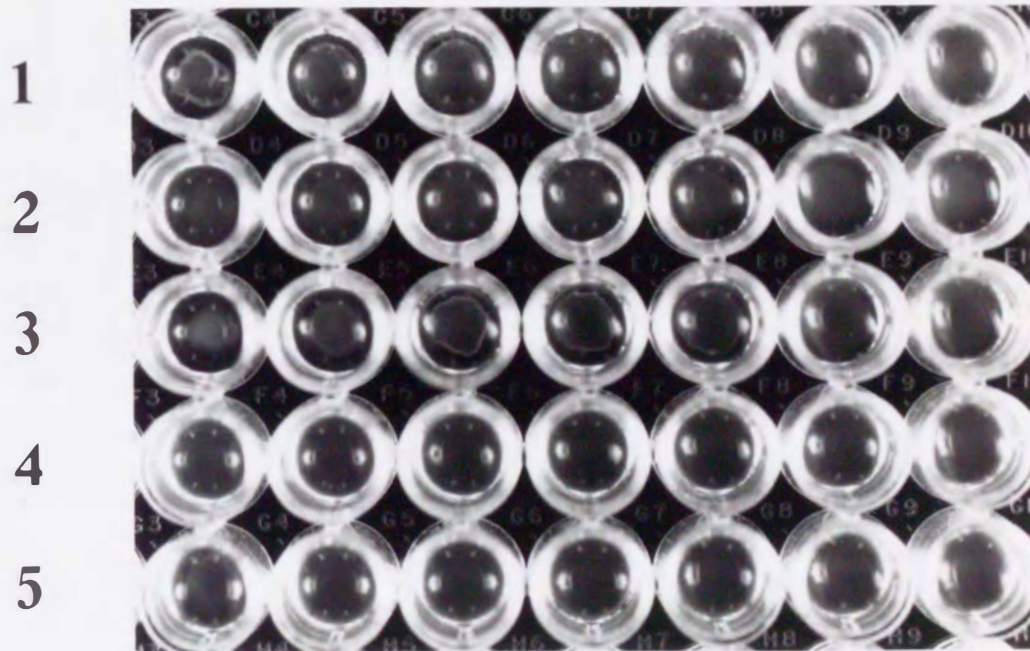


Figure 8. Aggregation of intact cells in the presence of antibodies. Lanes: 1, *A. actinomycetemcomitans* Y4 and monoclonal antibody S5; 2, *E. coli* DH5 α harboring pMBLcos and monoclonal antibody S5; 3, *E. coli* DH5 α harboring pARF211 and monoclonal antibody S5; 4, *A. actinomycetemcomitans* Y4 and monoclonal antibody P3; 5, *A. actinomycetemcomitans* Y4 and rabbit polyclonal antibody against GroEL.

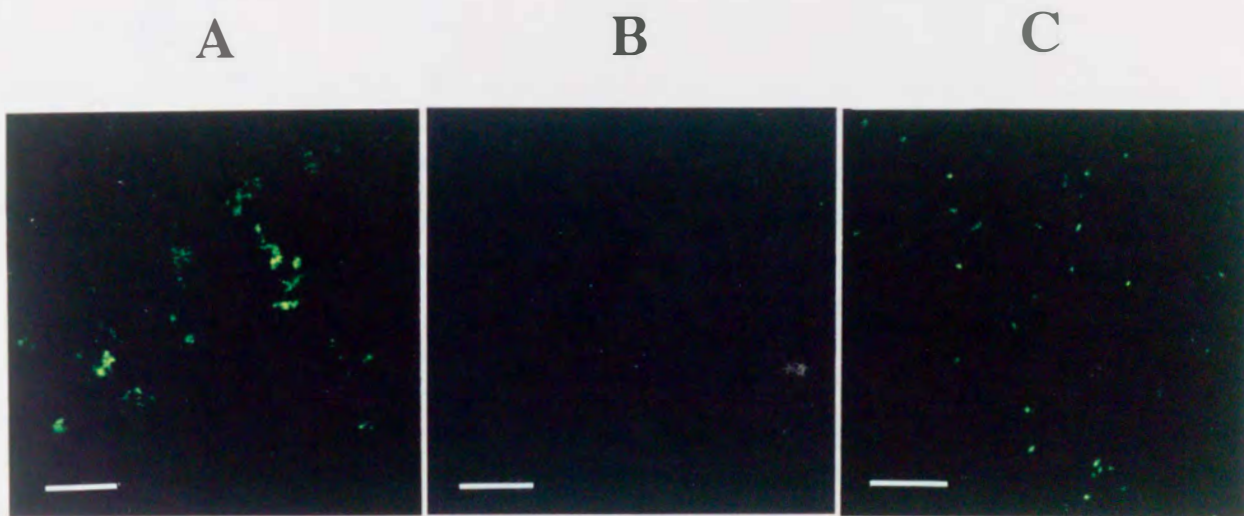


Figure 9. Fluorescence photomicrographs of *A. actinomycetemcomitans* Y4 (A), *E. coli* DH5 α harboring pMBLcos (B), and *E. coli* DH5 α harboring pARF211 (C). The binding of monoclonal antibody S5 to intact cells of each strain was observed with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Magnification, $\times 1000$. Bars show 30 μm .

7. 培養上清中に遊離するSPAの測定

A. actinomycetemcomitans Y4株の培養上清中には、SPAが含まれていることが知られている。そこで、*A. actinomycetemcomitans* Y4株とSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株において、培養上清中のSPA量と菌体に結合しているSPA量を、生体分子特異的相互作用測定機を用いて比較した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株において、菌体結合SPA量（モノクローナル抗体S5に対する反応単位）は、培養上清中のSPA量と比較して約3倍であった。一方、pARF100を保持しているSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株においては、約24倍であった（表3）。この結果から、SPAを産生する*E. coli* DH5 α 株の形質転換株の培養上清中には、ほとんど同多糖抗原が遊離されておらず、この形質転換株におけるSPA局在化機構は*A. actinomycetemcomitans* Y4株のものと異なる可能性が示唆された。

8. ラムノース合成遺伝子群の発現と機能の解析

ORF6、ORF7、ORF8およびORF9から推定されるアミノ酸配列は、*N. meningitidis*（Hammerschmidtら、1994）、*E. coli*（Stevensonら、1994）、*S. flexneri*（Rajakumarら、1994）のdTDP-ラムノースの合成に関与する4つの酵素のアミノ酸配列と高い相同性を示した（表1、図10）。dTDP-L-ラムノースは、dTTPとD-グルコース-1-リン酸から*rml*遺伝子群がコードする4つの酵素の作用で合成されることが知られている（図10）。そこで、ORF6、ORF7、ORF8およびORF9をそれぞれ単独で含むプラスミドを導入して、dTDP-L-ラムノース非合成株である*E. coli* S ϕ 874株を形質転換した。ポリアクリルアミド電気泳動を用いて、それぞれの形質転換株内で発現したタンパク質の分子量を確認したところ、塩基配列から推定された分子量とほぼ一致した（図11）。次に、HPLCを用いてORF6、ORF7、ORF8およびORF9がコードするタンパク質が、dTDP-ラムノースの合成に関与するか否かを調べた。4つのORFのサブクローンをそれぞれ保持する形質転換株から得た全ての粗酵素抽出物を同時にdTTPとD-グルコース-1-リン酸を含む反応液に加えたところ、この反応液中においてdTDP-

Table 3. Amounts of SPA in cell extracts and culture supernatants from *A. actinomycetemcomitans* Y4 and *E. coli* DH5 α harboring pARF100

Strain	Response unit for monoclonal antibody S5 ^a
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4	
Cell extract	42.67 \pm 3.0 ^b
Culture supernatant	13.63 \pm 1.0 ^c
<i>E. coli</i> DH5 α harboring pARF100	
Cell extract	93.43 \pm 1.2 ^b
Culture supernatant	3.87 \pm 1.0 ^c

^a Means \pm standard deviations from three independent experiments.

^b Values are response units per cells harvested in 100 μ l of culture.

^c Values are response units per 100 μ l of culture supernatant.

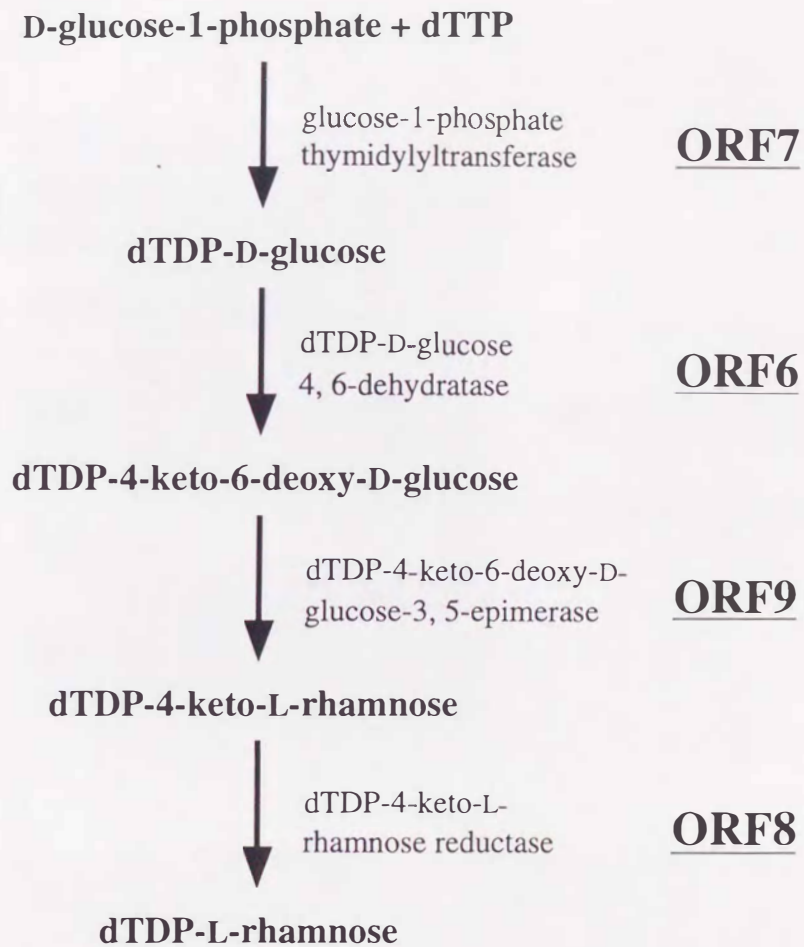


Figure 10. Biosynthetic pathway of the formation of dTDP-L-rhamnose from glucose-1-phosphate (Melo and Glaser, 1968). The genes that are presumed to encode the enzymes catalyzing the pathway are underlined.



Figure 11. Coomassie blue-stained SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showing expression of the four rhamnose biosynthetic proteins in *E. coli* Sφ874. Lanes: 1, Crude extract from *E. coli* Sφ874 harboring pBluescript (control); 2, crude extract from *E. coli* Sφ874 harboring pTrc99A (control); 3, crude extract from *E. coli* Sφ874 harboring pARF401 (ORF6); 4, crude extract from *E. coli* Sφ874 harboring pARF405 (ORF7); 5, crude extract from *E. coli* Sφ874 harboring pARF411 (ORF8); and 6, crude extract from *E. coli* Sφ874 harboring pARF406 (ORF9). The arrows indicate the ORF6, ORF7, ORF8, and ORF9 proteins. The positions of standard molecular mass markers (in kilodaltons) are shown on the left. The molecular masses (in daltons) predicted from their respective nucleotide sequences are indicated in parentheses.

L-ラムノースが合成されていることが示唆された。しかし、4つのORFがコードするタンパク質のいずれか1つでも欠くとdTDP-ラムノースを合成することができなかった(表4)。表4には、反応溶液中のdTDP-ラムノースを塩酸によって加水分解したラムノースの量を示した。以上の所見から、ORF6、ORF7、ORF8およびORF9がコードするタンパク質は、dTTPとD-グルコース-1-リン酸からdTDP-L-ラムノースを合成する一連の酵素であると示唆された。

Table 4. dTDP-rhamnose-synthesizing activity of crude enzyme extracts from *E. coli* transformants harboring pARF401, pARF405, pARF406, and pARF411

Crude enzyme extracts from:	Rhamnose ^a
<i>E. coli</i> Sϕ874 transformants harboring pBluescript KS, pARF405, pARF406, and pARF411	ND ^b
<i>E. coli</i> Sϕ874 transformants harboring pARF401, pTrc99A, pARF406, and pARF411	ND ^b
<i>E. coli</i> Sϕ874 transformants harboring pARF401, pARF405, pTrc99A, and pARF411	ND ^b
<i>E. coli</i> Sϕ874 transformants harboring pARF401, pARF405, pARF406, and pTrc99A	ND ^b
<i>E. coli</i> Sϕ874 transformants harboring pARF401, pARF405, pARF406, and pARF411	217 ± 11.7

^a Values are nmol per 100 ml of reaction mixtures. Means ± standard deviations from three independent experiments.

^b ND, not detectable by HPLC.

考 察

A. actinomycetemcomitans Y4株のSPAの合成に関与する遺伝子群をクローニングするにあたって、この遺伝子群が数10 kbに渡ってクラスター構造をしていることを予測した。研究開始当初、市販されているCharomid 9-28やCharomid 9-20（ニッポンジーン）を、コスミドベクターとして使用した。これらのコスミドは、構造上20 kbから30 kbの断片をクローニングする際に有効であるとされているが、*A.*

actinomycetemcomitans Y4株のSPAの合成に関与する遺伝子群をクローニングすることはできなかった。その原因として、それらのコスミドベクターはコピー数が多いために、20 kbから30 kbの長い挿入断片が*E. coli*内で安定に保たれないことが考えられた。そこで、pACYC177（ChangとCohen、1978）を改良して、コピー数のより少ないコスミドpMBLcosを開発した（Nakanoら、1995a）。本研究では、このコスミドを使用することによって、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に関与する約38 kbにわたる遺伝子群をクローニングすることに成功した。

ウェスタンブロッティング解析によって、この約38 kbにわたる遺伝子群を含むpARF100を保持している*E. coli* DH5 α 株が*A. actinomycetemcomitans* Y4株のLPSではなく、SPAに特異的なモノクローナル抗体と反応する高分子量の多糖体を合成していることが明らかとなった（図3）。言い換えれば、今回クローニングした約38 kbの断片は、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に関与している遺伝子群を含むことが証明された。

HPLCを用いて行った多糖体の組成分析から、SPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株（pARF211を保持している）から得られたオートクレーブ抽出物中には、ラムノースやフコースが含まれていることが明らかとなった。この結果と既に報告のある*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの構造から、本実験で作製したSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株は、L-ラムノース残基とD-フコース残基から構成される多糖を

合成するものと考えられる。後述するように、*E. coli* K-12株はdTDP-L-ラムノースを合成する4つの遺伝子とその染色体DNA上に持つことが知られている (Stevensonら、1994)。しかし、K-12株がD-フコースの合成に関する機能や遺伝子を持つとの報告は、現在のところない。また、他の原核生物や真核生物においてもD-フコース合成遺伝子に関する報告はない。*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAを合成に関する遺伝子群には、既に他の菌で発見されているL-ラムノースの合成に関する遺伝子の他に、現在まで報告のないD-フコースの合成に関与する遺伝子やL-ラムノースとD-フコースから構成される多糖の合成に関与する遺伝子群を含むことが示唆された。また、乾燥菌体あたりの多糖体に含まれるラムノースやフコースの量がA.

actinomycetemcomitans Y4株と比較して約5分の1程度であること理由は、*E. coli* DH5 α 株内での遺伝子の発現が低いために合成されるSPAの量が少ないなどが考えられるが、現在のところ不明である。Perryら (1996a、1996b) は、A.

actinomycetemcomitans Y4株のSPAはD-フコース、L-ラムノース、D-N-アセチルガラクトサミンから構成されていると、Amanoら (1989) の主張に反論している。

AmanoらのSPAの精製の方法は菌体のオートクレーブ抽出物をイオン交換カラムに通してさらにゲル濾過して得た多糖画分からポリミキシンBカラムでLPSを取り除いているが、Perryらの方法ではホットフェノール抽出物で得た多糖画分からLPSを取り除いていない。AmanoらとPerryらの結果が異なることは、SPAの精製の方法が異なることに起因すると思われる。また、*A. actinomycetemcomitans* Y4株やSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株から得られたオートクレーブ抽出物中においては、D-N-アセチルガラクトサミンは検出されなかった。

抗体を用いた菌体凝集試験や蛍光抗体法により、*E. coli* DH5 α 株の形質転換株においてSPA特異モノクローナル抗体S5と反応した多糖は、菌体の表層に局在していることが明らかとなった。いくつかの細菌において、菌体内から多糖をその表層に輸送するには、ATPバイディングカセット (ABC) スーパーファミリーに属している種特異のタンパク質が関与していることが知られている (Higginsら、1986)。

A. actinomycetemcomitans Y4株のSPAが*E. coli* DH5 α 株の菌体表層に輸送されたという結果は、*E. coli* DH5 α 株が本来保持していた輸送に関与するタンパク質が、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAを菌体表層に輸送したのか、あるいは、*A. actinomycetemcomitans* Y4株由来の輸送に関与するタンパク質が、*E. coli* DH5 α 株の細胞質から菌体表層へSPAを輸送したと考えられる。いずれにしても、異なる菌種由来のタンパク質と多糖が作用して、多糖を菌体表層に輸送するメカニズムは興味深い。

また、生体分子特異的相互作用測定機を用いて培養上清中のSPAの量と菌体結合SPA量を比較したところ、*A. actinomycetemcomitans* Y4株とSPA産生*E. coli* DH5 α 株の形質転換株とでは、結果は大きく異なっていた。*A. actinomycetemcomitans* Y4株は培養上清中にSPAをある程度遊離したが、*E. coli* DH5 α 株の形質転換株においては、SPAのほとんどが菌体結合型であった。この結果から、*A. actinomycetemcomitans* Y4株と比較して、*E. coli* DH5 α 株の形質転換株のSPAははるかに強固に菌体に結合していることが明らかになった。つまり、*A. actinomycetemcomitans* Y4株と*E. coli* DH5 α 株の形質転換株とでは、SPAが菌体表層に局在する機構が異なると考えられる。ところで、*E. coli* K-12株は、かつてLPSのO抗原多糖を持っていたが、実験用細菌として数十年にわたって培養されてきた過程でその染色体DNAに突然変異が起き、実験室の環境下では生存に不必要であるO抗原多糖を合成することができなくなったと考えられている（Stevensonら、1994）。この実験の結果を考察するうえで、*E. coli* DH5 α 株の形質転換株が合成したSPAは、以前保持していたO抗原多糖のように、LPSのコア多糖部に結合しているのではないかという推測も成り立つであろう。産生した多糖体を菌体表層に強く結合させている*E. coli* DH5 α 株の形質転換株は、多糖を菌体表層で固定するというメカニズムを解明する上で、有効な材料になると思われる。

本研究においてクローニングした約38 kbの遺伝子断片を制限酵素によって切断し、様々な領域をもつ断片を挿入した欠失プラスミドを作製し、*E. coli* DH5 α 株内でSPA

の合成に不可欠の領域を決定した。図5の結果より、*E. coli* DH5 α 株内におけるSPAの合成に不可欠の領域は、pARF211内の13 kbのBssHII-BspHI断片に含まれていることが明らかとなった。さらに塩基配列の決定より、この断片にはORF8からORF21までの14個のORFが含まれていることが認められた。また図4の結果より、ORF8、ORF9、ORF10またはORF11の少なくとも1つが、ORF20またはORF21の少なくとも1つが*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に不可欠な遺伝子であることが明らかとなった。13 kbのBssHII-BspHI断片上のその他のORF (ORF12、ORF13、ORF14、ORF15、ORF16、ORF17、ORF18またはORF19) は、*E. coli* DH5 α 株内におけるSPAの合成に不可欠な遺伝子である可能性は高いと思われるが、断定はできない。

つぎに、既に報告のあるアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列をもつORFについて考察する。ORF3とORF4から推定されるアミノ酸配列は、*E. amylovora*のAmsBタンパク質とAmsEタンパク質 (BugertとGeider, 1995) のアミノ酸配列と高い相同性を示した。これら2つのタンパク質をコードする遺伝子*amsB*と*amsE*は*ams*オペロンに属しており、同オペロンは*E. amylovora*の菌体表層多糖の合成に関与していると考えられている。AmsBタンパク質はグリコシルトランスフェラーゼとして機能すると推測されているが、AmsEタンパク質の機能については不明である (BugertとGeider, 1995)。また、ORF5から推定されるアミノ酸配列は*E. coli*のペプチドグリカンの代謝に関わるトランスグリコシラーゼ (Dijkstraら, 1995) と高い相同性を示した。ORF3、ORF4およびORF5はいずれも*E. coli* DH5 α 株内で

A. actinomycetemcomitans Y4株のSPAの合成に必要というわけではなかった (図4)。しかしながら、クラスター内でのそれらのORFの位置や、相同性のあるタンパク質が多糖の合成や代謝に関与していることを考慮すると、ORF3、ORF4またはORF5は、*A. actinomycetemcomitans* Y4内でSPAを合成するためには必要である可能性もある。

既に述べたとおり、ORF6、ORF7、ORF8およびORF9は、*N. meningitidis* (Hammerschmidtら, 1994)、*E. coli* (Stevensonら, 1994)、*S. flexneri* (Rajakumar

ら、1994) のdTDP-L-ラムノースの合成に関与する遺伝子である4つの*rml*遺伝子群とそれぞれ高い相同性を示した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAはD-フコースとL-ラムノースから構成される多糖なので、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の染色体DNA上にL-ラムノースの合成に関与する遺伝子群が存在していると考えられる。そこで、本研究においてORF6、ORF7、ORF8およびORF9がコードするタンパク質の機能を調べたところ、これらのタンパク質はdTTPとD-グルコース-1-リン酸からdTDP-ラムノースを合成する一連の酵素であることが明らかとなった(表4)。しかしながら、ORF6とORF7は*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に必要というわけではなかった(図4)。その理由として、*E. coli* DH5 α 株自身が染色体DNA上に保持している4つの*rml*遺伝子(Stevensonら、1994)が、dTDP-L-ラムノースの合成に関与していることが推測される。この推測から、ORF8とORF9もまた*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に必要というわけではないと思われる。

グラム陰性細菌の菌体表層多糖の輸送には、いくつかの特異的な酵素が関係している。一般的には、これらの酵素はABCスーパーファミリーに属する細胞質膜に存在するタンパク質であり、少なくとも2種類の酵素が知られている。1つはトランスロカーゼであり、もう1つはATP加水分解酵素である(Higginsら、1986)。これらのABCトランスポーターは、互いに作用しながら菌体表層へ多糖を輸送する働きを担っている(Pavelkaら、1994)。ORF10から推定されるアミノ酸配列は、*B. subtilis*のTagGタンパク質(Lazarevicら、1995)のアミノ酸配列と相同性が高かった。また同時に、*Vibrio cholerae* (Stroeherら、1992)、*Y. enterocolitica* (Zhangら、1993)、*E. coli* K5株(Smithら、1990)と*E. coli* K1株(Pavelkaら、1991)、*H. influenzae* (Krollら、1990)および*N. meningitidis* (Froschら、1991)のトランスロカーゼであると考えられるメンブレンスパンニングドメインタンパク質とも高い相同性を示した(データ省略)。一方、ORF11から推定されるアミノ酸配列はATPバインディングモチーフであるGXXGXGKS(Walkerら、1982)を含んでおり、*A. salmonicida*の

ABCタンパク質であるATP加水分解酵素のアミノ酸配列 (ChuとTrust、1993) と高い相同性が認められた。

ORF12から推定されるアミノ酸配列は、*S. enterica*のラムノース転移酵素であるRfbNタンパク質 (Jiangら、1991; Liuら、1993) のアミノ酸配列と26.6%の相同性を示した。一方、ORF20から推定されるアミノ酸配列も*S. enterica*の同タンパク質のアミノ酸配列と54.4%の相同性を示した。そこで、ORF12とORF20とから推定されるアミノ酸配列を比較したところ、23.7%の相同性を示すことが分かった。それぞれORFの長さはほとんど同じであり、ペプチド鎖全体に渡って共通のアミノ酸が多く認められた (図12)。これらの結果より、ORF12とORF20がコードするタンパク質は互いに類似した機能を持ち、おそらく転移酵素であると思われる。それらのアミノ酸配列が部分的に異なっているのは、酵素の基質の違いや合成された多糖の結合の様式が異なっているからではないかと考えられる。

ORF21から推定されるアミノ酸配列は、*S. enterica*のWbaPタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示した。WbaPタンパク質はガラクトース転位酵素として機能すると同時に、細胞質膜の内面から外面へO抗原多糖の構成オリゴ糖を移動させる役割を担っていると考えられている (Wangら、1996)。

ORF13から推定されるアミノ酸配列と*Y. enterocolitica*のRfbHタンパク質 (Zhangら、1993) は相同性が高かった。RfbHタンパク質は同菌のO抗原多糖の合成に関与しているが、その詳細な機能は明確になっていない。また、ORF19から推定されるアミノ酸配列は*S. flexneri*のRfbGタンパク質 (Moronaら、1994) と相同性を示したが、このタンパク質の機能も同様に不明である。

ORF22から推定されるアミノ酸配列は、*E. coli* K-12株のエキソヌクレアーゼIIIと69.7%の相同性を示した。このエキソヌクレアーゼIIIは、i) アプリン酸、アピリミジン酸の位置でDNAを切断するエンドヌクレアーゼ活性、ii) 二本鎖DNAに特異的に作用し、3'から5'方向へ分解するエキソヌクレアーゼ活性、iii) 3'末端リン酸基を除去するホスファターゼ活性、iv) DNA-RNAハイブリッドのRNA鎖を分解するリボ

RfbN	MK---ITLII	PTYNAGSLWP	NVLDAIKQQT	IYPD-KLIVI	DSGSKDETVP	46
ORF20 product	MTALSFVLCV	PTYNADQQWQ	DWIATYQQQT	RKAD-EVIVV	DSSSSDQTVK	49
ORF12 product	MKA---SIII	PLKNGGDIFK	QVLSSVLLQK	LDAPFEVIVI	DSGSKDGSVE	47
	*	* *	* *	**	** * * *	*
RfbN	LASDL----K	NISIFNIDSK	DFNHGGTRNL	AV--AKTLDA	DVIIFLTQDA	90
ORF20 product	-----WAEEA	GFSVHSISQM	EFNHGGTRNQ	AVKFAKSF-A	DIVVFMTQDA	93
ORF12 product	YLNNIIKNHD	NVRLYQIKPY	EFHGKTRNY	GASLSKG---	EFLVFITQDA	94
		*	* * * * *	*	* * * * *	
RfbN	ILADSDAIKN	LVYYFS-DPL	IAAVCGRQLP	HKDANPLAVH	ARNFNYSS--	137
ORF20 product	ILASPDSLAN	LLAPF-ADPE	VTTVYGKQLP	HANSTPVAAH	ARYFNYPAAQS	142
ORF12 product	LPANEFWLEE	MIKPFSLDEN	IQGVFGKHLP	YEDCDIFEKN	NLYTHFNNFG	144
	*	* *	* * * *			
RfbN	KSIVKSK-AD	IEKLGIKTVF	MSNSFAA---	---YRRSVFE	ELSGFP-EHT	179
ORF20 product	K--LKSKA-D	IPSLGIKTAF	MSNSFAA---	---YRRSVFE	ELGGFP-DNT	182
ORF12 product	KGIVVYKIED	KARYDSDEGY	RHLLCFYSDN	SSAMRKCIRD	K---YPYDDV	191
	* * *			*	*	
RfbN	ILAEDMFMAA	KMIQAGYKVA	YCAEAVVRHS	HNYTPREEFQ	RYFDT--GVF	227
ORF20 product	ILAEDMYLTA	KMVLAGYKVA	YCAEATVFHS	HNYTLSQELQ	RYFDT--GVF	230
ORF12 product	DFAEDQIWAK	RIIELGYFKA	YNENAIVFHS	HNYSFKEMLM	RSFDDHKGLY	241
	***	** * *	* * * * *	***	* * * *	*
RfbN	HACS-PWIQR	DFGAGGEGEF	-----RFVK	SEIQFLLKNA	PFWIPRALLT	270
ORF20 product	QQ-EQGWIQQ	TFGKMASEGK	-----KFVL	SELKFLVKNA	PHLLPKALLS	273
ORF12 product	KIYGYSVKN	IFYLPIYIIK	HTINDMRFK	TK-KLSKKEK	LYWSYFSLIK	290
		*	*	*	*	
RfbN	TFAKFLGYKL	GKHWQSLPLS	TCRYFSMYKS	YWNNIQYSSS	KEI-K	319
ORF20 product	TFAKWIGFQL	GYHYQKLPYA	WCKALSMHKG	YWKDEKNRRL	RAPHQ	323
ORF12 product	NTVKYTGAYF	G-----PKG	TNNKL-ITKL	FSRELILR--	---NK	328
	* *	* *	*			

Figure 12. Alignment of ORF20 product and ORF12 product with RfbN from *S. enterica* (Jiang et al., 1991). Identical amino acids in the three sequences are symbolized by asterisks. Dashes indicate gaps.

ヌクレアーゼH活性などの機能を持つことが知られている (Saporitoら、1988)。
しかし、これらの機能のいずれもがSPAの合成に関与していると思われない。実際、
ORF22は*E. coli* DH5 α 株内でSPAを合成するために不可欠な遺伝子ではなかった
(図4)。

ORF24から推定されるN-末端側の126個のアミノ酸配列は、*S. enterica*のdTDP-グル
コース-4,6デヒドラターゼ (Jiangら、1991) と高い相同性を示した。しかし、C-末
端側の54個のアミノ酸配列と相同性のある既報の配列は、認められなかった。
dTDP-グルコース-4,6デヒドラターゼはdTDP-ラムノースの合成に関与する酵素の1
つであり (図10)、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAがD-フコースとL-ラムノー
スから構成されている多糖であるので、*A. actinomycetemcomitans*内でSPAを合成する
ために不可欠な酵素であると考えられる。しかしながら、ORF24は*E. coli* DH5 α 株内
でSPAを合成するために不可欠な遺伝子ではなかった (図4)。さらに、ORF24は*A.*
*actinomycetemcomitans*内においてもSPAを合成するために不必要と思われる。なぜな
ら、ORF24がコードするタンパク質はその長さがdTDP-グルコース-4,6-デヒドラター
ゼに比べかなり短く、その機能が不明であるのみならず、上述のORF6がdTDP-グル
コース-4,6デヒドラターゼと高い相同性を示し、その機能を有すると考えられるか
らである (図10)。

A. actinomycetemcomitans Y4株における全染色体DNAの平均G+C比は45.6%である
と報告されている (Tannerら、1982)。また、我々のグループがかつて*A.*
actinomycetemcomitans Y4株の全く異なる領域からクローニングした8個の遺伝子の平
均G+C比は、最も高いもので53.3%、最も低いもので46.6%であった (Yoshidaら、
1997)。一方、この25 kbの断片上に存在する24個のORFのうち、個々のORFの平均
G+C比は最も高いもので46.4%、最も低いもので25.1%であった (表1)。この結果、
今回塩基配列の決定を行った断片の平均G+C比は、他の領域と比較して低いことが
明らかとなった。

また、この領域全体の平均G+C比という観点から、この断片を3つの領域に分ける

ことができた。図7に示したように、ORF1からORF9までの最も上流の9つの遺伝子群をregion Aと名づけた。この領域の平均G+C比は42.4%であった。その下流領域に局在する平均G+C比が27.0%であったORF10からORF19までの10個の遺伝子群をregion Bと名づけた。最も下流に位置する平均G+C比が41.7%であったORF20からORF24までの5つの遺伝子群をregion Cと名づけた。*K. pneumoniae* (Arakawaら、1995)、*S. flexneri* (Moronaら、1994)、*S. enterica* (Jiangら、1991)、*E. coli*

(Stevensonら、1994)あるいはその他のいくつかの細菌において、菌体表層多糖を合成する遺伝子群の平均G+C比は、全染色体DNAと比較して低いということが知られている。しかし、region Bに見られるように、8.5 kbもの長い領域に渡ってこれほど低い平均G+C比が見られる報告は、現在のところ存在しない。また、region Bに含まれるORF14、ORF15、ORF16、ORF17およびORF18から推定されるアミノ酸配列のいずれもが、現在までに報告のあるアミノ酸配列と相同性を示さなかった。しかも、これらの5個のORFは、*E. coli* DH5 α 株内で*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に不可欠な領域を含む断片上に位置する遺伝子であった(図4)。これらの所見より、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に必要な遺伝子群は多糖合成に関わる新しい遺伝子を含んでおり、これらの遺伝子の機能はA.

actinomycetemcomitans Y4株のSPAの合成に特異的であることが示唆された。一般的に、G+C比の比較は菌種間の関連性を調べる際に、よく使用される有効な手段である。異菌種間での染色体DNAのG+C比の相違は、AまたはTがGまたはCに、あるいは逆にGまたはCがAまたはTに突然変異していくその変動の割合に依存すると言われている(Sueoka、1988)。region BのG+C比において見られるregion Aやregion Cとの極端な差異は、region Bがregion Aやregion Cとは異なる進化上の起源や歴史をもち、この領域が何らかの方法で異なる時期に染色体DNAに組み込まれたことに起因すると思われる。

最近、いくつかの病原細菌において、菌体表層多糖の合成や菌体表層への輸送に関与している遺伝子群についての生化学的手法や分子生物学的手法を用いた解析が

行われつつある。これらの細菌が菌体表層多糖を産生する際、個々の遺伝子がコードする酵素は単独に機能しているのではなく、相互に関与しあいながら多糖を合成し菌体表層へ輸送することが明らかとなってきた (BlissとSilver, 1996)。しかしながら、その菌体表層多糖の合成機構や局在化機構についてはほとんど明らかになっていない。今回の研究において、これらの機構を明らかにするために適した多くのプラスミドや形質転換株を作製することができた。今後、これらの研究材料を有効に用いることで、菌体表層多糖の合成や菌体表層への輸送に関する研究に新たな見地を開くことができるであろう。また、*A. actinomycetemcomitans*のSPA産生のメカニズムを解明する研究は、歯周炎の原因を究明するうえで役立つのみならず、将来的には*A. actinomycetemcomitans*の菌体表層抗原を利用した予防法を開発するうえで、欠くことのできない研究であると考えられる。本研究は、歯周病の発症の機構を明確にするために、あるいは今後の歯周病の診断法や予防法の開発を促すために、有用なものとなるであろう。

総 括

1. *A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に関与している遺伝子群をクローニングした。
2. 同遺伝子群を用いて形質転換を行った*E. coli* DH5 α 株は、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAと同じ組成や免疫学的特異性を持つ多糖体を菌体表層に産生していた。また同抗原は*A. actinomycetemcomitans* Y4株と比較して、より強く*E. coli* DH5 α 株の菌体表層に結合していることが示唆された。
3. *E. coli* DH5 α 株内で同多糖体を発現させるために不可欠な領域は、クローニングした遺伝子断片の中央部に位置する約13 kb断片に含まれていた。同領域とその周辺領域の塩基配列の決定を行ったところ、同方向でかつ近接したORFが24個見つかри、これらのORFの多くはすでに報告のある他の菌種の菌体表層多糖の合成に関連のある遺伝子と高い相同性を示した。
4. ORF6、ORF7、ORF8及びORF9がコードするタンパク質は、相同性の高さから予測されたとおり、dTTPとD-グルコース-1-リン酸からdTDP-ラムノースの合成に関与する酵素であることが明らかとなった。
5. *A. actinomycetemcomitans* Y4株のSPAの合成に関与している遺伝子群の平均G+C比は、全染色体DNAの平均G+C比と比較して低かった。とりわけ、中央部の13個のORFを含む8.5 kb断片は平均G+C比が27%と著しく低かった。

謝 辞

本研究は、九州大学歯学部予防歯科学講座古賀敏比古教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導ならびに御校閲に深く感謝いたします。研究を遂行するにあたり、終始御指導さらに本論文の御校閲を賜りました中野善夫講師と山下喜久助教授に謹んで御礼申し上げます。また、レーザー顕微鏡や生体分子特異的相互作用測定機に関して、懇切丁寧に御指導していただいた山口登博士に心から御礼申し上げます。pSBA85を御提供くださいましたMonash大学微生物学講座Rajakumar博士に感謝致します。最後になりましたが、九州大学歯学部予防歯科学講座の皆様、厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- Amano, K., T. Nishihara, N. Shibuya, T. Noguchi, and T. Koga. 1989. Immunochemical and structural characterization of a serotype-specific polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 (serotype b). *Infect. Immun.* 57: 2942-2946.
- Amann, E., B. Ochs, and K. J. Abel. 1988. Tightly regulated tac promoters useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69: 301-315.
- Arakawa, Y., R. Wacharotayankun, T. Nagatsuka, H. Ito, N. Kato, and M. Ohta. 1995. Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae cps* region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid. *J. Bacteriol.* 177: 1788-1796.
- Asikainen, S., C.-H. Lai, S. Alaluusua, and J. Slots. 1991. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol. Immunol.* 6: 115-118.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523.
- Bliss, J. M., and R. P. Silver. 1996. Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol. Microbiol.* 21: 221-231.
- Bugert, P., and K. Geider. 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol. Microbiol.* 15: 917-933.
- Califano, J. V., H. A. Schenkein, and J. G. Tew. 1989. Immunodominant antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 in high-responder patients. *Infect. Immun.* 57: 1582-1589.
- Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable

- multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. 134: 1141-1156.
- Chu, S., and T. J. Trust. 1993. An *Aeromonas salmonicida* gene which influences A-protein expression in *Escherichia coli* encodes a protein containing an ATP-binding cassette and maps beside the surface array protein gene. *J. Bacteriol.* 175: 3105-3114.
- Dijkstra, A. J., F. Hermann, and W. Keck. 1995. Cloning and controlled overexpression of the gene encoding the 35 kDa soluble lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *FEBS lett.* 366: 115-118.
- Frosch, M., C. Weisgerber, and T. F. Meyer. 1989. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1669-1673.
- Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krauße, and C. Weisgerber. 1991. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol. Microbiol.* 5: 1251-1263.
- Gmür, R., H. McNabb, T. J. M. van Steenbergen, P. Baehni, A. Mombelli, A. J. van Winkelhoff, and B. Guggenheim. 1993. Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol. Immunol.* 8: 116-120.
- Grunstein, M., and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961-3965.
- Hammerschmidt, S., C. Birkholz, U. Zähringer, B. D. Robertson, J. van Putten, O. Ebeling, and M. Frosch. 1994. Contribution of genes from the capsule gene complex (*cps*) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in

- Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol. 11: 885-896.
- Higgins, C. F., I. D. Hiles, G. P. C. Salmond, D. R. Gill, J. A. Downie, I. J. Evans, I. B. Holland, L. Gray, S. D. Buckel, A. W. Bell, and M. A. Hermodson. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature 323: 448-450.
- Higgins, D. G., and P. M. Sharp. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene 73: 237-244.
- Hohn, B., and J. Collins. 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 11: 291-298.
- Holmes, D. S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Alal. Biochem. 114: 193-197.
- 池田克巳、石川烈、岡田宏、長谷川紘司. 1992. AAP歯周治療法のコンセンサス. クインテッセンス出版. 東京.
- Jiang, X.-M., B. Neal, F. Santiago, S. J. Lee, L. K. Romana, and P. R. Reeves. 1991. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (strain LT2). Mol. Microbiol. 5: 695-713.
- Kaplan, A. H., D. J. Weber, E. Z. Oddone, and J. R. Perfect. 1989. Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. Rev. Infect. Dis. 11: 46-63.
- Koga, T., H. Senpuku, K. Nakashima, Y. Ishihara, and T. Nishihara. 1990. Monoclonal antibody-coated latex agglutination assay for identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Zentralbl. Bakteriologie. 274: 91-99.
- 古賀敏比古. 1994. 「平成5年歯科疾患実態調査の概要」を分析する. 歯界展望. 84: 661-670.
- Kroll, J. S., S. Zamze, B. Loynds, and E. R. Moxon. 1989. Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in

- Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 171: 3343-3347.
- Kroll, J. S., B. Loynds, L. N. Brophy, and E. R. Moxon. 1990. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. Mol. Microbiol. 4: 1853-1862.
- Lazarevic, V., and D. Karamata. 1995. The *tagGH* operon of *Bacillus subtilis* 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichoic acids. Mol. Microbiol. 16: 345-355.
- Lipman, D. J., and W. R. Pearson. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441.
- Liu, D., A. M. Haase, L. Lindqvist, A. A. Lindberg, and P. R. Reeves. 1993. Glycosyl transferases of O-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: identification and characterization of transferase genes of groups B, C2, and E1. J. Bacteriol. 175: 3408-3413.
- Masoud, H., S. T. Weintraub, R. Wang, R. Cotter, and S. C. Holt. 1991. Investigation of the structure of lipid A from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 and human clinical isolate PO 1021-7. Eur. J. Biochem. 200: 775-779.
- Melo, A., and L. Glaser. 1968. The mechanism of 6-deoxyhexose synthesis. J. Biol. Chem. 243: 1475-1478.
- Morona, R., M. Mavris, A. Fallarino, and P. A. Manning. 1994. Characterization of the *rfa* region of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. 176: 733-747.
- Nakano, Y., Y. Yoshida, Y. Yamashita, and T. Koga. 1995a. Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors. Gene 162: 157-158.
- Nakano, Y., Y. Inai, Y. Yamashita, S. Nagaoka, T. Kusuzaki-Nagira, T. Nishihara, N. Okahashi, and T. koga. 1995b. Molecular and immunological characterization of a 64-kDa protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol. Immunol. 10: 151-159.

- Nishihara, T., T. Fujiwara, T. Koga, and S. Hamada. 1986. Chemical composition and immunobiological properties of lipopolysaccharide and lipid-associated proteoglycan from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.* 21: 521-530.
- Nishihara, T., N. Ueda, K. Amano, Y. Ishihara, H. Hayakawa, T. Kuroyanagi, Y. Ohsaki, K. Nagata, and T. Noguchi. 1995. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 α production in mouse marrow cultures. *Infect. Immun.* 63: 1893-1898.
- Page, R. C., T. J. Sims, L. D. Engel, B. J. Moncla, B. Bainbridge, J. Stray, and R. P. Darveau. 1991. The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 59: 3451-3462.
- Pavelka, M. S., Jr., L. F. Wright, and R. P. Silver. 1991. Identification of two genes, *kpsM* and *kpsT*, in region 3 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* 173: 4603-4610.
- Pavelka, M. S., Jr., S. F. Hayes, and R. P. Silver. 1994. Characterization of KpsT, the ATP-binding component of the ABC-transporter involved with the export of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *J. Biol. Chem.* 269: 20149-20158.
- Perry, M. B., L. L. MacLean, R. Gmür, and M. E. Wilson. 1996a. Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect. Immun.* 64: 1215-1219.
- Perry, M. B., L. M. MacLean, J.-R. Brisson, and M. E. Wilson. 1996b. Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur. J. Biochem.* 242: 682-688.
- Rajakumar, K., B. H. Jost, C. Sasakawa, N. Okada, M. Yoshikawa, and B. Adler. 1994.

- Nucleotide sequence of the rhamnose biosynthetic operon of *Shigella flexneri* 2a and role of lipopolysaccharide in virulence. *J. Bacteriol.* 176: 2362-2373.
- Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. H. Raetz, and P. D. Rick. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* 4: 495-503.
- Roberts, I. S., R. Mountford, R. Hodge, K. B. Jann, and G. J. Boulnois. 1988. Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 1305-1310.
- Robertson, P. B., M. Lantz, P. T. Marucha, K. S. Kornman, C. L. Trummel, and S. C. Holt. 1982. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.* 17: 275-283.
- Rosan, B., J. Slots, R. J. Lamont, M. A. Listgarten, and G. M. Nelson. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol. Immunol.* 3: 58-63.
- Saarela, M., S. Asikainen, S. Alaluusua, L. Pyhälä, C.-H. Lai, and H. Jousimies-Somer. 1992. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol. Immunol.* 7: 277-279.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Saporito, S. M., B. J. Smith-White, and R. P. Cunningham. 1988. Nucleotide sequence of the *xth* gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 4542-4547.
- Shine, J., and L. Dalgarno. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1342-1346.
- Sims, T. J., B. J. Moncla, R. P. Darveau, and R. C. Page. 1991. Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* recognized by patients with juvenile periodontitis and periodontally normal subjects. *Infect. Immun.* 59: 913-924.
- Slots, J., H. S. Reynolds, and R. J. Genco. 1980. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 29:1013-1020.
- Slots, J., L. Bragd, M. Wikström, and G. Dahlén. 1986. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontol.* 13:570-577.
- Smith, A. N., G. J. Boulnois, and I. S. Roberts. 1990. Molecular analysis of the *Escherichia coli* K5 *kps* locus: identification and characterization of an inner-membrane capsular polysaccharide transport system. *Mol. Microbiol.* 4: 1863-1869.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sreenivasan, P. K., D. J. LeBlanc, L. N. Lee, and P. Fives-Taylor. 1991. Transformation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by electroporation, utilizing constructed shuttle plasmids. *Infect. Immun.* 59: 4621-4627.
- Stevenson, G., B. Neal, D. Liu, M. Hobbs, N. H. Packer, M. Batley, J. W. Redmond, L. Lindquist, and P. Reeves. 1994. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J. Bacteriol.* 176: 4144-4156.
- Stroeher, U. H., L. E. Karageorgos, R. Morona, and P. A. Manning. 1992. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2566-2570.
- Sueoka, N. 1988. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2653-2657.

- Suzuki, J., A. Kondo, I. Kato, S. Hase, and T. Ikenaka. 1991. Analysis by high-performance anion-exchange chromatography of component sugars as their fluorescent pyridylamino derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 55: 283-284.
- Taichman, N. S., R. T. Dean, and C. J. Sanderson. 1980. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 28: 258-268.
- Takahashi, T., T. Nishihara, Y. Ishihara, K. Amano, N. Shibuya, I. Moro, and T. Koga. 1991. Murine macrophage interleukin-1 release by capsularlike serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 59: 18-23.
- Takeshita, S., M. Sato, M. Toda, W. Masahashi, and T. Hashimoto-Gotoh. 1987. High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* 61: 63-74.
- Tanner, A. C. R., R. A. Visconti, S. S. Socransky, and S. C. Holt. 1982. Classification and identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* by cluster analysis and deoxyribonucleic acid hybridizations. *J. Periodontal Res.* 17:585-596.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Tsukioka, Y., Y. Yamashita, T. Oho, Y. Nakano, and T. Koga. 1997. Biological function of the dTDP-rhamnose synthesis pathway in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 179: 1126-1134.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick., and N. J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:

945-951.

Wang, L., D. Liu, and P. R. Reeves. 1996. C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. *J. Bacteriol.* 178: 2598-2604.

Wilson, M. E., and R. E. Schifferle. 1991. Evidence that the serotype b antigenic determinant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 resides in the polysaccharide moiety of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 59: 1544-1551.

Yamaguchi, N., M. Kawasaki, Y. Yamashita, K. Nakashima, and T. Koga. 1995. Role of the capsular polysaccharide-like serotype-specific antigen in resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 63: 4589-4594.

Yamaguchi, N., Y. Yamashita, D. Ikeda, and T. Koga. 1996. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b-specific polysaccharide antigen stimulates production of chemotactic factors and inflammatory cytokines by human monocytes. *Infect. Immun.* 64: 2563-2570.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Yoshida, Y., Y. Nakano, Y. Yamashita, and T. Koga. 1997. The *gnd* gene encoding a novel 6-phosphogluconate dehydrogenase and its adjacent region of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* chromosomal DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 220-225.

Zambon, J. J., L. A. Christersson, and J. Slots. 1983a. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J. Periodontol.* 54: 707-711.

Zambon, J. J., J. Slots, and R. J. Genco. 1983b. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease.

Infect. Immun. 41: 19-27.

Zambon, J. J. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease.

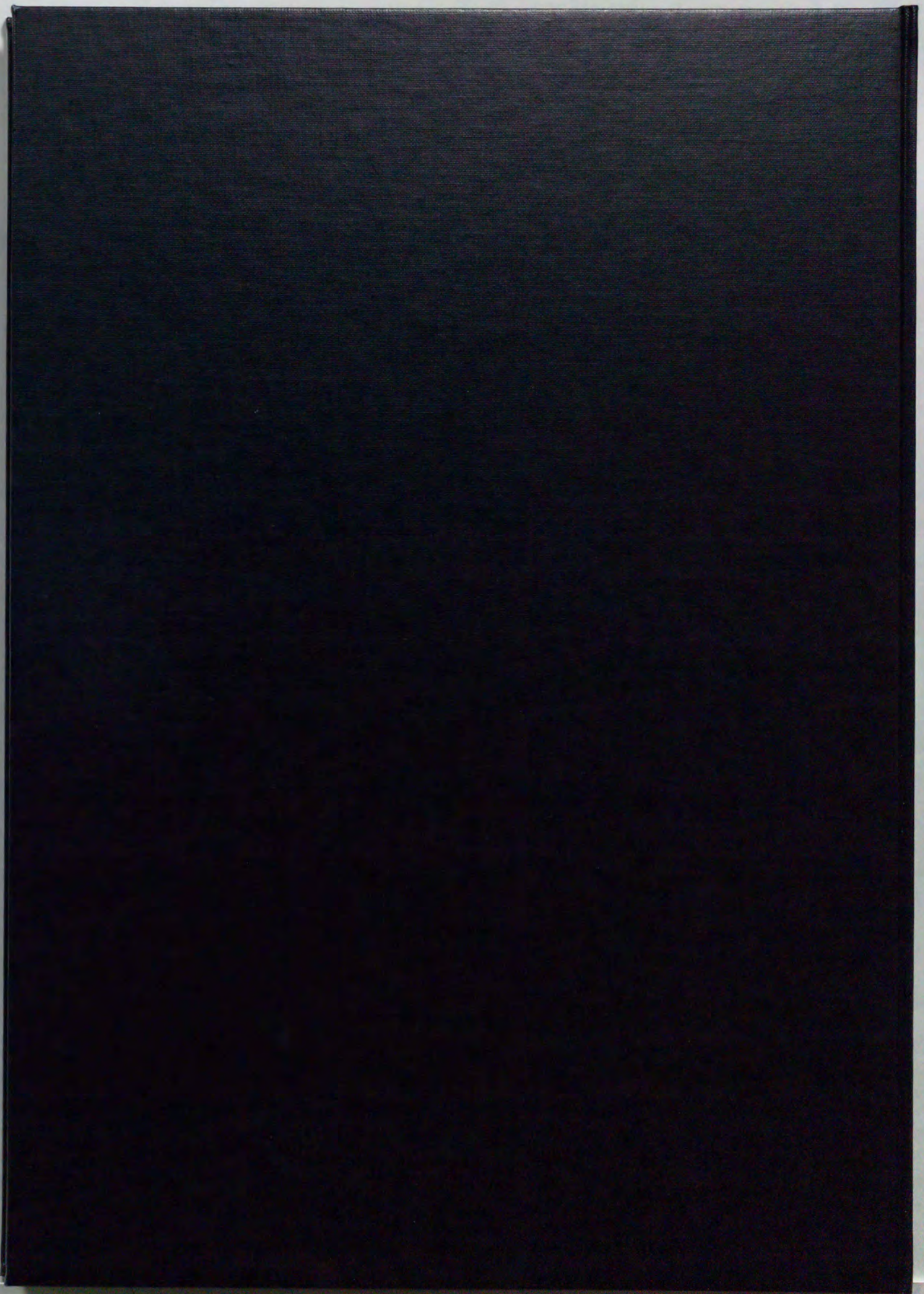
J. Clin. Periodontol. 12: 1-20.

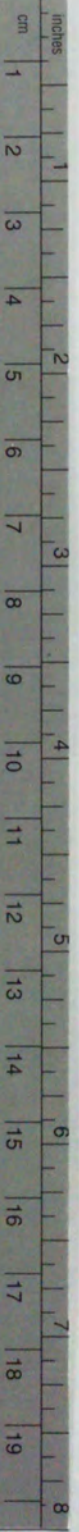
Zhang, L., A. Al-Hendy, P. Toivanen, and M. Skurnik. 1993. Genetic organization and

sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3:

similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to

the bacterial polysaccharide transport systems. Mol. Microbiol. 9: 309-321.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

