

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5714692号
(P5714692)

(45) 発行日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(24) 登録日 平成27年3月20日(2015.3.20)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N	33/566	(2006.01)	GO 1 N	33/566
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
GO 1 N	33/15	(2006.01)	GO 1 N	33/15
GO 1 N	33/50	(2006.01)	GO 1 N	33/50
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543

請求項の数 9 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-500475 (P2013-500475)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月22日 (2011.3.22)
 (65) 公表番号 特表2013-522638 (P2013-522638A)
 (43) 公表日 平成25年6月13日 (2013.6.13)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2011/054379
 (87) 國際公開番号 WO2011/117259
 (87) 國際公開日 平成23年9月29日 (2011.9.29)
 審査請求日 平成25年3月5日 (2013.3.5)
 (31) 優先権主張番号 10157397.0
 (32) 優先日 平成22年3月23日 (2010.3.23)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 506039900
 イーエムペーラーインスティトゥート・
 フューア・モレクラレ・ビオテヒノロギー
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
 テル・ハフツング
 I M B A - I N S T I T U T F U E R
 M O L E K U L A R E B I O T E C H N
 O L O G I E G M B H
 オーストリア、アーレオオオオオオオオ
 ドクトル・ボーアガッセ3番
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恒生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 瞳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 III型分泌機構の阻害剤の同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験化合物が3型分泌機構T3SSの機能を阻害する能力を有するか否かを決定する方法であつて、被験化合物をT3SSを有する細菌細胞と接触させ、

a. 第1工程で、分泌エフェクタータンパク質の量をその同種シャペロン分子との結合により測定し、該被験化合物で処理していない細胞由来のコントロール試料中の量と比較した該シャペロンと結合したエフェクタータンパク質の量の減少が該エフェクタータンパク質の分泌に対する該化合物の阻害効果を表す、該細菌細胞中のエフェクターまたは輸送体タンパク質の分泌を阻害する能力を試験し、

b. 第2工程で、T3SSニードル複合体を形成する構造成分の組み立てを阻害する能力を試験する、方法。 10

【請求項 2】

それぞれ該エフェクターがSptPおよびSipA-Flagから選択され、該シャペロンがSicPおよびInvBから選択される請求項1記載の方法。

【請求項 3】

分泌エフェクターまたは輸送体タンパク質の量をELISAにより測定する請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

ELISAを增幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイに変換し、高スループットフォーマットで実行する請求項3記載の方法。

【請求項 5】

T3SSニードル複合体を形成する構造成分の組み立てをモニターする方法であって、該ニードル複合体の組み立てが、それぞれ既存の構造成分[x-1]または成分[x-1]を含む予め形成された複合体と結合する時に、後で結合する構造成分[x]を検出することにより測定される方法。

【請求項 6】

該第2工程で、該ニードル複合体の組み立てが、それぞれ既存の構造成分[x-1]または成分[x-1]を含む予め形成された複合体と結合する時に、後で結合する構造成分[x]を検出することにより測定される請求項1記載の方法。

【請求項 7】

成分[x-1]の成分[x]への結合がELISAで測定され、成分[x-1]またはそれを含む複合体が固体支持体上に結合し、成分[x]が[x-1]と結合したときに検出される請求項5または6に記載の方法。

【請求項 8】

Salmonella typhimurium由来のPrgIまたは別のグラム陰性細菌由来のそのホモログが成分[x]であり、Salmonella typhimurium由来のPrgHまたは別のグラム陰性細菌由来のそのホモログが成分[x-1]である請求項5~7のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

化合物が構造成分[x]と構造成分[x-1]との結合に干渉することが示されており、被験化合物の構造が成分[x]および/または[x-1]の結晶構造内または該構造上にモデル化することにより最適化される請求項5または6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、III型分泌機構(T3SS)を標的とする抗菌剤の同定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗生物質は最も有効な薬剤の一つであるが、抗生物質は重大な問題、例えば病原細菌に特異性がないことにより正常細菌叢に影響を及ぼし、耐性菌の緊急事態を生じる。別の抗菌剤のサーチにおいて、T3SSは、多くのグラム陰性病原体の病原性に絶対的に必要な高度に保存された重要な病原性メカニズムであるため、このことがT3SSを魅力的な標的にし、新規治療薬の開発における有望な治療標的として発達した。

【0003】

III型分泌機構は、細菌毒素(「エフェクター」または「エフェクタータンパク質」)を以下のものを含む宿主に送達するための重要な細菌の病原性に必須の分子機械である: Salmonella enterica、Salmonella typhimurium、Salmonella typhi、Salmonella enteritica、すべての他のSalmonella種、Shigella spp(S. flexneriおよびS. dysenteriaeを含む)、Yersinia spp.(Yersinia pestis、Yersinia pseudotuberculosis、Yersinia enterocolitica)、腸管病原性E. coli(大腸菌)(EPEC)、腸管出血性 E. coli(EHEC)、Vibrio cholerae、Hafnia alvei、Bordetella sp.、およびChlamydia種。さらに、保存された分泌経路は、ウサギE. coli(RDEC-1)およびCitrobacter rodentiiなど動物病原体の病気に必要である。該保存された分泌経路は、種々の重要な植物病原体による病気の発生にも重要である。種々のグラム陰性病原体は、ヒトの病原体同様にIII型分泌機構を用いて作物の収穫高に経済的に重大な損害を与える。植物病原体には、Pseudomonas syringae、P. solanacearumおよびXanthomonas campestrisが含まれる。

【0004】

該分泌エフェクターは、細胞骨格力学、小胞輸送、細胞周期の進行、および転写を含む、真核細胞(哺乳動物細胞または植物細胞でありうる)の種々の機能を調節することができる能力を有する。感染は、軽度の頭痛や下痢から生命を脅かす疾患(例えば腸チフスまたは腺ペスト)に及ぶ臨床症状を生じる。T3SSの中心となるものはニードル複合体であり

10

20

30

40

50

、これは内部および外部細菌膜内に埋め込まれ、ペリプラズム空間に及び、ニードル様フィラメントにより細胞外環境に広がる。円筒形のニードル複合体(「インジェクティソーム(injectisome)」)は、細菌外皮と結合した多重環基部、および細菌表面から数ナノメートル突き出るニードル様伸長物を形成する構造タンパク質からなる。該ニードルは、別の構造物である内部ロッドを介して該基部に固定されているが、これは該ニードルフィラメントと共に、この分泌経路を移動するエフェクタータンパク質のためのパイプとして働くチャンネルを形成する(Marlovits et al.、2004、Science 306、1040-1042)。該ニードル複合体の組み立ては、基部構造の組み立てを最初にもたらす分離した工程で生じる。

【0005】

インジェクティソームの組み立てと操作には、細菌サイトゾル中に留まる小(12~18kDa)10)シャペロンが必要である(例えば、Ghosh、2004、Microbiol Mol Biol Rev 68: 771-795参照)。これらシャペロンのあるものは、インジェクティソーム(クラスIII)またはトランスロケーション(輸送)ポア(クラスII)の組み立てに関与するが、他のものはエフェクターを補助する。シャペロンの後のグループは、クラスIシャペロンとして分類され(Letzelter et al.、2006、The EMBO Journal(2006) 25、3223-3233)、「クラス1Aシャペロン」とも呼ばれる。これらシャペロンは、一般に1つのエフェクターと結合し、そのほとんどが同種エフェクターをコードする遺伝子と隣り合って位置する遺伝子によりコードされる。それらは、酸性(pI: 4~5)の通常二量体のタンパク質であり、短いN末端分泌シグナルのすぐ下流の最初の100アミノ酸内の同種エフェクターと結合する。それらは、常にではないがしばしば、そのパートナーエフェクタータンパク質をコードする遺伝子の次にコードされる。それらの配列相似性は低いが、その構造は非常に良く保存されている。それらの宿主細胞内への輸送前に、シャペロンは、インジェクティソームの部分であるATPアーゼによりエフェクターから除去される(Akeda and Galan、2005; Nature 437: 911-915)。

【0006】

T3SSの阻害剤を同定するための報告された方法のほとんどは、エフェクタータンパク質の分泌に注目し、レポーター系に依存する。WO2009/145829は、III型タンパク質分泌機構に依存して分泌される組換えレポータータンパク質(-ラクタマーゼ)に基づく高スループットスクリーニング法について記載しており、組換え細菌宿主細胞の外側に分泌されるレポータータンパク質の量の変化は、T3SSに対する被験化合物の阻害または活性化作用を示す。

【0007】

WO2009/137133は、一次スクリーニング工程として、被験化合物の分泌阻害について試験する同様のレポーター・アッセイと、次いで非特異的阻害剤を排除するための二次アッセイを含む方法について記載している。二次アッセイでは、被験化合物を、T3SSタンパク質の転写調節および/またはT3SSの構成成分の発現について試験する。

【0008】

WO2009/061491に記載のIII型分泌に影響を及ぼす化合物を同定するためのスクリーニング方法には、III型分泌機構を有する細菌のいわゆる「低カルシウム反応」に影響を及ぼす分子を阻害するためのアッセイが含まれる。一次スクリーニングアッセイは、所望によりレポーター系を用いて細菌の増殖を測定することに基づく。二次確認アッセイでは、タンパク質、すなわち、Yersiniaの場合はYOP(2 Yersinia外部タンパク質2)として知られるエフェクタータンパク質の分泌レベルに対する被験化合物の効果を測定する。

【0009】

Gauthier et al.、Antimicrobial Agents and Chemotherapy、Oct. 2005、4101-4109は、下痢の発生をもたらすヒトの病原体である腸管病原性大腸菌(EPEC)のエフェクタータンパク質EspBに対する被験化合物の効果をモニターするためのELISAに基づく高スループットアッセイについて記載している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

10

20

30

40

50

本発明の目的は、被験化合物が、T3SSの機能に影響を及ぼすか否かを決定することにより、T3SSに依存する細菌の病原性を決定するための新規方法を提供することである。具体的には、該新規方法は、ニードル複合体の機能に影響を及ぼす、すなわち、その構造部分の組み立てを妨げることにより非常に特異的な化合物を同定するための非常に感度の高いアッセイを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

すなわち、本発明は、被験化合物が3型分泌機構T3SSの機能を阻害する能力を有するか否かを決定するための方法であって、被験化合物をT3SSを有する細菌細胞と接触させ、
a. 第1工程で、該細菌細胞中のエフェクターまたは輸送体タンパク質の分泌を阻害する能力を試験し、

b. 第2工程で、T3SSニードル複合体を形成する構成成分の組み立てを阻害する能力を試験する、方法に関する。

【0012】

該第1工程で、分泌エフェクターまたは輸送体(トランスポーター)(「輸送体」または「輸送体タンパク質」はエフェクターが真核細胞の膜を横切るのを助けるタンパク質である)の量を、例えば、実験室規模で、電気泳動、次いでタンパク質染色により直接測定することができる。上清中のIII型分泌タンパク質の量を、該分泌タンパク質の1またはそれ以上に対する抗体を用いる免疫学的方法により検出することもできる。適切な方法には、限定されるものではないが、ウエスタンプロット、イムノドットプロット、およびELISAが含まれる。

【0013】

好ましくは、該第1工程のアッセイはELISAである。固定化工エフェクターに加えた抗体を直接標識するか、または過剰の第1抗体を洗浄除去後、モル過剰の、第1抗体の動物種のIgGに対する第2標識抗体を加えて間接的に検出することができる。

【0014】

常套的ELISAアッセイは、通常、例えば以下の当該分野でよく知られたプロトコールに従って行う：試験する試料、例えば細菌溶解物を固定化捕捉(またはコート)試薬と接触させ、インキュベーションする。固定化は、常套的に、アッセイ手順の前に、例えば水に不溶性のマトリックスまたは表面に吸着させることにより捕捉試薬を不溶化することにより達成される。固定化に用いる固相は、実質的に水に不溶性で免疫測定法に有用なあらゆる不活性支持体もしくは担体(例えば表面、粒子、ビーズ、多孔マトリックスなどの形の支持体を含む)でありうる。一般的に用いられる支持体の例には、小シート、Sephadex、塩化ポリビニル、プラスチックビーズ、およびポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどから製造されたアッセイプレートまたは試験チューブ(96ウェルマイクロタイタープレートを含む)、および微粒子物質、例えば濾紙、アガロース、架橋デキストラン、および他のポリサッカライドが含まれる。あるいはまた、反応性水不溶性マトリックス、例えば臭化シアン活性化炭化水素を用いることができ、該反応性物質は、捕捉試薬の固定化に適切に用いられる。好ましい態様において、固定化捕捉試薬でマイクロタイタープレートをコートし、特に用いるのに好ましい固相は一度に種々の試料を分析するのに用いることができるマルチウェルマイクロタイタープレートである。

【0015】

該固相を捕捉試薬でコートし、これを非共有または共有相互作用または物理的結合により固体支持体と結合させることができる。結合技術は当該分野でよく知られている。共有交互作用であれば、プレートまたは他の固相を、当該分野でよく知られた条件下で、例えば室温で1時間、捕捉試薬と共に架橋剤とインキュベーションする。

【0016】

コートしたプレートを、典型的には、結合部位に非特異に結合するブロッキング剤で処理し、結合部位を飽和させ、該プレートのウェルの過剰な部位への望ましくない結合を抑制する。適切なブロッキング剤の例には、例えばゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アル

10

20

30

40

50

ブミン、カゼイン、および脱脂乳が含まれる。

【0017】

コーティングおよびブロッキングの後、試料を固定化相に加える。充分な感度を得るために、加える試料の量は、固定化捕捉試薬が試料中の予期される遊離エフェクターの最大モル濃度のモル過剰となるようにすべきである。試料と固定化捕捉試薬のインキュベーション条件は、アッセイの感度を最大にし、解離を最小にするように選択する。次に、試料を除去し(このましくは「洗浄用緩衝液」で洗浄することにより)、捕捉されていないエフェクターを除去する。捕捉したエフェクターが続く工程である程度解離するかもしれない心配がある場合には、架橋剤または他の適切な試薬をこの段階で加え、結合したエフェクターを捕捉試薬に共有結合させることもできる。

10

【0018】

次に、固定化工エフェクターを、直接または間接的に検出可能な抗体と接触させる。抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい。抗体は、例えば蛍光標識され直接検出可能である。蛍光標識は、比色標識に比べて感度が高い。検出可能な抗体をビオチン化し、検出手段はアビジンもしくはストレプトアビジン- -ガラクトシダーゼ、およびMUG(4-メチルウンベリフェリル- -ガラクトシダーゼ)でありうる。

【0019】

好ましくは、遊離エフェクターの最大予測濃度に対してモル過剰の抗体を、洗浄後のブレートに加える。抗体の親和性は、少量の遊離エフェクターを検出することができるよう十分高くなければならない。

20

【0020】

次に、捕捉試薬と結合するエフェクターの量をエフェクターに結合した抗体を検出することにより測定する。このために、抗体を直接標識するか、過剰の第1抗体を洗浄除去後に、モル過剰の、第1抗体の動物種のIgGに対する第2抗体を加えることにより間接的に検出することができる。後者の間接アッセイでは、第1抗体に対する標識抗血清を試料に加え、in situで標識抗体を生成する。

【0021】

第1抗体または第2抗体に用いる標識は、結合パートナーの結合に干渉しないあらゆる検出可能な官能性がある。適切な標識の例には、直接標識することができる成分、例えば蛍光色素、化学ルミネッセント、および放射性標識、ならびに検出するために反応させるかまたは誘導体化する必要がある成分、例えば酵素を含むイムノアッセイに用いるための当該分野で知られた標識がある。そのような標識の例には、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および¹³¹I、蛍光体、例えば希土キレートまたはフルオレセイン、およびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ホースラディッシュパーオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、 -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソゾーム、糖オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、複素環オキシダーゼ、例えば色素前駆体を酸化するために過酸化水素を用いる酵素、例えばHRP、ラクトパーオキシダーゼ、またはミクロパーオキシダーゼと結合させたウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、ビオチン/ストレプトアビジン- -ガラクトシダーゼおよびMUG、スピニ標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが含まれる。これら標識とタンパク質またはポリペプチドを共有結合させるのに常套的方法を用いることができる。例えば、カップリング剤、例えばジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジンなどを用いて、上記、蛍光、化学ルミネッセント、および酵素標識で抗体を標識することができる。

30

【0022】

酵素標識を含むそのような標識の抗体に対する結合は、イムノアッセイ技術における当業者にとって標準的手順である。例えば、O'Sullivan et al. 「Methods for the Prepar

40

50

ation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay」、Methods in Enzymology中、J. J. Langone and H. Van Yunakis編、Vol. 73(Academic Press、New York, N.Y.、1981)、pp. 147-166参照。

【0023】

標識抗体を添加した後、洗浄して過剰の非結合標識抗体を除去し、次いで該標識に特異的な検出方法を用いて結合した標識の量を測定し、測定した量と試料中のエフェクターの量を相関させることにより結合抗体の量を測定する。例えば、酵素の場合は、測定した発色の量をエフェクターの量と相関させることができる。具体的には、HRPが標識である場合は、基質OPDを用い、490nmで吸光度を測定して色を検出する。

【0024】

ある例では、第1非標識抗体に対する酵素標識第2抗体を固定化相から洗浄した後、色または化学ルミネッセンスを固定化捕捉試薬と酵素の基質をインキュベーションすることにより発現させ、測定する。次に、分泌濃度の量を、同時の標準的エフェクター操作により生じた色または化学ルミネッセンスと比較して計算する。

【0025】

本発明に有用なELISAは、Gauthier et al.、Antimicrobial Agents and Chemotherapy、Oct. 2005、4101-410、およびW01999/45136に記載されている。簡単には、一夜培養の細菌をマイクロタイタープレートで継代培養し、目的の分泌エフェクタータンパク質を該プレートの表面に付着させる(あるいはまた、細菌を遠心分離して得た上清を用いることができる)。プレートに結合したエフェクター(または輸送体)をそれぞれ抗エフェクター抗体または抗輸送体抗体、およびパーオキシダーゼ結合二次抗体を用いて検出する。該試験は、o-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD)を加えて発色させ、反応を止めた後プレートリーダーで分析した。

【0026】

好ましい態様では、該第1工程において、分泌エフェクタータンパク質の量は、該タンパク質がその同種シャペロン分子と結合(相互作用)する能力により測定する。(本発明の目的では、この文脈において用語「シャペロン」は、上記クラスIシャペロン(またはクラス1Aシャペロン)(すなわち、該エフェクターの分泌に必要なシャペロン分子)と同義である。すなわち、この態様では、第1工程のアッセイはそのシャペロンと結合しているエフェクターの量を測定することに基づく。

【0027】

この態様では、分泌エフェクターの量は、結合パートナーと結合しているタンパク質をアッセイするのに適したあらゆる方法により測定することができる。

【0028】

ある態様では、該エフェクタータンパク質は、市販の標準的方法論を用いて上記原理に従って行うことができるELISA形アッセイにより検出される。例として、そのようなアッセイは、以下のとく行うことができる:シャペロンをマイクロタイタープレート上に固定化する(例えば、プレートに結合した、シャペロンに対する抗体またはその断片、またはシャペロン結合タグ(例えば、GST、His、Myc)に対する抗体による)。通常エフェクタータンパク質を分泌し、被験化合物で処理した細菌培養由来の溶解物または上清(同時に、非処理細菌由来のコントロール試料)を該プレートに加え、エフェクタータンパク質の量をエフェクタータンパク質に対する抗体および上記の検出可能な標識、例えば、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはフルオロフォアを有する抗体により検出する。図1Aは、分泌前の同種シャペロン(図ではPで示す)と結合しているエフェクターの分泌メカニズムを模式的に示す。図1Bは、シャペロンPをプレートにコートし、エフェクターを一次抗エフェクター抗体と結合する標識二次抗体の量を測定することにより測定するELISAを示す。

【0029】

好ましくは、ELISAを実施例1に記載のごとく用いる(本発明の目的では、そのようなELISAは「分泌ELISA」と呼ばれ、ELISAフォーマット以外を用いる場合は、そのようなアッセ

10

20

30

40

50

イは「分泌アッセイ」と呼ばれる)。分泌ELISAは、細胞上清から分泌分子、例えばエフェクター分子を直接検出することができる。主な利点は、24時間以内の培養増殖およびエフェクター両方の測定を含めて1マルチウェルプレートあたり96試料までを試験することができる。分泌ELISAは、現在、一人一日あたり384試料を試験するのに用いることができ、TCA(トリクロロ酢酸)沈殿およびウエスタンプロッティングの代わりに日常的に用いられる。例として、分泌アッセイは、エフェクター/シャペロンペアSptP/SicP(実施例1に記載)またはSipA-Flag/InvBを用いて確立することができる。

【0030】

Salmonella typhimuriumにより例示されるが、上記原理は、T3SSによりエフェクタータンパク質を分泌するあらゆる他の病原性グラム陰性菌に適用することができる。すなわち、該アッセイは、検出すべき各エフェクターに対する各シャペロンをコートする成分に用いてシャペロン/エフェクターペアに相当するあらゆるタンパク質の組み合わせに基づくことができる。該化合物の効果は、測定した量と、該細菌細胞を該化合物で処理していないコントロールの測定量を比較することにより分析することができる。

【0031】

Salmonella typhimurium以外の細菌由来のエフェクタータンパク質の例には以下のものがある: Yersinia spp. 由来のYopE、YopH、YpkA/YopO、YopP/YopJ、YopM、YopT; E. coli 由来のTir; P. aeruginosa 由来のExoS、ExoT、ExoY; Shigella spp. 由来のIpaA、IpaB、およびIpgD; P. syringae pv. Tomato 由来のAvrPto; Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria 由来のAvrBs2; およびX. campestris pv. Vesicatoria 由来のAvrBs3。例えば、Yersiniaのインヒビターを同定するためには、エフェクターSptP(Salmonella由来)の代わりに、シャペロンSycTをコートするタンパク質として用いることができ、検出するエフェクターはYopTである。シャペロンおよびエフェクタータンパク質(それらのタンパク質およびDNA配列を含む)、および組み合わせは文献で知られており、有用なエフェクターおよびエフェクター/シャペロンペアの例を表1~5に示す。

表1: *Salmonella enterica*; 表2: *Yersinia pestis/Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis*; 表3: *Escherichia coli*; 表4: *Shigella flexneri/Shigella sonnei*; 表5: *Chlamydia (Chlamydia pneumoniae/Chlamydia trachomatis/Chlamydia muridarum/Chlamydophila felis)*。

【0032】

特定のエフェクターのシャペロンが(まだ)同定されていない場合は、その存在を、例えばPallen et al.、2005; BMC Microbiol. 5:9に記載の生物情報学分析を用いて測定することができる。

【0033】

しばしば、細菌細胞とその宿主細胞を接触させるIII型タンパク質分泌機構の完全活性化が必要である。in vitro条件下ではT3SSの成分の発現は低いかもしれない。したがって、好ましくはWO2005/113791に記載のように、本発明の方法は、さらに、細菌細胞の外に分泌されたエフェクターの量を検出する工程の前に、III型タンパク質分泌機構を活性化する工程を含む。III型タンパク質分泌機構の活性化工程は、宿主細胞を被験化合物に暴露する前または後に行うことができる。例えば、細菌細胞をその真核宿主細胞と直接接触させるか、または温度、浸透圧、栄養素、二価カチオン(Ca^{2+})、pH値、および増殖期などのin vitroの実験条件を選択して適用することにより、特定の細菌細胞中でIII型タンパク質分泌機構の活性を増大するための方法は当業者に知られており、WO2005/113791に記載されている。例えば、in vitroのYop分泌をもたらすために、Yersiniaを、一般的には、 Ca^{2+} 除去培地で、28℃で増殖させ、次いで37℃に移す。Yersinia spp.と同様に、P. aeruginosaにおけるタンパク質の分泌は、低 Ca^{2+} 条件下で活性化される。37℃でShigellaまたは腸管病原性大腸菌を増殖させるとそのT3SSが活性化する。Salmonella typhimuriumについて、SPI-1 III型タンパク質分泌機構は、好ましくは、in vitroで、低酸素、高浸透圧、および弱アルカリ性(pH8)条件下で活性化される。

【0034】

10

20

30

40

50

好ましい態様において、本発明の方法の第1工程は、高スループットフォーマットで行うスクリーニング法であり、このための種々の有用なアッセイが市販されている。

【0035】

好ましい態様によれば、該高スループットアッセイは、ELISAアッセイ(いわゆる「Alpha aLISAs」)の変換に適した、容易に自動化される高感度のホモジニアスアッセイを可能にする、ビーズベースのアルファ技術(「増幅ルミネッセント近接ホモジニアスアッセイ」; PerkinElmer)を利用する。

【0036】

この技術は、いわゆるドナービーズとアクセプタービーズの近接に依存するシグナルに基づく。AlphaScreenでは、バイオ結合のための官能基を提供するヒドロゲルの層でコートする「ドナー」ビーズと「アクセプター」ビーズを使用する。該ドナービーズは、さらに、680nmで励起すると一重項酸素を発生する光増感層でコートされる。該ビーズをごく接近させると、一重項酸素の半減期はアクセプタービーズに伝達され、化学ルミネッセンスを生じさせるのに充分な長さである。

10

【0037】

例として、エフェクターが、直接、すなわち、そのシャペロンに結合することなく検出される場合は、該アッセイは、該エフェクター上の異なるエピトープを認識する2つの抗体を必要とする、いわゆるサンドイッチフォーマットである。一方の抗体は、ビオチン化され、ストレプトアビジンコートされたドナービーズにより捕捉される。第2抗体は、アクセプタービーズと結合する。エフェクターの存在は、ドナービーズとアクセプタービーズをごく接近させるイムノサンドイッチを生じる。エフェクターの濃度が高いと、ドナー-アクセプターイムノサンドイッチが形成され、シグナルの増加をもたらす。

20

【0038】

該アッセイをエフェクターとその同種シャペロンとの相互作用に基づく態様に従って実施する場合は、例として、一方のビーズはシャペロンを有し、他のビーズは抗エフェクター抗体を有する。該シャペロンをビーズと直接結合させるか、またはストレプトアビジンコートした標準ビーズを用い、これにビオチン化シャペロン分子を結合させる。

【0039】

検出は直接的でも間接的でもよく、直接アッセイフォーマットでは、抗エフェクター抗体またはシャペロンをビーズ上に直接結合させる。これは、アッセイをすぐに行える利便性をもたらす。間接アッセイでは、二次抗体またはプロテインAをビーズと結合させる。この方法は、一次抗体が非常に高価であるか入手困難である場合、その使用を最小限にする。

30

【0040】

例として、該アッセイは、例えば1時間、試料をビオチン化シャペロンでコートしたビーズおよび抗エフェクター抗体でコートしたビーズとインキュベーションすることにより二段階の反応として行うことができる。これに次いでストレプトアビジンで共有結合的にコートしたビーズと30分間インキュベーションする。インキュベーション工程の後、ビーズ内で化学ルミネッセンス反応から生じた光を定量する。該アッセイは、試料容量5μLの384ウェルプレート中で行うことができる。

40

【0041】

好ましくはないが、他の高スループットフォーマット用のアッセイタイプは、蛍光検出技術、例えば時間分解蛍光アッセイ、例えば解離増強ランタニドフルオロイミノアッセイ(DELFIA)または蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)から選ばれる。DELFIAは、緩衝剤、培地、試薬、または化合物などのアッセイ成分からのバックグラウンドの干渉を避けるため蛍光寿命の長い(>100μs)ランタニドキレートを用いる。標識は、窒素レーザーまたはフラッシュランプからUV範囲の光を吸収し、用いるランタニドに応じて500~700nmの蛍光を放射する。このアッセイは、洗浄工程を含むが、この欠点は、ある場合には検出性が高い利点の代償として許容されるかもしれない。

【0042】

50

市販のDELFIAキットの大部分は、非競合的「サンドイッチ型」アッセイに基づく。例として、本発明では、シャペロン分子は固体支持体と結合するが、抗エフェクター抗体は例えばユーロピウムで標識される。測定したEuの量は、シャペロンと結合したエフェクターの量と直接相関する。

【0043】

さらなる局面において、本発明は、T3SSニードル複合体を形成する構造成分の組み立てをモニターする方法であって、ニードル複合体の組み立てを、それぞれ、既存の構造成分[x-1]、または成分[x-1]を含む予め形成された複合体と結合する場合に、後で結合した構造成分[x]を検出することにより測定する方法に関する。

【0044】

被験化合物がT3SSの機能を阻害する能力を有するか否かを検出するための本発明の方法において、この方法は第2工程に相当する。

【0045】

該第二工程(本発明の目的において「構造アッセイ」、またELISAフォーマットの場合は「構造ELISA」とも呼ぶ)において、第1工程からの陽性ヒット、すなわち、エフェクターまたは輸送体の分泌を阻害する化合物の、ニードル複合体を形成する構造成分の組み立てを阻害する能力について試験する。このアッセイ工程は、組み立てが、構造成分[x]が、それぞれ既存の構造成分[x-1]または成分[x-1]を含む予め形成された複合体と結合する段階的プロセスであるということを利用する。

【0046】

*Salmonella typhimurium*によって例示すると、基部構造は、構造成分PrgH、PrgK、およびInvGにより形成されるが、PrgIおよびPrgJは、天然の組み立ての連鎖において基部が形成された後に加えられ、ニードルおよび内部ロッド基部構造を構成する。

る。この配列に基づけば、例として、PrgIは成分[x]でありうるが、PrgHは[x-1]を表す。あるいはまた、PrgKまたはInvGは、成分[x-1]、またはPrgHおよびPrgKからなる複合体、または3つ全ての基部成分PrgH、PrgK、およびInvGを含む複合体を表しうる。これら2つの構造成分により例示されるように、該アッセイは、PrgHが試験プレート上に捕捉され、PrgHを含む予め形成された基部と結合するとPrgIが検出されるように設計される。図2Aは、インジェクティソームの組み立てを模式的に示す。図2Bは、PrgHがプレートと結合し、ニードルフィラメント成分PrgIの結合を、一次抗PrgI抗体と結合する標識二次抗体の量を測定することにより測定されるELISAを例示する。

【0047】

該第二工程の構造ELISAアッセイを行うために、例として、標識PrgH、例えばHis標識PrgHをコードするプラスミドを保持する*Salmonella typhimurium*細胞を該被験化合物の存在下または非存在下で増殖させる。該細胞を溶解し、溶解物をニッケルでコートした試験プレートに加え、細菌溶解物中に含まれるHis標識PrgHを試験プレートに結合させる。PrgHを該プレートと充分な時間結合させ、次いでプレートを洗浄する。次の工程において、プレートのPrgIの存在をアッセイする。被験化合物の非存在下(またはPrgIと予め形成された基部構造との結合に影響を及ぼさない被験化合物の存在下)で、PrgIは、予め形成された複合体と結合し、一次抗PrgI抗体および検出可能な標識を有する二次抗体により検出することができる。あるいはまた、構造成分[x-1]は、His-標識融合タンパク質として発現するかわりに、GST抗体でコートされたプレートと結合する別の標識、例えばGST標識(ヒトグルタチオンS-トランスフェラーゼ)を有することができる。他の一般に用いられる融合標識には、HA-標識、MBP、Myc-標識がある。

【0048】

構造アッセイが、予め形成された基部複合体を有するPrgIの組み立てに対する阻害効果を示さない場合は、*Salmonella*由来の構造成分[x-1]/[x]の他の組み合わせ(例えば、成分[x-1]としてPrgH/PrgK複合体および成分[x]としてInvG)を試験する。

【0049】

被験化合物のPrgIの結合に対する阻害効果に関する否定的な結果は、T3SSの基部と結合

10

20

30

40

50

する該ニードル中のタンパク質を検出するのに必要なATPアーゼに対する被験化合物の阻害効果によるかもしれない。ATPアーゼに対するそのような阻害効果は、確認され、さらに、例えば、該化合物が触媒機能を阻害するか否か、または該酵素の別の部分を標的とするか否かをみいだすために分析することができる。そのような分析結果は、化合物をその細菌のT3SS関連ATPアーゼに特異的な阻害剤として最適化するための出発点として有用である。

【0050】

Salmonella typhimuriumによって例示するが、構造ELISAの上記原理は、T3SSを用いるあらゆる他の病原性グラム陰性菌に適用することができる。すなわち、該構造アッセイは、成分[x-1]を、コートした成分として、また後で組み立てられるタンパク質[x]を、検出する成分として用いて該ニードル複合体を形成するあらゆる構造成分を利用することができる。例として、Shigella flexneriの阻害剤を同定するにはPgHの代わりに成分mxiGを、コートされたタンパク質として用いることができ、PrgIの代わりにmxiHが検出すべき成分である。各成分は文献から知られており、本発明の構造アッセイに用いることができるPrgH、PrgI、およびInvGに対応する構造タンパク質の例を表6に示す。他の構造タンパク質の相同体(ホモログ)は文献に記載されている。

10

【0051】

特定の細菌のT3SSの阻害剤であることが同定された化合物が、別のグラム陰性菌のT3SSもブロックするか否かを試験することができる。通常、該化合物は、最初に、上記方法に従ってその他の細菌のエフェクターまたは輸送体の分泌を阻害する能力について試験することができる。その結果が肯定的な場合は、最初の細菌におけるある種の組み立て工程に干渉することが示された化合物は第2の細菌の同じ組み立て工程を阻害すると予期されるかもしれない。したがって、第2細菌の構造アッセイは、第1細菌の構造成分とホモローガスな構造成分を含むであろう。第2細菌の阻害剤としての化合物の特異性を得るために、該化合物を2つの細菌のいずれかの関連構造成分にモデル化する。

20

【0052】

本発明の方法は、インジェクティソームの組み立てにおける分離した工程に干渉する特異性の高いT3SSの阻害剤の同定を可能にする。ある化合物が構造成分[x]の成分[x-1]に対する結合と干渉することが示されたら、これら成分の結晶構造を得、被験化合物の構造を該構造にまたは該構造を用いてモデル化することにより最適化することができる。

30

【0053】

さらなる態様によれば、阻害剤は、構造設計によりde novoで設計することもできる。すなわち、さらなる態様において、本発明は、T3SSの構成成分の構造座標により定義された構造と結合するかまたは関連する被験化合物、すなわち、原子構造モデルを用いて2つの成分が組み立てられる部位と空間的に適合する化合物の能力を測定する方法に関する。好ましくは、特定の組み立て工程と相互作用するように設計または選択した化合物は、成分[x]および/または[x-1]と結合し、3次元構造および該組み立て部位と適合する幾何学的配置を推定することができる。

【0054】

構造成分の組み立て部位と特異的に結合(例えば高親和性で)することによりT3SSモジュレーターである化合物を設計する方法も、典型的にはコンピュータで行う。それは、原子モデルを作製することができるプログラムを有するコンピュータの使用を含む。X線結晶学的データを用いるコンピュータプログラムは、特にそのような化合物を設計するのに有用である。プログラム、例えばRefmac(Collaborative Computational Project, Number 4により配布された)を用いて、T3SS構造成分またはその部分の3次元モデル断片を作製することができる。分子の三次元構造を表現するために現在利用することができるSYBYL(Tripos, Inc.)またはMOE(Chemical Computing Group, Inc.)などの多くのコンピュータプログラムがある。一般的に、これらプログラムは、分子の三次元構造の座標、すなわち、例えば、x、y、およびz軸に沿った各構造成分の各原子の数的割り当て、またはアミノ酸の相対的構造座標により定義される結合部位の各原子の数的割り当て、そのような座標を表現

40

50

する手段(例えば視覚的表示)、そのような座標を修正する手段、およびそのような修正した座標を有する分子の画像を表現する手段を入力するために提供される。好ましい表現手段は当業者によく知られている。

【 0 0 5 5 】

コンピュータープログラム、例えば、Glide(Schroedinger)、INSIGHT(Accelrys、Burlington、MA)、GRASP(Anthony Nicholls、Columbia University)、Dock(Molecular Design Institute、University of California at San Francisco)、およびAuto Dock(Accelrys)は、新規構造を導入するさらなる操作と能力をもたらす。

【 0 0 5 6 】

各構造成分の結晶を得るために、当業者は多くの方法を利用することができる。通常用いられるポリペプチド結晶法には以下の技術が含まれる：バッチ、懸滴、シードイニシエーション、および透析。これら方法のそれぞれにおいて、過飽和溶液の維持による核形成後、連続的結晶化を促進することが重要である。バッチ法において、ポリペプチドを沈殿剤と混合して過飽和を達成し、次いで管を密封し、結晶が出現するまで放置する。透析法では、ポリペプチドを密封透析膜中に保持し、沈殿剤を含む溶液中におく。膜を横切る平衡化によりポリペプチドと沈殿剤の濃度は増加し、ポリペプチドは過飽和レベルに達する。

【 0 0 5 7 】

結晶の形成は、pH、温度、生物高分子の濃度、溶媒の性質、および沈殿剤、ならびに加えるイオンやタンパク質のリガンドの存在を含む多くの種々のパラメーターに依存する。多くの日常的結晶実験は、X線回折分析に適した結晶を生成する組み合わせについてこれらのパラメーターすべてをスクリーニングする必要があるかもしれない。結晶化ロボットを自動化し、多数の結晶実験の再現性のあるセットアップ作業をスピードアップすることができる(例えばUS 5,790,421参照)。

【 0 0 5 8 】

コンピューター適合分析により同定した候補化合物の効果を、上記のような標準的細胞アッセイもしくは無細胞アッセイで試験することによりさらにコンピューター的または実験的に評価することができる。

【 0 0 5 9 】

T3SSの阻害剤である本発明の方法により同定された化合物を、さらに毒性試験により動物疾患モデルを用いて試験する。T3SSをブロックする化合物を、関連動物疾患モデル、例えばウサギでEPEC/EHEC、マウスではS. typhimuriumを用いて試験することができる。化合物は、典型的には当業者に知られた標準的方法を用いてマウスに対する毒性を最初に試験する。最初に、該薬剤の薬物動態を薬剤の経口摂取後数時間以内の血液中の薬剤レベルを測定することにより試験する。この情報は、該化合物のバイオアベイラビリティの目安をもたらす。毒性試験は、最大耐容用量を決定するためにも行う。このために増加する濃度の薬剤を1000mg/kgのレベルまで動物に投与する。

【 0 0 6 0 】

動物疾患モデルにおける初期の試験は、例えば、EPEC介在疾患の阻害により行うことができる。初期の毒性およびバイオアベイラビリティ試験が完結したら、動物感染モデルを最も有望な化合物を用いて試験する。これら標準的アッセイを用い、ウサギにおけるRDEC-1(ウサギEPEC病原体)およびベロトキシンを含むRDEC-1(よく知られたEHEC動物モデル)に対する有望な化合物の効果を測定する。下痢の量を測定し、感染動物において薬剤の有無における定着(コロニー形成)の程度を病理学的に検査する。これらの試験は、III型分泌化合物がこれら感染の結果に影響を及ぼすことができるか否かを示す。

【 0 0 6 1 】

本発明の方法によりSalmonella typhimuriumのT3SSに対する効果があることが示された化合物を、WO1999/045136に記載のごとく動物疾患モデルで、ネズミ腸チフスモデルにおいてSalmonella typhimurium疾患の阻害を測定することにより試験する。Balb/CマウスにおけるS. typhimurium感染はネズミ腸チフスを生じ、動物は最終的に死に至る。経口(LD_5)

10

20

30

40

50

$_{50}=10^6$)と静脈内($LD_{50}=10^2$)の2つの感染経路を用いる。そのかわりに、動物を種々の時点でと殺し、肝臓と脾臓をホモゲナイズし、これら臓器中のS. typhimurium数をLeung et al.(Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88: 11470-4, 1991)の方法に従って計算することができる。この技術は感染性の指標である。S. typhimuriumの病原性を阻害する阻害剤の能力を試験するため、該マウスに、経口およびIV感染と同時に種々の用量の化合物を与える。該用量は毒性試験とバイオアベイラビリティ試験の結果に依存する。これら化合物の臓器定着率を変化させる能力は、これら化合物の潜在的抗菌療法剤としての有効性の優れた指標である。

【図面の簡単な説明】

【0062】

10

【図1A】同種シャペロンと結合するエフェクターの分泌メカニズム。

【図1B】同種シャペロンと結合したエフェクターを検出するための分泌ELISA。

【図2A】インジェクティソームの組み立てのメカニズム。

【図2B】組み立てられたニードル複合体を検出するための構造ELISA。

【実施例1】

【0063】

同種シャペロンSicPと結合したエフェクタータンパク質SptPを検出するための分泌ELISA

GST-SicPをE. coli(BL21、プラスミドX)中で発現させ、該細胞を溶解させ、該タンパク質をGST-トラップカラムを用いる高圧液体クロマトグラフィ(HPLC)により精製する。プレコーティングのためのSicPの最終タンパク質濃度はTBS中60 μ g/mlである。96ウェル平底マルチウェルプレート(300 μ l、Microtest(登録商標)96ウェルELISAプレートクリア、BD Falcon、US)を、1ウェル当たり100 μ lのTBSで洗浄し、次いで室温で2時間または4度一夜、ゆっくり振盪させながら溶液中の100 μ lのSicPでプレコーティングする。全ての液体を除去し、プレートを-80度保存する。ELISAを保存期間1年以下のプレートで行う。細菌を、1.8ml LB増殖培地(0.3M NaCl、0.012%アラビノーズ、抗生物質)を入れた2ml深ウェルプレート(Riplate(登録商標) sw 2ml、Ritter)中で少なくとも16時間増殖させる。4000gで15分間、細胞をペレットにして培養上清を得る(Multifuge 3 SR、Heraeus、UK)。

【0064】

プレコーティングしたプレートを、濃縮を避けるため紙で包み、室温に温める。インキュベーション工程中、プレートをアルミホイルで被い、攪拌機上に置き、プロトコールは室温で最も良く実施される。洗浄工程は200 μ lのPBS-T/ウェルを添加し、除去することからなる。PBS中の300 μ l 3%ウシ血清アルブミン(BSA)で1時間ブロックして非特異結合を最小限にし、次いで、洗浄工程なしにプロッキング溶液を除去する。100 μ lの培養上清をエフェクタータンパク質を捕捉するために1時間口ードし、次いで3回洗浄工程を行う。10 μ lの第1抗体希釈液(1:3000マウスモノクローナル抗SptP、PBS-T中)を1時間加え、次いで3回洗浄工程を行う。100 μ lの第2抗体希釈液(1:15000ホースラディッシュペオキシダーゼ(HRP)結合ウサギ抗マウス)を1時間加え、次いで3回洗浄工程を行う。最終検出工程のために、100 μ lの新鮮調整基質を適用する。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を、ジメチルスルホキシド(DMSO)に10mg/mlで溶解して100xストック溶液として調製する。ワーキング溶液を、100 μ lの100xストック溶液、2 μ lの30% H₂O₂、および10mlの0.1Mクエン酸緩衝液(pH6)を混合して調製し、室温で適用する。青色が発色している間に反応速度論をプレートリーダー(GENios Pro、Tecan、US)を用い640nmで測定する。明らかな青色が表示されたらすぐに25 μ lの2M硫酸(H₂SO₄)で反応を止め、450nmで吸光度を測定する。

【0065】

上記アッセイを、HTSフォーマット、例えばAlphaScreenに変換し、および/または他のグラム陰性菌の阻害剤、該細菌由来のエフェクターおよびエフェクター/シャペロンペアを同定するために用いることができる。実施例を表1~5に示す。

【0066】

表1

Salmonella enterica			
エフェクター	AccNr	シャペロン	AccNr
SptP	P74873	SicP	O85300
SopB	O30916	SigE	O30917
SopA	B5QZK6	InvB	P0A1N0
SopE2	Q7CQD4	InvB	P0A1N0
SipA	Q56027	InvB	P0A1N0
SopE	O52623	InvB	P0A1N0
SipB	Q56019	SicA	P69066
SipC	Q56020	SicA	P69066
SseF	O84951	SscA	O84946
SseB	Q7BVH7	SpiC	P74863
SseC	O84947	SpiC	P74863
SseL	Q8ZNG2	SrcA	Q8ZNP3
PipB2	D0ZTZ7	SrcA	Q8ZNP3
AvrA	O30621	----	
CopR	Q8ZQ53	----	
SteA	Q8ZPD7	----	
SteB	Q8ZPA6	----	
SteC	Q8ZP57	----	
PipB	Q8ZQ59	----	
SifA	Q56061	----	
SifB	Q9KIB9	----	
SlrP	Q8ZQQ2	----	
SsaH	Q9ZEF4	----	
SsaI	Q9ZEF3	----	
SsaJ	P74852	----	
SseG	O84952	----	
SseI	Q8ZQ79	----	
SseJ	Q9FD10	----	
SspH1	D0ZVG2	----	
SspH2	D0ZPH9	----	
SteA	Q8ZPD7	----	
SteB	D0ZI38	----	
SteC	Q8ZP57	----	
SipD	Q56026	----	
SseD	Q9R803	----	
SpvB	C0Q8H0	----	

10

20

30

40

Yersinia			
エフェクター	AccNr	シャペロン	AccNr
YopN	P68640	SycN/YscB	P61380/Q56973
YopT	O68703	SycT	P0C2V9
YopE	P31493	SycE	Q79NJ9
YscX	P0C2N4	YscY	P61417
YopB	Q06114	SycD	C5IZG5
YopD	Q06131	SycD	C5IZG5
YopH	P08538	SycH	Q56934
YopO	Q93KQ6	SycO	Q84GR4
YopT1	P0C2N1	---	
YpkA	Q05608	---	
LcrV	Q3I759	---	
YopP	O52162	---	
YopM	P17778	---	
YopJ	A1JUC5	---	
VirG	A1JU90	---	
YsaH	A1JQC0	---	
YspB	A1JQ86	---	
YsaW	A1JQA7	---	
TyeA	A9R9I1	---	
YopR	D1U2F5	---	
YsrR	Q9KKI8	---	
YitR	Q8CLV0	---	
YitA	Q8D1P8	---	
YitB	Q8D1P7	---	
YitC	Q8D1P6	---	
YipA	Q7CL72	---	
YipB	Q8CLU9	---	

10

20

30

【 0 0 6 8 】

表3

Escherichia coli			
エフェクター	AccNr	シャペロン	AccNr
SepD	Q5WME1	---	
Map	B8ZYG0	CesT	Q47015
SepZ	B8ZYN7	CesT	Q47015
Tir	Q9KWH9	CesT	Q47015
EspD	Q7DB81	CesD2	O52150
EspF	Q7DB85	CesF	C6UYM0
EspB	Q8XC86	CesAB	O52124
EspD	Q7DB81	CesD	Q9AJ22
EspA	Q7DB80	CesAB	O52124
EspB	Q8XC86	CesD	Q9AJ22
NleA	A9ZNG8	CesT	Q47015
NleH	A9ZNE5	CesT	Q47015
NleF	C6USQ4	CesT	Q47015
---		Rorf8	C8UFL9
---		YgeG	C8UAJ9
EspH	B8ZYG2	----	
EspJ	C6UYI2	----	
NleA1	A1KWP2	----	
NleA2	A1KWP3	----	
NleA3	A1KWP4	----	
NleA4	A1KWP5	----	
NleA5	A1KWP6	----	
NleA6-1	A1KWP7	----	
NleA6-2	A1KWP8	----	
NleA7	A1KWP9	----	
NleA8-1	A1KWQ0	----	
NleA8-2	A1KWQ1	----	
NleA9	A1KWQ2	----	
NleA10	A1KWQ3	----	
NleA11	A1KWQ4	----	

10

20

30

【 0 0 6 9 】

表4

Shigella			
エフェクター	AccNr	シャペロン	AccNr
IpaA	P18010	SpaK	P35530
IpgB1	Q6XVY7	SpaK	P35530
OspC3	Q3YTS0	SpaK	P35530
OspB	Q3YTY8	SpaK	P35530
IpaB	P18011	IpgC	P0A2U4
IpaC	P18012	IpgC	P0A2U4
IcsB	P33546	IpgA	P33547
IpgD	Q07566	IpgE	Q6XVY3
OspF	Q8VSP9	---	
VirA	Q3YTK0	---	
OspC1	Q3YTU3	---	
OspC2	Q3YTS7	---	
OspC3	Q3YTS0	---	
OspD1	Q3YTX0	---	
OspD2	Q3YTY4	---	
OspD3	Q3YTU2	---	
OspE1	Q9AJU4	---	
OspE2	Q9AJW6	---	
IpaH3	Q83RJ4	---	
OspG	Q3YTH2	---	
OspE1	Q327E9	---	
OspE2	Q3Y TU8	---	
IpaH9.8	O85159	---	
IpaH4.5	P18009	---	
IpaH7.8	P18014	---	

10

20

30

【 0 0 7 0 】

表5

Chlamydia			
エフェクター	AccNr	シャペロン	AccNr
CopB	O84582	Scc2(SycD)	A9NIN9
CopB2	O84583	Scc3(SycD)	Q9PJG4
CT694	O84700	----	
pkn5	O84680	----	
Tarp	Q6GX35	----	
IncA	O69196	----	
IncB	Q9Z8P7	----	
IncC	Q3KMC9	----	
CopN	Q9Z8L4	----	
CPn0206	Q9Z8X8	----	
CPn0330	Q9Z8K8	----	
CPn0374	Q9Z8G9	----	
CPn0474	Q9Z877	----	
CPn0490	Q9Z861	----	
CPn0648	Q9Z7Q6	----	
CPn0671	Q9Z7N3	----	
CPn0705	Q9Z7K0	----	
CPn0725	Q9Z7I0	----	
CPn0761	Q9Z7E5	----	
CPn0764	Q9Z7E2	----	
CPn0770	Q9Z7D6	----	
CPn0774	Q9Z7D2	----	
CPn0808	Q9Z798	----	
CPn0809	Q9Z797	----	
CPn0821	Q9Z785	----	
CPn0853	Q9Z753	----	
CPn0859	Q9Z747	----	
CPn0879	Q9Z727	----	
CPn1005	Q9Z6Q4	----	
CPn1019	Q9Z6P0	----	
CPn1020	Q9Z6N9	----	
CPn1022	Q9Z6N7	----	
CPn1032	Q9Z6M7	----	
----		Scc1(SycE1)	O34021
----		SycE2	
----		SycE3	
----		lcrH-2	Q9Z6N8

【実施例2】

【0071】

PrgIのPgH含有基部要素の結合を検出するための構造ELISA

本実験で用いる方法により、完全に組み立てられたニードル複合体を高スループット速度でモニターすることができる。該方法は、ニードル複合体(PrgH-ポリ-ヒスチジンタグ)のNi-NTAプレート上への捕捉、および抗PrgI抗体を用いるニードルフィラメントの検出に

10

20

30

40

50

基づく。これにより完全に組み立てられたニードル複合体のみが検出される。

【0072】

araBADプロモーター下で転写調節因子hilAを有する無鞭毛性Salmonella typhimurium S B906株に、C末端ポリヒスチジンタグ(His₁₈)を有するPrgHを保持するプラスミドを補う。細菌を、1.8ml LB(0.3M NaCl、0.012% アラビノース、抗生物質)を含む2ml深ウェルプレート(Riplate(登録商標) sw 2 ml、Ritter)中で少なくとも18時間増殖させる。細胞を400 0gで15分間ペレットにして回収する(Multifuge 3 SR、Heraeus、UK)。細胞ペレットを400 μ l 溶解緩衝液(0.15M トリス緩衝液中0.5M ショ糖、0.48mg/ml リソゾーム、5mM EDTA)に再浮遊し、サーモシェーカー中14℃で45分間インキュベーションする。次に、チューブを37℃で20分間インキュベーションする。この工程は、試料数に応じてサーモシェーカーまたは水浴中で行うことができる。100 μ l のLDAO/塩混合物(6部の10% LDAO、44部の5M NaCl)を各試料に加え、次いで、さらに37℃で5分間のインキュベーション工程を行う。4 μ l のMgCl₂を加え、次いで5分間インキュベーションする。次に、作製した細胞溶解物を10~20分間4℃に保つ。20 μ l の細胞溶解物を80 μ l 再浮遊緩衝液(PBS、0.5M NaCl、3% BSA、0.5% LDAO、pH8.0)で希釈する。得られた溶液を、予め湿らせた(再浮遊緩衝液)ニッケルコートティングマルチウェルプレート(Ni-NTA Hisorbプレート、Qiagen、USA)上にロードし、1時間インキュベーションし、次いで3回洗浄工程を行う。洗浄工程には、200 μ l 再浮遊緩衝液を加え、プレートを5分間ゆっくり振盪させ、次いで溶液を除去することが含まれる。このプロトコールでは、すべてのインキュベーションを、室温にてゆっくり振盪させているプレート上で、アルミホイルで被って行う。

【0073】

抗体を再浮遊緩衝液で希釈し、マルチウェルプレート上で1時間放置する。抗PrgI(1:2000；組換えPrgI-his6に対するウサギ抗PrgI抗体)を最初に加え、1時間インキュベーションした後、3回の洗浄工程により除去する。抗ウサギパーオキシダーゼ結合抗体(1:10000)を二次抗体として用い、再度1時間インキュベーションし、次いで3回の洗浄工程により洗浄除去する。100 μ l のテトラメチルベンジン高感度(Sigma、US)を加えて最後の検出を行う。明らかな青色が表示されたらすぐに20 μ l の2M硫酸で反応を止めて450nmで吸光度を測定する。

【0074】

他のグラム陰性細菌の組み立ての阻害剤を同定するのに用いることができるPrgHおよびPrgI相同体の例を表6に示す。

【0075】

表6

受託	エントリーナ	タンパク質名	遺伝子名	微生物
PrgH相同体				
B2VEF8 B2VEF8	B2VEF8 ERWT9	III型分泌機構タンパク質	prgH(ETA_1910 0)	Erwinia tasmaniensis (DSM 17950/Et1/99株)
Q7DB78 Q7DB78	Q7DB78 EC057	EscD(III型分泌機構EscD) (III型分泌機構EscDタンパク質)	escD(ECs4558) (Z5109)	Escherichia coli 0157:H7
P41783 P0A221	PRGH_SALTY MXIG_SHIFL	Protein prgH Protein mxiG	prgH(STM2874) mxiG(CP0136)	Salmonella typhimurium Shigella flexneri
Q6R8E0 Q6R8E0	Q6R8E0 SODGL	YsaF	ysaF	Sodalis glossinidius
A9R9J7 A9R9J7	A9R9J7 YERPG	III型分泌装置タンパク質YscD	yscD(YpAngola B0055)	Yersinia pestis bv. Antiqua (Angola株)
PrgI相同体				
B2VEF9 B2VEF9	B2VEF9 ERWT9	III型分泌装置	prgI(ETA_1911 0)	Erwinia tasmaniensis (DSM 17950/Et1/99株)
B7N793 B7N793	B7N793 ECOLU	III型分泌機構ニードルタンパク質	prgI(ECUMN_3190)	Escherichia coli 017:K5 2:H18 (UMN026/ExPEC株)
P41784 P0A223	PRGI_SALTY MXIH_SHIFL	タンパク質prgI タンパク質mxiH	prgI(STM2873) mxiH(CP0137)	Salmonella typhimurium Shigella flexneri
Q6R8A5 Q6R8A5	Q6R8A5 SODGL	PrgI	prgI	Sodalis glossinidius
Q01247 Q01247	YSCF_YEREN	Yopタンパク質 輸送タンパク質F	yscF	Yersinia enterocolitica
InvG相同体				
B2VEF5 B2VEF5	B2VEF5 ERWT9	III型分泌装置	invG(ETA_1908 0)	Erwinia tasmaniensis (DSM 17950/Et1/99株)
B7UMB3 B7UMB3	B7UMB3 EC027	T3SS構造タンパク質EscC	escC(E2348_C_3955)	Escherichia coli 0127:H6 (E2348/69/EPEC株)
P35672 Q04641	INVG_SALTY MXID_SHIFL	タンパク質invG 外膜タンパク質mxiD	invG(STM2898) mxiD(CP0145)	Salmonella typhimurium Shigella flexneri
Q6R8B7 Q7BRZ9	Q6R8B7 SODGL Q7BRZ9 YEREN	InvG	invG yscC	Sodalis glossinidius Yersinia enterocolitica

【実施例3】

【0076】

輸送体SipBおよびSipCの免疫検出(ウエスタンプロット)

Salmonella typhimurium培養をニードル複合体形成を促進する条件下で増殖させ、一夜非誘導性前培養し、次いで5~10時間誘導増殖するか、または直接接種し、液体LB(0.3M NaCl、0.012%アラビノース、適切な抗生物質)中で一夜増殖させる(ともに37℃で行う)。

該培養をチューブ中で遠心分離して細胞を除去する。主培養の上清を0.45μmフィルター

10

20

30

40

50

に通す。1.5mlのトリクロロ酢酸(TCA、100%w/vストック溶液)を10mlのタンパク質試料を加え、少なくとも60分間4℃に保存する。以下の工程では、遠心分離機を0℃以下に冷却する。試料の洗浄に用いるアセトンは18℃で保存し、ベンチ上で氷上に維持する。

【0077】

沈殿物をファルコンチューブ中、8000rpmで40分間遠心分離してペレットにし、上清を注意して捨て、ペレットを1.8ml冷アセトンで洗浄する。次に、試料を2mlプラスチックチューブに移し、20℃で保存する。タンパク質を冷蔵卓上遠心分離機で最大速度(13krpm、10min)でペレットにし、上清を除去し、1.8mlの冷ペプトン(-20℃)を加える。最終工程を繰り返し、上清を除去し、ペレットを95℃にセットした加熱ブロックで数分間乾燥する。ペレットを40μl H₂Oおよび60μl 5x Laemmli試料緩衝液に再懸濁する。試料を加熱ブロックで98℃で5分間加熱し、次いでポリアクリルアミドゲルに流す。

【0078】

タンパク質試料を分離したポリアクリルアミドゲルを100mlのH₂Oを入れたプラスチック容器中、室温で5分間静かに振盪させて洗浄する。次に、H₂Oを、タンパク質転写緩衝液(PTB: 2.9gグリシン、5.8gトリスベース、0.37gドデシル硫酸ナトリウム、200mlメタノール、800ml dH₂O中)で置換し、さらに10分間浸漬する。

【0079】

PVDF膜(Millipore、Billerica、USA)および適切な量の濾紙(2x3層のWhatman(登録商標)3MM Chr濾紙)を切り揃える。膜を100%メタノールで湿らせて活性化し、次いでdH₂Oで5分間洗浄し、次いで1x PTB中で10分間平衡化する。濾紙を1x PTBで湿らせる。タンパク質のゲルから膜への転写は、Bio-Rads Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cellを用いて行う。プロッティング後、膜を注意深く適切なプラスチック容器に入れ、すべてのインキュベーション工程をゆっくり振盪させながら行う。

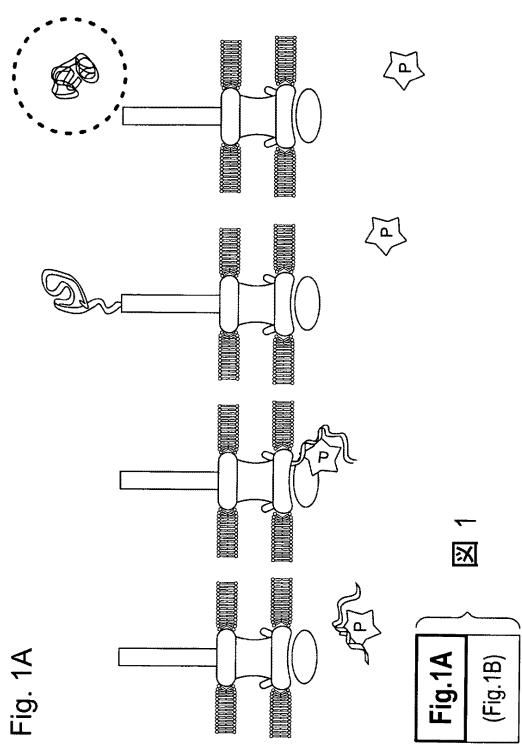
【0080】

さらなる結合部位を、膜をPBS中の0.1% Tween20(PBS-T)に溶解した5%脱脂粉乳に室温で1時間または4℃で一夜浸してブロックする。膜をPBS-Tで2回すすぎ、次いでPBS-T中の一次検出抗体希釈液(組換えSipBに対するウサギ抗SipB 1:10000、組換えSipCに対するウサギ抗SipC 1:1000)中に置く。膜を室温で1時間または4℃で一夜インキュベーションする。PBS-T中で各5分間続ける2回の rinsing 工程と3回の洗浄工程を行い、次いで二次抗体の希釈液(PBS-T中抗マウス1:10000)を室温で1~2時間加える。膜を再度2回 rinsing および3回洗浄し、次いで検出試薬(Amersham(登録商標)ECLウエスタンプロッティング検出試薬; GE Healthcare、USA)を適用する。過剰の液体を注意深く除去し、1mlの検出試薬をピペットにより各膜上に広げる。1分間インキュベーションした後、膜をx線カセット中に入れた透明膜中に置き、10秒間~30分間フィルム(Amersham(登録商標)Hyperfilm(登録商標)、GE Healthcare、USA)を暴露してタンパク質バンドを検出する。暴露したフィルムをColenta MP 900Fフィルム現像機で現像する。質量分析により單一タンパク質の同定を行い、SipBおよびSipCを検出する。これは、T3SSが選択した培養条件下で機能的であることを示す。該培養がT3SSの機能性の阻害剤の存在下、同じ条件下で増殖すると、SipBおよび/またはSipCは検出されない。同様にして、シャペロンを持たないエフェクター分子を検出することができる。

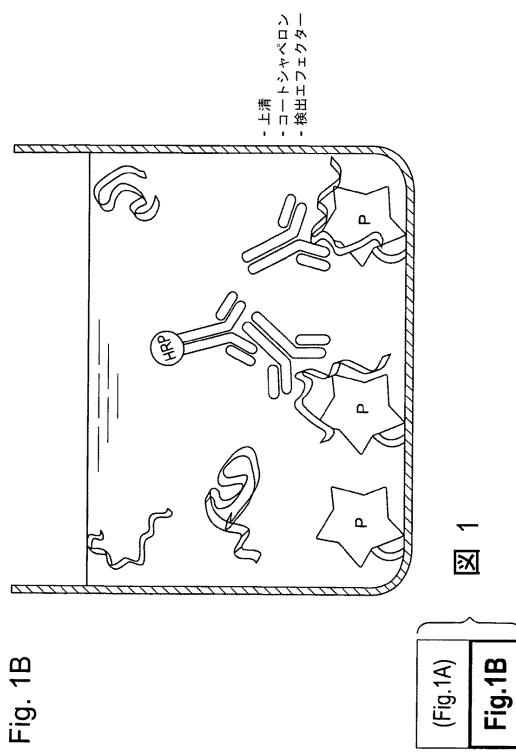
【0081】

ウエスタンプロットを用いる代わりに、HTSフォーマットについてサンドイッチ型Alpha LISAを以下のように実施する:一方の抗SipB抗体(または抗SipC抗体をそれぞれ)ビオチン化し、ストレプトアビシンコートしたドナービーズで捕捉する。第2抗SipB抗体(または抗SipC抗体をそれぞれ)をアクセプタービーズと結合させる。SipB(またはSipCそれぞれ)の存在はサンドイッチを生じ、ドナービーズとアクセプタービーズをごく近接させることにより測定可能な信号を生じる。

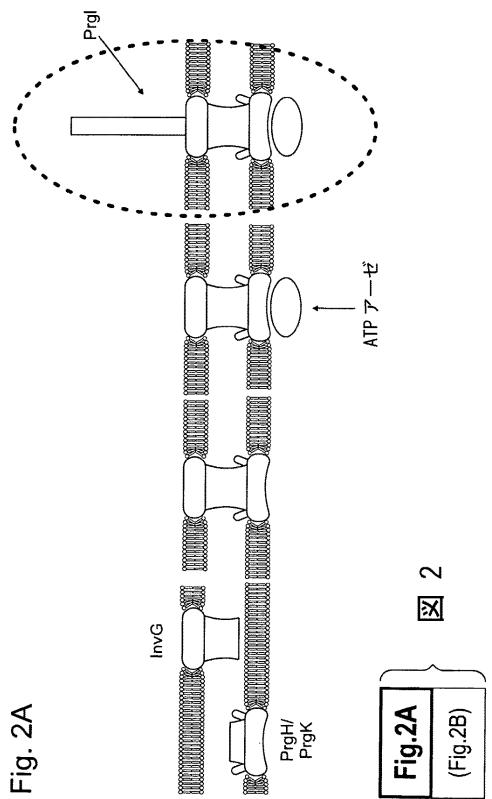
【図 1 A】



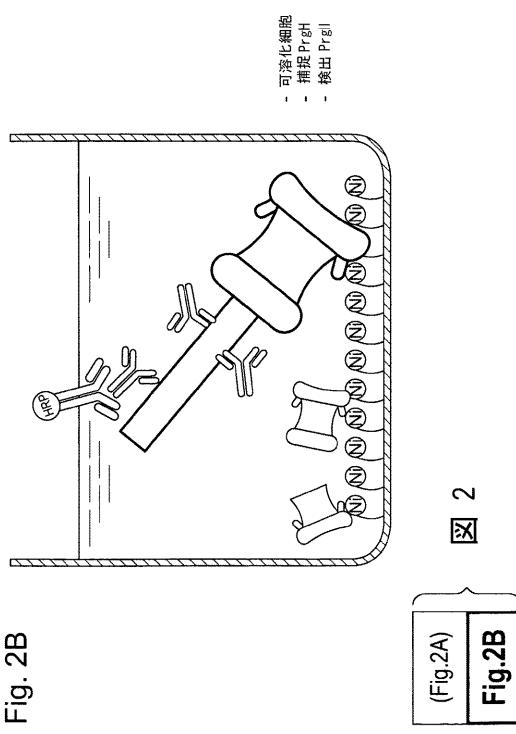
【図 1 B】



【図 2 A】



【図 2 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 37/00 103

(74)代理人 100138900
弁理士 新田 昌宏
(74)代理人 100162684
弁理士 呉 英燦
(74)代理人 100176474
弁理士 秋山 信彦
(72)発明者 トマス・ツェー・マルロヴィツツ
オーストリア、アー-1170ウィーン、チャートリースキガッセ149/7番
(72)発明者 ユリア・ラディクス
オーストリア、アー-1070ウィーン、ベルナルトガッセ9/9番
(72)発明者 ヴォルフガング・シュミート
オーストリア、アー-1020ウィーン、ベックリンシュトラーセ98/8番

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2009/137133 (WO, A1)
特表2000-511771 (JP, A)
特開2009-286794 (JP, A)
特表2009-518018 (JP, A)
特表2010-505939 (JP, A)
VEENENDAAL ANDREAS K J, SMALL-MOLECULE TYPE III SECRETION SYSTEM INHIBITORS BLOCK ASSEMBLY OF THE SHIGELLA TYPE III SECRETION, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2009年 1月, V191 N2, P563-570
阿部章夫, 桑江朝臣, 図解 *Helicobacter pylori*技術講座 No.41 図解:グラム陰性菌の分泌装置, *Helicobacter Res*, 日本, 2005年 4月 1日, Vol.9, No.2, Page.81-88

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33/48 - 33/98
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)