

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4642297号
(P4642297)

(45) 発行日 平成23年3月2日 (2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日 (2010.12.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 8 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2001-508376 (P2001-508376)	(73) 特許権者	300022113
(86) (22) 出願日	平成12年6月27日 (2000.6.27)		アストラゼネカ・ユーケイ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2003-504037 (P2003-504037A)		AstraZeneca UK Limited
(43) 公表日	平成15年2月4日 (2003.2.4)		イギリス国 ロンドン ダブリュー1ケイ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2000/002472		1 エルエヌ スタンホープ ゲート 1
(87) 国際公開番号	W02001/002605		5
(87) 国際公開日	平成13年1月11日 (2001.1.11)		15 Stanhope Gate, London W1K 1LN, United Kingdom
審査請求日	平成19年6月19日 (2007.6.19)		
(31) 優先権主張番号	9915399.1	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成11年7月2日 (1999.7.2)		弁理士 青山 稔
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 必須遺伝子の遺伝子産物の機能を調節する化合物を同定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 異種性の、調節可能なプロモーターの制御のもとで遺伝子が発現している生存能力のある細胞を提供すること、

(b) 工程 (a) にて提供された細胞中において該プロモーターを介して該遺伝子の発現をスイッチオフすること、

(c) 工程 (b) にて遺伝子の発現がスイッチオフされた細胞を被験化合物と接触させること、および

(d) 工程 (c) にて被験化合物と接触させた細胞により產生される遺伝子産物の機能に対する調節効果を検定すること、

を含む、アクセス可能な条件下で細胞の増殖および／または細胞の生存能力に必須の遺伝子の遺伝子産物の機能を調節する化合物を同定する方法。

【請求項 2】

(a) 代謝経路中における遺伝子が、異種性の、調節可能なプロモーターの制御のもとで発現している生存能力のある細胞を提供すること、

(b) 工程 (a) にて提供された細胞中において該プロモーターを介して該遺伝子の発現をスイッチオフすること、

(c) 工程 (b) にて遺伝子の発現がスイッチオフされた細胞の第一集団を第一被験化合物と接触させること、

(d) 工程 (b) にて遺伝子の発現がスイッチオフされた細胞の第二集団を第一被験化合物

10

20

とは異なる第二被験化合物と接触させること、次いで
(e)第一および第二被験化合物の生存能力のある細胞の生長に対する調節効果を検定し、
比較すること
を含む、代謝経路薬物高感受性を同定する方法。

【請求項 3】

工程(a)の生存能力のある細胞が定常期初期へと生長している請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

遺伝子が細菌の遺伝子である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

遺伝子が真菌の遺伝子である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

調節効果を光学密度測定法によって検定する請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

1 より多い必須遺伝子の遺伝子産物に対する被験化合物を試験するために、請求項 1 および 3 から 6 のいずれかに記載の方法を使用することを含む、薬物スクリーニング方法。

【請求項 8】

化合物を 20 より多い必須遺伝子の遺伝子産物に対して試験する請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、新規生物学的標的および／または阻害物質の同定方法を提供する。このような方法は、処理能力の高いスクリーニングにとって有用であり、かつ便利な手法を提供する。特に、このような方法は、新規抗菌剤の同定に使用され得る。

【0002】

抗菌剤、抗真菌剤、抗マラリア薬のような現在の治療薬に対する耐性の出現によって、新薬の開発が必要となっている。標的に基づいた生化学的スクリーニングは目的を達し得るが、伝統的な抗菌スクリーニングは、発見された新規の抗菌薬に関して、論理的な標的選択の手順よりも明らかに優れている。標的に基づいた生化学的スクリーニングは、標的酵素を効果的に阻害するにもかかわらず、おそらく細胞内への浸透が低いためまたは細胞外へ排出されるために、細胞活性が欠如していると見られることが多い。また、限定された入手可能な分子の中から自分の都合のよいように選んだ標的に、阻害のための構造が存在することは、全く保証がない。

【0003】

対照的に、細胞に基づいた抗菌薬のスクリーニングは、頻繁に抗菌作用を同定するが、その後、この阻害は一般毒性、例えば膜阻害もしくはDNAインターカレーションによるものと判明するか、または細胞機構と薬物との特異的相互作用を同定できないかのどちらかである。このことは、初期リード化合物の化学的な最適化を困難にし、構造活性相関の指針を何ら提供しない。

【0004】

標的に基づいた作用機序を同定するための特定のアプローチは、高感受性によるものであった。

【0005】

歴史的に、所望のタンパクの高感受性のものを作り出す方法は、それをコードしている遺伝子中に温度感受性(ts)突然変異を作り出すことであった(Schmid et al. Genetics 123, pp625-633, (1989))。温度感受性(Ts)または他の条件的な表現型は、(例えばPCRを用いる)標的のある、または(例えば化学薬品または放射線を用いる)ランダム突然変異形成のどちらかによって作成され得る。しかしながら、このような条件的な突然変異体は、しばしば、緩やかな条件下でさえ阻害剤に対して高感受性である。

【0006】

我々は、今回、阻害剤に対する高感受性が、生存能力のある細胞の特定の必須機能を停止させ、次いで阻害剤の可能性のあるものの存在／不在下での効果を分析することによって容易に得られることを見出した。ここで、「停止」とは、特定の必須機能が、細胞でいかなる発現レベルでも利用できないことを意味する。

【0007】

その結果、本発明の最初の観点において、我々は、遺伝子が異種性の、調節可能なプロモーターの制御のもとに発現する生存可能な細胞を提供すること、プロモーターを介して遺伝子発現をスイッチオフすること、被験化合物を細胞と接触させること、および遺伝子産物の機能に対する調節効果を検定することを含む、必須遺伝子の遺伝子産物の機能を調節する化合物を同定する方法を提供する。

10

【0008】

その方法は、化合物の高感受性の完全なゲノム解析の可能性における飛躍を提供する。その方法は、多くの重要な利点、とりわけ、例えば、変えた、突然変異したタンパクと阻害剤との相互作用から同じ化学物質との相互作用を推定するのは対照的に、不変の、「正常」タンパクを使用することを提供する。また、プロモーター活性をより高いまたはより低いレベルに微調整する作業は、必要とされない。一つの特異的生化学的物質、例えば細胞生長または生存に必要なタンパクの阻害は、簡便に、不変の親株と比較した調節可能な遺伝子を有する株の高感受性反応によって示される。

【0009】

「異種性の、調節可能なプロモーター」は、必須遺伝子本来のプロモーター以外のプロモーターを意味し、特定の物質の添加および／または除去によって、または例えば他の環境の変化によって制御され得る。

20

「高感受性」は、野生型の細胞と比較して、等しい薬物の濃度の存在下で、細胞の生長がより大きく減少することを意味する。

【0010】

さらに、一つ特定の酵素の発現減少によって起こる高感受性は、生化学経路全体、例えばステロール生合成にまで広がり得る。このことは本発明の図5において示される結果によって例示され、テルピナフィンに対する感受性は、同一経路における標的酵素(ERG1によってコードされている)の停止ならびにもう一つの酵素(ERG11によってコードされている)の停止の両方によって変えられる。

30

【0011】

「生存能力のある」は、ある必須遺伝子の発現が止められた場合、意義ある検定および速度論的解析が行われ得るほど十分に生長する細胞を意味する。細胞は、好ましくは、最後の光学密度が測定される定常期初期(early stationary phase)へと生長する。薬物なしまたはスイッチオフの制御なしの場合と比較した、減少した光学密度は生長阻害と解釈される。

【0012】

「必須遺伝子」は、例えば細胞生長および／または細胞生存に必要な遺伝子を意味する。これは、ある測定可能な条件のもとでのみ必要とされる(すなわち条件的な必須)遺伝子を含む。もっとも単純な明示において、必須性とは、リッチ培地上での生物の生長に必要であることと定義される(そのような培地ならびに一般的な酵母の方法論は、Sherman et al, Methods in Enzymology, Vol 194, Guthrie and Fink eds, Academic Press(1991)参照)。都合のよい遺伝子は、真菌および細菌の遺伝子を含む。

40

【0013】

「遺伝子発現をスイッチオフすること」とは、すべての遺伝子発現をオンからオフに変えることを意味する。オフの場合においては、低レベルの遺伝子発現も存在しない。

【0014】

「細胞」とは、任意の都合のよい供給源からの細胞を意味し、これらはヒト、動物または細菌の細胞を含む。化合物のスクリーニングと同時標的同定(simultaneous target identification)を組み合わせる、新規のゲノムに基づいた技術が開発されている。本発明は、

50

Schizosaccharomyces pombeおよびSaccharomyces cerevisiaeのような遺伝子的に制御しやすいモデルの生物に特に有用であると同時に、普遍的に適用でき、実務的考慮によってのみ制限される。S.cerevisiae, S.pombe, C.elegans, またはD.melanogasterのようなモデル生物を使用することによって、真核生物の一定に保たれた機能を研究することが可能である。ヒトまたは動物の細胞株を直接使用する遺伝学の応用は、また、可能性をさらに広げる。

【0015】

任意の都合のよい被験化合物、例えばペプチド、核酸および低分子量の化合物は、本発明の方法に使用され得る。好ましい被験化合物は、治療薬の可能性のあるものであり、または治療薬を同定するためのさらなる研究において使用され得る。特異的な被験化合物は、
10 例えば分子量1000未満、例えば分子量600未満の低分子量の化合物である。

【0016】

必須遺伝子の遺伝子産物に対する化合物の調節効果は、簡便には、終点の光学密度を読み取ることによって調べられる(培地の絶対光学密度が高いほど、より少ない阻害が起こっていると考えられる)。このような分析は、簡便には、酵母細胞に関して典型的に24時間にわたって行われる。細菌はずっと短い時間で済むが(例えば12時間)、より高度な真核生物の細胞は、初期定常生長期(early stationary growth phase)に達するまで数日を要する。その分析は、簡便には光度計測である(600nmでの培地の光学密度)。

【0017】

重要なことに、DNAの部位特異的組み込みのための非常に最近の技術(例えば本来のものを直接置換した切替可能なプロモーターを用いる)と(以下にさらに詳述するような)高感受性反応の観測された固定した時点の光学密度分析との組み合わせは新規であり、大規模薬物スクリーニング、化合物および標的のプロファイリングに活用される。さらに、このような系は、また、非常に容易に大量に入手可能である(すなわち、S.cerevisiae中に多数の遺伝子)。
20

【0018】

S.cerevisiaeにおける使用のための切替可能なプロモーターのいくつかの例は、MET3(メチオニンの添加によって抑制される)およびGAL1(ガラクトースによって誘導され、グルコースによって抑制される)を含む；S.pombeにおける使用のため：NMT1(チアミンによって抑制される)；C.albicansにおける使用のため：MAL1(グルコースによって抑制され、マルトース、スクロースによって誘導される)；E.coliにおける使用のため：araB(グルコースによって抑制され、アラビノースによって誘導される)；Staphylococci, Enterococci, StreptococciおよびBacilliのようなグラム陽性の細菌における使用のため：xy1A/xy1R(S.xylosus由来)(グルコースで抑制され、キシロースで誘導される)；E.coliおよびB.subtilisにおける使用のため；pSPAC(E.coli lac由来の人工的プロモーター、IPTGによって調節される。Vagner et al. Microbiology(1998), 144, 3097-3104参照)；および上記のすべての生物に加えてさらに明記されていない真菌、細菌および哺乳類の細胞系のため：tetA/tetR(さまざまな細菌性テトラサイクリン耐性カセット由来)この系はさまざまな形態で存在する。Gossen et al. Current Opin. Biotechnol. 5, pp516-520(1994)参照。それはさまざまなテトラサイクリン類似物質
30 によって抑制可能または誘導可能である。
40

【0019】

我々は、以下の実施例および図において、生化学的な機能を阻害するあらゆる試薬に対する高感受性を産生することが、厳密に制御可能なプロモーターの制御のもとにその機能(タンパクまたはmRNA)をコードしている遺伝子を配置すること、およびオンからオフの状態に切り替えること、さらに相互作用する物質を同時に加えることによって、可能であることを示す(このような切替の例のため、図1を参照)。コードされたタンパクの過剰または過少発現を達成するため、所望の遺伝子の上流に外部のプロモーターを配置することは既知であるが、このプロセスは非常に煩雑な作業の微調整および計画を必要とする。
50 発現レベルが大きく変化するため、すべての所望の遺伝子は、ちょうど生長律速レベルに

あるように、そのプロモーター強度の異なる調整を必要とする。それゆえ、このような微調整に依存したプロトコルは、ゲノム解析に必要な高処理スケールでの実行を可能にしそうにない。

【0020】

以下に示す実施例で詳述するような、我々の新規の発見により、明確に定義されたオンおよびオフの状態(すなわち、発現レベルの微調節なしでも明確に)ただ一つのプロモーターを用いる、単純かつ標準的なプロトコルが、標的物質の過少発現により特異的高感受性の正確な測定を產生できることが示される。過少発現は、i) R N Aの減少、ii) 標的タンパクの減少、iii) 再合成のない細胞生長の間いくつかの娘細胞の中への標的分子の希釈によって、起こる。

10

【0021】

以下の実施例は、例えば、化合物によって阻害され得る未知の真菌の標的タンパクが、制御可能なプロモーターの制御のもとにそれらの必須遺伝子を配置し、それをスイッチオフし、それに対応する野生型の細胞を阻害しないレベルの化合物にさらすことによって同定され得ることを証明する。今回、814個の*S.cerevisiae*遺伝子が、リッチ培地(Y P D(登録商標)供給)でさえ、生長に必須であることが判明した。観察された高感受性反応(例えば、*S.cerevisiae*のような真菌において)により：i) 標的は必須である。ii) 化合物は、抗真菌剤またはさらに強力な類似化合物への展開のための出発点である。iii) マッチした標的-化合物の対(または複数の対)は、抗真菌化合物の作用機序を確立する、ことが分かる。1つの標的に対して検出される1より多い化合物に関し、貴重な構造活性相関(S A R)の情報が得られる。多くの標的に対する多くの化合物の比較およびパターン認識分析によって、経路ごとに新規標的を分類するのに有用な貴重なデータベースが、すぐに確立される。高感受性は、また、親株を用いては同定できない低活性の化合物の標的-特異的検出を可能にする。

20

【0022】

本発明のさらに有益な点は、標的分子の特徴的な生化学的活性が、本発明の方法にとって必要条件ではないことである。高感受性それ自体が、特定の標的と固有に結びついたアッセイ可能な特徴を提供し得る。ゲノムのスイッチオフ構造は、非常に高い処理能力で、クローニング・ステップを含まない公開されたP C Rに基づいた方法を用いて、產生され、生物のゲノム中に統合され得る(Longtine et al. Yeast, 14, pp953-961(1998); Zhang et al. Nature Genetics, 20, pp123-128(1998))。その結果、本発明の方法は、すべての抗真菌標的の可能性のあるもの、例えば10まで、20まで、50まで、100まで、500まで、または1000までの標的に対して、現代的な処理能力の高いスクリーニング技術を用いて、可能な限り多くの化合物を試験するのに使用され得る。

30

【0023】

その結果、本発明のさらなる方法において、我々は、代謝経路中の遺伝子が、異種性の、調節可能なプロモーターの制御のもとで発現している生存能力のある細胞を提供すること、プロモーターを介して遺伝子の発現をスイッチオフすること、さまざまな種類の細胞をさまざまな被験化合物と接触させること、さらに生存細胞の生長に対する調節効果を検定し、比較することを含む、薬物代謝産物高感受性の同定方法を提供する。生化学的経路の一要素の過少発現およびもう一つの部分の化学的阻害が、共同作業的であることが判明し、その結果、その代謝経路のたった1つの要素の過少発現によって、経路特異的な情報が発生する。

40

【0024】

ここで、本発明を以下の実施例および図を引用することによって説明するが、限定するものではない：

図1は、本来のプロモーターをオン／オフが明確できっちりとしたスイッチ；ここではG A L 1と置換することによる、遺伝子、G e n 1の調節可能な対立遺伝子の発生を示す。

図2は、野生型(w t)およびG A L 1－E R G 1 1系におけるE r g 1 1 pの活性を示

50

し、時間と共におよび阻害剤の濃度の増加と共に触媒活性がどのように減少するかを説明する。培養物を時間 0 においてガラクトースからグルコースへと移すと、E r g 1 1 p (ラノステロール C-14-デメチラーゼ)の新たな合成が停止する。フルコナゾールの濃度は、野生型(w t)の系が全部は阻害されないものである。；____：フルコナゾールなし、.....：フルコナゾールあり；閾値は、E r g 1 1 p 活性が生長の律速となる値である。

図 3 は、フルコナゾールの存在下、野生型(JK9-3da, Kunz et al. Cell, 73, pp585-596(1993))、G A L 1 - E R G 1 1 および G A L 1 - A U R 1 (Longtine et al. Yeast, 14, pp953-961(1998)に記載されたように産生した)系の生長を示す。

図 4 は、オーレオバシジン A (aureobasidin A) の存在下、w t、G A L 1 - E R G 1 1、および G A L 1 - A U R 1 系の生長を示す。

図 5 は、テルビナフィンの存在下、w t、G A L 1 - E R G 1 1、および G A L 1 - A U R 1 系の生長を示す。

図 6 は、S.cerevisiaeにおけるプロモーターの置換のためのプロトコルを示す(実質上、Longtine et al. Yeast, 14, pp953-961(1998)に記載されたように)。

【0025】

実施例

S.cerevisiaeのエルゴステロールおよびスフィンゴ脂質生合成経路：既知の阻害剤での研究

【0026】

低発現の代わりに完全にスイッチオフのものを使用する理論的根拠は、以下の E r g 1 1 p (p = タンパク)、ラノステロール C-14-デメチラーゼ (エルゴステロール生合成経路における真菌の酵素) で例示のように詳述される：薬物フルコナゾールは、他のアゾール系抗真菌薬のように、E r g 1 1 p を阻害し、細胞内の総活性が減少する。しかしながら、活性 E r g 1 1 p の量が生長の律速とならないぐらい高い限りは、生長の減少は観察されない(閾値より上、図 2 参照)。本実施例において、フルコナゾール濃度は、この閾値以下に E r g 1 1 p 活性を低下させるには不十分である。しかしながら、G A L 1 駆動の E R G 1 1 遺伝子では、状況が異なる：時間 0 において、遺伝子の操作されたプロモーターは、培地中の炭素源を変えることによって、オンの状態(G A L 1 プロモーターの高発現のため、このレベルは、通常、本来のプロモーターよりも高い)からオフの状態に切り替えられる。この時点から、新たな m R N A は転写されず、m R N A の消失後は、新たな E r g 1 1 タンパクが合成されない。E r g 1 1 p の濃度は、新たな娘細胞への酵素の希釈および E r g 1 1 p の消失により低下している。閾値を下回るとすぐに、E r g 1 1 p は律速となる、すなわち、その系は、不変の親株(w t)と比較して生長が低下していることが分かる。このことは、培地の最終的な光学密度がより低くなることによって反映される。阻害剤フルコナゾールの存在は、不活性になる活性 E r g 1 1 p 分子を定量する。その結果、閾値をより短時間で下回り、新たな E r g 1 1 p は全く合成され得ない。野生型細胞と比較すると、このことは、高感受性(同じ薬物濃度で、生長の低下がより大きい)として理解される。単純に、このことを、律速状態が起こる前の細胞分裂の量の減少として説明できる。

【0027】

標的および化合物の評価のために、高感受性は、ある薬物-標的の組み合わせに特異的でなければならない。それゆえ、その方法は、もう一つの無関係な既知の薬物-標的の組み合わせで試験され、確認された：A U R 1 遺伝子は、イノシトールホスホリルセラミド(inositolphosphoryl-ceramide)(IPC)シンターゼをコードし、これは真菌のスフィンゴ脂質生合成経路に必須の酵素である(Nagiec et al, J. Biol. Chem., 1997, 272, 15, 9809-9817)。その酵素は、ナノモラー以下で天然物オーレオバシジン A によって阻害され、その薬物の抗菌作用につながる。E R G 1 1 のように、A U R 1 をプロモーターの置換に付し、得られた酵母系は、親(w t)、G A L 1 - E R G 1 1 および G A L 1 - A U R 1 であった。それらを、フルコナゾールおよびオーレオバシジン A の両方の薬物に対するそ

これらの感受性に関して試験した。我々の理論によって予測されたように、両方のGAL1駆動系は、同種の薬物に対して顕著な高感受性反応を示す(図3および4参照)。注目すべきことに、交差反応はない、すなわち、GAL1-ERG11ではオーレオバシジンAに対する感受性は増大せず、GAL1-AUR1でもフルコナゾールに対する感受性は増大しない。このことは我々の理論を確認し、薬物および標的発見手法としての記載された方法の適用可能性および利用性を証明する。

【0028】

当然、ある経路における一つの酵素の阻害剤に対する高感受性反応が、経路全体の阻害剤にまで拡張され得ることになる。これは、一つの酵素が次の基質を提供するという生化学的カスケード反応において、酵素が直線的に配置されていることによる。基質の供給の減少は、酵素レベルの減少と共に共同的に作用し得る。それゆえ、いくつかの生合成段階を通して、通常であればErg1p(スクアレンエポキシダーゼで、ステロール生合成経路のもう一つの酵素である)によって供給される基質の消失により、実質上の律速酵素Erg11p(スイッチオフ後)の活性がさらに低下する。ここで、Erg1pは、テルビナフィンによって阻害される。このような経路特異的高感受性は、スイッチオフ遺伝子と同じ経路に(類別化されていない)遺伝子を類別化することを可能にする。これを調べるために、我々はErg1pを試験した。この酵素は抗菌剤のテルビナフィンによって阻害されるが、Erg11pは阻害されないことが判明している。図5に示されるように、GAL1-ERG11は、テルビナフィンに対して、GAL1-ERG1と同じぐらい高感受性であり、仮定された交差経路高感受性を提供する。この経路特異的分析手法は、(作用機序が未知の)新規阻害剤の分類化に極めて有用である。

【0029】

特に*S.cerevisiae*に関して例示したが、本発明は細菌のように遺伝学的に操作可能な生物すべてに適用可能であることが分かる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本来のプロモーターをオン/オフが明確できっちりとしたスイッチ；ここではGAL1と置換することによる、遺伝子、Gen1の調節可能な対立遺伝子の発生を示す。

【図2】 図2は、野生型(wt)およびGAL1-ERG11系におけるErg11pの活性を示し、時間と共におよぼ阻害剤の濃度の増加と共に触媒活性がどのように減少するかを説明する。培養物を時間0においてガラクトースからグルコースへと移すと、Erg11p(ラノステロールC-14-デメチラーゼ)の新たな合成が停止する。フルコナゾールの濃度は、野生型(wt)の系が全部は阻害されないものである。；____：フルコナゾールなし、.....：フルコナゾールあり；閾値は、Erg11p活性が生長の律速となる値である。

【図3】 図3は、フルコナゾールの存在下、野生型(JK9-3da, Kunz et al. Cell, 73, pp585-596(1993))、GAL1-ERG11およびGAL1-AUR1(Longtine et al. Yeast, 14, pp953-961(1998)に記載されたように産生した)系の生長を示す。

【図4】 図4は、オーレオバシジンA(aureobasidin A)の存在下、wt、GAL1-ERG11、およびGAL1-AUR1系の生長を示す。

【図5】 図5は、テルビナフィンの存在下、wt、GAL1-ERG11、およびGAL1-AUR1系の生長を示す。

【図6】 図6は、*S.cerevisiae*におけるプロモーターの置換のためのプロトコールを示す(実質上、Longtine et al. Yeast, 14, pp953-961(1998)に記載されたように)。

【図 1】

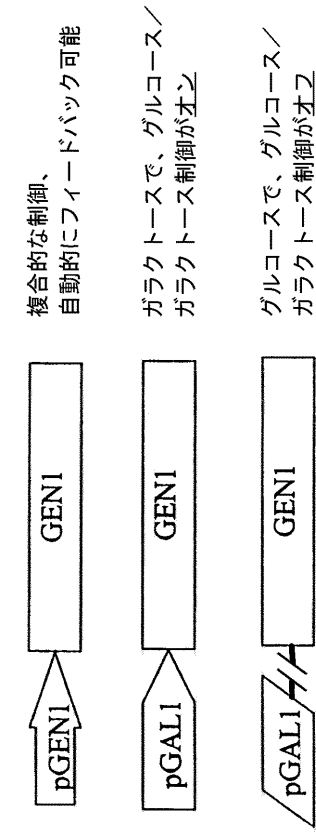


Figure 1

【図 2】

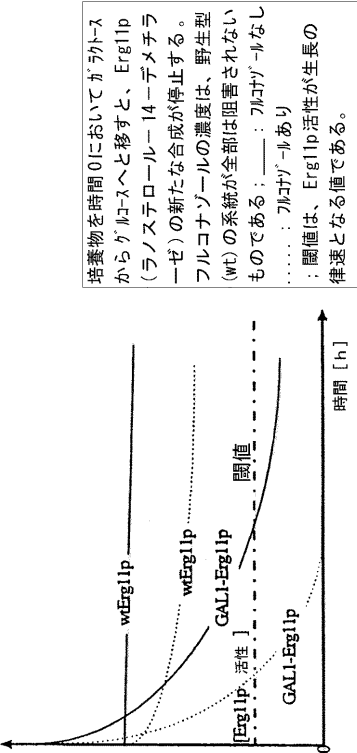


Figure 2

【図 3】

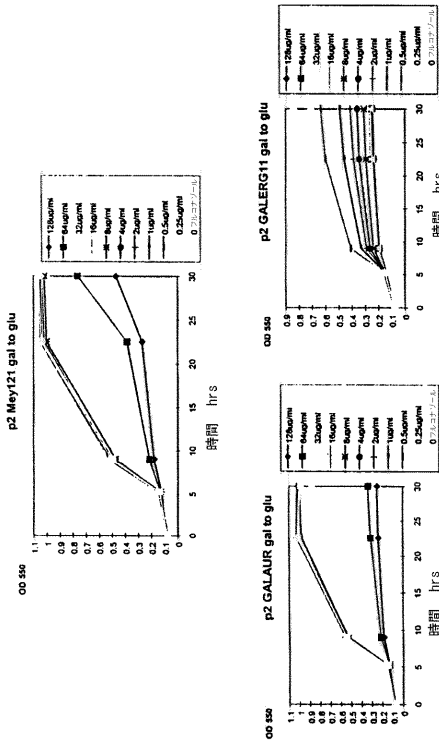


Figure 3

【図 4】

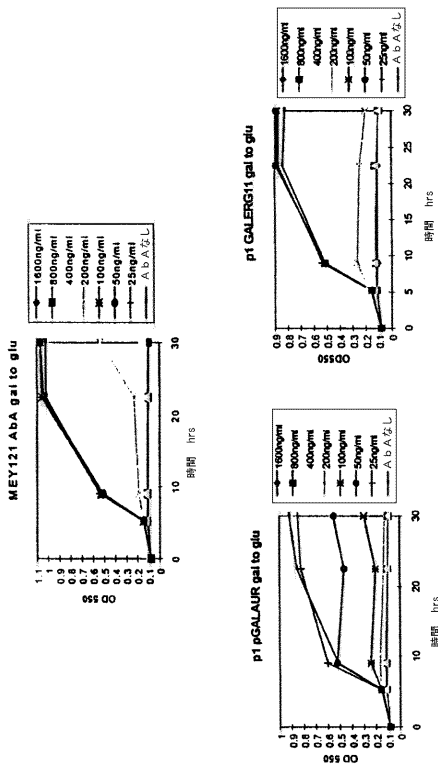


Figure 4

【図 5】

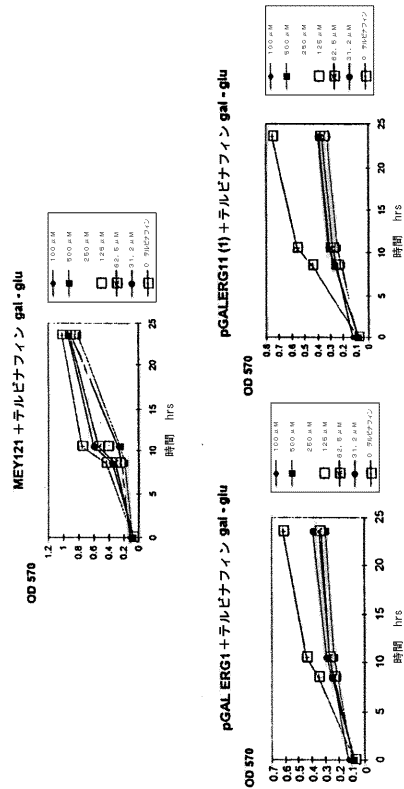


Figure 5

*S. cerevisiae*におけるプロモーター置換のためのプロトコール

【図 6】

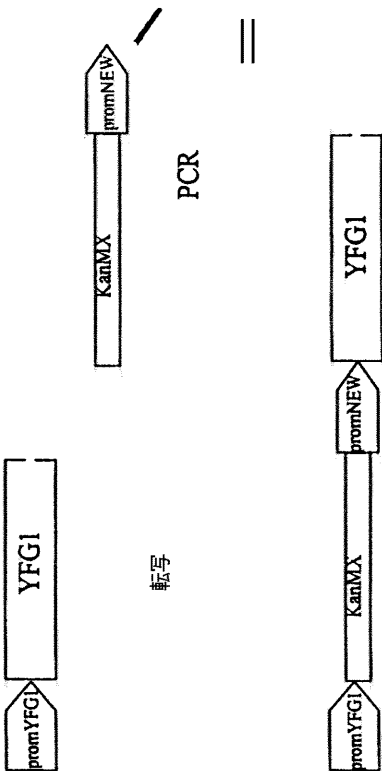


Figure 6

フロントページの続き

- (72)発明者 ノルベルト・フリーデマン・シュネル
イギリス、エスケイ 10・4 ティジー、チェシャー、マックルズフィールド、オルダリー・パーク
- (72)発明者 サバーナ・ジーニ・チャブダ
イギリス、エスケイ 10・4 ティジー、チェシャー、マックルズフィールド、オルダリー・パーク

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 国際公開第 98/044135 (WO, A1)
EMBO J., vol. 13, pages 3127-3135 (1994)
Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 250, pages 791-797 (1998)
Antimicrob. Agents Chemother., vol. 39, pages 2204-2209 (1995)
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
C12Q 1/02
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)