

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4445128号  
(P4445128)

(45) 発行日 平成22年4月7日(2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月22日(2010.1.22)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/18 (2006.01)	C 12 Q 1/18
C 12 Q 1/58 (2006.01)	C 12 Q 1/58
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 9/80 (2006.01)	C 12 N 9/80 Z

請求項の数 16 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-557387 (P2000-557387)	(73) 特許権者	593218462 インスティチュート・パストール 1 N S T I T U T P A S T E U R フランス国、75724 パリ・セデュ・ 15、リュー・デュ・ドクトール・ルー、 25-28
(86) (22) 出願日	平成11年6月29日(1999.6.29)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(65) 公表番号	特表2002-519039 (P2002-519039A)	(74) 代理人	100141357 弁理士 鈴木 音哉
(43) 公表日	平成14年7月2日(2002.7.2)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 國際出願番号	PCT/EP1999/004490	(72) 発明者	ドゥ・リューズ, イルド フランス国、エフ-75015 パリ、リ ュ・ルエル 49
(87) 國際公開番号	W02000/000634		
(87) 國際公開日	平成12年1月6日(2000.1.6)		
審査請求日	平成18年6月26日(2006.6.26)		
(31) 優先権主張番号	09/107,383		
(32) 優先日	平成10年6月30日(1998.6.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
微生物の受託番号	CNCM I-2245		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヘリコバクター ピロリを阻害する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

インビオでヘリコバクターの増殖又は生存を阻害することができる分子を同定するためのインビトロの方法であって、

(a) 親ヘリコバクターを生物学的試料中の該分子と接触させる工程、

(b) 該活性分子の存在下又は非存在下で、Ure Iを欠損した株に対して親株の及び/又はure Iを保持するプラスミドで補足されたUre I欠損株の細胞外pHに対する応答及び酸性に対する感受性を試験し比較する工程、並びに

(c) Ure I欠損株と比較して異なる効果を親株または補足された株に対して示す該分子を選択する工程を含む方法。

## 【請求項2】

酸性に対する感受性の程度が工程(b)において測定される、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

分子がUre Iに特異的である、請求項1記載の方法。

## 【請求項4】

ヘリコバクター株が、ヘリコバクター ピロリ(Helicobacter pylori)、ヘリコバクター フエリス(Helicobacter felis)、ヘリコバクター ヘイルマンニ(Helicobacter heilmannii)、ヘリコバクター ムステレ(Helicobacter mustelae)、ヘリコバクター カニス(Helicobacter canis)、ヘリコバクター ビリス(Helicobacter bilis)、ヘリコバクター ヘパチクス(Helicobacter hepaticus)、ヘリコバクター ムリダルム(

10

20

*Helicobacter muridarum*)、及びヘリコバクター トログンタム (*Helicobacter troguntum*) からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

U r e I を欠損した株が、u r e I 遺伝子の欠失を保持する H . ピロリの組換え株であって、前記遺伝子が非極性カセットにより置換されており、ここで非極性カセットは、それがオペロン内に存在する場合にオペロン内の下流の遺伝子の転写に影響を与えないカセットである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

非極性カセットがカナマイシン耐性カセットである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

u r e I 遺伝子の欠失が最初の 21 コドン以外全ての欠失であり、そして非極性カセットが自己のプロモーター領域とターミネーター領域とを欠失している a p h A - 3 カナマイシン耐性遺伝子から構成される、請求項 5 または 6 記載の方法。

【請求項 8】

u r e I を保持するプラスミドが、受託番号 I - 2245 の下で 1999 年 6 月 28 日に C . N . C . M . に寄託された、H . ピロリにおいて安定的に複製することができ、u r e I 遺伝子を保持し、かつ u r e I 遺伝子の欠失を保持する H . ピロリの組換え株であって前記遺伝子が非極性カセットにより置換されている組換え株を補足する、プラスミド p I L L 850 であり、ここで非極性カセットは、それがオペロン内に存在する場合にオペロン内の下流の遺伝子の転写に影響を与えないカセットである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

ウレアーゼ活性を有し、そして酸性に対する感受性を有するヘリコバクター株の製造方法であって、u r e I 遺伝子を欠失させ、そして前記遺伝子を非極性カセットにより置換する工程を含み、ここで非極性カセットは、それがオペロン内に存在する場合にオペロン内の下流の遺伝子の転写に影響を与えないカセットである、方法。

【請求項 10】

非極性カセットがカナマイシン耐性カセットである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

u r e I 遺伝子を欠失させ、そして前記遺伝子を非極性カセットにより置換する工程が、u r e I 遺伝子の最初の 21 コドン以外全てを欠失させ、それを自己のプロモーター領域とターミネーター領域とを欠失している a p h A - 3 カナマイシン耐性遺伝子から構成される非極性カセットにより置換することによって行われる、請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】

ヘリコバクター株が H . ピロリである、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

u r e I 遺伝子の欠失を保持する H . ピロリの組換え株であって、前記遺伝子が非極性カセットにより置換されており、ここで非極性カセットは、それがオペロン内に存在する場合にオペロン内の下流の遺伝子の転写に影響を与えないカセットである、組換え株。

【請求項 14】

非極性カセットがカナマイシン耐性カセットである、請求項 13 記載の組換え株。

【請求項 15】

u r e I 遺伝子の欠失が最初の 21 コドン以外全ての欠失であり、そして非極性カセットが自己のプロモーター領域とターミネーター領域とを欠失している a p h A - 3 カナマイシン耐性遺伝子から構成される、請求項 13 または 14 記載の組換え株。

【請求項 16】

受託番号 I - 2245 の下で 1999 年 6 月 28 日に C . N . C . M . に寄託された、H . ピロリにおいて安定的に複製することができ、u r e I 遺伝子を保持し、かつ u r e I 遺伝子の欠失を保持する H . ピロリの組換え株であって前記遺伝子が非極性カセットにより置換されている組換え株を補足し、ここで非極性カセットは、それがオペロン内に存

10

20

30

40

50

在する場合にオペロン内の下流の遺伝子の転写に影響を与えないカセットである、プラスミド p I L L 8 5 0。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Ure Iの活性を特異的に阻害することにより、インビボ (in vivo) でヘリコバクター、特にヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*) の生存を阻害することができる分子をスクリーニングする方法、これらの方法により同定された分子、及びヘリコバクター感染を処置又は予防するためのこれらの分子の使用に関する。

【0002】

10

【従来の発明】

発明の背景

ヘリコバクター ピロリは、ヒトの胃粘膜にコロニー形成する微好気性グラム陰性菌である (10)。H. ピロリは、胃炎及び消化性潰瘍疾患に関連しており、胃癌のリスクを増加させることができることが示されている。ウレアーゼは、H. ピロリの主要な毒性因子である。それは、細菌の酸性微小環境の中和に関与しており、H. ピロリ代謝においても役割を果たしている (11, 26)。

【0003】

H. ピロリのゲノムのウレアーゼ領域は、全ての株 (9 及び図 1) に共通の 2 つの遺伝子クラスターから構成されており、そのうちの一つは構造ウレアーゼサブユニットをコードする ure A B 遺伝子を含み、もう一つはウレアーゼ活性部位へのニッケルの取り込みに必要なアクセサリータンパク質をコードする ure E F G H を含有する。ure I 遺伝子は、この後者の遺伝子クラスターの直上流に位置し、同一の方向で転写される (図 1)。ure A 遺伝子、ure B 遺伝子、ure E 遺伝子、ure F 遺伝子、ure G 遺伝子、ure H 遺伝子、及び ure I 遺伝子、並びに遺伝子産物は、米国特許第 5,695,931 号及び認可された特許出願第 08/472,285 号に記載され、請求の範囲にも記載されており、これらはいずれも参考として本明細書に特別に組み込まれる。

20

【0004】

ure I から ure E まで (1 塩基対、bp) 及び ure E から ure F まで (11 bp) の距離は、ure I - ure E - ure F がオペロンを構成していることを示唆している。ure I 及び ure E の共転写は、ノーザンプロット解析により証明されている (1)。MiniTn - Km トランスポゾンにより中断された ure I 遺伝子を有する H. ピロリ N 6 突然変異体が、フェレロ (Ferrero) ら (1994) により以前に記載された (13)。この株 (N 6 - ure I : : Tn Km - 8) はウレアーゼ陰性表現型を表し、従って、ure I は完全なウレアーゼ活性に必要なアクセサリー遺伝子であると結論付けられた。

30

【0005】

H. ピロリ由来の Ure I と、シュードモナスアエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 及びロドコッカス (*Rhodococcus*) sp. R 312 の脂肪族アミダーゼオペロンによりコードされる Ami S タンパク質とは、配列が類似している (5, 27)。脂肪族アミダーゼは、相当する有機酸及びアンモニアを生成させるための、短鎖脂肪族アミドの細胞内加水分解を触媒する。H. ピロリも、インビトロ (in vitro) でアセトアミド及びプロピオニアミドを加水分解する、そのような脂肪族アミダーゼを有することが示されている (23)。

40

【0006】

Ure I 及び Ami S との配列類似性と、ウレアーゼ及びアミダーゼの基質 (尿素 : NH<sub>2</sub> - CO - NH<sub>2</sub> 及びアセトアミド : CH<sub>3</sub> - CO - NH<sub>2</sub>) の極めて類似した構造、並びに両酵素によるアンモニアの生成とを考え合わせると、H. ピロリ Ure I タンパク質の機能のより詳細な理解が必要である。この理解は、H. ピロリ感染の予防及び治療のための新規な機会を開くであろう。

50

## 【0007】

## 発明の概要

本発明は、インビボのヘリコバクター種、特にH.ピロリの増殖及び/又は生存を阻害することができる分子を同定する方法を提供する。特に、本発明の方法は、Ure Iタンパク質機能を特異的に阻害する分子をスクリーニングすることを含む。

## 【0008】

本発明は、本発明の方法により同定された分子、並びにヒト及び動物におけるヘリコバクター、特にH.ピロリの感染を処置又は予防するための、本発明の方法による分子の使用を包含する。

## 【0009】

本発明のもう一つの面は、インビボでヘリコバクター種の増殖及び/又は生存を阻害することができる分子の、そのような処置を必要とするヒト又は動物への投与による、ヘリコバクター種感染を予防又は処置するための方法である。本発明に係るそのような分子の一つは、それが(i)ヘリコバクター細胞の内部へ輸送されること、又は(ii)Ure Iの輸送特性を阻害すること、又は(iii)Ure Iとウレアーゼもしくはその他のヘリコバクタータンパク質との相互作用を阻害することによりUre I機能を阻害すること、を可能にするUre Iに対する高親和性を特徴とする。Ure Iを阻害することにより、そのような分子は、細菌の酸性に対する感受性を高める。

10

## 【0010】

本発明のさらにもう一つの面は、免疫原性Ure I抗原の作製、並びにヘリコバクター種の感染及び/又は胃もしくは腸におけるコロニー形成を予防するためのワクチンとしてのそれらの使用である。これらのUre I抗原に対する抗体も、本発明の範囲に包含される。

20

## 【0011】

本発明は、改変された遺伝子の産物が、in vivoでの細菌の生存能力の弱化に寄与し、従って病原性効果の弱化に寄与するよう、改変されたure I遺伝子を含むH.ピロリの組換え株にさらに関する。

## 【0012】

表2は、in vitro生存力試験及びpH測定で得られた結果を示す。

## 【0013】

30

表3は、図4のグラフに表された株N6及びN6-834によるアンモニア生成の値を与える。

## 【0014】

## 詳細な説明

ヘリコバクター種のウレアーゼクラスターは、特別の遺伝子ure Iを有するという点で、配列決定されているグラム陰性菌の多くのウレアーゼオペロンの中で独特である(20)。従って、Ure Iの機能は、多くの検討の対象となってきた。ほとんどの場合、Ure Iの機能は、ウレアーゼ活性部位へのニッケル取り込みに必要なアクセサリータンパク質、又はニッケルトランスポーターの機能であるとされてきた。非極性力セット(カナマイシン耐性力セット)により交換されたure Iの欠失を保持するH.ピロリ株が構築されており、N6-834と命名された(30)。その株は、1999年6月28日にC.N.C.M.(Collection Nationale de Culture de Microorganismes、25 rue du Docteur Roux、75724 Paris Cedex 15、France)に寄託された。非極性力セット(19)がH.ピロリで機能するところが示されたのは、これが最初であった。これらの結果は、Cag、多遺伝子病原性島(multigenic pathogenicity island)のような複雑なH.ピロリオペロンの遺伝学的分析のための貴重な道具を提供する。

40

## 【0015】

この株を用いた研究は、中性pHにおけるin vitro増殖後に測定されるH.ピロリウレアーゼの完全な活性にとって、Ure Iが必要とされないということを証明した。H.ピロリにおいて既に同定されているそのようなタンパク質NixA(3)が完全なウレアーゼ活

50

性にとって必要であるため、この結果は、Ure Iがニッケル輸送に関与していることに論を唱えるものである。Ure I欠損株から発現されたウレアーゼと、相当する親株から発現されたウレアーゼとの比較は、(i) それらが同一の活性最適pH(pH 8)を示すこと、(ii)ウレアーゼ構造サブユニットUre A - Bが等しい量で産生されること、及び(iii)ウレアーゼの細胞内の位置が同一であること、を示している。

## 【0016】

(i) Ure IがH.ピロリによるマウスにおけるコロニー形成にとって必須であること、(ii) Ure Iウレアーゼが酸性pHにおけるH.ピロリの生存にとって重要であること、及び(iii) Ure Iが低pHにおけるウレアーゼの「活性化」にとって必要であることが、本明細書において証明される。

10

## 【0017】

胃におけるコロニー形成過程において、H.ピロリは、重要なpH変動に対処しなければならず、特に極酸性pH(pH 1.4のような酸性)には迅速に適合しなければならない。本発明者らは、Ure Iが、マウス胃におけるコロニー形成の欠如と調和する、酸性に対するH.ピロリの適合にとって必要であることを示した。H.ピロリの酸性に対する耐性のための必須タンパク質として、Ure Iは、H.ピロリの感染、確立、及び持続において確実に重要な役割を果たしている。Ure Iは、尿素と構造的に類似した分子である短鎖アミドの輸送に関与していることが提唱されている(27) Ami Sタンパク質の配列と類似した配列を有している。Ure I / Ami Sタンパク質は、内在性膜タンパク質、おそらくは細胞膜の内在性膜タンパク質の特徴を有する。

20

## 【0018】

Ure Iの異なる役割も提唱されている。例えば、Ure Iは、低pHにおいて特に活性な尿素又は短鎖アミドの輸送(取り込み又は排出)に関与しているのかもしれない。しかし、脂肪族アミダーゼを欠損したSS1変異体は、マウスコロニー形成実験において親株と同等の効率でコロニー形成するため、アミドトランスポーターとしてのUre Iの必須の役割は、低いであろう。さらに、アミダーゼ活性は、N6-834突然変異株(1999年6月28日に提出されたC.N.C.M.)におけるure Iの欠失によって有意には変化しない。尿素の取り込み又は排出は、尿素回路の存在と調和している可能性があり、これはH.ピロリの特徴の一つである(28)。

30

## 【0019】

又は、Ure Iは、能動的なアンモニウム排出系に関与しているのかもしれない。最後に、Ure Iは、細胞外pHが酸性である場合にウレアーゼの活性が高くなることを可能にする、ウレアーゼ活性と細胞周辺pHとの結びつけのメカニズムに関与しているのかもしれない。

## 【0020】

本発明者らの結果は、Ure Iが酸性pH値において活性な尿素トランスポーターであるとする第1の仮説、及びUre Iが細胞周辺pHとウレアーゼ活性の間の一連のセンサー・タンパク質であるとする第3の仮説と一致している。本発明者らは、これらの2つの仮説は排他的なものではないと考える。Ure Iの役割が何であれ、in vivoでのH.ピロリの生存にとって必須な膜タンパク質として、それは、本発明において、新規な根絶療法及びH.ピロリに対するワクチンの強力な標的を提供する。

40

## 【0021】

in vivoのヘリコバクターの増殖及び/又は生存を阻害することができる分子は、親ヘリコバクター株を生物学的試料中の該分子と接触させること、尿素の存在下又は非存在下で、親株の細胞外pHに対する感受性を試験し、Ure Iにおける欠損株又はure Iで補足されたUre I欠損株と比較すること、Ure I欠損株と比較して異なる効果を親株又は補足された株に対して示す該分子を選択すること、及び該活性分子を収集すること、により同定されうる。

## 【0022】

Ure Iに特異的な活性を有する分子は、中性pHにおいては株の挙動に影響を与えること

50

なく、尿素の存在下で、H. ピロリを酸性pH (pH 2 . 2) に対して感受性にするものであろう。尿素の存在下での酸性に対する感受性は、実施例に記載され、クライン (Clyne) ら (8) から適合させたプロトコルに従い、すべてのH. ピロリ細胞において試験されうる。本発明者らは、プラスミド (ureAB-ureIEFGH) 上に全長ウレアーゼ遺伝子クラスターを保持するすべてのE. coli細胞において、この試験を転移することを現在試みている。尿素の存在下で、この組換えE. coliの酸性に対する感受性を高める分子のスクリーニングは、実施例においてH. ピロリに関して記載されたのと同様にして実施される。UreIに対して作用する阻害分子とウレアーゼに対して作用する阻害分子とを区別するため、尿素の存在下でpH 7 すべての細胞をインキュベートした後の培地のpHが測定されよう。目的の分子は、中性pHにおけるインキュベーションの後に観察される培地のアルカリ化を阻害することなく、酸性に対する応答に影響を与える分子である。  
10

## 【0023】

これらの方法は、UreIホモローグを保持するあらゆるヘリコバクター種を阻害する分子を同定するために用いられる。これは、胃内ヘリコバクター種：ヘリコバクター ピロリ、ヘリコバクター フエリス (Helicobacter felis)、ヘリコバクター ムステレ (Helicobacter mustelae)、ヘリコバクター ムリダラム (Helicobacter muridarum) を含み、さらに、ヘリコバクター ヘイルマンニ (Helicobacter heilmannii)、ヘリコバクター カニス (Helicobacter canis)、ヘリコバクター ビリス (Helicobacter bilis)、ヘリコバクター ヘパチクス (Helicobacter hepaticus)、及びヘリコバクター トロガントム (Helicobacter troguntum) を含む。  
20

## 【0024】

本発明の方法により同定された分子は、(i) 尿素又は短鎖アミドの輸送の阻害、(ii) アンモニウム排出の阻害、又は(iii) 低pHにおけるウレアーゼ「活性化」の阻害により、UreI活性を阻害することができるであろう。要点(i)及び(ii)による分子は、外膜全体に拡散することができるべきであり、低濃度でも活性を有するべきである。適当な候補分子は、尿素又は短鎖アミドの構造アナログ、アンモニウム誘導体、又はウレアーゼ阻害剤である。例えば、AHA (アセトヒドロキサム酸)、ヒドロキシ尿素、馬尿酸、フルロファミド (fluorofamide)、ヒドロキシルアミン、メチル尿素、チオ尿素 (29)、又はメチルアンモニウムである。要点(iii)による分子は、低pHにおけるウレアーゼの「活性化」にとって必要な、(おそらく細胞膜に挿入されている) UreIと、細胞周辺、膜、又は細胞質のH. ピロリタンパク質との接触を阻害するべきである。これらのタンパク質は、ウレアーゼ自体の構造サブユニット、アクセサリータンパク質、又はその他のタンパク質でありうる。本発明に従って得られた分子は、ウレアーゼ競合阻害剤であるべきではなく、in vivoで有毒又は変異原性であるべきではなく、抗生物質又は殺菌分子の作用を強化するかもしれない。そのような分子の作用の実証は、実施例に記載されたような同遺伝子株SS1及びSS1-834の対を有するマウス動物モデルにおいて、in vivoで実施されうる。  
30

## 【0025】

本発明に係る分子の一例は、UreIに特異的なモノクローナル又はポリクローナルの抗体である。好ましくは、抗体は、UreI活性を特異的に阻害することができる。  
40

## 【0026】

本発明の分子は、薬学的に許容される担体と組み合わせて、ヘリコバクター感染に罹患した患者に投与されうる。又は、本発明に係る一つ又は複数の分子を含む免疫原性組成物を、ヘリコバクター種感染を予防するためのワクチン組成物として投与することができる。

## 【0027】

本発明に係る免疫原性組成物は、UreIタンパク質の全部又は一部も含みうる。好ましくは、UreI断片は、元来のUreI配列の少なくとも10個の連続するアミノ酸を含み、より好ましくは、断片は、元来のUreI配列の少なくとも18個、20個、又は25個の連続するアミノ酸を含む。適当なUreI断片は、天然UreI配列の少なくとも  
50

40個又は少なくとも100個の連続するアミノ酸を含有しうる。ヘリコバクター ピロリの適当な断片は、例えば、H. ピロリ (GenBank accession No. M84338) のアミノ酸残基22から31、49から74、94から104、及び123から142からなる群より選択される断片を含む。

【0028】

以下の実施例を参照されたい。実施例は、本発明の純粋な例示であり、本発明を限定するためのものではない。

【0029】

【実施例】

H. ピロリ ure I 遺伝子の限定された突然変異の構築

10

Ure Iタンパク質が活性なウレアーゼの産生にとって必要であるか否かを決定するため、対立遺伝子交換により、ure Iの限定された突然変異を有するH. ピロリ株を作製した。この目的のため、ure Iに挿入された抗生物質耐性遺伝子を保持するカセットを有する2つのプラスミド (pILL823及びpILL834) を、E. coliにおいて構築した。

【0030】

一つのプラスミドpILL823 (図2A)においては、クロラムフェニコール (Cm) に対する耐性を与えるプロモーターないcat遺伝子の挿入により、ure I遺伝子を不活性化した。pCM4 (Pharmacia、スウェーデン) 由来の「catカートリッジ」を含有する780bpの平滑末端BamHI制限断片を、pILL753 (9) 中のure Iのコドン21及び22の間の唯一のHpaI部位に導入した。得られたプラスミドpILL823 (図2A)においては、catが、ure Iと同一の向きにあり、ure Iプロモーターの調節下で発現する。

20

【0031】

第2のプラスミドpILL834は、最初の21コドン以外が全て欠失しており、自己のプロモーター領域及びターミネーター領域 (19) から欠失されたaphA-3カナマイシン (Km) 耐性遺伝子 (25) から構成される非極性カセットと置換されているure I遺伝子を保持していた。シゲラ フレクスネリ (Shigella flexneri) (19) 及び (エルシニア・エンテロコリチカ (Yersinia enterocolitica、2のような) その他の生物において、このカセットは、これらの遠位の遺伝子が完全な翻訳シグナルを有している限り、オペロン内の下流の遺伝子の転写に影響を与えないことが示されている。ure Iとure Eの間には1塩基のみが存在し (図1)、ure Eは自己のRBS (リボソーム結合部位) を有しないため、ure I及びure Eの発現は、転写及び翻訳に関して連結している。従って、ure I欠失は、ure Eの直上流へのRBSの付加に付随して起こったものである。最終的なプラスミドpILL834 (図2A)を作製するために、3つの中間体pILL824、pILL825、及びpILL833 (図2A)が構築された。pBR322のEcoRV部位とHindIII部位の間に、pILL753 (9) 由来の1.8KbのHpaI-HindIII制限断片を挿入し、pILL824を得た。pILL824のure Eの最初の2つのコドンと重複するBclI部位へのH19アダプター (ure EとインフレームでRBS及びATGを保持する、表1) の挿入により、pILL825 (図2A)を作製した。次いで、pILL825のBamHI断片を、pILL753由来の1.3Kbの平滑末端PvuII-BamHI断片と置換した。これにより、完全なure I遺伝子が再構築され、このプラスミドをpILL833と名付けた。最後に、pILL833のHpaI-BglII断片と、非極性Kmカセットを含有するpUC18K2 (19) の850bpの平滑末端EcoRI-BamHI断片との置換 (それによりure Iの最初の21コドン以外の全てが欠失) により、pILL834を得た。

30

【0032】

【表1】

表1：オリゴヌクレオチドの名称及びヌクレオチド配列

プライマー	オリゴデオキシヌクレオチド配列 (5'→3')
H17	TTTGA CTTACTGGGGATCAAGCCTG (SEQ ID NO:1)
H19*	GATCATTATTCCCTCCAGATCTGGAGGAATAAAT (SEQ ID NO:2)
H28	GAAGATCTCTAGGACTTGTATTGTTATAT (SEQ ID NO:3)
H34	TATCAACGGTGGTATATCCAGTG (SEQ ID NO:4)
H35	GCAGTTATTGGTGCCCTTAAACG (SEQ ID NO:5)
H50	CCGGTGATATTCTCATTTAGCC (SEQ ID NO:6)
8A	GCGAGTATGTAGGTTAGTA (SEQ ID NO:7)
9B	GTGATACTTGAGCAATATCTTCAGC (SEQ ID NO:8)
12B	CAAATCCACATAATCCACGCTGAAATC (SEQ ID NO:9)

\*H19はアダプターとして使用され、その他はPCR増幅のためのプライマーとして使用された。

### 【0033】

#### H. ピロリへのure I 突然変異の導入

H. ピロリ株N6(12)及びマウス適合H. ピロリ株SS1(シドニー株(Sydney Strain)、17)由来のスコウロウブリス(Skouloubris)ら(23)により以前に記載されたpILL823及びpILL834の濃縮された調製物のエレクトロポレーションの後、対立遺伝子交換によりH. ピロリure I変異体を作製した。pILL823との染色体対立遺伝子交換を有する細菌をCm(4 µg/ml)上で選択し、pILL834との染色体対立遺伝子交換を有する細菌をKm(20 µg/ml)上で選択した。適当なオリゴヌクレオチド(表1)を用いたPCRを実施することにより、所望の対立遺伝子交換が株N6-823、N6-834、及びSS1-834(図1)において起こっていることが決定された。これらの株のゲノミックDNAを用いて得られたPCR産物は、予想通り、(i)株N6-823については、プライマーH28-H34では140bp、H35-9Bでは220bp、H28-9Bでは1.2Kbであり、(ii)株N6-834及びSS1-834については、プライマーH28-H50では150bp、H17-12Bでは180bp、H28-12Bでは1Kbであった。

### 【0034】

ure Iの非極性欠失を保持する株N6-834の増殖速度を、親株N6の速度と比較した。血液寒天培地プレート上で、コロニーサイズの違いは、観察されなかった。0.2% -シクロデキストリン(Sigma)を含有するBHI(Oxoid)液体培地で増殖させた両方の株において、同一の倍化時間及び定常期ODが測定された。従って、Ure Iは、in vitroのH. ピロリの増殖にとって必須ではない。

### 【0035】

H. ピロリure I変異体のウレアーゼ活性

クサック(Cussac)ら(9)により以前に記載されたようにして、株N6-823、N6-834、及びSS1-834のウレアーゼ活性をインピトロで測定し、親株N6及びSS1(図1)の活性と比較した。株N6-823においては、ウレアーゼ活性はほぼ完全に消失していた(0.3±0.1ユニット)。非極性ure I突然変異を有する株N6-834及びSS1-834は、野生型の活性レベルを有していた(N6-834及びSS1-834:12±2ユニット; 親株N6:10±1、SS1:12±0.4ユニット)。

### 【0036】

N6親株又はUre I欠損株N6-834のいずれかから作製されたウレアーゼの最適pHを測定し比較した。両方の株において、ウレアーゼは発表されているデータと一致する

10

20

30

30

40

50

という最適pHを有していた。

【0037】

これらの結果は、N 6 - ure I : : Tn Km - 8 (13) のウレアーゼ陰性表現型及び N 6 - 823 株の極めて弱いウレアーゼ活性が、下流遺伝子 ure E 及び ure F (図1) の発現に対する、挿入されたカセットの極性効果によるものであったことを強く示唆している。ure E - F 遺伝子を発現する E. coli / H. ピロリのシャトルプラスミドによりトランスで補足された株 N 6 - 823 のウレアーゼ活性を測定することにより、この仮説を試験した。このプラスミド pILL845 (図2B) は、(ure B の 3' 末、ure I の非極性欠失、並びに完全な ure E 遺伝子及び ure F 遺伝子を含む) pILL834 の 2.8 Kb の C1aI - BamHI 断片の、ヒュアマン (Heuermann) 及びハース (Haas) (15) により構築されたシャトルベクター pHe12 の対応する部位への挿入により得られた。株 N 6 - 823 に、スコウロウブリス (Skouloubris) ら (23) により記載されたような pILL845 の DNA 調製物をエレクトロポレーションにより導入し、形質転換体をカナマイシン (20 µg/ml) 及びクロラムフェニコール (4 µg/ml) 上で選択した。pILL845 を保有する株 N 6 - 823 において、野生型ウレアーゼ活性が回収され、株 N 6 - 823 の極めて低いウレアーゼ活性が補助遺伝子 ure E - F の発現に対する極性効果によるものであることが確認された。クレブシエラ アエロゲネス (Klebsiella aerogenes) において、Ure E の欠如は、ウレアーゼ活性に対してほとんど効果を有しなかった (4)。対照的に、Ure F は、アクセサリータンパク質複合体 (Ure DFG) の一部として、活性なウレアーゼの產生にとって絶対的に必要である (21)。従って、類推により、H. ピロリ極性 ure I 変異体の表現型は、ure F 発現の欠如のためであった可能性が高い。

【0038】

株 N 6 又は株 N 6 - 834 により產生されたウレアーゼ構造サブユニット、Ure A 及び Ure B を、各ウレアーゼサブユニットに対する抗血清の混合物を使用したウェスタンプロット技術で比較した。2つの株により產生された各サブユニットの量は同一であることが観察された。株 N 6 及び N 6 - 834 の細胞分画 (膜関連タンパク質及び上清からの可溶性タンパク質の分離) の後、Ure I の非存在下でウレアーゼの細胞内局在が影響を受ける可能性を調査した。これらの実験は、野生型株と Ure I 欠損突然変異体のウレアーゼの細胞内局在に差がないことを明らかにした。これらの結果は、中性pHにおいて、Ure I が、ウレアーゼ構造サブユニットの安定化にも、ウレアーゼの特定の細胞区画へのターゲティング過程にも関与していないことを証明している。

【0039】

マウス動物モデルにおける H. ピロリ SS1 - 834 変異体のコロニー形成試験  
チェバリエ (Chevalier) ら (7) 及びフェレロ (Ferrero) ら (14) によりバリデートされた H. ピロリ SS1 株 (シドニー株、17) 感染に関するマウスモデルを使用して、in vivo の Ure I の機能を試験した。マウスに非極性 ure I 突然変異体 SS1 - 834、及び陽性対照としての (同数のインビトロ継代を経た) 親株 SS1 を感染させた。この実験を 3 回繰り返し、同一の結果を得た (30)。2つの独立に構築された SS1 - 834 突然変異体を使用した。第 1 の変異株は 30 回のインビトロ継代を経ていたが、第 2 の株は 20 回のみであった。同一の実験条件下で、株 SS1 は、そのコロニー形成能を失うことなく、80 回超のインビトロ継代を経ることができる。

【0040】

各実験において、ペプトンブロースにおいて調製された 10<sup>6</sup> 個の H. ピロリ 株 SS1 又は SS1 - 834 菌を含有する上清 (100 µl) を、フェレロ (Ferrero) ら (14) により記載されたようにして、それぞれ 10 匹のマウス (6 から 8 週齢のスイス (Swiss) 特定病原体なしのマウス) に経口胃内 (orogastrically) 投与した。接種の 4 週間後にマウスを屠殺した。胃の半分に対して実施された生検標本における直接ウレアーゼ試験を用いて、H. ピロリの存在を試験した (14)。残りの胃組織は、フェレロ (Ferrero) ら (14) により記載されたようにして、H. ピロリの定量的培養のため使用した。各実験

10

20

30

40

50

において、10個全てのSS1感染マウスの胃が、ウレアーゼ陽性と判定された。細菌負荷量は、胃1g当たり $5 \times 10^4$ コロニー形成単位(CFU)と $5 \times 10^5$ CFUの間であった。株SS1-834を感染させたマウスの胃で、ウレアーゼ陽性と判定されたものは存在せず、それらからH.ピロリ細胞は培養されなかった。従って、UreIタンパク質は、H.ピロリのin vivoの生存及び/又はマウス胃におけるコロニー形成にとって必須である。

#### 【0041】

UreIはH.ピロリの酸性に対する耐性にとって必須である

株N6及びN6-834を用いて、10mM尿素の存在下又は非存在下における酸性条件における生存を試験した。スコウロウブリス(Skouloubris)ら(30)に詳述されている実験法は、クライン(Clyne)ら(8)に記載された手法に基づいている。対数増殖期の細菌を収集し、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄し、およそ $2 \times 10^8$ CFU/mlを、10mM尿素の存在下又は非存在下で、pH2.2又はpH7のPBSに再懸濁させ、37でインキュベートした。1時間のインキュベーションの後、(i)細菌の生存を評価するためH.ピロリの定量的培養を実施し、(ii)細菌を遠心分離し培地のpHを測定した。得られた結果を、表2に示す。尿素の非存在下では、株N6及びN6-834はいずれも同一の表現型を示し、即ち、それらは、培地の最終pHを変更することなくpH2.2では死滅し、pH7では生存した(表2)。尿素の存在下、pH7におけるインキュベーションの後は、最終pHがpH9に上昇したために、いずれの株も死滅した。尿素の存在下、pH2.2では、親株は、pHを中性にまで上昇させることができたため、生存率が高かった。対照的に、pHを上昇させることができず、その生存力が重大な影響を受けたUreI欠損株N6-834では、完全に異なる表現型が得られた(表2)。

10

#### 【0042】

UreI欠損株N6-834のプラスミドpILL850による補足

H.ピロリの酸性に対する抵抗能におけるUreIタンパク質の直接的な関与が、プラスミドpILL850(図2B制限地図及び構築の詳細)によるトランス補足により確認された。このプラスミド(1999年6月28日に提出されたCNCM I-2245)は、H.ピロリ/E.coliシャトルベクターpHe12(15)に由来する。プラスミドpILL850は、自己のプロモーターの制御下のureI遺伝子を保持しており、以下のようにして構築された。プラスミドpILL753(9)の1.2KbのBc1I制限断片を、pHe12(図2B)のBamHI制限部位とBc1I制限部位の間に導入した。株N6及びN6-834をこのプラスミドで形質転換し、前記の酸性感受性試験実験における補足された株の表現型を調査した。表2に示されたように、pILL850により補足された株N6-834の表現型は、親株N6の表現型と同一である。興味深いことに、(スコウロウブリス(Skouloubris)ら(30)に記載のような超音波処理された抽出物において測定された)補足された株のウレアーゼ活性は、pILL850を含まない相当する株の活性と比較してわずかに高いことが見出された。CNCMへの寄託の目的のため、pILL850をE.coli株MC1061(Wertman KF et al., 1986, Gene 49:253-262)に置いた。

20

#### 【0043】

アンモニウム産生の測定

H.ピロリ完全細胞の細胞外培地中に産生されたアンモニウムの量を、シグマ(Sigma)より市販されている酵素アッセイにより、供給元の指示に従い測定した。これらの実験は、異なるpH値におけるPBS中の細胞のインキュベーションの後、及び異なるインキュベーション時間の後に実施した。そのような実験は、異なる株におけるアンモニウムの産生及び分泌の正確な評価、並びにこの反応の動力学の測定を与えた。対照実験は、アンモニウム産生が尿素の非存在下では極めて低い(10~20μM)ことを示した。

30

#### 【0044】

図4は、10mM尿素の存在下で、pH2.2、pH5、又はpH7において、PBS中でインキュベートされたN6親株(パネルA)及びUreI欠損株N6-834(パネルB)から

40

50

放出された細胞外アンモニウムの動力学（0分、3分、5分、及び30分のインキュベーション時間）を示している。得られた結果は、(i)アンモニウムが多量に産生され細胞外培地に迅速に放出されること、及び(ii)N6野生型株（図4、パネルA、及び表3）においては、細胞外pHが酸性である場合に、アンモニウム産生が有意に増強されることを示している。この効果は、pH5で既にみられ、pH2.2においてはさらに強い。この最後の観察は、低pHにおけるウレアーゼの活性化を示唆したスコット（Scott）ら（31）の結果と一致している。本発明者らの実験において、酸性に対する応答が迅速であったことは、ウレアーゼ活性化が、転写制御又はde novoタンパク質合成に依存するものであることに異論を唱えるものである。

## 【0045】

10

次いで、UreI欠損株N6-834（図4、パネルB、及び表3）においてアンモニウム産生を測定した。中性pHにおいては、アンモニウム産生の動力学は野生型の動力学と類似していた。対照的に、pH5においては、アンモニウム産生は野生型株と比較して減少し、遅延した。pH2.2においては、UreIの欠如の劇的な効果が観察され、アンモニウムの量が極めて低かったが、それは、UreIが酸性に対する適合にとって必要であることを示す本発明者らの結果と一致している。

## 【0046】

本発明者らの結果は、H.ピロリの酸性に対する耐性にとってUreIが必須であることを証明している。UreIの非存在下においては、ウレアーゼは、大量に存在していても、酸性の攻撃から細菌を防御することができない。これは、in vivoのUreIの必須の役割と一致している。酸性の胃内腔を通過する間、UreI欠損株の生存力は影響を受ける。結果として、細菌の負荷量はコロニー形成が不可能なほどに低くなる。UreIに関して提唱されている異なる役割は、「詳細な説明」の部分に示されている。

20

## 【0047】

UreIタンパク質及びAmiSタンパク質の配列の整列化並びに2次元構造予測タンパク質データバンクにおけるUreIホモローグの体系的な検索を実施した。ureI遺伝子を有する尿素分解(ureolytic)細菌が、H.ピロリのみでないことが決定された。2つの系統発生的に関連したグラム陽性生物、ストレプトコッカス サリバリウス(Streptococcus salivarius)という歯苔菌(6)及びラクトバチルス ファーメンタム(Lactobacillus fermentum)という乳酸菌(16)は、ウレアーゼ構造遺伝子の直上流に位置するUreIホモローグ(図3)の遺伝子を保持している。ureI遺伝子は様々なヘリコバクター種において検出されており、H.フェリスのureI遺伝子は完全に配列決定されている(図3、及び認可された米国特許出願第08/467,822号、この内容は完全に参照として本明細書に組み込まれる)。PCR実験は、H.ヘイルマンニ(24)及びH.ムステレにureI遺伝子が存在することを示唆した。

30

## 【0048】

H.ピロリのUreIタンパク質と、P.アエルギノサ(27)及びロドコッカスsp.R312(5)由来の脂肪族アミダーゼオペロンにより発現されるAmiSタンパク質との配列類似性が報告されている。ミコバクテリウム・スメグマチス(Mycobacterium smegmatis)においては、アミダーゼ遺伝子の直上流に位置する遺伝子ORF\_P3によりコードされる付加的なAmiSホモローグが存在する(18)。

40

## 【0049】

これらのUreI/AmiSタンパク質の整列化[クラスタル(Clustal)W(1.60)プログラムを使用]は、強く保存されたアミノ酸ストレッチ(図3)を決定した。これらの保存されたブロックのうち1つを除く全てが、高度に疎水性のセグメントに存在した。それぞれ17から22残基長のこれらの領域は、おそらく膜貫通型-ヘリックスに折り畳まれる(図3)。H.ピロリ、H.フェリス、及びP.アエルギノサ由来のタンパク質については6個の膜貫通領域が予測され、ロドコッカスsp.R312及びM.スメグマチス由来のタンパク質については7個が予測された(ロスト(Rost)ら(22)に記載のようなプルフィール・フェッド・ニューラル・ネットワーク・システム(profile fed

50

neural network system)、pH Dを用いて実施された信頼性の高い予測)。膜におけるUre I / Ami Sタンパク質の方向は、これらのタンパク質において短い挿入された親水性領域の電荷から推定された(図3)。最初の5個のそのような領域は保存性が低く、様々な長さを有していた。これらのタンパク質に共通の最後のヘリックス間セグメントは、他よりも有意に保存性が高かった。細胞内であると予測されるこの領域は、Ure Iの活性部位、又は多量体化もしくは細胞内パートナーとの相互作用の部位であり得る。これらの結果は、グラム陽性菌及び陰性菌の両方に見出されるUre I / Ami Sファミリーのメンバーが、膜内在性タンパク質であることを強く示唆している。これらのタンパク質は、シグナル配列を有しておらず、従ってグラム陰性菌の細胞膜に挿入されるべきである。

10

## 【0050】

Ure I配列から選択された2つのペプチドを合成し、Ure Iに対するポリクローナル抗体を含有する血清を得るために、2匹のウサギに注射した。1つのペプチドは、Ure Iの第一に予測された細胞内ループ(残基nB15から31まで、図3を参照のこと)に相当し、第二のペプチドはUre Iの第二に予測された細胞内ループ(残基nB118から134まで、図3を参照のこと)に相当した。これらの血清は、現在試験中であり、もしUre Iタンパク質を認識することが判明すれば、このタンパク質の局在を正確に決定し、図3に示された予測されたUre I 2次元構造を確認することを可能にするであろう。

## 【0051】

本明細書に引用された参照は、完全に参照として特別に組み込まれる。

20

## 【0052】

## 【表2】

表2

株	初期pH	最終pH	尿素(10mM)	H.ピロリ(CFU/ml)
N6	2.2	2.26	-	0
N6	2.2	6.6	+	8×10 <sup>7</sup>
N6	7	6.98	-	2×10 <sup>8</sup>
N6	7	8.88	+	0
N6-834	2.2	2.2	-	0
N6-834	2.2	2.37	+	7×10 <sup>5</sup>
N6-834	7	7.1	-	3.5×10 <sup>7</sup>
N6-834	7	9.05	+	0
N6-834+pILL850	2.2	2.3	-	0
N6-834+pILL850	2.2	6.9	+	1.3×10 <sup>8</sup>
N6-834+pILL850	7	7.1	-	1.7×10 <sup>8</sup>
N6-834+pILL850	7	9	+	0

30

表2: (i)異なるH.ピロリ株の生存能力、及び(ii) (最終pHとして示される)細胞外pH、に対するpH7、5、又は2、2における尿素の存在の効果。実験法は、参照30及び実施例に記載されている。株N6は親株であり、N6-834はUre I欠損突然変異体である。プラスミドpILL850はE. coli/H.ピロリシャトルベクターに由来し、ure I遺伝子を保持し、株N6-834のure I変異体を補足する。

40

## 【0053】

## 【表3】

表3

株	培地 pH	分	[NH4] mM
N6	7.0	0	3.5
N6	7.0	3	4.4
N6	7.0	5	3.1
N6	7.0	30	5.6
N6	5.0	0	12.8
N6	5.0	3	9.3
N6	5.0	5	11.8
N6	5.0	30	16.0
N6	2.2	0	6.7
N6	2.2	3	9.0
N6	2.2	5	11.0
N6	2.2	30	20.0
10			
N6-834	7.0	0	2.7
N6-834	7.0	3	2.8
N6-834	7.0	5	3.8
N6-834	7.0	30	5.8
N6-834	5.0	0	1.4
N6-834	5.0	3	1.7
N6-834	5.0	5	2.9
N6-834	5.0	30	4.6
N6-834	2.2	0	0.9
N6-834	2.2	3	0.6
N6-834	2.2	5	0.7
N6-834	2.2	30	1.3
20			
30			

## 【0054】

## 参考文献

1. Akada, J. K., M. Shirai, H. Takeuchi, M. Tsuda, and T. Nakazawa. 1997. Transcriptional analysis of urease structural gene and the urel gene in *Helicobacter pylori*. Gut. 41:A9.
  2. Allaoui, A., Schulte, R. and G. R. Cornelis. 1995. Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* virC operon: characterization of yscE,F,G,H,I,J,K required for Yop secretion and yscH encoding YopR. Mol. Microbiol. 18:343-355.
  3. Bauerfeind, P., R. M. Garner, and H. L. T. Mobley. 1996. Allelic exchange mutagenesis of nixA in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. Infect. Immun. 64:2877-2880.
  4. Brayman, T. G., and R. T. Hausinger. 1996. Purification, characterization, and functional analysis of a truncated *Klebsiella aerogenes* UreE urease accessory protein lacking the Histidine-Rich carboxyl terminus. J. Bacteriol. 178:5410-5416.
  5. Chebrou, H., F. Bigey, A. Arnaud, and P. Galzy. 1996. Amide metabolism: a putative ABC transporter in *Rhodococcus* sp. R312. Gene. 182:215-218.
- 40 50

6. Chen, Y.-Y. M., K. A. Clancy, and R. A. Burne. 1996. *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect. Immun.* 64:585-592.
7. Chevalier, C., J.-M. Thiberge, R. L. Ferrero, and A. Labigne. 1999. Essential role of *Helicobacter pylori* g-Glutamyltranspeptidase (GGT) for the colonization of the gastric mucosa in mice. *Mol. Microbiol.* 31:1359-1372.
8. Clyne, M., A. Labigne, and B. Drumm. 1995. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect. Immun.* 63:1669-1673.
9. Cussac, V., R. L. Ferrero, and A. Labigne. 1992. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 174:2466-2473. 10
10. Dunn, B. E., H. Cohen, and M. Blaster. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:720-741.
11. Eaton, K. A., and S. Krakowka. 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62:3604-3607.
12. Ferrero, R. L., V. Cussac, P. Courcoux, and A. Labigne. 1992. Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J. Bacteriol.* 174:4212-4217. 20
13. Ferrero, R. L., V. Cussac, P. Courcoux, and A. Labigne. 1994. Construction of isogenic mutants of *Helicobacter pylori* deficient in urease activity. pp179-182. In *Basic and Clinical Aspects of H. pylori infection*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
14. Ferrero, R. L., J.-M. Thiberge, M. Huerre, and A. Labigne. 1998. Immune responses of specific-pathogen-free mice to chronic *Helicobacter pylori* (strain SS1) infection. *Infect. Immun.* 66:1349-1355.
15. Heuermann, d., and R. Haas. 1998. A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by complementation and conjugation. *Mol. Gen. Genet.* 257:519-528. 30
16. Kakimoto, S., Y. Sumino, K. Kawahara, E. Yamazaki, and I. Nakatsui. 1990. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Microbiol. & Biotechnol.* 32:538-543.
17. Lee, A., J. O'Rourke, M. Corazon De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M. F. Dixon. 1997. A standardized model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney Strain. *Gastroenterology*. 112:1386-1397.
18. Mahenthiralingam, E., P. Draper, E. O. Davis, and M. J. Colston. 1993. Cloning and sequencing of the gene which encodes the highly inducible acetamidase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Gen. Microbiol.* 139:575-583.
19. Menard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175:5899-5906. 40
20. Mobley, H. L. T., M. D. Island, and R. P. Hausinger. 1995. Molecular biology of ureases. *Microbiol. Rev.* 59:451-480.
21. Moncrief, M. B. C., and R. P. Hausinger. 1997. Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease. *J. Bacteriol.* 179:4081-4086.
22. Rost, B., R. Casadio, P. Fariselli, and C. Sander. 1995. Prediction of helical transmembrane segments at 95% accuracy. *Prot. Science.* 4:521-533. 50

23. Skouloubris, S., A. Labigne, and H. De Reuse. 1997. Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 25: 989-998.
24. Solnick, J. V., J. O'Rourke, A. Lee, and L. S. Tompkins. 1994. Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. *Infect. Immun.* 62:1631-1638.
25. Trieu-Cuot. P., G. Gerbaud, T. Lambert, and P. Courvalin. 1985. In vivo transfer of genetic information between Gram-positived and Gram-negative bacteria. *EMBO J.* 4:3583-3587.
26. Williams, C. L., T. Preston, M. Hossack, C. Slater, and K. E. L. McColl. 1996. *Helicobacter pylori* utilizes urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:87-94. 10
27. Wilson, S. A., R. J. Williams, L. H. Pearl, and R. E. Drew. 1995. Identification of two new genes in the *Pseudomonas aeruginosa* amidase operon, encoding an ATPase (AmiB) and a putative integral membrane protein (AmiS). *J. Biol. Chem.* 270:18818-18824.
28. Mendz, G. L. and S. L. Mazell. 1996. The Urea Cycle of *helicobacter pylori*. *Microbiology* 142:2959-2967.
29. Nicholson, E. B., E. A. Concaugh and H. L. T. Mobley. 1991. *Proteus mirabilis* urease: use of ureA-lacZ fusion demonstrates that induction is highly specific for urea. *Infection and Immunity*. 59(10):3360-3365. 20
30. Skouloubris, S., J.-M. Thibierge, A. Labigne and H. De Reuse (1998) The *Helicobacter pylori* Urel protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect. Immun.* 66:4517-4521.
31. Scott, D. R., Weeks, C. Hong, S. Postius, K. Melchers and G. Sachs (1998) The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 114:58-70.

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 H. ピロリ親株N 6 及びSS 1、並びにU r e Iを欠損した誘導された突然変異体株N 6 - 8 2 3、N 6 - 8 3 4、及びSS 1 - 8 3 4のウレアーゼ遺伝子クラスターを示す図である。遺伝子は、転写方向を示す矢印を含むボックスにより示されている。u r e 遺伝子間の距離は塩基対、bpで与えられている。株N 6 - 8 2 3、N 6 - 8 3 4、及びSS 1 - 8 3 4における正確な対立遺伝子交換を確認するために使用されたプライマーにハイブリダイズする部位が示されている。空白のボックスは、C m ( c a t )又はK m ( a p h A - 3 )に対する耐性を与える遺伝子を含有するカセットを表す。これらの株のウレアーゼ活性は、図の右側に与えられている。ウレアーゼ活性は、以前に記載されたようにして(9)血液寒天プレート上で48時間増殖させた細菌の粗抽出物におけるアンモニアの放出として測定された。1ユニットは、1分当たり全タンパク質1mg当たりの1  $\mu$ molの尿素を加水分解するために必要な酵素の量に相当する。データは、3から5回の決定から計算された平均±標準偏差である。 30

【図2A1】 p I L L 8 2 3、p I L L 8 2 4、p I L L 8 3 3、及びp I L L 8 3 4の制限地図を示す図である。小さいボックスは各プラスミドのベクターを示し、大きなボックスは遺伝子に相当する。O r iは、C o l E 1複製開始点の位置を示す。S p<sup>R</sup>及びA p<sup>R</sup>は、それぞれスペクチノマイシン及びアンピシリンに対する耐性を与える遺伝子である。u r e Iに挿入され、クロラムフェニコール(c a t)又はカナマイシン(a p h A - 3)に対する耐性を与えるカセットも、示されている。アダプターH 1 9が挿入されたB c l I部位を含む、u r e I終止コドン及びu r e E開始コドンを含むD N A領域の配列が与えられている。p I L L 8 2 4のB c l I部位へのH 1 9の挿入により、p I L L 8 2 5が作製され、得られたu r e I - u r e E遺伝子間領域も示されている。u r e 40

I の終止コドン及びu r e E の開始コドンはボックスで示され、リボソーム結合部位 (RBS) は下線で示されている。括弧は、ライゲーションにより除去された制限部位の位置を示す。

【図2A2】 p I L L 8 2 3 、 p I L L 8 2 4 、 p I L L 8 3 3 、 及び p I L L 8 3 4 の制限地図を示す図である。

【図2B】 2つのH.ピロリ / E. coli シャトルベクター、p I L L 8 4 5 及び p I L L 8 5 0 の制限地図を示す図である。小さいボックスは各プラスミドのベクターを示し、大きなボックスは遺伝子に相当する。O r i は、E. coli C o l E 1 複製開始点の位置を示し、r e p A はH.ピロリのp H e l 2 の自律複製に必要なR e p A タンパク質をコードする遺伝子を示す。C m<sup>R</sup>は、クロラムフェニコールに対する耐性を与える遺伝子である。u r e I プロモーターは、転写方向を示す矢印を含む「P」により示されている。その他の記号は図1と同様である。

【図3A】 H.ピロリ由来のU r e I のアミノ酸配列と、類似タンパク質の配列との整列化、及びU r e I / A m i S タンパク質ファミリーのメンバーの2次元構造の予測を示す図である。少なくとも4つの配列の1つの位置で同一である残基はボックスで示されており、点線は整列化を最適化するために挿入されたギャップを示す。配列の起源生物及びH.ピロリU r e I タンパク質との同一性の程度は、U r e I - H p 、ヘリコバクターピロリ (195残基、accession No. M84338) ; U r e I - H f 、ヘリコバクター フェリス (196残基で74%同一、accession No. A41012) 、U r e I - L a c t o 、ラクトバチルス ファーメンタム (46残基長の部分配列で55%同一、accession No. D10605) ; U r e I - S t r e p t o 、ストレプトコッカス・サリバリウス (129残基長の部分配列で54%同一、受託番号U 3 5 2 4 8) ; A m i S - M y c o 、ミコバクテリウム スメグマチス (172残基で39%同一、accession No. X57175) ; A m i S - R h o d 、ロドコッカス s p . R 3 1 2 (172残基で37%同一、accession No. Z46523) ; 及びA m i S - P s e u d o 、シュードモナス・アエルギノサ (171残基で37%同一、accession No. X77161) である。予測される膜貫通 - ヘリックスは影付きのボックスとして示されている。これらのボックスを隔離している領域は、細胞内であると予測される場合には「内」、細胞外であると予測される場合には「外」と記された親水性ループである。

【図3B】 H.ピロリ由来のU r e I のアミノ酸配列と、類似タンパク質の配列との整列化、及びU r e I / A m i S タンパク質ファミリーのメンバーの2次元構造の予測を示す図である。

【図4A】 N 6 親株 (パネルA) 及びU r e I 欠損株 N 6 - 8 3 4 (パネルB) からのアンモニウム放出の動力学を示す図である。細菌 ( $2 \times 10^8 / \text{ml}$ ) を収集し、(スコウロウブリス (Skouloubris) ら (30) に記載のようにして) 洗浄し、10 mM尿素の存在下でpH 7、5、又は2.2でリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に再懸濁させた。0分、3分、5分、及び30分後、0.5 ml を採取し、細菌を排除するため遠心分離した。シグマ (Sigma) より市販されているアッセイ (キットリファレンス # 171) を使用してアンモニウム濃度を測定するまで、上清を氷上に維持した。

【図4B】 N 6 親株 (パネルA) 及びU r e I 欠損株 N 6 - 8 3 4 (パネルB) からのアンモニウム放出の動力学を示す図である。

【図4C】 N 6 親株 (パネルA) 及びU r e I 欠損株 N 6 - 8 3 4 (パネルB) からのアンモニウム放出の動力学を示す図である。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Institut Pasteur  
 <120> METHODS OF INHIBITING HELICOBACTER PYLORI  
 <130> B4306\_AD/CAL  
 <150> 09/107,383  
 <151> 1998-06-30  
 <160> 16  
 <170> PatentIn Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 1  
 tttgacttac tggggatcaa gctcg  
 <210> 2  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> adaptor  
 <400> 2  
 gatcatttat tcctccagat ctggaggaat aaat  
 <210> 3  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 3  
 gaagatctct aggacttgta ttgttatat  
 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 4  
 tatcaacgggt ggtatatatcca gts  
 <210> 5  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 5  
 gcagttattt gttcccttaa acg  
 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 6  
 40

ccgggtgatat ttcatttta ggc	23
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> primer	
 <400> 7	
gctgatgttgc aggttcagta	20
 <210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> primer	
 <400> 8	10
gtgatacttg agcaatatct tccagc	25
 <210> 9	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> primer	
 <400> 9	
caaattccaca taatccacgc tggaaatc	27
 <210> 10	
<211> 195	
<212> PRT	
<213> H. pylori	20
 <400> 10	
Met Leu Gly Leu Val Leu Leu Tyr Val Gly Ile Val Leu Ile Ser Asn	
1 5 10 15	
 Gly Ile Cys Gly Leu Thr Lys Val Asp Pro Lys Ser Thr Ala Val Met	
20 25 30	
 Asn Phe Phe Val Gly Gly Leu Ser Ile Ile Cys Asn Val Val Val Ile	
35 40 45	
 Thr Tyr Ser Ala Leu Asn Pro Thr Ala Pro Val Glu Gly Ala Glu Asp	
50 55 60	
 Ile Ala Gln Val Ser His His Leu Thr Asn Phe Tyr Gly Pro Ala Thr	
65 70 75 80	30
 Gly Leu Leu Phe Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Ala Ala Ile Asn His Thr	
85 90 95	
 Phe Gly Leu Asp Trp Arg Pro Tyr Ser Trp Tyr Ser Leu Phe Val Ala	
100 105 110	
 Ile Asn Thr Ile Pro Ala Ala Ile Leu Ser His Tyr Ser Asp Met Leu	
115 120 125	
 Asp Asp His Lys Val Leu Gly Ile Thr Glu Gly Asp Trp Trp Ala Ile	
130 135 140	
 Ile Trp Leu Ala Trp Gly Val Leu Trp Leu Thr Ala Phe Ile Glu Asn	
145 150 155 160	40

Ile Leu Lys Ile Pro Leu Gly Lys Phe Thr Pro Trp Leu Ala Ile Ile  
 165 170 175

Glu Gly Ile Leu Thr Ala Trp Ile Pro Ala Trp Leu Leu Phe Ile Gln  
 180 185 190

His Trp Val  
 195

<210> 11  
 <211> 196  
 <212> PRT  
 <213> *H. felis*

10

<400> 11  
 Met Leu Gly Leu Val Leu Leu Tyr Val Ala Val Val Leu Ile Ser Asn  
 1 5 10 15

Gly Val Ser Gly Leu Ala Asn Val Asp Ala Lys Ser Lys Ala Ile Met  
 20 25 30

Asn Tyr Phe Val Gly Gly Asp Ser Pro Leu Cys Val Met Trp Ser Leu  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ser Thr Phe His Pro Thr Pro Pro Ala Thr Gly Pro Glu  
 50 55 60

Asp Val Ala Gln Val Ser Gln His Leu Ile Asn Phe Tyr Gly Pro Ala  
 65 70 75 80 20

Thr Gly Leu Leu Phe Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Ala Ala Ile Asn Asn  
 85 90 95

Thr Phe Asn Leu Asp Trp Lys Pro Tyr Gly Trp Tyr Cys Leu Phe Val  
 100 105 110

Thr Ile Asn Thr Ile Pro Ala Ala Ile Leu Ser His Tyr Ser Asp Ala  
 115 120 125

Leu Asp Asp His Arg Leu Leu Gly Ile Thr Glu Gly Asp Trp Trp Ala  
 130 135 140

Phe Ile Trp Leu Ala Trp Gly Val Leu Trp Leu Thr Gly Trp Ile Glu  
 145 150 155 160 30

Cys Ala Leu Gly Lys Ser Leu Gly Lys Phe Val Pro Trp Leu Ala Ile  
 165 170 175

Val Glu Gly Val Ile Thr Ala Trp Ile Pro Ala Trp Leu Leu Phe Ile  
 180 185 190

Gln His Trp Ser  
 195

<210> 12  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> *Lactobacillus fermentum*

<400> 12  
 Ile Leu Trp Leu Thr Gly Phe Leu Thr Asn Asn Leu Lys Met Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Phe Pro Gly Tyr Leu Gly Ile Ile Glu Gly Ile Cys Thr Ala  
 20 25 30  
 Trp Ile Pro Gly Phe Leu Met Leu Leu Asn Tyr Trp Pro Asn  
 35 40 45

<210> 13  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Streptococcus salivarius 10

<400> 13  
 Ile Leu Asn Ile Ile Val Ile Ala Tyr Gly Ala Cys Thr Gly Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Glu Trp Phe Tyr Gly Ser Ala Thr Gly Leu Leu Phe Ala Phe Thr  
 20 25 30  
 Tyr Leu Tyr Ser Ala Ile Asn Thr Ile Phe Asp Phe Asp Gln Arg Leu  
 35 40 45

Tyr Gly Trp Phe Ser Leu Phe Val Ala Ile Asn Thr Leu Pro Ala Gly  
 50 55 60  
 Ile Leu Cys Leu Thr Ser Gly Tyr Gly Asn Ala Trp Tyr Gly Ile 20  
 65 70 75 80  
 Ile Trp Phe Leu Trp Gly Ile Leu Trp Leu Thr Ala Phe Ile Glu Ile  
 85 90 95  
 Asn Leu Lys Lys Asn Leu Gly Lys Phe Val Pro Tyr Leu Ala Ile Phe  
 100 105 110

Glu Gly Ile Val Thr Ala Trp Ile Pro Gly Leu Leu Met Leu Trp Gly  
 115 120 125

Lys

<210> 14 30  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Myco. smegmatis  
 <400> 14  
 Met Gly Gly Val Gly Leu Phe Tyr Val Gly Ala Val Leu Ile Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Met Leu Leu Gly Arg Ile Ser Pro Arg Gly Ala Thr Pro Leu  
 20 25 30  
 Asn Phe Phe Val Gly Gly Leu Gln Val Val Thr Pro Thr Val Leu Ile  
 35 40 45

Leu Gln Ser Gly Gly Asp Ala Ala Val Ile Phe Ala Ala Ser Gly Leu  
 50 55 60  
 Tyr Leu Phe Gly Phe Thr Tyr Leu Trp Val Ala Ile Asn Asn Val Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Trp Asp Gly Glu Gly Leu Gly Trp Phe Ser Leu Phe Val Ala Ile  
 85 90 95  
 Ala Ala Leu Gly Tyr Ser Trp His Ala Phe Thr Ala Glu Ala Asp Pro  
 100 105 110  
 Ala Phe Gly Val Ile Trp Leu Leu Trp Ala Val Leu Trp Phe Met Leu  
 115 120 125  
 Phe Leu Leu Leu Gly Leu Gly His Asp Ala Leu Gly Pro Ala Val Gly  
 130 135 140  
 Phe Val Ala Val Ala Glu Gly Val Ile Thr Ala Ala Val Pro Ala Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Ile Val Ser Gly Asn Trp Glu Thr Gly Pro Leu Pro Ala Ala Val  
 165 170 175  
 Ile Ala Val Ile Gly Phe Ala Ala Val Val Leu Ala Tyr Pro Ile Gly  
 180 185 190  
 Arg Arg Leu Ala Ala Pro Ser Val Thr Asn Pro Pro Pro Ala Ala Leu  
 195 200 205  
 Ala Ala Thr Thr Arg  
 210

<210> 15  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> Rhodococcus sp.

<400> 15  
 Met Gly Ser Val Gly Leu Leu Tyr Val Gly Ala Val Leu Phe Val Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Met Leu Leu Gly Thr Val Pro Val Arg Ser Ala Ser Val Leu  
 20 25 30  
 Asn Leu Phe Val Gly Ala Leu Gln Cys Val Val Pro Thr Val Met Leu  
 35 40 45  
 Ile Gln Ala Gln Gly Asp Ser Ser Ala Val Leu Ala Ala Ser Gly Leu  
 50 55 60  
 Tyr Leu Phe Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Val Gly Ile Ser Asn Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Phe Glu Pro Glu Gly Ile Gly Trp Phe Ser Leu Phe Val Ala Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Leu Val Tyr Ser Phe Leu Ser Phe Thr Val Ser Asn Asp Pro  
 100 105 110

10

20

30

Val Phe Gly Val Ile Trp Leu Ala Trp Ala Ala Leu Trp Thr Leu Phe  
 115 120 125

Phe Leu Val Leu Gly Leu Gly Arg Glu Asn Leu Ser Arg Phe Thr Gly  
 130 135 140

Trp Ala Ala Ile Leu Leu Ser Gln Pro Thr Cys Thr Val Pro Ala Phe  
 145 150 155 160

Leu Ile Leu Thr Gly Asn Phe His Thr Thr Pro Ala Val Ala Ala Gly  
 165 170 175

Trp Ala Gly Ala Leu Leu Val Leu Leu Gly Leu Ala Lys Ile Leu Ala  
 180 185 190

Ala Pro Lys Ala Ala Val Pro Gln Pro Arg Pro Val Phe Asn  
 195 200 205

<210> 16  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> P. aeruginosa

<400> 16  
 Met Leu Gly Leu Val Leu Leu Tyr Val Gly Ala Val Leu Phe Leu Asn  
 1 5 10 15

Ala Val Trp Leu Leu Gly Lys Ile Ser Gly Arg Glu Val Ala Val Ile  
 20 25 30

Asn Phe Leu Val Gly Val Leu Ser Ala Cys Val Ala Phe Tyr Leu Ile  
 35 40 45

Phe Ser Ala Ala Ala Gly Gln Gly Ser Leu Lys Ala Gly Ala Leu Thr  
 50 55 60

Leu Leu Phe Ala Phe Thr Tyr Leu Trp Val Ala Ala Asn Gln Phe Leu  
 65 70 75 80

Glu Val Asp Gly Lys Gly Leu Gly Trp Phe Cys Leu Phe Val Ser Leu  
 85 90 95

Thr Ala Cys Thr Val Ala Ile Glu Ser Phe Ala Gly Ala Ser Gly Pro  
 100 105 110

Phe Gly Leu Trp Asn Ala Val Asn Trp Thr Val Trp Ala Leu Leu Trp  
 115 120 125

Phe Cys Phe Phe Leu Leu Gly Leu Ser Arg Gly Ile Gln Lys Pro  
 130 135 140

Val Ala Tyr Leu Thr Leu Ala Ser Ala Ile Phe Thr Ala Trp Leu Pro  
 145 150 155 160

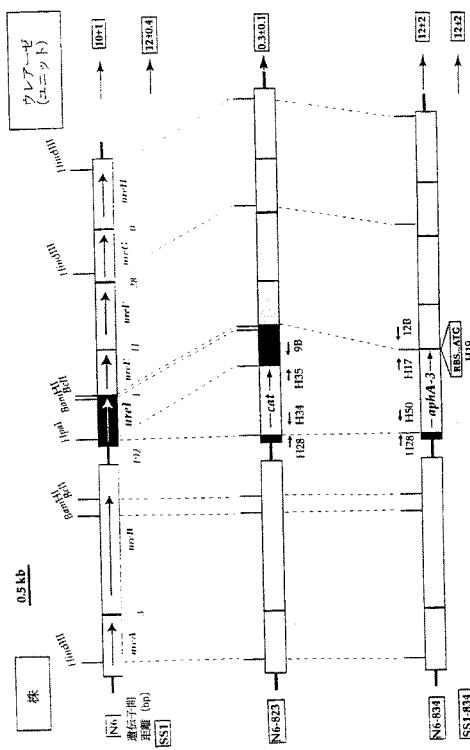
Gly Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Leu Lys Ala  
 165 170

10

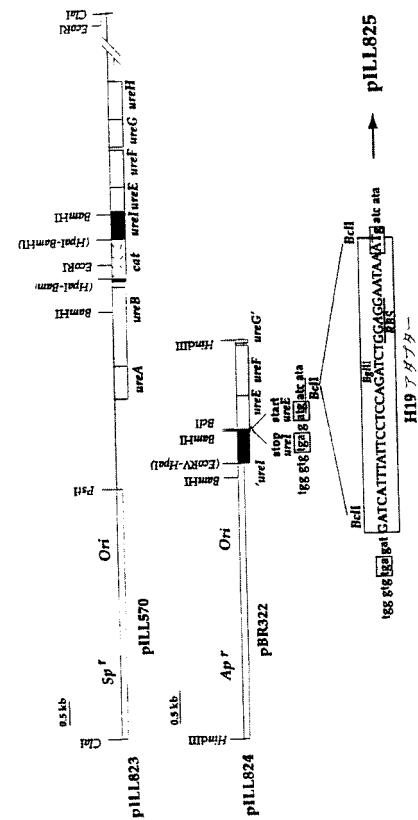
20

30

【 図 1 】



### 【図2A1】



## 【図2A2】

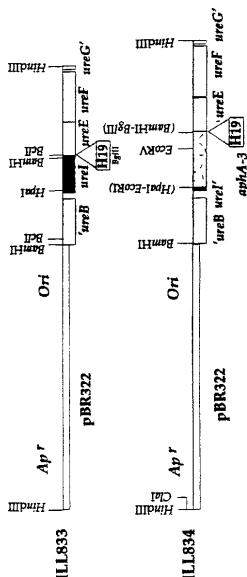
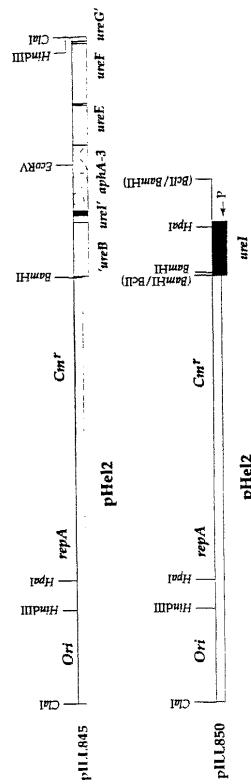


FIGURE 2A2

【図2B】



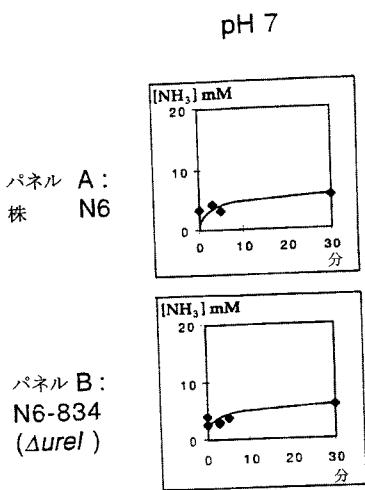
סימן 20

### 【図3A】

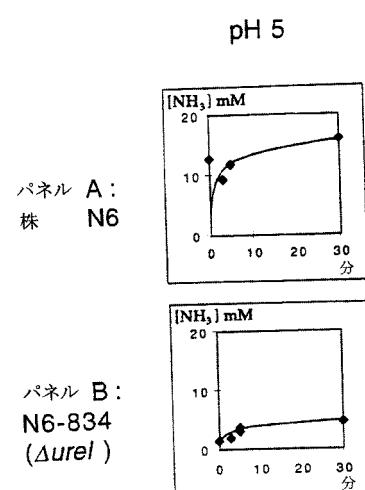
【図3B】

147	LAWSY	WLTNEIENI	L	KIP	GKFIP	WLA	EGJ	TAWIPAM	F	JOHN	194
148	le-Hp	WLTNEIENI	L	ST	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
le-HI	le-HI	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
1	le-Lacio	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
83	FLWKG	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
119	le-Strelo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
119	le-Strelo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
122	le-Myo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
119	le-Rhud	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
122	le-Pseudo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	195	
195	le-Hp	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
198	le-HI	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
45	le-Lacio	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
131	le-Strelo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
170	le-Myo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
168	le-Rhud	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
170	le-Pseudo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
198	le-Hp	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
198	le-HI	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
47	le-Lacio	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
171	le-Strelo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
213	le-Myo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
206	le-Rhud	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	
173	le-Pseudo	WLTNEIENI	L	K	GKFVWLA	WLTNEIENI	TAWIPAM	F	JOHN	196	

【図 4 A】

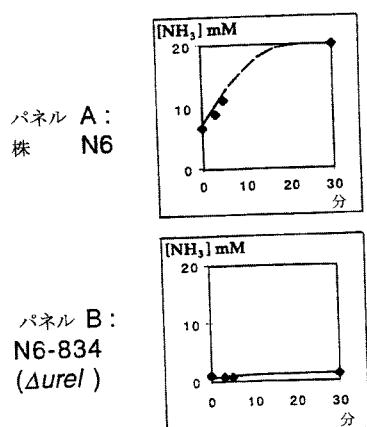


【図4B】



【図4C】

pH 2.2



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 R 1/01 (2006.01) C 1 2 Q 1/18  
C 1 2 R 1:01

(72)発明者 スクルブリ,ステファーヌ  
フランス国、エフ-75013 パリ、リュ・ドゥ・ラミラル・ムシェ 45  
(72)発明者 キュサック,ヴァレリー  
フランス国、エフ-75011 パリ、アンパース・モルレ 2ビス  
(72)発明者 ラビーニュ,アニエス  
フランス国、エフ-91440 ピュール-シュール-イヴェット、アヴニュ・ボゼジュール 4  
7

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表平08-510120 (JP, A)  
特表平07-500010 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70  
C12N 9/80  
C12N 15/00-15/90  
PubMed  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq