

(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 I

C 1 2 Q 1/18 (2006.01)

C 1 2 Q 1/18

C 1 2 Q 1/58 (2006.01)

C 1 2 Q 1/58

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/80 (2006.01)

C 1 2 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)
 (86) (22) 出願日 平成11年6月29日 (1999.6.29)
 (65) 公表番号 特表2002-519039 (P2002-519039A)
 (43) 公表日 平成14年7月2日 (2002.7.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1999/004490
 (87) 国際公開番号 W02000/000634
 (87) 国際公開日 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 1-2245

(73) 特許権者 593218462
 インスティテュート・パスツール
 I 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、リュウ・デュ・ドクトール・ルー、
 25-28
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100141357
 弁理士 鈴木 音哉
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄
 (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

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】

インビボ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、U r e I を欠損した株に対して親株の及び /
 又はu r e I を保持するプラスミドで補足されたU r e 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) U r e 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U r e 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 フェリス (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 (

Helicobacter muridarum)、及びヘリコバクター トログンタム (*Helicobacter troglodytes*) 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】

UreI を欠損した株が、ureI 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】

ureI 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 aphA - 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】

ureI 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、ureI 遺伝子を保持し、かつ ureI 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 pILL850 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、ureI 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】

ureI 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、ureI 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 aphA - 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】

ureI 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】

ureI 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 aphA - 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、ureI 遺伝子を保持し、かつ ureI 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】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、U r e 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。

【 0 0 0 2 】

【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 (1 0)。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 (1 1、2 6)。

【 0 0 0 3 】

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 u r e 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タンパク質をコードする u r e E F G H を含有する。u r e 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)。u r e A 遺伝子、u r e B 遺伝子、u r e E 遺伝子、u r e F 遺伝子、u r e G 遺伝子、u r e H 遺伝子、及び u r e I 遺伝子、並びに遺伝子産物は、米国特許第 5 , 6 9 5 , 9 3 1 号及び認可された特許出願第 0 8 / 4 7 2 , 2 8 5 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照として本明細書に特別に組み込まれる。

【 0 0 0 4 】

u r e I から u r e E まで (1 塩基対、b p) 及び u r e E から u r e F まで (1 1 b p) の距離は、u r e I - u r e E - u r e F がオペロンを構成していることを示唆している。u r e I 及び u r e E の共転写は、ノーザンブロット解析により証明されている (1)。Mini Tn - Km トランスポゾンにより中断された u r e I 遺伝子を有する H . ピロリ N 6 突然変異体が、フェレロ (F e r r e r o) ら (1 9 9 4) により以前に記載された (1 3)。この株 (N 6 - u r e I : : Tn Km - 8) はウレアーゼ陰性表現型を表し、従って、u r e I は完全なウレアーゼ活性に必要なアクセサリ遺伝子であると結論付けられた。

【 0 0 0 5 】

H . ピロリ由来の U r e 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) s p . R 3 1 2 の脂肪族アミダーゼオペロンによりコードされる A m i S タンパク質とは、配列が類似している (5、2 7)。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ン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 (2 3)。

【 0 0 0 6 】

U r e I 及び A m i 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 : $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$ 及びアセトアミド : $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{NH}_2$) 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 U r e 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。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

発明の概要

本発明は、インピ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、U r e Iタンパク質機能の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。

【 0 0 0 8 】

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。

【 0 0 0 9 】

本発明のもう一つの面は、インピ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) U r e Iの輸送特性を阻害すること、又は (iii) U r e 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U r e I機能を阻害すること、を可能にするU r e Iに対する高親和性を特徴とする。U r e 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。

【 0 0 1 0 】

本発明のさらにもう一つの面は、免疫原性U r e 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U r e I抗原に対する抗体も、本発明の範囲に包含される。

【 0 0 1 1 】

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u r e I遺伝子を含むH．ピロリの組換え株にさらに関する。

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

表 3 は、図 4 のグラフに表された株 N 6 及び N 6 - 8 3 4 によるアンモニア生成の値を与える。

【 0 0 1 4 】

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u r e 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 (2 0) 。従って、U r e 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、U r e 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。非極性カセット (カナマイシン耐性カセット) により交換されたu r e Iの欠失を保持するH．ピロリ株が構築されており、N 6 - 8 3 4 と命名された (3 0) 。その株は、1 9 9 9 年 6 月 2 8 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。非極性カセット (1 9) がH．ピロリで機能することが示されたのは、これが最初であった。これらの結果は、C a g、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。

【 0 0 1 5 】

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、U r e 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N i x A (3) が完全なウレアーゼ活

10

20

30

40

50

性にとって必要であるため、この結果は、U r e 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。U r e 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U r e 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。

【 0 0 1 6 】

(i) U r e 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) U r e 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) U r e 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

【 0 0 1 7 】

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ない。本発明者らは、U r e 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、U r e 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。U r e 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(2 7) A m i S タンパク質の配列と類似した配列を有している。U r e I / A m i 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

【 0 0 1 8 】

U r e I の異なる役割も提唱されている。例えば、U r e 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S S 1 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U r e 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、N 6 - 8 3 4 突然変異株(1 9 9 9 年6月28日に提出されたC . N . C . M .) におけるu r e I の欠失によって有意には改変されない。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(2 8) 。

【 0 0 1 9 】

又は、U r e 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、U r e 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。

30

【 0 0 2 0 】

本発明者らの結果は、U r e 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U r e I が細胞周辺pHとウレアーゼ活性の間の一種のセンサー・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。U r e 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

【 0 0 2 1 】

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、U r e I における欠損株又はu r e I で補足されたU r e I 欠損株と比較すること、U r e 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。

【 0 0 2 2 】

U r e 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る。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実施される。*Ure I*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で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、*Ure I*ホモロ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うる。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 フェリス* (*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 トロガンタム* (*Helicobacter troglodytes*) 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、*Ure I* 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 (flurofamide)、ヒドロキシシルアミン、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)*Ure I* 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、*Ure I* 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、*Ure I* 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、*Ure I* タンパク質の全部又は一部も含みうる。好ましくは、*Ure I* 断片は、元来の*Ure I* 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*Ure I* 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*Ure I* 断片は、天然*Ure I* 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

40

【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	TTTGACTTACTGGGGATCAAGCCTG (SEQ ID NO:1)
H19*	GATCATTTTATTCCTCCAGATCTGGAGGAATAAAT (SEQ ID NO:2)
H28	GAAGATCTCTAGGACTTGTATTGTTATAT (SEQ ID NO:3)
H34	TATCAACGGTGGTATATCCAGTG (SEQ ID NO:4)
H35	GCAGTTATTGGTGCCCTTAAACG (SEQ ID NO:5)
H50	CCGGTGATATTCTCATTTTAGCC (SEQ ID NO:6)
8A	GCGAGTATGTAGGTTTCAGTA (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。

【 0 0 3 3 】

H . ピロリへの *ure I* 突然変異の導入

H . ピロリ株 N 6 (1 2) 及びマウス適合 H . ピロリ株 S S 1 (シドニー株 (Sydney Strain) 、 1 7) 由来のスコウロウブリス (Skouloubris) ら (2 3) により以前に記載された p I L L 8 2 3 及び p I L L 8 3 4 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。p I L L 8 2 3 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、p I L L 8 3 4 との染色体対立遺伝子交換を有する細菌を Km (2 0 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 N 6 - 8 2 3 、 N 6 - 8 3 4 、及び S S 1 - 8 3 4 (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 N 6 - 8 2 3 については、プライマー H 2 8 - H 3 4 では 1 4 0 b p 、 H 3 5 - 9 B では 2 2 0 b p 、 H 2 8 - 9 B では 1 . 2 Kb であり、(ii) 株 N 6 - 8 3 4 及び S S 1 - 8 3 4 については、プライマー H 2 8 - H 5 0 では 1 5 0 b p 、 H 1 7 - 1 2 B では 1 8 0 b p 、 H 2 8 - 1 2 B では 1 Kb であった。

【 0 0 3 4 】

ure I の非極性欠失を保持する株 N 6 - 8 3 4 の増殖速度を、親株 N 6 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 B H I (O x o i d) 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。

【 0 0 3 5 】

H . ピロリ *ure I* 変異体のウレアーゼ活性

クサク (Cussac) ら (9) により以前に記載されたようにして、株 N 6 - 8 2 3 、 N 6 - 8 3 4 、及び S S 1 - 8 3 4 のウレアーゼ活性をインビトロで測定し、親株 N 6 及び S S 1 (図 1) の活性と比較した。株 N 6 - 8 2 3 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 N 6 - 8 3 4 及び S S 1 - 8 3 4 は、野生型の活性レベルを有していた (N 6 - 8 3 4 及び S S 1 - 8 3 4 : 1 2 ± 2 ユニット ; 親株 N 6 : 1 0 ± 1 、 S S 1 : 1 2 ± 0 . 4 ユニット) 。

【 0 0 3 6 】

N 6 親株又は *ure I* 欠損株 N 6 - 8 3 4 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 8

10

30

40

50

という最適pHを有していた。

【0037】

これらの結果は、N6 - ure I : : Tn Km - 8 (13) のウレアーゼ陰性表現型及び N6 - 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 N6 - 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 2.8Kb の Cla I - Bam HI 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 pHel2 の対応する部位への挿入により得られた。株 N6 - 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 N6 - 823 において、野生型ウレアーゼ活性が回収され、株 N6 - 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、アクセサリタンパク質複合体 (UreDFG) の一部として、活性なウレアーゼの産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 N6 又は株 N6 - 834 により産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ブロット技術で比較した。2つの株により産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 N6 及び N6 - 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 10^6 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

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 5×10^4 コロニー形成単位(CFU)と 5×10^5 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 2×10^8 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を改変することなく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、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)。

【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pHel2(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BclI制限断片を、pHel2(図2B)のBamHI制限部位とBclI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,Genes 49:253-262)に置いた。

【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中で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的測定を与えた。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。

【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

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】

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。

【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ベースにおけるUreIホモロ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。

【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ベ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ホモログが存在する（18）。

【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）に記載のようなブルフィール・フェッド・ニューラル・ネットワーク・システム（profile fed

10

20

30

40

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 U r e I / A m i 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、U r e 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 U r e I / A m i 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】

U r e I 配列から選択された2つのペプチドを合成し、U r e 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、2匹のウサギに注射した。1つのペプチドは、U r e I の第一に予測された細胞内ループ(残基n B 15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U r e I の第二に予測された細胞内ループ(残基n B 118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U r e 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U r e 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	+	8×10^7
N6	7	6.98	-	2×10^8
N6	7	8.88	+	0
N6-834	2.2	2.2	-	0
N6-834	2.2	2.37	+	7×10^5
N6-834	7	7.1	-	3.5×10^7
N6-834	7	9.05	+	0
N6-834+piLL850	2.2	2.3	-	0
N6-834+piLL850	2.2	6.9	+	1.3×10^8
N6-834+piLL850	7	7.1	-	1.7×10^8
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U r e 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、u r e I 遺伝子を保持し、株N6-834のu r e 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

【 0 0 5 4 】

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 ureI 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. Blaser. 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-positive 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.
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.
30. Skouloubris, S., J.-M. Thiberge, A. Labigne and H. De Reuse (1998) The *Helicobacter pylori* UreI 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. pylori* 親株 N 6 及び S S 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 S S 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、b p で与えられている。株 N 6 - 8 2 3、N 6 - 8 3 4、及び S S 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 4 8 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 1 mg 当たりの 1 μ 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 \pm 標準偏差である。

【図 2 A 1】 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^R 及び A p^R 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 DNA 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

Iの終止コドン及びureE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】 pILL823、pILL824、pILL833、及びpILL834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、pILL845及びpILL850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。Oriは、E.coli ColE1複製開始点の位置を示し、repAはH.ピロリのpHel2の自律複製に必要なRepAタンパク質をコードする遺伝子を示す。Cm^R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。ureI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。

10

【図3A】 H.ピロリ由来のUreI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UreI/AmiS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UreIタンパク質との同一性の程度は、UreI-Hp、ヘリコバクターピロリ(195残基、accession No. M84338)；UreI-Hf、ヘリコバクターフェリス(196残基で74%同一、accession No. A41012)、UreI-Lacto、ラクトバチルスファーマンタム(46残基長の部分配列で55%同一、accession No. D10605)；UreI-Strepto、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U35248)；AmiS-Mycro、ミコバクテリウムスメグマチス(172残基で39%同一、accession No. X57175)；AmiS-Rhod、ロドコッカスsp. R312(172残基で37%同一、accession No. Z46523)；及びAmiS-Pseudo、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。

20

【図3B】 H.ピロリ由来のUreI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UreI/AmiS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。

30

【図4A】 N6親株(パネルA)及びUreI欠損株N6-834(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(2×10^8 /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、10mM尿素の存在下でpH7、5、又は2.2でリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に再懸濁させた。0分、3分、5分、及び30分後、0.5ml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】 N6親株(パネルA)及びUreI欠損株N6-834(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。

40

【図4C】 N6親株(パネルA)及びUreI欠損株N6-834(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
 ttgacttac tggggatcaa gcttg 25

<210> 2
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> adaptor

<400> 2
 gatcatttat tcctccagat cggaggaat aaat 34

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 3
 gaagatctct aggacttgta cgttatat 29

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 4
 tatcaacggt ggtatatcca gtc 23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 5
 gcagttattg gtgcccttaa acg 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 6

10

20

30

40

ccggtgatat tctcatttta gcc

23

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 7

gcgagtatgt aggttcagta

20

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> primer

10

<400> 8

gtgatacttg agcaatatct tcagc

25

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> primer

<400> 9

caaatccaca taatccacgc tgaatc

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 15Gly Ile Cys Gly Leu Thr Lys Val Asp Pro Lys Ser Thr Ala Val Met
20 25 30Asn Phe Phe Val Gly Gly Leu Ser Ile Ile Cys Asn Val Val Val Ile
35 40 45Thr Tyr Ser Ala Leu Asn Pro Thr Ala Pro Val Glu Gly Ala Glu Asp
50 55 60Ile 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 95Phe Gly Leu Asp Trp Arg Pro Tyr Ser Trp Tyr Ser Leu Phe Val Ala
100 105 110Ile Asn Thr Ile Pro Ala Ala Ile Leu Ser His Tyr Ser Asp Met Leu
115 120 125Asp Asp His Lys Val Leu Gly Ile Thr Glu Gly Asp Trp Trp Ala Ile
130 135 140Ile 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
 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
 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

20

30

<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 Gly Asn Ala Trp Tyr Gly Ile
 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

20

<210> 14
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Myco. smegmatis

30

<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

10

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

20

<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

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

10

<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 Leu Gly Leu Ser Arg Gly Ile Gln Lys Pro
 130 135 140

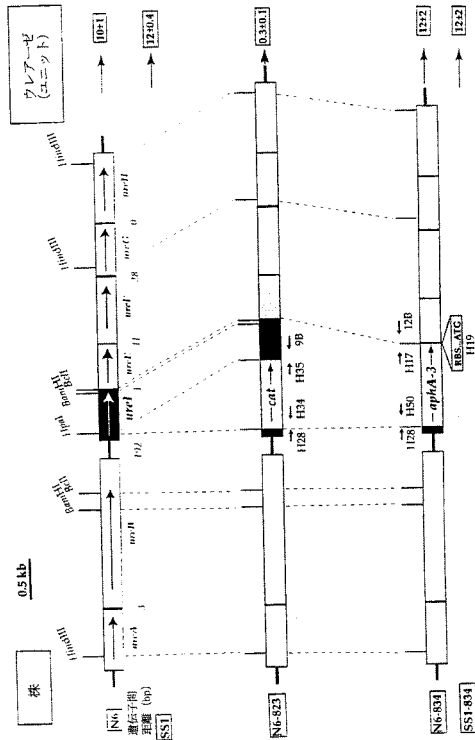
Val Ala Tyr Leu Thr Leu Ala Ser Ala Ile Phe Thr Ala Trp Leu Pro
 145 150 155 160

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

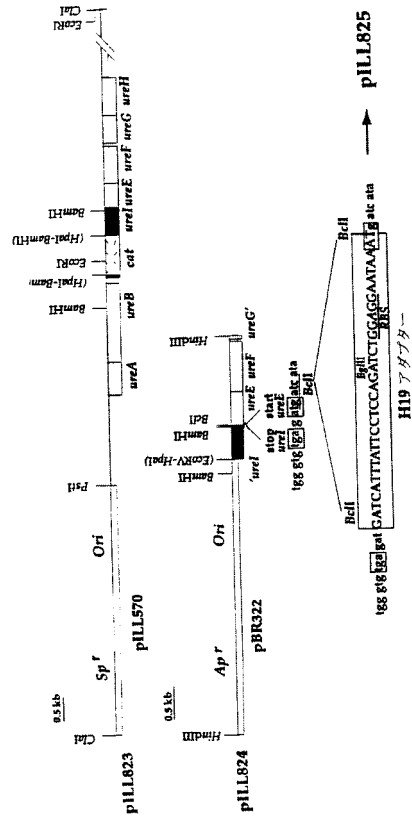
20

30

【図 1】



【図 2 A 1】



【図 2 A 2】

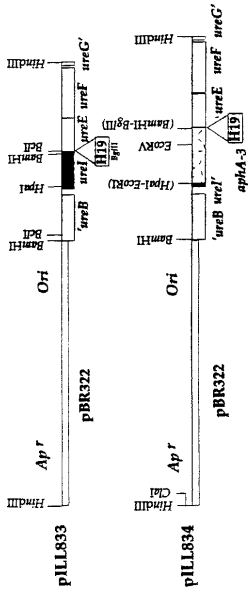


FIGURE 2A2

【図 2 B】

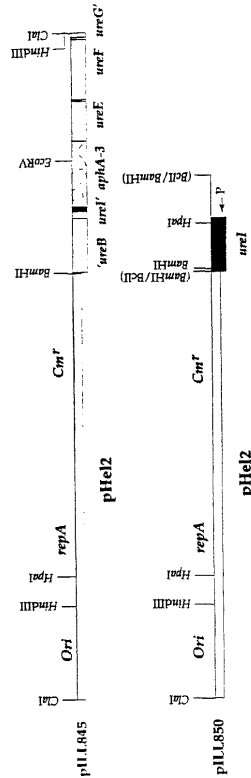
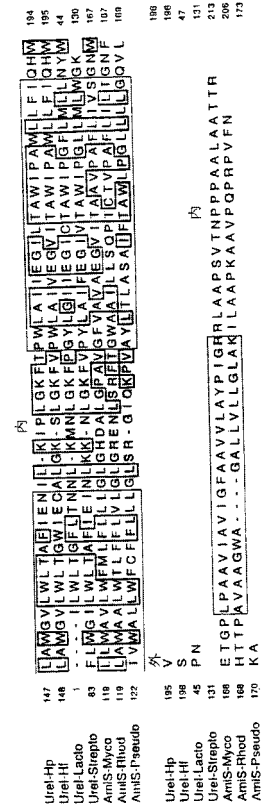
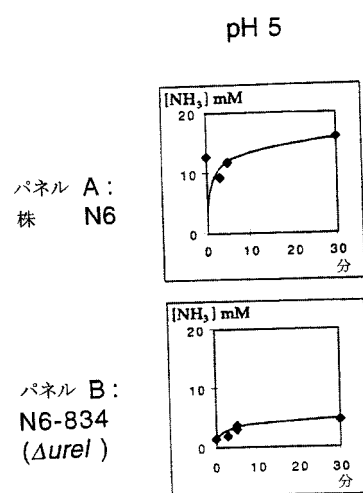


FIGURE 2B

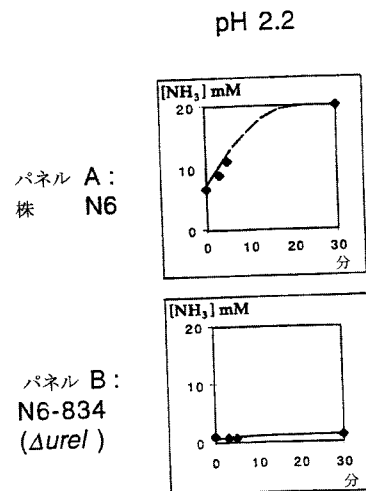
【 図 3 B 】



【 図 4 B 】



【図 4 C】



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, ステファーン
フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・ラミラル・ムシェ 4 5
- (72)発明者 キュサック, ヴァレリー
フランス国、エフ - 7 5 0 1 1 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 - 9 1 4 4 0 ビュール - 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 0 8 - 5 1 0 1 2 0 (J P , A)
特表平 0 7 - 5 0 0 0 1 0 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
- C12Q 1/00-1/70
 - C12N 9/80
 - C12N 15/00-15/90
 - PubMed
 - GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 - UniProt/GeneSeq