

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5203366号
(P5203366)

(45) 発行日 平成25年6月5日 (2013.6.5)

(24) 登録日 平成25年2月22日 (2013.2.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088

請求項の数 4 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2009-522355 (P2009-522355)	(73) 特許権者	597037245
(86) (22) 出願日	平成19年7月27日 (2007.7.27)		カウンスル オブ サイエントフィック
(65) 公表番号	特表2010-505389 (P2010-505389A)		アンド インダストリアル リサーチ
(43) 公表日	平成22年2月25日 (2010.2.25)		インド国 1 1 0 0 0 1 ニューデリー
(86) 国際出願番号	PCT/IB2007/002144		, ラフィ マーグ
(87) 国際公開番号	W02008/015524	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成20年2月7日 (2008.2.7)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成22年7月21日 (2010.7.21)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	1763/DEL/2006		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成18年8月2日 (2006.8.2)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	インド (IN)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコバクテリア特異的アンチセンス核酸分子の開発用ツールとしてのペプチドデホルミラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼの挿入配列をコードするポリヌクレオチド配列に相補的であり、配列番号 1 4 によって表されるアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼの挿入配列が X T X R R R G V V I N P で示される 1 2 アミノ酸を含み、X が 2 0 種の既知のアミノ酸のいずれか 1 種である、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

アミノ酸配列が、ヒト結核菌 (M. tuberculosis)、スメグマ菌 (M. smegmatis)、ウシ結核菌 (M. bovis)、トリ結核菌 (M. avium) 及びらい菌 (M. leprae) において 9 0 から 9 5 % 類似する、請求項 2 に記載のアンチセンス。

【請求項 4】

1 ヲ所 (5') 又は全体のいずれかでホスホロチオエート修飾されたオリゴデオキシヌクレオチドであることを特徴とする、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的として有用なマイコバクテリア

ペプチドデホルミラーゼ酵素中の特定の領域の同定に関する。本発明はさらに、ヒト結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来ペプチドデホルミラーゼ遺伝子の特定の領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計に関する。マイコバクテリア培養でのこのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、酵素の安定性の維持にも機能の保持にも関与することが分かっている領域中にハイブリダイズすることによってペプチドデホルミラーゼ酵素の産生を阻害し、それによって細胞の増殖に影響を与える。本発明は、マイコバクテリア中のペプチドデホルミラーゼ酵素の必須性も立証し、それをこの微生物中の薬剤標的として特許請求する。

【背景技術】

【0002】

10

過去数十年間に結核は、世界的に考慮すべきヒトの死亡原因として出現している。治療で一般に使用される1つ又は複数の抗マイコバクテリア剤に対して耐性を発達させているマイコバクテリア株の発生頻度が次第に増大していることが見出されている。したがって、この状況を克服するために、新規薬剤標的の同定によって達成され得る、より良い薬剤介入戦略を得る必要がある。この重要性において、酵素ペプチドデホルミラーゼは、マイコバクテリアのタンパク質合成全般において必須のステップであると考えられる新生ペプチドの脱ホルミル化に関与している。したがって、該酵素を阻害する任意の生物的／非生物的因子は、マイコバクテリアにおいてタンパク質合成全般を妨げることができ、その増殖を特異的に阻害する。

【0003】

20

先行技術の記載

病原性微生物における薬剤耐性は、世界的な公衆衛生への重大な脅威として出現している。多数の抗生物質が使用されているにもかかわらず、それらが阻害する標的の種類は非常に限定的である。これらの抗生物質の長期間かつ過剰な使用の結果、病原性微生物において多剤耐性を生じた。したがって、抗菌剤のスペクトルを多様化するために、薬剤設計の改善を可能にする、合理的な手法に基づいた新規介入戦略を緊急に考案する必要がある。

【0004】

タンパク質合成は、抗菌剤のための標的の豊富な供給源であると常に示されている。真核生物とは対照的に、原核生物におけるタンパク質合成は、N-ホルミルメチオニール-tRNAで開始し、全ての新生ペプチドのアミノ末端でのホルミル化を生じる。しかし、N-ホルミルメチオニン、真正細菌の成熟タンパク質において保持されず、ペプチドデホルミラーゼによって脱ホルミル化されると報告されている。このホルミル化／脱ホルミル化事象は、真正細菌のタンパク質合成において必須のステップであると考えられ、したがって該酵素の重要性は長い間予想されてきた。

30

【0005】

入手可能なゲノム配列決定データは、ヒト結核菌 (NCBI general identification GI: 38490165; 配列番号8)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) (NCBI general identification GI: 57651784)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) (NCBI general identification GI: 16272565; 配列番号2)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) (NCBI general identification GI: 16272565; 配列番号3)、レプトスピラ・インテロガン (*Leptospira interrogans*) (NCBI general identification GI: 14626937; 配列番号4)、エンテロコッカス・フェアセリス (*Enterococcus faecalis*) (NCBI general identification GI: 29377524; 配列番号5)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) (NCBI general identification GI: 49089809; 配列番号6) 及び枯草菌

40

50

(*Bacillus subtilis*) (NCBI general identification GI:16078635; 配列番号7)などの病原体を含む真正細菌系列全体にわたるペプチドデホルミラーゼ (def) をコードする推定上の遺伝子の存在を明らかにした。以前の研究は、様々な微生物においてペプチドデホルミラーゼの活性を阻害する様々な化合物又は調製物及びそれらの誘導体の同定及び使用を示している (特許番号: WO0138561、WO2005026133、WO2005037272、WO2005092872など)。

【0006】

Tomiooka, Hによる文献 (新規抗結核薬の開発についての展望 (Prospects for development of new antituberculous drugs) *Kekkaku*. 8月; 77 [8] 573~84、2002年) は、リファマイシン (リファブチン、リファペンチン及びリファラジル)、フルオロキノロン類 (シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、シタフロキサシン、モキシフロキサシンなど) 及び新規マクロライド類 (クラリスロマイシン、アジスロマイシン及びロキシスロマイシン) などの既存の薬剤の特定の新規誘導体の薬理学的状態全般を記載している。この文献は、新規抗マイコバクテリア剤、特にオキサゾリジノン (PNU-100480)、5'-ニトロイミダゾール (CGI 17341)、2-ピリドン (ABT-255)、新規リミノフェナジン類、ニトロイミダゾピラン (PA-824)、新規ケトライド類 (ABT-773 テリスロマイシン) 及びデフェンシン類 (ヒト好中球ペプチド-I) を含む抗結核剤の開発の重要性を考察している。さらに、筆者らは、新規薬剤標的として特定の代謝酵素又は毒性因子をコードするマイコバクテリア遺伝子に特異的な阻害剤を設計する (戦略の1つは、確実にアンチセンス技術であり得る) 可能性を記載している。事実、マイコバクテリア遺伝子の発現を休止するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、非常に一般的な技術であり (参考: Harthら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99、15614~15619、2002年) かつ、該文献で初めて述べられるのではない。

【0007】

本発明は、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ中に特異的に存在する挿入配列 (アミノ酸74~85から成り (図1及び図2を参照されたい)、酵素の機能の維持に関与する (図5は、この領域の欠失変異体が酵素活性を示さないことを示す) の重要性を強調する。さらに、挿入配列に対する (対応する核酸配列に相補的な) アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、ペプチドデホルミラーゼ酵素の発現を減少させ (抗mPDF抗体を使用するウェスタンブロット法によって図8に示す通り)、次いで培養中のマイコバクテリアの増殖阻害を生じる (図6A及び図7の左パネル)。したがって、これらの結果は、本発明者らが発明したマイコバクテリア酵素の挿入領域の新規性を、この挿入領域に基づく阻害剤を設計する可能性の見地から示す (アンチセンス分子は、マイコバクテリア増殖に寄与するこの領域の重要性を明らかにするために使用されている)。

【0008】

Cynamonら、2004年、*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 403~405による他の文献において、放線菌 (*Actinomycetes*) 綱から単離された抗生物質アクチノニン及びBB3497 (アクチノニンのヒドロキサム酸誘導体) が、活性部位に結合することによって様々な微生物由来のPDF酵素活性の阻害を示したことが記載されている。前記文献は、恐らくPDF酵素活性を阻害することによる、培養中のマイコバクテリアの増殖へのBB3497の阻害作用について記載している。Cynamonら、2004年は、彼らの文献において、既知のペプチドデホルミラーゼインヒビターがマイコバクテリアの増殖を阻害することを示した。一方、本発明者らは、本発明者らの研究をmPDFの特徴付けにより開始し、共有性があるにもかかわらず、それが他の細菌性相同体とは明確に異なることを立証した。ヒト結核菌のペプチドデホルミラーゼの配列分析によって、モチーフIとIIの間に特徴的な挿入 (残基74~85) が存在していることが明らかになった (図1)。欠失変

10

20

30

40

50

異体を用いた本出願の結果は、この酵素の機能に対して該領域が寄与していることを示している（図5）。今日までに特徴付けられたPDFにおいて、本発明者らの分析から、挿入領域のアミノ酸構成は、マイコバクテリア種に特有であることが明らかとなった（図2）。さらに、この挿入領域に対する5'-ホスホチオレート（phosphothiorate）修飾アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドを使用して、本発明者らは、培養中のマイコバクテリアの増殖阻害を示し、本領域の重要性を立証した（図6A）。さらに、マイコバクテリアに特異的な挿入配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、大腸菌（*Escherichia coli*）などの他の細菌由来のPDF酵素の機能に影響を有さない（図7の右パネルに示す通り）。したがって、本発明者らの結果は、挿入領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵素の発現を（図8）、したがってマイコバクテリアの増殖（図6A及び図7の左パネル）を特異的に阻害することを明確に立証する。これにより、本発明者らは、本発明者らがマイコバクテリアにおける酵素の機能について重要であるマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵素における領域（アミノ酸残基74～85）を同定したことを主張する。マイコバクテリア酵素の該領域と相互作用し、かつこの酵素の発現又は産生に影響を与える任意の分子（生物的又は非生物的）は、マイコバクテリアの増殖を阻害できる（本発明者らは、これを該領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することによって立証した。それは、本発明者らの結論／発明を検証するための手法である）。したがって、本発明者らがマイコバクテリアにおいて初めて同定し、かつその重要性を立証した（図5から8）該領域（アミノ酸残基74～85）は、明確に抗マイコバクテリア剤の開発のための薬剤標的である。

【0009】

Huntington, K. M. 2000年 *Biochemistry*, 4月18日; 39 [15]: 4543～51は、ヒト結核菌を含む様々な病原性細菌の全ゲノムについての近年の情報を報告し、新規薬剤標的をコードする遺伝子の同定における進歩を促進する優れたプラットフォームを確実に提供している。病原性微生物の代謝及び生存に関与するタンパク質をコードする必須遺伝子は、常に優先的なワクチン候補である。同様に、ペプチドデホルミラーゼは、原核生物においてN-ホルミル化ポリペプチドの翻訳後修飾に関与する必須酵素の1つである（Mazelら、1994年、Margolisら、2000年及び2001年）。それは、多数の真正細菌において亜鉛又は鉄のいずれかを含むメタロプロテアーゼとして特徴付けられている。細菌細胞においてそれが必須であるという特徴により、それが抗菌性薬剤設計の魅力的な標的となる。上記で挙げた文献において筆者らは、彼らが、活性部位に結合することによって、大腸菌及び枯草菌由来の精製組換えペプチドデホルミラーゼの強力な可逆的な阻害剤として作用する一連のペプチド性チオールを合理的に設計かつ合成したことを述べた。PDF阻害剤は、細菌の溶菌を誘導し、枯草菌、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）及び大腸菌に対して殺菌性であることが検査されている。しかし、本発明は、具体的にヒト結核菌に焦点を置く。筆者らは、精製したマイコバクテリア酵素及びマイコバクテリアの増殖へのこれらの化合物の作用を述べていない。一方、本発明者らの研究は、マイコバクテリアPDFを具体的に扱い、マイコバクテリア酵素に特異的な挿入配列が新規の抗マイコバクテリア剤を開発するために注目され得ることを初めて主張する。

【0010】

近年、本発明者らは、ヒト結核菌からの594塩基対def遺伝子をPCR増幅し、pET28cベクターへのクローニング後に、それをヒスチジンタグ付き融合タンパク質として大腸菌内で発現させた（Saxena及びChakraborti、*Biochem Biophys Res Commun* (332): 418～425, (2005年)）。原子吸光分析は、mPDFがFe²⁺含有酵素であることを明らかにしたが、その活性は30℃で、4時間程度の半減期を有して非常に安定であった。さらに、H₂O₂などの酸化剤への耐性を示してその特性を維持した（Saxena及びChakrabort

i, Biochem Biophys Res Commun 332:418~425, 2005年); Saxena及びChakraborti, J. Bacteriol 187:8216~8220, 2005年)。環境中の酸素による Fe^{+2} から Fe^{+3} への転換は、大腸菌中の該メタロプロテアーゼの不活性化を生じることから(Rajagopalanら, J, Biol. Chem 36:13910~13918, 1997年)、これは、ヒト結核菌が宿主内で有効な病原体として生存するために酸化ストレスに対処しているという事実を考慮すると重要な観察であると考えられる。

【0011】

このことにより、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵素が特徴付けられた。他の研究(特許番号WO02074903)とは対照的に、本発明者らの発明は、酵素活性及び該微生物の培養中での増殖を阻害し、その必須性及び薬剤標的としての可能性を立証する、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ遺伝子(def)の特定のヌクレオチド領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の主な目的は、配列番号14によって表される、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ[def]遺伝子配列を提供することである。

【0013】

したがって、本発明の他の目的は、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的として有用である、マイコバクテリアdef遺伝子のアミノ酸配列74から85を提供することである。

20

【0014】

本発明の他の目的は、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することである。

【0015】

さらに本発明の他の目的は、マイコバクテリアの活性及び増殖を阻害するのに有用なオリゴヌクレオチドを提供することである。

【0016】

さらに本発明の他の目的は、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼに対する修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することである。

30

【0017】

本発明のさらなる目的は、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製のための方法を提供することである。

【0018】

さらに本発明の他の目的は、オリゴヌクレオチドを、任意選択で、薬学的に許容される担体、添加剤又は希釈剤と共に含む、結核の治療に有用な医薬組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0019】

40

したがって、本発明は、XTXRRRRGVVINPで表される12アミノ酸(配列中、Xは、20種の既知のアミノ酸のいずれか1種)に対応する配列番号14によって表されるマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ[def]遺伝子配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、この領域内にハイブリダイズすることによってペプチドデホルミラーゼ酵素の産生を阻害し、それによってマイコバクテリア細胞の増殖に影響を与えるための、マイコバクテリア培養でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関する。ヒト結核菌由来のペプチドデホルミラーゼ酵素内の領域(アミノ酸配列74から85)は、酵素の安定性の維持にもマイコバクテリア酵素の機能の保持にも関与することが分かり、このことによってその重要性が強調される。前記オリゴヌクレオチドで処理した培養中のマイコバクテリア細胞の増殖の妨害は、マイコバクテリアにお

50

けるペプチドデホルミラーゼ酵素の必須性をさらに立証するものであり、したがって、この微生物中の薬剤標的としてそれを特許請求する。本発明はさらに、X T X R R R G V V I N Pで表される12アミノ酸（配列中、Xは、20種の既知のアミノ酸のいずれか1種）を含み、ヒト結核菌、スメグマ菌、ウシ結核菌、トリ結核菌及びらい菌において90から95%類似するマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ [d e f] 配列を提供する。マイコバクテリアのd e f 遺伝子の前記アミノ酸配列は、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的である。

【0020】

本発明の一実施形態において、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ [d e f] 遺伝子配列は、配列番号14によって表される。

10

【0021】

本発明の他の実施形態において、前記配列は、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的として有用である。

【0022】

本発明のさらに他の実施形態において、その配列は、X T X R R R G V V I N Pで表される12アミノ酸（配列中、Xは、20種の既知のアミノ酸のいずれか1種）を含む。

【0023】

本発明のさらなる実施形態において、アミノ酸配列は、ヒト結核菌、スメグマ菌、ウシ結核菌、トリ結核菌及びらい菌において90から95%類似する。

【0024】

20

本発明の他の実施形態は、配列番号14によって表される遺伝子配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0025】

本発明のさらなる実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、それが1ヵ所（5'）又は全体にわたってホスホロチオエート修飾されたオリゴデオキシヌクレオチドであることを特徴とする。

【0026】

本発明のさらに他の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ（d e f）遺伝子の短い領域内にハイブリダイズすることによって酵素ペプチドデホルミラーゼの産生を阻害する。

30

【0027】

本発明の他の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的である。

【0028】

本発明のさらに他の実施形態は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製のための方法であり、前記方法は、ペプチドデホルミラーゼ活性を有するポリペプチド（197アミノ酸）をコードする核酸配列（594 b p）を含むヒト結核菌由来のポリヌクレオチド配列を単離するステップであって、ポリペプチドがヒト結核菌、スメグマ菌、ウシ結核菌、トリ結核菌、らい菌などの様々なマイコバクテリア種において存在し、配列番号8、9、10、11、12によって表され、それら自体において少なくとも90から95%の類似性を有するステップと、ステップ（a）から単離された、配列番号14のポリヌクレオチド配列によって表されるマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵素中の領域並びに酵素活性及び機能の維持に関与するアミノ酸配列74から85を同定するステップであって、前記領域が全てのマイコバクテリア種において保存されているステップと、ペプチドデホルミラーゼ酵素の保存領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその許容される修飾物を調製するステップと、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して酵素活性及びマイコバクテリアの増殖を阻害するステップとを含む。

40

【0029】

本発明のさらなる実施形態は、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的としてのポリヌクレオチド配列の使用である。

50

【0030】

本発明のさらに他の実施形態は、マイコバクテリアに対する潜在的な薬剤標的としての、マイコバクテリアのd e f遺伝子のアミノ酸配列の使用である。

【0031】

本発明の他の実施形態は、マイコバクテリアの活性及び増殖を阻害するためのオリゴヌクレオチドの使用である。

【0032】

本発明のさらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドを、任意選択で、薬学的に許容される担体、添加剤又は希釈剤と共に含む医薬組成物が提供され、前記組成物は、結核の治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】ヒト結核菌のペプチドデホルミラーゼの配列分析が、モチーフIとIIの間に特徴的な挿入（残基74～85）の存在を明らかにしたことを示す図である。全ての真正細菌性PDFのアミノ酸配列の分析は、3種の（I：GXGXAAXQ、II：EGCLS及びIII：QHExXH、配列中、Xは任意の疎水性残基）高度に保存されたモチーフの存在を明らかにした。

【図2】様々なマイコバクテリア種のPDF配列のアラインメントを示す図である。様々なマイコバクテリア種間で比較する場合、ヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼの挿入領域は、84%程度の同一性を示す。

【図3】発現ベクター中のマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ遺伝子のクローニングを模式的に示す図である。

【図4】大腸菌内で発現させたヒト結核菌のペプチドデホルミラーゼの精製を示す図である。左パネル：レーン1、分子量マーカー；レーン2、pET-PDFで形質転換した細胞の粗抽出物；レーン3、pET-PDFで形質転換した細胞のIPTG誘導後の粗抽出物；レーン4、低速上清画分；レーン5、低速遠心分離後に得られた沈澱画分；レーン6、尿素で可溶化した上清画分；レーン7、尿素で可溶化した低速遠心分離後の沈澱画分；レーン8、Ni-NTA樹脂精製タンパク質。右パネル：レーン1、pET-PDFで形質転換した細胞の粗抽出物；レーン2、pET-PDFで形質転換した細胞のIPTG誘導後の粗抽出物；レーン3、Ni-NTA樹脂精製タンパク質。矢印は、精製mPDFの位置を示す。

【図5】大腸菌で発現させたヒト結核菌のペプチドデホルミラーゼの精製を示すグラフである。挿入領域全体の欠失（残基74～85にわたるΔIR変異体）は、タンパク質濃度の関数として測定した場合に、酵素活性を完全に消失させた（図5）。したがって、この結果は、ヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼの酵素活性に対する挿入領域の重要性を示した。

【図6A】増殖におけるマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼの保存された挿入領域のアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響を示すグラフである。未処理培養物と比較して、本発明者らの結果は、PS-ODN1の存在下で増殖させたスメグマ菌培養物の増殖において1/5の減少（図6A）を示した。

【図6B】3'フロウレセイン（Flourescein）結合PS-ODN1で処理した細胞の共焦点顕微鏡分析の図である。

【図7】マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼの保存された挿入領域のアンチセンスオリゴヌクレオチドへの反応における様々な細菌増殖を示すグラフである。

【図8】アンチセンスオリゴヌクレオチド処理への反応におけるペプチドデホルミラーゼタンパク質の発現を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明は、重篤な疾病である結核を生じる病原性細菌ヒト結核菌由来のペプチドデホルミラーゼを扱う。本発明は、ヒト結核菌由来ペプチドデホルミラーゼの特定の領域に相補

10

20

30

40

50

的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計に関する。ヒト結核菌由来のペプチドデホルミラーゼ酵素内の領域は、酵素の安定性の維持及びマイコバクテリア酵素の機能の保持に関与する。マイコバクテリア培養へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、領域内にハイブリダイズすることによってペプチドデホルミラーゼ酵素の産生を阻害し、次いでマイコバクテリア細胞の増殖に影響を与える。

【0035】

本開示の内容において、多数の用語が使用される。用語「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」、「核酸断片」、「単離されたポリヌクレオチド配列」、「ポリペプチド」及び「ポリペプチド配列」は、本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、ヌクレオチド／アミノ酸配列などを包含する。ポリヌクレオチドは、1本鎖又は2本鎖のいずれかであるRNA又はDNAのポリマーであり得る。同様にポリペプチドは、機能性タンパク質を翻訳するために様々な方法で配置される20種の異なるアミノ酸のポリマーである。DNAのポリマーの形態であるポリヌクレオチドは、ゲノムDNA又は合成DNAの配列を含み得る。本明細書で使用する「遺伝子」は、特定のタンパク質を発現する核酸断片を意味する。「タンパク質」又は「ポリペプチド」は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにおけるコード配列によって決定される特定の順序で配置されたアミノ酸鎖である。各タンパク質又はポリペプチドは、独自の機能を有する。

【0036】

タンパク質を記載する場合に使用される「成熟タンパク質」又は用語「成熟」は、翻訳後にプロセシングされたポリペプチドを意味する。

【0037】

本明細書において使用される用語「領域」は、長い配列の一部を含み、そのような保存されている部分配列が機能において重要であり、かつ新規標的を同定するために使用されることが予想される、核酸又はアミノ酸の短い保存配列を意味する。

【0038】

任意の所与の保存配列中の1つ又は2つの保存アミノ酸が、真の相同体で異なる可能性があることが、予想される。

【0039】

本明細書において使用する用語「実質的に類似」は、1つ又は複数のヌクレオチド塩基の変化が1つ又は複数のアミノ酸の置換を生じるが、しかしヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの機能的特性に影響しない核酸断片を意味する。

【0040】

「実質的に類似」は、1つ又は複数のヌクレオチド塩基の変化が、例えばアンチセンス技術を通じた遺伝子サイレンシングによる遺伝子発現の変化を介在するための核酸断片の能力に影響しない核酸断片も意味する。

【0041】

ヒト結核菌の特定の配列に基づいて設計された、本研究において使用されるアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドは、スメグマ菌の増殖を2種の配列間において配列の100%の同一性を共有することなく阻害する。さらに、実質的に類似な核酸断片は、そのハイブリダイズする能力によっても特徴付け得る。そのような相同性の推定は、ストリンジェントな条件下でのDNA-DNA又はDNA-RNAのいずれかのハイブリダイゼーションによって提供される。

【0042】

さらに、アミノ酸又はヌクレオチドの配列の「実質的な部分」は、アミノ酸又はヌクレオチドの配列が含むタンパク質又は遺伝子の推定的同定をもたらすために十分であるアミノ酸又はヌクレオチドの配列を含む。

【0043】

本明細書において使用する「増殖阻害」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理及び未処理の微生物のコロニー形成単位及び増殖曲線における相違について関する。

【0044】

「PCR」又は「ポリメラーゼ連鎖反応」は、特定のDNAセグメントの増幅のために使用される周知の技術である（米国特許第4683195号及び第4800159号）。

【0045】

配列番号1は、黄色ブドウ球菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:57651784）。

【0046】

配列番号2は、肺炎連鎖球菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:15858846）。

【0047】

配列番号3は、インフルエンザ菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:16272565）。

10

【0048】

配列番号4は、レプトスピラ・インテロガンズポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:14626937）。

【0049】

配列番号5は、エンテロコッカス・フェアセリスポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:29377524）。

20

【0050】

配列番号6は、ヘリコバクター・ピロリポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:49089809）。

【0051】

配列番号7は、枯草菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:16078635）。

【0052】

配列番号8は、ヒト結核菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:38490165）。

30

【0053】

配列番号9は、スメグマ菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（MSMEG0826ペプチドデホルミラーゼ（def）[3.5.1.88] {M. smegmatis MC2}（http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org_search=&org=gms））。

【0054】

配列番号10は、ウシ結核菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:31617046）。

【0055】

40

配列番号11は、トリ結核菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:41398721）。

【0056】

配列番号12は、らい菌ポリペプチドデホルミラーゼのアミノ酸配列である（NCBI general identification GI:13093428）。

【0057】

配列番号8 ヒト結核菌 gi:38490165

【化 1】

MAVVPIRIVGDPVLHTATTPVTVAADGSLPADLAQLIATMYDTMDAANGVGLAA
 NQIGCSLRLFVYDCAADRAM**TARRRGVVINPVLETSEIPETMPDPDTTDEGCLSV**
 PGESFPTGRAKWARVTGLDADGSPVSIEGTGLFARMLQHETGHIIDGFLYLDRLIG
 RYARNAKRAVKSHGWGVPGLSWLPGEDPDPFGH

配列番号 9 MSMEG0826 ペプチドデホルミラーゼ (def) [3. 5. 1. 88 10
] {M. smegmatis MC2) (www. tigr. org)

【化 2】

MAVVPIRIVGDPVLHTPTEPVVPGPDGSLPDDLPAIQDMFDTMDAANGVGLAAN
 QIGVAKRIFVYDCAPTRG**QTTRRRGVVINPVLETSEVPETMPDPDEDEEGCLSV**
 GENFPTGRADWARVTGLDADGSPITLEGEDI.FARMLQHETGHIIDGFLYLDRLVG
 RYARAACKAVKRNGWGGVPGLSWMPGEVPDPFGH

20

配列番号 10 ウシ結核菌 gi : 31617046

【化 3】

MTVVPIRIVGDPVLHTATTPVTVAADGSLPADLAQLIATMYDTMDAANGVGLAA
 NQIGCSLRLFVYDCAADRAM**TARRRGVVINPVLETSEIPETMPDPDTTDEGCLSV**
 PGESFPTGRAKWARVTGLDADGSPVSIEGTGLFARMLQHETGHIIDGFLYLDRLIG
 RYARNAKRAVKSHGWGVPGLSWLPGEDPDPFGH

30

配列番号 11 トリ結核菌 gi : 41398721

【化 4】

MAVVPIRIVGDPVLHTPTQPVPVGDDGSLPADLIGKLIADMYDTMDAAHIGVGLAA
 NQIGVGLRVFVYDCADDRGL**TERRRGVVNPVLETSEIPETMPDPDTTDEGCLS**
 VPGESFPTGRASWARVTGLDADGNPVSIEGHIGL.FARMLQHETGHIIDGFLYLDRLI
 GRYARSAKRAVKSHNWGVPGLSWMPGEGPDPFGH

配列番号 12 らい菌 gi : 13093428

40

【化 5】

MAIAPIRIVGDPVLHTPTAPVQVAADGSLPANLNGLISTMYDTMDAAHIGVGLAA
 NQIGYGLRVFVYDCAEDCR**QTARRRGVVINPVLETSEIPETMPDPDTTDEGCLSV**
 GESFPIGRAQWARVTGLDADGNPVTTEGTGLFARMLQHETGHIIDGFLYLDYLI
 GHARSAKRAIKSRHGWGVPGLSWMPGEVPDPFGP

(配列番号 8、9、10、11、12 における 12 アミノ酸挿入領域を太字で示す)

50

【0058】

ヒト結核菌由来ペプチドデホルミラーゼオープンリーディングフレーム (mPDF) の特徴付け:

ゲノムDNAをヒト結核菌 I I 3 7 R a 株から単離し、mPDF 遺伝子 (d e f) の P C R 増幅に使用した。使用されたプライマー (N d e I 部位が組み込まれた C R 1 : 5 ' C A T A T G G C A G T G G T A C C C 3 ' 及び C R 3 : 5 ' C C A T T A G T G A C C G A A C G G G 3 ') は、発表されたヒト結核菌ゲノム (C o l l e ら、N a t u r e . 3 9 3 . 5 3 7 ~ 5 4 4 (1 9 9 8 年)) の d e f (R v 0 4 2 9 c) 配列に基づいて設計した。d e f オープンリーディングフレーム (5 9 4 b p) は、E x p a n d l o n g t e m p l a t e P C R s y s t e m (R o c h e 、ドイツ) を製造者の推奨する手順に従って使用して P C R 増幅した。DNA ポリメラーゼ I (クレノー) での処理に続いて、P C R 増幅断片を最初に p U C 1 9 ベクター中にクローニングし (p U C - P D F ; 図 3) 、その核酸配列を、自動化配列決定装置を使用して決定した。構築物は、次いで p E T 2 8 c の N d e I / H i n d I I I 部位での d e f オープンリーディングフレームのサブクローニングに使用し、大腸菌 D H 5 α 株に形質転換した (p E T - P D F ; 図 3) 。目的遺伝子を含有するクローンは、制限分析によって確認した。

10

【0059】

p E T - P D F を過剰発現用に大腸菌 B L 2 1 株に形質転換した (D E 3) 。タンパク質の精製のために、これらのコロニーの一晚培養物 (カナマイシン 5 0 μ g / m l を含有する L B 培地中で、3 7 $^{\circ}$ C 、 1 5 時間程度) を再接種し、O D ₆₀₀ で 0 . 8 程度まで増殖させた。次いで細胞を 2 5 $^{\circ}$ C で 0 . 4 m M I P T G で誘導し、1 2 時間後に回収し、溶解緩衝液 (5 m M D T T 、カタラーゼ 1 0 μ g / m l 、1 m M フッ化フェニルメチルスルホニル、ペプスタチン 1 μ g / m l 及びロイペプチン 1 μ g / m l を含有する 2 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4) 中に懸濁した。細胞を超音波処理し、沈殿物画分 (1 2 0 0 0 x g 程度、4 $^{\circ}$ C 、 3 0 分間) を 3 M 尿素及び 2 % T r i t o n X 1 0 0 を含む溶解緩衝液に再懸濁した。遠心分離後、上清画分を透析 (4 $^{\circ}$ C 、 1 4 時間) して尿素を除去し、製造者の推奨する手順に従って N i - N T A カラム (Q i a g e n) で精製した。最後に、mPDF を溶出緩衝液 (3 0 0 m M N a C l 、 2 5 0 m M イミダゾール及びカタラーゼ 1 0 μ g / m l を含有する 2 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4) 中で溶出し、タンパク質濃度をブラッドフォード法 (B r a d f o r d M . M 、 A n a l . B i o c h e m . 7 2 : 2 4 8 ~ 2 5 4 1 9 7 6 年) に従って推定した。

20

30

【0060】

精製の様々な段階での m P D F タンパク質を 1 2 % S D S - P A G E で分析し、その同一性を抗ヒスチジン抗体を使用するウェスタンブロット法で確認した (図 4) 。精製した m P D F 保存物のタンパク質濃度は、3 . 5 m g / m l に保ち、使用まで - 8 0 $^{\circ}$ C で保存した。アッセイでの使用の前に m P D F を希釈緩衝液 (B S A 1 m g / m l 及びカタラーゼ 1 0 μ g / m l を含む 2 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4) 中に希釈し、タンパク質濃度を 3 . 5 μ g / m l に調整した。原子吸光分析を m P D F 試料 3 0 μ g (2 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4 中に調製) をグラファイト炉に注入することによって実施した。m P D F 中に存在する鉄含有量を、F e S O ₄ 1 ~ 1 0 μ g を使用して作製した標準曲線を使用して算出した。これは触媒コアにおける鉄の存在 (m P D F ポリペプチド 1 m o l 当たり鉄 0 . 9 4 $\pm$ 0 . 2 1 m o l 、 n = 4) を明らかにした。

40

【0061】

メチオニンを脱ホルミル化する m P D F の能力は、G r o c h e らによって記載された方法 (G r o c h e ら、B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 2 4 6 : 3 4 2 ~ 3 4 6 1 9 9 8 年) をわずかに変更して分光光度的なアッセイで評価した。アッセイは、5 0 μ l 反応用量で実施し、1 x アッセイ緩衝液 (1 0 0 μ g / m l カタラーゼを含む 1 0 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4) 中の m P D F タンパク質 (通常 7 0 n g) を基質 (0 から 8 0 m M N - ホルミル - M e t - A l a 、 S i g m a 、米国) と共に 3 0 $^{\circ}$ C 、 3 0 分間インキュベートした。反応を 4 % H C l O ₄ 5 0 μ l の添加によ

50

って終止させ、さらにTNBSA試薬（0.1M NaHCO₃緩衝液pH8.4中、0.01%）と共にインキュベートした（37℃、2時間）。10%SDS（250μl）及び1N HCl（125μl）の添加に続いて、一級アミンとTNBSAとの反応によって生成された高度に発色性の誘導体を335nmで測定した（Hermanson G、Bioconjugate techniques、Academic press、San Diego、カリフォルニア州、1996年、pp112～113）。得られた値をブランク（mPDF酵素を除く全ての成分）の読み値を減算することによって補正した。標準曲線は、既知量のメチオニン（0～42.8nmol）で作製した。N-ホルミル-メチオニン-アラニンを基質として使用する3回の独立した実験由来の触媒パラメーターの決定は、mPDFが4.1±0.2mMのミカエリスメンテン定数（K_m）、タンパク質1mg当たり13.3±0.7μmol/分の最大速度（V_{max}）、及び1220±6M⁻¹s⁻¹の触媒効率（）を有する活性酵素であることを示した。

10

【0062】

マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵素活性は、高度に安定であり、過酸化水素などの酸化剤に耐性であった：

時間の関数として測定した場合に上記で挙げたTNBSAアッセイにおける組換えタンパク質（濃度3.5μg/mlで一定）の酵素活性は、半減期4.1±0.7時間を示した。したがって、その金属結合コアのFe⁺²の存在にもかかわらず、組換えmPDFは、大腸菌のそれと比較して非常に安定であると確かめられた。この観察は、ヒト結核菌が宿主内でのその生存のために酸化ストレスに対処しているという事実と共に、本発明者らをH₂O₂（過酸化水素）などの酸化剤のmPDFの脱ホルミル化能への影響の測定に導いた。マイクロモル濃度が、大腸菌の酵素の急速かつ完全な失活を生じると報告されている（Rajagopalan及びPei、J. Biol. Chem. 273 22305～22310 1998年）一方で、本発明者らは、500mM H₂O₂でのプレインキュベーション（1反応当たりタンパク質70ngで、30℃、2時間まで）が未処理対照と比較してmPDFの脱ホルミル化能に有意な影響を示さなかったことを見出した。したがって、本発明者らの結果は、他の細菌性相同体との共有性にもかかわらずmPDFは、その作用において差異を明確に維持したことを立証した。

20

【0063】

酵素安定性の維持に関与するマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵素における挿入領域の同定

30

他のグラム陽性細菌（II型クラス）と同様に、mPDFは、保存されたモチーフIとIIの間に挿入（アミノ酸残基74～85；図1中のIR）を有した。本発明者らは、挿入配列（12アミノ酸「MTARRRGVVINP」が欠失、IRと表す）でのmPDFの欠失変異体をPCRに基づく変異誘発法（Shirley, K. ら、PCR Primer: A Laboratory Manual pp143～155 in C. W. Dieffenbach, G. S. Dveksler, (編)、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州、1995年）を採用して作製した。次いでこれらの領域のmPDFの脱ホルミル化能への寄与を査定する酵素活性を評価した。mPDFの酵素活性は、上記で挙げたTNBSAアッセイにおいて基質としてN-ホルミル-Met-Alaを使用して、カタラーゼ及びBSAの存在下で決定した。発現させた変異体タンパク質（IR）は、ウェスタンブロット法によって確認された通り抗ヒスチジンタグ抗体によって認識された。アッセイにおいて過剰量のタンパク質（20μgを5mM N-ホルミル-Met-Alaとインキュベートした）を使用してもIR変異体は、いかなる脱ホルミル化活性も示さなかった（図5）。

40

【0064】

挿入領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、培養中のマイコバクテリアの増殖及びペプチドデホルミラーゼ酵素の産生を阻害する：

多くの病原性細菌におけるdef遺伝子の必須性は、有望な薬剤標的としてのその使用

50

を導いた (Yuanら、Drug Discov. Today 6、954～961 (2001年)。該酵素の阻害剤と共にインキュベートする培養は、細菌の増殖に影響を与えることが報告されている (Clemantsら、Antimicrob. Agents. Chemother 45、563～570 2001年及びCynamonら、J. Antimicrob. Chemother 53、403～405 2004年)。挿入配列がmPDFの酵素活性の維持に不可欠であることから、本発明者らは、ヒト結核菌の遺伝的研究のためのモデルとしてしばしば使用されている、高増殖性腐生菌、スメグマ菌 $mc^2 155$ 株の増殖プロファイルへの該領域の寄与をさらに検討した (Flintら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101、12598～12603 2004年)。この目的のために、全てのマイコバクテリア種において大部分保存されている領域 (ヒト結核菌 *def* の219～249塩基) (ヒト結核菌とスメグマ菌の *def* の間でヌクレオチドレベルで73%程度相同) にわたるように設計した5'ホスホチオレート修飾アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド、PS-ODN1の存在下で細菌培養物を増殖させた。

10

【0065】

細菌の増殖プロファイルは、600nmでの吸光度を記録すること及びコロニー形成単位を計ることによって様々な時間間隔 (0～24時間) で測定した。未処理培養物と比較して、本発明者らの結果は、PS-ODN1で処理した場合に24時間でスメグマ菌の増殖において1/5の減少を示した (図6A及び7、左パネル)。この発見は、全ての塩基がホスホチオレート修飾を有する該領域 (ヒト結核菌 *def* の229～255塩基にわたる、ヒト結核菌とスメグマ菌の間のヌクレオチド配列で86%相同) 内の他のアンチセンスデオキシリボヌクレオチド (PS-ODN2) を使用することによって確認された (図6Aの挿入図)。本発明者らは、細菌培養物を非相同性配列 (ヒト結核菌とスメグマ菌の *def* の100～117塩基間で22%相同) に基づいて設計された非特異的5'ホスホチオレート修飾アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド、PS-ODN3で処理した場合に上記の増殖阻害を観察しなかった。PS-ODN1は、マイコバクテリア特異的であることから (挿入配列は他の細菌中に無かった)、大腸菌の増殖プロファイルに影響を有さなかった (図7、右パネル)。

20

【0066】

PS-ODN1がスメグマ菌細胞内に浸透したことを確認するために、それを3'末端でフロウレseinと結合させ (PS-ODN4)、24時間の処理後、共焦点顕微鏡で可視化した場合に蛍光を呈した (図6B)。したがって、これら全ての証拠は、PS-ODNがマイコバクテリア種に特有の挿入配列を標的とし、細胞内に浸透し、かつスメグマ菌の増殖を特異的に阻害したことを立証する。

30

【0067】

PS-ODNがスメグマ菌で天然PDFタンパク質の発現を阻害するかどうかを決定するために、培養物をPS-ODN1の存在下又は不在下で24時間増殖させた。培養物を沈澱させた後、処理及び未処理細胞溶解物の両方の細胞の可溶性画分を20mMリン酸緩衝液 (pH7.4) に調製した。これらの試料を次いでSDS-PAGE (添加したタンパク質量=溝1つ当たり50μg) 及び組換えmPDFに対するポリクローナル抗体を使用するウェスタンブロット法に使用した。未処理対照 (添加対照として提供されるボンソーS染色ブロットを参照されたい、図8、上パネル) と比較して、PS-ODN1で処理したスメグマ菌細胞において、内在性PDFタンパク質の発現レベルにおける有意な減少が認められた (図8、下パネル)。総合すると本発明者らの結果は、挿入配列が該酵素の機能に対して重要な役割を演じていることを立証する。

40

【0068】

以下の実施例は、本発明の例示のために提供され、したがって本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0069】

50

(実施例 1)

mPDF のヌクレオチド由来アミノ酸配列を NIH のメールサーバーを使用して BLAST プログラムにおける「nr」データベースと比較した (Altschul ら、Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402、1997 年)。検索した配列の多重配列アラインメントを Clustal X 1.81 プログラムを使用して実行した (Thompson ら、Nucleic Acids Res. 25: 4876~4882、1997 年)。全ての真正細菌の PDF のアミノ酸配列の分析は、文献における I 型 (グラム陰性) 及び II 型 (グラム陽性) クラスとしてのその一般的分類によらない、3 種 (I: GXGXAAXQ、II: EGCLS 及び III: QHExXH、配列中、X は任意の疎水性残基) の高度に保存されたモチーフ (図 1) の存在を明らかにした。本発明者らは、mPDF のヌクレオチド由来アミノ酸配列を I 型 (大腸菌) 及び II 型 (黄色ブドウ球菌) の両クラスに属する十分に特徴付けられた典型例と比較した。ヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼ配列の分析は、mPDF が挿入 (アミノ酸残基 74~85; 図 1 において IR と表記) を有することを明らかにした。次いで、様々なマイコバクテリア種の PDF 配列をアラインした。様々なマイコバクテリア種間で比較した場合、ヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼの挿入領域は 84% 程度の同一性を示す (図 2)。

10

【0070】

ヒト結核菌酵素と他の細菌性鉄含有ペプチドデオルミラーゼ (deormylases) の配列アラインメント:

大腸菌、黄色ブドウ球菌及びヒト結核菌由来の鉄含有ペプチドデホルミラーゼのヌクレオチド由来アミノ酸配列を Clustal X 1.84 プログラムを使用してアラインした。星印及び点を、それぞれ同一及び類似のアミノ酸を示すために使用する。ΔIR 変異体を作製するために欠失させた挿入領域 (74~85) を構成するアミノ酸に下線を付けている。

20

【0071】

様々なマイコバクテリア種由来のペプチドデホルミラーゼ酵素の多重配列アラインメント: PSI-BLAST を通じて検索したマイコバクテリアの配列を Clustal X 1.84 プログラムによってアラインした。保存された残基を含むマイコバクテリアデオルミラーゼに特異的な挿入領域に下線を付けている。星印及び点を使用して、それぞれ同一及び類似のアミノ酸を示す。

30

【0072】

(実施例 2)

def オープンリーディングフレーム (594 塩基) をヒト結核菌由来ゲノム DNA を使用して、アニーリング温度 50℃ で PCR 増幅した。使用したプライマー (NdeI 部位が組み込まれた CR1: 5' CATATGGCAGTGGTACCC3' 及び CR3: 5' CCATTAGTGACCGAACGGG3') は、発表されたヒト結核菌ゲノム (Cole ら、Nature. 393 537~544 1998 年) の def (Rv0429c) 配列に基づいて設計した。PCR は、製造者の推奨する手順に従って、Expand long template PCR system (Roche) を使用して実施した。

40

【0073】

DNA ポリメラーゼ I (クレーン) での処理に続いて、PCR 増幅断片を最初に pUC19 ベクターの SmaI 部位に標準的手順 (Sambrook, J. 及び Russell, D. . Molecular cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク州、米国 2001 年) に従ってクローニングし (pUC-mPDF)、その核酸配列を自動化配列決定装置 (Applied Biosystems) を使用して決定した。pUC19 へのクローニングに続く該断片の配列決定は、発表されたヒト結核菌の def 配列 (Cole ら、Nature、393 537~544 1998 年) とヌクレオチドレベルで 100% の同一性を示した。

50

【0074】

mPDFの酵素的性質を特徴付けるために、defオープンリーディングフレームを含む594bp断片をpUC-mPDFの制限酵素NdeI/HindIIIでの制限酵素消化によって切り出し、標準的手法(Sambrook, J. 及びRussell, D. . Molecular cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク州、米国 2001年)に従ってpET28cの対応する部位に連結した。これによりpET-mPDFとして表す構築物を生じ(図3)、それを組換えタンパク質を得るために大腸菌BL21株に形質転換した(DE3)。プラスミドpET-mPDFを有する宿主細胞から調製した細胞溶解物のSDS-PAGE分析は、IPTG誘導後に30kDa程度のタンパク質の過剰発現を示した(図4、左パネル、レーン2と3を比較されたい)。

10

【0075】

過剰発現されたタンパク質が沈澱画分に確認され(図4、左パネル、レーン4と5を比較されたい)、それを3M尿素で可溶化し(図4、左パネル、レーン6)、20mMリン酸緩衝液に対して透析した。続く、Ni-NTAカラムでの可溶性タンパク質のアフィニティー精製(図4、左パネル、レーン8)は、 31 ± 1.4 kDa (平均 $\pm$ SD、 $n=7$)の分子量を明らかにした。発現されたタンパク質は、アミノ末端に、ポリヒスチジン領域(6残基)のアミノ酸を含むベクター由来のさらなる19アミノ酸(HHHHHHSSGLVPRGSH)を有していた。アミノ末端の伸長は、タンパク質のアフィニティー精製を促進するだけでなく、抗ヒスチジntagモノクローナル抗体を使用するウェスタンブロット法におけるmPDFタンパク質の検出の手段も提供する(図4、右パネル、レーン2及び3)。該構築物は、本発明者らの研究において野生型として設計された。

20

【0076】

発現ベクター中でのマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ遺伝子のクローニングの模式的表示: defオープンリーディングフレーム(594bp)をヒト結核菌由来ゲノムDNAを使用してPCR増幅した。DNAポリメラーゼI(クレノー)での処理に続いて、PCR増幅断片をpUC19ベクターのSmaI部位にクローニングし(pUC-PDF)、その核酸配列を制限酵素消化に続く核酸配列決定によって確認した。構築物を、続いてpET28cのNdeI/HindIII部位でのオープンリーディングフレームのサブクローニングのために使用し、pET-PDF(WT)を得るために大腸菌DH5 α 株に形質転換した。所望の位置に変異を含むPCR増幅産物を独自のSacI/HindIIIで消化し、pET-PDF構築物の対応する部位に組み込んだ。

30

【0077】

図4: 大腸菌中で発現させたヒト結核菌のペプチドデホルミラーゼの精製

pET-PDF又は欠失変異体(IR)を有するBL21(DE3)細胞の一晩培養物を本文に記載の通り処理した。精製の様々な段階でのタンパク質試料を、12%SDS-PAGEに続いてクーマシーブリリアントブルー染色(左パネル)及び抗ヒスチジン抗体を使用するウェスタンブロット法(右パネル)に使用した。左パネル: レーン1、分子量マーカー; レーン2、pET-PDFで形質転換した細胞の粗抽出物; レーン3、pET-PDFで形質転換した細胞のIPTG誘導後の粗抽出物; レーン4、低速上清画分; レーン5、低速遠心分離後に得られた沈澱画分; レーン6、尿素で可溶化した上清画分; レーン7、尿素で可溶化した低速遠心分離後の沈澱画分; レーン8、Ni-NTA樹脂精製タンパク質。右パネル: レーン1、pET-PDFで形質転換した細胞の粗抽出物; レーン2、pET-PDFで形質転換した細胞のIPTG誘導後の粗抽出物; レーン3、Ni-NTA樹脂精製タンパク質。矢印は、精製mPDFの位置を示す。数字は、マーカータンパク質の分子量の大きさを示す。

40

【0078】

挿入領域74から85の重要性を立証するために、本発明者らは、ヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼのアミノ酸残基74~85を欠失した変異体をPCRに基づく手法を使用

50

して構築した。変異体は、pUC-PDFを鋳型として使用してPCRに基づく方法に従って作製した（Shirley, K. ら、PCR Primer: A Laboratory Manual pp143~155 in C. W. Dieffenbach, G. S. Dveksler, (編)、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州、1995年）。PCRは、2種の外部（プライマーCR26: 5' GGAATTCCATATGGCAGTCGTACCC3' 及びCR27: 5' CCCAAGCTTTTAGTGACCGAACGG3'）並びに2種の内部プライマー（アミノ酸残基74~85に対応する36塩基対を除いて設計したCR88: 5' GCGGACCGCGCAGTGCTTGAGACCTC3' 及びCR87: 5' GAGGTCTCAAGCACTGCGCGGTCCG3'）で実施した。所望の変異を作製するために、2セットの一次PCR反応（PCRプライマーCR27/CR87及びCR26/CR88並びに鋳型としてpUC-PDFを使用する）を実施した。一次反応で得られた増幅産物を1:1の割合で混合した。混合後、PCR産物を二回目のPCRを実施するための鋳型として外部プライマー（CR26/CR27）と共に使用した。所望の変異を含む最終PCR産物を0.8%アガロースゲルで精製し、SacII/HindIIIで消化し、pET-mPDFの対応する部位に組み込んだ（図3）。本方法で得られた変異体構築物は、pET-ΔIR PDFと表した。該（変異体構築物）を発現させ、上記の野生型と同様に精製した。次いで野生型及び変異タンパク質の酵素活性を測定した。

【0079】

mPDF又は変異タンパク質のメチオニンを脱ホルミル化する能力は、他に記載の方法（Hermanson G、Bioconjugate techniques、Academic press、San Diego、カリフォルニア州、1996年、pp112~113）をわずかに変更して分光光度的アッセイにおいて評価した。簡潔には、50μl反応用量中で1×アッセイ緩衝液（100μg/mlカタラーゼを含む100mMリン酸緩衝液pH7.4）中のmPDF又は変異タンパク質（通常32ng~20μg）を、基質（5mM N-ホルミル-Met-Ala、Sigma、米国）と共に30℃、30分間インキュベートした。反応を4% HClO₄ 50μlの添加によって終止させ、さらにトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBSA）試薬（0.1M NaHCO₃ 緩衝液、pH8.4中に0.01%）と共にインキュベートした（37℃、2時間）。10% SDS（250μl）及び1N HCl（125μl）の添加に続いて、一級アミンとTNBSAとの反応によって生成された高度に発色性の誘導体を335nmで測定した。得られた値は、ブランク（酵素を除く全ての成分）の読み値を減算することによって補正した。標準曲線は、既知量のメチオニン（0~42.8nmol）で作製し、mPDFの酵素活性は、タンパク質1mg当たり、1分間に産生される遊離アミノ基のnmol数として表した。最後にデータは、少なくとも3回の独立した実験からの平均±SDの形式で表した。挿入領域全体の欠失（残基74~85にわたるΔIR変異体）は、タンパク質の関数として測定した場合、酵素活性を完全に消失させた（図5）。したがって、この結果は、挿入領域のヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼの酵素活性に対する重要性を示した。

【0080】

ヒト結核菌ペプチドデホルミラーゼの酵素活性についての変異の影響

欠失変異体（ΔIR 74~85）を本文に記載の通りPCRに基づく突然変異誘導法を使用して作製した。発現に続いて、野生型及びmPDF変異体タンパク質を精製した。変異体ΔIR（74~85）及び野生型（WT）の脱ホルミル化能は、5mM N-ホルミル-Met-Alaを基質として使用してタンパク質濃度の増加（0.032、0.16、0.8、4.0、20μg）の関数として比較した。

【0081】

（実施例3）

本発明者らは、ヒト結核菌の遺伝子研究のモデルとしてしばしば使用されている、高増

10

20

30

40

50

殖性腐生菌、スメグマ菌 $mc^2 155$ 株の増殖プロファイルへの該領域の寄与をさらに検討した (Flintら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101、12598～12603 2004年)。スメグマ菌細胞 1×10^5 個程度 (コンフルエント培養物由来、細胞数は系列希釈で調整) を培地 (10%ADCを補充した7H9ミドルブルック培地) 3 ml 中の $10 \mu M$ PS-ODN1とインキュベートした。PS-ODN1は、全てのマイコバクテリア種において大部分が保存されている領域 (ヒト結核菌 *def* の219～249塩基) (ヒト結核菌とスメグマ菌の *def* の間でヌクレオチドレベルで73%程度相同) にわたるように設計した。少量の一定分量を様々な時間間隔 (0、6、12、24時間後) で採取し、PS-ODN1で処理及び未処理の細菌培養物の増殖プロファイルを得るために600 nmでの光学密度を記録した。同時に、様々な時間間隔で回収した細菌細胞を洗浄し、系列希釈後に7H10ミドルブルックアガー (10%ADCを補充) 上に蒔き、37℃、3日間のインキュベーションの後にコロニー形成単位を計った。未処理培養物と比較して、本発明者らの結果は、PS-ODN1の存在下で増殖させたスメグマ菌培養物の増殖において1/5の減少 (図6A及び7) を示した (同様の増殖プロファイルが、培養物の光学密度を600 nmで決定すること及びプレート上に得られたコロニーの数を数えることによって増殖を測定した場合に得られた)。この発見を全ての塩基がホスホチオレート修飾を有する、領域 (ヒト結核菌 *def* の229～255塩基にわたる、ヒト結核菌とスメグマ菌の間でヌクレオチド配列で86%相同) 内の他のアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド (PS-ODN2) を使用することによって確認した (図6Aの挿入図)。

【0082】

さらに、PS-ODN1がスメグマ菌細胞に浸透したことを確認するために、PS-ODN1に3'フロウレセイン標識を結合し、マイコバクテリア培養物 (スメグマ菌細胞 1×10^5 個程度を、10%ADCを補充した7H9ミドルブルック培地3 ml 中の $10 \mu M$ PS-ODNとインキュベートし、37℃/200 rpmで24時間増殖させた) の処理のために使用した。実験の終了時に、 $1 \times PBS$ (pH7.4) での洗浄に続いて、3'フロウレセインと結合したPS-ODN1で処理した細胞を、共焦点顕微鏡で可視化した場合に、蛍光を呈した (図6B)。PS-ODN1がマイコバクテリア特異的であることから、挿入配列が無い大腸菌において培養物を $10 \mu M$ PS-ODN1で処理した場合にはその増殖に影響を与えなかった (図7、右パネル)。したがって、これら全ての証拠は、PS-ODNがマイコバクテリア種に特有の挿入配列を標的とし、細胞内に浸透しかつスメグマ菌の増殖を特異的に阻害したことを立証する。

【0083】

マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼの保存された挿入領域のアンチセンスオリゴヌクレオチドの増殖における影響。スメグマ菌培養物 (アルブミン、ブドウ糖及びカタラーゼの混合物を10%補充したミドルブルック7H9培地3 ml 中の細胞 1×10^5 個) を、マイコバクテリア種に典型的な挿入領域に対して設計したPS-ODN ($10 \mu M$) と共にインキュベートした。一定分量を様々な時間間隔 (0、6、12、24時間後) で採取し、PS-ODNで処理及び未処理の細菌培養物の増殖プロファイルを得るために600 nmでの光学密度を記録した。挿入図：非相同性配列 (ヒト結核菌とスメグマ菌の *def* の100～117塩基間で22%相同) に基づいて設計された非特異的5'ホスホチオレート修飾アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド、PS-ODN3で処理し、上記の通り増殖させた場合のマイコバクテリア培養物、本発明者らは、上記の増殖阻害を観測しなかった、(B) 3'フロウレセイン結合PS-ODNで24時間処理した細菌細胞を共焦点顕微鏡下で可視化した。上パネル：未処理スメグマ菌、下パネル：3'フロウレセイン結合PS-ODNで処理したスメグマ菌。

【0084】

マイコバクテリアペプチドデホルミラーゼの保存された挿入領域のアンチセンスオリゴヌクレオチドへの反応における様々な細菌の増殖 様々な時間間隔で採取した $10 \mu M$ PS-ODN (マイコバクテリア種に特異的な挿入領域に対して設計された) の存在下及

び不在下で増殖させた細菌培養物（細胞 1×10^5 個、スメグマ菌は、アルブミン、ブドウ糖及びカタラーゼの混合物を10%補充した3mlミドルブルック7H9培地、大腸菌は、3ml Lauria-Bertani培地）を洗浄し、系列希釈後に、アルブミン、ブドウ糖及びカタラーゼの混合物を10%補充したミドルブルック7H10アガー（スメグマ菌）又は、Lauria-Bertaniアガー（大腸菌）プレートに蒔いた。37℃、3日間（スメグマ菌）及び12時間（大腸菌）のインキュベーション後に得られたコロニーを計測し、未処理培養物増殖の百分率としてプロットした。

【0085】

（実施例4）

PS-ODNがスメグマ菌において天然PDFタンパク質の発現を阻害するかどうかを決定するために、培養物をPS-ODN1の存在下又は不在下で24時間増殖させた。培養物を沈澱させた後、処理及び未処理の両方の細胞の可溶性画分、溶解物を20mMリン酸緩衝液（pH7.4）中に調製した。これらの試料を次いでSDS-PAGE（添加したタンパク質量＝溝1つ当たり50μg）及び組換えmPDFに対するポリクローナル抗体を使用するウェスタンブロット法に使用した。未処理対照（添加対照として提供するポンソーS染色ブロットを参照されたい、図8、上パネル）と比較して、PS-ODN1で処理したスメグマ菌細胞において、内在性PDFタンパク質の発現レベルにおける顕著な減少が認められた（図8、下パネル）。総合すると本発明者らの結果は、挿入配列が該酵素の機能に対して重要な役割を演じることを立証する。

【0086】

図8：アンチセンスオリゴヌクレオチド処理への反応におけるペプチドデホルミラーゼタンパク質の発現 スメグマ菌培養物（アルブミン、ブドウ糖及びカタラーゼの混合物を10%補充したミドルブルック7H9培地3ml中の細胞 1×10^5 個）を、マイコバクテリア種に特有である挿入領域に対して設計したPS-ODN（10μM）と共に24時間インキュベートした。細胞を回収し、超音波処理し、タンパク質量推定の後に上清画分（13200rpm）を次に使用した。12%SDS-PAGE（処理及び未処理試料について溝1つ当たりタンパク質50μgを添加）で分離したタンパク質を精製した組換えmPDFに対して作製したポリクローナル抗体を使用するウェスタンブロット分析に使用した。上パネル：mPDFに対するポリクローナル抗体をプローブとしたブロット、レーン1；Ni-NTA精製mPDF（対照として）、レーン2；未処理スメグマ菌由来上清画分、レーン3；10μM PS-ODNで処理したスメグマ菌由来上清画分、レーン4；着色タンパク質分子量マーカー。下パネル：添加対照として示す、ポンチョーS（Poncheau S）で染色した同じブロット。

【0087】

利点：

過去数十年において、結核は世界中で数百万人の死の原因となる世界的な健康への脅威として再出現している。いくつかの抗結核薬が既知であるにもかかわらず、病原性マイコバクテリア種からの1剤又は多剤耐性株の出現が、この恐ろしい疾病の復活の主な原因の1つとして広く考えられている。この状況を克服するために、新規の薬剤介入戦略を緊急に開発する必要がある。この目的を達するために、薬剤標的の同定は、最初の必要事項である。本明細書において、本発明は、抗菌化合物のスクリーニングのための標的の豊富な供給源であることが常に証明されている、マイコバクテリアのタンパク質合成全般に焦点を置く。真核生物の細胞質タンパク質の合成とは対照的に、ホルミル化／脱ホルミル化事象は、真正細菌において必須のステップであると考えられ、したがってPDF酵素の重要性は長い間予想されてきた。様々な細菌性PDFでの共有性にもかかわらず、マイコバクテリアPDFはいくつかの独特の特徴を有する。それらの内、挿入（残基74～85）配列（マイコバクテリア種のみの特異的）の酵素安定性及び該タンパク質の機能の維持における寄与は、重要な性質であり、今日まで他のいかなる細菌からも報告されていない。挿入配列に対して設計及び合成されたホスホチオレート修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドは、培養中のマイコバクテリアの増殖及びマイコバクテリアペプチドデホルミラーゼ酵

素の発現を妨げる。したがってこれらの結果は、それに基づく合理的薬剤設計が可能である、マイコバクテリア酵素の挿入領域の新規性を強調する。このため本発明は、マイコバクテリア酵素の該領域と相互作用し、かつマイコバクテリア増殖を阻害できる該酵素の発現又は産生に影響を与える任意の（生物的又は非生物的）抗マイコバクテリア化合物の同定／開発において明確に有利となる。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<210> 1
 <211> 162 10
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 1

Met Ala Ile Lys Lys Leu Val Pro Ala Ser His Pro Ile Leu Thr Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Gln Ala Val Lys Thr Phe Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Leu 20
 20 25 30

Gln Asp Leu Glu Asp Thr Met Tyr Ala Gln Glu Ala Ala Gly Leu Cys
 35 40 45

Ala Pro Gln Ile Asn Gln Ser Leu Gln Val Ala Ile Ile Asp Met Glu
 50 55 60 30

Met Glu Gly Leu Leu Gln Leu Val Asn Pro Lys Ile Ile Ser Gln Ser
 65 70 75 80

Asn Glu Thr Ile Thr Asp Leu Glu Gly Ser Ile Thr Leu Pro Asp Val
 85 90 95

Tyr Gly Glu Val Thr Arg Ser Lys Met Ile Val Val Glu Ser Tyr Asp 40
 100 105 110

Val Asn Gly Asn Lys Val Glu Leu Thr Ala His Glu Asp Val Ala Arg
 115 120 125

Met Ile Leu His Ile Ile Asp Gln Met Asn Gly Ile Pro Phe Thr Glu
 130 135 140

Arg Ala Asp Arg Ile Leu Thr Asp Lys Glu Val Glu Ala Tyr Phe Ile
 145 150 155 160

Asn Asp

<210> 2 10

<211> 203

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

Met Ser Ala Ile Glu Arg Ile Thr Lys Ala Ala His Leu Ile Asp Met
 1 5 10 15

20

Asn Asp Ile Ile Arg Glu Gly Asn Pro Thr Leu Arg Thr Val Ala Glu
 20 25 30

Glu Val Thr Phe Pro Leu Ser Asp Gln Glu Ile Ile Leu Gly Glu Lys
 35 40 45

Met Met Gln Phe Leu Lys His Ser Gln Asp Pro Val Met Ala Glu Lys
 50 55 60

30

Met Gly Leu Arg Gly Gly Val Gly Leu Ala Ala Pro Gln Leu Asp Ile
 65 70 75 80

Ser Lys Arg Ile Ile Ala Val Leu Val Pro Asn Ile Val Glu Glu Gly
 85 90 95

40

Glu Thr Pro Gln Glu Ala Tyr Asp Leu Glu Ala Ile Met Tyr Asn Pro
 100 105 110

Lys Ile Val Ser His Ser Val Gln Asp Ala Ala Leu Gly Glu Gly Glu
 115 120 125

Gly Cys Leu Ser Val Asp Arg Asn Val Pro Gly Tyr Val Val Arg His
 130 135 140

50

Ala Arg Val Thr Val Asp Tyr Phe Asp Lys Asp Gly Glu Lys His Arg
 145 150 155 160

Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Asn Ser Ile Val Val Gln His Glu Ile Asp
 165 170 175

His Ile Asn Gly Ile Met Phe Tyr Asp Arg Ile Asn Glu Lys Asp Pro
 180 185 190

Phe Ala Val Lys Asp Gly Leu Leu Ile Leu Glu
 195 200

<210> 3
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 3

Met Thr Ala Leu Asn Val Leu Ile Tyr Pro Asp Asp His Leu Lys Val
 1 5 10 15

Val Cys Glu Pro Val Thr Lys Val Asn Asp Ala Ile Arg Lys Ile Val
 20 25 30

Asp Asp Met Phe Asp Thr Met Tyr Gln Glu Lys Gly Ile Gly Leu Ala
 35 40 45

Ala Pro Gln Val Asp Ile Leu Gln Arg Ile Ile Thr Ile Asp Val Glu
 50 55 60

Gly Asp Lys Gln Asn Gln Phe Val Leu Ile Asn Pro Glu Ile Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Glu Gly Glu Thr Gly Ile Glu Glu Gly Cys Leu Ser Ile Pro Gly
 85 90 95

Phe Arg Ala Leu Val Pro Arg Lys Glu Lys Val Thr Val Arg Ala Leu

10

20

30

40

50

100 105 110

Asp Arg Asp Gly Lys Glu Phe Thr Leu Asp Ala Asp Gly Leu Leu Ala
115 120 125

Ile Cys Ile Gln His Glu Ile Asp His Leu Asn Gly Ile Leu Phe Val
130 135 140

Asp Tyr Leu Ser Pro Leu Lys Arg Gln Arg Ile Lys Glu Lys Leu Ile
145 150 155 160

Lys Tyr Lys Lys Gln Ile Ala Lys Ser
165

<210> 4
<211> 178
<212> PRT
<213> Leptospira interrogans

<400> 4

Met Ser Val Arg Lys Ile Leu Arg Met Gly Asp Pro Ile Leu Arg Lys
1 5 10 15

Ile Ser Glu Pro Val Thr Glu Asp Glu Ile Gln Thr Lys Glu Phe Lys
20 25 30

Lys Leu Ile Arg Asp Met Phe Asp Thr Met Arg His Ala Glu Gly Val
35 40 45

Gly Leu Ala Ala Pro Gln Ile Gly Ile Leu Lys Gln Ile Val Val Val
50 55 60

Gly Ser Glu Asp Asn Glu Arg Tyr Pro Gly Thr Pro Asp Val Pro Glu
65 70 75 80

Arg Ile Ile Leu Asn Pro Val Ile Thr Pro Leu Thr Lys Asp Thr Ser
85 90 95

10

20

30

40

50

Gly Phe Trp Glu Gly Cys Leu Ser Val Pro Gly Met Arg Gly Tyr Val
 100 105 110

Glu Arg Pro Asn Gln Ile Arg Met Gln Trp Met Asp Glu Lys Gly Asn
 115 120 125

Gln Phe Asp Glu Thr Ile Asp Gly Tyr Lys Ala Ile Val Tyr Gln His
 130 135 140

10

Glu Cys Asp His Leu Gln Gly Ile Leu Tyr Val Asp Arg Leu Lys Asp
 145 150 155 160

Thr Lys Leu Phe Gly Phe Asn Glu Thr Leu Asp Ser Ser His Asn Val
 165 170 175

20

Leu Asp

<210> 5

<211> 187

<212> PRT

<213> Enterococcus faecelis

<400> 5

30

Met Ile Thr Met Lys Asp Ile Ile Arg Glu Gly Asn Pro Thr Leu Arg
 1 5 10 15

Ala Val Ala Glu Glu Val Pro Val Pro Ile Thr Glu Glu Asp Arg Gln
 20 25 30

Leu Gly Glu Asp Met Leu Thr Phe Leu Lys Asn Ser Gln Asp Pro Val
 35 40 45

40

Lys Ala Glu Glu Leu Gln Leu Arg Gly Gly Val Gly Leu Ala Ala Pro
 50 55 60

Gln Leu Asp Ile Ser Lys Arg Ile Ile Ala Val His Val Pro Ser Asn
 65 70 75 80

50

50

Gln Glu Asp Gly Val Gln His Lys Glu Asp Cys Leu Glu Ile Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Ile Glu Thr Gly Gly Ser Met Met Tyr Lys Glu Gly Cys
 85 90 95

Leu Ser Val Pro Gly Phe Tyr Glu Glu Val Glu Arg Phe Glu Lys Val
 100 105 110

Lys Ile Glu Tyr Gln Asn Arg Phe Ala Glu Val Lys Val Leu Glu Ala
 115 120 125

Ser Glu Leu Leu Ala Val Ala Ile Gln His Glu Ile Asp His Leu Asn
 130 135 140

Gly Val Leu Phe Val Asp Lys Leu Ser Ile Leu Lys Arg Lys Lys Phe
 145 150 155 160

Glu Lys Glu Leu Lys Glu Leu Gln Lys Lys Gln Lys His Lys
 165 170

<210> 7
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 7

Met Ala Val Lys Lys Val Val Thr His Pro Ala Glu Val Leu Glu Thr
 1 5 10 15

Pro Ala Glu Thr Val Thr Val Phe Asp Lys Lys Leu Lys Lys Leu Leu
 20 25 30

Asp Asp Met Tyr Asp Thr Met Leu Glu Met Asp Gly Val Gly Leu Ala
 35 40 45

Ala Pro Gln Ile Gly Ile Leu Lys Arg Ala Ala Val Val Glu Ile Gly

50	55	60	
Asp Asp Arg Gly Arg Ile Asp Leu Val Asn Pro Glu Ile Leu Glu Lys			
65	70	75	80
Ser Gly Glu Gln Thr Gly Ile Glu Gly Cys Leu Ser Phe Pro Asn Val			
	85	90	95
			10
Tyr Gly Asp Val Thr Arg Ala Asp Tyr Val Lys Val Arg Ala Phe Asn			
	100	105	110
Arg Gln Gly Lys Pro Phe Ile Leu Glu Ala Arg Gly Phe Leu Ala Arg			
	115	120	125
Ala Val Gln His Glu Met Asp His Leu Asp Gly Val Leu Phe Thr Ser			20
	130	135	140
Lys Ile Ser Lys Tyr Tyr Thr Glu Asp Glu Leu Ala Asp Met Glu Gly			
145	150	155	160
<210>	8		
<211>	197		
<212>	PRT		30
<213>	Mycobacterium tuberculosis		
<400>	8		
Met Ala Val Val Pro Ile Arg Ile Val Gly Asp Pro Val Leu His Thr			
1	5	10	15
Ala Thr Thr Pro Val Thr Val Ala Ala Asp Gly Ser Leu Pro Ala Asp			
	20	25	30
			40
Leu Ala Gln Leu Ile Ala Thr Met Tyr Asp Thr Met Asp Ala Ala Asn			
	35	40	45
Gly Val Gly Leu Ala Ala Asn Gln Ile Gly Cys Ser Leu Arg Leu Phe			
50	55	60	
			50

Val Tyr Asp Cys Ala Ala Asp Arg Ala Met Thr Ala Arg Arg Arg Gly
65 70 75 80

Val Val Ile Asn Pro Val Leu Glu Thr Ser Glu Ile Pro Glu Thr Met
85 90 95

Pro Asp Pro Asp Thr Asp Asp Glu Gly Cys Leu Ser Val Pro Gly Glu
100 105 110

10

Ser Phe Pro Thr Gly Arg Ala Lys Trp Ala Arg Val Thr Gly Leu Asp
115 120 125

Ala Asp Gly Ser Pro Val Ser Ile Glu Gly Thr Gly Leu Phe Ala Arg
130 135 140

20

Met Leu Gln His Glu Thr Gly His Leu Asp Gly Phe Leu Tyr Leu Asp
145 150 155 160

Arg Leu Ile Gly Arg Tyr Ala Arg Asn Ala Lys Arg Ala Val Lys Ser
165 170 175

His Gly Trp Gly Val Pro Gly Leu Ser Trp Leu Pro Gly Glu Asp Pro
180 185 190

30

Asp Pro Phe Gly His
195

<210> 9

<211> 198

<212> PRT

<213> Mycobacterium smegmatis

40

<400> 9

Met Ala Val Val Pro Ile Arg Ile Val Gly Asp Pro Val Leu His Thr
1 5 10 15

Pro Thr Glu Pro Val Pro Val Gly Pro Asp Gly Ser Leu Pro Asp Asp
20 25 30

50

Leu Pro Ala Leu Ile Gln Asp Met Phe Asp Thr Met Asp Ala Ala Asn
 35 40 45

Gly Val Gly Leu Ala Ala Asn Gln Ile Gly Val Ala Lys Arg Leu Phe
 50 55 60

Val Tyr Asp Cys Ala Pro Thr Arg Gly Gln Thr Thr Arg Arg Arg Gly 10
 65 70 75 80

Val Val Ile Asn Pro Val Leu Glu Thr Ser Glu Val Pro Glu Thr Met
 85 90 95

Pro Asp Pro Asp Glu Asp Glu Glu Gly Cys Leu Ser Val Pro Gly Glu
 100 105 110 20

Asn Phe Pro Thr Gly Arg Ala Asp Trp Ala Arg Val Thr Gly Leu Asp
 115 120 125

Ala Asp Gly Ser Pro Ile Thr Leu Glu Gly Glu Asp Leu Phe Ala Arg
 130 135 140

Met Leu Gln His Glu Thr Gly His Leu Asp Gly Phe Leu Tyr Leu Asp 30
 145 150 155 160

Arg Leu Val Gly Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Lys Lys Ala Val Lys Arg
 165 170 175

Asn Gly Trp Gly Gly Val Pro Gly Leu Ser Trp Met Pro Gly Glu Val
 180 185 190 40

Pro Asp Pro Phe Gly His
 195

<210> 10

<211> 197

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 10

Met Thr Val Val Pro Ile Arg Ile Val Gly Asp Pro Val Leu His Thr
 1 5 10 15

Ala Thr Thr Pro Val Thr Val Ala Ala Asp Gly Ser Leu Pro Ala Asp
 20 25 30

Leu Ala Gln Leu Ile Ala Thr Met Tyr Asp Thr Met Asp Ala Ala Asn
 35 40 45

Gly Val Gly Leu Ala Ala Asn Gln Ile Gly Cys Ser Leu Arg Leu Phe
 50 55 60

Val Tyr Asp Cys Ala Ala Asp Arg Ala Met Thr Ala Arg Arg Arg Gly
 65 70 75 80

Val Val Ile Asn Pro Val Leu Glu Thr Ser Glu Ile Pro Glu Thr Met
 85 90 95

Pro Asp Pro Asp Thr Asp Asp Glu Gly Cys Leu Ser Val Pro Gly Glu
 100 105 110

Ser Phe Pro Thr Gly Arg Ala Lys Trp Ala Arg Val Thr Gly Leu Asp
 115 120 125

Ala Asp Gly Ser Pro Val Ser Ile Glu Gly Thr Gly Leu Phe Ala Arg
 130 135 140

Met Leu Gln His Glu Thr Gly His Leu Asp Gly Phe Leu Tyr Leu Asp
 145 150 155 160

Arg Leu Ile Gly Arg Tyr Ala Arg Asn Ala Lys Arg Ala Val Lys Ser
 165 170 175

His Gly Trp Gly Val Pro Gly Leu Ser Trp Leu Pro Gly Glu Asp Pro
 180 185 190

10

20

30

40

50

Asp Pro Phe Gly His
195

<210> 11

<211> 197

<212> PRT

<213> Mycobacterium avium

<400> 11

10

Met Ala Val Val Pro Ile Arg Ile Val Gly Asp Pro Val Leu His Thr
1 5 10 15

Pro Thr Gln Pro Val Pro Val Gly Asp Asp Gly Ser Leu Pro Ala Asp
20 25 30

Leu Gly Lys Leu Ile Ala Asp Met Tyr Asp Thr Met Asp Ala Ala His
35 40 45

20

Gly Val Gly Leu Ala Ala Asn Gln Ile Gly Val Gly Leu Arg Val Phe
50 55 60

Val Tyr Asp Cys Ala Asp Asp Arg Gly Leu Thr Glu Arg Arg Arg Gly
65 70 75 80

30

Val Val Val Asn Pro Val Leu Glu Thr Ser Glu Ile Pro Glu Thr Met
85 90 95

Pro Asp Pro Asp Thr Asp Asp Glu Gly Cys Leu Ser Val Pro Gly Glu
100 105 110

Ser Phe Pro Thr Gly Arg Ala Ser Trp Ala Arg Val Thr Gly Leu Asp
115 120 125

40

Ala Asp Gly Asn Pro Val Ser Ile Glu Gly His Gly Leu Phe Ala Arg
130 135 140

Met Leu Gln His Glu Thr Gly His Leu Asp Gly Phe Leu Tyr Leu Asp
145 150 155 160

50

Arg Leu Ile Gly Arg Tyr Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Val Lys Ser
 165 170 175

His Asn Trp Gly Val Pro Gly Leu Ser Trp Met Pro Gly Glu Gly Pro
 180 185 190

Asp Pro Phe Gly His 10
 195

<210> 12

<211> 197

<212> PRT

<213> Mycobacterium leprae

<400> 12

20

Met Ala Ile Ala Pro Ile Arg Ile Val Gly Asp Pro Val Leu His Thr
 1 5 10 15

Pro Thr Ala Pro Val Gln Val Ala Ala Asp Gly Ser Leu Pro Ala Asn
 20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ile Ser Thr Met Tyr Asp Thr Met Asp Ala Ala His
 35 40 45 30

Gly Val Gly Leu Ala Ala Asn Gln Ile Gly Tyr Gly Leu Arg Val Phe
 50 55 60

Val Tyr Asp Cys Ala Glu Asp Cys Arg Gln Thr Ala Arg Arg Arg Gly
 65 70 75 80

40

Val Val Ile Asn Pro Ile Leu Glu Thr Ser Glu Ile Pro Glu Thr Met
 85 90 95

Pro Asp Pro Asp Thr Asp Asn Glu Gly Cys Leu Ser Val Pro Gly Glu
 100 105 110

Ser Phe Pro Ile Gly Arg Ala Gln Trp Ala Arg Val Thr Gly Leu Asp
 115 120 125 50

Ala Asp Gly Asn Pro Val Thr Thr Glu Gly Thr Gly Leu Phe Ala Arg
130 135 140

Met Leu Gln His Glu Thr Gly His Leu Asp Gly Phe Leu Tyr Leu Asp
145 150 155 160

Tyr Leu Ile Gly Arg His Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ile Lys Ser
165 170 175

Arg His Trp Gly Val Pro Gly Leu Ser Trp Met Pro Gly Glu Val Pro
180 185 190

Asp Pro Phe Gly Pro
195

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Mycobacterial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaaは自然界において生じる任意のアミノ酸であってよい

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaaは自然界において生じる任意のアミノ酸であってよい

<400> 13

Xaa Thr Xaa Arg Arg Arg Gly Val Val Ile Asn Pro
1 5 10

10

20

30

40

50

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> 配列番号 2 1 中のヒト結核菌デホルミラーゼ遺伝子配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> ヒト結核菌デホルミラーゼ遺伝子配列に対する 5' - 3' アンチセンスオリゴヌクレオチド

<400> 14

gataccaca ccgcgtcggc gggcggcat

30

20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ヒト結核菌由来ゲノム DNA 5' - 3' デホルミラーゼオープンリーディングフレーム (594bp)

30

<400> 15

catatggcag tggtagcc

18

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ヒト結核菌由来ゲノム DNA 5' - 3' デホルミラーゼオープンリーディングフレーム (594bp)

40

<400> 16

ccattagtga ccgaacggg

19

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

50

<213> Artificial

<220>

<223> ヒト結核菌デホルミラーゼポリペプチドのアミノ酸74～85を欠失しているデホルミラーゼタンパク質の変異のための外部プライマー

<400> 17

ggaattccat atggcagtcg taccc

25

10

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ヒト結核菌デホルミラーゼポリペプチドのアミノ酸74～85を欠失しているデホルミラーゼタンパク質の変異のための外部プライマー

<400> 18

cccaagcttt tagtgaccga acgg

24

20

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ヒト結核菌デホルミラーゼポリペプチドのアミノ酸74～85を欠失しているデホルミラーゼタンパク質の変異のための内部プライマー

30

<400> 19

gcggaccgcg cagtgttga gacctc

26

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> ヒト結核菌デホルミラーゼポリペプチドのアミノ酸74～85を欠失しているデホルミラーゼタンパク質の変異のための内部プライマー

<400> 20

gaggtctcaa gcactgcgcg gtccg

25

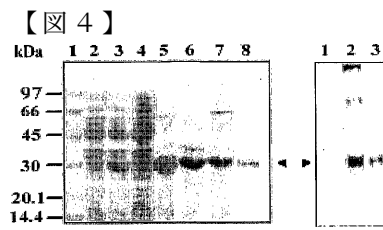


FIG. 4

大腸菌 ----MSVLQVLHIPDERLRKVAKPVEEVN----AEIQRIVDDMFETMY-----
AIE
ヒト結核菌 ---MAVVPIRIVGDPVLHTATTPVTVAADGSLPADLAQI.IATMYDTMD-----
AAN
黄色ブドウ球菌 ---
MLTMKDIIRDGHPTLRQAAELELPLTKEEKETLIAMREFLVNSQDEEIAKRYGLRS

 : :: : . * : : : : : : ::

モチーフ 1 IR モチーフ 2

* : * * * * * : . * : . . : : : * * :

* * * * *

大腸菌 I PF-
QRALVPRAEKVKIRALDRDGKPFELIADGLLAICTQHMDHLVGKLFMDYLSPLKQ
ヒト結核菌 VPG-
ESFPTGRAKWARVTGLDADGSPVSIEGTGLFARMLQHETGHLDGFLYLDRILIGRYA
黄色ブドウ球菌
VDDNVAGI,VHRHNRITIKAKDIEGNDIQLRLKGYPALVFQHEIDHLNGVMFYDHIIDKNHP
モチーフ 3

大腸菌 QRIRQKVEKLDRLKARA-----
 ヒト結核菌 RNAKRAVKSHGWGVPGLSWLPGEDPDPFGH
 黄色ブドウ球菌 LQPHTDAVEV-----
 TR

ヒト結核菌 MAWVPIRIVGDPVLHTATTPVIVAADGSLPADLAQLIATMYDTHDAANGVGLAANQIGCS
ウシ結核菌 MTWVPIRIVGDPVLHTATTPVIVAADGSLPADLAQLIATMYDTHDAANGVGLAANQIGCS
らい菌 MAIAPIRIVGDPVLHTPTAPVCVAADGSLPANLNGLISTMYDTHDAANGVGLAANQIGVG
トリ結核菌 MAWVPIRIVGDPVLHTPTQPVFVGDDGSLPADLGKLIADMYDTHDAANGVGLAANQIGVG
スメグマ菌 MAWVPIRIVGDPVLHTPTEPVFVGPDGSLPDDLPAIQDHFDTHDAANGVGLAANQIGVA
,,*****,**,* **,*,*****;*,**,*;*****;*****=***,

[illegible]

ヒト結核菌 LRLFWYDCAADRAHTARRRGVWNPVLETSEIPETMPDPDTPDEGCLSVPGESFPTGRAK
ウシ結核菌 LRLFWYDCAADRAHTARRRGVWNPVLETSEIPETMPDPDTPDEGCLSVPGESFPTGRAK
らい菌 LRVFVYDCAEDCRQTARRRGVWNPVILETSEIPETMPDPDTPMEGCLSVPGESFPIGRAQ
トリ結核菌 LRVFVYDCAADDRGLTERRRGVWNPVILETSEIPETMPDPDTPDEGCLSVPGESFPTGRAS
スメグマ菌 KRLFWYDCAPTRGQTTARRRGVWNPVLETSEVPETMPDPDEDEEGCLSVPGENFPTGRAD

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 84

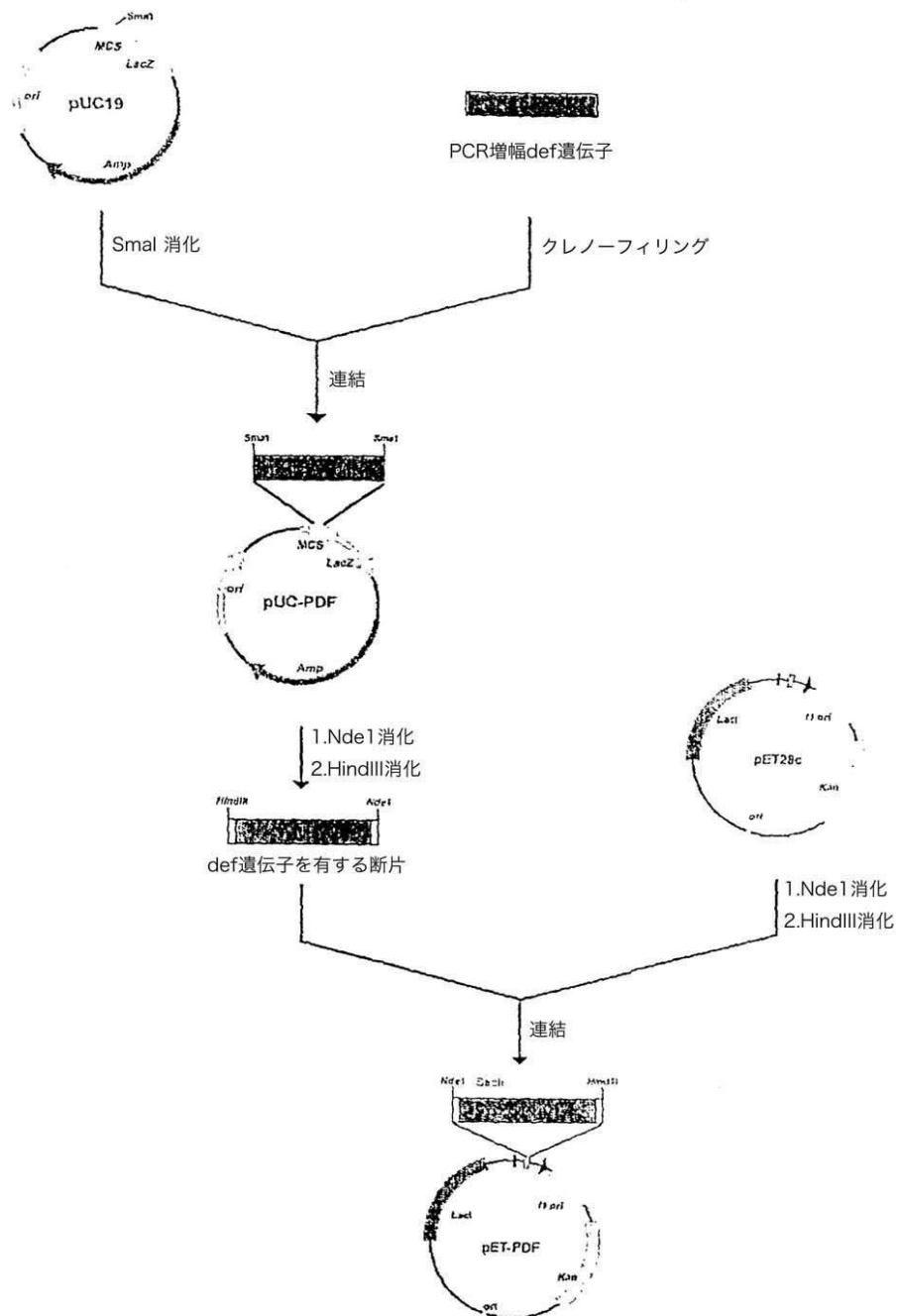
ヒト結核菌 MARVTGLDADGSPVSI EGTGLFARMLQHETGHLDGFLYLDRLIGRYARNAKRAVISHGMG
ウシ結核菌 MARVTGLDADGSPVSI EGTGLFARMLQHETGHLDGFLYLDRLIGRYARNAKRAVISHGMG
らい菌 MARVTGLDADGNPVTTEGTGLFARMLQHETGHLDGFLYLDVLI GRHAPS AKRAIKSRHMG
トリ結核菌 MARVTGLDADGNPVSI EGHGLFARMLQHETGHLDGFLYLDRLIGRYAPS AKRAVISHNMG
スメグマ菌 MARVTGLDADGSPITLEGEDLFARMLQHETGHLDGFLYLDRLVGRYARA AKKAVKNGMG

$$\frac{1}{x^2} = x^{-2}, \quad \frac{d}{dx} x^{-2} = -2x^{-3} = -\frac{2}{x^3}$$

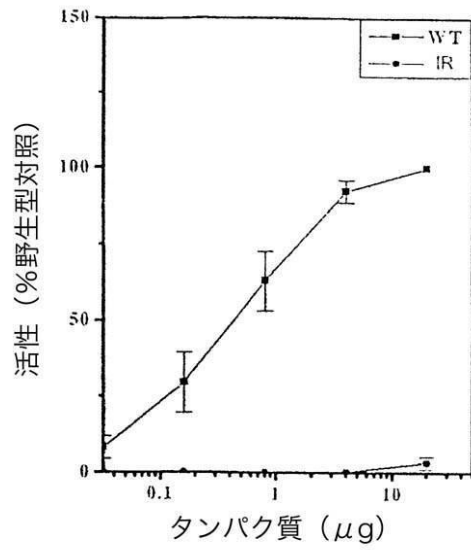
| | |
|-------|--------------------|
| ヒト結核菌 | VPGLSNLPGEDPDPFGH |
| ウシ結核菌 | VPGLSNLPGEDPDPFGH |
| らい菌 | VPGLSNMPGEVDPDPFGP |
| トリ結核菌 | VPGLSNMPGEGDPDPFGH |
| スメグマ菌 | VPGLSNMPGEVDPDPFGH |

[illegible]

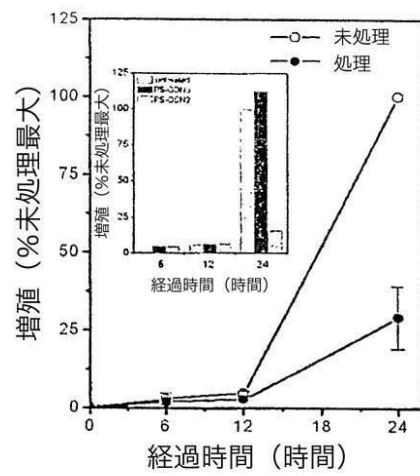
【図 3】



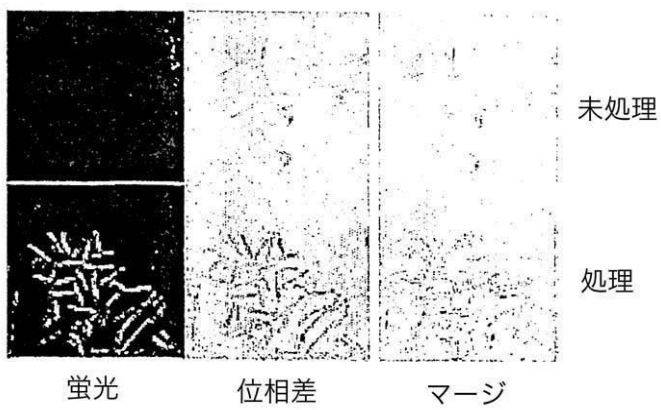
【図 5】



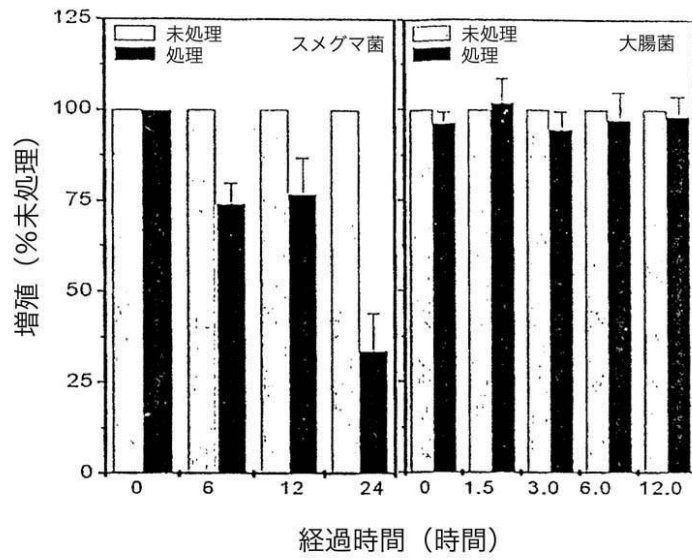
【図 6 A】



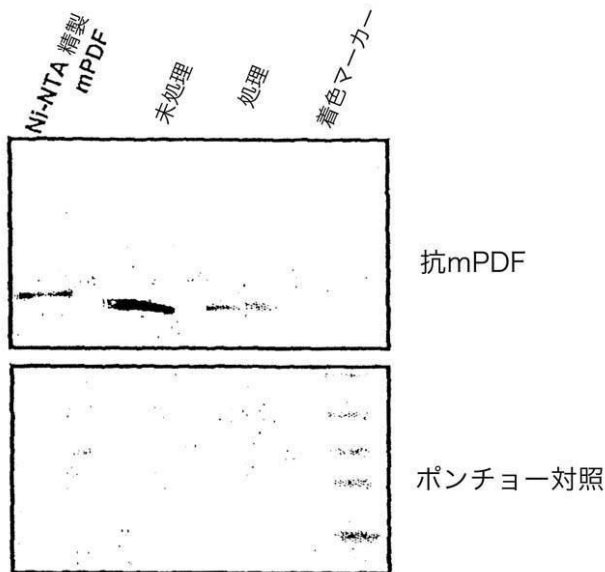
【図 6 B】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

[0005203366000001.xml](#)

フロントページの続き

(74)代理人 100097870

弁理士 梶原 斎子

(74)代理人 100140556

弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719

弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258

弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969

弁理士 井上 洋一

(72)発明者 サクセーナ、ラーフル

インド国、パンジャブ、チャンディーガル、セクター 39エイ、 インスティテュート オブ
ミクロバイアル テクノロジー

(72)発明者 チャクラボーティ、プラディップ、クマール

インド国、パンジャブ、チャンディーガル、セクター 39エイ、 インスティテュート オブ
ミクロバイアル テクノロジー

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第2005/026133 (WO, A1)

国際公開第2005/092872 (WO, A1)

J. Bacteriology, 2005年, vol.187, p.8216-20

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004年, vol.53, p.403-5

Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 2002年
, vol.102, p.479, U-17

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

BIOSIS(DIALOG)