(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-516615
(P2005-516615A)
(43)公表日　平成17年6月9日(2005.6.9)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	A	4B024
C12Q 1/02	C12Q 1/02		4B063
G01N 33/53	G01N 33/53	M	
G01N 33/569	G01N 33/569	F	
//(C12Q 1/02	C12Q 1/02		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 14 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-566189(P2003-566189)
(86)(22)出願日　平成14年2月8日(2002.2.8)
(85)翻訳文提出日　平成15年6月16日(2003.6.16)
(86)国際出願番号　PCT/IN2002/000022
(87)国際公開番号　WO2003/066838
(87)国際公開日　平成15年8月14日(2003.8.14)
(81)指定国　EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),GB,JP,RU,US

(71)出願人　503216904
ザ　ディレクター、オール　インディア　インスチチュート　オブ　メディカル　サイエンス
インド国、ニューデリー、アンサリ　ナガル
(71)出願人　304064850
ザ　セクレタリィ、ディパートメント　オブ　バイオテクノロジィ　オブ　ビー－２
インド国、ニューデリー、ロディ　ロード、シージーオー　コンプレックス、フロアー　７－８
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
最終頁に続く

(54)【発明の名称】結核の治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法

(57)【要約】
結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法であって：
（１）プラスミドｐＪＴ５３．３４の約３，３kbのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄIII挿入部に存在するｄｅｖＲ遺伝子を破壊し、
（２）該破壊されたｄｅｖＲ遺伝子からｐＪＱ２００ＳｋｄｅｖＲ::ｋａｎを構築し、
（３）該プラスミドを結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖに導入し、
（４）カナマイシンを含有するミドルブルック７Ｈ１０寒天プレート上で、プラスミドの組み込みを示す単一の交差形質転換体を選択し、
（５）該交差形質転換を、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、ｄｅｖＲ、Km^Rおよびショ糖耐性（ＳａｃＢ）遺伝子配列の存在について解析し、
（６）該遺伝子配列を、ｄｅｖＲプローブ、ｄｅｖＳプローブ、カナマイシン耐性遺伝子プローブを用いてサザン解析の工程に付して、野生型及びｄｅｖＲ遺伝子座の破壊されたコピーを含む結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを特定し、
（７）カナマイシンとショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ９培地中で結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを増殖させ、
（８）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲ株を、カナマイシンとショ糖を含有する７Ｈ１０培地を有する複数のプレートに入れて、カナマイシン耐性形質転換体を得、
（９）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲを、サザンハイブリダイゼーショ

【特許請求の範囲】
【請求項１】
結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法であって、
（１）プラスミドｐＪＴ５３．３４の約３，３kbのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ挿入部に存在するｄｅｖＲ遺伝子（Ｒｖ３１３３ｃ）を破壊し、
（２）該破壊されたｄｅｖＲ遺伝子からｐＪＱ２００ＳｋｄｅｖＲ::ｋａｎを構築し、
（３）該プラスミドを、結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖに導入し、
（４）カナマイシンを含有するミドルブルック７Ｈ１０寒天プレート上で、プラスミドの組み込みを示す単一の交差形質転換体を選択し、
（５）該交差形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、ｄｅｖＲ、Km^Rおよびショ糖耐性（ＳａｃＢ）遺伝子配列の存在について解析し、
（６）該遺伝子配列を、ｄｅｖＲプローブ、ｄｅｖＳプローブ、カナマイシン耐性遺伝子プローブを用いて、サザン解析の工程に付して、野生型及びｄｅｖＲ遺伝子座の破壊されたコピーを含む結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを特定し、
（７）カナマイシンとショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ９培地中で、結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを増殖させ、
（８）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲ株を、カナマイシンとショ糖を含有する７Ｈ１０培地を有する複数のプレートに付して、カナマイシン耐性形質転換体を得ることにより、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異株を得、
（９）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲを、サザンハイブリダイゼーションに付し、次いでポリメラーゼ連鎖反応法により、該対立遺伝子交換を確認し、
（１０）該形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応工程に付して、ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を解析し、
（１１）該ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を、ウェスタンブロッティング法と免疫電子顕微鏡法の工程に付して、該遺伝子の機能破壊を確認し、
（１２）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関して、酸素制限条件下で結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株の生存力を評価し、
（１３）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関して、好気的な酸素制限条件下で該結核菌（M. tuberculosis）株ｄｅｖＲの生存力を評価し、
（１４）該増殖した株を逆転写ＰＣＲ解析の工程に付して、Ｒｖ３１３４ｃ－ｄｅｖＲ－ｄｅＳオペロンから転写体を得、
（１５）該転写体を、ウルトラバイオレット（Ultra-Violet）社製ゲル記録システムを使用してスキャンし、更に、これを、コンピューターソフトウェアを使用してデンシトメーター解析の工程に付し、
（１６）（ａ）結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異株と野生型株で感染したモルモットからの、感染臓器（肺と肝臓）の組織病理的解析、および（ｂ）感染した動物の脾臓からの結核菌（M. tuberculosis）の回収と細菌量の定量を含む試験により、モルモットでの病原性について結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株を試験する、ことを含んでなる上記方法。
【請求項２】
前記ｄｅｖＲ対立遺伝子が、唯一のＰｐｕＭＩ部位でカナマイシン耐性遺伝子で破壊される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記培地は、カナマイシンとショ糖とを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記ウェスタンブロッティング法と前記免疫電子顕微鏡法の工程は、従来法で行われる、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記ｄｅｖＲ対立遺伝子は、ＡｐａＩ　ＢａｍＨＩ断片として切り取られ、プラスミドｐ

ＪＱ２００Ｓｋの対応する部位にクローン化されて、ｐＪＱ２００ＳｋｄｅｖＲ::ｋａｎを構築する、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記プラスミドは、電気穿孔法により結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖに導入される、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法に関する。特に本発明は、低酸素におけるマイコバクテリウムの持続的生在との特定の関連において、抗結核薬を含む治療法を開発するための新しい新規標的の同定方法に関する。
【０００２】
結核は、世界中で毎年３百万人以上の死亡を引き起こしている単一の感染性病原体による主要な死亡原因である。１９９８年、インドでの結核菌の症例による推定患者数は２，０７８，０７６であり、そのうち９３５，１３５症例は、感染によると見込まれている。感染の経過は、病原体と宿主免疫防御の間の連続的な相互作用の結果として明確に表われる。多くの例において、感染した個体は、有効な免疫応答を開始し、ついには感染巣の周りに肉芽腫を形成し、疾患の進行を停止する。肉芽腫内の環境は、低酸素であると予測される。臨床試験は、これらの肉芽腫内で結核菌が死滅せず、休止状態にあることを示唆している。これは、潜伏感染と呼ばれている。潜伏感染の約１０％は、再び活動性となり、感染開始の数ヶ月～数年後に活動性の感染症に至る。
【０００３】
潜伏感染者の数の多さは、結核の発生数の減少と結核菌（M. tuberculosis）伝染率の低下に対する主な障害となっている。潜伏感染と疾病の間における結核菌（M. tuberculosis）の適応は、おそらく宿主組織内の特定の生理学的および環境的条件により調節される正確な遺伝経路により行われている。
【０００４】
結核の予防、抑制および治療のための新規かつより指向性の方法を工夫するため、これらの経路を理解する必要に迫られている。従来の薬剤は、細菌の増殖と分裂（例えば、細胞壁生合成とＤＮＡ複製）に必要な経路を標的としている。増殖が遅いかまたは増殖していない細菌に対して、従来の薬剤の活性が低いことが、現在の治療法が感染を撲滅するのに長期間を要する重要な理由であると考えられる。
【０００５】
註釈の結核菌（M. tuberculosis）ゲノムで、それぞれ、Ｒｖ３１３３ｃとＲｖ３１３２ｃとして示されているようなｄｅｖＲ－ｄｅｖＳ遺伝子は、それぞれ、応答レギュレーターＤｅｖＲ及びヒスチジンキナーゼセンサーＤｅｖＳをコードすると予測される。この遺伝子系は、結核菌（M. tuberculosis）の病原性株と非病原性株のＲＮＡを使用して、差し引きハイブリダイゼーションにより我々の実験室ですでに同定されたものである（参照文献１）。本明細書において我々は、低酸素におけるマイコバクテリウムの持続的生存との特定の関連において、抗結核薬を含む治療法を開発するために、新しい新規標的としてこの系を同定する方法を記載する。
【０００６】
従って、本発明の目的は、患者の疾病の再発／再活性化の原因である標的、即ち、微生物が低酸素に適応することを可能にする標的を、同定することにある。
【０００７】
本発明の他の目的は、疾病の再発／再活性化の原因である標的、即ち、微生物が低酸素に適応することを可能にする標的を同定し、治療法と抗結核薬を開発することにある。
【０００８】
本発明によれば、結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法であって、

（１）プラスミドｐＪＴ５３．３４の約３，３kbのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ挿入部に存在するｄｅｖＲ遺伝子（Ｒｖ３１３３ｃ）を、カナマイシン耐性（ＫｍＲ）カセットで破壊し、
（２）該破壊されたｄｅｖＲ遺伝子からｐＪＱ２００ＳｋｄｅｖＲ::ｋａｎを構築し、
（３）電気穿孔法により、該プラスミドを結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖに導入し、
（４）２０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するミドルブルック７Ｈ１０寒天プレート上で、プラスミドの組み込みを示す単一の交差形質転換体を選択し、
（５）該交差形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、ｄｅｖＲ、Km^Rおよびショ糖耐性（ＳａｃＢ）遺伝子配列の存在について解析し、
（６）該遺伝子配列を、ｄｅｖＲプローブ、ｄｅｖＳプローブ、カナマイシン耐性遺伝子プローブを用いてサザン解析の工程に付して、野生型、及びｄｅｖＲ遺伝子座の破壊されたコピーを含む結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを特定し、
（７）２０μｇ／ｍｌのカナマイシンと２％ショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ９培地中で結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを増殖させ、
（８）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲ株を、２０μｇ／ｍｌのカナマイシンと２％ショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ１０培地を有する複数のプレートに付して、カナマイシン耐性形質転換体を得、
（９）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲを、サザンハイブリダイゼーションに付し、次いでポリメラーゼ連鎖反応法により、該対立遺伝子交換を確認し、
（１０）該形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応工程に付して、ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を解析し、
（１１）該ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を、ウェスタンブロッティング法と免疫電子顕微鏡法の工程に付して、該遺伝子の機能破壊を確認し、
（１２）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関し、酸素制限条件下で結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株の生存力を評価し、
（１３）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関し、好気的な酸素制限条件下で、該結核菌（M. tuberculosis）株ｄｅｖＲ変異株の生存力を評価し、
（１４）該増殖した株を逆転写ＰＣＲ解析の工程に付して、Ｒｖ３１３４ｃ－ｄｅｖＲ－ｄｅＳオペロンから、転写体を得、
（１５）該転写体を、ウルトラバイオレット（Ultra-Violet）製品ゲル記録システムを使用してスキャンし、更に、これを、コンピューターソフトウェアを使用してデンシトメーター解析の工程に付し、
（１６）モルモットでの病原性について結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株を試験する、ことを含んでなる上記方法が提供される。

【０００９】
結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法を、添付の図面を参照して詳細に説明する。

【００１０】
図１は、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異株のコンストラクションを示し、ａ）は、組換え結核菌（M. tuberculosis）株のサザンハイブリダイゼーション解析結果を示し、ｂ）は、典型的ｄｅｖＲ変異体クローンのＰＣＲ解析結果を示す。

【００１１】
図２ａ）は、ｄｅｖＲ変異体結核菌（M. tuberculosis）のウェスタンブロット解析結果を示し、図２ｂ）は、ｄｅｖＲ変異体結核菌（M. tuberculosis）の免疫電子顕微鏡の解析結果を示し、図２ｃ）は、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異体とＨ３７Ｒｖ株のインビトロ形態解析結果を示す。

【００１２】
図３は、結核菌（M. tuberculosis）の野生型株と変異株のＲｖ３１３４ｃ－ｄｅｖＲ－ｄｅｖＳオペロンの発現解析結果を示す。

【００１３】
図４は、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異体とＨ３７Ｒｖ株で感染したモルモットの肝臓および肺肉芽腫の特徴を示す。
【００１４】
本発明の方法により、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ遺伝子は、標準的方法を使用する対立遺伝子交換により破壊される。簡単に説明すると、プラスミドｐＪＴ５３．３４の約３．３kbのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄIII挿入体中に位置するｄｅｖＲ遺伝子を、唯一のＰｐｕＭＩ部位でカナマイシン耐性（Ｋｍ^{R}）遺伝子で破壊する。破壊したｄｅｖＲ対立遺伝子を、ＡｐａＩ－ＢａｍＨＩ断片として切り取り、プラスミドｐＪＱ２００ＳＫの対応する部位にクローン化し、ｐＪＱ２００ＳｋｄｅｖＲ::ｋａｎを構築する。このプラスミドを、電気穿孔法により結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖ中に導入する。プラスミドの組み込みを示す単一の交差形質転換体を、２０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するミドルブルック７Ｈ１０寒天プレート上で選択し、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、ｄｅｖＲ、Ｋｍ^{R}およびショ糖（ＳａｃＢ）遺伝子配列の存在について解析する。２５個のＫｍ^{R}コロニーを解析し、６個のみがＫｍ^{R}についてＰＣＲにより陽性であり、高頻度で自然発生によるＫｍ^{R}（～７５％）を示している。すべての６個のコロニーは、ｓａｃＢ　ＰＣＲについて陽性であり、Ｋｍ^{R}コロニーの生成に単一の交差が関与していることを示している。（６個のうち）３個は、ＰＣＲにより野生型ｄｅｖＲ（５１３bp）とｄｅｖＲ::ｋａｎ生成物（１．８kb）について陽性であり、プラスミド由来のｄｅｖＲ::ｋａｎコピーの結核菌（M. tuberculosis）の染色体への組み込みが起きたことを示唆している。Ｋｍ^{R}遺伝子特異的プライマーとともに染色体隣接部プライマーを使用するＰＣＲにより、１つのクローン中のｄｅｖＲまたはｄｅｖＳ遺伝子座の近くで、プラスミド組み込みの起きたことが示唆された。親株で得られた３．８kbの単一のハイブリダイゼーションシグナルとは対照的に、ｄｅｖＲプローブを用いるサザンハイブリダイゼーションにより、３．８kbと約９．５kbの２つのシグナルが得られる。ｄｅｖＳ遺伝子をプローブとして使用して、同一の結果が得られる（図１Ａ）。Ｋｍ^{R}遺伝子プローブを用いるハイブリダイゼーションは、ｄｅｖＲまたはｄｅｖＳ遺伝子座において、Ｋｍ^{R}遺伝子の左への、単一の交差組換えにより生じる約９．５kbのベクター骨格含有断片を際立たせた。ｄｅｖＲ遺伝子座の野生型と破壊されたコピーを含有する部分２倍体株を、結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲと呼ぶ（図１Ａ）。
【００１５】
カナマイシン（２０μｇ／ｍｌ）と２％ショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ９培地中で７日間、結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを増殖させることにより、第２の工程において、対立遺伝子交換が選択される。一連の希釈液は、カナマイシン（２０μｇ／ｍｌ）と２％ショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ１０倍地上で培養される。全部で８７のＫｍ^{R}とショ糖耐性（Ｓｕｃ^{R}）形質転換体が得られ、これらのうち３１は、ＰＣＲで野生型ｄｅｖＲ遺伝子について陰性であり、１８は、ＰＣＲでｄｅｖＲ::ｋａｎ破壊遺伝子について陽性である。ショ糖耐性は、ｓａｃＢ遺伝子が、分離の結果として失われる（６４％）か、或いは変異が蓄積して機能が失われる（３６％）という２つの事象のうちの１つから起きた。対立遺伝子交換は、サザンハイブリダイゼーションにより確認される。簡単に説明すると、１６（１８のうち）のＫｍ^{R}－Ｓｕｃ^{R}形質転換体を、ｄｅｖＲおよびｄｅｖＳ遺伝子プローブを用いて探査する。１５のコロニーで２重交差が起きて、野生型ｄｅｖＲ遺伝子（３．８kbのシグナル）ではなく、ｄｅｖＲ::ｋａｎコピー（５．１kbのハイブリダイゼーションシグナル）の存在が導かれ、変異体は、ｄｅｖＲ遺伝子座中に挿入されたＫｍ^{R}カセットに対応して１．３ｋｂサイズが増大していた。Ｋｍ^{R}遺伝子プローブとのハイブリダイゼーションは、染色体上のＫｍ^{R}カセット破壊されたｄｅｖＲ遺伝子コピーの保持を確認した。ｓａｃＢプローブとのハイブリダイゼーションが無いことは、この遺伝子が、縦列複製の分離中に失われることを立証した（示していない）。典型的クローンを図１Ａに示す。１つのｄｅｖＲノックアウトクローンを、さらなる解析のために、ランダムに選択する。遺伝子置換も、ＰＣＲにより確認される（図１Ｂ）。

【００１６】
変異体中のｄｅｖＲ遺伝子の機能破壊は、標準的方法を使用してウェスタンブロッティング法と免疫電子顕微鏡により確認される。結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖ、ｄｅｖＲ変異体および大腸菌（E. coli）の対数増殖期培養物の超音波処理物を、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、タンパク質をニトロセルロース膜に移し、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲタンパク質に対してウサギで作成した１；１，０００希釈したポリクローナル抗ＤｅｖＲ抗体で探査した。免疫活性は、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合性ロバ抗ウサギ免疫グロブリンＧと３，３’－ジアミノベンジジン基質を使用して、評価する。ＤｅｖＲタンパク質は、ＤｅｖＲタンパク質を過剰発現している結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖと組換え大腸菌（E. coli）中で視覚化されるが、変異株中では見られない（図２Ａ）。免疫電子顕微鏡により、ＤｅｖＲ標識は、野生型微生物の表面上と細胞質ゾル中で起きた（桿菌当たり２５±２．４の金粒、図２Ｂ）が、変異株中では起きなかった（桿菌当たり２±０．８８の金粒、図２Ｂ）。

【００１７】
変異体と親菌の形態は、走査電子顕微鏡により比較される。野生型菌（平均２～４μｍ、図２Ｃ）と比較して、対数増殖期の変異体（平均４～６μｍ）は長い。１０％アルブミン－デキストロースと０．０５％ツイーン８０を含有する７Ｈ９中で、好気的条件下で３つずつ培養したｄｅｖＲ変異体と親株の増殖曲線を、比較する。平均A_{590}は、野生型培養物では１日目の０．０５４から２８日目の１．４１まで上昇し、変異体培養物では０．０４８から１．９まで上昇した。各時点での変異体と親株とのA_{590}の差は、統計的に有意なものではなく（ウィルコキソン順位和検定）、ｄｅｖＲ変異は、好気的条件下での結核菌（M. tuberculosis）の増殖に大きな影響を与えなかったことを示唆する。

【００１８】
結核菌（M. tuberculosis）中で転写されることがすでに証明された結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子の発現に及ぼす酸素制限の影響を評価した。培養物がヅボス（Dubos）ツイーンアルブミン中で攪拌無しでゆっくり増殖した休止期の結核菌（M. tuberculosis）のインビトロモデルは、低酸素濃度が増殖を制限する培養容器の底を用いて使用した。約３０日後、細菌は静止期／非複製増殖期に入った。この期間中、野生型微生物は、１８倍増殖した。野生型微生物は、生存能力の検出可能な喪失することなく、ゆるやかに酸素枯渇に適応した。変異体細菌は、３０日間わたって、わずかに約５倍増殖したのみである。実験の最後に変異株の生存能力は、親株の約２５％である。結核菌（M. tuberculosis）親株と変異株の好気的攪拌培養物は、同時に対数期（A_{590}約０．４）まで増殖される。Rneasyミニキット（Qiagen、ドイツ）を使用して、対数期の３０日および４０日非攪拌培養物からＲＮＡを単離し、Ｒｖ３１３４ｃ－ｄｅｖＲ－ｄｅｖＳオペロン（Ｒｖ３１３４ｃはこのオペロン中の最初の遺伝子である）に由来する転写体について、逆転写ＰＣＲを行う。ＵＶＰゲル記録システムを使用してゲルをスキャンし、Labworks（登録商標）解析ソフトウェアUltra-Violet社製、アメリカ合衆国）を使用して、デンシトメーター解析を行う。低酸素条件下では、野生型培養物中のｄｅｖＲ、ｄｅｖＳおよびＲｖ３１３４ｃ遺伝子の発現は、約３～約４倍高められる。変異株でも当該上方調整が観察されるが、Ｒｖ３１３４ｃとｄｅｖＳ遺伝子発現の基礎レベルは、野生型株で観察されたものより約２．５倍低い。予測されるように、野生型ｄｅｖＲ遺伝子からの転写は、変異株では検出されない（図３）。Km^Rカセット（ｄｅｖＲ遺伝子内）の発現もまた、同様の条件下で上方調整される（データは示していない）ため、変異株中のｄｅｖＳ遺伝子の発現とその上方調整は、上流に発生する転写のためであると考えられる。

【００１９】
治療法と抗結核薬の開発に使用するための新規標的の同定方法を、本明細書に詳細に記載する。

【００２０】
モルモットでのインビボ増殖と疾病を引き起こす能力に関するｄｅｖＲ変異の影響を、以下のように評価する。ランダムに飼育したアルビノのモルモット（各群５匹）に、０．１

ｍｌのリン酸緩衝化生理食塩水中の生存活性のある菌（結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖ×１０^{6}CFUおよびｄｅｖＲ変異体３．２×１０^{7}CFU）を、皮下注射する。感染後４７日目に、モルモットを屠殺する。屠殺日の前に結核以外で死んだ１匹（Ｈ３７Ｒｖ群）は、解析からはずしている。内臓中の目に見える結核の量を、以下のようにして屠殺直後に評価した。結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖで感染したモルモットで、肺、肝臓、脾臓およびリンパ節の深い関与が見られる。視覚スコアは、親株および変異株で感染したモルモットについて、それぞれ４３～９３（平均７７）および２３～４８（平均３８．４）であり、差は有意である（ｐ＜０．０５、表１）。肝臓は、最も影響を受けた臓器であり、無数の大きな結核結節が多く侵襲しており、親株で感染したモルモットでは壊死の領域が見られる。脾臓と肺は、無数の小さな結核結節の中程度の侵襲を示した。変異株で感染したモルモットの臓器では、見られる病変の数はかなり少ない（表１）。脾臓をホモジナイズし、連続希釈物をＬＪ斜面培地に塗沫した。親株で感染した動物の脾臓から全部で７．０９±０．８３ log10 cfuが単離され、変異株で感染した動物の脾臓から４．４±１．２１ log10 cfuが単離され、差は有意である（ｐ＜０．０５、表１）。

【００２１】

肝臓と肺の剖検試料から連続する５μｍ四方の切片について、既に記載したように組織学的特徴（臓器の構造、切片中の肉芽腫により占められた領域の割合、肉芽腫内の主要な細胞成分の割合）の半定量的評価を行った。変異株で感染した５匹のモルモットのうち３匹からの肝臓切片は、通常の構造を有し、肉芽腫や炎症性細胞浸潤物の存在は示さない。変異株で感染した残りの２匹の動物では、小さく、正しく組織化された、非壊死性の上皮様細胞肉芽腫が観察される。親株で感染したすべての４匹のモルモットからの肝臓切片は、上皮様細胞とリンパ球とからなる十分に形成された肉芽腫の存在を示した。他の型の細胞は存在しない。ある動物では、肉芽腫は広範（６５％）であり、臓器構造の部分的破壊を伴う（図４）。肝臓と比較すると、肺の方が、はるかに広範な破壊を伴うことに気付く。変異株で感染したすべてのモルモットの肺の構造は、正常である。すべての動物は肉芽腫の存在を示したが、これは非常に小さく、リンパ球とマクロファージとからなっていた。巨細胞および他の細胞または壊死は、どの肺でも見られない。親株で感染した動物では、１匹のモルモットからの肺は、完全に破壊され、残りの３匹では部分的に傷害されている。肉芽腫は、４０％～８５％の範囲であり、大部分がリンパ球性のものから多くが組織球性のものまであった（図４）。

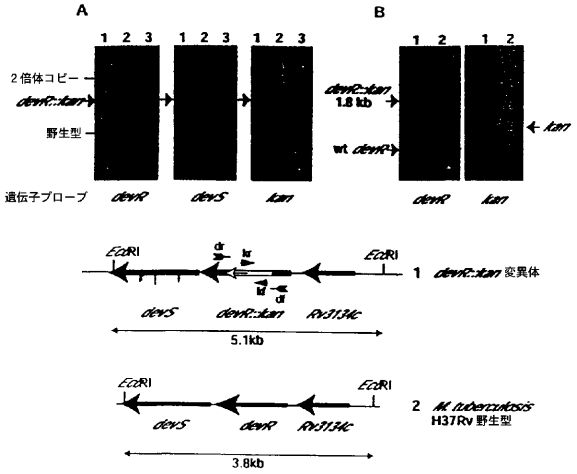
【００２２】

感染後７週目に、親株で感染したモルモットと比較して、変異株で感染したモルモットからは、有意に少なな臓器病変が観察され、ほぼ１０００分の１の少ない細菌量が回収された。肺と比較して肝臓ではマクロファージやリンパ球より上皮様細胞が優勢であることは、肝臓での良好な免疫応答とより進行した肉芽腫の分解を示唆する。

【００２３】

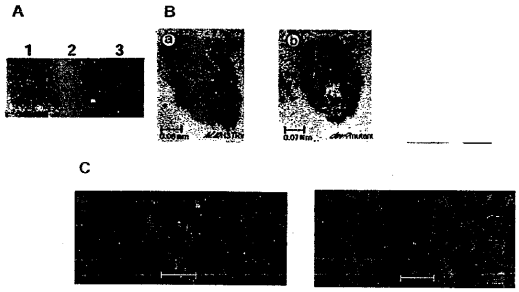
従って、結核菌（M. tuberculosis）の病原性にはＤｅｖＲ－ＤｅｖＳ２成分系が関与し、これらが、酸素制限と低酸素への応答の開始及び維持との間の重要な制御上のリンクであり得ることがわかる。嫌気的微環境へのマイコバクテリウム（Mycobacterium）の適応は、結核菌が、炎症性および壊死性病変（例えば肉芽腫）内で、休止／静止期のような持続状態で無制限に存在する手段を与えると考えられる。従って、この遺伝子系は、結核（特に、持続条件）の治療のための新しい新規な薬剤の開発のための重要な標的となるであろう。

【図１】

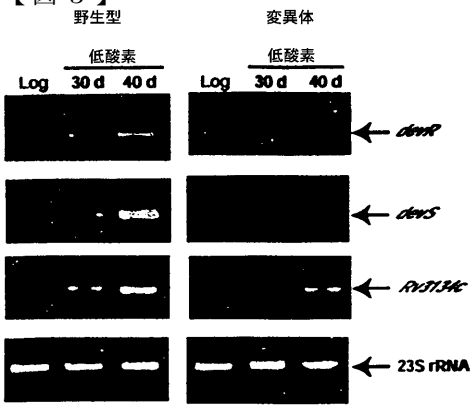


【図２】

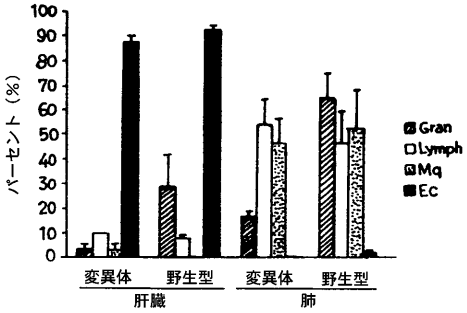
Fig. 2



【図３】



【図４】



【手続補正書】
【提出日】平成17年2月8日(2005.2.8)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】　結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規標的の同定方法であって、
（１）プラスミドｐＪＴ５３．３４の約３，３kbのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ挿入部に存在するｄｅｖＲ遺伝子（Ｒｖ３１３３ｃ）を破壊し、
（２）該破壊されたｄｅｖＲ遺伝子からｐＪＱ２００ＳｋｄｅｖＲ::ｋａｎを構築し、
（３）該プラスミドを、結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖに導入し、
（４）カナマイシンを含有するミドルブルック７Ｈ１０寒天プレート上で、プラスミドの組み込みを示す単一の交差形質転換体を選択し、
（５）該交差形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、ｄｅｖＲ、Km^Rおよびショ糖耐性（ＳａｃＢ）遺伝子配列の存在について解析し、
（６）該遺伝子配列を、ｄｅｖＲプローブ、ｄｅｖＳプローブ、カナマイシン耐性遺伝子プローブを用いて、サザン解析の工程に付して、野生型及びｄｅｖＲ遺伝子座の破壊されたコピーを含む結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを特定し、
（７）カナマイシンとショ糖を含有するミドルブルック７Ｈ９培地中で、結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲを増殖させ、
（８）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）Ｄｕｐ　ｄｅｖＲ株を、カナマイシンとショ糖を含有する７Ｈ１０培地を有する複数のプレートに付して、カナマイシン耐性形質転換体を得ることにより、結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異株を得、
（９）該増殖した結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲを、サザンハイブリダイゼーションに付し、次いでポリメラーゼ連鎖反応法により、該対立遺伝子交換を確認し、
（１０）該形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応工程に付して、ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を解析し、
（１１）該ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を、ウェスタンブロッティング法と免疫電子顕微鏡法の工程に付して、該遺伝子の機能破壊を確認し、
（１２）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関して、酸素制限条件下で結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株の生存力を評価し、
（１３）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関して、好気的な酸素制限条件下で該結核菌（M. tuberculosis）株ｄｅｖＲの生存力を評価し、
（１４）該増殖した株を逆転写ＰＣＲ解析の工程に付して、Ｒｖ３１３４ｃ－ｄｅｖＲ－ｄｅＳオペロンから転写体を得、
（１５）該転写体を、ウルトラバイオレット（Ultra-Violet）社製ゲル記録システムを使用してスキャンし、更に、これを、コンピューターソフトウェアを使用してデンシトメーター解析の工程に付し、
（１６）（ａ）結核菌（M. tuberculosis）のｄｅｖＲ変異株と野生型株で感染したモルモットからの、感染臓器（肺と肝臓）の組織病理的解析、および（ｂ）感染した動物の脾臓からの結核菌（M. tuberculosis）の回収と細菌量の定量を含む試験により、モルモットでの病原性について結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株を試験する、ことを含んでなる上記方法。
【請求項２】　前記ｄｅｖＲ対立遺伝子が、唯一のＰｐｕＭＩ部位でカナマイシン耐性遺伝子で破壊される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】　前記培地は、カナマイシンとショ糖とを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項４】　前記ウェスタンブロッティング法と前記免疫電子顕微鏡法の工程は、従来法で行われる、請求項１に記載の方法。

【請求項５】　前記ｄｅｖＲ対立遺伝子は、ＡｐａＩ　ＢａｍＨＩ断片として切り取られ、プラスミドｐＪＱ２００Ｓｋの対応する部位にクローン化されて、ｐＪＱ２００Ｓｋｄｅｖ Ｒ::ｋａｎを構築する、請求項１に記載の方法。

【請求項６】　前記プラスミドは、電気穿孔法により結核菌（M. tuberculosis）Ｈ３７Ｒｖに導入される、請求項１に記載の方法。

【請求項７】　結核に対して有効な治療法と治療薬の開発に使用するための新規ｄｅｖＲターゲット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IN 02/00022

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[7]: C12N 1/21, 15/00, C12Q 1/00, 1/68 // (C12N 1/21; C12R 1:32)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[7]: C12N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, CAS, Medline

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DASGUPTA, N. et al. Identification of a restriction fragment length polymorphism associated with a deletion that maps in a transcriptionally active open-reading frame, orfX, in Mycobacterium tuberculosis Erdman. Tubercle and Lung Disease, 1998, Vol. 79, No. 2, pages 75-81, Medline-abstract [online], [retrieved on 9 October 2002 (09.10.02)]. Retrieved from: EPOQUE Medline Database, AN: NLM10645444 *abstract.*	1-6
A	DASGUPTA, N. et al. Characterization of a two-component system, devR-devS, of Mycobacterium tuberculosis. Tubercle and Lung Disease, 2000, Vol. 80, No. 3, pages 141-159, Medline-abstract [online], [retrieved on 9 October 2002 (09.10.02)]. Retrieved from: EPOQUE Medline Database, AN: NLM10970762 *abstract.*	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
„A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
„E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
„L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
„O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
„P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
„T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
„X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
„Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
„&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 October 2002 (09.10.2002)	23 October 2002 (23.10.2002)
Name and mailing adress of the ISA/AT Austrian Patent Office Kohlmarkt 8-10; A-1014 Vienna Facsimile No. 1/53424/535	Authorized officer MOSSER R. Telephone No. 1/53424/437

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IN 02/00022

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PEREZ, E. et al. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. Molecular Biology, 2000, Vol. 41, No. 1, pages 179-187. *the whole document.*	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IN 02/00022-0

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	ＦＩ	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｒ　1:32　)	Ｃ１２Ｒ　1:32	

(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘
(72)発明者　ティアギ、ジャヤ、シヴァスワミ
インド国　ニューデリー、アンサリ　ナガル、　オール　インディア　インスチチュート　オブ　メディカル　サイエンス、　デパートメント　オブ　バイオテクノロジー内
(72)発明者　カプール、ヴァンダナ
インド国　ニューデリー、アンサリ　ナガル、　オール　インディア　インスチチュート　オブ　メディカル　サイエンス、　デパートメント　オブ　バイオテクノロジー内

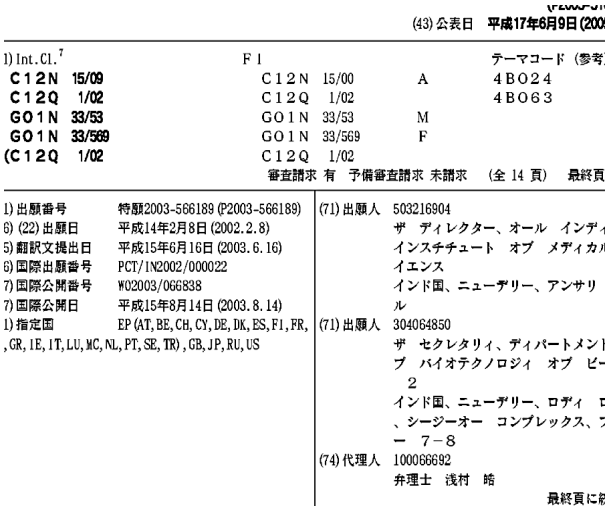
Ｆターム(参考) 4B024 AA11 DA05 EA04 GA14 HA12
4B063 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QR57 QR62 QR68 QR69 QR72 QR75
QR80 QS14 QS24 QS25 QS28 QS33 QS34 QS39

【要約の続き】
ンに付し、次いで、ポリメラーゼ連鎖反応法により、該対立遺伝子交換を確認し、
（１０）該形質転換体を、ポリメラーゼ連鎖反応解析の工程に付して、ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を解析し、
（１１）ｄｅｖＲ　ｋａｎ破壊遺伝子を、ウェスタンブロッティング法と免疫電子顕微鏡法の工程に付して、該遺伝子の機能破壊を確認し、
（１２）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関し、酸素制限条件下で結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株の生存力を評価し、
（１３）ｄｅｖＲとｄｅｖＳ遺伝子発現に関し、好気的な酸素制限条件下で該結核菌（M. tuberculosis）株ｄｅｖＲの生存力を評価し、
（１４）該増殖した株を逆転写ＰＣＲ解析の工程に付して、Ｒｖ３１３４ｃ－ｄｅｖＲ－ｄｅＳオペロンから転写体を得、
（１５）該転写体を、ウルトラバイオレット（Ultra-Violet）社製ゲル記録システムを使用してスキャンし、更に、これを、コンピューターソフトウェアを使用してデンシトメーター解析の工程に付し、
（１６）組織（肺と肝臓）の組織病理的解析と微生物学的方法により、ｄｅｖＲ変異株で感染したモルモットの脾臓中の細菌量の定量することにより、モルモットでの病原性について結核菌（M. tuberculosis）ｄｅｖＲ変異株を試験する、ことを含んでなる上記方法。

专利名称(译)	结核病的治疗和鉴定用于开发治疗药物的新靶标的方法		
公开(公告)号	JP2005516615A	公开(公告)日	2005-06-09
申请号	JP2003566189	申请日	2002-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	医学的主任全印度研究院 2蜂生物Tekunorojii的秘书Ryi双舱		
申请(专利权)人(译)	主任，医学科学的全印度研究院 该Sekuretaryi，蜂生物Tekunorojii的双舱 - 2		
[标]发明人	ティアギジャヤシヴァスワミ カプールヴァンダナ		
发明人	ティアギ、ジャヤ、シヴァスワミ カプール、ヴァンダナ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/35 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/31 C12Q1/02 C12R1/32 G01N33/569		
CPC分类号	C12N15/1082 C07K14/35		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/02 G01N33/53.M G01N33/569.F C12R1/32		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR68 4B063/QR69 4B063/QR72 4B063/QR75 4B063/QR80 4B063/QS14 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39		
代理人(译)	池田幸		
其他公开文献	JP4229238B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种鉴定用于开发结核病有效疗法和治疗剂的新靶标的方法，包括：（1）存在于质粒pJT53.34的大约3.3kb EcoRI-HindIII插入物中的devR基因被破坏，（2）从被破坏的devR基因构建pJQ200SkdevR :: kan，（3）将该质粒转化为结核分枝杆菌（M.tuberculosis）（M.结核病）H37Rv，（4）在含有卡那霉素的Middle Brook 7H10琼脂平板上选择显示质粒整合的单交叉转化体，（5）通过聚合酶链式反应（PCR）分析交叉转化的存在devR，KmR和蔗糖抗性（SacB）基因序列，（6）将基因序列插入devR探针，devS探针，卡那霉素抗性在使用遗传探针的Southern分析之后，鉴定了含有破坏的野生型和devR基因座拷贝的结核分枝杆菌Dup devR，（7）结核分枝杆菌Dup devR在含有卡那霉素和蔗糖的中Brook 7H9培养基中生长，（8）扩大的结核分枝杆菌Dup将devR菌株置于具有含有卡那霉素和蔗糖的7H10培养基的多个平板中以获得卡那霉素抗性转化体，（9）对扩增的结核分枝杆菌devR进行Southern杂交，然后通过聚合酶链反应验证所述等位基因交换，（10）对所述转化体进行聚合酶链式反应分析以获得devR我们分析了kan破坏基因，（11）将devR kan破坏基因进行蛋白质印迹和免疫电子显微镜检查，以确认基因的功能性破坏，（12）对于devR和devS基因表达，在氧限制条件下评估结核分枝杆菌devR突变株的活力，（13）关于devR和devS基因表达，在有氧限氧条件下，上述细菌（M.结核病）应变devR活力评估，（14）对生长的菌株进行逆转录PCR分析步骤以获得来自Rv 3134 c-dev R-deS操纵子的转录物，（15）使用Ultra-Violet Co.，Ltd。制造的凝胶记录系统扫描转印体，并使用计算机软件进一步进行密度计分析，（16）组织（肺和肝）的组织病理学分析在感染了DevR突变体豚鼠的脾脏中通过生物方法制成，通过测定细菌负荷，检测结核病（结核杆菌）在豚鼠中的毒力devR突变株，包括以上方法。



(43) 公表日 平成17年6月9日 (200

1) Int.Cl.⁷	F I		テーマコード（参考
C12N 15/09	C12N 15/00	A	4B024
C12Q 1/02	C12Q 1/02		4B063
G01N 33/53	G01N 33/53	M	
G01N 33/569	G01N 33/569	F	
(C12Q 1/02	C12Q 1/02		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 （全 14 頁） 最終頁

1) 出願番号 特願2003-566189 (P2003-566189)
6) (22) 出願日 平成14年2月8日 (2002.2.8)
5) 翻訳文提出日 平成15年6月16日 (2003.6.16)
6) 国際出願番号 PCT/IN2002/000022
7) 国際公開番号 WO2003/066838
7) 国際公開日 平成15年8月14日 (2003.8.14)
1) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, , GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , GB, JP, RU, US

(71) 出願人 503216904
ザ ディレクター、オール インディ
インスチチュート オブ メディカル
イエンス
インド国、ニューデリー、アンサリ
ル
(71) 出願人 304064850
ザ セクレタリィ、ディパートメン
ブ バイオテクノロジィ オブ ビー
2
インド国、ニューデリー、ロディ
、シージーオー コンプレックス、
ー 7－8
(74) 代理人 100066692
弁理士 浅村 皓

最終頁に