

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4229238号
(P4229238)

(45) 発行日 平成21年2月25日(2009.2.25)

(24) 登録日 平成20年12月12日(2008.12.12)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 F
請求項の数 4 (全 9 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-566189 (P2003-566189)	(73) 特許権者	503216904
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日(2002.2.8)		ザ ディレクター、オール インディア
(65) 公表番号	特表2005-516615 (P2005-516615A)		インスチテュート オブ メディカル サ
(43) 公表日	平成17年6月9日(2005.6.9)		イエンス
(86) 国際出願番号	PCT/IN2002/000022		インド国、ニューデリー、アンサリ ナガ
(87) 国際公開番号	W02003/066838		ル
(87) 国際公開日	平成15年8月14日(2003.8.14)	(73) 特許権者	304064850
審査請求日	平成17年2月8日(2005.2.8)		ザ セクレタリィ、ディパートメント オ
早期審査対象出願			ブ バイオテクノロジー オブ ビー
前置審査			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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

d e v R遺伝子を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として同定する方法であって

(1) d e v R遺伝子(R v 3 1 3 3 c)を保持する組換えプラスミドにおける約3, 3 kbのE c o R I - H i n d I I I 挿入部に存在するd e v R遺伝子(R v 3 1 3 3 c)を、唯一のP p u M I 部位でカナマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊し、

(2) 該カナマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊されたd e v R遺伝子を、p J Q 2 0 0 S k プラスミドに組み込んで、該破壊されたd e v R遺伝子を保持するプラスミドを構築し、

(3) 該プラスミドを、結核菌(M. tuberculosis) H 3 7 R v に導入し、

(4) カナマイシンを含有するミドルブルック7 H 1 0 寒天プレート上で、該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(P C R)により、d e v R、K m^Rおよびショ糖耐性(S a c B)遺伝子配列の存在について解析し、

(6) 該遺伝子配列を、d e v Rプローブ、d e v S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d e v R遺伝子座の破壊されたコピーを保持する結核菌(M. tuberculosis)(以下、「結核菌d e v R変異株」と記載する)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7 H 9 培地中で、該結核菌d e v

R変異株を増殖させ、

(8) 該増殖した結核菌 d e v R 変異株を、カナマイシンとショ糖を含有する 7 H 1 0 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、該結核菌 d e v R 変異株を得、

(9) 該増殖した結核菌 d e v R 変異株を、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、d e v R k a n 破壊遺伝子を解析し、

(11) 該 d e v R k a n 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) d e v R と d e v S 遺伝子発現に関して、酸素制限条件下で結核菌 d e v R 変異株の生存力を評価し、

(13) d e v R と d e v S 遺伝子発現に関して、好氣的条件下で該結核菌 d e v R 変異株の生存力を評価し、

(14) 該増殖した株を逆転写 P C R 解析の工程に付して、R v 3 1 3 4 c - d e v R - d e S オペロンから転写体を得、

(15) 該転写体を、ゲル記録システムを使用してスキャンし、更に、これを、コンピュータソフトウェアを使用してデンスitometer 解析の工程に付し、

(16) (a) 該結核菌 d e v R 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 d e v R 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3】

前記 d e v R 対立遺伝子を、A p a I B a m H I 断片として切り取り、プラスミド p J Q 2 0 0 S k の対応する部位にクローン化して、前記破壊された d e v R 遺伝子を保持するプラスミドを構築する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記プラスミドを、電気穿孔法により結核菌(M. tuberculosis) H 3 7 R v に導入する、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. tuberculosi

10

20

30

40

50

s) の適応は、おそらく宿主組織内の特定の生理学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的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（参考文献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的同定方法であって、

(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(Km^R)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、ウェスタンブロット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、

10

20

30

40

50

(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、好氣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-devS*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。

10

【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。

20

【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】

30

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、pJQ200Sk*devR::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、20 μ g/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

40

50

により、3.8 kbと約9.5 kb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9.5 kb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(20 µg/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(20 µg/ml)と2%ショ糖を含有するミドルブルック7H10培地上で培養される。全部で87のKm^Rとショ糖耐性(Suc^R)形質転換体を得られ、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(3.8 kbのシグナル)ではなく、devR::kanコピー(5.1 kb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1.3 kb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2~4 µm、図2C)と比較して、対数増殖期の変異体(平均4~6 µm)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、好氣的条件下で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A₅₉₀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A₅₉₀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、好氣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. tubercul

10

20

30

40

50

osis) 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) 親株と変異株の好氣的攪拌培養物は、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 (10
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*
devS 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。20

【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*) H37
Rv × 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 (H37 *Rv* 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*) H37 *Rv* 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 斜面培地に塗抹した。親株で感染した動物の脾臓から全部で
 $7.09 \pm 0.83 \log_{10} \text{cfu}$ が単離され、変異株で感染した動物の脾臓から $4.4 \pm 1.21 \log_{10} \text{cfu}$
が単離され、差は有意である ($p < 0.05$ 、表 1)。30 40

【0021】

肝臓と肺の剖検試料から連続する 5 μm 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。50

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】

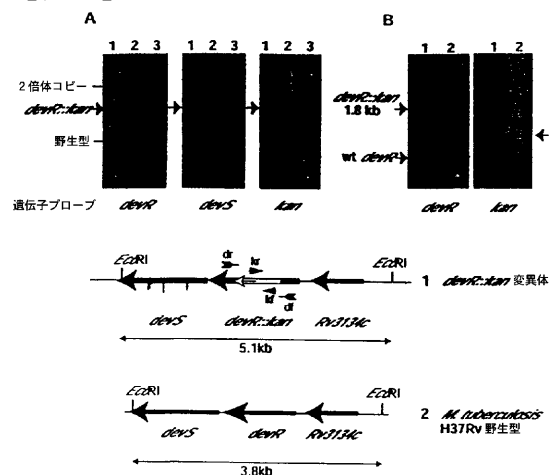
感染後7週目に、親株で感染したモルモットと比較して、変異株で感染したモルモットからは、有意に少なな臓器病変が観察され、ほぼ1000分の1の少ない細菌量が回収された。肺と比較して肝臓ではマクロファージやリンパ球より上皮様細胞が優勢であることは、肝臓での良好な免疫応答とより進行した肉芽腫の分解を示唆する。

10

【0023】

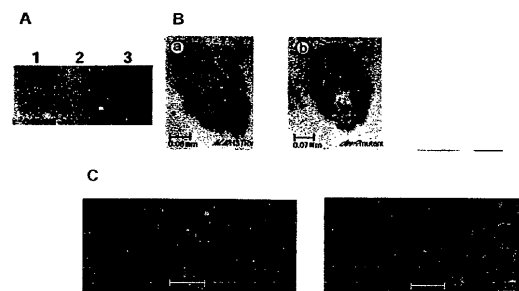
従って、結核菌(*M. tuberculosis*)の病原性にはDevR-DevS2成分系が関与し、これらが、酸素制限と低酸素への応答の開始及び維持との間の重要な制御上のリンクであり得ることがわかる。嫌氣的微環境へのマイコバクテリウム(*Mycobacterium*)の適応は、結核菌が、炎症性および壊死性病変(例えば肉芽腫)内で、休止/静止期のような持続状態で無制限に存在する手段を与えると考えられる。従って、この遺伝子系は、結核(特に、持続条件)の治療のための新しい新規な薬剤の開発のための重要な標的となるであろう。

【図1】

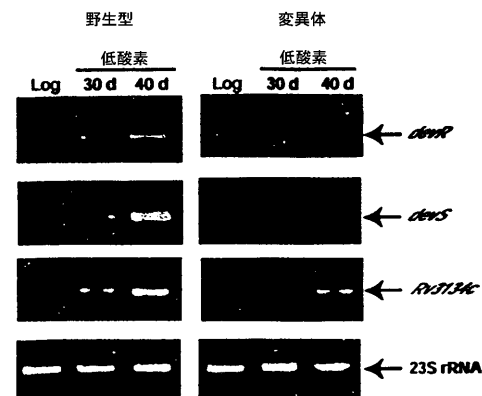


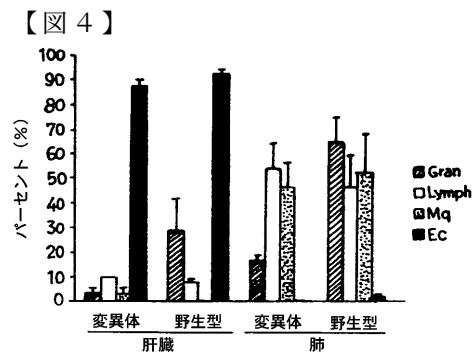
【図2】

Fig. 2



【図3】





フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/32 (2006.01) C 1 2 Q 1/02
C 1 2 R 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

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 Tuber Lung Dis, (2000), Vol. 80, No. 3, p. 141-159, 2000年

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (2001), Vol. 98, No. 13, p. 7534-7539, 米国, 2001年

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (1997), Vol. 94, p. 10955-10960, 米国, 1997年

Science, (1998), Vol. 282, p. 759-762, 米国, 1998年

J. Bacteriol., (1999), Vol. 181, No. 16, p. 4780-4789, 1999年

J. Bacteriol., (2000), Vol. 182, No. 13, p. 3832-3838, 2000年

J. Bacteriol., (2000), Vol. 182, No. 20, p. 5715-5720, 2000年

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/00

G01N 33/53

C12R 1/32

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)

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	JP4229238B2	公开(公告)日	2009-02-25
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Tekunorogiii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Tekunorogiii的双舱 - 2		
当前申请(专利权)人(译)	主任，医学科学的全印度研究院 该Sekuretaryi，蜂生物Tekunorogiii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	C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/569 C12R1/32 C07K14/35 C12N1/21 C12N15/10 C12N15/31		
CPC分类号	C12N15/1082 C07K14/35		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/569.F C12R1/32		
代理人(译)	池田幸		
审查员(译)	三罗·哈马达		
其他公开文献	JP2005516615A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种鉴定用于开发结核病的有效疗法和治疗剂的新靶标的方法，包括：

(1) 质粒pJT53.34的大约3kb EcoRI-HindIII插入物中存在的devR基因被破坏，(2) 从破坏的devR基因构建pJQ200SkdevR :: kan，(3) 将质粒转化到结核分枝杆菌中 (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个交叉转化体，(5) 通过聚合酶链反应 (PCR) 分析交叉转化是否存在devR，Km R 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进行Southern分析后，鉴定出含有野生型和devR基因座的破坏拷贝的结核分枝杆菌Dup devR，(7) 结核分枝杆菌Dup dev R在含有卡那霉素和蔗糖的Middle 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) 所述DevR根破坏的基因，进行Western印迹和免疫电子显微镜法的过程中，以验证该基因的功能性破坏，(12) 涉及DevR和开发者的基因表达，在氧受限条件来评估结核分枝杆菌 (结核分枝杆菌) devR突变株的生存力，(13) 涉及devR和开发者的基因表达，所述结合Kakukin (M.有氧氧受限的条件结核病) 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，并进一步使用计算机软件进行密度计分析，(16) 组织 (肺和肝) 的组织病理学分析通过生物学方法定量感染devR突变株的豚鼠脾脏中细菌的数量，测试结核分枝杆菌devR突变体对豚鼠的致病性以上方法。

【图 3】

