

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 355073

(P2002 - 355073A)

(43)公開日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		39/39	4 B 0 2 4
39/39		A 6 1 P 31/04	4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/04		C 0 7 K 14/24	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/24		14/32	4 C 0 8 5

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 35数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 15700(P2002 - 15700)

(22)出願日 平成14年1月24日(2002.1.24)

(31)優先権主張番号 60/265034

(32)優先日 平成13年1月30日(2001.1.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 ジョン・パトリック・ミュラー, ジュニア

アメリカ合衆国コネチカット州06340, グロ

トン, イースタン・ポイント・ロード, ファ

イザー・グローバル・リサーチ・アンド・

ディベロプメント

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H A R Aポリペプチドおよび核酸、並びに関連する方法およびその使用

(57)【要約】

【課題】 その発現が生物における抗生物質耐性を導く可能性がある遺伝子を同定するため、輸送体およびその基質抗細菌化合物を同定する。

【解決手段】 本発明は、エンテロコッカス・フェカリスおよび枯草菌由来のh a r Aポリペプチドおよびh a r Aポリペプチドをコードする核酸、並びにそれらの突然変異体と共に、スクリーニングおよび診断法における該ポリペプチドおよび核酸の使用法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化合物がharAポリペプチドに結合するかどうか決定するための、化合物のスクリーニング法であって：harAポリペプチドと化合物を、結合に適した条件下で接触させ；そして化合物がharAポリペプチドに結合するかどうか決定することを含み、harAポリペプチドが(a)図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列または(b)図4(配列番号4)に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む、前記方法。

【請求項2】 化合物がharA活性を阻害するかどうか決定するための、化合物のスクリーニング法であって：harAポリペプチドの活性を、(i)化合物の非存在下および(ii)存在下で、harA活性を測定するのに適した条件下で測定することを含み；化合物の非存在下のharA活性に比較した化合物の存在下のharA活性の減少は、化合物がharA活性を阻害することを確認し、harAポリペプチドが(a)図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列または(b)図4(配列番号4)に示されるアミノ酸配列に少なくとも75% 20 同一であるアミノ酸配列を含む、前記方法。

【請求項3】 測定されるharA活性が、NTPアーゼ活性である、請求項2の方法。

【請求項4】 抗細菌剤がharA仲介薬剤耐性を示す生物を治療するのに有効であるかどうか決定するための、E.フェカリスまたは枯草菌のハイグロマイシンA耐性株の使用。

【請求項5】 harA遺伝子を含む生物を同定するための、harAポリペプチドをコードする核酸の使用であって、該核酸が：

(a)(i)図1(配列番号1)に示されるヌクレオチド配列または(ii)図3(配列番号3)に示されるヌクレオチド配列に少なくとも75%同一であるヌクレオチド配列；

(b)(a)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；および

(c)(a)または(b)のヌクレオチド配列に縮重しているヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、前記使用。

【請求項6】 harAポリペプチドをコードする核酸 40 を含む組換えベクターであって、該核酸が：

(a)(i)図1(配列番号1)に示されるヌクレオチド配列または(ii)図3(配列番号3)に示されるヌクレオチド配列に少なくとも75%同一であるヌクレオチド配列；

(b)(a)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；および

(c)(a)または(b)のヌクレオチド配列に縮重しているヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、前記ベクター。

*【請求項7】 pMP、pJPM1、pGEM-T、pVA891、pSK⁺、pUC8、pUC9、pBR322、pBR329、pPL、pKK223およびpQE50より選択される、請求項6のベクター。

【請求項8】 pMP-bac-A1-1(ATCC寄託番号第PTA-2551号)またはpGEM-T/harA(ATCC寄託番号第PTA-2552号)である、請求項7のベクター。

【請求項9】 harAポリペプチドをコードする核酸を含む組換えベクターであって、harAポリペプチドをコードする該核酸がクロラムフェニコール耐性挿入物またはエリスロマイシン耐性挿入物を含むヌクレオチド配列を含む、前記ベクター。

【請求項10】 請求項6-9のいずれか1つのベクターを含む細胞。

【請求項11】 枯草菌株JH642 expZ::CAT(ATCC寄託番号第PTA-2480号)またはエンテロコッカス・フェカリス株OG1XharA::ERM(ATCC寄託番号第PTA-2550号)である、請求項10の細胞。

【請求項12】 (i)図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列または(ii)図4(配列番号4)に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む、組換えharAポリペプチド。

【請求項13】 請求項12のharAポリペプチドおよび薬学的に許容しうるキャリアーを含む、免疫学的組成物。

【請求項14】 さらにアジュバントを含む、請求項13の免疫学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)および枯草菌(*Bacillus subtilis*)由来のharAポリペプチドおよびharAポリペプチドをコードする核酸、並びにそれらの突然変異体と共に、化合物スクリーニングおよび診断法における該ポリペプチドおよび核酸の使用法に関する。

【0002】

【従来の技術】しばしば多剤措置に対する耐性を含む、一般的に用いられる抗生物質剤に対する細菌耐性の発生は、世界的に増大しつつある問題である。多くの細菌生物は、おそらくこうした耐性を与える内因性遺伝子産物の発現のため、内因的に、または他のすでに耐性である生物から獲得された耐性として、いくつかの天然産物(および関連する)抗細菌剤に耐性を示す。いくつかの抗細菌剤に耐性であることが知られる生物の中に、エンテロコッカス・フェカリス(「E.フェカリス」)がある。E.フェカリス感染は、最も一般的な院内(病院で獲得する)および医原性(治療、例えば針穿刺から生じ

る)感染の1つであり、これは、回復を損なうのに加え、敗血症、敗血症ショックまたは死さえも導く可能性がある。E.フェカリスはまた、前立腺炎症例と共に、尿管、骨盤、腹部および新生児感染のかなりの割合にも責任があり、そしてしばしば、細菌心内膜炎の原因病原体である。

【0003】抗細菌剤に対する細菌感受性の内因性のレベルは、該剤が細胞区画内に集積する能力および該剤のその特定の標的への親和性両方に依存すると理解されている。多くの薬剤耐性細菌は、抗生物質薬剤を細菌の外側の細胞外培地に再び輸送し、薬剤の集積を防ぎそして薬剤に対する細菌の感受性を減少させるタンパク質を発現する。これらの薬剤輸送タンパク質は2種類に分けることが可能である: 薬剤の追放(extrusion)をイオン交換とカップリングさせる二次輸送体、およびATP加水分解の際、リン酸結合のエネルギーを利用し、薬剤を追放するATP結合カセット(「ABC」)輸送体である。ある輸送体は非常に特異的であり、1つの薬剤種しか認識しないが、多様な薬剤種と共に他の分子、例えば界面活性剤および色素を追放する多剤輸送体もまた存在する。Young, J.およびHolland, I.B. "ABC transporters: bacterial exporters - revisited five years on," *BBA* 1461: 177-200 (1999)を参照されたい。耐性の他の機構には、例えば細胞表面でのまたは細胞内部での酵素による薬剤不活性化、および例えばリボソーム構造の天然変動による、または薬剤の細胞への進入に必要とされる輸送系の非存在による標的改変が含まれる。

【0004】存在するゲノム供給源を解析し、ABC含有タンパク質を理解する試みが行われてきている。例えばQuentin, Y., Fichant, G.およびDenizot, F. "Inventory, Assembly and Analysis of Bacillus subtilis ABC Transport Systems" *J. Mol. Biol.* 287: 467-484 (1999)を参照されたい。Quentinらは、枯草菌の解析を行い、そして78のABC含有遺伝子を同定し、このうち8つは、それ以前にATP結合タンパク質と注釈をつけられていなかった。これらの模式図において、輸送体は、1つまたはそれ以上のポリペプチドとして発現される3つのサブユニット-ヌクレオチド結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび溶質結合タンパク質-のゲノム関連により、特徴付けられる。しかし、「輸送体(exporter)」群の5つのATPアーゼの1つの群(「サブファミリー3」と称される)は、ゲノムにおいて、いかなる膜貫通ドメインとも関連していなかったが、マクロライド耐性またはタンパク質翻訳の制御に関連するタンパ

ク質にある程度の配列類似性を示した。そのうち1つが出願者らにより本明細書に記載される遺伝子「expZ」である、サブファミリー3の遺伝子の機能は、現在まで同定されていない。

【0005】他の生物中のABC配列は、公的にアクセス可能な遺伝子データベース、例えばGenbankにおいて同定することが可能であり、例えば、YER036c、YFR009w、YPL226w、YLR249w、YNL014w、YDR091c、YKL209c、YLL015w、YOL075c、YCR011cおよびYHL035cと称される遺伝子がある。Linton, K.J.およびHiggins, C.F., "The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins," *Molecular Microbiology* 28(1): 5-13 (1998)を参照されたい。ABCタンパク質に関する情報の有用なデータベースは、<http://ir2lc.b.cnrs-mrs.fr/ABCdb/>で入手可能である。E.フェカリス・ゲノムは、現在、配列決定されており、そして多くの配列が、その実際のまたはありうる機能に関し、注釈をつけられている。E.フェカリス・ゲノムの解析のための公的に利用可能なサイトは、<http://pedant.mips.biochem.mpg.de/>である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ABC含有配列を、ATP結合領域間に共通の配列特徴に基づき、増大しつつあるゲノム供給源内で同定することが可能である一方、どのABC含有遺伝子が薬剤抵抗性を与えるかをどのように同定するかも、またはどの薬剤が特定のABC含有遺伝子を発現する生物に対し無効であろうかをどのように同定するかも知られていない。出願者らが追求した、抗生物質耐性の増大する問題に取り掛かる1つの方法は、その発現が生物における抗生物質耐性を導く可能性がある遺伝子を同定するため、輸送体およびその基質抗細菌化合物を同定するのを試みることである。他者による研究の例は、「MXR1」と呼ばれるABCタンパク質を開示し、そして該タンパク質の過剰発現が、ミトザントロンなどのいくつかの化学療法剤の細胞傷害効果に対する耐性を与えることを言及する、PCT国際特許出願WO 00/36101に見ることが可能である。別の研究は、アルカエグロブス・ファルギドゥス(*Archaeoglobus fulgidus*)ABC輸送体に相同性を有する黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)ポリペプチドをコードする核酸を開示する、PCT国際特許出願WO 99/31133に開示される。

【0007】

【課題を解決するための手段】出願者らは、ハイグロマ

イシンA類似体(analogues)に耐性であるE.フェカリスおよび枯草菌の株を発見し、そして以前は性質決定されていなかった、その耐性と共に他の抗細菌剤に対する耐性を与える内因性遺伝子産物を同定した。用語「harA」(すなわちハイグロマイシンA耐性(hygro mycin A resistance))は、本明細書において、一般的に、ハイグロマイシンA耐性を与える、いかなるポリペプチド、こうしたポリペプチドをコードする核酸、あるいはこうしたポリペプチドまたは核酸の断片または誘導体も指すようい

【0008】本発明は、E.フェカリスおよび枯草菌由来のharAポリペプチドおよびharAポリペプチドをコードする核酸、並びにそれらの突然変異体と共に、harAポリペプチドおよびharA核酸を産生する方法、並びに該ポリペプチドおよび核酸を含む組成物に関する。本発明はまた、診断法およびワクチン接種におけるharAポリペプチドおよびharA核酸の使用法と共に、harAポリペプチドに結合し、harAポリペプチドのATPアーゼ活性を含むharAポリペプチドの活性を調節するかまたは阻害する化合物を同定するため、harAポリペプチドおよびharA核酸を用いる方法および過程にも関する。

【0009】本発明は、図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む、単離harAポリペプチドに関する。1つの態様において、該ポリペプチドは、E.フェカリスharAポリペプチドである。別の態様において、該ポリペプチドは、実質的に純粋な形である。別の態様において、該ポリペプチドは、図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、図2(配列番号2)に示されるアミノ酸配列から本質的になる単離harAポリペプチドも提供する。本発明はまた、図4(配列番号4)に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む、単離harAポリペプチドにも関する。1つの態様において、該ポリペプチドは、枯草菌harAポリペプチドである。別の態様において、該ポリペプチドは、実質的に純粋な形である。別の態様において、該ポリペプチドは、図4(配列番号4)に示されるアミノ酸配列を含む。本発明はまた、図4(配列番号4)に示されるアミノ酸配列から本質的になる単離harAポリペプチドも提供する。本発明はまた、プラスミドpGEM-T/harA(ATCC寄託番号第PTA-2552号)に含まれる核酸にコードされるアミノ酸配列から本質的になるアミノ酸配列を有するharAポリペプチドにも関する。本発明はまた、プラスミドpMP-bacA1-1(ATCC寄託番号第PTA-2551号)に含まれる核酸にコードされるアミノ酸配列から本質的になるアミノ酸配列を有するharAポリペプチドにも関する。

【0010】用語「単離された」は、人の手により、天然状態から改変されたことを意味し、すなわち天然に存在するものである場合、天然に存在する状態から変化させられたかまたは除去されたかあるいはその両方であることを意味する。例えば、原核または真核細胞、細菌、ビリオンまたはウイルスに天然に存在する核酸またはポリペプチドは、「単離され」ていないが、天然状態で共に存在する成分から分離された同じ核酸またはポリペプチドは、本明細書において、「単離され」ている。用語「単離された」の意味にやはり含まれるのは、例えば、いかなるものでもよい組換え核酸、クローニングされた遺伝子、in vitro転写または翻訳産物、外因性または異種核酸またはその転写および翻訳産物、並びに放射標識および修飾されたまたはそうでなければ非天然存在核酸またはアミノ酸の置換を含む、化学的、酵素的、または生体内変換手段によりプロセシングされた、いかなるものでもよい核酸またはポリペプチドである。

【0011】「ポリペプチド類」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合により、互いに連結された2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む、いかなるペプチドまたはタンパク質も指す。「ポリペプチド類」は、通常ペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーと称される短鎖も、そして一般的にタンパク質と称されるより長い鎖も両方指す。「ポリペプチド類」には、天然過程により、例えばプロセシングおよび他の翻訳後修飾により修飾されたものだけでなく、化学的修飾技術により修飾されたものも含まれる。こうした修飾は、基本的な教科書、より詳細なモノグラフ、および研究刊行物に記載され、そして当該技術分野に公知である。同じ種類の修飾が、既定のポリペプチドのいくつかの部位で、同じかまたは異なる度合いで存在する可能性があることを理解すべきである。また、既定のポリペプチドが、多くの種類の修飾を含む可能性もある。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのどこで起こってもよい。修飾には、例えば、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、糖鎖形成、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化(例えばヒドロキシプロリンまたはヒドロキシリジンの形成)、ヨウ化、メチル化(例えばe-N-メチルリジン、3-メチル-ヒスチジンの形成)、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、糖鎖形成、脂質付着、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADPリボシル化、セレノイル化、硫酸化、

タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA仲介付加、例えばアルギニル化、およびユビキチン化が含まれる。例えば、PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 第2版, T.E. Creighton監修, W.H. Freeman and Company, ニューヨーク(1993)およびWold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12ページ, POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, 中, B.C. Johnson監修, Academic Press, ニューヨーク(1983); Seiffterら, Meth. Enzymol. 182:626-646(1990)およびRattanら, Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62(1992)を参照されたい。ポリペプチドは、分岐していても、あるいは分岐を含むまたは含まない環状であってもよい。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは、翻訳後天然過程から生じてよく、そしてまた完全に合成法により、作成してもよい。ポリペプチドは、20の天然コードアミノ酸以外のアミノ酸、例えば当該技術分野に公知の -、 -、または -アミノ酸、あるいはD-アミノ酸を含んでもよい。

【0012】本出願において、「単離ポリペプチド」の意味にはまた、界面活性剤を含む天然または外因性脂質、harAポリペプチドを発現する細胞由来の膜調製と共に、harAポリペプチドを含む小胞または閉鎖膜性調製が含まれる。

【0013】本出願において交換可能に用いられる「に同一」または「同一性」は、配列を比較することにより決定されるような、2つまたはそれ以上のポリペプチド配列、あるいは2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列の関係である。本出願において、「に類似」または「類似性」は、場合によって、こうした一連の配列間の一致により決定されるような、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の度合いを意味する。「同一性」および「類似性」は、限定されるわけではないが、例えば: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 監修, Oxford University Press, ニューヨーク, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 監修, Academic Press, ニューヨーク, 1993; Computer Ana

lysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M.およびGriffin, H.G. 監修, Humana Press, ニュージャージー, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987;およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M.およびDevereux, J. 監修, M Stockton Press, ニューヨーク, 1991;およびCarillo, H.およびLipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073(1988)に記載されるものを含む、既知の方法により、容易に計算することが可能である。同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間の最大の一致を与えるよう設計される。同一性および類似性を決定する方法は、公的に利用可能なコンピュータープログラムに集大成されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータープログラム法には、限定されるわけではないが、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J.ら, Nucleic Acids Research 12(1):387(1984))、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschul, S.F.ら, J. Molec. Biol. 215:403-410(1990))が含まれる。BLAST XプログラムはNCBIおよび他の供給源から公的に入手可能である(BLASTマニュアル, Altschul, S.ら, NCBINLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S.ら, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))。公知のSmith-Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するのに用いてもよい。

【0014】ポリペプチド配列比較に特に好ましいパラメーターには以下が含まれる: アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, J. Mol Biol. 48:443-453(1970); 比較マトリックス: HentikoffおよびHentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919(1992)由来のBLOSSUM62; ギャップペナルティ: 12; およびギャップ長ペナルティ: 4。これらのパラメーターを用いる有用なプログラムは、Genetics Computer Group、ウィスコンシン州マディソンから「gap」プログラムとして公的に入手可能である。前述のパラメーターは、ペプチド比較のデフォルトパラメーターである(末端ギャップに関するペナルティなし)。

【0015】本発明はまた、ポリペプチド参照配列に少なくとも75、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むharAポリペプチドにも関する。1つの態様において、harAポリペプチドは、参照配列に同一でもよいし、または参照配列に比較し、特定の整数までのアミノ酸改変を含んでもよく、前記改変は、少なくとも1つのアミノ酸欠失、保存的および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群より選択され、そして前記改変は、参照配列中のアミノ酸の中に個々に、あるいは参照配列内の1つまたはそれ以上の隣接する基で点在し、参照配列のアミノまたはカルボキシ末端位で、あるいはこれらの末端位の間どこかで起こってもよい。好ましい態様において、参照配列は、配列番号2に示されるアミノ酸配列である。別の好ましい態様において、参照配列は、配列番号4に示されるアミノ酸配列である。

【0016】本発明はまた、参照配列を含むアミノ酸の10%を越えない保存的置換を有するアミノ酸配列を含むharAポリペプチドにも関する。1つの態様において、参照配列は、配列番号2に示されるアミノ酸配列である。別の態様において、参照配列は、配列番号4に示されるアミノ酸配列である。好ましい態様において、harAポリペプチドは、ポリペプチドのABCドメインのいずれか1つまたはそれ以上に、保存的アミノ酸置換を含む。本出願において、用語「ABCドメイン」は、少なくとも1つのWalker Aボックスおよび少なくとも1つのWalker Bボックスを含むいかなるものでもよい配列を含む。より好ましい態様において、図2（配列番号2）に同定されるような、1つまたはそれ以上のWalker A、Walker B、サインモチーフまたは下流モチーフ配列が保存される。別のより好ましい態様において、図4（配列番号4）に同定されるような、1つまたはそれ以上のWalker A、Walker B、サインモチーフまたは下流モチーフ配列が保存される。別のより好ましい態様において、harAポリペプチドは、ABCドメイン、Walker A、Walker B、サインモチーフまたは下流モチーフ配列のいずれか1つまたはそれ以上の外側のharAポリペプチド領域に保存的アミノ酸置換を含む。

【0017】「保存的」アミノ酸置換は、当該技術分野に公知である。こうした置換を作成する規則は、とりわけ、Dayhof, M. D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D. C., Vol. 5, Sup. 3に記載されるものを含む。より具体的には、保存的アミノ酸置換は、一般的に、酸性度、極性または側鎖の大きさ(bulkiness)において関連する、アミノ酸ファミリー内で行われるものである。遺伝的にコードされるアミノ酸は、一般的に4つの群に分けられる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リジ

ン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および(4)非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、およびチロシンである。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンはまた、芳香族アミノ酸として一緒に分類される。いずれかの特定の群内での1つまたはそれ以上の置換、例えばイソロイシンもしくはバリンでのロイシンの置換、またはグルタミン酸でのアスパラギン酸の置換、またはセリンでのスレオニンの置換、あるいは構造的に関連するアミノ酸残基、例えば、類似の酸性度、極性、側鎖の大きさ、またはそれらのいくつかの組み合わせでの類似性を持つアミノ酸残基でのいずれかの他のアミノ酸の置換は、一般的に、ポリペプチドの機能または免疫原性に重要でない影響を有するであろう。好ましい態様において、保存的置換ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に、少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約85%、そしてさらにより好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、そして最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0018】別の態様において、ポリペプチドは、それらの組み合わせを含め、挿入、欠失、または置換された1および10の間、そしてより好ましくは1および5の間のアミノ酸を有するharAポリペプチドからなる。より好ましい態様において、単離ポリペプチドは、harAポリペプチドのアミノ酸配列中に1および5の間の保存的置換アミノ酸を有する。

【0019】本発明はさらに、本発明の前述のポリペプチドのいずれか1つの実質的な部分からなるharAポリペプチドに関する。本明細書において、本発明のポリペプチドの「実質的な部分」、または「ペプチド断片」は、対応する全長ポリペプチドの完全なアミノ酸配列以下からなるが、そのアミノ酸配列の少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%を含む、ポリペプチドを意味する。

【0020】本発明は、実質的に純粋な形の単離harAポリペプチドに関する。1つの態様において、単離harAポリペプチドは、可溶性型で回収される。別の態様において、単離harAポリペプチドは、不溶性型で回収される。

【0021】本出願において、「実質的に純粋」は、単一の物質の少なくとも重量90%、好ましくは少なくとも重量95%、そしてより好ましくは少なくとも重量99%を含むことを意味し、物質は、天然存在であってもまたは非天然存在であっても、いかなる化学化合物であってもよい。

【0022】用語「可溶性型で回収される」は、タンパク質またはポリペプチドが、前記タンパク質またはポリ

ペプチドを発現する細胞の細胞質から回収されることを示す。乳化物、界面活性剤、または膜性調製中で回収されるタンパク質またはポリペプチドもまた、本発明において、可溶性型とみなされる。

【0023】用語「不溶性型で回収される」は、タンパク質またはポリペプチドが、前記タンパク質またはポリペプチドを発現する細胞に存在する封入体から回収されることを示す。

【0024】本発明はさらに、本明細書に記載されるポリペプチドのいずれかを調製する方法であって、本明細書に記載される組換え発現ベクターのいずれかで形質転換された宿主細胞を培養し、そして可溶性または不溶性型いずれかで、細胞培養から発現されたポリペプチドを回収することを含む、前記方法に関する。培養は、本明細書にさらに記載されるように、そして選択された宿主細胞にしたがって、特に好ましいように、ポリペプチドの発現を行うことが可能な条件下で行われ、その条件は当該技術分野に公知である。

【0025】本発明は、harAポリペプチドおよび薬学的に許容しうるキャリアーを含む、免疫学的組成物に関する。本発明はまた、harAポリペプチドをコードする核酸であって、動物における該ポリペプチドの発現を指示するのに有効なベクターと機能的に関連している前記核酸、および薬学的に許容しうるキャリアーを含む、免疫学的組成物にも関する。

【0026】上述の組成物のいずれかの態様において、キャリアーはさらに、アジュバントまたはharAポリペプチドに対する動物の免疫反応を刺激するかまたは亢進するのに有効な他の調節剤を含む。免疫刺激剤としておよびワクチンにおいて使用するためのアジュバントは、当該技術分野に公知であり、例えば、フロイントのアジュバント、Amphigen、および他の商業的に入手可能なアジュバントがあり、そして確立された臨床的指針を参照することにより、選択された動物、哺乳動物またはヒトにおける使用のため、適応される。

【0027】他の態様において、組成物は、錠剤、カプセル、丸剤、粉末、持続放出処方、溶液、懸濁物として経口投与に、無菌溶液、懸濁物または乳剤として非経口注射に、軟膏またはクリームとして局所投与に、あるいは座薬として直腸投与に、適した形である。その好ましい態様において、組成物は、正確な投薬量の単回投与に適した、単位投薬型である。

【0028】本発明は、動物において、薬剤耐性感染を治療する方法であって、該動物に、上述の組成物のいずれかを、薬剤に対する感受性の増加を引き出すのに十分な量で投与することを含む、前記方法に関する。1つの態様において、薬剤耐性は、harAポリペプチドにより、またはharA核酸の発現により、仲介される。別の態様において、薬剤は、ハイグロマイシンAまたは関連類似体、バージニアマイシン、ランカシジンまたはS

ynercid (登録商標) である。本出願において、用語「類似体(類)」は、化学化合物いずれかに適用された場合、指定された化合物だけでなく、同じ化学構造種の化合物およびそれに由来する化合物も含む。したがって、「ハイグロマイシンA」(または同様に、「ランカシジン」、「バージニアマイシン」、「ストレプトグラミン」という句の使用は、その化学構造種にある、単数または複数の化合物を指す。用語「ハイグロマイシン(類)」は、本明細書において、ハイグロマイシンAを意味する。1つの態様において、感染は細菌感染であり、そしてその好ましい態様において、細菌感染は、E.フェカリス、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)またはエンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)感染である。そのより好ましい態様において、細菌感染は、エンテロコッカス・フェシウムまたはE.フェカリス感染である。別のより好ましい態様において、細菌感染は、化膿連鎖球菌または肺炎連鎖球菌感染である。別のより好ましい態様において、細菌感染は、インフルエンザ菌感染である。別の態様において、感染は、原生動物感染である。その好ましい態様において、原生動物感染は、セルピユリナ(トレポネマ)・ヒオジセンテリエ(*Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*)感染である。その別の態様において、感染は、ハイグロマイシンAでの治療に服しやすくと同定されるいずれかの感染性病原体によるものである。別の態様において、感染は、ハイグロマイシンA耐性、バージニアマイシン耐性、ランカシジン耐性またはSynercid (登録商標)耐性感染のいずれかが1つである。さらに別の態様において、感染は、ハイグロマイシンA類似体に耐性である。別の態様において、感染は、バンコマイシン耐性である。他の態様において、方法は、動物に、上述の組成物のいずれかを、例えばエンテロコッカス属、連鎖球菌属またはヘモフィルス属感染を治療する別の抗菌化合物または組成物と組み合わせることを含む。1つの態様において、他の抗菌化合物は、マクロライド(例えばエリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン)、ベータ-ラクタム(例えばペニシリン類、セファロスポリン類)、アミノ配糖体、スルホンアミド、テトラサイクリン、キノロン、ストレプトグラミン、オキサゾリジノンまたは糖ペプチド(例えばバンコマイシン)である。上述の例は、例示のみであり、そして本発明において、特定の抗菌剤が用いられると限定されることを意図しないことを理解すべきである。

【0029】上述の組成物または方法のいずれかの態様において、動物は哺乳動物である。そのより好ましい態

様において、哺乳動物はヒトである。他のより好ましい態様において、哺乳動物は、イヌまたはネコを含む、ヒトのコンパニオン動物であるか、あるいは哺乳動物は、ウマ、ウシ、またはブタ動物を含む、家畜動物である。他の態様において、動物は、トリ・コンパニオン動物または家禽動物である。

【0030】上述の組成物または方法のいずれかの態様において、ポリペプチドは、図2（配列番号2）に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含むharAポリペプチドである。別の態様において、ポリペプチドは、図4（配列番号4）に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含むharAポリペプチドである。別の態様において、ポリペプチドは、図2（配列番号2）に示されるアミノ酸配列、または図4（配列番号4）に示されるアミノ酸配列を含むharAポリペプチドである。別の態様において、ポリペプチドは、図2（配列番号2）または図4（配列番号4）に示されるポリペプチドなどのharAポリペプチドの断片または変異体である。上述の組成物または方法のいずれかの態様において、動物は哺乳動物である。より好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。別のより好ましい態様において、哺乳動物は、ブタ、ウシ、ウマ、イヌおよびネコ哺乳動物の中から選択される。

【0031】「免疫学的組成物」は、動物において、ポリペプチドまたはタンパク質に対して特異的に向けられる免疫反応を引き出すことが可能なものである。用語「免疫原性の」または「免疫原性」は、ポリペプチドが該ポリペプチドに対して特異的に向けられる免疫反応を引き出す能力を指す。用語「抗原性の」および「抗原性」は、タンパク質またはポリペプチドが、抗体により、該タンパク質またはポリペプチドに対して特異的に結合される能力を指す。

【0032】用語「薬学的に許容しうるキャリアー」は、活性成分、例えば薬剤物質、ポリペプチドまたは核酸の搬送および吸収を可能にし、そして活性成分の生物学的活性の有効性に干渉せず、化学的に不活性であり、そして投与される被験者に毒性でない、物質を指す。

【0033】適切な薬学的キャリアーには、不活性希釈剤または充填剤、水および多様な有機溶媒が含まれる。薬学的に許容しうるキャリアーは、望ましい場合、さらなる成分、例えばフレーバー剤、結合剤、賦形剤およびそれらに匹敵するものを含んでもよい。したがって、経口投与のため、多様な賦形剤、例えばクエン酸を含む錠剤を、多様な崩壊剤、例えばデンプン、アルギン酸および特定の複合ケイ酸塩と、そして結合剤、例えばスクロース、ゼラチンおよびアラビアゴム(acacia)と共に使用してもよい。さらに、滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクが、錠剤目的にしばしば有用である。同様の種類の固

体組成物はまた、軟および硬充填ゼラチンカプセルに使用してもよい。そのための好ましい成分には、ラクトースまたは乳糖および高分子量ポリエチレングリコール類が含まれる。水性懸濁物またはエリキシル剤が経口投与に望ましい場合、キャリアーは、多様な甘味料またはフレーバー剤、着色物質または色素、および望ましい場合、乳化剤または懸濁剤を、希釈剤、例えば水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、水性プロピレングリコールまたはデキストロース溶液あるいはそれらの組み合わせと共に、含んでもよい。キャリアーおよび活性成分は、好ましくは無菌である。投薬型は、望ましい場合、適切に緩衝されていてもよい。

【0034】特定の量の活性化化合物を含む多様な薬剤組成物を調製する方法は、当業者に知られるかまたは明らかであるだろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, ペンシルバニア州イースター, 第15版(1975)を参照されたい。

【0035】用語「細菌感染を治療するまたは予防する」は、細菌の複製を阻害するか、感染の伝播を阻害するか、または生物が自身を宿主内に確立することを妨げるか、または感染により引き起こされる疾患の症状を軽減することを意味する。好ましい態様において、該方法を用い、E.フェカリス感染を治療する。他の好ましい態様において、該方法を用い、化膿連鎖球菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌またはエンテロコッカス・フェシウム感染の1つまたはそれ以上を治療する。治療は、細菌負荷、感染の減少(すなわち減少した伝播)並びに/あるいは食物摂取および/または成長の増加がある場合、療法的に有効とみなされる。

【0036】本発明は、本明細書に記載されるようなharAポリペプチドに対して免疫反応性である抗体に関する。1つの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。別の態様において、抗体はヒト化抗体である。好ましい態様において、抗体はヒト化モノクローナル抗体である。さらに別の態様において、抗体は、harAポリペプチドに機能的に同等であるポリペプチドに対して免疫反応性である。本発明のポリペプチドおよび抗体は、ハイグロマイシンA類似体、バージニアマイシン類、ランカシジンおよびSynercid(登録商標)に耐性である生物の監視および検出に有用である。

【0037】本発明は、動物において、harA仲介生物質耐性の存在を同定するための方法であって、該動物から、そこに存在するいかなる細菌も単離し、該細菌に発現されるポリペプチドを単離し、そして該細菌から単離されたタンパク質への、harAポリペプチドに対して免疫反応性である抗体の結合を検出することにより、harAポリペプチドの存在を同定することを含む、前記方法に関する。1つの態様において、動物は、

抗生物質耐性感染を患う。別の態様において、動物は、抗生物質耐性感染を患わない。したがって、本発明の抗体は、感染動物の治療を指示するのにも、そして抗生物質耐性感染に感染する可能性がある動物または動物集団の監視のためにも、どちらにも有用である。1つの態様において、抗生物質は、ハイグロマイシンA、バージニアマイシン、ランカシジン、またはSynercid（登録商標）である。

【0038】用語「抗体」は、本明細書において、抗原に結合することが可能な免疫グロブリン分子を指す。抗体は、ポリクローナル混合物でもまたはモノクローナルでもよい。抗体は、天然供給源由来の、または組換え供給源由来の損なわれていない(intact)免疫グロブリンでもよいし、そして損なわれていない免疫グロブリンの免疫反応性部分であってもよい。1つの態様において、エピトープは、好ましくはポリペプチド配列の8以上、より好ましくは12以上、そして最も好ましくは20以上のアミノ酸を含む。用語「抗体」は、例えばFv、Fab'、F(ab')₂と共に一本鎖を含む完全な範囲の型を含む。重鎖および軽鎖の遺伝子が、単一のコード配列に組み合わされている一本鎖抗体もまた、用語「抗体」に含まれる。

【0039】用語「免疫反応性」は、本出願において、ポリペプチドまたはタンパク質に特異的に結合することが可能であることを意味する。用語「ヒト化」は、例えば、Jones, Pら, Nature 321: 52-525 (1986) または Tempestら, Biototechnology 9: 266-273 (1991) に記載されるように、抗体の相補性決定領域が、ヒトモノクローナル抗体に転移されていることを意味する。用語「ヒト化」はまた、ヒト重鎖およびヒト軽鎖を両方含む抗体、例えば、J. Immunol. Meth. 231: 11-23 (1999) に記載されるように、任意のヒトまたは非ヒト抗原に対するヒト抗体を発現するよう操作されたトランスジェニックマウスにより産生される抗体などを意味する。

【0040】用語「機能的に同等」は、本明細書において、harAに特異的な抗体に認識されることが可能なタンパク質、すなわち野生型harAタンパク質と実質的に類似の免疫学的反応を引き出すことが可能なタンパク質を指す。したがって、機能的に同等のタンパク質に対して作成された抗体はまた、harAも認識するであろう。

【0041】用語「防御」または「防御すること」は、本明細書において、ワクチンに関し、該ワクチンが、ワクチンに使用された抗原(類)が由来する生物により引き起こされる疾患を予防するまたはその症状を減少させることを意味する。

【0042】用語「有効量」は、投与される被験者において、免疫反応を引き出すのに十分なharA核酸また

はharAポリペプチドの量を指す。免疫反応は、制限なしに、細胞性および/または体液性免疫の誘導を含む可能性がある。

【0043】用語「療法剤」は、好ましくは抗細菌である、いかなる分子、化合物または治療も指し、細菌感染またはそれにより引き起こされる疾患の治療を補助する。用語としての「変異体(類)」は本明細書において、それぞれ参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドの配列を改変してもよいし、または改変しなくてもよい。ヌクレオチド変化は、以下に論じられるように、参照配列にコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および一部切除(truncation)を生じる可能性がある。ポリペプチドの典型的な変異体は、別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なる。一般的に、参照ポリペプチドおよび変異体の配列が、全体的に非常に類似であり、そして多くの領域で同一であるように、相違は制限される。変異体および参照ポリペプチドは、いずれかの組み合わせの、1つまたはそれ以上の置換、付加、欠失により、アミノ酸配列が異なる。置換または挿入アミノ酸残基は、遺伝暗号にコードされるものであっても、またはなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、天然に存在するもの、例えば対立遺伝子変異体でもよいし、または天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然存在変異体は、突然変異誘発技術により、直接合成により、そして当業者に知られる他の組換え法により、作成してもよい。

【0044】本発明のポリペプチドおよび核酸を用い、単離harAポリペプチド、例えば細胞、細胞不含調製、膜性調製、または本明細書に記載されるような結合および機能アッセイに適したいずれかの他の調製中のharAポリペプチドへの化合物の結合を評価してもよい。

【0045】本発明は、harAポリペプチドを発現する生物による感染に対し、動物にワクチン接種するための、harAポリペプチドの使用に関する。本発明はまた、harAポリペプチドに結合する化合物を同定するためのharAポリペプチドの使用にも関する。本発明はまた、harAポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定するためのharAポリペプチドの使用にも関する。1つの態様において、harAポリペプチドの活性は、ATP加水分解であり、すなわちharAポリペプチドは、少なくともATPアーゼとして機能する。他の活性は、さらに以下に記載される。

【0046】本発明は、harAポリペプチドに結合するものを同定するための、化合物のスクリーニング法に関する。本発明において、harAポリペプチドに結合するかまたはその活性に影響を与えるか、あるいはharAポリペプチドを発現する細胞と相互作用するかまたは影響を与えるかどうか決定するためにスクリーニングされる化合物は、「候補」と称される可能性がある。本発明において、いずれかの化合物が、harAポリペプチドに結合するかまたはその活性に影響を与えるか、あるいはharAポリペプチドを発現する細胞と相互作用するかまたは影響を与えるかどうか決定するため、スクリーニングされる複数の化合物（または候補）は、「化合物ライブラリー」と称される可能性がある。化合物、候補、または化合物ライブラリーは、当該技術分野に公知であるように、生合成的に、または化学的合成法により、天然または合成産生化合物の生体内変換により、あるいはこうした方法の組み合わせにより、産生してもよい。用語「結合」または「結合すること」は、本明細書において、特定のアクセシに関連し、当該技術分野に理解されるような、「特異的結合」を指す。同様に、ポリ

ペプチドまたは核酸の「活性」は、恒常的活性または他の細胞構成要素による検出可能シグナルの生成と対照的に、目的の特定のポリペプチドまたは核酸の活性に依存し、そして該活性から生じる活性を意味する。

【0047】本発明は、化合物がharAポリペプチドに結合するかどうか決定するための、化合物のスクリーニング法であって、harAポリペプチドと化合物を、結合に適した条件下で接触させ、そして化合物がharAポリペプチドに結合するかどうかを決定することを含む、前記方法に関する。1つの態様において、結合は、直接検出され、すなわち検出可能シグナルが該化合物に取り込まれている。その1つの態様において、シグナルは、原子（類）の放射性同位体により置換されている化合物の1つまたはそれ以上の原子により、放出される放射線である。別の態様において、結合は、harAポリペプチドの測定により、検出される；その態様において、harAポリペプチドは放射標識されていてもよいし、または化学的に修飾されたアミノ酸を含んでもよいし、またはアミノ酸の抗原性配列（類）を含んでもよいし、または融合パートナー、例えばFLAGエピトープを用いてharAポリペプチドを検出することが可能な融合タンパク質を含んでもよい。別の態様において、結合は間接的に検出され、すなわち、シグナルは、化合物がharAポリペプチドに結合する際、該化合物またはharAポリペプチド以外の分子により生成される。その態様において、シグナルは、別のポリペプチドの産生により、または例えばレポーター遺伝子系におけるように、核酸の発現により、提供されてもよい。

【0048】本発明は、ライブラリー由来の少なくとも1つの化合物が、harAポリペプチドに結合するかど

うが決定するための、ライブラリースクリーニング法であって、(a)harAポリペプチドとライブラリーを、結合に適した条件下で接触させ、(b)ライブラリー由来の少なくとも1つの化合物が、harAポリペプチドに結合するかどうか検出し、そして少なくとも1つの化合物の結合が検出された場合、(c)harAポリペプチドに結合する各化合物を同定することを含む、前記方法に関する。同定される化合物は、以前から知られる化合物である可能性もあるし、あるいは化合物ライブラリーの場合、また、先に単離されていないが、その合成様式、部位、または化合物もしくは化合物ライブラリーが作成された方法に特定の単数もしくは複数の特徴により、または公知の化学的技術を用いた単離により、harAポリペプチドまたはその断片と関連しまたは分離して、同定することが可能である化合物も含まれる可能性もある。本発明は、当該技術分野に公知である高処理スクリーニング法を含みそして包含する。1つの態様において、工程(b)および工程(c)は、共に行い、すなわちライブラリー由来の化合物の結合の検出およびこうした化合物の同定は、カップリングされているかまたは分離不能である。別の態様において、工程(c)、同定は、ライブラリー中の各化合物を単離し、そして各々のこうした化合物に関し、該化合物がharAポリペプチドに結合するかどうか別個に決定することにより、行う。高処理スクリーニング法を用いた、化合物同定のための多くの形態が当該技術分野に公知であり、そしてこれは、その排他的な目録であることを意図しない。

【0049】本発明は、化合物がharA活性を阻害するかどうか決定するための、化合物のスクリーニング法であって：harAポリペプチドの活性を、(i)化合物の非存在下および(ii)存在下で、harA活性を測定するのに適した条件下で測定することを含む；化合物の非存在下のharA活性に比較した化合物の存在下のharA活性の減少は、化合物がharA活性を阻害することを確認し、harAポリペプチドが(a)図2（配列番号2）に示されるアミノ酸配列または(b)図4（配列番号4）に示されるアミノ酸配列に少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む、前記方法に関する。好ましい態様において、さらに以下に記載されるように、測定されるharA活性は、NTPアーゼ活性である。

【0050】本発明は、harAポリペプチドのヌクレオチドトリホスファターゼ（「NTPアーゼ」）活性を阻害する化合物を同定するための、化合物のスクリーニング法に関する。本発明は、化合物がharA NTPアーゼ活性を阻害するかどうか決定するための、化合物のスクリーニング法であって、harA NTPアーゼ活性を測定するのに適した条件下で、(i)化合物の非存在下および(ii)存在下で、別個にharAポリペプチドのNTPアーゼ活性を測定し、そして化合物の非

存在下のharA NTPアーゼ活性に比較し、化合物の存在下のharA NTPアーゼ活性の減少を検出することを含む、前記方法に関する。NTPアーゼ活性を測定する方法は、当該技術分野に公知である。例えば、NTPアーゼ活性は、Hwang, K.Y., Chung, J.H., Kim, S.-H., Han, Y.S.およびCho, Y., "Structure-based identification of a novel NTPase from *Methanococcus jannaschii*," Nature Structural Biology 6(7):691-696(1999)に記載されるように測定してもよい。1つの態様において、NTPアーゼ活性は、ATPアーゼ活性であり、すなわちヌクレオチドはアデノシンである。ATPアーゼ活性を測定する方法は、当該技術分野に公知である。例えば、ATPアーゼ活性は、Zarembinski, T.I.ら, "Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics," PNAS (USA) 95:15189-15193(1998)に記載されるように、または例えばKiel, M.C. Hiroyuki, A., Ganoza, M.C., "Identification of a ribosomal ATPase in *Escherichia coli* cells," Biochimie 81:1097-1108(1999)に記載されるように測定してもよい。上述の刊行物はすべて、本明細書に援用される。別の態様において、ATPアーゼ活性は、harAポリペプチドを発現する細胞を用いて測定される。その態様において、細胞は、プラスミドpMP-bacA1-1(ATCC寄託番号第PTA-2551号)を含む。その別の態様において、細胞は、プラスミドpGEM-T/harA(ATCC寄託番号第PTA-2552号)を含む。別の態様において、ATPアーゼ活性は、単離harAポリペプチドを用いて測定される。別の態様において、ATPアーゼ活性は、ATP依存タンパク質合成により示される。

【0051】本発明はまた、当該技術分野に公知であるように、転写または翻訳に関連するharA活性に関するアッセイを伴う、化合物のスクリーニング法にも関する。例えば、Zubay, G. Ann. Rev. Genet. 7:267-287(1973); また、Pratt, J.M., "coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems," p.179-209, B.D. H

amesおよびS.J. Higgins(監修) Transcription and Translation, A Practical Approach 中, IRL Press, オックスフォード(1984);およびShinabargerら, "Mechanism of Action of Oxazolidinones: Effects of Linezolid and Eperzolid on Translation Reactions," Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41(10):2132-2136(1997)と共に、やはりポリ(U)プログラム化ポリフェニルアラニン合成を記載するKielら(上記)、Murrayら, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(4):947(1998), Mahmoodら, Gene 106:29-34(1991)、およびMao, J.C.-H. J. Bacteriol. 94:80-86(1967)を参照されたい。ABC含有タンパク質に関しては、例えば、TNF- α 刺激に反応した滑膜細胞におけるABC50 mRNAの上昇と共に、刺激に反応したT-リンパ球における翻訳機構、例えば伸長因子eIF2のレベルの増加を記載する、Tyzackら参照されたい。Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J.およびProud, C.G. "ABC50 Interacts with Eukaryotic Initiation Factor 2 and Associates with the Ribosome in an ATP-dependent manner" J. Biol. Chem. 275(44):34131-34139(2000)。出願者らは、上述の刊行物すべてを本明細書に援用する。本発明は、上述のいかなるものでもよい化合物または化合物ライブラリースクリーニング法にも関し、ここで化合物の結合は、harA核酸のmRNAレベルの変化により、1つまたはそれ以上の翻訳因子のリボソームまたはポリソームとの関連における変化により、あるいはいずれかの検出可能開始因子のレベルの変化により、検出される。1つの態様において、harA核酸のmRNAレベルの変化は、上述のような、当該技術分野に公知のものなどのin vitro翻訳アッセイにより、検出される。

【0052】上述のスクリーニング法のいずれかの態様において、harAポリペプチドへの化合物の結合、またはharAポリペプチドの活性、例えばATPアーゼ活性に対する化合物の影響または翻訳に対するその影響は、レポーター系を用いることにより、検出してもよい。1つの態様において、レポーター系は、レポーター遺伝子系である。レポーター遺伝子系は当該技術分野に

公知である。例えば、Schenborn E. および Groskreutz, D. “Reporter gene vectors and assays,” Mol. Biotechnol. 13(1): 29-44 (1999) を参照されたい。その好ましい態様において、レポーター遺伝子系はATPアーゼ活性とカップリングされる。より好ましい態様において、レポーター遺伝子系は、ATP加水分解に反応性である。別の態様において、化合物または化合物群の結合は、ELISAにより検出される。その1つの態様において、ELISAアッセイは、harAポリペプチドに特異的な抗体を利用する。別の態様において、harAポリペプチドは、harAポリペプチドを発現する細胞由来の調製、例えば細胞区画、細胞エンベロップ、細胞壁または膜性調製中にあるか、あるいはharAポリペプチドを産生するin vitro発現系由来であってもよい。他の態様において、harAポリペプチドと化合物の相互作用は、harAを欠く、あるいは破壊されているかまたは非機能性であるharAポリペプチドを発現する細胞における化合物の量に比較した、harAポリペプチドを発現する細胞における化合物の増加した量により、測定され、例えば、さらなる態様において、こうした細胞はJH642 expZ::CAT(ATCC寄託番号第PTA-2480号)またはOG1X harA::ERM(ATCC寄託番号第PTA-2550号)であってもよい。化合物の量を測定する方法の例は、Sutcliffe, J., Tait-Kamradt, A. および Wondrack, L., “Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes Resistant to Macrolides but Sensitive to Clindamycin: a Common Resistance Pattern Mediated by an Efflux System,” Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40(6): 1817-1824 (1996) に見ることが可能である。

【0053】本発明はまた、抗細菌剤、例えばハイグロマイシンA、ランカシジン、バージニアマイシン、ストレプトグラミンまたはストレプトグラミン併用、例えば Synercid、あるいは本明細書に記載されるいかなるものでもよい他の抗細菌剤(類)に対する生物の耐性を減少させる化合物を同定するための、化合物のスクリーニング法であって、harAポリペプチドの発現により、剤に耐性である生物を、化合物と、剤に対する生物の耐性を測定するのに適した条件下で接触させ、そして該化合物が剤に対する生物の耐性を減少させるかどうかを検出することを含む、前記方法にも関する。

【0054】1つの態様において、生物を化合物ライブ

ラリーと接触させ、そして生物の耐性の減少が検出されたら、剤に対する生物の耐性を減少させる、ライブラリー中の各化合物を同定することをさらに含む。同定される化合物は、先に知られる化合物である可能性もあるし、あるいは化合物ライブラリーの場合、また、先に単離されていないが、その合成様式、部位、または化合物もしくは化合物ライブラリーが作成された方法に特定の単数もしくは複数の特徴により、または公知の化学的技術を用いた単離により、harAポリペプチドまたはその断片と関連しまたは分離して、同定することが可能である化合物も含まれる可能性もある。

【0055】上述のスクリーニング法のいずれかの1つの態様において、減少した耐性は、化合物の非存在下でのMICに比較した、生物に対する剤のMICの減少により測定される。その好ましい態様において、MICは、プロス微量希釈アッセイを用いて測定される。好ましい態様において、MICの減少は、少なくとも4倍である。そのより好ましい態様において、MICの減少は、少なくとも約8倍である。さらにより好ましい態様において、MICの減少は、少なくとも約16倍、または少なくとも約32倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約500倍である。MIC、または「最小阻害濃度(minimum inhibitory concentration)」は、本出願において、増殖を完全に阻害する抗生物質の最低濃度である。

【0056】「耐性である」または「薬剤耐性である」(またはそれぞれ「耐性」または「薬剤耐性」)は、本出願において、薬剤(交換可能に「化合物」または「剤」)が生物の特定の株を殺すのに失敗することを意味し、そして本明細書に特に記載されない限り、いかなる定量的測定を伴うことも意図しない(以下を参照されたい)。耐性は、薬剤の存在下で生物の反復される細胞分裂周期に渡り、生物の下位集団(類)の生存として明らかになる可能性があり、すなわち、集団の少なくとも大部分の細胞は殺されるが、ある程度の比率(下位集団(類))が生き残り、そして各細胞分裂周期で数が増加する。耐性はまた、薬剤への生物の最初の曝露の際の、または他の生物またはその株において、薬剤に対する耐性を与えることが知られる遺伝子の生物の感受性株への意図的な導入の際の、生物に対する薬剤のMICに比較した、薬剤のMICの増加として明らかになる可能性もある。好ましくは、MICの変化は、少なくとも約4倍、または少なくとも約8倍、または約16倍、または約32倍、または約50倍、または約100倍、または約500倍である。耐性はまた、特定の抗細菌剤および特定の試験生物を用いたディスク拡散アッセイにおける阻害ゾーンの非存在により、明らかになる可能性もある。耐性は、特定の生物、またはその株に固有であり、そしてスクリーニング実験において、他の関連生物また

はその株との比較により、生物またはその株の増加した生存によってのみ、同定される可能性がある。

【0057】これらの方法のいずれかの態様において、harA破壊技術、例えば本明細書に以下に記載されるもの、または当該技術分野に知られる他のものを用い、耐性生物から対照（感受性）生物を産生してもよく、ここで耐性はharAにより仲介される。同様に、本明細書に開示される破壊技術の一般的な適用可能性は、薬剤耐性がharA遺伝子の発現により仲介される、いかなる生物を用いて、スクリーニングを行うことも可能にする。

【0058】本発明はまた、ハイグロマイシンA、バージニアマイシン、ランカシジンまたはストレプトグラミンもしくはストレプトグラミン併用、例えばSynergicidに耐性である生物または生物団におけるharA仲介耐性の同定のための方法であって、薬剤に耐性である生物を単離し、該生物においてharA遺伝子を破壊するのに適したプラスミドを産生し、該生物を該プラスミドで形質転換し、形質転換生物を薬剤と接触させ、そして形質転換生物において、対照生物に比較した、薬剤に対する感受性の増加を測定し、それにより、該生物がharA仲介薬剤耐性を示すことを確認することを含む、前記方法にも関する。本明細書において、句「感受性の増加」は本明細書に用いられるように、「耐性の減少」と同等である。1つの態様において、harA遺伝子を破壊するのに適したプラスミドは、EcoRVおよびEcoRIを用いて切除された、枯草菌harA遺伝子の内部断片を含む。別の態様において、harA遺伝子を破壊するのに適したプラスミドは、それぞれ配列番号5および配列番号6のセンスおよびアンチセンスプライマーを用いたPCRにより生成されたE.フェカリスharA遺伝子の内部断片を含む。その好ましい態様において、プラスミドは、大腸菌およびE.フェカリスにおいて発現するerm決定基を持つ大腸菌ベクターpVA891を含む。1つの態様において、対照は耐性生物である（すなわち破壊プラスミドで形質転換されていない）。別の態様において、対照は破壊構築物を欠くプラスミドで形質転換された耐性生物である。

【0059】本発明は、抗細菌剤が、harA仲介薬剤耐性を示す生物を治療するのに有効であるか決定するための、E.フェカリスのハイグロマイシンA耐性株の使用に関する。1つの態様において、E.フェカリスのハイグロマイシンA耐性株は、株OG1X(ATCC寄託番号第PTA-3272号)である。

【0060】本発明はまた、抗細菌剤が、harA仲介薬剤耐性を示す生物を治療するのに有効であるか決定するための、枯草菌のハイグロマイシンA耐性株の使用にも関する。1つの態様において、枯草菌のハイグロマイシンA耐性株は、株JH642(ATCC寄託番号第PTA-3271号)である。

【0061】本発明はまた、剤がharA仲介薬剤耐性を示す第一の生物に対して有効であるか決定するための、抗細菌剤のスクリーニング法であって、(a)MIC₁およびMIC₂を測定し、そして(b)比MIC₁/MIC₂を計算することを含み、約4未満の比は、剤が第一の生物に対して有効であることを確認し；MIC₁はharA仲介薬剤耐性を示す第二の生物に対する剤のMICであり；そしてMIC₂はharA仲介薬剤耐性を示さない第三の生物に対する剤のMICである、前記方法にも関する。該方法の1つの態様において、第一の生物は、E.フェカリス、E.フェシウム、黄色ブドウ球菌、化膿連鎖球菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、またはセルピュリナ・ヒオジセンテリエである。耐性生物は、例えば、ヒトを含む動物集団を感染させる株の監視、または実験室株のスクリーニングにより同定することが可能であり；harA仲介耐性は、例えば、耐性生物におけるharA遺伝子の破壊による感受性の授与により、本明細書に記載されるように同定される。別の態様において、薬剤は、ハイグロマイシンA、バージニアマイシン、ランカシジン、ストレプトグラミンまたはストレプトグラミン併用、例えばSynergicidである。該方法の別の態様において、第一の生物および第二の生物は、同じ生物である。該方法の別の態様において、第二の生物は、E.フェカリス株OG1X(ATCC寄託番号第PTA-3272号)または枯草菌株JH642(ATCC寄託番号第PTA-3271号)である。別の態様において、第二の生物は、破壊されたharA遺伝子を含む生物の復帰突然変異体である。その別の態様において、第二の生物は、E.フェカリス株OG1XharA::ERM(ATCC寄託番号第PTA-2550号)または枯草菌株JH642expZ::CAT(ATCC寄託番号第PTA-2480号)の復帰突然変異体である。該方法の別の態様において、第三の生物は、harA発現が破壊された第二の生物の株であり；その好ましい態様において、第一の生物および第二の生物は同じ生物である。別の態様において、第三の生物は、E.フェカリス株OG1XharA::ERM(ATCC寄託番号第PTA-2550号)または枯草菌株JH642expZ::CAT(ATCC寄託番号第PTA-2480号)である。さらに別の態様において、第二の生物は、E.フェカリス株OG1X(ATCC寄託番号第PTA-3272号)であり、そして第三の生物は、OG1XharA::ERM(ATCC寄託番号第PTA-2550号)である。さらに別の好ましい態様において、第二の生物は、枯草菌株JH642(ATCC寄託番号第PTA-3271号)であり、そして第三の生物は、JH642expZ::CAT(ATCC寄託番号第PTA-2480号)である。他の態様において、例えば、第二および第三の生物は、それぞれ、生物の選択された耐性および感受性株で

あってもよく、これは抗細菌剤をスクリーニングするのに特に適しており、一方、第一の生物は、関連するが、例えば感染した動物集団から単離された生物の耐性株であってよい。他の態様において、例えば、第三の生物は、第一の生物の天然感受性株、あるいは第一の生物のノックアウトまたは破壊突然変異体である。他の態様において、 MIC_1 / MIC_2 は約 10 未満である。

【0062】上述の方法のいずれかの態様において、*harA* ポリペプチドは、限定されるわけではないが、配列番号 2 または配列番号 4 に示される配列に少なくとも 75% 同一、あるいは配列番号 2 または配列番号 4 に示されるアミノ酸配列に少なくとも 95% 同一または 100% 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または本明細書に記載される変異体、断片のいずれかを含む、上に同定される *harA* ポリペプチドのいずれかである。

【0063】本発明は、*harA* ポリペプチドをコードする単離核酸に関する。1つの態様において、核酸は *E. フェカリス* から単離され、そして好ましくは *E. フェカリス* 株 OG1X (ATCC 寄託番号第 PTA-3272 号) から単離される。別の態様において、核酸は枯草菌から単離され、そして好ましくは枯草菌株 JH642 (ATCC 寄託番号第 PTA-3271 号) から単離される。

【0064】本発明は、*harA* ポリペプチドをコードする単離核酸であって：(a) 図 1 (配列番号 1) に示されるヌクレオチド配列に少なくとも 75% 同一であるヌクレオチド配列；(b) (a) のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；および (c) (a) または (b) のヌクレオチド配列に縮重しているヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、前記核酸に関する。1つの態様において、核酸は、図 1 (配列番号 1) に示されるヌクレオチド配列に少なくとも 85% 同一であるヌクレオチド配列を含む。好ましい態様において、ヌクレオチド配列は、図 1 (配列番号 1) に示されるヌクレオチド配列から本質的になる。別の態様において、核酸は、図 2 (配列番号 2) に示されるアミノ酸配列から本質的になるアミノ酸配列を含む *harA* ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。さらに別の態様において、ヌクレオチド配列は、図 2 (配列番号 2) に示されるアミノ酸配列をコードする。さらに別の態様において、ヌクレオチド配列は、図 1 (配列番号 1) に示されるヌクレオチド配列に少なくとも 75% 同一であるが、100% 未満同一である。さらに別の態様において、ヌクレオチド配列は、図 1 (配列番号 1) に示されるヌクレオチド配列である。

【0065】本発明は、*harA* ポリペプチドをコードする単離核酸であって：(a) 図 3 (配列番号 3) に示されるヌクレオチド配列に少なくとも 75% 同一であるヌクレオチド配列；(b) (a) のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；および (c) (a) ま

たは (b) のヌクレオチド配列に縮重しているヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、前記核酸に関する。1つの態様において、核酸は、図 3 (配列番号 3) に示されるヌクレオチド配列に少なくとも 85% 同一であるヌクレオチド配列を含む。好ましい態様において、ヌクレオチド配列は、図 3 (配列番号 3) に示されるヌクレオチド配列から本質的になる。別の態様において、核酸は、図 4 (配列番号 4) に示されるアミノ酸配列から本質的になるアミノ酸配列を含む *harA* ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。さらに別の態様において、ヌクレオチド配列は、図 4 (配列番号 4) に示されるアミノ酸配列をコードする。さらに別の態様において、ヌクレオチド配列は、図 3 (配列番号 3) に示されるヌクレオチド配列に少なくとも 75% 同一であるが、100% 未満同一である。さらに別の態様において、ヌクレオチド配列は、図 3 (配列番号 3) に示されるヌクレオチド配列である。

【0066】本出願において、用語「核酸」は、一般的にポリヌクレオチドを含み、これは、ゲノム DNA および cDNA、合成 DNA、および RNA を含んでもよく、このいずれも必要に応じ、転写または翻訳前に除去され、あるいは選択的スプライシングされあるいは別の方式でプロセッシングされるイントロン、または他の核酸を含んでもよく、そして本明細書に言及されるすべての核酸は、合成ポリヌクレオチドあるいは 1 つまたはそれ以上の非天然存在ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含んでもよく、これらはすべて当該技術分野に公知である。

【0067】本出願において、核酸は、1 つまたはそれ以上のヌクレオチド置換または代替コドンの含有により、参照核酸と異なるが、参照核酸にコードされるポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする場合、参照核酸に関し、「縮重」している。本発明はさらに、本明細書に開示されるものに縮重しているすべての配列に関する。一般の当業者は、コドン使用表が公共に広く入手可能であるため、特定の生物に好ましい置換および代替コドンを日常的に決定することが可能であると期待される。用語「縮重」が、代替翻訳開始および終結コドン、並びに当該技術分野に公知であり、そして本明細書にさらに記載される、異なる生物で起こることが知られるような、一般的な代替コドン使用を含む、代替コドン使用を含むとさらに理解されるべきである。

【0068】用語「核酸」は、本明細書において、本発明のポリペプチド、特に細菌ポリペプチド、そしてさらに特に図 2 (配列番号 2) に示されるアミノ酸配列を有する *E. フェカリス harA* のポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを含む。該用語はまた、該ポリペプチドをコードする単一の連続する領域または断続する領域 (例えば組込みファージまたは挿入配列ま

たは編集により中断されるもの)を、やはりコードおよび/または非コード配列を含んでもよいさらなる領域と共に含むポリヌクレオチドも含む。

【0069】2つのヌクレオチド配列の同一性の度合い(%)は、本明細書に記載されるとおりであり、ポリヌクレオチド比較の好ましいパラメーターは以下を含む：比較マトリックス：一致=+10、ミスマッチ=0；ギャップペナルティ：50；およびギャップ長ペナルティ：3を用いた、アルゴリズム：Needleman および Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453(1970)。このアルゴリズムは、Genetics Computer Group、ウィスコンシン州マディソンから「gap」プログラムとして入手可能である。これらは、核酸比較のデフォルトパラメーターである。

【0070】好ましいポリヌクレオチド態様は、さらに、参照配列に少なくとも75、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離核酸を含む。1つの態様において、参照配列は配列番号1である。別の態様において、参照配列は配列番号3である。1つの態様において、核酸は、配列番号1の配列に同一の配列を含む。別の態様において、核酸は、配列番号3の配列に同一の配列を含む。さらに別の態様において、核酸は、参照配列に比較した際、特定の整数までのヌクレオチド改変を含み、前記改変は、少なくとも1つのヌクレオチド欠失、移行および塩基転換を含む置換、または挿入からなる群より選択され、そして前記改変は、参照配列中のヌクレオチドの中に個々に、あるいは参照配列内の1つまたはそれ以上の隣接する基で点在し、参照ヌクレオチド配列の5'または3'末端位で、あるいはこれらの末端位の間どこかで起こってもよい。好ましい態様において、整数は50未満である。より好ましい態様において、整数は40未満、30未満、または10未満である。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の改変は、このコード配列にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を生成し、そしてそれによりこうした改変後、ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを改変してもよい。

【0071】用語としての「変異体(類)」核酸は、本明細書において、参照核酸と異なるが、本質的な特性を保持する核酸である。核酸の典型的な変異体は、別の参照核酸とヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配列における変化は、参照ポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を改変してもよいし、または改変しなくてもよい。ヌクレオチド変化は、参照配列にコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および一部切除を生じる可能性がある。一般的に、参照ポリペプチドおよび変異体の配列が、全体的に非常に類似であり、そして多くの領域で同一であるよ

うに、相違は制限される。核酸の変異体は、天然に存在するもの、例えば対立遺伝子変異体でもよいし、または天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。核酸の非天然存在変異体は、突然変異誘発技術により、直接合成により、そして当業者に知られる他の組換え法により、作成してもよい。変異体は、マーカー配列、例えばpQEベクター(Qiagen, Inc.)に提供され、そしてGentzら, Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 86:821-824(1989)に記載されるようなヘキサヒスチジンペプチド、またはHAタグ(Wilsonら, Cell 37:767(1984))をコードする配列を含んでもよい。

【0072】本発明はまた、harA核酸コード誘導体、harAコードタンパク質の類似体および変異体、並びにharAアンチセンス核酸にも関する。容易に明らかであるように、本明細書において、「harAコードタンパク質の断片または部分をコードする核酸」は、harAコードタンパク質の列挙される断片または部分のみをコードする核酸を指すと解釈すべきであり、そしてharAコードタンパク質の他の近接する部分を連続する配列と解釈すべきではない。

【0073】本発明は、異種プロモーターと機能的な関連にある、本明細書に記載されるようないかなるharA核酸にも関する。その1つの態様において、核酸はさらに、原核細胞で活性である複製起点を含む。その好ましい態様において、核酸はさらに、本明細書に記載されるharA核酸のいずれかを含む組換えベクターを含む。より好ましい態様において、ベクターは、pMP、pGEM-T、pVA891、pUC8、pUC9、pBR322、pBR329、pPL、pKK223およびpQE50より選択される。本発明はまた、上述のベクターのいずれかを含む細胞にも関する。

【0074】本発明は、pMP-bacA1-1(ATCC寄託番号第PTA-2551号、2000年9月26日寄託)であるベクターに関する。本発明はまた、pGEM-T/harA(ATCC寄託番号第PTA-2552号、2000年9月26日寄託)であるベクターにも関する。

【0075】本発明は、真核細胞で活性な複製起点をさらに含む、本明細書に記載されるいかなる核酸にも関する。その1つの態様において、核酸はさらに、組換えベクターを含む。その好ましい態様において、ベクターは、pcDNA-3、pcEXV、酵母ベクター、例えばYep13、Yip5、pYAC、例えばpYAC3、および融合タンパク質ベクター、例えばpMal、pTrxFus、およびpGEXであり、これらのすべては当該技術分野に公知である。その好ましい態様において、本発明はベクターを含む真核細胞に関する。より好ましい態様において、真核細胞は、CHO、COS、

COS-7、NIH-3T3、HEK-293、MDC KまたはLM(tk-)細胞、または昆虫細胞、例えば Sf-9またはSf-21細胞、またはアフリカツメガエル(Xenopus)細胞、例えば卵母細胞またはアフリカツメガエル細胞株であり、これらのすべては当該技術分野に公知である。

【0076】本発明は、harAポリペプチドをコードし、そしてさらにクロラムフェニコール耐性挿入物を含むヌクレオチド配列を含む、単離核酸に関する。その1つの態様において、核酸はさらに、組換えベクターを含む。その好ましい態様において、本発明は、組換えベクターを含む細胞に関する。本発明はさらに、クロラムフェニコール耐性挿入物を含む、枯草菌株JH642 ex pZ::CAT(ATCC寄託番号第PTA-2480号、2000年9月26日寄託)である細胞に関する。

【0077】本発明は、harAポリペプチドをコードし、そしてさらにエリスロマイシン耐性挿入物を含むヌクレオチド配列を含む、単離核酸に関する。その1つの態様において、核酸はさらに、組換えベクターを含む。その好ましい態様において、本発明は、組換えベクターを含む細胞に関する。本発明はさらに、エリスロマイシン耐性挿入物を含む、エンテロコッカス・フェカリス株OG1X harA::ERM(ATCC寄託番号第PTA-2550号、2000年9月26日寄託)である細胞に関する。

【0078】本明細書に記載されるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(「ATCC」)における寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条件下に行われた。本明細書に記載される寄託は、請求される核酸、ベクター、プラスミドおよび細胞が容易に入手可能であり、そして関連するその過程、方法および使用がすべて、本明細書に開示されるヌクレオチドおよびアミノ酸配列、並びに当該技術分野に公知の方法を用いて、容易に行われるように、単に当業者に対する便宜として提供される。

【0079】エンテロコッカス・フェカリス株OG1Xは、オクラホマ大学(Enterococcus@ouhsc.eduに連絡されたい)、Biomedical Research Center Building, Rm. 356, The University of Oklahoma, 975 NE 10th Street, Oklahoma City, OK 73104, USAより公的に入手可能である。株OG1Xは、2001年4月12日にATCCに寄託され、そしてATCC寄託番号第PTA-3272号を与えられている。枯草菌株JH642は、オハイオ州立大学のバチルス遺伝子ストックセンター(BGSC)より公的に入手可能である。zeigler.1@osu.eduまたはDr. D.R. Zeigler, D

partment of Biochemistry, The Ohio State University, 484 West Twelfth Avenue, Columbus, OH 43210, USAに連絡されたい。株JH642もまた、2001年4月12日にATCCに寄託され、そしてATCC寄託番号第PTA-3271号を与えられている。

【0080】本発明の核酸は、成熟タンパク質、リーダー配列を加えた成熟タンパク質(プレタンパク質と称してもよい)、プレタンパク質のリーダー配列でない、1つまたはそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、またはリーダー配列およびポリペプチドの活性および成熟型を産生するプロセシング工程中、一般的に除去される、1つまたはそれ以上のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレプロタンパク質をコードしていてもよい。本発明の核酸はまた、harAポリペプチドの同定、単離または検出に有用な融合タンパク質パートナーを加えた成熟タンパク質をコードしていてもよい。融合タンパク質パートナーは、当該技術分野に公知である。

【0081】本発明は、本明細書に記載されるようなharA核酸であって、核酸の発現が、融合パートナーおよびharAポリペプチドを含む融合ポリペプチドを生じるように、融合パートナーをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、前記核酸に関する。

【0082】本発明は、harA遺伝子を含む生物を同定するための、harAポリペプチドをコードする核酸の使用に関する。こうした使用は、harA遺伝子を含むかまたは発現する生物、特に本明細書に記載されるようなエンテロコッカス属、連鎖球菌属またはヘモフィルス属生物による感染を患うまたは該感染を受けやすい個体または集団を同定し、単離しそして治療するための、動物、特に哺乳動物、そしてさらに特にヒトの個々の動物および集団の監視のための方法を提供する。

【0083】本発明は、薬剤耐性感染性生物を同定するための方法であって、該生物から核酸を単離し、そして中程度または非常にストリンジентな条件下で、harA核酸が該生物由来の核酸にハイブリダイズするかどうか決定することを含む、前記方法に関する。1つの態様において、感染性生物は、感染した動物から単離される。別の態様において、harA核酸は、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは約15から約50ヌクレオチドを含む。別の態様において、ハイブリダイゼーションアッセイに用いられるharA核酸は、約50から約150ヌクレオチドである。その好ましい態様において、核酸は、約90から約120ヌクレオチドである。本発明は、harA核酸および関連核酸を同定するのに必要とされるような、ハイブリダイゼーションアッセイ、例えばFISH(蛍光in situハイブリダイゼーション)および増幅アッセイ、例えばPCR両方に

用いられるプローブを含む。これらは、当該技術分野に公知である、核酸プローブを用いる多くの方法のわずかに2つの例である。

【0084】本発明は、中程度にストリンジントな条件下で、図1（配列番号1）に示されるヌクレオチド配列を含む核酸にハイブリダイズする単離核酸を提供する。1つの態様において、核酸は、約15から約40ヌクレオチドを含む。

【0085】本発明は、中程度にストリンジントな条件下で、図3（配列番号3）に示されるヌクレオチド配列を含む核酸にハイブリダイズする単離核酸を提供する。1つの態様において、核酸は、約15から約50ヌクレオチドを含む。別の好ましい態様において、核酸は、少なくとも約30ヌクレオチドを含む。別の好ましい態様において、核酸は、約50ヌクレオチド未満を含む。1つの態様において、上述の核酸は、少なくとも30ヌクレオチドを含む。

【0086】「ストリンジントな条件」および「ストリンジントなハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーションが、配列間に少なくとも95%そして好ましくは少なくとも97%の同一性がある場合のみ起こるであろうことを意味する。本発明の実施に有用なハイブリダイゼーション条件の例は、本明細書に以下に記載される。

【0087】配列番号1および/または3の配列由来のオリゴヌクレオチドである、本発明の核酸は、本明細書に同定される核酸が、全体としてまたは部分的に、感染した組織の細菌中で転写されているかどうかを決定するため、本明細書に記載されるような方法および過程で用いてもよいが、好ましくはPCRのため、用いられる。こうした配列はまた、感染の種類および病原体が達成した感染の段階の診断に有用性を有するであろうことが認識される。細菌および/または感染組織のharA核酸配列の検出は、薬剤耐性の診断に有用性を有することがさらに認識される。

【0088】上に論じられるような本発明の核酸は、RNA、cDNAおよびゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用し、harAポリペプチドをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンを単離し、そしてharA遺伝子に高い配列類似性を有する他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離してもよい。こうしたプローブは、一般的に、少なくとも15塩基を含むであろう。好ましくは、こうしたプローブは、少なくとも30塩基を有するであろうし、そして少なくとも50塩基を有してもよい。特に好ましいプローブは、少なくとも30塩基を有するであろうし、そして50塩基以下を有するであろう。

【0089】本発明はまた、配列番号1（または配列番号3）に示されるヌクレオチド配列の完全遺伝子を含む適切なゲノム、cDNAまたは他のライブラリーを、配

列番号1（または配列番号3）に示される前記ポリヌクレオチド配列またはその断片の配列を有するプローブを用いて、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でスクリーニングし；そして前記DNA配列を単離することにより、得ることが可能なポリヌクレオチド配列から本質的になる核酸も提供する。こうしたポリヌクレオチドを得るのに有用な断片には、例えば、本明細書の他の場所に記載されるプローブおよびプライマーが含まれる。

【0090】例えば、harA遺伝子のコード領域を、配列番号1に提供されるDNA配列を用いてスクリーニングすることにより単離し、オリゴヌクレオチドプローブを合成してもよい。本発明の遺伝子のものに相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドをその後、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングするのに用い、プローブがライブラリーのどのメンバーにハイブリダイズするかを決定する。相同性クローニングまたは発現クローニングに有用なcDNAおよびゲノムDNAライブラリーを含む、病原性生物由来の核酸を含むライブラリーは、当該技術分野に公知の方法により、容易に調製される。

【0091】本発明はまた、E.フェカリス、harA耐性E.フェカリス、E.フェカリス特異的アミノ酸またはヌクレオチド配列、あるいは抗E.フェカリス抗体の検出のためのキットであって、少なくとも本発明のポリペプチド、核酸、または抗体を有する容器を含む、前記キットにも関する。1つの態様において、容器は、図1（配列番号1）に示されるヌクレオチド配列を含む核酸に、非常にストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸を少なくとも含む。その好ましい態様において、核酸は、15-40ヌクレオチドを含む。別の態様において、容器は、図3（配列番号3）に示されるヌクレオチド配列を含む核酸に、非常にストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸を少なくとも含む。その好ましい態様において、核酸は、15-40ヌクレオチドを含む。

【0092】用語「オープンリーディングフレーム」または「ORF」は、核酸のコード領域を意味し、すなわち開始および停止コドン、並びに複数の介在する天然に存在するアミノ酸をコードするヌクレオチド3つ組または「コドン」を含む。

【0093】「宿主細胞」は、外因性ポリヌクレオチド配列で形質転換またはトランスフェクションされている、あるいは形質転換またはトランスフェクションが可能である細胞である。

【0094】以下の例は、例示のみであり、そして本発明の範囲を制限することを意図しない。

【0095】

【実施例】出願者らは、抗細菌剤ハイグロマイシンAおよび他の構造的に関連しない剤に耐性であるE.フェカ

リスおよび枯草菌の株を発見し、そしてその耐性を与える「harA」と称される、先に性質決定されていなかった内因性遺伝子産物を同定した。harA核酸およびポリペプチドの単離および性質決定を以下に記載する。本明細書に引用されるすべての特許、特許出願、および刊行物は、完全に本明細書に援用される。

【0096】harA核酸の単離

出願者らは、枯草菌株JH642が、非極性ハイグロマイシンA類似体に天然に耐性であることを観察した。ハイグロマイシンA類似体は、当該技術分野に公知である；が、耐性スクリーニングに適したハイグロマイシンの例は、例えば、PCT国際出願WO00/32616、WO99/57125およびWO99/57127に見出すことが可能である。潜在的な耐性決定基を同定する試みの中で、出願者らは、枯草菌ゲノムプラスミドライブラリーを用いた異種機能的クローニング戦略を用い、マルチコピープラスミドに対して増幅した際、感受性黄色ブドウ球菌株において、ハイグロマイシン耐性表現型を生じさせるであろう遺伝子を同定した。以下により詳細に記載されるこの選択は、先に性質決定されていなかった遺伝子expZの同定を導き、該遺伝子の産物は、それぞれバージニアマイシンおよびエリスロマイシンの細胞内集積を妨げる、オルソログなブドウ球菌タンパク質、vgaおよびmsrAに類似性を持つATP結合カセット(ABC)タンパク質をコードすると予測された。expZの過剰発現は、黄色ブドウ球菌において、いくつかの構造的に関連しない剤への高レベルの耐性を与えるのに十分である。本明細書に記載される本発明に関し、限定することを意図しない詳細な方法が、以下に提供される。

【0097】プラスミドライブラリーの構築および枯草菌expZ遺伝子のクローニング

その産物が、ハイグロマイシン類に対するあるレベルの内因性の耐性を確立する際に重要である可能性がある遺伝子を同定するため、出願者らは、以下のように、ハイグロマイシン類似体への増加したレベルの耐性を持つ黄色ブドウ球菌形質転換体に関し、大腸菌-黄色ブドウ球菌シャトルベクターpMP20にクローニングされた枯草菌染色体DNA部分の組換えライブラリーをスクリーニングした。

【0098】染色体DNAを、Lプラス中で増殖させた枯草菌株JH642の100 ml培養から抽出し、Sau3Aで部分的に消化し、そして1%アガロースゲル中での電気泳動により、分画した。2-4 kbまでのサイズに対応する分画を精製し、そしてBamHIで消化し、そしてアルカリホスファターゼで脱リン酸化しておいたpMP20との連結に用いた。連結されたDNAを用い、アンピシリン耐性に関する選択を用い、エレクトロポレーションにより、大腸菌DH5を形質転換した。形質転換体コロニーをプールし；プラスミドDNA

混合物を抽出し、そしてエリスロマイシン(2 μg/ml)および2 μg/mlのWO 00/32616の実施例68であり、そして本明細書において「化合物1」と称される非極性ハイグロマイシンA類似体、3-(4-(2S,4S,5R)-5-(3-(2,4-ジクロロ-フェノキシ)-1-メチル)-(1E)-プロペニル)-4-ヒドロキシ-テトラヒドロ-フラン-2-イルオキシ)-3-ヒドロキシ-フェニル)-2-メチル-N-((3aS,4R,5R,6S,7R,7aR)-4,6,7-トリヒドロキシ-ヘキサヒドロ-ベンゾ(1,3)ジオキサール-5-イル)-(2E)-アクリルアミドを含むプレート上の選択を用い、エレクトロポレーションにより黄色ブドウ球菌RN4220を形質転換するのに用いた。

【0099】ベクターで形質転換された黄色ブドウ球菌細胞は、化合物1のこのレベルに感受性であった。プラスミド分離および戻し交雑実験により、枯草菌染色体由来のDNA部分を宿するプラスミドが、黄色ブドウ球菌において、ハイグロマイシンA耐性を与えたことが確認された。化合物1のMICは、これらの株において、pMP20形質転換体の0.2 μg/ml以下から、組換えプラスミドで形質転換された細胞の50 μg/mlに増加した。耐性の同様の増加は、ランカシジン、バージニアマイシンおよびSynercid(登録商標)に関してもまた観察された。

【0100】いくつかのクローニングされた挿入物の末端のDNA配列解析およびそれに続く枯草菌ゲノム配列データベース(<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/>)の検索は、耐性表現型が、各プラスミド上の「expZ」遺伝子の存在と関連することを明らかにした。枯草菌遺伝子expZは、黄色ブドウ球菌Vgaおよび表皮ブドウ球菌MsrAタンパク質を含むATP結合カセット(ABC)タンパク質ファミリーのメンバーに類似性を持つ、先に性質決定されていなかったORFである。expZ、vgaおよびmsrAはすべて、膜貫通ドメインを欠くかまたは膜貫通パートナーと関連し、そして各々、タンデムに配置された2つのABCサブユニットからなり、ABC-ABC共有結合二量体を形成する。類似性は、推定上のヌクレオチド結合ドメインを含む領域で最高である。しかし、いくつかの酵母ABCタンパク質との相同性により、expZがmRNAの翻訳に関する新規リボソームタンパク質をコードする可能性があることが示唆される。expZおよび他のタンパク質の間は低レベルの配列類似性しかなく、そしてABCを含む多様なタンパク質中には低い類似性しかないため、expZタンパク質の内因性の活性は、その配列に基づいて決定することが不可能である。しかし、出願者らは、harA遺伝子の発現が、ハイグロマイシンAおよび他の化合物、例えばバージニアマイシン、ランカシジンおよびSyn

er cid (登録商標)に耐性を与えることを立証し、そして該遺伝子のhar A特異的破壊が、ハイグロマイシンAに対する感受性を再確立することを示した(以下を参照されたい)。したがって、出願者らは、該遺伝子を、「ハイグロマイシンA耐性(Hy gromycin A Resistance)」を表す「har A」と改名することを提唱する。

【0101】突然変異har A核酸

枯草菌har A: CAT挿入突然変異体の生成

har A: CAT挿入突然変異体を発現する枯草菌株は、統合プラスミドpJPM1を用いた単回クロスオーバー組換えにより、産生された。プラスミドpJPM1は、枯草菌において、クロラムフェニコール耐性を与える黄色ブドウ球菌プラスミドpC194のcat遺伝子を持つpSK誘導体である。プラスミドpJPM1は、枯草菌の複製起点を含まず、そして該宿主で複製することが不可能である。しかし、枯草菌染色体と相同な領域を提供するいずれかのDNA断片がこのプラスミドに挿入されると、該プラスミドは、枯草菌コンピテント細胞を、高頻度でcat耐性に形質転換する能力を獲得する。組込みは、キャンベル型(単回クロスオーバー)組換え事象を介して起こり、これは、ベクターのどちらかの端にクローニングされた領域の複製を生じる。組込み事象の逆転は、プラスミドの正確な切除および染色体上の遺伝子構造の回復を導く。枯草菌har A遺伝子の内部断片を、EcoRVおよびEcoRIを用いて切除し、そしてpJPM1生成プラスミドpJPM1-expZ1の適合する部位にサブクローニングした。プラスミドpJPM1-expZ1を用い、天然コンピテント枯草菌株JH642(ハイグロマイシン耐性)を形質転換し、そして形質転換体を、クロラムフェニコール(5 µg/ml)を用いて選択した。har A: CAT挿入突然変異体は、PCRにより確認し、そして該株を「JH642 expZ: CAT」と名づけた。株JH642 expZ: CATは、ハイグロマイシン類似体、並びにランカシジンおよびバージニアマイシンを含む他の関連しない抗生物質に高感受性であった。株JH642 expZ: CATは、2000年9月26日にATCCに寄託され、そして寄託番号第PTA-2480号を与えられた。

【0102】エンテロコッカス・フェカリスhar A: ERM挿入突然変異体の生成

E.フェカリスhar A遺伝子の内部部分に対応するPCR産物を生成し、大腸菌およびE.フェカリスにおいて発現するerm決定基を持つ大腸菌ベクターpVA891を用いることにより、pVA891-expZを得た。簡潔には、内部har Aプライマー(センス: 5'-TCTAGATATCACGATGGATACC-3'-配列番号5);(アンチセンス: 5'-TCTAGATTGCCGTACTTATCACCC-3'-配列

番号6)を、E.フェカリス・ゲノムテンプレートDNAと共に用い、655 bpのPCR産物を生成した。PCR生成断片を、QIAquick PCR精製キットを用いて精製し、そしてT-AクローニングプラスミドpGem-T Easyにクローニングした。続いてEcoRIを用いて断片を切除し、S & S Elu-Quickキットを用いてゲル精製し、そしてpVA891のEcoRI部位にクローニングした。連結物を、エリスロマイシン耐性(200 µg/ml)に関する選択を用いて、大腸菌DH5に形質転換し; pVA891-expZを生じた。プラスミドpVA891-expZを、エレクトロポレーションにより、E.フェカリスOG1X(ハイグロマイシン耐性)に導入し、ここで相同組換えを介して発生した組込み体を、エリスロマイシン(20 µg/ml)を用いて選択した。har A: ermノックアウト株は、PCRにより確認し、そして該株を「OG1X har A: erm」と名づけた。株OG1X har A: ermは、非極性ハイグロマイシンA類似体、ランカシジン、バージニアマイシン、およびSynercid(登録商標)に高感受性であった。復帰突然変異体(すなわち耐性株)は、エリスロマイシンの非存在下で、数世代増殖させることにより得て、そしてハイグロマイシンAへの耐性およびエリスロマイシンへの感受性に関しスクリーニングすることにより同定することが可能であった。OG1X har A: ermは、2000年9月26日にATCCに寄託され、そして寄託番号第PTA-2550号を与えられた。

【0103】大腸菌における組換え産生タンパク質の精製

有効な組換えタンパク質産生のためには、遺伝子はプロモーター配列に連結されていなければならない。細菌系で使用するためのプロモーターはまた、望ましいポリペプチドをコードするDNAに機能可能であるように連結されたシャイン-ダルガーノ配列を含むであろう。タンパク質精製の好ましい方法において、遺伝子は、コードされるタンパク質がいくつかのヒスチジン残基(つまり「ヒスチジntag」)を取り込むように、5'端またはいくつかの他の位で修飾される。このヒスチジntagは、米国特許第4,569,794号に記載される単一工程タンパク質精製法である固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)の使用を可能にする。IMAC法は、未精製細胞抽出物から出発した、実質的に純粋なタンパク質の単離を可能にする。

【0104】大腸菌においてE.フェカリスおよび枯草菌har Aタンパク質を発現するベクターの産生
大腸菌においてhar Aタンパク質を発現するのに適した発現ベクターを調製した。枯草菌har Aコード配列は、テンプレートとして枯草菌株JH642ゲノムDNAを用い、順方向プライマーB-EXPZ-EF2

(5' - CATATGAAAGAGATCGTAACA
TTAACAAACG - 3' ; 配列番号7) および逆方向
プライマーB - EXPZ - ER2 (5' - GGATC
CTTAGTCTTTTTTGTCTTGATGATC
C - 3' ; 配列番号8) を用い、PCRクローニングし
た。E . フェカリス *harA* コード領域は、プライマー
E - EXPZ - EF1 (5' - CATATGTCGAA
AATTGAAC - 3' ; 配列番号9) およびE - EX
PZ - ER1 (5' - GGATCCTTATGATTT
CAAGAC - 3' ; 配列番号10) 並びにテンプレ
ートとしてのE . フェカリス株OG1XゲノムDNAを用
いて増幅した。生じたPCR産物を、製造者に記載され
るように、pGEM - T EASY (登録商標) (Pr
omega、ウィスコンシン州マディソン) にクローニ
ングした。生じたプラスミド挿入物は、DNA配列解析
により確認し、そして続いて、以下に記載されるよう
にタンパク質産生に関し評価した。「pGEM - T / ha
rA」と称されるこのプラスミドは、2000年9月2
6日にATCCに寄託され、そしてATCC寄託番号第
PTA - 2552号を与えられた。

【0105】正しいDNA配列を含むコード領域を、酵
素NdeIおよびBamHIを用いてpGEM - T E
ASY (登録商標) から切除し、そしてpET16b
(Novagen、ウィスコンシン州マディソン) の対
応する部位にクローニングした。プラスミドpET16
bは、複製起点(Ori)、形質転換過程後にベクター
を取り込んでいる細胞を選択するのに有用なアンピシ
リン耐性遺伝子(Amp) を含む。発現プラスミドを同定
し、そして大腸菌発現株BL - 21 (DE3) (Nov
agen) に形質転換する。pET16b - *harA* 発
現構築物は、*harA* コード領域に機能可能であるよう
に連結されたバクテリオファージT7プロモーターおよ
びT7ターミネーター配列を含む。各構築物から発現さ
れる*harA* タンパク質は、コードされるタンパク質産
物の精製を単純にするため、6 - 10のヒスチジン残基
を含むよう、アミノ末端で修飾される。コードされるタ
ンパク質のアミノ末端にヒスチジン残基を配置すると、
IMAC工程タンパク質精製が可能になる。

【0106】E . フェカリス *harA* および枯草菌 *harA* 遺伝子にコードされるタンパク質の組換え発現およ
び精製

本明細書に開示されるような枯草菌またはE . フェカリス・ゲノム由来の*harA* を持ち、*harA* が発現プロ
モーターおよびバクテリオファージT7 g10リボソ
ーム結合部位に機能可能であるように連結されている発
現ベクターで、大腸菌BL21 (DE3) (*hds*
gal clts857 ind Sam7nin5
lacUV5 - T7 gene 1) を、標準的な方
法を用い、形質転換した。アンピシリンへの耐性に関し
選択した形質転換体を、無作為に選択し、そして迅速プ

ラスミド調製またはプラスミド特異的PCR解析を用
い、アガロースゲル電気泳動により、ベクターの存在に
関し、試験した。発現プラスミドを含むコロニーをLブ
ロス中で増殖させ、そして本質的に米国特許第4, 56
9, 794号に記載されるように、プラスミドが持つO
RFをIMACにより精製した。

【0107】*harA* タンパク質を以下のように発現さ
せそして精製した。*harA* 発現プラスミドを含む新鮮
に形質転換されたBL - 21 (DE3) 細胞を、100
μg/ml アンピシリンを含むLプレート上で、室温
で一晩増殖させた。翌朝、5mlのLブロス各プレ
ートに添加し、プレートを擦り落とし、そして生じた細胞
懸濁物を用いて、およそ0.1のOD600まで、10
0μg/ml アンピシリンを含む100 mlのLブ
ロスに接種した。培養を、激しく震盪しながら37
で、~0.6のOD600まで増殖させた。この時点
で、培養を30 に移し、そしてさらに3時間、1.0
mM IPTGで異種タンパク質産生を誘導した。5
000 x g、15分間の遠心分離により細胞を採取
し、そして精製まで - 70 で凍結させた。細胞を迅速
に37 で融解し、そして10 mlの溶解緩衝液(2
5 mM Tris - Cl (pH 8.0)、250
mM NaCl、10% グリセロール、5 mM イミ
ダゾール) に再懸濁した。リゾチーム (Sigma、1
00μg/ml) および完全EDTA不含プロテアーゼ
阻害剤 (Boehringer、1Xまで) を添加し、
そして懸濁物を氷上で1時間インキュベーションした。
細胞は、16,000 psiでフレンチプレッシャー
セルにおける破壊により溶解した。溶解物を遠心分離
により収集し、そして0.45μMフィルターを通過させ
ることにより、上清を清澄にした。溶解緩衝液で平衡化
した2ミリリットルの50% Ni²⁺アガローススラリ
ー (Qiagen; ウィスコンシン州マディソン) を抽
出物に添加し、そして穏やかに震盪しながら、4
で一晩インキュベーションした。翌朝、抽出物/ビーズ混合
物を、10 ml (0.8 x 4.0 cm) Bio
- Rad使い捨てカラムに充填した。未結合タンパク質
および他の成分は、カラムを洗浄緩衝液(25mM T
ris - Cl (pH 8.0)、250 mM NaCl、10% グリセ
ロール、40 mM イミダゾール) で洗浄することにより除去した。*harA* タンパク
質は、3カラム体積の溶出緩衝液(25 mM Tris - Cl (pH 8.0)、250 mM NaCl、
10% グリセロール、250 mM イミダゾール)
で溶出させ、保存緩衝液(25 mM Tris - HCl (pH 8.0)、250 mM NaCl、10%
グリセロール) に対して長時間透析し、そして - 70
に保存した。

【0108】抗生物質感受性試験
耐性の定量的評価は、濃度が2倍の増分で異なる抗生物

質を含む、陽イオン補充 Mueller-Hinton プロスを用いたプロス微量希釈法により、行った。増殖を完全に阻害する抗生物質の最低濃度を、MICまたは最低阻害濃度と称した。

【0109】好ましくは、微量希釈アッセイは、本明細書に援用される NCCLS (米国臨床実験室基準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards)) 指針 M31-A, Vol. 19, No. 11, "Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals," 1999年6月 (ISBN 1-56238-377-9) にしたがった陽イオン調整 Mueller-Hinton プロスを用いて行う。

【0110】ハイグロマイシンA類似体および他の化合物への耐性を与える際の exp Z の役割を確かめるため、出願者らは、抗生物質耐性パターンに対する枯草菌および E. フェカリス exp Z 発現および破壊の影響を調べた。表1に示されるように、exp Z 破壊は、exp Z⁺または har A⁺ (すなわち非修飾、耐性) 枯草菌および E. フェカリス株のものと比較し、ハイグロマイシンA高感受性表現型を与えた。やはり表1に示されるのは、枯草菌 har A を含む pMP プラスミドでの形質転換による、通常は薬剤感受性の黄色ブドウ球菌 RN 4220株への「har A」表現型の授与である。

【0111】「感受性」から「耐性」へのMICの期待される変化は、試験された抗細菌剤中で、かなり異なることに注目することが重要である。例えば、har A で形質転換されそして har A を発現する同じ株に比較した「感受性」黄色ブドウ球菌株に対する試験された剤のMICの増加は、ハイグロマイシンAに関する約8倍から、Synercidに関する約15倍、化合物1に関する約500倍の相違まで多様である。これらの変化はすべて、特定の抗細菌剤への生物の特定の株を用いたスクリーニング法において、有意とみなされるべきである。同様に、天然耐性枯草菌および E. フェカリス株に対する剤の試験は、har A 遺伝子が破壊されている場合、MICの減少は、4倍以上(化合物2対 E. フェカリス OG1X) から約16倍(ハイグロマイシンA対枯草菌 JH642)、100倍以上(ランカシジン対 E. フェカリス OG1X、化合物1および2対枯草菌 JH642)まで多様であったことを示す。再び、これらの相違はすべて、特定の抗細菌剤への生物の特定の株を用いたスクリーニング法において、有意とみなされるべきである。特に、微量希釈法において、この方法に典型的な実験的不明確さのため、少なくとも4倍の相違が観察されるべきである。化合物2、5-デオキシ-5[4-

[(2,6-ジデオキシ-D-エリスロ-ヘキソフラノス-5-ウロス-1-イル) オキシ] -3-ヒドロキシフェニル] -2-メチル-1-オキソ-2-(E)-プロベニル] アミノ] -1,2-O-メチレン-D-ネオ-イノシトール、(E)-O-[(3-クロロフェニル)メチル] オキシムは、PCT国際出願 WO 99/57127 (17ページ、28-30行) に記載されるハイグロマイシンA類似体である。化合物3、5-デオキシ-5-[[3-[4-[(6-デオキシ-D-アラビノ-ヘキソフラノス-5-ウロス-1-イル) オキシ] 3-ヒドロキシフェニル] -2-メチル-1-オキソ-2-(E)-プロベニル] アミノ] -1,2-O-メチレン-D-ネオ-イノシトール、(E)-O-[(3-クロロフェニル)メチル] オキシムは、PCT国際出願 WO 99/57125、65ページ、実施例92に記載されるハイグロマイシンA類似体である。

【0112】したがって、表1に示されるような一団の抗細菌剤の適切な選択により、多様な生物をスクリーニングし、薬剤耐性を診断し、そしてその機構が har A 仲介であるかどうか決定することが可能である。一団の抗細菌剤および生物は、臨床的实施において、より広範であることが期待され、そして本明細書に示される方法の拡大は、当業者の一般的な専門的技術の範囲内であると理解されるべきである。これらの結果は、exp Z 遺伝子がハイグロマイシンA類似体、並びにランカシジン、バージニアマイシンおよび Synercid (登録商標) を含む他の構造的に関連しない抗生物質に対する枯草菌および E. フェカリスの内因性の耐性に責任があることを確認した。したがって、本明細書において「har A」と記載される exp Z 遺伝子は、細菌病原体に対する、ハイグロマイシンA関連抗生物質、および本明細書に示されるような他の剤の活性を評価するための、内因性の遺伝子型として、有用な標的を代表する。

【0113】表1. 野生型および同質遺伝子 har A 破壊突然変異体の MIC

【0114】

【表1】

生物 ^b	株説明	抗細菌剤、MIC ^a (μg/ml)				
		化合物1	化合物2	化合物3	ハイダロマイシンA	バージニアマイシンA
黄色ブドウ球菌 RN4220 (「SA1」)	野生型、感受性	≤0.2	≤0.2	0.39	31.3	0.78
SA1 (pMP20)	野生型、感受性+ベクターのみ	≤0.2	≤0.2	0.39	31.3	0.78
SA1 (pMP20 Bs_harA ⁺)	野生型、感受性+枯草菌 harA を含むベクター	100	50	≥100	250	50
枯草菌 JH642 trpC2_pheA1 (「BS1」)	野生型、耐性	50	100	≥100	250	25
BS1 (harA::cat)	野生型、耐性、破壊突然変異体	≤0.2	0.39	0.78	15.6	0.78
E.フェカリス OGX1 str gel (「EF1」)	野生型、耐性	1.25	1.25	1.56	62.5	25
EF1 (harA::erm)	野生型、耐性、破壊突然変異体	≤0.2	≤0.2	≤0.2	7.8	1.56

^a プロス微量希釈法による

^b すべての株は、2つ組で評価した

本発明の単離ポリヌクレオチド分子は、E.フェカリスのいかなる株由来のヌクレオチド配列を有してもよいが、好ましくは株OG1X由来である。本発明の実施において使用するためのE.フェカリスの病原性株は、以下に記載されるような単離技術を用い、感染動物の器官、組織または体液から単離してもよい。

【0115】本明細書に開示されるポリヌクレオチド分子およびオリゴヌクレオチド分子の産生および操作は、当該技術分野の技術の範囲内であり、そしてとりわけ、Maniatisら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー; Ausubelら、

1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, ニューヨーク; Sambrookら、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー; Innisら(監修), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., サンディエゴ; および Erlich(監修), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, ニューヨークおよびこれらの参考文献のすべての改訂に記載される組換え技術にしたがい、行うことが可能である。本発明を実施するのに有用なPCR技術の別の有用な記載は、J. Sutcliffeら, "Detection Of Erythromycin-Resistant Determinants By PCR," Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40(11), 2562-2566(1996)に記載される。該アッセイは、好ましくはマイクロタイタープレートで行われる。

【0116】配列番号1に示されるヌクレオチド配列およびその実質的な部分への本明細書における言及は、例えばE.フェカリス株OG1X由来のE.フェカリスharA遺伝子および5'上流プロモーター領域を含むプラスミド「pGEM-T/harA」に存在するような、それぞれ、対応するヌクレオチド配列およびその実質的な部分へも言及することが意図される。プラスミドpGEM-T/harAは、2000年9月26日にATCCに寄託され、そして寄託番号第PTA-2552号を与えられた。

【0117】さらに、配列番号1および配列番号3に示されるヌクレオチド配列およびその実質的な部分への本明細書における言及は、例えば枯草菌株JH642由来の枯草菌harA遺伝子および5'上流プロモーター領域を含むプラスミド「pMP-bacA1-1」に存在するような、それぞれ、対応するヌクレオチド配列およびその実質的な部分へも言及することが意図される。プラスミドpMP-bacA1-1は、2000年9月26日にATCCに寄託され、そして寄託番号第PTA-2551号を与えられた。

【0118】ハイブリダイゼーションアッセイ
核酸プローブハイブリダイゼーションアッセイは、当該技術分野に公知であり;本明細書に記載される条件は例示目的のみのためである。「中程度にストリンジェントな条件」下でのハイブリダイゼーションは、本明細書に

において、例えば65 での0.5 M NaHPO₄、7% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1 mM EDTA中でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、および42 での0.2 x SSC / 0.1 % SDS中での洗浄を意味する(Ausubelら(上記), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, Greene Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, inc., ニューヨーク, p.2.10.3)。「非常にストリ
10 ジェントな条件」下でのハイブリダイゼーションは、本明細書において、例えば、約23ヌクレオチドを含む核酸に関し、約60 での、約20ヌクレオチドを含む核酸に関し、約55 での、そして約17ヌクレオチドを含む核酸に関し、約48 での、0.5 M NaHPO₄、7% SDS、1 mM EDTA中でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーションと共に、68 での0.1 x SSC / 0.1 % SDS中での洗浄
20 を意味する(Ausubelら, 1989, 上記)。「非常にストリジェントな条件」下でのハイブリダイゼーションは、本明細書において、例えば、約23ヌクレオチドを含む核酸に関し、約60 での、約20ヌクレオチドを含む核酸に関し、約55 での、そして約17ヌクレオチドを含む核酸に関し、約48 での、0.5 M NaHPO₄、7% SDS、1 mM EDTA中でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーションと共に、68 での0.1 x SSC / 0.1 % SDS中での洗浄を意味する(Ausubelら, 1989, 上記)。

【0119】適切に設計されたプライマーを用い、脳組織、肺組織、腸組織、胎盤組織、血液、脳脊髄液、糞便、粘液、尿、羊水などを含む、動物組織または体液の試料中のhar A特異的核酸の存在を検出することが可能である。特定の増幅産物の産生は、har A仲介耐性の診断を支持することが可能であり、一方、増幅産物の欠如は、har A仲介耐性の欠如を示すことが可能である。増幅を行うための方法、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、当該技術分野に公知である。当該技術分野に知られる他の増幅技術、例えばリガーゼ連鎖反応を代わりに用いてもよい。また、本明細書に開示される核酸の配列を用い、E.フェカリスの他の種または株あるいは他の細菌細胞から相同遺伝子を単離する際に用いるためのプライマーを設計してもよい。

【0120】組換え発現系

本発明の組換えベクター、特に発現ベクターは、好ましくは、本発明のポリヌクレオチド分子のコード配列が、ポリペプチドを産生するため、該コード配列の転写および翻訳に必要な1つまたはそれ以上の制御要素と機能的な関連にあるように、構築される。本明細書において、用語「制御要素」は、限定されるわけではないが、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、およびポリヌクレオチドコード配列の発現をドライブするおよび/または制御するよう働くことが当該技術分野に知られる他の要素をコードするヌクレオチド配列を含む。また、本明細書において、ヌクレオチド配列、好ましくはコード配列または

オープンリーディングフレームは、1つまたはそれ以上の制御要素と「機能可能に関連する」「機能可能に連結される」または「機能可能な連結にある」かまたは「機能的関連」または「機能可能関連」にあり、制御要素がコード配列の転写またはそのmRNAの翻訳、あるいはその両方を効果的に制御し、そして可能にする。

【0121】適切な要素と機能的関連にある特定のコード配列を含む組換えベクターを構築するための方法は、当該技術分野に公知であり、そしてこれらを用いて本発明を実施することが可能である。これらの方法には、in vitro組換え技術、合成技術、およびin vivo遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatisら, 1989, 上記; Ausubelら, 1989, 上記; Sambrookら, 1989, 上記; Innisら, 1995, 上記; および Erlich, 1992, 上記に記載される技術を参照されたい。

【0122】本発明のhar Aコード配列を発現するのに利用することが可能な多様な発現ベクターが当該技術分野に知られ、特定のコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、およびコスミドDNA発現ベクターが含まれる。本発明のポリヌクレオチド分子を含むよう操作することが可能な典型的な原核発現ベクタープラスミドには、とりわけ、pUC8、pUC9、pBR322およびpBR329(Biorad Laboratories、カリフォルニア州リッチモンド)、pPLおよびpKK223(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)、pQE50(Qiagen、カリフォルニア州チャツワース)、およびpGEM-T EASY(Promega、ウィスコンシン州マディソン)が含まれる。本発明の核酸分子を含むよう操作することが可能な典型的な真核発現ベクターには、とりわけ、エクジソン誘導性哺乳動物発現系(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)、サイトメガロウイルス-プロモーター-エンハンサーに基づく系(Promega、ウィスコンシン州マディソン; Stratagene、カリフォルニア州ラホヤ; Invitrogen)、およびバキュロウイルスに基づく発現系(Promega)が含まれる。他の真核ベクターには、pcDNA-3、pcEXV、および融合タンパク質ベクター、例えばpGEX、pMalおよびpTrxFusが含まれる。用いてもよい酵母ベクターには、例えばYEp13、Yip5およびYACベクター、例えばpYAC3が含まれる。

【0123】これらのベクターおよび他のベクターの制御要素は、その強度および特性において多様であってもよい。利用する宿主/ベクター系に応じ、いかなる数の適切な転写および翻訳要素を用いてもよい。例えば、哺乳動物細胞系にクローニングする場合、哺乳動物細胞の

ゲノムから単離したプロモーター、例えばマウスメタロチオネインプロモーター、またはこれらの細胞で増殖するウイルスから単離したプロモーター、例えばワクシニアウイルス7.5Kプロモーターまたはモロニーネズミ肉腫ウイルス末端反復配列、を用いてもよい。組換えDNAまたは合成技術により得たプロモーターもまた、挿入配列の転写を提供するのに用いてもよい。さらに、特定のプロモーターからの発現は、特定の誘導因子、例えばメタロチオネインプロモーターのための亜鉛およびカドミウムイオンの存在下で上昇する可能性がある。転写制御領域またはプロモーターの制限されない例には、とりわけ、細菌に関し、*-gal*プロモーター、*T7*プロモーター、*TAC*プロモーター、*左*および*右*プロモーター、*trp*および*lac*プロモーター、*trp-lac*融合プロモーターなど；酵母に関し、解糖酵素プロモーター、例えば*ADH-I*および*II*プロモーター、*GPK*プロモーター、*PGI*プロモーター、*TRP*プロモーターなど；そして哺乳動物細胞に関し、*SV40*初期および後期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーターが含まれる。本発明は、大腸菌または他の適切な宿主における本発明のいずれかのコード配列を発現するのに用いることが可能な、プラスミド*pGEM-T/harA*に含まれる、*E.フェカリスharA*遺伝子プロモーターのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子をさらに提供する。

【0124】特定の開始シグナルもまた、挿入されたコード配列の効率的な翻訳に必要とされる。これらのシグナルは、典型的には*ATP*開始コドンおよび隣接配列を含む。それ自体の開始コドンおよび隣接配列を含む、本発明のポリヌクレオチド分子が適切な発現ベクターに挿入される場合、さらなる翻訳調節シグナルは必要とされない可能性がある。しかし、コード配列部分のみが挿入された場合、*ATG*開始コドンを含む外因性翻訳調節シグナルが必要とされる可能性がある。これらの外因性翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の多様な供給源から得ることが可能である。さらに、開始コドンは、全挿入物のインフレーム翻訳を確実にするため、コード領域の読み枠と一致していなければならない。

【0125】ポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを含む融合ポリペプチドを発現するであろう発現ベクターもまた構築してもよい。こうした融合ポリペプチドは、例えば*E.フェカリスharA*ポリペプチドに対する抗血清を作成するため、*E.フェカリスharA*ポリペプチドの生化学的特性を研究するため、異なる免疫学的または機能的特性を示す*E.フェカリスharA*ポリペプチドを設計するため、あるいは組換え発現*E.フェカリスharA*ポリペプチドの同定もしくは精製を補助するため、または該ポリペプチドの安定性を改善するため、用いてもよい。ありうる融合ポリペプチド発現ベク

ターには、限定されるわけではないが、*-ガラクトシダーゼ*および*trpE*融合体、*マルトース結合ポリペプチド*融合体(*pMal*シリーズ；*New England Biolabs*)、*グルタチオン-S-トランスフェラーゼ*融合体(*pGEX*シリーズ；*Pharmacia*)、*ポリヒスチジン*融合体(*pET*シリーズ；*Novagen, Inc.*、*ウィスコンシン州マディソン*)、および*チオレドキシ*融合体(*pTrxFus*；*Invitrogen*、*カリフォルニア州カールスバッド*)および*FLAG*エピトープ融合パートナー（以下を参照されたい）をコードする配列を取り込むベクターが含まれる。これらの融合ポリペプチドおよび他の融合ポリペプチドをコードする発現ベクターを構築するための方法が、当該技術分野に公知である。

【0126】融合ポリペプチドは、発現されたポリペプチドの精製を補助するのに有用である可能性がある。限定されない態様において、例えば、*harA*-*マルトース結合融合ポリペプチド*は、*アミロース樹脂*を用いて精製することが可能であり；*HtaA*-*グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合ポリペプチド*は、*グルタチオン-アガロースビーズ*を用いて精製することが可能であり；そして*harA*-*ポリヒスチジン融合ポリペプチド*は、*二価ニッケル樹脂*を用いて精製することが可能である。あるいは、*キャリアポリペプチド*または*ペプチド*に対する抗体を、融合ポリペプチドの*アフィニティークロマトグラフィー*精製のため用いてもよい。例えば、*モノクローナル抗体*の標的エピトープをコードするヌクレオチド配列を、制御要素と機能的な関連で発現ベクター内に設計し、そして発現されるエピトープが本発明の*E.フェカリス*ポリペプチドに融合されているように配置してもよい。限定されない態様において、*親水性マーカーペプチド*である*FLAGTMエピトープタグ*(*International Biotechnologies Inc.*)をコードするヌクレオチド配列を、標準的な技術により、*harA*ポリペプチドの*アミノ*または*カルボキシル*末端に対応する点で、発現ベクターに挿入してもよい。その後、発現された*harA*ポリペプチド-*FLAGTMエピトープ*融合産物を、商業的に入手可能な抗*FLAGTM*抗体を用いて検出し、そして*アフィニティー*精製してもよい。

【0127】発現ベクターはまた、発現された*E.フェカリス*ポリペプチドが特定の*プロテアーゼ*での処理により、*キャリア*領域または融合パートナーから放出されることが可能であるように、特定の*プロテアーゼ*切断部位をコードする*ポリリンカー*配列を含むよう、設計してもよい。例えば、融合ポリペプチドベクターは、とりわけ、*トロンピン*または*因子Xa*切断部位をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0128】*E.フェカリス*コード配列から上流でそして該配列と同じ読み枠のシグナル配列を、既知の方法に

より、発現ベクター中に設計し、発現されるポリペプチドの輸送および分泌を指示してもよい。シグナル配列の限定されない例には、とりわけ、 α -因子、免疫グロブリン、外膜ポリペプチド、ペニシリナーゼ、およびT細胞受容体由来のものが含まれる。

【0129】本発明の組換えベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクションされた宿主細胞の選択を補助するため、レポーター遺伝子産物または他の選択可能マーカーのコード配列を含むよう、ベクターを操作してもよい。こうしたコード配列は、好ましくは、上述の10 ように、制御要素と機能的関連にある。本発明を実施するのに有用なレポーター遺伝子は、当該技術分野に公知であり、そしてとりわけ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光ポリペプチド、蛍光(firefly)ルシフェラーゼ、およびヒト成長ホルモンをコードするものが含まれる。選択可能マーカーをコードするヌクレオチド配列は、当該技術分野に公知であり、そして抗生物質または代謝拮抗剤への耐性を与える遺伝子産物をコードするもの、あるいは栄養要求必要条件を供給するものが含まれる。こうした配列の例には、とりわけ、チミジンキナーゼ活性、あるいはメトトレキセート、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、ゼオシン、ピリメタミン、アミノ配糖体類、またはハイグロマイシンへの耐性をコードするものが含まれる。

【0130】本発明は、本発明のポリヌクレオチド分子または組換えベクターを含む形質転換宿主細胞、およびそれに由来する細胞株をさらに提供する。本発明を実施するのに有用な宿主細胞は、真核であってもまたは原核細胞であってもよい。こうした形質転換宿主細胞には、30 限定されるわけではないが、とりわけ、微生物、例えば組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNAベクターで形質転換された細菌、あるいは組換えベクターで形質転換された酵母、あるいは動物細胞、例えば組換えウイルスベクター、例えばバキュロウイルスに感染した昆虫細胞、または組換えウイルスベクター、例えばアデノウイルスもしくはワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞が含まれる。例えば、ATCC、米国メリーランド州ロックビル(寄託番号第31343号)より、またはGIBCO BRL、メリーランド州ガイザーズバーグより入手可能なDH5⁺などの大腸菌株を用いてもよい。適切な宿主の別の例は、黄色ブドウ球菌である。真核宿主細胞には、酵母細胞が含まれるが、哺乳動物細胞、例えばとりわけ、マウス、ハムスター、ウシ、サル、またはヒト細胞株由来のものもまた、有効に利用することが可能である。本発明の組換えポリペプチドを発現するのに用いることが可能な真核宿主細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(例えばATCC寄託番号第CCL-61号)、NIHスイスマウス胚細胞NIH/3T3(例え

ばATCC寄託番号第CRL-1658号)、およびMadin-Darbyウシ腎臓(MDBK)細胞(ATCC寄託番号第CCL-22号)と共にSf-9細胞が含まれる。トランスフェクション細胞は、染色体組込みにより、またはエピソームで、本発明の核酸を発現する可能性がある。

【0131】本発明の組換えベクターは、好ましくは、実質的に均質な細胞培養の1つまたはそれ以上の宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションされる。ベクターは、一般的に、既知の技術にしたがい、例えば、とりわけ、プロトプラスト形質転換、リン酸カルシウム沈殿、塩化カルシウム処理、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、組換えウイルスとの接触によるトランスフェクション、リポソーム仲介トランスフェクション、DEAE-デキストラントランスフェクション、形質導入、コンジュゲート化、または微粒子銃により、宿主細胞に導入される。形質転換体の選択は、標準法により、例えば組換え発現ベクターに関連する選択可能マーカーを発現する細胞に関する選択、例えば抗生物質耐性により、行うことが可能である。

【0132】発現ベクターが宿主細胞に導入されたら、宿主細胞ゲノムまたはエピソームいずれかにおける本発明のポリヌクレオチド分子の組込みおよび維持は、標準的技術により、例えばサザンハイブリダイゼーション解析、制限酵素解析、逆転写酵素PCR(rt-PCR)を含むPCR解析により、または期待されるポリペプチド産物を検出する免疫学的アッセイにより、確認することが可能である。本発明のポリヌクレオチド分子を含むおよび/または発現する宿主細胞は、当該技術分野に知られるように:(i)DNA-DNA、DNA-RNA、またはRNA-アンチセンスRNAハイブリダイゼーション;(ii)「マーカー」遺伝子機能の存在の検出;(iii)宿主細胞における特定のmRNA転写物の発現により測定されるような、転写レベルの評価;または(iv)例えばイムノアッセイによる成熟ポリペプチド産物の存在の検出を含む、当該技術分野に公知の少なくとも4つの一般的なアプローチのいずれにより同定してもよい。

【0133】組換えポリペプチドの発現および精製
本発明の核酸が、適切な宿主細胞に安定して導入されたら、形質転換宿主細胞をクローニング的に増殖させ、そして生じた細胞を、コードされるポリペプチドの最大産生を行うことが可能な条件下で増殖させる。こうした条件には、典型的には、形質転換細胞を高密度に増殖させることが含まれる。発現ベクターが誘導性プロモーターを含む場合、適切な誘導条件、例えば温度シフト、栄養素の枯渇、無償性の(gratuitous)誘導因子(例えば炭水化物類似体、例えばイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG))の添加、過剰な代謝副産物の集積、またはそれらの匹敵するものを、必要

に応じて使用し、発現を誘導する。

【0134】ポリペプチドが宿主細胞の内部に保持される場合、細胞を採取し、そして溶解し、そして4、またはプロテアーゼ阻害剤の存在下、あるいは両方などの、ポリペプチド分解を最小にすることが当該技術分野に知られる抽出条件下で、溶解物から産物を実質的に精製するかまたは単離する。ポリペプチドが宿主細胞から分泌される場合、枯渇栄養培地を単に収集し、そしてポリペプチドをそこから実質的に精製するかまたは単離する。

【0135】ポリペプチドは、必要に応じ、限定されるわけではないが、1つまたはそれ以上の以下の方法：硫酸アンモニウム沈殿、サイズ分画、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、密度遠心分離、およびアフィニティークロマトグラフィーを含む標準的な方法を用い、細胞溶解物または培地から実質的に精製するかまたは単離する。ポリペプチドが生物学的活性を欠く場合、大きさ、またはポリペプチド特異的抗体との反応性に基づき、あるいは融合タグの存在により、検出することが可能である。本発明の実施に用いるため、ポリペプチドは、培養液体中に分泌されるような、または細胞溶解物中に存在するような、未精製状態であってもよいが、好ましくは、そこから実質的に精製されるかまたは単離される。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、その天然対応物が、E.フェカリス細胞溶解物の調製中に通常見られるより、少なくとも約1000x高い濃度で調製中に存在する。

【0136】ポリペプチド

本発明は、上述のポリペプチドのいずれかを調製する方法であって、特定のポリペプチドをコードする、1つまたはそれ以上の制御要素と機能的関連にあるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含む組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、該ポリペプチドの発現を行うことが可能な条件下で培養し、そして細胞培養から発現されたポリペプチドを回収することを含む、前記方法を提供する。

【0137】十分な純度の本発明のポリペプチドが得られたら、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸配列解析、免疫学的活性、生物学的活性などを含む、標準的な方法により、性質決定してもよい。ポリペプチドはさらに、親水性解析（例えばHoppsおよびWoods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824）、または類似のソフトウェアアルゴリズムを用いて性質決定し、疎水性および親水性領域を同定してもよい。構造解析を行い、特定の二次構造を仮定するポリペプチドの領域を同定してもよい。生物物理学的方法、例えばX線結晶学（Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11:7-13）、コンピューターモデリング（Fletteric

およびZoller（監修）、1986: Current Communications in Molecular Biology中、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー）、および核磁気共鳴（NMR）を用い、ポリペプチドおよび他の推定上の相互作用ポリペプチド/受容体/分子間の相互作用の潜在的な部位をマッピングし、そして研究してもよい。これらの研究から得られた情報を用い、欠失突然変異体およびワクチン組成物を設計し、そして該ポリペプチドの生物学的機能を*in vivo*で特異的に遮断することが可能な療法的または薬理学的化合物を設計するかまたは選択してもよい。

【0138】本発明のポリペプチドは、動物由来の血液または血清試料におけるE.フェカリス特異的抗体に関しスクリーニングするための、例えばELISAアッセイなどの標準的技術を用いた診断試薬として；または動物由来の細胞、組織または体液試料におけるE.フェカリス特異的ポリペプチドに関しスクリーニングするための、例えばウェスタンブロットアッセイなどの標準的技術を用いた、以下に記載されるような、診断試薬に有用なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作成するための抗原としてを含む、多様な目的に有用である。

【0139】本発明のポリペプチドは、例えばエンテロコッカス感染と共にブドウ球菌および肺炎球菌感染の治療において、harA活性の調節因子を同定する化合物のスクリーニングに、特に有用である。

【0140】ポリペプチドへの化合物の結合を決定するための方法は、当該技術分野に公知であり、そして直接結合を測定するアッセイ、または競合的結合アッセイが含まれる。こうした結合アッセイは、化合物の検出を容易にするように、標識された化合物を利用し、例えば³H、¹⁴C、³²Pを用いた化合物の放射標識により、あるいはポリペプチドに結合した化合物の化学的変換により、あるいはELISAまたは化合物もしくはポリペプチドいずれかの固定を伴う他の方法を用いてもよい。

【0141】ポリペプチドの類似体および誘導体限定されるわけではないが、以下のいずれか：例えばカルバジド酸エステルまたは三次中心を産生するためのポリペプチドの1つまたはそれ以上のL-アミノ酸の対応するD-アミノ酸、アミノ酸類似体、またはアミノ酸模倣体での置換；または特定の化学的修飾、例えばトリプシン、キモトリプシン、パパインまたはV8プロテアーゼでのタンパク質分解切断、あるいはNaBH₄または臭化シアンでの処理、あるいはアセチル化、ホルミル化、酸化または還元などを含む、ポリペプチドの1つまたはそれ以上の化学的修飾を、既知の技術を用いて行い、類似体を調製してもよい。あるいは、またはさらに、本発明のポリペプチドを、遺伝子組換え技術により、修飾してもよい。

【0142】本発明のポリペプチドは、限定されるわけではないが、アセチル基、硫黄架橋基、グリコシル基、脂質、およびリン酸を含む、1つまたはそれ以上の化学基のコンジュゲート化により、および/または本発明の第二のポリペプチド、または別のポリペプチド、例えばとりわけ、血清アルブミン、テンガイ (keyhole limpet) ヘモシアニン、または商業的に活性化されたBSA、またはポリアミノ酸 (例えばポリリジン)、または多糖 (例えばセファロース、アガロース、または修飾もしくは未修飾セルロース) へのコンジュゲート化により、誘導体化してもよい。こうしたコンジュゲート化は、好ましくは、ポリペプチドのアミノ酸側鎖および/またはN末端またはC末端での共有結合による。こうしたコンジュゲート化反応を行うための方法は、ポリペプチド化学反応の分野に公知である。

【0143】請求される発明を実施するのに有用な誘導体にはまた、水可溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコールが本発明のポリペプチド、あるいはその類似体または誘導体にコンジュゲート化され、それにより少なくとも部分的に該ポリペプチドの免疫原性を保持しながら、さらなる望ましい特性を提供するものも含まれる。これらのさらなる望ましい特性には、例えば、水性溶液中の増加した可溶性、保存中の増加した安定性、タンパク質分解脱水への増加した耐性、および増加した *in vivo* 半減期が含まれる。本発明のポリペプチドへのコンジュゲート化に適した水可溶性ポリマーには、限定されるわけではないが、ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマーであって、1つの端で、アルキル基、ポリオキシエチル化ポリオール類、ポリビニルアルコール、多糖類、ポリビニルエチルエーテル類、および、-ポリ[2-ヒドロキシエチル]-DL-アスパルトアミドで置換されていないかまたは置換されている前記ホモポリマーおよびコポリマーが含まれる。ポリエチレングリコールが特に好ましい。ポリペプチドの水可溶性ポリマーコンジュゲートを作成するための方法は、当該技術分野に公知であり、そしてとりわけ、本明細書に援用される米国特許3,788,948; 米国特許3,960,830; 米国特許4,002,531; 米国特許4,055,635; 米国特許4,179,337; 米国特許4,261,973; 米国特許4,412,989; 米国特許4,414,147; 米国特許4,415,665; 米国特許4,609,546; 米国特許4,732,863; 米国特許4,745,180; 欧州特許 (EP) 152,847; EP 98,110; および日本特許5,792,435に記載される。

【0144】抗体

本発明は、本発明のポリペプチドに対して向けられる単離抗体をさらに提供する。好ましい態様において、抗体

は、既知の方法を用い、E.フェカリスまたは枯草菌由来のharAポリペプチドに対して作成してもよい。ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ラットまたはマウスより選択される多様な宿主動物を、部分的にまたは実質的に精製されたまたは単離されたE.フェカリスポリペプチドで、または上述されるようなその相同体、融合ポリペプチド、実質的な部分、類似体または誘導体で免疫感作してもよい。以下に記載されるようなアジュバントを用い、抗体産生を亢進してもよい。

【0145】ポリクローナル抗体を、免疫感作動物の血清から得て、そして単離し、そして標準的技術を用い、抗原に対する特異性に関し、試験してもよい。あるいは、培養中の連続する細胞株による抗体分子の産生を提供するいかなる技術を用い、モノクローナル抗体を調製し、そして単離してもよい。これらには、限定されるわけではないが、KohlerおよびMilstein (Nature, 1975, 256:495-497) に元来記載されたハイブリドーマ技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor, 1983, Immunology Today 4:72; Cotter, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030); およびEBVハイブリドーマ技術 (Cotter, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96) が含まれる。あるいは、一本鎖抗体 (例えば米国特許4,946,778を参照されたい) を適応させ、harA抗原特異的一本鎖抗体を産生してもよい。これらの刊行物は本明細書に援用される。

【0146】ヒト化抗体の産生は、現在、当該技術分野に公知である。ヒト化抗体を産生することが可能な1つの方式は、例えばJones, P.R., Nature 321:52-525 (1986) またはTempest, Biotechnology 9:266-273 (1991) に記載されるような、ヒトモノクローナル抗体への抗体の相補性決定領域の転移による。ヒト化抗体はまた、例えばJ. Immunol. Meth. 231:11-23 (1999) に記載されるように、抗原に反応し、ヒト重鎖および軽鎖を発現するよう操作されたトランスジェニックマウスにより、作成してもよい。

【0147】本発明のポリペプチドの特異的結合部位を含む抗体断片もまた、本発明に含まれ、そして既知の技術により、生成することが可能である。こうした断片には、限定されるわけではないが、損なわれていない抗体分子のペプシン消化により生成することが可能なF(ab')₂断片、およびF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成することが可能なFab断片が含まれる。あるいは、Fab発現ライブラリーを

構築し (Huseら, 1989, Science 246:1275-1281)、E. フェカリスポリペプチドに望ましい特異性を有する Fab 断片の迅速な同定を可能にしてもよい。

【0148】モノクローナル抗体および抗体断片の産生および単離のための技術は、当該技術分野に公知であり、そしてとりわけ、本明細書に援用される Harlow および Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory に、そして J. W. Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, ロンドンにさらに記載される。

【0149】E. フェカリス遺伝子の標的化突然変異本発明の核酸の開示に基づき、har A 遺伝子を無力にするかまたは別の方式で突然変異させるのに用いるための遺伝子構築物を調製してもよい(この遺伝子は、本明細書において、以後、「har A 遺伝子」と称される)。har A 遺伝子は、適切に設計された遺伝子構築物を用いて、突然変異させることが可能である。例えば、har A 遺伝子を：(a) har A 遺伝子のコード配列または制御配列のすべてまたは一部を欠失させる；または (b) har A 遺伝子のコード配列または制御配列のすべてまたは一部を異なるヌクレオチド配列で置き換える；または (c) har A 遺伝子のコード配列または制御配列に、har A 由来のまたは異種供給源由来のヌクレオチド配列を含んでもよい1つまたはそれ以上のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド分子、またはポリヌクレオチド分子を挿入する；または (d) (a)、(b) および (c) のある組み合わせを行うよう機能する、本発明の遺伝子構築物を用いて突然変異させてもよい。あるいは、構築物を使用し、har A 遺伝子の発現またはそのコードされるポリペプチドの安定性を改変してもよい。

【0150】har A 遺伝子が突然変異されている細胞は、例えば、無力な遺伝子を持つ細胞をワクチン組成物、特に修飾生ワクチン中で用い、動物において、防御反応を誘導するまたは防御反応の誘導に貢献することが可能である場合、本発明を実施するのに有用である。本発明はまた、細胞が恒常的突然変異体である場合、ポリペプチドおよび本発明のポリペプチドを発現する細胞も含む。

【0151】限定されない態様において、本発明の遺伝子構築物を用い、野生型遺伝子のコード配列あるいはそのプロモーターまたは他の制御領域、あるいはそれらの部分を、異なるヌクレオチド配列、例えば突然変異コード配列または突然変異制御領域、またはそれらの部分で置き換えることにより、野生型 har A 遺伝子を突然変

異させる。こうした遺伝子構築物で用いるための突然変異 har A 遺伝子配列は、エラー傾向 PCR の使用による、またはカセット突然変異誘発によるものを含む、多様な既知の方法のいずれにより、産生してもよい。例えば、オリゴヌクレオチド指示突然変異誘発を使用し、明示される方式で、野生型 har A 遺伝子のコード配列またはプロモーター配列を改変し、例えば、配列内の特定の点にフレームシフトまたは終結コドンを導入してもよい。あるいはまたはさらに、本発明の遺伝子構築物で用いるための突然変異ヌクレオチド配列は、1つまたはそれ以上のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子のコード配列またはプロモーター配列の挿入または欠失により、あるいはコード配列またはプロモーター配列の部分の、1つまたはそれ以上の異なるヌクレオチド、オリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子での置換により、調製してもよい。こうしたオリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子は、いかなる天然存在供給源から得てもよいし、または合成であってもよい。挿入または欠失配列は、単に har A 遺伝子の読み枠を破壊するよう働いてもよいし、または選択可能マーカーなどの異種遺伝子産物をさらにコードしてもよい。

【0152】あるいはまたはさらに、ランダム突然変異誘発を用い、本発明の遺伝子構築物で用いるための突然変異 har A 遺伝子配列を産生してもよい。ランダム突然変異誘発は、いかなる適切な技術により、例えば har A 遺伝子を持つ細胞を、紫外線照射または x 線に、あるいは化学的突然変異誘発剤、例えば N - メチル - N' - ニトロソグアニジン、スルホン酸エチルメタン、亜硝酸またはナイトロジェンマスタードに曝露し、そしてその後、特定の遺伝子に突然変異を持つ細胞に関し選択することにより、行ってもよい。例えば突然変異誘発技術の概説には、Ausubel, 1989, 上記を参照されたい。

【0153】本発明を実施するのに有用な修飾 har A ポリペプチドを産生する突然変異は、ORF、またはプロモーターもしくは他の制御領域、あるいは遺伝子もしくは ORF を天然に含む、または遺伝子の発現もしくはそのコードされるポリペプチドの安定性を改変するいかなる他の配列も含む、har A 遺伝子のどこで起こってもよい。

【0154】あるいは、本発明の遺伝子構築物は、in situ で har A 遺伝子または ORF に天然に隣接し、該遺伝子自体のコード領域由来のヌクレオチド配列を一部しかまたはまったく含まないヌクレオチド配列を含んでもよい。こうした遺伝子構築物は、例えば全 har A 遺伝子または ORF を欠失させるのに有用であるだろう。

【0155】相同組換えを通じた標的化遺伝子突然変異のため、遺伝子構築物は、好ましくは、上述のような突

然変異ヌクレオチド配列を含む、環状または直線化いずれかのプラスミドである。限定されない態様において、突然変異配列の少なくとも約200ヌクレオチドを用い、本発明の遺伝子構築物を、相同組換えのため、harA遺伝子に特異的に向けるが、より短い長さのヌクレオチドもまた、有効である可能性がある。さらに、プラスミドは、好ましくは、harA遺伝子に機能的に関連するよう挿入され、天然harA遺伝子の制御要素配列が破壊されるであろうように構築された、レポーター遺伝子産物または他の選択可能マーカーをコードするさらなるヌクレオチド配列を含む。本発明を実施するのに用いてもよいレポーター遺伝子は、当該技術分野に公知であり、そしてとりわけ、CAT、緑色蛍光ポリペプチド、および β -ガラクトシダーゼをコードするものが含まれる。選択可能マーカーをコードするヌクレオチド配列は、当該技術分野に公知であり、そして抗生物質または代謝拮抗剤への耐性を与える遺伝子産物をコードするもの、あるいは栄養要求必要条件を供給するものが含まれる。こうした配列の例には、ピリメタミン耐性、またはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(アミノ配糖体への耐性を与える)をコードするものが含まれる。

【0156】本発明の遺伝子構築物を生成するのに用いてもよい方法は、当該技術分野に公知であり、そしてとりわけ、Maniatisら、1989、上記； Ausubelら、1989、上記； Sambrookら、1989、上記； Innisら、1995、上記；およびErlich、1992、上記に記載されるような、*in vitro*組換え技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えが含まれる。

【0157】細胞は、既知の技術にしたがい、例えばエレクトロポレーションにより、本発明の遺伝子構築物で形質転換またはトランスフェクションしてもよい。形質転換体の選択は、標準的技術を用い、例えば構築物に関連し、選択可能マーカーを発現する細胞に関する選択により、行うことが可能である。組換え事象が成功して起こり、そして特定の標的遺伝子が改変された形質転換体の同定は、遺伝子解析により、例えばサザンブロット解析により、または特定のポリペプチドをコードするmRNA転写物の欠失を検出するため、ノーザン解析により、あるいは、例えば免疫学的解析により、減少した病原性のような新規表現型の出現により、PCRアッセイにより、またはそれらのある組み合わせにより決定されるような、特定のポリペプチドを欠く細胞を検出することにより、行うことが可能である。

【0158】さらなる限定されない態様において、本発明の遺伝子構築物は、E.フェカリス由来、または動物を感染させる、異なる病原体由来の異なる遺伝子またはコード領域であって、本発明の修飾生存細胞でのワクチン接種に際し、動物における別個の防御免疫反応を誘導

するまたは該反応の誘導に貢献する抗原をコードする前記遺伝子またはコード領域をさらに含んでもよい。このさらなる遺伝子またはコード領域は、修飾生存細胞からのコードされる抗原の分泌を導き、それによりワクチン接種された動物の免疫系に抗原が提示されることを可能にするシグナル配列を含むよう、さらに操作してもよい。

【0159】本発明はしたがって、harA遺伝子が突然変異されている修飾生存E.フェカリス細胞を提供する。さらに、本発明は、harAを発現する修飾生存細胞を調製する方法であって：(a)本発明の遺伝子構築物で細胞を形質転換し；(b)該遺伝子構築物によりharA遺伝子が突然変異されている形質転換細胞を選択し；そして(c)感受性動物を防御するワクチンにおいて用いることが可能な細胞を、工程(b)の細胞の中から選択することを含む、前記方法を提供する。本発明はまた、こうした修飾細胞から調製された、死んだ細胞組成物も含む。

【0160】本発明はまた、harA特異的アミノ酸またはヌクレオチド配列、あるいは抗harA抗体の存在を検出するためのキットにも関する。該キットはまた、例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体に付着した、あるいはポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体に結合する部分に付着した酵素、蛍光物質、または放射能標識を含む、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体を検出するための手段も含んでもよい。

【0161】例えばharA遺伝子を含むかまたは発現する生物における、ハイブリダイゼーションのため、または同等に標的配列のPCR増幅のためのプローブを含む本発明の核酸は、好ましくは、15-50ヌクレオチドの断片を含む単離DNAを含む。こうしたharA特異的核酸は、当該技術分野に公知であり、そして例示的方式で以下に記載されるようなハイブリダイゼーションアッセイを用いて、検出することが可能である。

【0162】例示のためであって限定ではなく、高ストリンジェンシー条件は、例えば：6x SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500 μ g/ml 変性サケ精子DNAで構成される緩衝液中の65 $^{\circ}$ で8時間から一晩行われる、DNAを含むフィルターのプレハイブリダイゼーション、その後、ここでは100 μ g/ml 変性サケ精子DNAおよび5-20x 10⁶ cpmの³²P標識プローブを含むプレハイブリダイゼーション混合物中の65 $^{\circ}$ で48時間のハイブリダイゼーション、その後、2x SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll、および0.01% BSAを含む溶液中での37 $^{\circ}$ で1時間の洗浄を含む。これに続き、オートラジオグラフィー前に0.1x S

SC中での50 で45分間の洗浄がある。

【0163】核酸の性質（例えば長さ、GC含量など）およびハイブリダイゼーションの目的（検出、増幅など）の性質に応じ、用いてもよい高ストリンジェンシーの他の条件は、当該技術分野に公知である。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）における相補的配列へのおよそ15 - 40塩基のオリゴヌクレオチドのストリンジェントなハイブリダイゼーションは、以下の条件下で行われる：50 mM KClの塩濃度、10 mM Tris-HClの緩衝剤濃度、1.5 mMのMg²⁺濃度、7 - 7.5のpHおよび55 - 60 のアニリング温度。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は公知であり、そしてSambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1989)、特に第11章に例示される。

【0164】別の特定の態様において、harA核酸、またはその相補体に中程度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズ可能な核酸が提供される。こうしたストリンジェンシーに適した条件の選択は、当該技術分野に公知である（例えばSambrookら, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバーを参照されたい；また、Ausubelら監修, *実験室技術マニュアルのCurrent Protocols in Molecular Biology* シリーズ中, (著作権)1987-1997, *Current Protocols*, (著作権)1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.も参照されたい)。中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションには、膜をさらに、40 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2、1% SDS、1 mM EDTA中の55 で各30分間の4回の洗浄に供する。

【0165】例示のためであって限定ではなく、90ヌクレオチドを越えるハイブリダイゼーション領域のための低ストリンジェンシー条件を用いた方法は、以下のとおりである（ShiloおよびWeinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6789-6792もまた参照されたい）。DNAを含むフィルターを、35%ホルムアミド、5x SSC、50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、5 mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA、および500 μg/ml 変性サケ精子DNAを含*

*む溶液中で、40 で6時間前処理する。ハイブリダイゼーションは、以下の修飾を含む同一溶液で行う：0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 μg/ml サケ精子DNA、10%（重量/体積）デキストラン硫酸、および5 - 20 x 10⁶ cpm ³²P標識プローブを用いる。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で、40 で18 - 20時間インキュベーションし、そしてその後、2x SSC、25 mM Tris-HCl(pH 7.4)、5 mM EDTA、および0.1% SDSを含む溶液中で、55 で1.5時間洗浄する。洗浄溶液を新鮮な溶液に置き換え、そして60 でさらに1.5時間インキュベーションする。フィルターをふき取って乾燥し、そしてオートラジオグラフィーのため曝露する。必要であれば、フィルターを65 - 68 で三度目に洗浄し、そしてフィルムに再曝露する。用いてもよい低ストリンジェンシーの他の条件は、当該技術分野に公知である（例えば種間ハイブリダイゼーションに使用されるようなもの）。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、harAをコードするオープンリーディングフレームを含むE.フェカリスのヌクレオチド配列（配列番号1）を示す。開始(ATG)および停止(TAA)コドンを下線で示し、そして推定上のABCドメインもまた、下線で示す。

【図2】 図2は、図1に示されるharA核酸にコードされるharAポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号2）を示す。一重下線（例えばGlyArg）または二重下線（例えばAspGlu）の配列は、それぞれ「Walker Aボックス」および「Walker Bボックス」ABCタンパク質モチーフを表す。Walker J.E.ら, *EMBO J.* 1:945-951(1982)を参照されたい。点線の配列（例えばLeuSer）はABC「サインモチーフ」を表し、そして破線の配列（例えばValSer）はABC「下流モチーフ」を表す。Quentinら, *J. Mol. Biol.* 287:467-484(1999)を参照されたい。

【図3】 図3は、expZ(harA)をコードするオープンリーディングフレームを含む枯草菌のヌクレオチド配列（配列番号3）を示す。開始(ATG)および停止(TAA)コドンを下線で示す。

【図4】 図4は、図3に示されるexpZ(harA)核酸にコードされるharAポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号4）を示す。Walker A、Walker B、重要および下流モチーフは、図2におけるのと同じ方式で示される。

【図1】

FIG. 1A

ATGTCGAAAA TTGAACTAAA ACAACTATCT TTTGCCTATG ATAATCAAGA AGTATTGCTT 60
 TTTGATCAGC CAAATATCAC GATGGATACC AATGGAAAT TAGGATTGAT TGGCCGCAAT 120
 GGCCGTGGGA AAACAACCTT ATTAAGATCG TTACAAAAAC AGTTGGATTA CCAAGGAGAG 180
 ATTCTTCATC AAGTCGATTT CGTCTA'TTTT CCACAAACAG TTGCAGAAGA ACAACAGCTC 240
 ACTTA'TTATG TCTTACAAGA GGTGACTTCT TTTGAACAGT GGGAAATTAGA ACGAGAATTA 300
 ACGCTTTTAA ACGTTGATCC TGAAGTTTAA TGGCGGCCCT TTTCTTCTTT ATCAGGCGGC 360
 GAAAAGACGA AAGTTTTATT AGGTCTTCTT TTTATTGAAG AAAATGCCTT TCCTTTAATT 420
 GACGAGCCAA CAAATCATTT AGATCTAGCT GGCAGACAAC AAGTGGCTGA ATATTTGAAG 480
 AAAAAGAAAC ACGGGTTTAT TTTAGTCAGC CACGATCGGG CATTGTGTTGA TGAAGTGGTT 540
 GATCATATTT TGGCGATTGA AAAAAGTCAA TTGACGCTGT ATCAAGGGAA TTTTCTATT 600
 TATGAAGAGC AAAAAAATT AAGAGATGCT TTTGAACTAG CAGAAAATGA AAAAATCAAA 660
 AAAGAAGTCA ATCGCTTGAA AGAAACCGCT CGTAAAAAAG CGGAATGGTC GATGAACCGT 720
 GAAGGTGATA AGTACGGCAA CGCTAAGGAA AAAGGGAGCG GGGCGATTTT TGATACAGGA 780
 GCCATTGGTG CCCGGGCAGC GCGCGTAATG AAGCGCTCGA AACACATTCA ACAACGCGCC 840
 GAAACACAAT TAGCAGAAAA AGAAAACTA TTA~~AA~~AGATC TTGAGTATAT TGATCCTTTG 900
 TCAATGGATT ATCAGCCAAC GCATCACAAA ACATTATGA CGGTGGAACA GCTTCGTCTA 960

FIG. 1B

GGCTACGAGA AAAATTGGCT ATTTGCGCCA CTTTCTTTTT CAATAAACGC GGGAGAAATT 1020
 GTTGAATAA CAGGGAAAAA TGGCTCAGGA AAATCGAGCT TAATTCAGTA TTTATTGGAT 1080
 AATTTTTCTG GGGATTCAGA AGGCGAAGCC ACTTTGGCTC ACCAATTAAC CATTTCTTAT 1140
 GTGCGCCAAG ATTATGAAGA CAATCAAGGA ACITTTATCCG AATTTGCAGA GAAAAATCAG 1200
 TTAGATTACA CTCAATTTTT AAATAACTTA CGAAAACCTG GGATGGAGCG CGCCGTTTTC 1260
 ACTAATCGAA TTGAACAAAT GAGTATGGGG CAACGGAAAA AAGTCGAAGT AGCCAAATCA 1320
 TTGTCTCAAT CAGCTGAACT TTATATTTGG GATGAACCCC TTAATTA~~CTT~~ GGATGTATTT 1380
 AATCATCAAC AATTAGAAGC GCTAATCTTA TCTGTGAAGC CTGCAATGCT AGTGATTGAG 1440
 CATGATGCAC ATTTTCATGAA GAAAATAACA GATAAAAAAA TTGTCTTGAA ATCATAA 1497

【図2】

FIG. 2A

MetSerLysIleGluLeuLysGlnLeuSerPheAlaTyrAspAsnGlnGluValLeuLeu 20
PheAspGlnAlaAsnIleThrMetAspThrAsnTrpLysLeuGlyLeuIleGlyArgAsn 40
GlyArgGlyLysThrThrLeuLeuArgLeuLeuGlnLysGlnLeuAspTyrGlnGlyGlu 60
IleLeuHisGlnValAspPheValTyrPheProGlnThrValAlaGluGluGlnGlnLeu 80
ThrTyrTyrValLeuGlnGluValThrSerPheGluGlnTrpGluLeuGluArgGluLeu 100
ThrLeuLeuAsnValAspProGluValLeuTrpArgProPheSerSerLeuSerGlyGly 120
GluLysThrLysValLeuLeuGlyLeuLeuPheIleGluGluAsnAlaPheProLeuIle 140
AspGluProThrAsnHisLeuAspLeuAlaGlyArgGlnGlnValAlaGluTyrLeuLys 160
LysLysLysHisGlyPheIleLeuValSerHisAspArgAlaPheValAspGluValVal 180
AspHisIleLeuAlaIleGluLysSerGlnLeuThrLeuTyrGlnGlyAsnPheSerIle 200
TyrGluGluGlnLysLysLeuArgAspAlaPheGluLeuAlaGluAsnGluLysIleLys 220
LysGluValAsnArgLeuLysGluThrAlaArgLysLysAlaGluTrpSerMetAsnArg 240
GluGlyAspLysTyrGlyAsnAlaLysGluLysGlySerGlyAlaIlePheAspThrGly 260
AlaIleGlyAlaArgAlaAlaArgValMetLysArgSerLysHisIleGlnGlnArgAla 280
GluThrGlnLeuAlaGluLysGluLysLeuLeuLysAspLeuGluTyrIleAspProLeu 300
SerMetAspTyrGlnProThrHisHisLysThrLeuLeuThrValGluGluLeuArgLeu 320

FIG. 2B

GlyTyrGluLysAsnTrpLeuPheAlaProLeuSerPheSerIleAsnAlaGlyGluIle 340
ValGlyIleThrGlyLysAsnGlySerGlyLysSerSerLeuIleGlnTyrLeuLeuAsp 360
AsnPheSerGlyAspSerGluGlyGluAlaThrLeuAlaHisGlnLeuThrIleSerTyr 380
ValArgGlnAspTyrGluAspAsnGlnGlyThrLeuSerGluPheAlaGluLysAsnGln 400
LeuAspTyrThrGlnPheLeuAsnAsnLeuArgLysLeuGlyMetGluArgAlaValPhe 420
ThrAsnArgIleGluGlnMetSerMetGlyGlnArgLysLysValGluValAlaLysSer 440
LeuSerGlnSerAlaGluLeuTyrIleTrpAspGluProLeuAsnTyrLeuAspValPhe 460
AsnHisGlnGlnLeuGluAlaLeuIleLeuSerValLysProAlaMetLeuValIleGlu 480
HisAspAlaHisPheMetLysLysIleThrAspLysLysIleValLeuLysSer 498

【図3】

FIG. 3A

ATGAAAGAGA TCGTAACATT AACAAACGTT AGCTATGAAG TAAAGGATCA AACTGTTTTT 60
 AAACATGTAA ACGCCAGTGT TCAGCAAGGA GATATCATTG GGATTATCGG CAAAAACGGC 120
 GCTGGGAAAT CTACGTTGCT GCACCTCATT CACAATGACT TAGCCCCCTGC ACAGGGTCAA 180
 ATCCTTCGGA AGGATATAAA ACTGGCTTTG GTTGAACAGG AAACCGCGGC GTATTCTTTT 240
 GCGGATCAGA CACCTGCCGA AAAGAAGTTA CTGGAGAAAT GGCATGTGCC TCTTCGTGAT 300
 TTTTCATCAGT TAAGCGCGG TGAAAACTG AAAGCGCGC TGGCGAAAGG ACTATCAGAG 360
 GATGCAGATC TGCTGCTGTT AGATGAACCG ACAAACCACC TTGATGAAAA AAGCTTGCAA 420
 TTTCTCATCC AACAGCTGAA ACATTATAAC GGCACGTGTA TTCTCGTTTC TCACGATCGA 480
 TATTTTTTAG ACGAAGCCGC AACAAAAATA TGGTCTGCTG AGGATCAGAC GCTGATTGAA 540
 TTCAAAGGGA ATTACTCCGG GTATATGAAG TTCCGGGAGA AGAAAAGACT CACCCAGCAG 600
 CGTGAATATG AAAAGCAGCA AAAAATGGTT GAACGGATTG AAGCACAAT GAATGGGCTC 660
 GCTTCTGGT CGGAAAAAGC CCATGCTCAA TCGACGAAA AGGAAGGGTT TAAAGAATAT 720
 CACCGGTAA AAGCGAAGCG TACGGATGCC CAGATAAAT CCAAGCAGAA GCGGCTTGAA 780
 AAAGAGCTTG AAAAAGCAA GCGGAACCC GTTACCCAG AATATACAGT CCGCTTTTCA 840
 ATCGATACAA CCCACAAAAC AGGAAAACGT TTTTLAGAAG TTCAGAAATG AACAAAAGCG 900
 TTTGGAGAAA GGACTCTCTT TAAAAACGCA AACTTTACAA TTCAGCACGG CGAAAAGGTT 960

FIG. 3B

GCGATCATAG GCCCAATGG CAGCGGAAAA ACGACATTAC TGAACATCAT TCTGGGACAG 1020
 GAAACAGCAG AAGGAAGTGT ATGGGTGTCG CCGTCCGCAA ACATCGGCTA TTTAACGCAG 1080
 GAGGTGTTG ATTTGCCTTT AGAACAAACA CCGGAAGAGT TATTTGAGAA TGAAACATTC 1140
 AAAGCAAGGG GGCACGTTCA AAATCTGATG AGGCACTTAG GTTTTACAGC CGCCCAATGG 1200
 ACTGAACCGA TCAAGCATAT GAGTATGGGT GAGCGTGTA AGATCAAGCT GATGGCATAT 1260
 ATTCTGGAGG AAAAAGACGT GCTGATTTTA GATGAGCCGA CAAACCATCT CGACCTGCCG 1320
 TCACGCGAAC AGCTGGAAGA AACACTGTCA CAATACAGCG GCACATGCTT GCGGTTTCA 1380
 CATGACCGAT ACTTCTCGA AAAACAACA AACAGTAAAC TCGTCATCTC AAACAACGGC 1440
 ATCGAAAAGC AGTTAAACGA CGTTCCTTCA GAAAGAAATG AGCGGGAGGA GCTTCGGTTA 1500
 AAGCTTGAGA CAGAAAGACA AGAAGTGCTG GGAAAGCTCA GTTTTATGAC GCCAAATGAT 1560
 AAAGGGTATA AGGAGCTTGA TCAGGCTTTC AATGAGCTTA CGAAACGAAT AAAAGAGCTG 1620
 GATCATCAAG ACAAAAAAGA CTGA 1644

【図4】

FIG. 4A

MetLysGluIleValThrLeuThrAsnValSerTyrGluValLysAspGlnThrValPhe 20
 LysHisValAsnAlaSerValGlnGlnGlyAspIleIleGlyIleIleGlyLysAsnGly 40
AlaGlyLysSerThrLeuLeuHisLeuIleHisAsnAspLeuAlaProAlaGlnGlyGln 60
 IleLeuArgLysAspIleLysLeuAlaLeuValGluGlnGluThrAlaAlaTyrSerPhe 80
 AlaAspGlnThrProAlaGluLysLysLeuLeuGluLysTrpHisValProLeuArgAsp 100
PheHisGlnLeuSerGlyGlyGluLysLeuLysAlaArgLeuAlaLysGlyLeuSerGlu 120
AspAlaAspLeuLeuLeuLeuAspGluProThrAsnHisLeuAspGluLysSerLeuGln 140
 PheLeuIleGlnGlnLeuLysHisTyrAsnGlyThrValIleLeuValSerHisAspArg 160
 TyrPheLeuAspGluAlaAlaThrLysIleTrpSerLeuGluAspGlnThrLeuIleGlu 180
 PheLysGlyAsnTyrSerGlyTyrMetLysPheArgGluLysLysArgLeuThrGlnGln 200
 ArgGluTyrGluLysGlnGlnLysMetValGluArgIleGluAlaGlnMetAsnGlyLeu 220
 AlaSerTrpSerGluLysAlaHisAlaGlnSerThrLysLysGluGlyPheLysGluTyr 240
 HisArgValLysAlaLysArgThrAspAlaGlnIleLysSerLysGlnLysArgLeuGlu 260
 LysGluLeuGluLysAlaLysAlaGluProValThrProGluTyrThrValArgPheSer 280
 IleAspThrThrHisLysThrGlyLysArgPheLeuGluValGlnAsnValThrLysAla 300
 PheGlyGluArgThrLeuPheLysAsnAlaAsnPheThrIleGlnHisGlyGluLysVal 320

FIG. 4B

AlaIleIleGlyProAsnGlySerGlyLysThrThrLeuLeuAsnIleIleLeuGlyGln 340
 GluThrAlaGluGlySerValTrpValSerProSerAlaAsnIleGlyTyrLeuThrGln 360
 GluValPheAspLeuProLeuGluGlnThrProGluGluLeuPheGluAsnGluThrPhe 380
 LysAlaArgGlyHisValGlnAsnLeuMetArgHisLeuGlyPheThrAlaAlaGlnTrp 400
 ThrGluProIleLysHisMetSerMetGlyGluArgValLysIleLysLeuMetAlaTyr 420
 IleLeuGluGluLysAspValLeuIleLeuAspGluProThrAsnHisLeuAspLeuPro 440
 SerArgGluGlnLeuGluGluThrLeuSerGlnTyrSerGlyThrLeuLeuAlaValSer 460
HisAspArgTyrPheLeuGluLysThrThrAsnSerLysLeuValIleSerAsnAsnGly 480
 IleGluLysGlnLeuAsnAspValProSerGluArgAsnGluArgGluGluLeuArgLeu 500
 LysLeuGluThrGluArgGlnGluValLeuGlyLysLeuSerPheMetThrProAsnAsp 520
 LysGlyTyrLysGluLeuAspGlnAlaPheAsnGluLeuThrLysArgIleLysGluLeu 540
 AspHisGlnAspLysLysAsp 547

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)	
C 0 7 K	14/32	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/10	
C 1 2 Q	1/10		1/34	
	1/34		1/68	A
	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53			M
			33/566	
	33/566		33/569	B
	33/569	C 1 2 N	15/00	Z N A A

(72)発明者 エリック・トッド・バイマ
 アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ
 ロトン, イースタン・ポイント・ロード,
 ファイザー・グローバル・リサーチ・アン
 ド・ディベロプメント

Fターム(参考) 2G045 AA28 AA40 BA11 BB50 DA12
 DA13 DA36 FB02
 4B024 AA01 BA11 CA02 DA06 GA14
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ06 QQ08
 QQ30 QQ43 QR10 QR32 QR41
 QR55 QR75 QR77 QS34 QX01
 4B065 AA01X AA19X AB01 AC10
 BD36 CA24 CA44
 4C085 AA03 AA38 BA08 BB11 CC07
 DD22 DD23 DD62 EE01 EE06
 FF24 GG01 GG08
 4H045 AA10 BA10 CA11 DA89 EA29
 FA74

专利名称(译)	HARA多肽和核酸，及其相关方法和用途		
公开(公告)号	JP2002355073A	公开(公告)日	2002-12-10
申请号	JP2002015700	申请日	2002-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	ジョンパトリックミューラージュニア エリックトッドバイマ		
发明人	ジョン・パトリック・ミューラー、ジュニア エリック・トッド・バイマ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/24 C07K14/315 C07K14/32 C12N1/21 C12N15/09 C12Q1/10 C12Q1/34 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/315 C07K14/32		
FI分类号	A61K39/00.H A61K39/39 A61P31/04 C07K14/24 C07K14/32 C12N1/21 C12Q1/10 C12Q1/34 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.B C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/ FB02 4B024/AA01 4B024/BA11 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/GA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ30 4B063/QQ43 4B063/QR10 4B063/QR32 4B063/ QR41 4B063/QR55 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA01X 4B065/ AA19X 4B065/AB01 4B065/AC10 4B065/BD36 4B065/CA24 4B065/CA44 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA08 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/ EE06 4C085/FF24 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA89 4H045/EA29 4H045/FA74		
优先权	60/265034 2001-01-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：鉴定转运蛋白及其底物抗菌化合物，以鉴定其表达可能导致生物体产生抗生素抗性的基因。本发明涉及粪肠球菌和枯草芽孢杆菌的harA多肽以及编码harA多肽的核酸及其突变体，以及在筛选和诊断方法中使用该多肽和核酸的方法。

生物	核苷酸	核酸(%)			
		化合物1	化合物2	化合物3	化合物4
黄色杆菌	野生型、嗜酸性	≤12	≤12	≤12	≤12
链球菌 (S11)	野生型、嗜酸性	≤12	≤12	≤12	≤12
S11 (突变体)	野生型、嗜酸性 + 47カウ-05	≥100	≥100	≥100	≥100
S11 (突变体) (S11)	野生型、嗜酸性 + 枯草芽孢杆菌 harA 結合 位点	≥100	≥100	≥100	≥100
枯草芽孢杆菌	野生型、嗜性	≥100	≥100	≥100	≥100
链球菌 (S11)	野生型、嗜性	≤12	≤12	≤12	≤12
链球菌 (S11)	野生型、嗜性	≥100	≥100	≥100	≥100
链球菌 (S11)	野生型、嗜性	≤12	≤12	≤12	≤12
链球菌 (S11)	野生型、嗜性	≥100	≥100	≥100	≥100