(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-522980
(P2005-522980A)
(43)公表日　平成17年8月4日(2005.8.4)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B024
A61K 31/7105	A61K 31/7105		4B029
A61K 38/00	A61K 39/395	D	4B063
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4B064

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 141 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-583605 (P2002-583605)
(86)(22)出願日　平成14年4月23日 (2002.4.23)
(85)翻訳文提出日　平成15年12月18日 (2003.12.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/013142
(87)国際公開番号　WO2002/086090
(87)国際公開日　平成14年10月31日 (2002.10.31)
(31)優先権主張番号　60/285,697
(32)優先日　平成13年4月23日 (2001.4.23)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/287,066
(32)優先日　平成13年4月27日 (2001.4.27)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/295,890
(32)優先日　平成13年6月5日 (2001.6.5)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　501299451
エリトラ　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カルフォルニア　９２１２１　サン　ディエゴ　サイエンス　センター　ドライブ　１０４１０
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アスペルギルス・フミガーツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓｆｕｍｉｇａｔｕｓ）の必須遺伝子の同定および使用方法

(57)【要約】
本発明は、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）のゲノム中の遺伝子が必須のものであるかどうか、およびその遺伝子が毒性または病原性に不可欠であるかどうかについて実験的に確認することを可能にする、ヌクレオチド配列、方法および組成物を提供する。その方法は、標的遺伝子が条件発現下に置かれている遺伝的変異体の構築を含む。必須遺伝子および悪性感染症の発症に重要であるそのような遺伝子の同定は、アスペルギルス・フミガーツスに対する新規薬剤のスクリーニング手段を開発するための基礎を提供する。本発明はさらに、必須遺伝子であって薬剤スクローニングの標的となり得るアスペルギルス・フミガーツス遺伝子を提供する。標的遺伝子のヌクレオチド配列は、様々な薬剤探索目的で、例えば組換えタンパク質の発現、ハイブリダイゼーションアッセイおよび核酸アレイの構築のために、使用することができる。本発明の必須遺伝子によってコードされるタンパク質および様々なスクリーニング方法における必須遺伝子の改変アレルを含有する遺伝子操作された細胞の使用も、本発明に包含される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本質的に配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つのアミノ酸配列からなる遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む、精製または単離された核酸分子。
【請求項２】
前記ヌクレオチド配列が配列番号2001～2594または7001～7603のうちの１つである、請求項１に記載の核酸分子。
【請求項３】
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603のうちの１つの断片を含む核酸分子であって、該断片が、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603のうちの１つの少なくとも10個、20個、25個、30個、50個および100個連続したヌクレオチドを含む断片からなる群より選択される、前記核酸分子。
【請求項４】
下記(a)または(b)のヌクレオチド配列：
(a) 配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603のうちの１つからなる群より選択されるヌクレオチド配列、または
(b) 配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つからなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
からなる第２の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、但し該ストリンジェントな条件が、フィルターに結合したDNAに対する、６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中、およそ45℃でのハイブリダイゼーションと、それに続く0.2×SSC／0.1%SDS中でのおよそ50～65℃での洗浄とを含む、前記核酸分子。
【請求項５】
下記：
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603、
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603の少なくとも25個連続したヌクレオチドを含む断片、
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603と相補的な配列、および
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594または6001～6603の少なくとも25個連続したヌクレオチドを含む断片と相補的な配列、
からなる群より選択される配列に対して、BLASTN version 2.0をデフォルトパラメーターで用いて決定する場合に少なくとも30%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）またはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）以外の生物から取得される、精製または単離された核酸分子。
【請求項６】
請求項１、２、３、４または５に記載の核酸分子と機能しうる形で連結されたプロモーターを含有するベクター。
【請求項７】
プロモーターが調節性のものである、請求項６に記載のベクター。
【請求項８】
請求項７に記載のベクターを含有する宿主細胞。
【請求項９】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、精製または単離されたポリペプチド。
【請求項１０】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つからなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、FASTA version 3.0t78をデフォルトパラメーターで用いて決定する場合に少なくとも30%の類似性を有するアミノ酸配列を含む、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）またはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）以外の生

物から取得される、精製または単離されたポリペプチド。
【請求項１１】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つから選択されるアミノ酸配列の少なくとも６個連続した残基からなる、第１のポリペプチドの断片を、第２のポリペプチドと融合して含む融合タンパク質。
【請求項１２】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つからなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と機能しうる形で連結されたプロモーターを含有するベクターを細胞内に導入すること、および該細胞を培養して該ヌクレオチド配列を発現させることを含む、ポリペプチドの製造方法。
【請求項１３】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つからなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と機能しうる形で連結された異種プロモーターを含有する細胞を提供すること、および該細胞を培養して該ヌクレオチド配列を発現させることを含む、ポリペプチドの製造方法。
【請求項１４】
配列番号2001～2594または7001～7603のうちの１つからなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる遺伝子産物の活性をモジュレートする化合物の同定方法であって、下記(a)および(b)：
(a) 該遺伝子産物を化合物に接触させること、および
(b) 該化合物が該遺伝子産物の活性をモジュレートするかどうかを判定すること、
を含む、前記方法。
【請求項１５】
前記遺伝子産物の活性が阻害されることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記遺伝子産物がポリペプチドであり、かつ前記活性が、酵素活性、炭素化合物異化活性、生合成活性、トランスポーター活性、転写活性、翻訳活性、シグナル伝達活性、DNA複製活性、および細胞分裂活性からなる群より選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つの少なくとも６個の連続した残基を含むアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドを含む組成物を、動物内に導入することを含む、該動物における免疫応答を惹起する方法。
【請求項１８】
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603のうちの１つからなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む遺伝子が、不活性であるか、または異種プロモーターの制御下に置かれている、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の分離株。
【請求項１９】
異種プロモーターの制御下にある、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603のうちの１つから選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含有する、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の分離株。
【請求項２０】
異種プロモーターが調節性である、請求項１８または１９に記載の単離株。
【請求項２１】
配列番号3001～3594または8001～8603のうちの１つからなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドもしくはその断片と結合する化合物または結合パートナーの同定方法であって、下記(a)および(b):
(a) 該ポリペプチドもしくはその断片を、複数の化合物または１以上の結合パートナーを含む調製物と接触させること、および

(b) 該ポリペプチドもしくはその断片と結合する化合物または結合パートナーを同定すること、
を含む、前記方法。
【請求項２２】
アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の成長または増殖を阻止する能力を有する化合物の同定方法であって、下記工程(a)～(c)：
(a) アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）細胞において、配列番号2001～2594または7001～7603からなる群より選択される核酸によってコードされる遺伝子産物のレベルまたは活性を野生型細胞と比較して低下させる工程であって、その低下したレベルが該細胞に対して致死的でない、該工程、
(b) 該細胞を化合物に接触させる工程、および
(c) 該化合物が該細胞の成長または増殖を阻止するかどうかを判定する工程、
を含む、前記方法。
【請求項２３】
前記の遺伝子産物のレベルまたは活性を低下させる工程が、前記遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を、前記遺伝子産物が前記の低下したレベルにて発現される条件下で、調節プロモーターから転写させることを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記遺伝子産物が、配列番号3001～3594または8001～8603によってコードされるポリペプチドからなる群より選択される配列を含むポリペプチドである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）細胞の成長または増殖を阻止する方法であって、該細胞を、
(i) 配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択されるヌクレオチド配列のレベルを低下させるかもしくは該ヌクレオチド配列の活性を阻害する化合物、または
(ii) 配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子産物のレベルを低下させるかもしくは該遺伝子産物の活性を阻害する化合物、
と接触させることを含む、前記方法。
【請求項２６】
前記遺伝子産物が、配列番号3001～3594または8001～8603によってコードされるポリペプチドからなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記化合物が、抗体、抗体のフラグメント、アンチセンス核酸分子またはリボザイムである、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
下記工程(a)および(b):
(a) 複数の候補化合物をスクリーニングして、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子産物の活性またはレベルを低下させる化合物を同定する工程、および
(b) そのようにして同定された化合物を製造する工程、
を含む、抗真菌化合物の製造方法。
【請求項２９】
前記遺伝子産物が、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603によってコードされるポリペプチドからなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】
アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）による被験体の感染の治療方法であって、治療上有効な量の、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択される配列を含む核酸によってコードされる遺伝子産物の活性またはレベルを低下させる化合物、および製薬上許容される担体、を含有する医薬組成物を該被験体に投与することを含む、前記方法。
【請求項３１】
前記化合物が、抗体、抗体のフラグメント、アンチセンス核酸分子またはリボザイムである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）による物体の汚染を防止または阻止する方法であって、該物体を、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択される配列を含む核酸によってコードされる遺伝子産物の活性またはレベルを低下させる化合物を有効量にて含む組成物と接触させることを含む、前記方法。
【請求項３３】
製薬上許容される担体中に、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択される核酸によってコードされる遺伝子産物の活性またはレベルを低下させる作用物質を治療上有効な量にて含む、医薬組成物。
【請求項３４】
被験体が、植物、脊椎動物、哺乳動物、鳥類およびヒトからなる群より選択される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
請求項9または１０に記載のポリペプチドと結合する、抗体調製物。
【請求項３６】
モノクローナル抗体を含む、請求項３５に記載の抗体調製物。
【請求項３７】
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603のうちの１つを含むヌクレオチド配列によってコードされる標的遺伝子産物に対して化合物を評価する方法であって、下記工程(a)～(c):
(a) 野生型真菌細胞を該化合物と接触させて、第１のタンパク質発現プロファイルを作成する工程、
(b) 該標的遺伝子が大幅に過小発現されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養された請求項１８または１９に記載の真菌細胞のタンパク質発現プロファイルを決定し、該培養細胞についての第２のタンパク質発現プロファイルを作成する工程、および
(c) 第１のタンパク質発現プロファイルを第２のタンパク質発現プロファイルと比較して、それらのプロファイルにおける類似点を特定する工程、
を含む、前記方法。
【請求項３８】
各株の細胞が、１つ以上のおよそ20ヌクレオチドの分子タグをさらに含み、かつ細胞中の各タグの配列がその株の細胞に特有のものである、請求項１８または１９に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）株のコレクション。
【請求項３９】
分子タグが遺伝子破壊カセット内に配置されている、請求項３８に記載のコレクション。
【請求項４０】
請求項１８または１９に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の分離株であって、該株の細胞が、１つ以上のおよそ20ヌクレオチドの分子タグをさらに含み、かつ該細胞中の各タグの配列がその株の細胞に特有のものである、前記分離株

。
【請求項４１】
それぞれの核酸分子が、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択される標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含む、複数の核酸分子を含む核酸分子マイクロアレイ。
【請求項４２】
配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列、もしくは配列番号3001～3594および8001～8603からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸配列を含む、コンピュータまたはコンピュータ可読媒体。
【請求項４３】
真菌性ヌクレオチド配列または真菌性アミノ酸配列と、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594および7001～7603からなる群より選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列または配列番号3001～3594および8001～8603からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸配列との間の、配列相同性を検出することを含む、コンピュータ支援による真菌の推定上の必須遺伝子の同定方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
1．緒言
本発明は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の同定された必須遺伝子のコレクションおよび治療的介入に有効な標的として遺伝子産物を同定および確認する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
2．発明の背景
アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)は、環境の炭素および窒素を再循環させるうえで不可欠な役割を担う腐生真菌である。その天然の生態学的地位は土壌であり、それは土壌に生存し、有機物デブリに依存して増殖する。この種は世界で最も優勢な真菌ではないが、最も広く分布する空気伝播分生子を有する真菌のうちの1つである。それは、すべての分生子頭が何千という分生子を形成して多量に胞子を形成する。大気中に放出された分生子は、肺胞に達するのに十分な程度に小さい直径(2～3μm)を有する。免疫適格個体が分生子を吸入しても、先天免疫機序により比較的効率的に分生子が取除かれるので、悪影響が現れることはめったにない。したがって、近年まで、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)は、アレルギー性の疾患、たとえば、農夫肺、すなわち分生子に繰返し暴露された個体で観測される臨床状態、の原因となる弱い病原体であるとみなされてきた。免疫抑制患者の数および現代の免疫抑制療法の厳格性が増加したことが原因となって、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)は、免疫無防備状態の宿主において重篤で通常致命的な侵襲性感染症を引き起こす最も優勢な空気伝播真菌性病原体になった。
【０００３】
侵襲性アスペルギルス症(IA)は、過去12年間で4倍の増加が観測された。1992年において、癌で死亡した患者では、真菌性感染症の約30%はIAが原因であった。また、全白血病患者の10～25%でIAが発症し、治療を行った場合でさえも、死亡率は80～90%であると推定される。IAの平均発生率は、急性白血病の患者では5～25%、同種骨髄移植(BMT)の後では5～10%、血液疾患の細胞傷害性治療または自己BMTおよび実質性器官移植の後では0.5～5%であると推定される。実質性器官移植の後で発症するIAは、心臓-肺移植患者で最も多く(19～26%)、そして肝臓、心臓、肺、および腎臓レシピエントの順に減少することが見いだされている(1～10%)(Patel and Paya, 1997, Clin. Microbiol. Rev. 10:86-124)。IAは、非血行性状態を内在する患者でも発症し、AIDS患者での報告が増加している(1～12%)(D

enning et al., 1991, N. Engl. J. Med. 324:654-661)。IAはまた、慢性肉芽腫性疾患(CGD)で多く見受けられる感染性合併症でもある(25～40%)。

【０００４】

次の4つのタイプのIAが記載されている(Denning, 1998, Clin, Infect. Dis. 26:781-805): (i) IAの中で最も多い形態である急性または慢性肺アスペルギルス症; (ii) 主にAIDS患者に見受けられ、粘膜および軟骨の浸潤ならびに偽膜形成を様々な度合で有する、気管気管支炎および閉塞性気管支疾患; (iii) 急性侵襲性鼻副鼻腔炎; ならびに(iv) 一般に脳(BMT患者の10～40%)および他の器官(たとえば、皮膚、腎臓、心臓、および眼)を冒す播種性疾患。

【０００５】

体内におけるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の菌糸体成長を伴う他の疾患、たとえば、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)およびアスペルギルス腫もまた、治療的介入が必要である。ABPAは、現在のところ、アスペルギルス(Aspergillus)種により引き起こされる最も重篤なアレルギー性肺合併症である。それは、アトピー性喘息または嚢胞性繊維症に罹患している患者で発症する。一般に「菌球」と呼ばれるアスペルギルス腫は、結核症、類肉腫症、または他の水疱性肺障害により生じた既存の肺腔中および慢性閉塞性副鼻腔中に発生する。

【０００６】

現時点では、アスペルギルス症の治療に利用できるのは、アンホテリシンB(AmB)およびイトラコナゾールだけである(DePauw, 1997, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 16:32-41)。in vitroでの活性にもかかわらず、in vivoでは、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)に対するこれらの薬剤の効力は低いままであり、その結果として、IAによる死亡率は依然として高い。多くの研究および新規薬剤の開発にもかかわらず、抗アスペルギルス(Aspergillus)療法は不十分なままである。IAに対するAmB療法の全体的成功率は34%である。このほか、抗細菌剤が効かない発熱に対してAmBを経験的に投与したとしても、ほとんどのIA症例が発生する。この観測結果から、in vivoでA.フミガーツス(A.fumigatus)に対して活性を有する薬剤が基本的に不十分なものであることは明らかであり、A.フミガーツス(A.fumigatus)において好適な生化学的標的を同定してそれらの生化学的標的に対して活性である新規抗真菌剤を探索および開発することが緊急に必要とされていることがよくわかる。

【０００７】

薬剤スクリーニングの目的で細胞標的を同定および確認するには、一般に、その遺伝子産物を不活性化させれば細胞が生存できなくなることを実験的に実証する必要がある。したがって、A.フミガーツス(A.fumigatus)により発現される同一必須遺伝子産物に対して活性である薬剤は、有効な治療剤であると予測される。同様に、A.フミガーツス(A.fumigatus)の病原性および毒性に必要とされる遺伝子産物もまた、薬剤スクリーニングプログラムの好適な標的を提供すると予想される。この場合、標的の確認は、動物モデル試験において、毒性因子をコードする遺伝子を不活性化させることにより病原性または理想的には毒性が低減されていることが明らかな突然変異A.フミガーツス(A.fumigatus)株を産生させるという実証に基づいている。薬剤標的の同定および確認は、これらの標的が医薬品業界内において高スループットスクリーニング手段の基礎をなすので、新規薬剤の検出および探索を行う際の重要な問題である。

【０００８】

標的の探索は、伝統的には、新たに同定された遺伝子および遺伝子産物を個別に分析して好適な薬剤標的として利用可能であるかを調べるコストと時間のかかるプロセスであった。しかしながら、全ゲノムの大規模なDNA配列分析の出現により、遺伝子探索のプロセスは著しく加速された。したがって、この情報を解析して、まず当該生物の遺伝子をすべて同定し、次に、どの遺伝子が有効な無毒の薬剤の探索に好適な標的になる産物をコードしているか識別するために、新しい方法およびツールが必要とされる。

【０００９】

A.フミガーツス(A.fumigatus)はヒトの主要な真菌性病原体になりつつあるので、臨床用途向けの有効な無毒の治療用化合物に対する需要が高くなってきている。本発明は、薬剤スクリーニング用の新規な標的を同定するためにゲノミクス法を採用する。本発明は、薬剤標的を迅速に確認およびスクリーニングする高スループットストラテジーで使用することのできるA.フミガーツス(A.fumigatus)の必須遺伝子のヌクレオチド配列を提供する。

【発明の開示】

【００１０】

3. 発明の概要

本発明は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子のヌクレオチド配列、遺伝子産物の特性づけ、ならびにそれらの各遺伝子の条件発現突然変異体およびノックアウト突然変異体の構築に関する。したがって、本発明の突然変異体を用いることにより、遺伝子が必須のものであるかどうか、遺伝子が毒性または病原性に必要であるかどうかについて実験的に確認することが可能になる。本明細書に提供される情報は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)に対する新規薬剤用の高スループットスクリーニング法の開発の基礎をなす。

【００１１】

本発明の一実施形態では、薬剤スクリーニング用の標的として利用できる可能性のあるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子のセットを同定する。C.アルビカンス(C.albicans)の成長、生存、および増殖に必須であることが実験的に確認されているカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)遺伝子との配列比較により、そのような遺伝子を同定した。本発明により提供されるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子または毒性遺伝子(すなわち、標的遺伝子)のポリヌクレオチドは、様々な薬剤探索目的に使用することができる。限定されるものではないが、そのポリヌクレオチドを、組換えタンパク質を発現させて、特性づけ、スクリーニング、または治療的使用に供するために; 病原性生物が(永続的に、または特定の発生段階で、または疾患状態で)侵襲または存在する宿主組織に対するマーカーとして; アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)のDNA配列と比較して、同一または類似の生物化学的な活性および/または機能を有する重複遺伝子またはパラログを同定するために; 他の近縁または遠縁の病原性生物のDNA配列と比較して、可能性のあるオーソロガスな必須遺伝子または毒性遺伝子を同定するために; 発現パターンを調べるための核酸アレイに結合させるオリゴマーを選択および作製するために; DNA免疫化法を用いて抗タンパク質抗体を産生させるために; 抗DNA抗体を産生させるかまたは他の免疫応答を惹起する抗原として; ならびに治療剤(たとえば、アンチセンス分子)として、使用することができる。そのポリヌクレオチドが、他のタンパク質に(たとえば、レセプター-リガンド相互作用などで)結合するかまたは結合する可能性のあるタンパク質をコードしている場合、結合が起こるそのような他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを同定するかまたは結合相互作用の阻害剤を同定するアッセイにおいて、そのポリヌクレオチドを使用することもできる。

【００１２】

本発明により提供される必須遺伝子(すなわち、標的遺伝子産物)によってコードされるポリペプチドまたはタンパク質は、高スループットスクリーニング用の複数のタンパク質のパネルまたはアレイのメンバーとして使用することを含む、生物活性を調べるアッセイにおいて; 抗体を産生させるかまたは免疫応答を惹起するために; 体液中のそのタンパク質(またはそのレセプター)のレベルを定量するようにデザインされたアッセイで試薬(標識試薬など)として; 病原性生物が(永続的に、または特定の発生段階で、または疾患状態で)侵襲するまたは存在する宿主組織に対するマーカーとして; ならびにもちろん、とくに毒性因子の場合、相関性レセプターまたはリガンド(結合パートナーとも呼ばれる)を単離するために、使用することができる。そのタンパク質が(たとえば、レセプター-リガンド相互作用などで)他のタンパク質に結合するかまたは結合する可能性がある場合、結合

が起こるそのような他のタンパク質を同定するかまたは結合相互作用の阻害剤を同定するために、そのタンパク質を使用することができる。これらの結合相互作用に関与するタンパク質、たとえば、病原性生物の侵襲性および病原性に関与するタンパク質はまた、結合相互作用に対するペプチドまたは小分子の阻害剤またはアゴニストをスクリーニングするために使用することができる。

【００１３】

他の実施形態では、本発明は、必須遺伝子の発現が異種プロモーターにより調節されるように、必須遺伝子が、異種プロモーターを含むプロモーター置換断片の(たとえば、組換えによる)導入により改変されている、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株を提供する。一例として、DNA結合ドメインと転写活性化ドメインとを含むトランスアクチベータータンパク質の存在により、異種プロモーターからの発現を調節することができる。ただし、これに限定されるものではない。このトランスアクチベータータンパク質のDNA結合ドメインは、異種プロモーター中の配列を認識してそれに結合し、そのプロモーターの転写を増大させる。トランスアクチベータータンパク質は、該タンパク質をコードするヌクレオチド配列を発現させることにより、細胞中で産生させることができる。

【００１４】

本発明では、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)中の改変される遺伝子は、その株の生存、成長、および増殖に必要とされる必須遺伝子に対応する。好ましい実施形態では、これらの改変により、突然変異生物において急速死滅性表現型がもたらされる。したがって、本発明は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株のコレクションであって、それぞれのコレクションが、複数の株を含み、それぞれの株は、異なる条件発現突然変異遺伝子を含有する、前記コレクションを包含する。

【００１５】

コレクションは、コレクション中のそれぞれの株の細胞が、個別に、使用に関連する同一の操作または処理に付されるような、本発明の様々な方法に従って、使用することができる。他の選択肢として、コレクション中のそれぞれの株の細胞は、使用に関連する操作または処理の前に、プールされる。コレクションの概念は、コレクション中の異なる株の真菌細胞または異なる真菌株のプールから得られるデータがセットとして同等に扱われる場合に、データの収集、処理、および解釈に拡張される。

【００１６】

他の実施形態では、本発明は、基板上のアレイの識別可能な位置に配置された複数の規定されたヌクレオチド配列を含む核酸マイクロアレイに関する。規定されたヌクレオチド配列は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の生存、成長、および増殖に必要とされるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子のヌクレオチド配列、および/またはそれぞれの突然変異アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株をマーキングするために利用される特有な分子タグ、に相補的で、かつそれらにハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを含有しうる。

【００１７】

本発明のさらに他の実施形態では、本明細書に開示された方法に従って構築されるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の条件発現突然変異体を、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)に対して有効な抗真菌剤の検出に使用する。試験化合物を存在させてまたは存在させずに様々な成長条件下で、本発明の条件発現突然変異アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)細胞を培養する。次に、成長速度を比較して、化合物が、条件発現遺伝子によってコードされた標的遺伝子産物に対して活性であるかどうかを調べる。この実施形態の一態様では、条件発現遺伝子を実質的に過少発現させて、その遺伝子により発現される遺伝子産物に対して活性な化合物に対する感受性が増強された細胞を提供する。他の選択肢として、条件発現遺伝子を実質的

に過剰発現させて、標的遺伝子の条件発現突然変異アレルにより発現される遺伝子産物に対して活性な化合物に対する耐性が増大されたアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)細胞を提供することも可能である。

【００１８】

本発明のさらに他の実施形態では、開示された方法に従って構築されるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株を、植物またはヒトのような動物の非感染性疾患の治療に有効な治療剤のスクリーニングに使用する。標的のアミノ酸配列と植物または動物の対応アミノ酸配列との類似性の結果として同定された、活性化合物は、植物または動物の疾患、とくにヒト疾患、たとえば癌および免疫障害、を治療するための治療用途を有する可能性がある。

【００１９】

他の実施形態では、本発明は、公知の薬剤の存在下などのさまざまな条件下でアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子および/または毒性遺伝子の発現を分析するための転写プロファイリング法およびプロテオミクス法の使用をさらに包含する。そのような研究から得られる情報は、公知の薬剤の標的および機序を明らかにしたり、公知の薬剤と同じように作用する新規薬剤を見いだしたり、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の生存、成長、および増殖に必須の遺伝子産物とアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の毒性および病原性に関与する遺伝子産物との相互作用を明確化したりするために使用することができる。

【００２０】

これらの薬剤探索ユーティリティーのいずれかまたはすべてをキットにすれば、研究用製品として商品化することができる。キットは、本発明の複数のA.フミガーツス(A.fumigatus)必須遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、抗体、ならびに/または他の試薬を含みうる。

【００２１】

4. 図面の簡単な説明

(後述の「図面の簡単な説明」の項を参照されたい)

5. 発明の詳細な説明

5.1 アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子の同定

5.1.1 アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノムのDNA配列分析

全ゲノムランダムショットガンDNA配列決定の試みを行うことにより、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノムDNAのヌクレオチド配列を得た。ゲノムDNAは、ヒトアスペルギルス症患者の感染肺組織から単離されたアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)CEA 10の分離株から調製したものである。ゲノムDNAを機械的に剪断して断片にし、酵素処理して平滑末端を生成させ、E. coli pUCl9系およびpBR322系プラスミド中にクローン化してゲノムDNAライブラリーを形成した。pUCl9をベースとするゲノムDNAライブラリークローンの平均インサートサイズは約2kbであり、プラスミドはE. coli細胞中に高コピー数で存在していた。pBR322をベースとするクローンの他の2つのゲノムDNAライブラリーは、それぞれ、約10kbおよび約50kbのインサートを含有する。ロボット操作によりゲノムクローンのコロニーを384ウェルタイタープレートに移し; 細胞のアルカリ溶解およびDNAのイソプロパノール沈殿に基づく標準的方法により、ジデオキシDNAシークエンシング反応用のプラスミドDNA鋳型を調製した。標準的なM13フォワードおよびリバースプライマーならびにABI-Prism BigDyeターミネーター化学(Applied Biosystems)を用いてDNAシークエンシング反応を行い、キャピラリーアレイ・シークエンサーABI PRISM 3700 DNA Analyzer(Applied Biosystems)を用いて分析した。生成したヌクレオチド配列をトリミングしてエラーを排除し、ヒトゲノムの配列決定用に開発されたソフトウェアアルゴリズムによりアセンブリーしてコンティグおよびスカフォードを形成した。シークエンシング反応および配列分析の方法論に関する詳細な説明については、Venter et al., 2001, Science 291:1304 および; Myers et al., 2000, Science 287:2196を参照されたい。これらの文献はその全体が参照により本明細書に組み入れられるものとす

る。

【００２２】

本発明は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子のヌクレオチド配列を提供する。本発明の必須遺伝子は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノムDNAのヌクレオチド配列をカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の公知の必須遺伝子のヌクレオチド配列と比較することにより同定される。本発明以前には、これらのアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子のヌクレオチド配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の生存、成長、および増殖に対するそれらの必須性は知られていない。

【００２３】

本発明で使用されるヌクレオチド配列データのセットは、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノムの10倍の概算被覆倍率を示す。まず最初に、そのヌクレオチド配列について、コード領域、イントロン、およびスプライス部位を同定することができるGenescanおよびGlimmer M (The Institute of Genome Research)のようなソフトウェアプログラムにより、アノテーションを行った。さらに、自動および手動でヌクレオチド配列の手直しを行うことにより、コード領域および他の遺伝子特徴の正確な特性付けを精緻化し、確定した。

【００２４】

推定アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子のヌクレオチド配列をカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の公知の必須遺伝子のヌクレオチド配列と比較した。30%のDNA配列類似性および/または推定アミノ酸配列について35%の類似性を示すアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子を、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子として同定する。

【００２５】

600を超えるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子のヌクレオチド配列が、添付の配列表中に提供され、それらはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)中のそれらの相同体の識別子と表1中で相互参照されている。それぞれの必須遺伝子のヌクレオチド配列とその対応するアミノ酸配列および他の関連配列との関連づけを容易にするために、配列識別子を合計8ブロックにまとめ、各ブロックに1000個の配列番号を割り振った。4つのブロック(各ブロックが配列のタイプに対応している)中の最初の系列の配列番号は、配列番号を付された594個の配列と、配列を伴わない405個の配列番号(位置保持記号として機能する)とを有する。したがって、必須遺伝子の4つの関連配列のそれぞれに対する配列番号は、1000だけ離れている。たとえば、配列番号1、1001、2001、および3001は、それぞれ、ゲノム配列、イントロンを有するコード領域のヌクレオチド配列、オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列、および1つの必須遺伝子の遺伝子産物のアミノ酸配列に対するものであり、そしてこの例では、A.フミガーツス(A.fumigatus)必須遺伝子は、AfYMR290Cである。同様に、4つのブロック(各ブロックが配列のタイプに対応している)中の２番目の系列の配列番号は、配列番号を付された603個の配列と、配列を伴わない397個の配列番号(位置保持記号として機能する)とを有する。したがって、必須遺伝子の4つの関連配列のそれぞれに対する配列番号は、1000だけ離れている。たとえば、配列番号5001、6001、7001、および8001は、それぞれ、ゲノム配列、イントロンを有するコード領域のヌクレオチド配列、オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列、およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子AfYMR290Cの変異体の遺伝子産物のアミノ酸配列に、対するものである。

【００２６】

必須遺伝子のヌクレオチド配列、推定アミノ酸配列、核酸アレイ、組換えベクター、およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子のヌクレオチド配列を含む発現ベクターの特徴を、これ以降の第5.2.1節、第5.2.2節、および第5.2.3節に記載し説明する。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子のヌクレオチド配列を含む遺伝子操作された酵母細胞、原核細胞、および高等真核生物の

細胞を第5.2.3節に示し、説明する。本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子に対応するアンチセンス核酸分子を第5.2.6節に示す。

【表１】

表１

アスペルギルス・フミガーツス染色体配列の呼称	カンジダ・アルビカンス相同体の呼称	ゲノム配列の配列番号	イントロンを有するコード配列の配列番号	オープンリーディングフレームの配列番号	遺伝子産物のアミノ酸配列の配列番号
AfYMR290C	CaYMR290C	1	1001	2001	3001
AfYPR034W	CaYPR034W	2	1002	2002	3002
AfORF6_4497	CaORF6_4497	3	1003	2003	3003
AfYJL008C	CaYJL008C	4	1004	2004	3004
AfYIL068C	CaYIL068C	5	1005	2005	3005
AfYHR196W	CaYHR196W	6	1006	2006	3006
AfYMR197C	CaYMR197C	7	1007	2007	3007
AfYLR100W	CaYLR100W	8	1008	2008	3008
AfYDL055C	CaYDL055C	9	1009	2009	3009
AfYDL043C	CaYDL043C	10	1010	2010	3010
AfYJL054W	CaYJL054W	11	1011	2011	3011
AfYHR072W2	CaYHR072W2	12	1012	2012	3012
AfYPR119W	CaYPR119W	13	1013	2013	3013
AfYDR013W	CaYDR013W	14	1014	2014	3014
AfYGR255C	CaYGR255C	15	1015	2015	3015
AfYDR353W	CaYDR353W	16	1016	2016	3016
AfYNR053C	CaYNR053C	17	1017	2017	3017
AfYLR222C	CaYLR222C	18	1018	2018	3018
AfYER025W	CaYER025W	19	1019	2019	3019
AfYOR272W	CaYOR272W	20	1020	2020	3020
AfYGL206C	CaYGL206C	21	1021	2021	3021
AfYMR208W	CaYMR208W	22	1022	2022	3022
AfYKL019W	CaYKL019W	23	1023	2023	3023
AfYJR006W	CaYJR006W	24	1024	2024	3024
AfYIL075C	CaYIL075C	25	1025	2025	3025
AfYER070W	CaYER070W	26	1026	2026	3026
AfYMR113W	CaYMR113W	27	1027	2027	3027
AfYIR011C	CaYIR011C	28	1028	2028	3028
AfYER012W	CaYER012W	29	1029	2029	3029
AfORF6_8837	CaORF6_8837	30	1030	2030	3030
AfYJR002W	CaYJR002W	31	1031	2031	3031
AfYPL043W	CaYPL043W	32	1032	2032	3032
AfYNL110C	CaYNL110C	33	1033	2033	3033
AfORF6_4899	CaORF6_4899	34	1034	2034	3034
AfORF6_5199	CaORF6_5199	35	1035	2035	3035
AfYFR052W	CaYFR052W	36	1036	2036	3036
AfYMR146C	CaYMR146C	37	1037	2037	3037
AfYGL003C	CaYGL003C	38	1038	2038	3038
AfYFL008W	CaYFL008W	39	1039	2039	3039
AfYDL028C	CaYDL028C	40	1040	2040	3040
AfYHR070W	CaYHR070W	41	1041	2041	3041
AfYLR115W	CaYLR115W	42	1042	2042	3042
AfYLR197W	CaYLR197W	43	1043	2043	3043
AfYOL022C	CaYOL022C	44	1044	2044	3044
AfYIL062C	CaYIL062C	45	1045	2045	3045
AfYPR086W	CaYPR086W	46	1046	2046	3046

【００２７】

AfYPR183W	CaYPR183W	47	1047	2047	3047
AfYNL126W	CaYNL126W	48	1048	2048	3048
AfYLR167W	CaYLR167W	49	1049	2049	3049
AfYJL010C	CaYJL010C	50	1050	2050	3050
AfYLR026C	CaYLR026C	51	1051	2051	3051
AfYBR192W	CaYBR192W	52	1052	2052	3052
AfYDR088C	CaYDR088C	53	1053	2053	3053
AfYOR280C	CaYOR280C	54	1054	2054	3054
AfYNL244C	CaYNL244C	55	1055	2055	3055
AfYER021W	CaYER021W	56	1056	2056	3056
AfYLR186W	CaYLR186W	57	1057	2057	3057
AfYDR527W	CaYDR527W	58	1058	2058	3058
AfYDL017W	CaYDL017W	59	1059	2059	3059
AfYGR090W	CaYGR090W	60	1060	2060	3060
AfYKL182W	CaYKL182W	61	1061	2061	3061
AfYPL231W	CaYPL231W	62	1062	2062	3062
AfYDR120C	CaYDR120C	63	1063	2063	3063
AfYBR080C	CaYBR080C	64	1064	2064	3064
AfYPR082C	CaYPR082C	65	1065	2065	3065
AfYOR310C	CaYOR310C	66	1066	2066	3066
AfYDL205C	CaYDL205C	67	1067	2067	3067
AfYIR022W	CaYIR022W	68	1068	2068	3068
AfYGR246C	CaYGR246C	69	1069	2069	3069
AfYCL017C	CaYCL017C	70	1070	2070	3070
AfYBL023C	CaYBL023C	71	1071	2071	3071
AfORF6_5147	CaORF6_5147	72	1072	2072	3072
AfYGR209C	CaYGR209C	73	1073	2073	3073
AfYLR306W	CaYLR306W	74	1074	2074	3074
AfYLL012W	CaYLL012W	75	1075	2075	3075
AfYPL217C	CaYPL217C	76	1076	2076	3076
AfYPR110C	CaYPR110C	77	1077	2077	3077
AfYMR288W	CaYMR288W	78	1078	2078	3078
AfYJL074C	CaYJL074C	79	1079	2079	3079
AfYOR119C	CaYOR119C	80	1080	2080	3080
AfYNR017W	CaYNR017W	81	1081	2081	3081
AfYDL060W	CaYDL060W	82	1082	2082	3082
AfYIL021W	CaYIL021W	83	1083	2083	3083
AfTRP5	CaTRP5	84	1084	2084	3084
AfYPL203W	CaYPL203W	85	1085	2085	3085
AfYPL094C	CaYPL094C	86	1086	2086	3086
AfYBL026W	CaYBL026W	87	1087	2087	3087
AfYKL210W	CaYKL210W	88	1088	2088	3088
AfYIL003W	CaYIL003W	89	1089	2089	3089
AfYDR212W	CaYDR212W	90	1090	2090	3090
AfYLR002C	CaYLR002C	91	1091	2091	3091
AfYLR397C	CaYLR397C	92	1092	2092	3092
AfYGL001C	CaYGL001C	93	1093	2093	3093
AfYPR041W	CaYPR041W	94	1094	2094	3094
AfYGR156W	CaYGR156W	95	1095	2095	3095
AfYPL010W	CaYPL010W	96	1096	2096	3096
AfYLR259C	CaYLR259C	97	1097	2097	3097
AfYBR196C	CaYBR196C	98	1098	2098	3098

【００２８】

AfYJR045C	CaYJR045C	99	1099	2099	3099
AfYBR202W	CaYBR202W	100	1100	2100	3100
AfYNL245C	CaYNL245C	101	1101	2101	3101
AfORF6_4747	CaORF6_4747	102	1102	2102	3102
AfORF6_7375	CaORF6_7375	103	1103	2103	3103
AfYER136W	CaYER136W	104	1104	2104	3104
AfYPL093W	CaYPL093W	105	1105	2105	3105
AfYBR159W	CaYBR159W	106	1106	2106	3106
AfYJL034W	CaYJL034W	107	1107	2107	3107
AfYDR172W	CaYDR172W	108	1108	2108	3108
AfYOR157C	CaYOR157C	109	1109	2109	3109
AfYLR127C	CaYLR127C	110	1110	2110	3110
AfYMR213W	CaYMR213W	111	1111	2111	3111
AfYHR019C	CaYHR019C	112	1112	2112	3112
AfYLR229C	CaYLR229C	113	1113	2113	3113
AfYGL130W	CaYGL130W	114	1114	2114	3114
AfYJL002C	CaYJL002C	115	1115	2115	3115
AfYPR105C	CaYPR105C	116	1116	2116	3116
AfYBR055C	CaYBR055C	117	1117	2117	3117
AfYPR175W	CaYPR175W	118	1118	2118	3118
AfYPL063W	CaYPL063W	119	1119	2119	3119
AfYFL022C	CaYFL022C	120	1120	2120	3120
AfYML075C	CaYML075C	121	1121	2121	3121
AfYNL222W	CaYNL222W	122	1122	2122	3122
AfYLR086W	CaYLR086W	123	1123	2123	3123
AfYOL142W	CaYOL142W	124	1124	2124	3124
AfYHR186C	CaYHR186C	125	1125	2125	3125
AfYNL287W	CaYNL287W	126	1126	2126	3126
AfYLL018C	CaYLL018C	127	1127	2127	3127
AfYAL015C	CaYAL015C	128	1128	2128	3128
AfYOR335C	CaYOR335C	129	1129	2129	3129
AfYDL193W	CaYDL193W	130	1130	2130	3130
AfYML126C	CaYML126C	131	1131	2131	3131
AfYDR404C	CaYDR404C	132	1132	2132	3132
AfYML130C	CaYML130C	133	1133	2133	3133
AfYKR081C	CaYKR081C	134	1134	2134	3134
AfYER172C	CaYER172C	135	1135	2135	3135
AfYOL010W	CaYOL010W	136	1136	2136	3136
AfYPR178W	CaYPR178W	137	1137	2137	3137
AfORF6_4974	CaORF6_4974	138	1138	2138	3138
AfYGL022W	CaYGL022W	139	1139	2139	3139
AfYGR280C	CaYGR280C	140	1140	2140	3140
AfYDL108W	CaYDL108W	141	1141	2141	3141
AfYOL005C	CaYOL005C	142	1142	2142	3142
AfYJL194W	CaYJL194W	143	1143	2143	3143
AfYOR151C	CaYOR151C	144	1144	2144	3144
AfYCL031C	CaYCL031C	145	1145	2145	3145
AfYOR210W	CaYOR210W	146	1146	2146	3146
AfYGL123W	CaYGL123W	147	1147	2147	3147
AfYOL139C	CaYOL139C	148	1148	2148	3148
AfORF6_8482	CaORF6_8482	149	1149	2149	3149
AfYKL035W	CaYKL035W	150	1150	2150	3150

【００２９】

AfORF6_5210	CaORF6_5210	151	1151	2151	3151
AfYOR294W	CaYOR294W	152	1152	2152	3152
AfYJL001W	CaYJL001W	153	1153	2153	3153
AfYHR052W	CaYHR052W	154	1154	2154	3154
AfYNL313C	CaYNL313C	155	1155	2155	3155
AfYLR249W	CaYLR249W	156	1156	2156	3156
AfYKL181W	CaYKL181W	157	1157	2157	3157
AfYML092C	CaYML092C	158	1158	2158	3158
AfYGL106W	CaYGL106W	159	1159	2159	3159
AfYLR243W	CaYLR243W	160	1160	2160	3160
AfYPL151C	CaYPL151C	161	1161	2161	3161
AfYER125W	CaYER125W	162	1162	2162	3162
AfYNL006W	CaYNL006W	163	1163	2163	3163
AfYJL087C	CaYJL087C	164	1164	2164	3164
AfYBR237W	CaYBR237W	165	1165	2165	3165
AfYLR117C	CaYLR117C	166	1166	2166	3166
AfYDR091C	CaYDR091C	167	1167	2167	3167
AfYGL040C	CaYGL040C	168	1168	2168	3168
AfYDR454C	CaYDR454C	169	1169	2169	3169
AfYDR267C	CaYDR267C	170	1170	2170	3170
AfYGR264C	CaYGR264C	171	1171	2171	3171
AfYMR308C	CaYMR308C	172	1172	2172	3172
AfYNL124W	CaYNL124W	173	1173	2173	3173
AfYDR473C	CaYDR473C	174	1174	2174	3174
AfYBR154C	CaYBR154C	175	1175	2175	3175
AfYDL140C	CaYDL140C	176	1176	2176	3176
AfYHR005C	CaYHR005C	177	1177	2177	3177
AfYER003C	CaYER003C	178	1178	2178	3178
AfYBL076C	CaYBL076C	179	1179	2179	3179
AfYBR265W	CaYBR265W	180	1180	2180	3180
AfYDL153C	CaYDL153C	181	1181	2181	3181
AfYHR024C	CaYHR024C	182	1182	2182	3182
AfYDR062W	CaYDR062W	183	1183	2183	3183
AfYHR169W	CaYHR169W	184	1184	2184	3184
AfYBR256C	CaYBR256C	185	1185	2185	3185
AfYLL011W	CaYLL011W	186	1186	2186	3186
AfYDL097C	CaYDL097C	187	1187	2187	3187
AfYCR052W	CaYCR052W	188	1188	2188	3188
AfYPL169C	CaYPL169C	189	1189	2189	3189
AfYNL132W	CaYNL132W	190	1190	2190	3190
AfYNL308C	CaYNL308C	191	1191	2191	3191
AfYLR060W	CaYLR060W	192	1192	2192	3192
AfYML093W	CaYML093W	193	1193	2193	3193
AfORF6_2086-2	CaORF6_2086-2	194	1194	2194	3194
AfYLR029C	CaYLR029C	195	1195	2195	3195
AfYBR088C	CaYBR088C	196	1196	2196	3196
AfYKR086W	CaYKR086W	197	1197	2197	3197
AfYMR015C	CaYMR015C	198	1198	2198	3198
AfYAL035W	CaYAL035W	199	1199	2199	3199
AfYJR123W	CaYJR123W	200	1200	2200	3200
AfYGR245C	CaYGR245C	201	1201	2201	3201
AfPBS2	CaPBS2	202	1202	2202	3202

【００３０】

AfYFL018C	CaYFL018C	203	1203	2203	3203
AfYOR206W	CaYOR206W	204	1204	2204	3204
AfYNR038W	CaYNR038W	205	1205	2205	3205
AfYML085C	CaYML085C	206	1206	2206	3206
AfYKL125W	CaYKL125W	207	1207	2207	3207
AfYLR196W	CaYLR196W	208	1208	2208	3208
AfYNR035C	CaYNR035C	209	1209	2209	3209
AfYPR107C	CaYPR107C	210	1210	2210	3210
AfYNL280C	CaYNL280C	211	1211	2211	3211
AfYIL142W	CaYIL142W	212	1212	2212	3212
AfYCR072C	CaYCR072C	213	1213	2213	3213
AfYER031C	CaYER031C	214	1214	2214	3214
AfYOL077C	CaYOL077C	215	1215	2215	3215
AfYNL088W	CaYNL088W	216	1216	2216	3216
AfYER113C	CaYER113C	217	1217	2217	3217
AfYKR062W	CaYKR062W	218	1218	2218	3218
AfYPL028W	CaYPL028W	219	1219	2219	3219
AfYKL046C	CaYKL046C	220	1220	2220	3220
AfYBR142W	CaYBR142W	221	1221	2221	3221
AfYDR052C	CaYDR052C	222	1222	2222	3222
AfYLR300W	CaYLR300W	223	1223	2223	3223
AfYPR010C	CaYPR010C	224	1224	2224	3224
AfORF6_2086	CaORF6_2086	225	1225	2225	3225
AfYDR037W	CaYDR037W	226	1226	2226	3226
AfYPR108W	CaYPR108W	227	1227	2227	3227
AfYFR050C	CaYFR050C	228	1228	2228	3228
AfYBR234C	CaYBR234C	229	1229	2229	3229
AfYHR174W	CaYHR174W	230	1230	2230	3230
AfYBR070C	CaYBR070C	231	1231	2231	3231
AfYGR211W	CaYGR211W	232	1232	2232	3232
AfYOR095C	CaYOR095C	233	1233	2233	3233
AfYHR042W	CaYHR042W	234	1234	2234	3234
AfYJL033W	CaYJL033W	235	1235	2235	3235
AfYDL031W	CaYDL031W	236	1236	2236	3236
AfYLR342W	CaYLR342W	237	1237	2237	3237
AfYDR211W	CaYDR211W	238	1238	2238	3238
AfYPL160W	CaYPL160W	239	1239	2239	3239
AfYDR356W	CaYDR356W	240	1240	2240	3240
AfYFL038C	CaYFL038C	241	1241	2241	3241
AfYFR002W	CaYFR002W	242	1242	2242	3242
AfYOR074C	CaYOR074C	243	1243	2243	3243
AfYCL054W	CaYCL054W	244	1244	2244	3244
AfYJL026W	CaYJL026W	245	1245	2245	3245
AfYJL039C	CaYJL039C	246	1246	2246	3246
AfYML025C	CaYML025C	247	1247	2247	3247
AfORF6_1934	CaORF6_1934	248	1248	2248	3248
AfYDR361C	CaYDR361C	249	1249	2249	3249
AfYGL065C	CaYGL065C	250	1250	2250	3250
AfYNL232W	CaYNL232W	251	1251	2251	3251
AfYER023W	CaYER023W	252	1252	2252	3252
AfYBR060C	CaYBR060C	253	1253	2253	3253
AfYLR378C	CaYLR378C	254	1254	2254	3254

【００３１】

AfORF6_8025	CaORF6_8025	255	1255	2255	3255
AfYDL007W	CaYDL007W	256	1256	2256	3256
AfORF6_5739	CaORF6_5739	257	1257	2257	3257
AfYNL277W	CaYNL277W	258	1258	2258	3258
AfYPR048W	CaYPR048W	259	1259	2259	3259
AfYHR088W	CaYHR088W	260	1260	2260	3260
AfYPR016C	CaYPR016C	261	1261	2261	3261
AfYIL126W	CaYIL126W	262	1262	2262	3262
AfYLR105C	CaYLR105C	263	1263	2263	3263
AfYHR072W	CaYHR072W	264	1264	2264	3264
AfYBR160W	CaYBR160W	265	1265	2265	3265
AfYBL040C	CaYBL040C	266	1266	2266	3266
AfYMR240C	CaYMR240C	267	1267	2267	3267
AfYLR175W	CaYLR175W	268	1268	2268	3268
AfYLR175W2	CaYLR175W2	269	1269	2269	3269
AfYHR074W	CaYHR074W	270	1270	2270	3270
AfYPR088C	CaYPR088C	271	1271	2271	3271
AfYDL030W	CaYDL030W	272	1272	2272	3272
AfYNL062C	CaYNL062C	273	1273	2273	3273
AfYDR196C	CaYDR196C	274	1274	2274	3274
AfYOL038W	CaYOL038W	275	1275	2275	3275
AfYDL217C	CaYDL217C	276	1276	2276	3276
AfYOR250C	CaYOR250C	277	1277	2277	3277
AfYDR167W	CaYDR167W	278	1278	2278	3278
AfYGL120C	CaYGL120C	279	1279	2279	3279
AfYHR027C	CaYHR027C	280	1280	2280	3280
AfYER013W	CaYER013W	281	1281	2281	3281
AfORF6_569	CaORF6_569	282	1282	2282	3282
AfORF6_6011	CaORF6_6011	283	1283	2283	3283
AfYNL247W	CaYNL247W	284	1284	2284	3284
AfYJL125C	CaYJL125C	285	1285	2285	3285
AfYML125C	CaYML125C	286	1286	2286	3286
AfYJR076C	CaYJR076C	287	1287	2287	3287
AfYGR070W	CaYGR070W	288	1288	2288	3288
AfYDL105W	CaYDL105W	289	1289	2289	3289
AfYHR023W	CaYHR023W	290	1290	2290	3290
AfLYS4	CaLYS4	291	1291	2291	3291
AfYDR062W2	CaYDR062W2	292	1292	2292	3292
AfYMR203W	CaYMR203W	293	1293	2293	3293
AfYOL094C	CaYOL094C	294	1294	2294	3294
AfYDR407C	CaYDR407C	295	1295	2295	3295
AfYOR287C	CaYOR287C	296	1296	2296	3296
AfYLL031C	CaYLL031C	297	1297	2297	3297
AfYPL085W	CaYPL085W	298	1298	2298	3298
AfYMR260C	CaYMR260C	299	1299	2299	3299
AfYFL017C	CaYFL017C	300	1300	2300	3300
AfYMR218C	CaYMR218C	301	1301	2301	3301
AfYEL026W	CaYEL026W	302	1302	2302	3302
AfYDL207W	CaYDL207W	303	1303	2303	3303
AfYNL131W	CaYNL131W	304	1304	2304	3304
AfYNR026C	CaYNR026C	305	1305	2305	3305
AfYOR004W	CaYOR004W	306	1306	2306	3306

【００３２】

AfYBR254C	CaYBR254C	307	1307	2307	3307
AfYOR232W	CaYOR232W	308	1308	2308	3308
AfYNR043W	CaYNR043W	309	1309	2309	3309
AfYOR257W	CaYOR257W	310	1310	2310	3310
AfYGR060W	CaYGR060W	311	1311	2311	3311
AfYJR112W	CaYJR112W	312	1312	2312	3312
AfYPR186C	CaYPR186C	313	1313	2313	3313
AfYBR079C	CaYBR079C	314	1314	2314	3314
AfYPR056W	CaYPR056W	315	1315	2315	3315
AfYDR472W	CaYDR472W	316	1316	2316	3316
AfYGR172C	CaYGR172C	317	1317	2317	3317
AfYMR028W	CaYMR028W	318	1318	2318	3318
AfYMR227C	CaYMR227C	319	1319	2319	3319
AfYGR029W	CaYGR029W	320	1320	2320	3320
AfYPR025C	CaYPR025C	321	1321	2321	3321
AfYOR145C	CaYOR145C	322	1322	2322	3322
AfYBL041W	CaYBL041W	323	1323	2323	3323
AfYHR122W	CaYHR122W	324	1324	2324	3324
AfYPR113W	CaYPR113W	325	1325	2325	3325
AfYHR143W-A	CaYHR143W-A	326	1326	2326	3326
AfYDR449C	CaYDR449C	327	1327	2327	3327
AfYDR016C	CaYDR016C	328	1328	2328	3328
AfYDR236C	CaYDR236C	329	1329	2329	3329
AfYKL141W	CaYKL141W	330	1330	2330	3330
AfYLR078C	CaYLR078C	331	1331	2331	3331
AfYDR311W	CaYDR311W	332	1332	2332	3332
AfORF6_3819	CaORF6_3819	333	1333	2333	3333
AfORF6_3864	CaORF6_3864	334	1334	2334	3334
AfORF6_804	CaORF6_804	335	1335	2335	3335
AfORF6_889	CaORF6_889	336	1336	2336	3336
AfYAL033W	CaYAL033W	337	1337	2337	3337
AfYBL030C	CaYBL030C	338	1338	2338	3338
AfYBR029C	CaYBR029C	339	1339	2339	3339
AfYBR123C	CaYBR123C	340	1340	2340	3340
AfYBR143C	CaYBR143C	341	1341	2341	3341
AfYBR155W	CaYBR155W	342	1342	2342	3342
AfYBR198C	CaYBR198C	343	1343	2343	3343
AfYCL003W	CaYCL003W	344	1344	2344	3344
AfYCR012W	CaYCR012W	345	1345	2345	3345
AfYCR057C	CaYCR057C	346	1346	2346	3346
AfYDL084W	CaYDL084W	347	1347	2347	3347
AfYDL087C	CaYDL087C	348	1348	2348	3348
AfYDR002W	CaYDR002W	349	1349	2349	3349
AfYDR023W	CaYDR023W	350	1350	2350	3350
AfYDR045C	CaYDR045C	351	1351	2351	3351
AfYDR054C	CaYDR054C	352	1352	2352	3352
AfYDR060W	CaYDR060W	353	1353	2353	3353
AfYDR087C	CaYDR087C	354	1354	2354	3354
AfYDR226W	CaYDR226W	355	1355	2355	3355
AfYDR228C	CaYDR228C	356	1356	2356	3356
AfYDR238C	CaYDR238C	357	1357	2357	3357
AfYDR299W	CaYDR299W	358	1358	2358	3358

【００３３】

AfYDR328C	CaYDR328C	359	1359	2359	3359
AfYDR373W	CaYDR373W	360	1360	2360	3360
AfYDR390C	CaYDR390C	361	1361	2361	3361
AfYDR489W	CaYDR489W	362	1362	2362	3362
AfYEL032W	CaYEL032W	363	1363	2363	3363
AfYEL055C	CaYEL055C	364	1364	2364	3364
AfYER006W	CaYER006W	365	1365	2365	3365
AfYER036C	CaYER036C	366	1366	2366	3366
AfYFL045C	CaYFL045C	367	1367	2367	3367
AfYGL008C	CaYGL008C	368	1368	2368	3368
AfYGL048C	CaYGL048C	369	1369	2369	3369
AfYGL097W	CaYGL097W	370	1370	2370	3370
AfYGL112C	CaYGL112C	371	1371	2371	3371
AfYGL201C	CaYGL201C	372	1372	2372	3372
AfYGL207W	CaYGL207W	373	1373	2373	3373
AfYGL225W	CaYGL225W	374	1374	2374	3374
AfYGL245W	CaYGL245W	375	1375	2375	3375
AfYGR047C	CaYGR047C	376	1376	2376	3376
AfYGR048W	CaYGR048W	377	1377	2377	3377
AfYGR083C	CaYGR083C	378	1378	2378	3378
AfYGR185C	CaYGR185C	379	1379	2379	3379
AfYGR218W	CaYGR218W	380	1380	2380	3380
AfYGR267C	CaYGR267C	381	1381	2381	3381
AfYHR005C-A	CaYHR005C-A	382	1382	2382	3382
AfYHR072W-A	CaYHR072W-A	383	1383	2383	3383
AfYHR166C	CaYHR166C	384	1384	2384	3384
AfYHR188C	CaYHR188C	385	1385	2385	3385
AfYIL022W	CaYIL022W	386	1386	2386	3386
AfYIL109C	CaYIL109C	387	1387	2387	3387
AfYJL109C	CaYJL109C	388	1388	2388	3388
AfYJL111W	CaYJL111W	389	1389	2389	3389
AfYJL167W	CaYJL167W	390	1390	2390	3390
AfYJR064W	CaYJR064W	391	1391	2391	3391
AfYJR065C	CaYJR065C	392	1392	2392	3392
AfYKL013C	CaYKL013C	393	1393	2393	3393
AfYKL045W	CaYKL045W	394	1394	2394	3394
AfYKL104C	CaYKL104C	395	1395	2395	3395
AfYKL193C	CaYKL193C	396	1396	2396	3396
AfYLR088W	CaYLR088W	397	1397	2397	3397
AfYLR129W	CaYLR129W	398	1398	2398	3398
AfYLR274W	CaYLR274W	399	1399	2399	3399
AfYLR291C	CaYLR291C	400	1400	2400	3400
AfYLR293C	CaYLR293C	401	1401	2401	3401
AfYML064C	CaYML064C	402	1402	2402	3402
AfYMR049C	CaYMR049C	403	1403	2403	3403
AfYMR055C	CaYMR055C	404	1404	2404	3404
AfYMR131C	CaYMR131C	405	1405	2405	3405
AfYMR220W	CaYMR220W	406	1406	2406	3406
AfYMR309C	CaYMR309C	407	1407	2407	3407
AfYNL061W	CaYNL061W	408	1408	2408	3408
AfYNL113W	CaYNL113W	409	1409	2409	3409
AfYNL163C	CaYNL163C	410	1410	2410	3410

【００３４】

AfYNL178W	CaYNL178W	411	1411	2411	3411
AfYNL181W	CaYNL181W	412	1412	2412	3412
AfYNL263C	CaYNL263C	413	1413	2413	3413
AfYNR046W	CaYNR046W	414	1414	2414	3414
AfYOL034W	CaYOL034W	415	1415	2415	3415
AfYOR056C	CaYOR056C	416	1416	2416	3416
AfYOR057W	CaYOR057W	417	1417	2417	3417
AfYOR117W	CaYOR117W	418	1418	2418	3418
AfYOR207C	CaYOR207C	419	1419	2419	3419
AfYOR224C	CaYOR224C	420	1420	2420	3420
AfYOR259C	CaYOR259C	421	1421	2421	3421
AfYOR261C	CaYOR261C	422	1422	2422	3422
AfYOR262W	CaYOR262W	423	1423	2423	3423
AfYPL117C	CaYPL117C	424	1424	2424	3424
AfYPL122C	CaYPL122C	425	1425	2425	3425
AfYPL218W	CaYPL218W	426	1426	2426	3426
AfYPL235W	CaYPL235W	427	1427	2427	3427
AfYPR103W	CaYPR103W	428	1428	2428	3428
AfYPR112C	CaYPR112C	429	1429	2429	3429
AfYPR165W	CaYPR165W	430	1430	2430	3430
AfPRO1	CaPRO1	431	1431	2431	3431
AfYBL050W	CaYBL050W	432	1432	2432	3432
AfYDL029W	CaYDL029W	433	1433	2433	3433
AfYDR397C	CaYDR397C	434	1434	2434	3434
AfYDR460W	CaYDR460W	435	1435	2435	3435
AfYER094C	CaYER094C	436	1436	2436	3436
AfYER171W	CaYER171W	437	1437	2437	3437
AfYGL091C	CaYGL091C	438	1438	2438	3438
AfYGR074W	CaYGR074W	439	1439	2439	3439
AfYGR103W	CaYGR103W	440	1440	2440	3440
AfYGR253C	CaYGR253C	441	1441	2441	3441
AfYHR170W	CaYHR170W	442	1442	2442	3442
AfYJR017C	CaYJR017C	443	1443	2443	3443
AfYLR103C	CaYLR103C	444	1444	2444	3444
AfYNL075W	CaYNL075W	445	1445	2445	3445
AfYPL131W	CaYPL131W	446	1446	2446	3446
AfORF6_1717	CaORF6_1717	447	1447	2447	3447
AfORF6_2193	CaORF6_2193	448	1448	2448	3448
AfORF6_2398	CaORF6_2398	449	1449	2449	3449
AfORF6_4499	CaORF6_4499	450	1450	2450	3450
AfORF6_5520	CaORF6_5520	451	1451	2451	3451
AfORF6_7629	CaORF6_7629	452	1452	2452	3452
AfORF6_7847	CaORF6_7847	453	1453	2453	3453
AfORF6_8362	CaORF6_8362	454	1454	2454	3454
AfORF6_8377	CaORF6_8377	455	1455	2455	3455
AfORF6_8461	CaORF6_8461	456	1456	2456	3456
AfORF6_8607	CaORF6_8607	457	1457	2457	3457
AfORF6_8654	CaORF6_8654	458	1458	2458	3458
AfYBL020W	CaYBL020W	459	1459	2459	3459
AfYBL097W	CaYBL097W	460	1460	2460	3460
AfYBR002C	CaYBR002C	461	1461	2461	3461
AfYBR011C	CaYBR011C	462	1462	2462	3462

【００３５】

AfYBR087W	CaYBR087W	463	1463	2463	3463
AfYBR135W	CaYBR135W	464	1464	2464	3464
AfYBR243C	CaYBR243C	465	1465	2465	3465
AfYCL059C	CaYCL059C	466	1466	2466	3466
AfYDL102W	CaYDL102W	467	1467	2467	3467
AfYDL132W	CaYDL132W	468	1468	2468	3468
AfYDL141W	CaYDL141W	469	1469	2469	3469
AfYDL143W	CaYDL143W	470	1470	2470	3470
AfYDL145C	CaYDL145C	471	1471	2471	3471
AfYDL147W	CaYDL147W	472	1472	2472	3472
AfYDL195W	CaYDL195W	473	1473	2473	3473
AfYDL208W	CaYDL208W	474	1474	2474	3474
AfYDR170C	CaYDR170C	475	1475	2475	3475
AfYDR188W	CaYDR188W	476	1476	2476	3476
AfYDR189W	CaYDR189W	477	1477	2477	3477
AfYDR190C	CaYDR190C	478	1478	2478	3478
AfYDR235W	CaYDR235W	479	1479	2479	3479
AfYDR246W	CaYDR246W	480	1480	2480	3480
AfYDR324C	CaYDR324C	481	1481	2481	3481
AfYDR341C	CaYDR341C	482	1482	2482	3482
AfYDR365C	CaYDR365C	483	1483	2483	3483
AfYDR376W	CaYDR376W	484	1484	2484	3484
AfYDR394W	CaYDR394W	485	1485	2485	3485
AfYDR429C	CaYDR429C	486	1486	2486	3486
AfYER007W	CaYER007W	487	1487	2487	3487
AfYER048W-A	CaYER048W-A	488	1488	2488	3488
AfYER082C	CaYER082C	489	1489	2489	3489
AfYER148W	CaYER148W	490	1490	2490	3490
AfYFL002C	CaYFL002C	491	1491	2491	3491
AfYFR004W	CaYFR004W	492	1492	2492	3492
AfYFR031C	CaYFR031C	493	1493	2493	3493
AfYFR037C	CaYFR037C	494	1494	2494	3494
AfYGL011C	CaYGL011C	495	1495	2495	3495
AfYGL068W	CaYGL068W	496	1496	2496	3496
AfYGL103W	CaYGL103W	497	1497	2497	3497
AfYGR094W	CaYGR094W	498	1498	2498	3498
AfYHL015W	CaYHL015W	499	1499	2499	3499
AfYHR007C	CaYHR007C	500	1500	2500	3500
AfYHR020W	CaYHR020W	501	1501	2501	3501
AfYHR090C	CaYHR090C	502	1502	2502	3502
AfYHR148W	CaYHR148W	503	1503	2503	3503
AfYHR165C	CaYHR165C	504	1504	2504	3504
AfYHR190W	CaYHR190W	505	1505	2505	3505
AfYIL046W	CaYIL046W	506	1506	2506	3506
AfYIL078W	CaYIL078W	507	1507	2507	3507
AfYIR008C	CaYIR008C	508	1508	2508	3508
AfYJL014W	CaYJL014W	509	1509	2509	3509
AfYJL050W	CaYJL050W	510	1510	2510	3510
AfYJL069C	CaYJL069C	511	1511	2511	3511
AfYJL081C	CaYJL081C	512	1512	2512	3512
AfYJL104W	CaYJL104W	513	1513	2513	3513
AfYJL143W	CaYJL143W	514	1514	2514	3514

【００３６】

AfYJL153C	CaYJL153C	515	1515	2515	3515
AfYJL203W	CaYJL203W	516	1516	2516	3516
AfYJR007W	CaYJR007W	517	1517	2517	3517
AfYJR063W	CaYJR063W	518	1518	2518	3518
AfYJR072C	CaYJR072C	519	1519	2519	3519
AfYKL058W	CaYKL058W	520	1520	2520	3520
AfYKL060C	CaYKL060C	521	1521	2521	3521
AfYKL145W	CaYKL145W	522	1522	2522	3522
AfYKR068C	CaYKR068C	523	1523	2523	3523
AfYKR079C	CaYKR079C	524	1524	2524	3524
AfYLR078C	CaYLR078C	525	1525	2525	3525
AfYLR116W	CaYLR116W	526	1526	2526	3526
AfYLR153C	CaYLR153C	527	1527	2527	3527
AfYLR163C	CaYLR163C	528	1528	2528	3528
AfYLR208W	CaYLR208W	529	1529	2529	3529
AfYLR272C	CaYLR272C	530	1530	2530	3530
AfYLR276C	CaYLR276C	531	1531	2531	3531
AfYLR277C	CaYLR277C	532	1532	2532	3532
AfYLR336C	CaYLR336C	533	1533	2533	3533
AfYLR347C	CaYLR347C	534	1534	2534	3534
AfYLR355C	CaYLR355C	535	1535	2535	3535
AfYLR383W	CaYLR383W	536	1536	2536	3536
AfYML069W	CaYML069W	537	1537	2537	3537
AfYMR093W	CaYMR093W	538	1538	2538	3538
AfYMR235C	CaYMR235C	539	1539	2539	3539
AfYNL102W	CaYNL102W	540	1540	2540	3540
AfYNL189W	CaYNL189W	541	1541	2541	3541
AfYNL240C	CaYNL240C	542	1542	2542	3542
AfYNR050C	CaYNR050C	543	1543	2543	3543
AfYOL027C	CaYOL027C	544	1544	2544	3544
AfYOL097C	CaYOL097C	545	1545	2545	3545
AfYOL102C	CaYOL102C	546	1546	2546	3546
AfYOR048C	CaYOR048C	547	1547	2547	3547
AfYOR063W	CaYOR063W	548	1548	2548	3548
AfYOR116C	CaYOR116C	549	1549	2549	3549
AfYOR159C	CaYOR159C	550	1550	2550	3550
AfYOR204W	CaYOR204W	551	1551	2551	3551
AfYOR217W	CaYOR217W	552	1552	2552	3552
AfYOR341W	CaYOR341W	553	1553	2553	3553
AfYPL076W	CaYPL076W	554	1554	2554	3554
AfYPL211W	CaYPL211W	555	1555	2555	3555
AfYPL242C	CaYPL242C	556	1556	2556	3556
AfYPL266W	CaYPL266W	557	1557	2557	3557
AfYPR019W	CaYPR019W	558	1558	2558	3558
AfYPR176C	CaYPR176C	559	1559	2559	3559
AfYLR355C	CaYLR355C	560	1560	2560	3560
AfYGR083C	CaYGR083C	561	1561	2561	3561
AfYHR172W	CaYHR172W	562	1562	2562	3562
AfYOL130W	CaYOL130W	563	1563	2563	3563
AfYJL143W	CaYJL143W	564	1564	2564	3564
AfYNL039W	CaYNL039W	565	1565	2565	3565
AfYPR187W	CaYPR187W	566	1566	2566	3566

【００３７】

AfYPR144C	CaYPR144C	567	1567	2567	3567
AfYGR002C	CaYGR002C	568	1568	2568	3568
AfYKL059C	CaYKL059C	569	1569	2569	3569
AfYGR009C	CaYGR009C	570	1570	2570	3570
AfYGR186W	CaYGR186W	571	1571	2571	3571
AfORF6_1498	CaORF6_1498	572	1572	2572	3572
AfORF6_3819	CaORF6_3819	573	1573	2573	3573
AfORF6_4463	CaORF6_4463	574	1574	2574	3574
AfORF6_6069	CaORF6_6069	575	1575	2575	3575
AfORF6_6140	CaORF6_6140	576	1576	2576	3576
AfORF6_6390	CaORF6_6390	577	1577	2577	3577
AfORF6_6660	CaORF6_6660	578	1578	2578	3578
AfORF6_6664	CaORF6_6664	579	1579	2579	3579
AfORF6_6808	CaORF6_6808	580	1580	2580	3580
AfORF6_6933	CaORF6_6933	581	1581	2581	3581
AfORF6_6939	CaORF6_6939	582	1582	2582	3582
AfORF6_7203	CaORF6_7203	583	1583	2583	3583
AfORF6_8654	CaORF6_8654	584	1584	2584	3584
AfYBR038W	CaYBR038W	585	1585	2585	3585
AfYER059W	CaYER059W	586	1586	2586	3586
AfYGL233W	CaYGL233W	587	1587	2587	3587
AfYNL048W	CaYNL048W	588	1588	2588	3588
AfYNL221C	CaYNL221C	589	1589	2589	3589
AfYOL066C	CaYOL066C	590	1590	2590	3590
AfORF6_3026	CaORF6_3026	591	1591	2591	3591
AfORF6_4005	CaORF6_4005	592	1592	2592	3592
AfYNL256W	CaYNL256W	593	1593	2593	3593
AfYPL128C	CaYPL128C	594	1594	2594	3594
AfHIS3		4001			
AfHIS3 Prom. Replace		4002			
AfHIS3 5' primer		4003			
AfHIS3-pyrG primer		4004			
pyrG-PglaA 5'		4005			
pyrG-PglaA 3'		4006			
pyrG-AfHIS3		4007			
AfHIS3 3' primer		4008			
AfALB1		4009			
AfALB1 prom. Replace		4010			
AfALB1 5' primer		4011			
AfALB1-pyrG		4012			
AnpyrG upstream		4013			
AnpyrG downstream		4014			
pyrG-AfALB1		4015			
AfALB1 3' primer		4016			
AfPYROA ORF		4017			
AfPYROA ORF		4018			
AfPYROA genomic		4019			
AfPYROA Prom Replac		4020			
AfPYROA 5' primer		4021			
AfPYROA-pyrG		4022			
pyrG-AfPYROA		4023			
AfPYROA 3' primer		4024			

【００３８】

AfERG11		4025			
AfERG11		4026			
AfERG11beta		4027			
AfERG11beta		4028			
AfALG7 genomic		4029			
AfALG7 ORF		4030			
AfALG7 ORF		4031			
AfAAD14 genomic		4032			
AfAAD14 ORF		4033			
AfAAD14 ORF		4034			
AfEF-2 ORF + 5'		4035			
AfEF-2 ORF		4036			
AfEF-2 ORF		4037			
AfErg8 Prom Replac		4038			
AfYMR290C	CaYMR290C	5001	6001	7001	8001
AfYPR034W	CaYPR034W	5002	6002	7002	8002
AfORF6_4497	CaORF6_4497	5003	6003	7003	8003
AfYJL008C	CaYJL008C	5004	6004	7004	8004
AfYIL068C	CaYIL068C	5005	6005	7005	8005
AfYHR196W	CaYHR196W	5006	6006	7006	8006
AfYMR197C	CaYMR197C	5007	6007	7007	8007
AfYLR100W	CaYLR100W	5008	6008	7008	8008
AfYDL055C	CaYDL055C	5009	6009	7009	8009
AfYDL043C	CaYDL043C	5010	6010	7010	8010
AfYJL054W	CaYJL054W	5011	6011	7011	8011
AfYHR072W2	CaYHR072W2	5012	6012	7012	8012
AfYPR119W	CaYPR119W	5013	6013	7013	8013
AfYDR013W	CaYDR013W	5014	6014	7014	8014
AfYGR255C	CaYGR255C	5015	6015	7015	8015
AfYDR353W	CaYDR353W	5016	6016	7016	8016
AfYNR053C	CaYNR053C	5017	6017	7017	8017
AfYLR222C	CaYLR222C	5018	6018	7018	8018
AfYER025W	CaYER025W	5019	6019	7019	8019
AfYOR272W	CaYOR272W	5020	6020	7020	8020
AfYGL206C	CaYGL206C	5021	6021	7021	8021
AfYMR208W	CaYMR208W	5022	6022	7022	8022
AfYKL019W	CaYKL019W	5023	6023	7023	8023
AfYJR006W	CaYJR006W	5024	6024	7024	8024
AfYIL075C	CaYIL075C	5025	6025	7025	8025
AfYER070W	CaYER070W	5026	6026	7026	8026
AfYMR113W	CaYMR113W	5027	6027	7027	8027
AfYIR011C	CaYIR011C	5028	6028	7028	8028
AfYER012W	CaYER012W	5029	6029	7029	8029
AfORF6_8837	CaORF6_8837	5030	6030	7030	8030
AfYJR002W	CaYJR002W	5031	6031	7031	8031
AfYPL043W	CaYPL043W	5032	6032	7032	8032
AfYNL110C	CaYNL110C	5033	6033	7033	8033
AfORF6_4899	CaORF6_4899	5034	6034	7034	8034
AfORF6_5199	CaORF6_5199	5035	6035	7035	8035
AfYFR052W	CaYFR052W	5036	6036	7036	8036
AfYMR146C	CaYMR146C	5037	6037	7037	8037
AfYGL003C	CaYGL003C	5038	6038	7038	8038

【００３９】

AfYFL008W	CaYFL008W	5039	6039	7039	8039
AfYDL028C	CaYDL028C	5040	6040	7040	8040
AfYHR070W	CaYHR070W	5041	6041	7041	8041
AfYLR115W	CaYLR115W	5042	6042	7042	8042
AfYLR197W	CaYLR197W	5043	6043	7043	8043
AfYOL022C	CaYOL022C	5044	6044	7044	8044
AfYIL062C	CaYIL062C	5045	6045	7045	8045
AfYPR086W	CaYPR086W	5046	6046	7046	8046
AfYPR183W	CaYPR183W	5047	6047	7047	8047
AfYNL126W	CaYNL126W	5048	6048	7048	8048
AfYLR167W	CaYLR167W	5049	6049	7049	8049
AfYJL010C	CaYJL010C	5050	6050	7050	8050
AfYLR026C	CaYLR026C	5051	6051	7051	8051
AfYBR192W	CaYBR192W	5052	6052	7052	8052
AfYDR088C	CaYDR088C	5053	6053	7053	8053
AfYOR280C	CaYOR280C	5054	6054	7054	8054
AfYNL244C	CaYNL244C	5055	6055	7055	8055
AfYER021W	CaYER021W	5056	6056	7056	8056
AfYLR186W	CaYLR186W	5057	6057	7057	8057
AfYDR527W	CaYDR527W	5058	6058	7058	8058
AfYDL017W	CaYDL017W	5059	6059	7059	8059
AfYGR090W	CaYGR090W	5060	6060	7060	8060
AfYKL182W	CaYKL182W	5061	6061	7061	8061
AfYPL231W	CaYPL231W	5062	6062	7062	8062
AfYDR120C	CaYDR120C	5063	6063	7063	8063
AfYBR080C	CaYBR080C	5064	6064	7064	8064
AfYPR082C	CaYPR082C	5065	6065	7065	8065
AfYOR310C	CaYOR310C	5066	6066	7066	8066
AfYDL205C	CaYDL205C	5067	6067	7067	8067
AfYIR022W	CaYIR022W	5068	6068	7068	8068
AfYGR246C	CaYGR246C	5069	6069	7069	8069
AfYCL017C	CaYCL017C	5070	6070	7070	8070
AfYBL023C	CaYBL023C	5071	6071	7071	8071
AfORF6_5147	CaORF6_5147	5072	6072	7072	8072
AfYGR209C	CaYGR209C	5073	6073	7073	8073
AfYLR306W	CaYLR306W	5074	6074	7074	8074
AfYLL012W	CaYLL012W	5075	6075	7075	8075
AfYPL217C	CaYPL217C	5076	6076	7076	8076
AfYPR110C	CaYPR110C	5077	6077	7077	8077
AfYMR288W	CaYMR288W	5078	6078	7078	8078
AfYJL074C	CaYJL074C	5079	6079	7079	8079
AfYOR119C	CaYOR119C	5080	6080	7080	8080
AfYNR017W	CaYNR017W	5081	6081	7081	8081
AfYDL060W	CaYDL060W	5082	6082	7082	8082
AfYIL021W	CaYIL021W	5083	6083	7083	8083
AfTRP5	CaTRP5	5084	6084	7084	8084
AfYPL203W	CaYPL203W	5085	6085	7085	8085
AfYPL094C	CaYPL094C	5086	6086	7086	8086
AfYBL026W	CaYBL026W	5087	6087	7087	8087
AfYKL210W	CaYKL210W	5088	6088	7088	8088
AfYIL003W	CaYIL003W	5089	6089	7089	8089
AfYDR212W	CaYDR212W	5090	6090	7090	8090

【００４０】

AfYLR002C	CaYLR002C	5091	6091	7091	8091
AfYLR397C	CaYLR397C	5092	6092	7092	8092
AfYGL001C	CaYGL001C	5093	6093	7093	8093
AfYPR041W	CaYPR041W	5094	6094	7094	8094
AfYGR156W	CaYGR156W	5095	6095	7095	8095
AfYPL010W	CaYPL010W	5096	6096	7096	8096
AfYLR259C	CaYLR259C	5097	6097	7097	8097
AfYBR196C	CaYBR196C	5098	6098	7098	8098
AfYJR045C	CaYJR045C	5099	6099	7099	8099
AfYBR202W	CaYBR202W	5100	6100	7100	8100
AfYNL245C	CaYNL245C	5101	6101	7101	8101
AfORF6_4747	CaORF6_4747	5102	6102	7102	8102
AfORF6_7375	CaORF6_7375	5103	6103	7103	8103
AfYER136W	CaYER136W	5104	6104	7104	8104
AfYPL093W	CaYPL093W	5105	6105	7105	8105
AfYBR159W	CaYBR159W	5106	6106	7106	8106
AfYJL034W	CaYJL034W	5107	6107	7107	8107
AfYDR172W	CaYDR172W	5108	6108	7108	8108
AfYOR157C	CaYOR157C	5109	6109	7109	8109
AfYLR127C	CaYLR127C	5110	6110	7110	8110
AfYMR213W	CaYMR213W	5111	6111	7111	8111
AfYHR019C	CaYHR019C	5112	6112	7112	8112
AfYLR229C	CaYLR229C	5113	6113	7113	8113
AfYGL130W	CaYGL130W	5114	6114	7114	8114
AfYJL002C	CaYJL002C	5115	6115	7115	8115
AfYPR105C	CaYPR105C	5116	6116	7116	8116
AfYBR055C	CaYBR055C	5117	6117	7117	8117
AfYPR175W	CaYPR175W	5118	6118	7118	8118
AfYPL063W	CaYPL063W	5119	6119	7119	8119
AfYFL022C	CaYFL022C	5120	6120	7120	8120
AfYML075C	CaYML075C	5121	6121	7121	8121
AfYNL222W	CaYNL222W	5122	6122	7122	8122
AfYLR086W	CaYLR086W	5123	6123	7123	8123
AfYOL142W	CaYOL142W	5124	6124	7124	8124
AfYHR186C	CaYHR186C	5125	6125	7125	8125
AfYNL287W	CaYNL287W	5126	6126	7126	8126
AfYLL018C	CaYLL018C	5127	6127	7127	8127
AfYAL015C	CaYAL015C	5128	6128	7128	8128
AfYOR335C	CaYOR335C	5129	6129	7129	8129
AfYDL193W	CaYDL193W	5130	6130	7130	8130
AfYML126C	CaYML126C	5131	6131	7131	8131
AfYDR404C	CaYDR404C	5132	6132	7132	8132
AfYML130C	CaYML130C	5133	6133	7133	8133
AfYKR081C	CaYKR081C	5134	6134	7134	8134
AfYER172C	CaYER172C	5135	6135	7135	8135
AfYOL010W	CaYOL010W	5136	6136	7136	8136
AfYPR178W	CaYPR178W	5137	6137	7137	8137
AfORF6_4974	CaORF6_4974	5138	6138	7138	8138
AfYGL022W	CaYGL022W	5139	6139	7139	8139
AfYGR280C	CaYGR280C	5140	6140	7140	8140
AfYDL108W	CaYDL108W	5141	6141	7141	8141
AfYOL005C	CaYOL005C	5142	6142	7142	8142

【００４１】

AfYJL194W	CaYJL194W	5143	6143	7143	8143
AfYOR151C	CaYOR151C	5144	6144	7144	8144
AfYCL031C	CaYCL031C	5145	6145	7145	8145
AfYOR210W	CaYOR210W	5146	6146	7146	8146
AfYGL123W	CaYGL123W	5147	6147	7147	8147
AfYOL139C	CaYOL139C	5148	6148	7148	8148
AfORF6_8482	CaORF6_8482	5149	6149	7149	8149
AfYKL035W	CaYKL035W	5150	6150	7150	8150
AfORF6_5210	CaORF6_5210	5151	6151	7151	8151
AfYOR294W	CaYOR294W	5152	6152	7152	8152
AfYJL001W	CaYJL001W	5153	6153	7153	8153
AfYHR052W	CaYHR052W	5154	6154	7154	8154
AfYNL313C	CaYNL313C	5155	6155	7155	8155
AfYLR249W	CaYLR249W	5156	6156	7156	8156
AfYKL181W	CaYKL181W	5157	6157	7157	8157
AfYML092C	CaYML092C	5158	6158	7158	8158
AfYGL106W	CaYGL106W	5159	6159	7159	8159
AfYLR243W	CaYLR243W	5160	6160	7160	8160
AfYPL151C	CaYPL151C	5161	6161	7161	8161
AfYER125W	CaYER125W	5162	6162	7162	8162
AfYNL006W	CaYNL006W	5163	6163	7163	8163
AfYJL087C	CaYJL087C	5164	6164	7164	8164
AfYBR237W	CaYBR237W	5165	6165	7165	8165
AfYLR117C	CaYLR117C	5166	6166	7166	8166
AfYDR091C	CaYDR091C	5167	6167	7167	8167
AfYGL040C	CaYGL040C	5168	6168	7168	8168
AfYDR454C	CaYDR454C	5169	6169	7169	8169
AfYDR267C	CaYDR267C	5170	6170	7170	8170
AfYGR264C	CaYGR264C	5171	6171	7171	8171
AfYMR308C	CaYMR308C	5172	6172	7172	8172
AfYNL124W	CaYNL124W	5173	6173	7173	8173
AfYDR473C	CaYDR473C	5174	6174	7174	8174
AfYBR154C	CaYBR154C	5175	6175	7175	8175
AfYDL140C	CaYDL140C	5176	6176	7176	8176
AfYHR005C	CaYHR005C	5177	6177	7177	8177
AfYER003C	CaYER003C	5178	6178	7178	8178
AfYBL076C	CaYBL076C	5179	6179	7179	8179
AfYBR265W	CaYBR265W	5180	6180	7180	8180
AfYDL153C	CaYDL153C	5181	6181	7181	8181
AfYHR024C	CaYHR024C	5182	6182	7182	8182
AfYDR062W	CaYDR062W	5183	6183	7183	8183
AfYHR169W	CaYHR169W	5184	6184	7184	8184
AfYBR256C	CaYBR256C	5185	6185	7185	8185
AfYLL011W	CaYLL011W	5186	6186	7186	8186
AfYDL097C	CaYDL097C	5187	6187	7187	8187
AfYCR052W	CaYCR052W	5188	6188	7188	8188
AfYPL169C	CaYPL169C	5189	6189	7189	8189
AfYNL132W	CaYNL132W	5190	6190	7190	8190
AfYNL308C	CaYNL308C	5191	6191	7191	8191
AfYLR060W	CaYLR060W	5192	6192	7192	8192
AfYML093W	CaYML093W	5193	6193	7193	8193
AfORF6_2086-2	CaORF6_2086-2	5194	6194	7194	8194

【００４２】

AfYLR029C	CaYLR029C	5195	6195	7195	8195
AfYBR088C	CaYBR088C	5196	6196	7196	8196
AfYKR086W	CaYKR086W	5197	6197	7197	8197
AfYMR015C	CaYMR015C	5198	6198	7198	8198
AfYAL035W	CaYAL035W	5199	6199	7199	8199
AfYJR123W	CaYJR123W	5200	6200	7200	8200
AfYGR245C	CaYGR245C	5201	6201	7201	8201
AfPBS2	CaPBS2	5202	6202	7202	8202
AfYFL018C	CaYFL018C	5203	6203	7203	8203
AfYOR206W	CaYOR206W	5204	6204	7204	8204
AfYNR038W	CaYNR038W	5205	6205	7205	8205
AfYML085C	CaYML085C	5206	6206	7206	8206
AfYKL125W	CaYKL125W	5207	6207	7207	8207
AfYLR196W	CaYLR196W	5208	6208	7208	8208
AfYNR035C	CaYNR035C	5209	6209	7209	8209
AfYPR107C	CaYPR107C	5210	6210	7210	8210
AfYNL280C	CaYNL280C	5211	6211	7211	8211
AfYIL142W	CaYIL142W	5212	6212	7212	8212
AfYCR072C	CaYCR072C	5213	6213	7213	8213
AfYER031C	CaYER031C	5214	6214	7214	8214
AfYOL077C	CaYOL077C	5215	6215	7215	8215
AfYNL088W	CaYNL088W	5216	6216	7216	8216
AfYER113C	CaYER113C	5217	6217	7217	8217
AfYKR062W	CaYKR062W	5218	6218	7218	8218
AfYPL028W	CaYPL028W	5219	6219	7219	8219
AfYKL046C	CaYKL046C	5220	6220	7220	8220
AfYBR142W	CaYBR142W	5221	6221	7221	8221
AfYDR052C	CaYDR052C	5222	6222	7222	8222
AfYLR300W	CaYLR300W	5223	6223	7223	8223
AfYPR010C	CaYPR010C	5224	6224	7224	8224
AfORF6_2086	CaORF6_2086	5225	6225	7225	8225
AfYDR037W	CaYDR037W	5226	6226	7226	8226
AfYPR108W	CaYPR108W	5227	6227	7227	8227
AfYFR050C	CaYFR050C	5228	6228	7228	8228
AfYBR234C	CaYBR234C	5229	6229	7229	8229
AfYHR174W	CaYHR174W	5230	6230	7230	8230
AfYBR070C	CaYBR070C	5231	6231	7231	8231
AfYGR211W	CaYGR211W	5232	6232	7232	8232
AfYOR095C	CaYOR095C	5233	6233	7233	8233
AfYHR042W	CaYHR042W	5234	6234	7234	8234
AfYJL033W	CaYJL033W	5235	6235	7235	8235
AfYDL031W	CaYDL031W	5236	6236	7236	8236
AfYLR342W	CaYLR342W	5237	6237	7237	8237
AfYDR211W	CaYDR211W	5238	6238	7238	8238
AfYPL160W	CaYPL160W	5239	6239	7239	8239
AfYDR356W	CaYDR356W	5240	6240	7240	8240
AfYFL038C	CaYFL038C	5241	6241	7241	8241
AfYFR002W	CaYFR002W	5242	6242	7242	8242
AfYOR074C	CaYOR074C	5243	6243	7243	8243
AfYCL054W	CaYCL054W	5244	6244	7244	8244
AfYJL026W	CaYJL026W	5245	6245	7245	8245
AfYJL039C	CaYJL039C	5246	6246	7246	8246

【００４３】

AfYML025C	CaYML025C	5247	6247	7247	8247
AfORF6_1934	CaORF6_1934	5248	6248	7248	8248
AfYDR361C	CaYDR361C	5249	6249	7249	8249
AfYGL065C	CaYGL065C	5250	6250	7250	8250
AfYNL232W	CaYNL232W	5251	6251	7251	8251
AfYER023W	CaYER023W	5252	6252	7252	8252
AfYBR060C	CaYBR060C	5253	6253	7253	8253
AfYLR378C	CaYLR378C	5254	6254	7254	8254
AfORF6_8025	CaORF6_8025	5255	6255	7255	8255
AfYDL007W	CaYDL007W	5256	6256	7256	8256
AfORF6_5739	CaORF6_5739	5257	6257	7257	8257
AfYNL277W	CaYNL277W	5258	6258	7258	8258
AfYPR048W	CaYPR048W	5259	6259	7259	8259
AfYHR088W	CaYHR088W	5260	6260	7260	8260
AfYPR016C	CaYPR016C	5261	6261	7261	8261
AfYIL126W	CaYIL126W	5262	6262	7262	8262
AfYLR105C	CaYLR105C	5263	6263	7263	8263
AfYHR072W	CaYHR072W	5264	6264	7264	8264
AfYBR160W	CaYBR160W	5265	6265	7265	8265
AfYBL040C	CaYBL040C	5266	6266	7266	8266
AfYMR240C	CaYMR240C	5267	6267	7267	8267
AfYLR175W	CaYLR175W	5268	6268	7268	8268
AfYLR175W2	CaYLR175W2	5269	6269	7269	8269
AfYHR074W	CaYHR074W	5270	6270	7270	8270
AfYPR088C	CaYPR088C	5271	6271	7271	8271
AfYDL030W	CaYDL030W	5272	6272	7272	8272
AfYNL062C	CaYNL062C	5273	6273	7273	8273
AfYDR196C	CaYDR196C	5274	6274	7274	8274
AfYOL038W	CaYOL038W	5275	6275	7275	8275
AfYDL217C	CaYDL217C	5276	6276	7276	8276
AfYOR250C	CaYOR250C	5277	6277	7277	8277
AfYDR167W	CaYDR167W	5278	6278	7278	8278
AfYGL120C	CaYGL120C	5279	6279	7279	8279
AfYHR027C	CaYHR027C	5280	6280	7280	8280
AfYER013W	CaYER013W	5281	6281	7281	8281
AfORF6_569	CaORF6_569	5282	6282	7282	8282
AfORF6_6011	CaORF6_6011	5283	6283	7283	8283
AfYNL247W	CaYNL247W	5284	6284	7284	8284
AfYJL125C	CaYJL125C	5285	6285	7285	8285
AfYML125C	CaYML125C	5286	6286	7286	8286
AfYJR076C	CaYJR076C	5287	6287	7287	8287
AfYGR070W	CaYGR070W	5288	6288	7288	8288
AfYDL105W	CaYDL105W	5289	6289	7289	8289
AfYHR023W	CaYHR023W	5290	6290	7290	8290
AfLYS4	CaLYS4	5291	6291	7291	8291
AfYDR062W2	CaYDR062W2	5292	6292	7292	8292
AfYMR203W	CaYMR203W	5293	6293	7293	8293
AfYOL094C	CaYOL094C	5294	6294	7294	8294
AfYDR407C	CaYDR407C	5295	6295	7295	8295
AfYOR287C	CaYOR287C	5296	6296	7296	8296
AfYLL031C	CaYLL031C	5297	6297	7297	8297
AfYPL085W	CaYPL085W	5298	6298	7298	8298

【００４４】

AfYMR260C	CaYMR260C	5299	6299	7299	8299
AfYFL017C	CaYFL017C	5300	6300	7300	8300
AfYMR218C	CaYMR218C	5301	6301	7301	8301
AfYEL026W	CaYEL026W	5302	6302	7302	8302
AfYDL207W	CaYDL207W	5303	6303	7303	8303
AfYNL131W	CaYNL131W	5304	6304	7304	8304
AfYNR026C	CaYNR026C	5305	6305	7305	8305
AfYOR004W	CaYOR004W	5306	6306	7306	8306
AfYBR254C	CaYBR254C	5307	6307	7307	8307
AfYOR232W	CaYOR232W	5308	6308	7308	8308
AfYNR043W	CaYNR043W	5309	6309	7309	8309
AfYOR257W	CaYOR257W	5310	6310	7310	8310
AfYGR060W	CaYGR060W	5311	6311	7311	8311
AfYJR112W	CaYJR112W	5312	6312	7312	8312
AfYPR186C	CaYPR186C	5313	6313	7313	8313
AfYBR079C	CaYBR079C	5314	6314	7314	8314
AfYPR056W	CaYPR056W	5315	6315	7315	8315
AfYDR472W	CaYDR472W	5316	6316	7316	8316
AfYGR172C	CaYGR172C	5317	6317	7317	8317
AfYMR028W	CaYMR028W	5318	6318	7318	8318
AfYMR227C	CaYMR227C	5319	6319	7319	8319
AfYGR029W	CaYGR029W	5320	6320	7320	8320
AfYPR025C	CaYPR025C	5321	6321	7321	8321
AfYOR145C	CaYOR145C	5322	6322	7322	8322
AfYBL041W	CaYBL041W	5323	6323	7323	8323
AfYHR122W	CaYHR122W	5324	6324	7324	8324
AfYPR113W	CaYPR113W	5325	6325	7325	8325
AfYHR143W-A	CaYHR143W-A	5326	6326	7326	8326
AfYDR449C	CaYDR449C	5327	6327	7327	8327
AfYDR016C	CaYDR016C	5328	6328	7328	8328
AfYDR236C	CaYDR236C	5329	6329	7329	8329
AfYKL141W	CaYKL141W	5330	6330	7330	8330
AfYLR078C	CaYLR078C	5331	6331	7331	8331
AfYDR311W	CaYDR311W	5332	6332	7332	8332
AfORF6_3819	CaORF6_3819	5333	6333	7333	8333
AfORF6_3864	CaORF6_3864	5334	6334	7334	8334
AfORF6_804	CaORF6_804	5335	6335	7335	8335
AfORF6_889	CaORF6_889	5336	6336	7336	8336
AfYAL033W	CaYAL033W	5337	6337	7337	8337
AfYBL030C	CaYBL030C	5338	6338	7338	8338
AfYBR029C	CaYBR029C	5339	6339	7339	8339
AfYBR123C	CaYBR123C	5340	6340	7340	8340
AfYBR143C	CaYBR143C	5341	6341	7341	8341
AfYBR155W	CaYBR155W	5342	6342	7342	8342
AfYBR198C	CaYBR198C	5343	6343	7343	8343
AfYCL003W	CaYCL003W	5344	6344	7344	8344
AfYCR012W	CaYCR012W	5345	6345	7345	8345
AfYCR057C	CaYCR057C	5346	6346	7346	8346
AfYDL084W	CaYDL084W	5347	6347	7347	8347
AfYDL087C	CaYDL087C	5348	6348	7348	8348
AfYDR002W	CaYDR002W	5349	6349	7349	8349
AfYDR023W	CaYDR023W	5350	6350	7350	8350

【００４５】

AfYDR045C	CaYDR045C	5351	6351	7351	8351
AfYDR054C	CaYDR054C	5352	6352	7352	8352
AfYDR060W	CaYDR060W	5353	6353	7353	8353
AfYDR087C	CaYDR087C	5354	6354	7354	8354
AfYDR226W	CaYDR226W	5355	6355	7355	8355
AfYDR228C	CaYDR228C	5356	6356	7356	8356
AfYDR238C	CaYDR238C	5357	6357	7357	8357
AfYDR299W	CaYDR299W	5358	6358	7358	8358
AfYDR328C	CaYDR328C	5359	6359	7359	8359
AfYDR373W	CaYDR373W	5360	6360	7360	8360
AfYDR390C	CaYDR390C	5361	6361	7361	8361
AfYDR489W	CaYDR489W	5362	6362	7362	8362
AfYEL032W	CaYEL032W	5363	6363	7363	8363
AfYEL055C	CaYEL055C	5364	6364	7364	8364
AfYER006W	CaYER006W	5365	6365	7365	8365
AfYER036C	CaYER036C	5366	6366	7366	8366
AfYFL045C	CaYFL045C	5367	6367	7367	8367
AfYGL008C	CaYGL008C	5368	6368	7368	8368
AfYGL048C	CaYGL048C	5369	6369	7369	8369
AfYGL097W	CaYGL097W	5370	6370	7370	8370
AfYGL112C	CaYGL112C	5371	6371	7371	8371
AfYGL201C	CaYGL201C	5372	6372	7372	8372
AfYGL207W	CaYGL207W	5373	6373	7373	8373
AfYGL225W	CaYGL225W	5374	6374	7374	8374
AfYGL245W	CaYGL245W	5375	6375	7375	8375
AfYGR047C	CaYGR047C	5376	6376	7376	8376
AfYGR048W	CaYGR048W	5377	6377	7377	8377
AfYGR083C	CaYGR083C	5378	6378	7378	8378
AfYGR185C	CaYGR185C	5379	6379	7379	8379
AfYGR218W	CaYGR218W	5380	6380	7380	8380
AfYGR267C	CaYGR267C	5381	6381	7381	8381
AfYHR005C-A	CaYHR005C-A	5382	6382	7382	8382
AfYHR072W-A	CaYHR072W-A	5383	6383	7383	8383
AfYHR166C	CaYHR166C	5384	6384	7384	8384
AfYHR188C	CaYHR188C	5385	6385	7385	8385
AfYIL022W	CaYIL022W	5386	6386	7386	8386
AfYIL109C	CaYIL109C	5387	6387	7387	8387
AfYJL109C	CaYJL109C	5388	6388	7388	8388
AfYJL111W	CaYJL111W	5389	6389	7389	8389
AfYJL167W	CaYJL167W	5390	6390	7390	8390
AfYJR064W	CaYJR064W	5391	6391	7391	8391
AfYJR065C	CaYJR065C	5392	6392	7392	8392
AfYKL013C	CaYKL013C	5393	6393	7393	8393
AfYKL045W	CaYKL045W	5394	6394	7394	8394
AfYKL104C	CaYKL104C	5395	6395	7395	8395
AfYKL193C	CaYKL193C	5396	6396	7396	8396
AfYLR088W	CaYLR088W	5397	6397	7397	8397
AfYLR129W	CaYLR129W	5398	6398	7398	8398
AfYLR274W	CaYLR274W	5399	6399	7399	8399
AfYLR291C	CaYLR291C	5400	6400	7400	8400
AfYLR293C	CaYLR293C	5401	6401	7401	8401
AfYML064C	CaYML064C	5402	6402	7402	8402

【００４６】

AfYMR049C	CaYMR049C	5403	6403	7403	8403
AfYMR055C	CaYMR055C	5404	6404	7404	8404
AfYMR131C	CaYMR131C	5405	6405	7405	8405
AfYMR220W	CaYMR220W	5406	6406	7406	8406
AfYMR309C	CaYMR309C	5407	6407	7407	8407
AfYNL061W	CaYNL061W	5408	6408	7408	8408
AfYNL113W	CaYNL113W	5409	6409	7409	8409
AfYNL163C	CaYNL163C	5410	6410	7410	8410
AfYNL178W	CaYNL178W	5411	6411	7411	8411
AfYNL181W	CaYNL181W	5412	6412	7412	8412
AfYNL263C	CaYNL263C	5413	6413	7413	8413
AfYNR046W	CaYNR046W	5414	6414	7414	8414
AfYOL034W	CaYOL034W	5415	6415	7415	8415
AfYOR056C	CaYOR056C	5416	6416	7416	8416
AfYOR057W	CaYOR057W	5417	6417	7417	8417
AfYOR117W	CaYOR117W	5418	6418	7418	8418
AfYOR207C	CaYOR207C	5419	6419	7419	8419
AfYOR224C	CaYOR224C	5420	6420	7420	8420
AfYOR259C	CaYOR259C	5421	6421	7421	8421
AfYOR261C	CaYOR261C	5422	6422	7422	8422
AfYOR262W	CaYOR262W	5423	6423	7423	8423
AfYPL117C	CaYPL117C	5424	6424	7424	8424
AfYPL122C	CaYPL122C	5425	6425	7425	8425
AfYPL218W	CaYPL218W	5426	6426	7426	8426
AfYPL235W	CaYPL235W	5427	6427	7427	8427
AfYPR103W	CaYPR103W	5428	6428	7428	8428
AfYPR112C	CaYPR112C	5429	6429	7429	8429
AfYPR165W	CaYPR165W	5430	6430	7430	8430
AfPRO1	CaPRO1	5431	6431	7431	8431
AfYBL050W	CaYBL050W	5432	6432	7432	8432
AfYDL029W	CaYDL029W	5433	6433	7433	8433
AfYDR397C	CaYDR397C	5434	6434	7434	8434
AfYDR460W	CaYDR460W	5435	6435	7435	8435
AfYER094C	CaYER094C	5436	6436	7436	8436
AfYER171W	CaYER171W	5437	6437	7437	8437
AfYGL091C	CaYGL091C	5438	6438	7438	8438
AfYGR074W	CaYGR074W	5439	6439	7439	8439
AfYGR103W	CaYGR103W	5440	6440	7440	8440
AfYGR253C	CaYGR253C	5441	6441	7441	8441
AfYHR170W	CaYHR170W	5442	6442	7442	8442
AfYJR017C	CaYJR017C	5443	6443	7443	8443
AfYLR103C	CaYLR103C	5444	6444	7444	8444
AfYNL075W	CaYNL075W	5445	6445	7445	8445
AfYPL131W	CaYPL131W	5446	6446	7446	8446
AfORF6_1717	CaORF6_1717	5447	6447	7447	8447
AfORF6_2193	CaORF6_2193	5448	6448	7448	8448
AfORF6_2398	CaORF6_2398	5449	6449	7449	8449
AfORF6_4499	CaORF6_4499	5450	6450	7450	8450
AfORF6_5520	CaORF6_5520	5451	6451	7451	8451
AfORF6_7629	CaORF6_7629	5452	6452	7452	8452
AfORF6_7847	CaORF6_7847	5453	6453	7453	8453
AfORF6_8362	CaORF6_8362	5454	6454	7454	8454

【００４７】

AfORF6_8377	CaORF6_8377	5455	6455	7455	8455
AfORF6_8461	CaORF6_8461	5456	6456	7456	8456
AfORF6_8607	CaORF6_8607	5457	6457	7457	8457
AfORF6_8654	CaORF6_8654	5458	6458	7458	8458
AfYBL020W	CaYBL020W	5459	6459	7459	8459
AfYBL097W	CaYBL097W	5460	6460	7460	8460
AfYBR002C	CaYBR002C	5461	6461	7461	8461
AfYBR011C	CaYBR011C	5462	6462	7462	8462
AfYBR087W	CaYBR087W	5463	6463	7463	8463
AfYBR135W	CaYBR135W	5464	6464	7464	8464
AfYBR243C	CaYBR243C	5465	6465	7465	8465
AfYCL059C	CaYCL059C	5466	6466	7466	8466
AfYDL102W	CaYDL102W	5467	6467	7467	8467
AfYDL132W	CaYDL132W	5468	6468	7468	8468
AfYDL141W	CaYDL141W	5469	6469	7469	8469
AfYDL143W	CaYDL143W	5470	6470	7470	8470
AfYDL145C	CaYDL145C	5471	6471	7471	8471
AfYDL147W	CaYDL147W	5472	6472	7472	8472
AfYDL195W	CaYDL195W	5473	6473	7473	8473
AfYDL208W	CaYDL208W	5474	6474	7474	8474
AfYDR170C	CaYDR170C	5475	6475	7475	8475
AfYDR188W	CaYDR188W	5476	6476	7476	8476
AfYDR189W	CaYDR189W	5477	6477	7477	8477
AfYDR190C	CaYDR190C	5478	6478	7478	8478
AfYDR235W	CaYDR235W	5479	6479	7479	8479
AfYDR246W	CaYDR246W	5480	6480	7480	8480
AfYDR324C	CaYDR324C	5481	6481	7481	8481
AfYDR341C	CaYDR341C	5482	6482	7482	8482
AfYDR365C	CaYDR365C	5483	6483	7483	8483
AfYDR376W	CaYDR376W	5484	6484	7484	8484
AfYDR394W	CaYDR394W	5485	6485	7485	8485
AfYDR429C	CaYDR429C	5486	6486	7486	8486
AfYER007W	CaYER007W	5487	6487	7487	8487
AfYER048W-A	CaYER048W-A	5488	6488	7488	8488
AfYER082C	CaYER082C	5489	6489	7489	8489
AfYER148W	CaYER148W	5490	6490	7490	8490
AfYFL002C	CaYFL002C	5491	6491	7491	8491
AfYFR004W	CaYFR004W	5492	6492	7492	8492
AfYFR031C	CaYFR031C	5493	6493	7493	8493
AfYFR037C	CaYFR037C	5494	6494	7494	8494
AfYGL011C	CaYGL011C	5495	6495	7495	8495
AfYGL068W	CaYGL068W	5496	6496	7496	8496
AfYGL103W	CaYGL103W	5497	6497	7497	8497
AfYGR094W	CaYGR094W	5498	6498	7498	8498
AfYHL015W	CaYHL015W	5499	6499	7499	8499
AfYHR007C	CaYHR007C	5500	6500	7500	8500
AfYHR020W	CaYHR020W	5501	6501	7501	8501
AfYHR090C	CaYHR090C	5502	6502	7502	8502
AfYHR148W	CaYHR148W	5503	6503	7503	8503
AfYHR165C	CaYHR165C	5504	6504	7504	8504
AfYHR190W	CaYHR190W	5505	6505	7505	8505
AfYIL046W	CaYIL046W	5506	6506	7506	8506

【００４８】

AfYIL078W	CaYIL078W	5507	6507	7507	8507
AfYIR008C	CaYIR008C	5508	6508	7508	8508
AfYJL014W	CaYJL014W	5509	6509	7509	8509
AfYJL050W	CaYJL050W	5510	6510	7510	8510
AfYJL069C	CaYJL069C	5511	6511	7511	8511
AfYJL081C	CaYJL081C	5512	6512	7512	8512
AfYJL104W	CaYJL104W	5513	6513	7513	8513
AfYJL143W	CaYJL143W	5514	6514	7514	8514
AfYJL153C	CaYJL153C	5515	6515	7515	8515
AfYJL203W	CaYJL203W	5516	6516	7516	8516
AfYJR007W	CaYJR007W	5517	6517	7517	8517
AfYJR063W	CaYJR063W	5518	6518	7518	8518
AfYJR072C	CaYJR072C	5519	6519	7519	8519
AfYKL058W	CaYKL058W	5520	6520	7520	8520
AfYKL060C	CaYKL060C	5521	6521	7521	8521
AfYKL145W	CaYKL145W	5522	6522	7522	8522
AfYKR068C	CaYKR068C	5523	6523	7523	8523
AfYKR079C	CaYKR079C	5524	6524	7524	8524
AfYLR078C	CaYLR078C	5525	6525	7525	8525
AfYLR116W	CaYLR116W	5526	6526	7526	8526
AfYLR153C	CaYLR153C	5527	6527	7527	8527
AfYLR163C	CaYLR163C	5528	6528	7528	8528
AfYLR208W	CaYLR208W	5529	6529	7529	8529
AfYLR272C	CaYLR272C	5530	6530	7530	8530
AfYLR276C	CaYLR276C	5531	6531	7531	8531
AfYLR277C	CaYLR277C	5532	6532	7532	8532
AfYLR336C	CaYLR336C	5533	6533	7533	8533
AfYLR347C	CaYLR347C	5534	6534	7534	8534
AfYLR355C	CaYLR355C	5535	6535	7535	8535
AfYLR383W	CaYLR383W	5536	6536	7536	8536
AfYML069W	CaYML069W	5537	6537	7537	8537
AfYMR093W	CaYMR093W	5538	6538	7538	8538
AfYMR235C	CaYMR235C	5539	6539	7539	8539
AfYNL102W	CaYNL102W	5540	6540	7540	8540
AfYNL189W	CaYNL189W	5541	6541	7541	8541
AfYNL240C	CaYNL240C	5542	6542	7542	8542
AfYNR050C	CaYNR050C	5543	6543	7543	8543
AfYOL027C	CaYOL027C	5544	6544	7544	8544
AfYOL097C	CaYOL097C	5545	6545	7545	8545
AfYOL102C	CaYOL102C	5546	6546	7546	8546
AfYOR048C	CaYOR048C	5547	6547	7547	8547
AfYOR063W	CaYOR063W	5548	6548	7548	8548
AfYOR116C	CaYOR116C	5549	6549	7549	8549
AfYOR159C	CaYOR159C	5550	6550	7550	8550
AfYOR204W	CaYOR204W	5551	6551	7551	8551
AfYOR217W	CaYOR217W	5552	6552	7552	8552
AfYOR341W	CaYOR341W	5553	6553	7553	8553
AfYPL076W	CaYPL076W	5554	6554	7554	8554
AfYPL211W	CaYPL211W	5555	6555	7555	8555
AfYPL242C	CaYPL242C	5556	6556	7556	8556
AfYPL266W	CaYPL266W	5557	6557	7557	8557
AfYPR019W	CaYPR019W	5558	6558	7558	8558

【００４９】

AfYPR176C	CaYPR176C	5559	6559	7559	8559
AfYLR355C	CaYLR355C	5560	6560	7560	8560
AfYGR083C	CaYGR083C	5561	6561	7561	8561
AfYHR172W	CaYHR172W	5562	6562	7562	8562
AfYOL130W	CaYOL130W	5563	6563	7563	8563
AfYJL143W	CaYJL143W	5564	6564	7564	8564
AfYNL039W	CaYNL039W	5565	6565	7565	8565
AfYPR187W	CaYPR187W	5566	6566	7566	8566
AfYPR144C	CaYPR144C	5567	6567	7567	8567
AfYGR002C	CaYGR002C	5568	6568	7568	8568
AfYKL059C	CaYKL059C	5569	6569	7569	8569
AfYGR009C	CaYGR009C	5570	6570	7570	8570
AfYGR186W	CaYGR186W	5571	6571	7571	8571
AfORF6_1498	CaORF6_1498	5572	6572	7572	8572
AfORF6_3819	CaORF6_3819	5573	6573	7573	8573
AfORF6_4463	CaORF6_4463	5574	6574	7574	8574
AfORF6_6069	CaORF6_6069	5575	6575	7575	8575
AfORF6_6140	CaORF6_6140	5576	6576	7576	8576
AfORF6_6390	CaORF6_6390	5577	6577	7577	8577
AfORF6_6660	CaORF6_6660	5578	6578	7578	8578
AfORF6_6664	CaORF6_6664	5579	6579	7579	8579
AfORF6_6808	CaORF6_6808	5580	6580	7580	8580
AfORF6_6933	CaORF6_6933	5581	6581	7581	8581
AfORF6_6939	CaORF6_6939	5582	6582	7582	8582
AfORF6_7203	CaORF6_7203	5583	6583	7583	8583
AfORF6_8654	CaORF6_8654	5584	6584	7584	8584
AfYBR038W	CaYBR038W	5585	6585	7585	8585
AfYER059W	CaYER059W	5586	6586	7586	8586
AfYGL233W	CaYGL233W	5587	6587	7587	8587
AfYNL048W	CaYNL048W	5588	6588	7588	8588
AfYNL221C	CaYNL221C	5589	6589	7589	8589
AfYOL066C	CaYOL066C	5590	6590	7590	8590
AfORF6_3026	CaORF6_3026	5591	6591	7591	8591
AfORF6_4005	CaORF6_4005	5592	6592	7592	8592
AfYNL256W	CaYNL256W	5593	6593	7593	8593
AfYPL128C	CaYPL128C	5594	6594	7594	8594
AfYAL041W	CaYAL041W	5595	6595	7595	8595
AfYFL024C	CaYFL024C	5596	6596	7596	8596
AfYJL041W	CaYJL041W			7597	8597
AfYMR314W	CaYMR314W			7598	8598
AfYKL004W	CaYKL004W			7599	8599
AfYFL005W	CaYFL005W			7600	8600
AfYDL126C	CaYDL126C			7601	8601
AfYAR007C	CaYAR007C		6602	7602	8602
AfYMR043W	CaYMR043W		6603	7603	8603

【００５０】

5.1.2. アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子配列の必須性

本発明の一実施形態では、本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子とカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)中のそれらの相同体との間に見られる高度の配列保存に基づいて、これらのアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子がそれらのカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)相同対応遺伝子と同じような生物学的機能を呈すると予測される。したがって、本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)相同遺伝子は、アスペルギルス・フミガー

ツス(Aspergillus fumigatus)の生存または成長に必須であると予測される。

【００５１】

配列相同性分析で使用したカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)遺伝子のそれぞれの必須性を、そのような条件発現突然変異体を作製することにより実験的に実証した。C.アルビカンス(C.albicans)は各遺伝子について2つのアレルを含む絶対二倍体生物であるので、遺伝子の一方のアレルを破壊またはノックアウトし、他方のアレルの発現を異種プロモーターの制御下に置く。C.アルビカンス(C.albicans)必須遺伝子の条件発現突然変異体の作製および試験については、2000年12月29日および2001年2月20日にそれぞれ出願された同時係属の米国特許出願第60/259,128号および同第09/792,024号(それらはいずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている。

【００５２】

アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株の生存、成長、および増殖ならびに/または生存能力がその遺伝子の発現に実質的に結びついているかまたは依存している場合、必須であると考えられる。細胞に必須の機能は、ある程度は細胞の遺伝子型に、ある程度は細胞の環境に依存する。いくつかの必須機能、たとえば、エネルギー代謝など、細胞構造の生合成、遺伝物質の複製および修復などには、複数の遺伝子を必要とする。したがって、生物中の多くの遺伝子の発現が、その生存および/または成長に必須である。そのような遺伝子に、その発現および/または生物活性の消失もしくは低下を招く欠失または突然変異が生じると、通常の成長条件下での真菌の生存能力または成長が消失または低下する可能性がある。必須遺伝子に欠失または突然変異が起こると、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)細胞は、死滅したり、成長を停止したり、または重篤な成長欠陥を示す可能性がある。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子の機能の低下または消失により、その細胞数または成長速度は、類似の条件下で、野生型アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の場合の50%、40%、30%、20%、10%、5%、または1%の範囲になる可能性がある。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の多くの必須遺伝子がこの生物の毒性および/または病原性に寄与すると予想される。したがって、特定宿主または宿主由来の特定の細胞セットに対するアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株の毒性および/または病原性が突然変異遺伝子の条件発現に関連づけられる場合、その必須遺伝子をアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の「毒性遺伝子」と呼ぶこともある。

【００５３】

遺伝子の必須性は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の標的遺伝子をノックアウト(挿入による不活性化または欠失)して、得られた突然変異アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の表現型を通常の成長条件下および他の許容成長条件下で観測することにより、実証することができる。しかしながら、遺伝子破壊実験において、ある遺伝子についてノックアウト(たとえば、標的遺伝子の挿入不活化または欠失による)を生成できないという観測結果が得られたとしても、それだけでは、その遺伝子が必須遺伝子であるという結論を裏づけることはできない。むしろ、対象の遺伝子が必須であるという明確な確証を得るには、対象の遺伝子の発現がその遺伝子を有する細胞の生存能力と関係づけられることを直接実証することが必要である。したがって、突然変異細胞においてある範囲の発現レベルの必須遺伝子が得られるように、必須アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子を調節性異種プロモーターの制御下に置くことができる。そのような発現レベルには、無視できるかまたは非常に低い発現レベルが包含され、それにより、通常の成長条件下および他の許容成長条件下で成長させたときにそのような遺伝子操作された条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異体の表現型の評価が可能になる。条件発現突然変異体の生存能力または成長の消失または低下により、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の必須性を確認する。

【００５４】

本発明の方法によれば、生存、成長、増殖、および/または病原性における機能を調べることができるように特定の遺伝子の量をモジュレートすることができるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の条件発現突然変異体のコレクションを、作製してもよい。そのような研究から得られる情報により、個々の遺伝子産物を可能性のある薬剤標的として同定および確認することが可能である。本発明は、薬剤スクリーニングにおける、そして薬剤の作用機序の研究のための、個別のまたはコレクションとしての遺伝的突然変異体の使用方法を、さらに提供する。

【００５５】

本発明の他の実施形態では、本発明の各必須遺伝子は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)および他のアスペルギルス(Aspergillus)真菌に対して活性な薬剤をスクリーニングする様々な方法において、個別にまたはコレクションの一部分として使用されるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)中の可能性のある薬剤標的を構成する。薬剤スクリーニングプログラムの目的および標的疾患に応じて、本発明の必須遺伝子を分類し、遺伝子産物の構造上の特徴、機能特性、および発現プロファイルに基づいてサブセットに分割することができる。それぞれのサブセット内の必須遺伝子によってコードされる遺伝子産物は、類似の生物活性、類似の細胞内局在、構造相同性、および/または配列相同性を共有しうる。近縁または遠縁の分類群の他の生物に対する配列の相同性または類似性、たとえば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)遺伝子、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)遺伝子、もしくはヒト遺伝子に対する相同性、またはS.セレビシエ(S.cerevisiae)、S.ポンベ(S.pombe)、もしくはヒトのような他の生物の遺伝子に対する配列の類似性もしくは相同性の完全欠如、に基づいてサブセットを作成することも可能である。それぞれのアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異体による死滅性最終表現型または静止性最終表現型の呈示に基づいて、サブセットを作成することも可能である。薬剤スクリーニングプログラムにおいてグループとして都合よく研究することができる必須遺伝子セットと呼ばれるそのようなサブセットを、本発明により提供する。特定の実施形態では、急速死滅性最終表現型を示す突然変異体が好ましい。さらに、本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子によってコードされる産物は真菌に必須の生化学的経路に関与するので、これらの遺伝子およびそれらのコード産物を分析すれば、そのような経路の解明が促進され、その結果さらなる薬剤標的が同定される。したがって、本発明は、薬剤標的を同定および確認するための体系的かつ効率的な
方法を提供する。この方法は、ゲノミクス情報および個別遺伝子の生物学的機能に基づく。

【００５６】

薬剤標的の同定および薬剤のスクリーニングにおける本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ヌクレオチド配列の様々な使用方法を第5.4節で説明する。また、原核生物、酵母、および高等真核生物におけるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ヌクレオチド配列の遺伝子産物およびその断片の産生方法、ならびに遺伝子産物およびその断片に特異的に結合する抗体の産生方法が、第5.2.3節および5.2.4にて示され説明される。

【００５７】

さらに他の実施形態では、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子を遺伝子操作して、対応する相同必須遺伝子の機能の消失または低下を示す突然変異酵母細胞、たとえば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)およびカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の突然変異細胞、の特定の株を用いる相補性試験で発現させることができる。このようにして、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子を、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)またはサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)の突然変異細胞の相補性試験で使用することにより、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)相同必須遺伝子の遺伝子産物の構造および機能を解明し確定することができる。

【００５８】
さらなる実施形態では、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子がカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)相同遺伝子で置換されたアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の突然変異株の作製を容易にすべく、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子配列を使用することができる。カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)はすべての必須遺伝子について2つのアレルを含む絶対二倍体であり、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)でノックアウト突然変異体を生成するには2つの分子事象が必要となるので、そのようなアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異体はとくに有用であると思われる。このアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異体を用いれば、それぞれの必須遺伝子機能を示さない他の病原体の細胞バックグラウンドでカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)必須遺伝子を発現させることが可能であり、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)に対する可能性のある薬剤候補の作用を評価するのに有用であると思われる。

【００５９】
さらに、本発明は、とくに、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)のような非病原性酵母においてこれらの必須遺伝子のオーソログを同定するための必須性に関するこの情報の使用、および薬剤スクリーニング方法におけるこれらのオーソログの使用を提供する。サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)中のこれらの必須遺伝子のオーソログのヌクレオチド配列は一部の例では公知になっているかもしれないが、これらのサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)遺伝子が、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)のような病原性真菌に対する薬剤を見いだすのに有用でありうることは理解されていなかった。

【００６０】
さらに、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)とカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の必須遺伝子の遺伝子産物間で配列が保存されているので、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子の遺伝子産物の構造を利用すれば、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)相同遺伝子産物に対する薬剤の合理的設計を支援することができる。したがって、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)または他の病原性真菌に作用する薬剤を開発する際、様々な実施形態で、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子を使用することができる。そのような方法によって得られる静真菌性化合物または殺真菌性化合物は、広範な宿主範囲を示すであろう。

【００６１】
本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子によってコードされる遺伝子産物の生物学的機能は、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)および/またはサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)中のそれらの対応する相同体の機能により推定することができる。したがって、本発明のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子は、以下の生物学的機能のうちの1つ以上を有しうる。

【００６２】
代謝: アミノ酸代謝、アミノ酸生合成、硫黄の同化型還元およびセリンファミリーの生合成、アミノ酸代謝の調節、アミノ酸輸送、アミノ酸分解(異化)、他のアミノ酸代謝活性、窒素および硫黄の代謝、窒素および硫黄の利用、窒素および硫黄の利用の調節、窒素および硫黄の輸送、ヌクレオチド代謝、プリン-リボヌクレオチド代謝、ピリミジン-リボヌクレオチド代謝、デオキシリボヌクレオチド代謝、環状および異常ヌクレオチドの代謝、ヌクレオチド代謝の調節、ポリヌクレオチド分解、ヌクレオチド輸送、他のヌクレオチド代謝活性、リン酸代謝、リン酸利用、リン酸利用の調節、リン酸輸送、他のリン酸代謝活性、C-化合物および炭水化物の代謝、C-化合物および炭水化物の利用、C-化合物および炭水化物の利用の調節、C-化合物、炭水化物の輸送、他の炭水化物代謝活性、脂質、脂肪酸

、およびイソプレノイドの代謝、脂質、脂肪酸、およびイソプレノイドの生合成、リン脂質生合成、糖脂質生合成、脂質、脂肪酸、およびイソプレノイドの分解、脂質、脂肪酸、およびイソプレノイドの利用、脂質、脂肪酸、およびイソプレノイド生合成の調節、脂質および脂肪酸の輸送、脂質および脂肪酸の結合、他の脂質代謝活性、脂肪酸代謝活性、およびイソプレノイド代謝活性、ビタミン、補因子、および補欠分子族の代謝、ビタミン、補因子、および補欠分子族の生合成、ビタミン、補因子、および補欠分子族の利用、ビタミン、補因子、および補欠分子族の調節、ビタミン、補因子、および補欠分子族の輸送、他のビタミン活性、補因子活性、および補欠分子族活性、二次代謝、主要代謝糖誘導体の代謝、グリコシドの生合成、主要アミノ酸から誘導される二次産物の生合成、アミンの生合成。

【００６３】

エネルギー：解糖および糖新生、ペントース-リン酸経路、トリカルボン酸経路、電子伝達および膜関連エネルギー保存、電子伝達および膜関連エネルギー保存のアクセサリータンパク質、電子伝達および膜関連エネルギー保存の他のタンパク質、呼吸、発酵、エネルギー保存物質(グリコーゲン、トレハロース)の代謝、グリオキシル酸回路、脂肪酸の酸化、他のエネルギー発生活性。

【００６４】

細胞成長、細胞分裂、およびDNA合成：細胞成長、出芽、細胞極性および糸状体形成、フェロモン応答、交配型決定、性特異的タンパク質、胞子形成および発芽、減数分裂、DNAの合成および複製、組換えおよびDNA修復、細胞周期制御および有糸分裂、細胞周期チェックポイントタンパク質、細胞質分裂、他の細胞成長活性、細胞分裂活性、およびDNA合成活性。

【００６５】

転写：rRNA転写、rRNA合成、rRNAプロセシング、他のrRNA転写活性、tRNA転写、tRNA合成、tRNAプロセシング、tRNA改変、他のtRNA転写活性、mRNA転写、mRNA合成、一般的な転写活性、転写制御、クロマチン改変、mRNAプロセシング(スプライシング)、mRNAプロセシング(5'、3'末端プロセシング、mRNA分解)、3'末端プロセシング、mRNA分解、他のmRNA転写活性、RNA輸送、他の転写活性。

【００６６】

タンパク質合成：リボソームタンパク質、翻訳、翻訳制御、tRNAシンテターゼ、他のタンパク質合成活性。

【００６７】

タンパク質の行先決定：タンパク質のフォールディングおよび安定化、タンパク質ターゲッティング、選別およびトランスロケーション、タンパク質修飾、脂肪酸による修飾(たとえば、ミリスチル化、パルミチル化、ファルネシル化)、リン酸化による修飾、脱リン酸化、アセチル化による修飾、他のタンパク質修飾、タンパク質複合体のアセンブリー、タンパク質分解、細胞質および核の分解、リソソームおよび液胞の分解、他のタンパク質分解、他のタンパク質分解性タンパク質、他のタンパク質行先決定活性。

【００６８】

輸送促進：チャネル/細孔、イオンチャネル、イオントランスポーター、金属イオントランスポーター(Cu、Feなど)、他のカチオントランスポーター(Na、K、Ca、NH_4など)、アニオントランスポーター(Cl、SO_4、PO_4など)、C-化合物および炭水化物トランスポーター、他のC-化合物トランスポーター、アミノ酸トランスポーター、ペプチドトランスポーター、脂質トランスポーター、プリンおよびピリミジントランスポーター、アラントインおよびアラントイン酸トランスポーター、輸送ATPアーゼ、ABCトランスポーター、薬剤トランスポーター、他の輸送促進因子。

【００６９】

細胞輸送および輸送機序：核輸送、ミトコンドリア輸送、小胞輸送(ゴルジネットワークなど)、ペルオキシソーム輸送、液胞輸送、細胞外輸送(分泌)、細胞移入、細胞骨格依存輸送、輸送機序、他の輸送機序、他の細胞内輸送活性。

【００７０】
細胞バイオジェネシス: 細胞壁(細胞エンベロープ)のバイオジェネシス、原形質膜のバイオジェネシス、細胞骨格のバイオジェネシス、小胞体のバイオジェネシス、ゴルジ体のバイオジェネシス、細胞内輸送小胞のバイオジェネシス、核のバイオジェネシス、染色体構造のバイオジェネシス、ミトコンドリアのバイオジェネシス、ペルオキシソームのバイオジェネシス、エンドソームのバイオジェネシス、液胞およびリソソームのバイオジェネシス、他の細胞性バイオジェネシス活性。
【００７１】
細胞情報伝達/シグナル伝達: 細胞内情報伝達、不特定シグナル伝達、第二メッセンジャー形成、Gタンパク質活性の調節、鍵キナーゼ、他の不特定シグナル伝達活性、形態形成、Gタンパク質、Gタンパク質活性の調節、鍵キナーゼ、他の形態形成活性、浸透圧感知、レセプタータンパク質、メディエータータンパク質、鍵キナーゼ、鍵ホスファターゼ、他の浸透圧感知活性、栄養応答経路、レセプタータンパク質、第二メッセンジャー形成、Gタンパク質、Gタンパク質活性の調節、鍵キナーゼ、鍵ホスファターゼ、他の栄養応答活性、フェロモン応答生成、レセプタータンパク質、Gタンパク質、Gタンパク質活性の調節、鍵キナーゼ、鍵ホスファターゼ、他のフェロモン応答活性、他のシグナル伝達活性。
【００７２】
細胞レスキュー、防御、細胞死、および老化: ストレス応答、DNA修復、他のDNA修復、解毒、シトクロムP450を用いる解毒、他の解毒、細胞死、老化、外因性ポリヌクレオチドの分解、他の細胞レスキュー活性。
【００７３】
イオンのホメオスタシス: カチオンのホメオスタシス、金属イオンのホメオスタシス、プロトンのホメオスタシス、他のカチオンのホメオスタシス、アニオンのホメオスタシス、スルフェートのホメオスタシス、ホスフェートのホメオスタシス、クロリドのホメオスタシス、他のアニオンのホメオスタシス。
【００７４】
細胞の組織化(タンパク質は対応するオルガネラに局在化される): 細胞壁の組織化、原形質膜の組織化、細胞質の組織化、細胞骨格の組織化、中心体の組織化、小胞体の組織化、ゴルジ体の組織化、細胞内輸送小胞の組織化、核の組織化、染色体構造の組織化、ミトコンドリアの組織化、ペルオキシソームの組織化、エンドソームの組織化、液胞およびリソソームの組織化、内膜の組織化、細胞外/分泌タンパク質。
【００７５】
5.2. アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子
5.2.1 核酸分子、ベクター、および宿主細胞
ここに記載されているのは、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子のコレクションを包含する本発明の核酸分子である。
【００７６】
本明細書中で用いられる「遺伝子」および「組換え遺伝子」という用語は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子もしくはポリヌクレオチドまたは生物活性リボ核酸（RNA）を指す。この用語はさらに、上流、下流、および/またはイントロンのヌクレオチド配列を含む核酸分子を包含しうる。「オープンリーディングフレーム(ORF)」という用語は、停止コドンを含まないアミノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレットを意味し、このトリプレット配列は、特定の生物に適したコドン使用情報を用いてタンパク質に翻訳可能である。
【００７７】
本明細書中で使用される「標的遺伝子」という用語は、とくに薬剤スクリーニングに関連して本発明に有用な必須遺伝子を指す。いくつかの遺伝子は毒性に寄与しかつその生物の生存に必須であると予想されるので、適切な場合には、「標的必須遺伝子」および「標的毒性遺伝子」という用語を用いる。本発明の標的遺伝子は、当技術分野で公知の方法および/または以下に教示する方法により、薬剤標的として、部分的な特徴づけ、完全な特

徴づけ、または確認を行うことが可能である。本明細書中で使用される「標的生物」という用語は、本発明に有用な必須遺伝子および/または毒性遺伝子を有する病原性生物を指す。

【００７８】

「ヌクレオチド配列」という用語は、ヌクレオチドのヘテロポリマー（リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されるものではない）またはこれらのヌクレオチドの配列を指す。また「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのヘテロポリマー（非改変型もしくは改変型のDNAまたはRNAでありうる）を指すために本明細書中で互換的に使用される。たとえば、ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖DNAであっても、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるDNAであっても、および一本鎖領域と二本鎖領域との混合物を有するDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子であってもよい。さらに、ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、またはその両方を含む三本鎖領域から構成されたものであってもよい。また、ポリヌクレオチドは、１以上の修飾塩基を含有してもよく、ヌクレアーゼ耐性もしくは他の理由のために改変されたDNAもしくはRNAの主鎖を含有してもよい。一般に、本発明により提供される核酸セグメントは、ゲノムの断片と短いオリゴヌクレオチドから、または一連のオリゴヌクレオチドから、あるいは個々のヌクレオチドから、アセンブリーして生成される、合成核酸であってよい。

【００７９】

本明細書中でポリペプチドまたはタンパク質を指して使用される「組換え体」という用語は、ポリペプチドまたはタンパク質が組換え発現系（たとえば、微生物または哺乳動物の発現系）から得られることを意味する。「微生物の」とは、細菌または真菌（たとえば酵母）の発現系で作製される組換えポリペプチドまたはタンパク質について言う。産物として、「組換え微生物の」とは、関連する天然グリコシル化を本質的に伴わないポリペプチドまたはタンパク質を定義する。ほとんどの細菌培養（たとえばE.coli培養）で発現されるポリペプチドまたはタンパク質は、グリコシル化改変を含まないが、酵母で発現されるポリペプチドまたはタンパク質は、グリコシル化される。

【００８０】

「発現ビヒクルまたはベクター」という用語は、ヌクレオチド配列からポリペプチドを発現するためのプラスミド、ファージ、またはウイルスを指す。発現ビヒクルは、(1)遺伝子発現で調節的役割を担う１以上の遺伝的エレメント、たとえば、プロモーターまたはエンハンサー、と、(2)mRNAに転写されタンパク質に翻訳される、(1)のエレメントに機能しうる形で連結された構造配列またはコード配列と、(3)適切な転写開始および終結配列と、のアセンブリーを含有する転写ユニット（発現構築物とも呼ばれる）を含みうる。「機能しうる形で連結された」とは、転写および最終的には翻訳を可能とするような形で調節領域および発現対象のDNA配列が連結および配置されているときの連結を指す。カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の場合、そのコドン使用が異常であるため、期待されるアミノ酸配列を有するポリペプチドがこの生物で確実に産生されるようにするには、他の生物から得られたコード配列を改変することが必要になる可能性がある。酵母または真核生物の発現系で使用するための構造ユニットは、好ましくは、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列が含有する。他の選択肢として、リーダー配列または輸送配列を用いずに組換えタンパク質を発現させる場合、これはN末端メチオニン残基を含有しうる。最終産物を得る際、発現された組換えタンパク質からこの残基を後続処理で切断してもよいし切断しなくてもよい。

【００８１】

「組換え宿主細胞」という用語は、染色体DNA中に安定に組み込まれた組換え転写ユニットを有するかまたは染色体外に組換え転写ユニットを安定に保有する培養細胞を意味する。本明細書中で定義される組換え宿主細胞は、組換え転写ユニット中のDNAセグメントまたは合成遺伝子によってコードされた異種ポリペプチドもしくはタンパク質およびRNAを発現する。この用語はまた、遺伝子発現で調節的役割を担う安定に組み込まれた１以上

の組換え遺伝的エレメント（たとえばプロモーターまたはエンハンサー）を有する宿主細胞をも意味する。本明細書中で定義される組換え発現系は、発現対象の内因性DNAセグメントまたは遺伝子に連結された調節エレメントを誘導すると、その細胞の内因性RNA、ポリペプチド、またはタンパク質を発現する。この細胞は原核細胞であっても真核細胞であってもよい。

【００８２】

「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によりアミノ酸を互いに結合させることにより形成される分子を指し、また遺伝子にコードされる通常使用される20種のアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。「活性ポリペプチド」という用語は、天然に存在する任意のポリペプチドの生物活性および/または免疫活性を保持する形態のポリペプチドを指す。「天然に存在するポリペプチド」という用語は、遺伝子操作されていない細胞によって産生されるポリペプチドを指し、とくに、そのポリペプチドの翻訳後修飾（タンパク質分解プロセシング、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない）により生じる様々なポリペプチドを包含しうる。

【００８３】

本明細書中で使用される「単離された」という用語は、天然の供給源において対象の核酸またはポリペプチドと一緒に存在する少なくとも１つの高分子成分（たとえば、核酸またはポリペプチド）から分離された核酸またはポリペプチドを指す。一実施形態において、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、存在する所定の生体高分子の少なくとも95重量％、より好ましくは少なくとも99.8重量％を構成するように精製される（ただし、水、緩衝液、および他の小分子、とくに、1000ダルトン未満の分子量を有する分子が存在していてもよい）。

【００８４】

一実施形態では、本発明は、600を超える必須遺伝子の正体を提供する。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において必須でありかつカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の公知の必須遺伝子と高度の配列保存性を共有するゲノムヌクレオチド配列およびこれらの遺伝子のコード領域の配列識別子を表1に列挙する。コード領域の上流および下流の配列を含むゲノム配列、リーディングフレーム、これらの遺伝子のエキソンおよびイントロンの位置はこれまで知られていない。それぞれの遺伝子座に対して、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子と遺伝子の上流および下流の両方についての約1kbのヌクレオチド配列とを包含するゲノム配列のストレッチ(配列番号1～594および5001～5603)を表1に示す。さらに、それぞれの遺伝子座に由来する、イントロンを含むコード配列(配列番号1001～1594および6001～6603)、コード領域(配列番号2001～2594および7001～7603)、ならびにコードされたタンパク質(配列番号3001～3594および8001～8603)、を表1に示す。遺伝子座が2つ以上のオープンリーディングフレームを提供しうる多くの場合について、代替的なオープンリーディングフレームおよびイントロンのヌクレオチド配列ならびに代替的な遺伝子産物のアミノ酸配列をも、表1に列挙する。また、表1には、それぞれ遺伝子座に対して2セットのゲノムDNA配列を示しており(配列番号1～594および5001～5603)、これは、表1に示されるゲノム配列がそれぞれの変異体コード領域とその前後約1kbのヌクレオチド配列を含むという事実を反映したものである。代替的なコード領域またはオープンリーディングフレームは、代替的な開始および停止コドンならびに/または異なるメッセンジャーRNAスプライシングパターンを用いることにより生成されうる。好ましい実施形態では、配列番号7001～7603に記載の必須遺伝子のヌクレオチド配列および配列番号8001～8603に記載の必須遺伝子産物のアミノ酸配列が、本発明に従って使用される。

【００８５】

これらの遺伝子がアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の成長および/または生存に必須であるという事実は、本発明者らが発見するまで知られていなかった。したがって、これらの遺伝子配列およびそれらの遺伝子産物の使用は本発明に包含さ

れる。すなわち、配列番号2001～2594および7001～7603のそれぞれが、同定された必須遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列を特定している。コード領域の上流および下流の配列を含む必須遺伝子のゲノム配列を、配列番号1～594および5001～5603に示す。イントロン配列を含む必須遺伝子のゲノム配列を、配列番号1001～1594および6001～6603に示す。同定された必須遺伝子の推定アミノ酸配列を、配列番号3001～3594および8001～8603に示すが、これらはそれぞれ、配列番号2001～2594および7001～7603のヌクレオチド配列の概念上の翻訳により得られるものである。さらに、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603のゲノム配列によってコードされるスプライス変異体などの遺伝子産物ならびにそれらのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列も包含される。

【００８６】

DNA配列は、シークエンシング反応により得られたものであり、誤同定されたヌクレオチド、挿入、および/または欠失として存在しうる少数のエラーが含まれている可能性がある。しかしながら、そのような少数のエラーが配列データベース中に仮に存在していたとしても、本発明の必須遺伝子としてORFを同定する際に障害にはならないはずである。ORFの配列は本明細書中に提供されており、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノム中の対応する遺伝子を一意的に同定するためにそれを使用することができるので、当技術分野で公知のいくつかある任意の方法によりORFに対応する遺伝子のクローンを取得し、配列決定を繰返し、そして少数のエラーを修正することは容易であろう。ORFまたはその一部分が開示されているので、対象のコード配列を一意的に同定し、完全なcDNA配列またはゲノム配列を得るのに十分な指針を提供することにより、本質的に、完全な遺伝子が提供されることになる。

【００８７】

さらに、これらの方法は、染色体DNA配列と、プライマー中または組換えDNA中の遺伝子の配列と、の間の絶対的配列同一性を必要としないので、少数の配列エラー、遺伝的多型、およびスプライシングの変異があったとしても、条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株の構築およびそれらの株の使用は、影響を受けることはない。いくつかの場合には、リーディングフレームのアミノ酸配列全体を、公知のサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、および/またはC.ネオフォルマンス(C.neoformans)の配列と比較することにより、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の正確なリーディングフレームを同定することができる。したがって、本発明は、本発明で同定されたORFに対応するアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子、本発明で同定されたORFに対応するアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子によってコードされるポリペプチド、ならびに本発明のORFに対応する遺伝子のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの様々な使用を包含する。特定のヌクレオチド配列と遺伝子との関係を参照する際に本明細書中で使用される「対応する」または「対応した」という用語は、特定の配列が遺伝子を有効に特定していることを意味する。一般的には、対応とは、配列決定における少数のエラー、アレルの変異、および/またはスプライシングの変異を除いて、実質的に配列が同一であることを指す。対応は、遺伝子配列と、その遺伝子から転写されるmRNAまたはその一部分と、の間の転写関係であってもよい。この対応はまた、ポリペプチドに翻訳されないmRNAの部分と、遺伝子のDNA配列と、の間も存在する。

【００８８】

本発明の必須遺伝子を同定し特性づけるために、コンピュータアルゴリズムを利用してコンピュータデータベースの検索および比較解析を行い、その解析の結果をコンピュータに記憶するかまたはコンピュータ上に表示する。配列情報を解析するためのそのようなコンピュータ化ツールは、同一種においてまたは異なる種において他の遺伝子および遺伝子産物に対する遺伝子および遺伝子産物の構造の関連性を決定するのに非常に有用であり、新規な遺伝子およびその産物の推定上の機能を提供しうる。ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列のような生物学的情報は、コード化されてコンピュータ中でデータの流れとして表

現される。本明細書中で使用される「コンピュータ」という用語は、パーソナルコンピュータ、データ端末、コンピュータワークステーション、ネットワーク、コンピュータ化された記憶および検索システム、ならびに配列情報および分析の結果を表示するためのグラフィックディスプレイを包含するが、これらに限定されるものではない。典型的には、コンピュータは、データ入力手段、ディスプレイ手段、プログラム可能な処理装置およびデータ記憶手段を備える。配列データ、リスト、およびデータベースのような情報を記憶するために、「コンピュータ可読媒体」を使用することが可能であり、そのような媒体としては、コンピュータメモリー、フロッピーディスクや磁気テープのような磁気記憶デバイス、光磁気記憶デバイス、およびコンパクトディスクのような光記憶デバイスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。したがって、本発明はまた、配列番号1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列、または配列番号3001～3361および8001～8603からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むコンピュータまたはコンピュータ可読媒体を包含する。好ましい実施形態では、配列の手直しを行って、配列に関連する他のアノテーションおよび生物学的情報へリンク付けした形で記憶する。本発明のヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号1001～1594、6001～6603、2001～2594、7001～7603からなる群より選択される1つ以上のヌクレオチド配列、ならびに/または配列番号3001～3594および8001～8603からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸配列、を用いて、配列相同性検索、配列アライメント、構造予測、およびモデル構築を行う命令によってプログラムされた1つ以上のコンピュータを提供することも本発明の目的である。本発明のヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列を伝送したり配信したりすることのできる、コンピュータを包含するデバイスもまた、対象となる。また、公的および私的配列データベース内でコンピュータ支援により相同配列を同定する方法、コンピュータ支援によって公知の機能を有する他の遺伝子産物との構造上の相同性に基づいて遺伝子産物の推定上の機能特性を提供する方法、ならびにコンピュータ支援により遺伝子産物のモデルを構築する方法における、配列番号1001～1594、6001～6603、2001～2361、7001～7603からなる群より選択される1つ以上のヌクレオチド配列、ならびに/または配列番号3001～3361および8001～8603からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸配列の使用も、本発明に包含される。特定の一実施形態では、本発明は、コンピュータにより支援される、真菌の推定上の必須遺伝子を同定する方法であって、真菌性ヌクレオチド配列または真菌性アミノ酸配列と、配列番号1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列、あるいは配列番号3001～3361および8001～8603からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列と、の間の配列相同性を検出することを含む、上記方法を包含する。

【００８９】

表1に列挙されている必須遺伝子は、当業者に周知のクローニング方法を用いて取得することが可能であり、たとえば、適切なプローブを使用して適切なcDNAまたはgDNA(ゲノムDNA)ライブラリー内の遺伝子を検出することが挙げられるが、これらに限定されるものではない(たとえば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoriesを参照されたい。この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。)。本発明で同定された配列に対するプローブは、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603として本明細書中に開示されたDNA配列に基づいて合成することができる。本明細書中で使用する場合、「標的遺伝子」(たとえば、必須遺伝子および/または毒性遺伝子)とは、(a)配列番号2001～2594に示されるDNA配列および/またはその断片のうちの少なくとも1つを含有する遺伝子；(b)配列番号3001～3594および8001～8603に示されるアミノ酸配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現されるゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされた遺伝子産物をコードする任意のDNA配列またはその断片；(c)ストリンジェントな条件下、たとえば、フィルターに結合させたDNAに6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)

中、約45℃でハイブリダイズさせてから0.2×SSC/0.1% SDS中、約50～65℃で１回以上洗浄する条件下、または高ストリンジェント条件下、たとえば、フィルターに結合させた核酸に6×SSC中、約45℃でハイブリダイズさせてから0.1×SSC/0.2% SDS中、約68℃で１回以上洗浄する条件下、または当業者に自明な他のハイブリダイゼーション条件（たとえば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, at pp. 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3を参照されたい）下において、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603に示されるヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズする任意のDNA配列を指す。好ましくは、本明細書に開示されたDNA配列の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドは、遺伝子産物(たとえば、標的遺伝子によってコードされる遺伝子産物と機能的に等価な遺伝子産物)をコードする。上述したように、標的遺伝子配列は、配列番号3001～3594および8001～8603のアミノ酸配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において発現されるようなゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされる遺伝子産物をコードする縮重ヌクレオチド配列だけでなく、さらに、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)以外の生物で翻訳されたときに、配列番号3001～3594および8001～8603のアミノ酸配列のうちの1つを含むポリペプチドを生成する縮重ヌクレオチド配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現されるようなゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされた遺伝子産物を生成する縮重ヌクレオチド配列、あるいはそれらの断片をも包含する。当業者であれば、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)または他の生物で標的遺伝子配列を使用するときに、適切なコドンをどのように選択するかまたは配列番号2001～2594および7001～7603のヌクレオチド配列をどのように改変するかはわかるであろう。さらに、「標的遺伝子」という用語は、配列番号2001～2594および7001～7603に示されるDNA配列のうちの1つを有するアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子と非常に高いヌクレオチド配列相同性を共有する、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)に天然に存在する遺伝子またはその変異体、すなわち、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)のオーソログを、包含する。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子に適用することのできる薬剤スクリーニング方法は、非病原性サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)および病原性カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)における同一遺伝子のオーソログにも適用することができると考えられる。したがって、本発明のスクリーニング方法は、スクリーニングの目的に依存してサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)を起源とする遺伝子を含むかまたは含まない標的遺伝子に適用可能である。

【００９０】

他の実施形態では、本発明はまた、下記のポリヌクレオチド、そのポリヌクレオチドを発現する宿主細胞、およびそのヌクレオチドの発現産物をも包含する：(a)機能的ドメインに対応する標的遺伝子産物の一部分をコードするポリヌクレオチド、およびそのようなヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド産物、ここで、レセプター型遺伝子産物の場合、そのようなドメインとしては、シグナル配列、細胞外ドメイン(ECD)、膜貫通ドメイン(TM)、および細胞質ドメイン(CD)が挙げられるが、これらに限定されるものではない； (b)標的遺伝子産物の突然変異体をコードするポリヌクレオチド、ここで、そのドメインのうちの1つはその全体または一部分が欠失もしくは改変されており、レセプター型遺伝子産物の場合、そのような突然変異体としては、シグナル配列が切断された成熟タンパク質、TMの全体または一部分が欠失した可溶性レセプター、およびCDの全体または一部分が欠失した非機能的レセプターが挙げられるが、これらに限定されるものではない； ならびに(d)他のポリペプチドに融合された、標的遺伝子産物またはそのドメインのうちの１つを含有する融合タンパク質、をコードするポリヌクレオチド。

【００９１】
本発明はまた、標的遺伝子配列のDNA配列にハイブリダイズする（つまり該DNA配列の相補体である）ポリヌクレオチド（好ましくはDNA分子）をも包含する。そのようなハイブリダイゼーション条件は、上述され当技術分野で公知であるように、高いストリンジェント条件であってもそれほど高くないストリンジェント条件であってもよい。先に記載したDNA配列にハイブリダイズする本発明の核酸分子としては、高ストリンジェント条件下またはストリンジェント条件下で標的遺伝子にハイブリダイズするオリゴデオキシヌクレオチド(「オリゴ」)が挙げられる。一般に、14～70ヌクレオチドの長さを有するオリゴの場合、融解温度(Tm)は、以下の式を用いて計算される。
【００９２】
Tm(℃)＝81.5+16.6（log[一価カチオン(モル濃度)]+0.41(%G+C)-(500/N)
式中、Nはプローブの長さである。ホルムアミドを含有する溶液中でハイブリダイゼーションを行う場合、以下の式を用いて融解温度を計算することが可能である。
【００９３】
Tm(℃)＝81.5+16.6(log[一価カチオン(モル濃度)])+0.41(%G+C)-(0.61)(%ホルムアミド)+(500/N)
式中、Nはプローブの長さである。一般に、ハイブリダイゼーションは、(DNA-DNAハイブリッドの場合)Tmより約20～25℃低い温度または(RNA-DNAハイブリッドの場合)Tmより約10～15℃低い温度で行われる。他の例示的な高ストリンジェント条件としては、たとえば、37℃(14塩基オリゴの場合)、48℃(17塩基オリゴの場合)、55℃(20塩基オリゴの場合)、および60℃(23塩基オリゴの場合)における6×SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウム中での洗浄が挙げられる。
【００９４】
これらの核酸分子は、コードするものであってもよいし、あるいはたとえば標的遺伝子の調節に有用な標的遺伝子アンチセンス分子としておよび/または標的遺伝子ヌクレオチド配列の増幅反応におけるアンチセンスプライマーとして機能するものであってもよい。さらに、そのような配列は、リボザイムおよび/または三重らせん配列の一部分として使用することが可能であり、標的遺伝子の調節にも有用である。さらにまた、そのような分子は、病原体の存在を検出することができる診断方法の構成要素として使用することができる。これらの核酸分子の使用について以下で詳細に説明する。
【００９５】
本発明の標的遺伝子の断片は、少なくとも10ヌクレオチドの長さをもちうる。他の実施形態では、断片は、約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000またはそれ以上の連続ヌクレオチドの長さをもちうる。他の選択肢として、断片は、標的遺伝子産物の少なくとも10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450またはそれ以上の連続アミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を含有しうる。本発明の標的遺伝子の断片はまた、上記の核酸分子のエキソンまたはイントロン、ならびにシグナル配列、細胞外ドメイン(ECD)、膜貫通ドメイン(TM)、および細胞質ドメイン(CD)のような機能的ドメインをコードする核酸分子のコード領域の一部分に相当するものであってもよい。
【００９６】
他の実施形態では、本発明は、本明細書に開示されたコード配列の上流および下流に見いだされる調節領域に関する。調節領域は、本明細書に提供されたゲノム配列から容易に決定され単離される。そのような調節領域内に含まれるものとしては、とくに、プロモーター配列、上流アクチベーター配列、さらには本発明で同定された遺伝子の発現をモジュレートする調節タンパク質に対する結合部位が挙げられる。
【００９７】
他の実施形態では、本発明は、本発明の必須遺伝子のイントロンのヌクレオチド配列を含む核酸分子を包含する。それぞれの必須遺伝子の1つ以上のイントロンのヌクレオチド配列は、存在するのであれば、ゲノム配列(配列番号1001～1361および6001～6603)中に存

在しかつ対応するオープンリーディングフレーム配列(それぞれ配列番号2001～2361および7001～7603)中に存在しないヌクレオチド配列のセグメントにより提供される。これらのイントロン配列またはその断片を含む核酸分子は、配列表中には個別に提供されてはいないが本発明に包含され、そしてさまざまな目的に、たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応により個別のエキソンを単離するためのオリゴヌクレオチドプライマーとして、またはA.フミガーツス(A.fumigatus)の株を同定および/または検出するための診断ツールとして有用である。

【００９８】

以上に列挙された使用のほかに、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子のヌクレオチド配列は、以下のような特定の有用性を有している。

【００９９】

アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノムの遺伝子地図または配列地図の確立を促進するために、本発明のヌクレオチド配列を遺伝子マーカーおよび/または配列マーカーとして使用することができる。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の存在を検出するために、本発明のヌクレオチド配列および対応する遺伝子産物を使用することもできる。当技術分野で周知のハイブリダイゼーションおよび抗体に基づいた方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列および対応する遺伝子産物の存在および濃度を決定することができる。

【０１００】

ヌクレオチド配列を使用することにより、高レベルのアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)分生子に連続的に暴露される動物または被験体のように臨床疾病状態を発症する危険性の高い動物または被験体において防御免疫応答を惹起するために免疫原またはサブユニットワクチンとして単独でまたは組合せで使用することのできる対応する遺伝子産物を作製することもできる。

【０１０１】

さらに他の実施形態では、本発明はまた、(a)標的遺伝子の上記コード配列および/またはそれらの相補配列(アンチセンスなど)のいずれかを含むヌクレオチド配列を含有するDNAベクター; (b)コード配列の発現を指令する調節エレメントと機能しうる形で連結された上記コード配列のいずれかを含むヌクレオチド配列を含有するDNA発現ベクター; ならびに(c)宿主細胞でコード配列の発現を指令する調節エレメントと機能しうる形で連結された標的遺伝子の上記コード配列のいずれかを含有する遺伝子操作された宿主細胞をも包含する。他の種(サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)を除く)の相同標的遺伝子のコード配列を含有するベクター、発現構築物、発現ベクター、および遺伝子操作された宿主細胞もまた対象となる。このほか、他の種の相同標的遺伝子の突然変異アレルを含有する遺伝子操作された宿主細胞もまた対象となる。本発明に使用される調節エレメントとしては、誘導または非誘導プロモーター、エンハンサー、オペレーター、および発現を駆動および調節する当業者に公知の他のエレメントが挙げられるが、これらに限定されるものではない。そのような調節エレメントとしては、lac系、trp系、tet系、および他の抗生物質に基づく抑制系(たとえば、PIP)、TAC系、TRC系、ファージAの主要なオペレーターおよびプロモーターの領域、fdコートタンパク質の制御領域、ならびに3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、酸ホスファターゼに対する真菌性プロモーター、酵母接合フェロモン応答性プロモーター(たとえば、STE2およびSTE3)、および炭水化物代謝に関与する遺伝子から単離されたプロモーター(たとえば、GALプロモーター)、リン酸応答性プロモーター(たとえば、PHO5)、またはアミノ酸代謝(たとえば、MET遺伝子)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明は、本明細書に開示されたすべてのDNAベクター配列の断片を包含する。

【０１０２】

同定された必須遺伝子および毒性遺伝子をさらに特性づけするために、種々の方法を利用することができる。第1に、同定された遺伝子のヌクレオチド配列を用いることにより、同定された遺伝子産物の生物学的機能に関する情報を得ることのできる1つ以上の公知

の配列モチーフとの相同性を解明することができる。当技術分野で周知のコンピュータプログラムを利用すれば、そのような関係を確証することができる。第2に、同定された遺伝子の配列を用いてin situハイブリダイゼーションのような標準的な方法を行うことにより、その遺伝子をサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)やカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)などの別の生物体について構築した類似の地図に関連づけることのできる染色体地図および遺伝子地図に配置することができる。そのような特性づけにより得られた情報により、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)およびその他の病原体に対する薬剤を見いだすためのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの好適な使用方法が示唆され得る。

【０１０３】

以上に列挙した使用の実施方法については、当業者に周知である。そのような方法を開示している参考文献としては、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual,“ 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis eds., 1989, および”Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques,“ Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987が挙げられるが、これらに限定されるものではない。形質転換および相同的組換えによる遺伝子破壊のような基礎的な分子生物学的方法が、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)をはじめとするアスペルギルス(Aspergillus)種に対して開発されてきている。ハイグロマイシンBおよびフレオマイシンに対する抗生物質耐性を付与する遺伝子およびオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ突然変異アレルを相補する栄養要求性マーカーのアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)PYRGを含む選択性マーカーが、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の遺伝子操作に利用可能である。

【０１０４】

5.2.2 アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子の相同体の同定

本発明はまた、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の同定された必須遺伝子に相同的な遺伝子の単離および同定を可能にする生物学的および計算機的方法ならびに試薬を提供する。そのような相同遺伝子の正体および使用もまた、本発明に包含される。

【０１０５】

本明細書に開示された薬剤標的の同定および確認の方法は、他の一倍体病原性真菌に直接適用することができる。デューテロミセトス(Deuteromycetous)真菌、すなわち、性周期および古典的遺伝学に基づかない真菌は、ヒト真菌性病原体の大部分を占める。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)は、この門の医学的に重要なメンバーである。これは、より厳密には、子嚢菌門(Ascomycota)および担子菌門(Basidiomycota)のメンバーを含む。本発明の方法の対象範囲に含まれうる他の病原性デューテロミセトス(deuteromycetous)真菌としては、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、およびコクシジオイデス・イミチス(Coccidiodes immitis)が挙げられる。病原性真菌が二倍体であり一倍体生活環が欠如している場合、本明細書に開示されるように、一方のアレルをノックアウトして第2のアレルを条件発現させる。

【０１０６】

同様に、医薬に適した真菌性病原体もまた、本発明を用いる合理的な薬剤標的探索に好適であるので、植物真菌性病原体および動物病原体を調べて、農業目的および獣医学的目的のための新規な薬剤標的を同定することも可能である。果物、ナッツ、野菜、米、ダイズ、エンバク、オオムギ、およびコムギをはじめとする多くの農作物の品質および収量は、植物真菌性病原体により著しく減少する。例としては、葉汚斑(Septoria tritici)、包えい汚斑(Septoria nodorum)、様々なコムギさび病(Puccinia recondita、Puccinia graminis); うどんこ病(様々な種)、および茎/株腐敗(Fusarium spp.)を引き起こすコムギ真菌性病原体が挙げられる。植物病原体の他のとくに破壊的な例はとしては、Phytophthora

infestans、すなわちジャガイモ凶作の原因因子、ニレ立ち枯れ病を引き起こす子嚢真菌Ophiostoma ulmi、トウモロコシ黒穂病を引き起こす病原体Ustilago maydis、いもち病を引き起こす病原体Magnapurtla grisea、Peronospora parasitica(Century et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Jul 3;92 (14):6597-601); Cladosporium fulvum(トマトの葉かび病原体); Fusarium graminearum、Fusarium culmorum、およびFusarium avenaceum(コムギ、Abramson et al., J Food Prot 2001 Aug; 64(8):1220-5); Altemaria brassicicola(ブロッコリー; Mora et al., Appl Microbiol Biotechnol 2001 Apr; 55(3):306-10); Alternaria tagetica(Gamboa-Angulo et al., J Agric Food Chem 2001 Mar;49(3):1228-32); 穀物病原体Bipolaris sorokiniana(Apoga et al., FEMS Microbiol Lett 2001 Apr 13; 197(2):145-50); イネ苗いもち病真菌Pyricularia grisea(Lee et al., Mol Plant Microbe Interact 2001 Apr; 14(4): 27-35); 葯黒穂病真菌Microbotryum violaceum(Bucheli et al.,: Mol Ecol 2001 Feb ; 10(2): 85-94); Verticillium longisporum comb. Nov(油料種子ナタネの立枯れ病, Karapapa et al., Curr Microbiol 2001 Mar; 42(3): 217-24); ワタ丸莢のアスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)感染(Shieh et al., Appl Environ Microbiol 1997 Sep; 63(9):3548-52); 眼点病病原体Tapesia yallundae(Wood et al., FEMS Microbiol Lett 2001 Mar 15; 196(2):183-7); Phytophthora cactorum株P381(イチゴの葉壊死、Orsomando et al., J Biol Chem 2001 Jun 15; 276(24):21578-84); Sclerotihia sclerotiorum、すなわち広く分布する壊死性真菌(ヒマワリ、Poussereau et al., Microbiology 2001 Mar; 147 (Pt 3): 717 26); コショウ植物/クランベリー炭疽病真菌Colletotrichum gloeosporioides(Kim et al., Mol Plant Microbe Interact 2001 Jan; 14(1):80-5)); Nectria haematococca(エンドウマメ植物、Han et al., Plant J 2001 Feb; 25(3):305-14); Cochliobolus heterostrophus(Monke et al., Mol Gen Genet 1993 Oct; 241(1-2):73-80)、Glomerella cingulata(Rodriquez et al., Gene 1987; 54(1):73-81)、偏性病原体Bremia lactucae(レタスべと病; Judelson et al., Mol Plant Microbe Interact 1990 Jul-Aug; 3(4):225-32)、Rhynchosporium secalis(Rohe et al., Curr Genet 1996 May; 29(6):587-90)、Gibberella pulicaris (Fusarium sambucinum)、Leptosphaeria maculans(Farman et al., Mol Gen Genet 1992 Jan; 231(2):243-7)、Cryphonectria parasiticaおよびMycosphaerella fijiensisおよびMycosphaerella musicola、それぞれ黒色および黄色斑点病の原因因子、ならびにバナナのSeptoria斑点病を引き起こすMycosphaerella eumusae(バナナおよびプランテーン、Balint-Kurti et al., FEMS Microbiol Lett 2001 Feb 5; 195(1):9-15)が挙げられる。殺真菌剤耐性の植物病原体の出現および単一栽培に対する依存度の増加は、明らかに、新規の改良された殺真菌性化合物の必要性が増大していることを示している。したがって、本発明は、植物および家畜の病原体および寄生生物における薬剤標的の同定および確認を包含する。医薬上、農業上、または商業上価値のある一倍体および二倍体真菌の代表的なグループを表2に列挙する。

【０１０７】

表２：代表的な一倍体および二倍体真菌

子嚢菌門(Ascomycota)

動物病原体:	植物病原体:	一般的で商業上重要なもの
アスペルギルス・フミガーツス (Aspergillus fumigatus)	アルタナリア・ソラニ (Alternaria solanii)	アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)
アルタナリアspp (Alternaria spp)	ゴウマノミセス・グラミニス (Gaeumannomyces graminis	シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)
ブラストミセス・デルマチジス (Blastomyces dermatidis)	サーコスポラ・ゼアーマイディス Cercospora zeae-maydis	ピキア・パストリス (Pichia pastoris)
以下を含む、カンジダ(Candida) spp	灰色かび病菌 (Botrytis cinerea)	ハンゼヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha)
カンジダ・デュブリネンシス (Candida dubliinensis)	クラビセプス・パーピュレアー (Claviceps purpurea)	アシュビア・ゴシピイ (Ashbya gossipii)
カンジダ・グラブラータ (Candida glabrata)	コルチシウム・ロルフシイ (Corticum rolfsii)	アスペルギルス・ニドランス (Aspergillus nidulans)
カンジダ・クルゼイ (Candida krusei)	エンドチア・パラシチカ (Endothia parasitica)	トリコデルマ・レセイ (Trichoderma reesei)
カンジダ・ラスタニエ (Candida lustaniae)	スクレロチニア・スクレロチオラム (Sclerotinia sclerotiorum)	オーディオバシディウム・プルランス (Aureobasidium pullulans)
カンジダ・パラプシロプシス (Candida parapsilopsis)	エリシフェ・グラミニス (Erysiphe gramini)	ヤロウィア・リポリチカ (Yarrowia lipolytica)
カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis)	エリシフェ・トリチシ (Erysiphe triticii)	カンジダ・ユチリス Candida utilis
コクシジオイデス・イミチス (Coccidioides immitis)	フザリウムspp. (Fusarium spp.)	クルベロミセス・ラクチス (Kluveromyces lactis)
エクソフィアラ・デルマチチジス (Exophalia dermatiditis)	イネいもち病菌 (Magnaporthe grisea)	
フザリウム・オシキスポラム (Fusarium oxysporum)	プラスモパラ・ビチコーラ (Plasmopara viticola)	
ヒストプラスマ・カプスラーツム (Histoplasma capsulatum)	ペニシリウム・ジギタツム (Penicillium digitatum)	
ニューモシスチス・カリニ (Pneumocystis carinii)	オフィオストマ・ウルミ (Ophiostoma ulmi)	
	オリゼ(oryzae)を含むリゾクトニア (Rhizoctonia)種	
	以下を含むセプトリア(Septoria)種	
	セプトリア・アベネ (Septoria avenae)	
	セプトリア・ノドラム (Septoria nodorum)	
	セプトリア・パセリニイ (Septoria passerinii)	
	セプトリア・トリチシ (Septoria triticii)	
	ベンチュリア・イナクアリス (Venturia inequalis)	

【０１０８】

バーティシリウム・ダーリエ
(Verticillium dahliae)
バーティリシウム・アルボアトラム
(Verticillium albo-atrum)

担子菌門(Basidiomycota)

動物病原体:	植物病原体:	一般的で商業上重要なもの
クリプトコッカス　ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans) トリコスポロン・ベイゲリイ (Trichosporon beigelii)	以下を含む プクキニア(Puccinia) ssp プクキニア・コロナータ (Puccinia coronata) プクキニア・グラミニス (Puccinia graminis) コムギ赤さび病菌 (Puccinia recondita) プクキニア・ストリイフォルミス (Puccinia striiformis) 以下を含むティレチア(Tilletia) spp ティレチア・カリイズ (Tilletia caries) ティレチア・コントロベルサ (Tilletia controversa) ティレチア・インディカ (Tilletia indica) ティレチア・トリチシ (Tilletia tritici) ティレチア・フォエチダ (Tilletia foetida) ウスチラゴ・マイディス (Ustilago maydis) ウスチラゴ・ホルデイ (Ustilago hordeii)	アガリクス・カンペストリス (Agaricus campestris) ファネロケーテ・クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) グレオフィラム・トラベウム Gloeophyllum trabeum トラメテス・ベルシコラ (Trametes versicolor)

接合菌門(Zygomycota)

動物病原体:	植物病原体:	一般的で商業上重要なもの
アブシディア・コリムビフェラ (Absidia corymbifera) ムコール・ルキシー (Mucor rouxii) リゾムコール・プシラス (Rhizomucor pusillus) リゾプス・アルヒズス (Rhizopus arrhizus)		

【０１０９】

したがって、先に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）のヌクレオチド配列のほかに、他の種に存在しうるこれらの標的遺伝子配列の相同体またはオーソログを当技術分野で周知の分子生物学的方法により同定および単離して、過度の実験を行うことなく本発明の方法で使用することができる。たとえば、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、コクシジ

オイデス・イミチス(Coccidioides immitis)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、フィトフトリア・インフェスタンス(Phytophthora infestans)、プクキニア・セコンディリイ(Puccinia secondilii)、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、または上記のいずれかの種の属に含まれる任意の種における、相同標的遺伝子。カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)を含むカンジダ属(Candida)、サッカロミセス属(Saccharomyces)、シゾサッカロミセス属(Schizosaccharomyces)、スポロボロミセス属(Sporobolomyces)、トルロプシス属(Torulopsis)、トリコスポロン属(Trichosporon)、白癬菌属(Tricophyton)、皮膚糸状菌属(Dermatophytes)、小胞子菌属(Microsproum)、ウィッカーハミア属(Wickerhamia)、アシュビア属(Ashbya)、ブラストミセス属(Blastomyces)、カンジダ属(Candida)、シテロミセス属(Citeromyces)、クレブロセキウム属(Crebrothecium)、クリプトコッカス属(Cryptococcus)、デバリオミセス属(Debaryomyces)、エンドミコプシス属(Endomycopsis)、ゲオトリクム属(Geotrichum)、ハンゼヌラ属(Hansenula)、クロエケラ属(Kloeckera)、クリュイベロミセス属(Kluveromyces)、リポミセス属(Lipomyces)、ピキア属(Pichia)、ロドスポリジウム属(Rhodosporidium)、ロドトルラ属(Rhodotorula)、およびヤロウィア属(Yarrowia)の他の酵母もまた、対象となる。このほかに含まれるものとしては、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、カンジダ・パラプシロプシス(Candida parapsilopsis)、カンジダ・クルゼイ(Candida krusei)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、コクシジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis) 、エクソフィアラ・デルマチチジス(Exophalia dermatiditis)、フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、ニューモシスチス・カリニ(Phneumocystis carinii)、トリコスポロン・ベイゲリイ(Trichosporon beigelii)、リゾプス・アルヒズス(Rhizopus arrhizums)、ムコール・ルキシー(Mucor rouxii) 、リゾムコール・プシラス(Rhizomucor pusillus)、もしくはアブシディア・コリムビフェラ(Absidia corymbigera)のような動物真菌病原体、またはアルタナリア・ソラニ(Alternaria solani)、灰色かび病菌(Botrytis cinerea)、エリシフェ・グラミニス(Erysiphe graminis)、イネいもち病菌(Magnaporthe grisea)、コムギ赤さび病(Puccinia recodita) 、スクレロチニア・スクレロチオラム(Sclerotinia sclerotiorum)、セプトリア・トリチシ(Septoria triticii)、ティレチア・コントロベルサ(Tilletia controversa)、ウスチラゴ・マイディス(Ustilago maydis)、ベンチュリア・イナクアリス(Venturia inaequalis)、バーティシリウム・ダーリエ(Verticillium dahliae)のような植物真菌病原体、あるいは上記のいずれかの種の属に含まれる任意の種から同定および単離することのできる先の標的遺伝子配列の相同体が挙げられる。

【０１１０】

したがって、本発明は、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)およびカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)以外の種に由来する、標的遺伝子のポリヌクレオチドにハイブリダイズしうるヌクレオチド配列を提供する。一実施形態では、本発明は、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも50%の同一性をもつヌクレオチド配列を含む単離された核酸を包含する。他の実施形態では、本発明は、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、7001～7603からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる第2の核酸に中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を包含する。

【０１１１】

さらに他の実施形態では、本発明は、配列番号3001～3594および8001～8603からなる群より選択されるアミノ酸配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現される、ゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされた遺伝子産物、に対して少なくとも50%の同一性をもつアミノ

酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を包含する。ここで、該ポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)以外に由来するものである。サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)中のそのような遺伝子の相同体またはオーソログならびにカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)中のそのような遺伝子の相同体またはオーソログのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はほとんど発表されており、Candida albicans Sequencing Projectにより収集されたデータベース(バージョン6)として利用可能であり、Stanford UniversityおよびUniversity of Minnesotaのウェブサイト(http://www- sequence.stanford.edu:8080/およびhttp://alces.med.umn.edu/Candida.htmlを参照されたい)でインターネットによりアクセス可能であるが、S.セレビシエ(S.cerevisae)中またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)中のそのような相同体またはオーソログの多くは、薬剤スクリーニングにおける使用は知られておらず、したがって、そのような使用は本発明によりとくに提供される。カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)またはサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)のそのようなヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列を使用するために、Stanford Genomic Resources(www-genome.stanford.edu)、Munich Information Centre for Protein Sequences (www.mips.biochem.mpg.de)、またはProteome (www.proteomc.com)のような公的データベースを用いて、配列の同定および検索することができる。カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)またはサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)中のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子のオーソログまたは相同体がわかっている場合には、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)および/またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の遺伝子の名称を表Iに示す。サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)のオーソログは、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、または7001～7603のヌクレオチド配列のうちの任意の1つからなる核酸プローブを用いるハイブリダイゼーションアッセイにより同定することもできる。

【０１１２】

本発明のヌクレオチド配列にはさらに、配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも40%、45%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列も包含される。本発明のヌクレオチド配列にはまた、配列番号3001～3594および8001～8603に示されるアミノ酸配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現される、ゲノム配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603によってコードされた遺伝子産物に対して、少なくとも25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性または類似性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も包含される。公知のS.セレビシエ(S.cerevisiae)および/またはC.アルビカンス(C.albicans)の配列は、そのようなヌクレオチド配列から除外してもよい。

【０１１３】

配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603、2001～2594、および7001～7603に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも40%、45%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列は、Stemmer (Stemmer 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-51)ならびに米国特許第6,323,030 B1号、同第6,372,497 B1号、および同第6,365,408 B1号に開示されているようなDNAシャッフリングにより産生させることができる。それらの文献はいずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。DNAシャッフリングの一態様において、DNA分子を例えばDNase Iで消化してDNA断片のプールを提供するが、この態様に限定されるものではない。これらのランダム断片は、DNAポリメラーゼの存在下におけるアニーリングの反復サイクルに付される。断片間の相同性により、伸長可能な

プライミング部位が提供され、個別断片が異なる遺伝子に由来するものであれば、組換え断片が生成される。したがって、シャッフリングは、たとえば、本明細書に開示されるようなアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子をコードするDNA断片およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の相同体をコードする1つ以上のDNA断片、を含むDNA断片の混合物を用いて、行うことができる。そのような相同体をコードするDNA断片は、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、コクシジオイデス・イミチス(Coccidiodes immitis)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、フィトフトリア・インフェスタンス(Phytophthora infestans)、プクキニア・セコンディリイ(Puccinia seconditii)、ニューモシスチス・カリニ(Pneumocystis carinii)、または上記のいずれかの種の属に含まれる任意の種のような他の真菌種から単離すことができる。ただし、これらの種に限定されるものではない。さらに、DNAシャッフリングに付すことのできる、本明細書に開示されるようなアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の相同体をコードするDNA断片は、他の酵母から単離することも可能であり、そのような酵母の属としては、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)を含むカンジダ属(Candida)、サッカロミセス属(Saccharomyces)、シゾサッカロミセス属(Schizosaccharomyces)、スポロボロミセス属(Sporobolomyces)、トルロプシス属(Torulopsis)、トリコスポロン属(Trichosporon)、白癬菌属(Tricophyton)、皮膚糸状菌属(Dermatophytes)、小胞子菌属(Microsproum)、ウィッカーハミア属(Wickerhamia)、アシュビア属(Ashbya)、ブラストミセス属(Blastomyces)、カンジダ属(Candida)、シテロミセス属(Citeromyces)、クレブロセキウム属(Crebrothecium)、クリプトコッカス属(Cryptococcus)、デバリオミセス属(Debaryomyces)、エンドミコプシス属(Endomycopsis)、ゲオトリクム属(Geotrichum)、ハンゼヌラ属(Hansenula)、クロエケラ属(Kloeckera)、クリュイベロミセス属(Kluveromyces)、リポミセス属(Lipomyces)、ピキア属(Pichia)、ロドスポリジウム属(Rhodosporidium)、ロドトルラ属(Rhodotorula)、およびヤロウィア属(Yarrowia)も対象となる。本明細書に開示されるようなアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の相同体をコードする、DNAシャッフリングに有用なさらに他のDNA断片は、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、カンジダ・パラプシロプシス(Candida parapsilopsis)、カンジダ・クルゼイ(Candida krusei)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス(Exophalia dermatiditis)、フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、ニューモシスチス・カリニ(Phneumocystis carinii)、トリコスポロン・ベイゲリイ(Trichosporon beigelii)、リゾプス・アルヒズス(Rhizopus arrhizums)、ムコール・ルキシー(Mucor rouxii)、リゾムコール・プシラス(Rhizomucor pusillus)、もしくはアブシディア・コリムビフェラ(Absidia corymbigera)のような動物真菌病原体、またはアルタナリア・ソラニ(Alternaria solani)、灰色かび病菌(Botrytis cinerea)、エリシフェ・グラミニス(Erysiphe graminis)、イネいもち病菌(Magnaporthe grisea)、コムギ赤さび病菌(Puccinia recodita)、スクレロチニア・スクレロチオラム(Sclerotinia sclerotiorum)、セプトリア・トリチシ(Septoria triticii)、ティレチア・コントロベルサ(Tilletia controversa)、ウスチラゴ・マイディス(Ustilago maydis)、ベンチュリア・イナクアリス(Venturia inaequalis)、バーティシリウム・ダーリエ(Verticillium dahliae)のような植物真菌病原体、あるいは上記のいずれかの種の属に含まれる任意の種から同定および単離することができる。

【０１１４】

同様に、以上に記載したDNAシャッフリングを用いることにより、配列番号3001～3594および8001～8603に示されるアミノ酸配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現される、ゲノム配列番号1～594、5001～5603、1001～1594

、6001～6603によってコードされた遺伝子産物に対して、少なくとも25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性または類似性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を構築することも可能である。

【０１１５】

2つのアミノ酸配列または2つのヌクレオチド配列の同一性パーセンテージを決定するために、その配列を最適な比較が行えるようにアライメントする(たとえば、第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と最適にアライメントするために第1のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の配列内にギャップを導入してもよい)。その後、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置に存在するアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置に存在するものと同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占有されていた場合、それらの分子はその位置では同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列により共有される同一である位置の数の関数である(すなわち、同一性%＝同一オーバーラッピング位置の数/全位置数×100%)。一実施形態では、2つの配列は同じ長さである。

【０１１６】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい例としては、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877の場合のように改変されたKarlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268のアルゴリズムが挙げられる。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-0のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み入れられている。NBLASTヌクレオチドプログラムパラメーターセット、たとえば、スコア=100、ワード長=12を用いて、BLASTヌクレオチド検索を行えば、本発明の核酸分子と相同的なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラムパラメーターセット、たとえば、スコア=50、ワード長=3を用いて、BLASTタンパク質検索を行えば、本発明のタンパク質分子と相同的なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップを加えたアラインメントを得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようにGapped BLASTを利用することができる。他の選択肢として、PSI-BLASTを使用することにより、分子間の距離関係を調べる反復検索を行うこともできる(同書)。BLAST、Gapped BLAST、およびPSI-BLASTプログラムを利用する場合、各プログラム(たとえば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる(たとえば、http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい)。配列比較に利用される数学的アルゴリズムの他の好ましい例としては、Myers and Miller, (1988) CABIOS 4:11-17のアルゴリズムが挙げられるが、これに限定されるものではない。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部分であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み入れられている。ALIGNプログラムを利用してアミノ酸配列の比較を行う場合、 PAM120加重残基表、ギャップ長スペナルティ＝12、およびギャップペナルティ＝4を使用することができる。

【０１１７】

相同標的遺伝子を単離するために、上記のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)標的遺伝子配列を標識して使用することにより、対象の生物から得られたmRNAにより構築したcDNAライブラリーをスクリーニングすることができる。標識配列が由来する生物のタイプとは異なる生物からcDNAライブラリーを誘導した場合、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを低くすべきである。cDNAスクリーニングにより、同一または異なる種で選択的にスプライシングされた転写産物から誘導されたクローンを同定することができる。他の選択肢として、同様に標識断片を適切なストリンジェント条件で使用することにより、対象の生物から誘導したゲノムライブラリーをスクリーニングすることもできる。当業者であれば、低ストリンジェント条件について熟知していよう。低ストリンジェント条件は、ライブラリーおよび標識配列が由来する特定の生物によって予

想通りに異なるであろう。そのような条件に関する指針については、たとえば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; およびAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.)を参照されたい。

【０１１８】

さらに、対象の標的遺伝子の範囲内でアミノ酸配列に基づいて設計された2つの縮重オリゴヌクレオチドプライマープールを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより、相同標的遺伝子配列を単離することができる。この反応の鋳型は、対象の生物から調製したmRNAの逆転写により得られたcDNAであってよい。PCR産物をサブクローニングして配列決定を行い、増幅された配列が相同標的遺伝子配列の配列であるかを確認することができる。

【０１１９】

次いで、当業者に周知の種々の方法により、PCR断片を用いて全長cDNAクローンを単離することができる。他の選択肢として、標識断片を用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。

【０１２０】

PCR法は、全長cDNA配列を単離するためにも利用することができる。たとえば、標準的な手順に従って、対象の生物からRNAを単離することができる。第1の鎖の合成を開始するために、増幅断片の最も5’末端側に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いてRNAで逆転写反応を行うことができる。次いで、標準的末端トランスフェラーゼ反応により、得られたRNA/DNAハイブリッドにグアニンを「テイル付加」し、ハイブリッドをRNAase Hで消化し、その後、poly-Cプライマーによって第2の鎖の合成を開始することができる。このようにして、増幅断片の上流にあるcDNA配列を容易に単離することができる。使用できるクローニングストラテジーのレビューについては、たとえば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; およびAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.)を参照されたい。

【０１２１】

さらに、対象の生物から単離されたDNAまたは合成されたcDNAを利用して発現ライブラリーを構築することができる。この方法では、相同標的遺伝子によって産生される遺伝子産物を発現させ、以下に記載するカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)遺伝子産物に対して生成される抗体と連携させて標準的抗体スクリーニング法によりスクリーニングすることができる。(スクリーニング法については、たとえば、Harlow, E. and Lane, eds., 1988, “Antibodies: A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harborを参照されたい。) そのような標識抗体との反応によって検出されたライブラリークローンを精製し、周知の方法によって配列解析に付すことができる。

【０１２２】

他の選択肢として、増殖、毒性、または病原性に関与する標的遺伝子またはポリペプチドに対して所望のレベルの相同性を有する配列を同定するためにデータベースを検索することにより、相同標的遺伝子またはポリペプチドを同定することも可能である。当業者であれば、GenBankおよびGenSeqをはじめとする様々なデータベースを利用できる。種々の実施形態では、データベースをスクリーニングして、標的ヌクレオチド配列またはその一部分に対して少なくとも97%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、または少なくとも40%の同一性を有する核酸を同定する。他の実施形態では、データベースをスクリーニングして、増殖、毒性、または病原性に関与するポリペプチドまたはその一部分に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、または少なくとも25%の同一性または類似性を有するポリペプチドを同定する。

【０１２３】

他の選択肢として、遺伝子の機能を排除または改変して表現型を有する突然変異体を作製することにより、機能的に相同である標的配列またはポリペプチドを同定することも可能である。たとえば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)などの所与の真菌種の1種または全種の遺伝子に対してこれを行うことができる。一方の真菌種の遺伝子で突然変異を起こさせ、機能的相補性試験を行うことにより、他方の種の機能的類似遺伝子もしくは関連遺伝子(オーソログ)または同一の種の機能的類似遺伝子(パラログ)を同定する方法が提供される。

【０１２４】

所与の種、たとえば、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)から遺伝子のライブラリーまたは遺伝子のメッセンジャーRNAのcDNAコピーのライブラリーを作製し、そのライブラリーをベクター中にクローニングすることにより、第2の種、たとえば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)においてその遺伝子を発現させることができる(たとえば、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)、アスペルギルス・ニドランス(Aspergillus nidulans)プロモーター、またはサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)プロモーターを用いて)。そのようなライブラリーは「異種ライブラリー」と呼ばれる。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)異種ライブラリーを、同定された遺伝子について機能的欠陥のあるサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)の所定の突然変異体中へと形質転換し、突然変異欠陥の全体または一部分の表現型機能を修復する異種ライブラリーの遺伝子をスクリーニングまたは選択することは、「異種機能的相補」と呼ばれ、この場合、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)またはカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)突然変異遺伝子と機能的に関連づけられるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の遺伝子を同定することが可能である。この機能的相補法に特有な点は、核酸またはポリペプチドの配列類似性がなくても遺伝子機能を回復することできる点である。すなわち、この方法によれば、保存された生物学的機能を有する遺伝子の異種間同定が、配列類似性の比較によりそのような保存を解明または示唆することができない場合であっても、可能である。

【０１２５】

試験対象の遺伝子が必須遺伝子である場合、異種機能的相補試験を実施するうえで数多くの可能性が存在する。必須遺伝子の突然変異は、限定されるものではないが、温度感受性アレル、調節プロモーターから条件発現されるアレル、またはmRNA転写産物またはコードされた遺伝子産物を条件により不安定化させるアレルなどの条件アレルであってよい。他の選択肢として、必須遺伝子に突然変異を有する株を、選択マーカーを含むベクター上の天然型遺伝子のコピー(同一種から突然変異された遺伝子の野生型コピー)を用いて増殖させることにより、ベクターおよびそこに含まれる野生型アレルのコピーをほとんどまたはまったく有していない株を選択することが可能である。このように構築された株を異種ライブラリーで形質転換し、異種遺伝子が必須遺伝子の突然変異を機能的に相補できるクローンを、野生型遺伝子を有するプラスミドの存続を許容しない培地で選択する。

【０１２６】

異種機能的相補試験は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、およびサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)の間の遺伝情報の置換に限定されるものではなく、上記の真菌種の任意のペアを用いて機能的相補試験を行うことができる。たとえば、スクレロチニア・スクレロチオラム(Sclerotinia sclerotiorum)のCRE1遺伝子は、アスペルギルス・ニドランス(Aspergillus nidulans)のCREA遺伝子のcreAD30突然変異体を機能的に相補することができる(Vautard et al. 1999, ”The glucose repressor gene CRE1 from Sclerotininia sclerotiorum is functionally related to CREA from Aspergillus nidulans but not to the Mig proteins from Saccharomyces cerevisiae, “ FEBS Lett. 453:54-58参照)。

【０１２７】
さらに他の実施形態では、遺伝子発現アレイに置かれた核酸と、そのアレイにハイブリダイズさせる核酸プローブとが2つの異なる生物種を起源とする場合、その分析結果によって2種間の相同遺伝子の迅速な同定が可能になる。
【０１２８】
5.2.3 アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子によってコードされる産物
本発明の本方法および組成物で使用され、それらに包含される標的遺伝子産物としては、先に記載の標的必須遺伝子配列、たとえば、配列番号2001～2594および7001～7603に記載の標的遺伝子配列によってコードされる遺伝子産物(たとえば、RNAまたはタンパク質)が挙げられる。普遍遺伝暗号を用いない生物中で発現させたとき、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現されるような配列番号3001～3594および8001～8603のアミノ酸配列を有する標的遺伝子のタンパク質産物ならびにゲノム配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされる遺伝子産物は、その生物における公知のコドン使用に従ったヌクレオチド配列によりコードされる可能性がある。当業者であれば、コドン使用の相違、たとえば、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)のコドン使用の相違、に対処するために必要な改変についてわかるであろう。
【０１２９】
しかしながら、このほか、本発明の本方法および組成物はまた、機能的に等価な遺伝子産物に相当するタンパク質およびポリペプチドを使用および包含する。そのような機能的に等価な遺伝子産物としては、配列番号3001～3594および8001～8603に示されるアミノ酸配列ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現される、ゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされた遺伝子産物、を含むかまたは本質的にそれからなるポリペプチドの天然の変異体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。
【０１３０】
そのような等価な標的遺伝子産物は、上記の標的遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列内に、たとえば、アミノ酸残基の欠失、付加、または置換を含有するが結果としてサイレントな変化であって、機能的に等価な標的遺伝子産物が生じるものでもよい。アミノ酸置換は、関連する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または両親媒性に関する類似性に基づいて行いうる。たとえば、無極性(すなわち、疎水性)アミノ酸残基としては、アラニン(AlaまたはA)、ロイシン(LeuまたはL)、イソロイシン(IleまたはI)、バリン(ValまたはV)、プロリン(ProまたはP)、フェニルアラニン(PheまたはF)、トリプトファン(TrpまたはW)、およびメチオニン(MetまたはM)が挙げられ;極性中性アミノ酸残基としては、グリシン(GlyまたはG)、セリン(SerまたはS)、トレオニン(ThrまたはT)、システイン(CysまたはC)、チロシン(TyrまたはY)、アスパラギン(AsnまたはN)、およびグルタミン(GlnまたはQ)が挙げられ;正電荷(すなわち、塩基性)アミノ酸残基としては、アルギニン(ArgまたはR)、リジン(LysまたはK)、およびヒスチジン(HisまたはH)が挙げられ;さらに負電荷(すなわち、酸性)アミノ酸残基としては、アスパラギン酸(AspまたはD)およびグルタミン酸(GluまたはE)が挙げられる。
【０１３１】
「機能的に等価」という用語が本明細書で使用される場合、表2に記載した1種以上の標的遺伝子配列によってコードされるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)標的遺伝子産物と実質的に類似したin vivo活性を示しうるポリペプチドを意味する。このほか、以下で記載するアッセイの一部分として使用される場合、「機能的に等価」とは、標的遺伝子産物の対応する部分が他の細胞分子または細胞外分子と相互作用するのと実質的に類似した形でそのような他の分子と相互作用しうるペプチドまたはポリペプチドをいう。好ましくは、本発明の機能的に等価な標的遺伝子産物はまた、表Iに記載した1種以上の標的遺伝子配列によってコードされる標的遺伝子産物と同一サイズまたはほぼ同一

サイズである。

【０１３２】

標的遺伝子産物の1つ以上のドメイン(たとえば、シグナル配列、TM、ECD、CD、またはリガンド結合ドメイン)に対応するペプチドまたはポリペプチド、末端切断型または欠失標的遺伝子産物(たとえば、標的遺伝子産物の1以上のドメインを欠失したポリペプチド)および融合標的遺伝子タンパク質(たとえば、全長または末端切断型もしくは欠失標的遺伝子産物、または標的遺伝子産物の1以上のドメインに対応するペプチドもしくはポリペプチドと関連のないタンパク質とを融合したタンパク質)もまた、本発明の範囲である。そのようなペプチドまたはポリペプチド(キメラタンパク質またはポリペプチドとも呼ばれる)は、表Iに列挙された標的遺伝子ヌクレオチドおよびアミノ酸配列に基づいて当業者によって容易に設計されうる。融合タンパク質の例としては、エピトープに結合する試薬を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる標的遺伝子産物の単離を容易にするエピトープタグ融合タンパク質が挙げられるが、これに限定されるものではない。融合タンパク質のその他の例としては、たとえば、融合タンパク質が細胞膜に固定されることによって標的遺伝子ポリペプチドが細胞表面に提示されうる任意のアミノ酸配列との融合物;あるいは酵素(たとえば、クルベロミセス・ラクチス(Kluyveronmyces lactis)のLAC4遺伝子によってコードされるβ-ガラクトシダーゼ(Leuker et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 245:212-217))、蛍光タンパク質(たとえば、レニラ・レニフォルミス(Renilla reniformis)由来のもの(Srikantha et al., 1996, J. Bacteriol. 178:121-129))、またはマーカー機能を提供しうる発光タンパク質と、の融合物が挙げられる。したがって、本発明は、配列番号3001～3594および8001～8603のうちの1つから選択されるアミノ酸配列の少なくとも6個の連続残基からなる第1のポリペプチド断片を、第2のポリペプチドに融合させて含む融合タンパク質を提供する。

【０１３３】

上記の標的遺伝子産物コード配列に他の改変を行うことにより、たとえば、選択された宿主細胞での発現、スケールアップなどに、より好適なポリペプチドを得ることができる。たとえば、システイン残基を欠失させるまたは他のアミノ酸で置換することにより、ジスルフィド結合を排除することができる。

【０１３４】

本発明の標的遺伝子産物は、好ましくは、エピトープ断片を提示するのに(すなわち、遺伝子産物が標的遺伝子産物に対する抗体によって認識されるようにするのに)必要な数と少なくとも同じ数の連続アミノ酸残基を含む。たとえば、そのようなタンパク質断片またはペプチドは、識別的に発現された全長遺伝子産物または経路遺伝子産物の少なくとも約8個の連続アミノ酸残基を含有しうる。他の実施形態では、本発明のタンパク質断片およびペプチドは、標的遺伝子産物の約6、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450個、またはそれ以上の連続したアミノ酸残基を含有しうる。

【０１３５】

本発明の方法および組成物に使用され、それらに包含される標的遺伝子産物はまた、本発明の1種以上の上記標的遺伝子配列によってコードされるアミノ酸配列を包含する。ここで、これらの配列またはその断片の1つ以上のエキソンによって頻繁にコードされているドメインは欠失されている。さらにまた、本発明の標的遺伝子産物は、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、およびミリスチル化などの翻訳後修飾を含みうる。

【０１３６】

本発明の標的遺伝子産物は、たとえば、合成法または当業者には周知の技術を用いる組換えDNA法により容易に製造することができる。したがって、本発明の標的遺伝子産物の製造方法については本明細書に記載する。まず、本発明のポリペプチドおよびペプチドを当技術分野で周知の方法により合成または調製する。たとえば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N.Y. を参照され

たい。この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。たとえば、ペプチドを固相支持体上または溶液中で合成することができる。

【０１３７】

他の選択肢として、当業者に周知の組換えDNA法を用いて、配列番号2001～2594および7001～7603に示されるような標的遺伝子タンパク質コード配列および適切な転写/翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、たとえば、in vitro組換えDNA法、合成法、およびin vivo組換え法/遺伝学的組換え法が挙げられる。たとえば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Pla et al., Yeast 12:1677-1702 (1996)(参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする)およびAusubel, 1989, supraに記載の方法を参照されたい。このほか、標的遺伝子タンパク質配列をコードしうるRNAは、たとえば、合成機を用いて化学的に合成することもできる。たとえば、Oligonucleotide Synthesis, 1984, Gait, M.J. ed., IRL Press, Oxford)(参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする)に記載の方法を参照されたい。

【０１３８】

本発明の標的遺伝子コード配列を発現させるために、種々の宿主-発現ベクター系を用いることができる。そのような宿主-発現ベクター系は、対象のコード配列の産生および続いて精製が行われるビヒクルであることもあれば、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトしたときに本発明の標的遺伝子タンパク質をin situで発現することのできる細胞であることもある。これらの系としては、標的遺伝子タンパク質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またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌(たとえば、E. coli、B. subtilis)；標的遺伝子タンパク質コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母(たとえば、サッカロミセス属、分裂酵母属、赤パンカビ属、コウジカビ属、カンジダ属、ピキア属)などの微生物；標的遺伝子タンパク質コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(たとえば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系；標的遺伝子タンパク質コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(たとえば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV；タバコモザイクウイルスTMV)を感染させた、または組換えプラスミド発現ベクター(たとえば、Tiプラスミド)でトランスフォームした植物細胞；あるいは哺乳動物細胞ゲノム由来プロモーター(たとえば、メタロチオネインプロモーター)、または哺乳動物ウイルス由来プロモーター(たとえば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系(たとえば、COS、CHO、BHK、293、3T3)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。所要により、コード領域のヌクレオチド配列を、その翻訳産物が正しいアミノ酸配列を有するように、宿主のコドン使用に従って改変してもよい。

【０１３９】

細菌系では、発現される標的遺伝子タンパク質に使用目的に応じて様々な発現ベクターを有利に選択することができる。たとえば、抗体の産生またはペプチドライブラリーのスクリーニングのためにそのようなタンパク質を大量に産生させる際、たとえば、容易に精製される融合タンパク質産物を高レベルで発現するように指令するベクターが望まれることもある。そのようなベクターとしては、融合タンパク質が産生されるように標的遺伝子タンパク質コード配列を個別にlacZコード領域とインフレームで連結させることのできるE. coli発現ベクターpUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791)；pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、pGEXベクターを用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させることもできる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であって、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させてから遊離グルタチオンの存在下で溶離させることにより、溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子タンパク質がGST部分から放出されうる

ようにトロンビンまたはファクターXaプロテアーゼ切断部位を含むようにデザインされている。

【０１４０】

哺乳動物宿主細胞で標的遺伝子を発現させようとする場合、ウイルスに基づく様々な発現系を利用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、対象の標的遺伝子コード配列はアデノウイルス転写/翻訳制御複合体、たとえば、後期プロモーターと三部(tripartite)リーダー配列と連結させることができる。このキメラ遺伝子は次にin vitroまたはin vivo組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域(たとえば、領域E1またはE3)に挿入すると、生存可能でありかつ感染宿主において標的遺伝子産物を発現させウる組換えウイルスが得られる(たとえば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659を参照されたい)。また、挿入された標的遺伝子コード配列が効果的に翻訳されるには特定の開始シグナルも必要となりうる。これらのシグナルにはATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。その固有の開始コドンおよび隣接配列を含む標的遺伝子全体を適切な発現ベクターに挿入する場合、さらなる翻訳制御シグナルは必要でない。しかしながら、標的遺伝子コード配列の一部分だけを挿入する場合には、おそらくはATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルを提供しなければならない。さらに、全インサートを確実に翻訳するには開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームと同期していなければならない。これらの外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然起源および合成起源のいずれをも含めて種々の起源のものであってよい。発現効率は適切な転写増強エレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって増強させることができる(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544を参照されたい)。

【０１４１】

さらに、挿入配列の発現を調節するかまたは所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾およびプロセシングする宿主細胞系統を選択することができる。タンパク質産物のそのような修飾(たとえば、グリコシル化)およびプロセッシング(たとえば、切断)は、タンパク質機能にとって重要でありうる。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾に関して特徴的および特定的機序を有している。発現した外来タンパク質の適切な修飾およびプロセッシングを確実なものとするために適当な細胞系または宿主系を選択することができる。この目的で、一次転写産物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機序を有する真核宿主細胞が使用できる。

【０１４２】

組換えタンパク質を長期にわたって高い収率で産生するには、安定な発現が好ましい。たとえば、標的遺伝子タンパク質を安定に発現するように細胞系を操作することが可能である。宿主細胞は適切な発現制御エレメント(たとえば、プロモーター配列、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)により制御されるDNAおよび選択マーカーでトランスフォームさせることができる。外来DNAを導入した後、操作細胞を完全培地で1～2日間成長させ、その後、選択培地に切り替えてもよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択耐性を付与し、細胞がその染色体中にプラスミドを安定に組み込めるようにし、増殖巣を形成するように細胞を成長させ、次に、これをクローニングして細胞系へと拡張することができる。この方法は標的遺伝子タンパク質を発現する細胞系の遺伝子工学的操作に有利に用いることができる。そのような遺伝子工学的に操作した細胞系は、内在する標的遺伝子タンパク質の活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニングおよび評価にとくに有用でありうる。

【０１４３】

限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、およびアデニンホスホリボシルトランフェラーゼ(Lowy et al., 1980, Cell 22:817)遺伝子をはじめとするいくつかの選択系が、それぞれ、tk^-、$hgprt^-$、または$aprt^-$細胞で使用できる。また、メト

トレキサート(Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527耐性)を付与するdhfr、ミコフェノール酸耐性を付与するgpt(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)、アミノグリシドG-418耐性を付与するneo(Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1)およびハイグロマイシン耐性を付与するhygro(Santerre et al., 1984, Gene 30:;147)に対する選択の基礎として抗代謝産物耐性を用いることができる。

【０１４４】

他の選択肢として、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を用いることにより、融合タンパク質を容易に精製することができる。たとえば、Janknechtらにより記載されている系を用いれば、ヒト細胞系で発現された非変性融合タンパク質の精製が容易になる(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976)。この系では、対象の遺伝子を、その遺伝子のオープンリーディングフレームが6個のヒスチジン残基からなるアミノ末端タグと翻訳の際に融合されるようにワクシニア組換えプラスミド中にサブクローニングする。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞からの抽出物をNi^{2+}ニトリロ酢酸-アガロースカラムに充填し、ヒスチジンタグ付きタンパク質をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。また、標的遺伝子産物のカルボキシ末端における融合も意図される。

【０１４５】

本明細書に記載されているようなアッセイ系において構成要素として用いる場合、標的遺伝子タンパク質は、標的遺伝子タンパク質と試験物質との間で形成される複合体の検出を容易にするために直接的または間接的に標識することができる。限定されるものではないが、^{125}Iなどの放射性同位元素、基質に暴露された際に検出可能な比色定量シグナルまたは光を発する酵素標識系、および蛍光標識をはじめとする種々の好適な標識系のいずれかを使用することができる。

【０１４６】

間接的標識は、いずれかの標的遺伝子産物と特異的に結合する標識抗体などのタンパク質の使用を含む。そのような抗体としては、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAbs)、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、$F(ab')_2$フラグメント、Fab発現ライブラリーによって作製されるフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられる。

【０１４７】

同定された標的ヌクレオチド配列によってコードされる標的遺伝子タンパク質が発現した後、そのタンパク質を精製する。タンパク質精製法は当技術分野で周知である。同定された外因性ヌクレオチド配列にコードされ、それから発現されたタンパク質は、ポリエチレングリコールによる沈殿のような沈殿法を用いて部分精製することができる。このほか、タンパク質のエピトープタグを用いてタンパク質の簡便なワンステップ精製を行ってもよい。さらにまた、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、ヒドロキシアパタイトカラムの使用、固定化反応性色素、等電点クロマトグラフィー、および高速液体クロマトグラフィーの使用などのクロマトグラフィー法を用いてタンパク質を精製することもできる。精製方法としては、一次元ゲル電気泳動、高分解能二次元ポリアクリルアミド電気泳動、等電点電気泳動などの電気泳動法が考えられる。また本発明の精製法としては、固相結合抗体、リガンド提示カラム、および他のアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを含むアフィニティークロマトグラフィー法も考えられる。

【０１４８】

さらに、精製された標的遺伝子産物、その断片、またはその誘導体を薬学上許容される担体に加えて個体に投与し、そのタンパク質またはポリペプチドに対する免疫応答を誘発してもよい。好ましくは、この免疫応答はその個体を防御する防護免疫応答である。タンパク質(アジュバントを含む)および薬学上許容される担体の適当な用量を決定する方法は、当業者に周知である。

【０１４９】

5.2.4 アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子によってコードされる産物を認識する抗体の単離および使用

ここでは上記の1つ以上の標的遺伝子産物のエピトープを特異的に認識しうる抗体の産生方法について説明する。そのような抗体としては、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAbs)、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、$F(ab')_2$フラグメント、Fab発現ライブラリーによって作製されたフラグメント、抗イディオタイプ(抗-Id)抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられる。

【０１５０】

標的遺伝子または遺伝子産物に対する抗体を産生させるために、種々の宿主動物に標的遺伝子タンパク質またはその一部を注射することにより免疫化する。そのような宿主動物としては、限定されるものではないがいくつか挙げると、ウサギ、マウス、およびラットが挙げられる。宿主種にもよるが、免疫応答を増強するために、限定されるものではないが、フロイント(完全および不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、BCG(bacille Calmett-Guerin)およびCorynebacterium parvumなどの潜在的に有用なヒトアジュバントをはじめとする種々のアジュバントを使用できる。したがって、本発明は、単離されたポリペプチドを含む免疫原性組成物を動物に導入することを含んでなる、動物において免疫応答を誘発する方法を提供する。ここで、該ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3001～3594および8001～8603ならびにアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)により発現される、ゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされた遺伝子産物(スプライス突然変異体など)、のうちの1つの少なくとも6個の連続した残基を含む。

【０１５１】

ポリクローナル抗体は、標的遺伝子産物のような抗原またはその抗原性機能誘導体で免疫化した動物の血清に由来する抗体分子の不均質集団である。ポリクローナル抗体を作製するために、先に記載した宿主動物を、これもまた先に記載したアジュバントを添加した、示差的に発現させた遺伝子産物または異なる経路の遺伝子産物を注射することによって免疫化することができる。免疫動物における抗体力価は、固定化ポリペプチドを用いる酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)などの標準的な技術によって経時的にモニタリングすることができる。所要により、抗体分子を、動物から(たとえば、血液から)単離してもよいし、タンパク質Ａクロマトグラフィーなどの周知の方法によってさらに精製してIgG画分を得ることができる。

【０１５２】

モノクローナル抗体は特定の抗原に対する抗体の均質な集団であるが、これは連続細胞培養系により抗体分子を産生させる任意の方法によっても得ることができる。こうした方法としては、限定されるものではないが、Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497;および米国特許第4,376,110号)のハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030)、およびEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)が挙げられる。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそのいずれかのサブクラスに属する任意の免疫グロブリンであってもよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroまたはin vivoで培養可能である。現在のところin vivoにおいて高力価のmAbを産生させることが好ましい産生方法となっている。

【０１５３】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(たとえば、抗体ファージ提示ライブラリー)を対象のポリペ

プチドでスクリーニングすることにより、本発明のポリペプチドに対して誘導されるモノクローナル抗体を同定および単離することができる。ファージ提示ライブラリーを作製およびスクリーニングするためのキットは、市販されている(たとえば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01；およびStratagene SurfZAPTM Phage Display Kit, Catalog No. 240612)。さらに、抗体提示ライブラリーを作製およびスクリーニングする際に使用するのにとくに向いている方法および試薬の例は、たとえば米国特許第5,223,409号；PCT公報第WO 92/18619号；PCT公報第WO 91/17271号；PCT公報第WO 92/20791号；PCT公報第WO 92/15679号；PCT公報第WO 93/01288号；PCT公報第WO 92/01047号；PCT公報第WO 92/09690号；PCT公報第WO 90/02809号；Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huseら (1989) Science 246:1275-1281；Griffithsら (1993) EMBO J. 12:725-734に記載されている。

【０１５４】

さらに、標準的組換えDNA技術を用いて作製できる、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体などの組換え抗体は、本発明の範囲内にある。キメラ抗体は、マウスmAb由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である(たとえば、Cabilly et al.,米国特許第4,816,567号；およびBossら、米国特許第4,816397号を参照。これらの文献はその内容全体が参照により本明細書に組み入れるものとする)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の１つ以上の相補性決定領域(CDR)、およびヒト免疫グロブリン分子由来の枠組み構造領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である(たとえば、Queen、米国特許第5,585,089号を参照されたい。この文献は、その内容全体が参照により本明細書に組み入れるものとする)。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、たとえば、PCT公報第WO 87/02671号；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494号；PCT公報第WO 86/01533号；米国特許第4,816,567号；欧州特許出願第125,023号；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043；Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimura et al. (1987) Canc. Res. 47:999-1005；Wood et al. (1985) Nature 314:446-449；およびShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559)；Morrison (1985) Science 229:1202-1207；Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4:214：米国特許第5,225,539号；Jones et al. (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534；ならびにBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法を用いて、当該技術分野で公知の組換えDNA技術により作製することができる。

【０１５５】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のためにとくに望ましい。そのような抗体は、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子は発現できないが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子は発現できるトランスジェニックマウスを用いて産生できる。このトランスジェニックマウスを、選択した抗原(たとえば、本発明のポリペプチド全体またはその一部分)で通常の方式で免疫化する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスが有するヒト免疫グロブリントランスジーンは、B細胞分化の間に再編成し、その後クラススイッチおよび体細胞変異を経る。従って、このような技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgAおよびIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術のレビューについては、LonbergおよびHuszar(1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術の詳細な議論、ならびにこのような抗体の産生プロトコールについては、たとえば、米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；および米国特許第5,545,806号を参照されたい。

【０１５６】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる方法を用いて産生できる。この方法では、選択された非ヒトモノクローナル抗体(たとえば、マウス抗体)を用いて、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する(Jespers et al., (1994) Bio/technology 12:899-903)。

【０１５７】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の方法により産生できる。たとえば、このようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化により産生されうる$F(ab')_2$フラグメント、ならびに$F(ab')_2$フラグメントのジスルフィド結合を還元することで産生され得るFabフラグメントなどが挙げられるが、これらに限定されない。このほか、Fab発現ライブラリーを構築して(Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281)、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントを迅速かつ簡単に同定することができる。

【０１５８】

本発明の抗体はまた、標的遺伝子産物に対するそれらの結合親和性の点からも説明または特定することができる。好ましい結合親和性としては、5×10^{-6}M、10^{-6}M、5×10^{-7}M、10^{-7}M、5×10^{-8}M、10^{-8}M、5×10^{-9}M、10^{-9}M、5×10^{-10}M、10^{-10}M、5×10^{-11}M、10^{-11}M、5×10^{-12}M、10^{-12}M、5×10^{-13}M、10^{-13}M、5×10^{-14}M、10^{-14}M、5×10^{-15}M、または10^{-15}M未満の解離定数すなわちKdを有するものが挙げられる。

【０１５９】

標的遺伝子産物に対する抗体またはそのフラグメントを使用して標的遺伝子産物を検出して、様々な環境条件下、異なる形態学的形態(菌糸体、酵母、胞子)および生物の生活環の異なる段階におけるポリペプチドの発現の存在度およびパターンを評価できる。標的遺伝子産物に向けられた抗体またはそのフラグメントを診断のために使用して、臨床検査手法の一部分として(たとえば、所与の治療処方計画の有効性を決定するために)、感染宿主の組織中の標的遺伝子産物のレベルをモニターできる。抗体を検出可能な物質と結合させることにより検出し易くできる。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ；ならびに適切な放射性物質の例としては^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓまたは^{3}Ｈが挙げられる。

【０１６０】

さらに、標的遺伝子産物に対する抗体またはそのフラグメントを治療に用いて、感染を予防および/または病原体の増殖を阻害することにより、感染性疾患を治療できる。抗体はまた、標的遺伝子産物の生物学的活性を改変するためにも使用できる。毒性または病原性に関与する遺伝子産物に対する抗体を使用して、感染を防ぎ、生物による感染に関連する１つ以上の症状を緩和することもできる。この治療的効果を促進または増強するために、抗体(またはそのフラグメント)を、毒素または殺真菌剤などの治療成分とコンジュゲートしてもよい。治療成分を抗体とコンジュゲートさせるための方法は周知であり、たとえば、Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。

【０１６１】

治療成分がコンジュゲートされているかまたはされていない抗体は、単独でまたは化学治療薬物との組合せで投与される治療薬として使用することができる。

【０１６２】

5.2.5 リボザイムを用いるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)必須遺伝子発現のモジュレーション

リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒することが可能な酵素性RNA分子である(レビューについては、たとえば、Rossi, J., 1994, Current Biology 4:469-471を参照されたい)。リボザイムの作用機序は、リボザイム分子と相補的な標的RNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションと、それに続く、エンドヌクレアーゼによる切断を伴う。リボザイム分子の構成は、標的遺伝子mRNAに相補的な１つ以上の配列を含まなければならず、またmRNA切断に関与する既知の触媒配列を含まなければならない。この配列については、参照により全体が本明細書に組み入れられるものとする、米国特許第5,093,246号を参照されたい。したがって、標的遺伝子タンパク質をコードするRNA配列の特異的かつ効果的なエンドヌクレアーゼによる切断を触媒する、改変ハンマーヘッド型リボザイム分子は、本発明の範囲内である。

【０１６３】

特定の標的遺伝子mRNA転写産物を触媒的に切断するようデザインされたリボザイム分子はまた、標的遺伝子mRNAの翻訳および標的遺伝子の発現を抑制するためにも使用されうる。特異的な認識配列部位でmRNAを切断するリボザイムが標的遺伝子mRNAを破壊するために使用する場合、ハンマーヘッドリボザイムが好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、標的遺伝子mRNAと相補的な塩基対を形成する領域との隣接によって指定される位置でmRNAを切断する。唯一の必要条件は、標的mRNAが次の2塩基、すなわち5'-UG-3'の配列を持つことだけである。ハンマーヘッドリボザイムの構築と産生は当技術分野でよく知られており、HaseloffおよびGerlach, 1988, Nature, 334:585-591において、より完全に記載されている。効率を増加させ、機能を持たないmRNA転写産物の細胞内蓄積を最小にするために、切断認識部位は標的遺伝子mRNAの5'末端付近に位置することが好ましい。

【０１６４】

本発明のリボザイムはまた、テトラヒメナ・サーモフィラ(Tetrahymena thermophila)中に天然に存在し（IVSまたはL-19 IVS RNAとして知られる）、Thomas Cechおよび共同研究者らによって広範にわたり記述されたようなRNAエンドリボヌクレアーゼ（以下、「Cech型リボザイム」）をも含む（Zaug et al.,1984, Science, 224:574-578; ZaugおよびCech, 1986, Science, 231:470-475; Zaug et al., 1986, Nature, 324:429-433; University Patents Inc.による公開国際出願第WO88/04300号; BeenおよびCech, 1986, Cell, 47:207-216）。Cech型リボザイムは、標的RNA配列とハイブリダイズし、その後、標的RNAの切断を起こす、8塩基対の活性部位を持つ。本発明は、標的遺伝子に存在する8塩基対の活性部位配列を標的とするそれらのCech型リボザイムを包含する。

【０１６５】

アンチセンス法の場合と同様に、リボザイムは（たとえば、改善された安定性、ターゲッティングなどのために）改変されたオリゴヌクレオチドで構成することができ、in vivoにおいて標的遺伝子を発現する細胞に送達されなければならない。アンチセンス分子とは異なりリボザイムは触媒であるため、その効果のためにより低い細胞内濃度しか必要としない。異なる標的遺伝子に対する複数のリボザイム分子もまた、逐次または同時に組み合わせて用いることができる。

【０１６６】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、あるいは三重らせん分子は、DNAおよびRNA分子の合成のために当技術分野で知られている任意の方法によって調製しうる。これらは、たとえば固相ホスホロアミダイト化学合成などの、当技術分野において既知のオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学合成するための技術を含む。このほか、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のin vitroおよびin vivoでの転写によって、RNA分子を生成することができる。T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込んだ各種のベクターに、このようなDNA配列を組み込むことができる。別の方法としては、用いられるプロモーターに依存して構成的または誘導的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスDNA構築物を、細胞株に安定して導入することができる。これらの核酸構築物を、送達複合体を介して望ましい細胞集団に選択的に投与することができる。

【０１６７】
細胞内における安定性または半減期を増大させる手段として、DNA分子に既知の様々な改変を導入することができる。実施可能な改変は、分子の5'末端および/または3'末端にリボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列を付加すること、またはオリゴデオキシリボヌクレオチド主鎖中のホスホジエステラーゼ結合よりもむしろホスホロチオエートまたは2'O-メチルを使用することを含むが、それに限定されるものではない。
【０１６８】
5.2.6 アンチセンス分子を用いる必須アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子発現のモジュレーション
遺伝子発現の阻害剤としてのアンチセンス分子の使用は、遺伝子に基づく特異的な治療法になりうる(レビューについては、Stein, in Ch. 69, Section 5, "Cancer: Principle and Practice of Oncology", 4th ed., e.d by DeVita et al., J.B. Lippincott, Philadelphia 1993を参照されたい)。本発明は、標的必須遺伝子または毒性遺伝子またはその一部分のアンチセンスである少なくとも6ヌクレオチドの核酸の治療的または予防的な使用を提供する。本明細書で使用する「アンチセンス」標的核酸とは、いくらかの配列相補性により、標的遺伝子RNA(好ましくはmRNA)の一部分にハイブリダイズ可能な核酸を指す。本発明は、以下に記載するように、製薬上許容される担体中に有効量の本発明のアンチセンス核酸を含む医薬組成物をさらに提供する。
【０１６９】
他の実施形態では、本発明は、C.アルビカンス(C.albicans)などの対象の生物中の標的遺伝子のin vitro、ex vivoまたはin vivoでの発現を阻害する方法であって、本発明のアンチセンス核酸を含む有効量の組成物を細胞に提供することを含む方法に関する。異なる標的遺伝子にハイブリダイズ可能な複数のアンチセンスポリヌクレオチドを組み合わせて、逐次または同時に使用してもよい。
【０１７０】
他の実施形態では、本発明は、上述した方法により同定された必須遺伝子の発現をモジュレートする方法であって、必須遺伝子から転写されたmRNAの翻訳を阻害するアンチセンスRNA分子を調節プロモーターから発現させる方法に関する。本実施形態の一態様では、条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株において、アンチセンスRNA分子を発現させる。本実施形態の他の態様では、アスペルギルス (Aspergillus)または他の一倍体もしくは二倍体病原性生物、たとえば、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、カンジダ・パラプシロプシス(Candida parapsilopsis)、カンジダ・クルゼイ(Candida krusei)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、コクシジオイデス・イミチス (Coccidioides immitis) 、エクソフィアラ・デルマチチジス(Exophalia dermatiditis)、フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、ニューモシスチス・カリニ(Phneumocystis carinii)、トリコスポロン・ベイゲリイ(Trichosporon beigelii)、リゾプス・アルヒズス(Rhizopus arrhizums)、ムコール・ルキシー(Mucor rouxii)、リゾムコール・プシラス(Rhizomucor pusillus)、もしくはアブシディア・コリムビフェラ(Absidia corymbigera)のような動物真菌病原体、または灰色かび病菌(Botrytis cinerea)、エリシフェ・グラミニス(Erysiphe graminis)、イネいもち病菌(Magnaporthe grisea)、コムギ赤さび病菌(Puccinia recodita)、セプトリア・トリチシ(Septoria triticii)、ティレチア・コントロベルサ(Tilletia controversa)、ウスチラゴ・マイディス(Ustilago maydis)のような植物真菌病原体、あるいは上記のいずれかの種の属に含まれる任意の種、の野生型株において、アンチセンスRNA分子を発現させる。
【０１７１】
本発明のアンチセンスヌクレオチド配列を含む核酸分子は、標的遺伝子mRNAのコードお

よび/または非コード領域に相補的でありうる。アンチセンス分子は、相補的な標的遺伝子mRNA転写物に結合し、翻訳を低下させるかまたは阻止する。絶対的相補性は、好ましいが必須ではない。本明細書に記載されているRNAの一部分に「相補的な」配列とは、該RNAとハイブリダイズして、安定した二本鎖を形成するのに十分な相補性を有する配列を意味し；二本鎖アンチセンス核酸の場合、二本鎖DNAの一本鎖をこのように試験できるか、または三重らせん形成をアッセイできる。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。当業者は、標準的手順を使用してミスマッチの許容程度を確認して、ハイブリダイズされた複合体の融点を決定できる。

【０１７２】

メッセージの5'端(たとえば、AUG開始コドンまでを含む5'非翻訳配列)に相補的な核酸分子は、翻訳を阻害するのに最も効率的に作用するはずである。しかしながら、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列も同様に、mRNAの翻訳を阻害するのに有効であることが最近示された。概説については、Wagner, R., 1994, Nature 372:333-335を参照されたい。

【０１７３】

mRNAの5'非翻訳領域に相補的なヌクレオチド配列を含む核酸分子は、AUG開始コドンの相補配列を含んでもよい。mRNAコード領域に相補的なアンチセンス核酸分子は、それほど効率的でない翻訳阻害剤であるが、本発明に従って使用できる。標的遺伝子mRNAの5'-、3'-またはコード領域にハイブリダイズするようにデザインされたか否かに関わらず、アンチセンス核酸は少なくとも６ヌクレオチドの長さを有し、6～約50ヌクレオチドの長さにわたるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。具体的な態様では、オリゴヌクレオチドは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、または少なくとも200ヌクレオチドである。

【０１７４】

標的遺伝子配列の選択に関係なく、in vitro試験をまず行って、遺伝子発現を阻害するアンチセンス分子の能力を定量することが好ましい。これらの試験では、オリゴヌクレオチドのアンチセンス遺伝子阻害と非特異的生物学的影響とを区別する対照を利用することが好ましい。また、これらの試験では、標的RNAまたはタンパク質のレベルを、内部対照RNAまたはタンパク質のレベルと比較することが好ましい。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られた結果を、対照オリゴヌクレオチドを用いて得られたものと比較することが想定される。対照オリゴヌクレオチドがテストオリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであり、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、標的配列との特異的ハイブリダイゼーションを予防するのに必要なだけアンチセンス配列と異なることが好ましい。

【０１７５】

アンチセンス分子は、一本鎖または二本鎖の、DNA、RNAもしくはキメラ混合物、またはそれらの誘導体もしく改変体でありうる。アンチセンス分子は、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において改変して、たとえば、分子、ハイブリダイゼーションなどの安定性を向上させることができる。アンチセンス分子は、ペプチド(たとえば、細胞受容体をin vivoで標的化するため)、ハイブリダイゼーション誘発型切断薬物(たとえば、Krolら, 1988, BioTechniques 6:958-976を参照)、または挿入剤(intercalating agents)(たとえば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照)などの他のさらなる群を含みうる。この目的のために、アンチセンス分子を他の分子(たとえば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発型架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発型切断剤など)とコンジュゲートしてもよい。

【０１７６】

アンチセンス分子は、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチ

ルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(ｖ)、ワイブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(ｖ)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリンを含むがこれらに限定されない群から選択される少なくとも１つの修飾塩基成分を含みうる。

【０１７７】

アンチセンス分子はまた、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシルロースおよびヘキソースからなる群より選択される少なくとも１つの改変型糖部分を含んでもよいが、これらの糖に限定されるものではない。

【０１７８】

さらに他の実施形態では、アンチセンス分子は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミダイト、ホスホロジアミダイト、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタールまたはそれらの類似体からなる群より選択される少なくとも１つの改変型リン酸骨格を含む。

【０１７９】

さらに他の実施形態では、アンチセンス分子は、α-アノマーオリゴヌクレオチドである。α-アノマーオリゴヌクレオチドは、通常のβユニットとは逆に、鎖が互いに対して平行に延びる相補的RNAと、特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148)、またはキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330)である。

【０１８０】

本発明のアンチセンス分子は、たとえば自動化DNA合成機(これらは、Biosearch、Applied Biosystemsなどから市販されている)を使用して、当該技術分野で公知の標準的な方法により合成され得る。たとえば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドはSteinら(1988, Nucl. Acids Res. 16:3209)の方法により合成でき、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは制御型多孔性ガラス高分子支持体などを使用して調製できる(Sarinら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451)。

【０１８１】

標的遺伝子のコード領域に対して相補的なアンチセンスヌクレオチドを使用できるが、転写された非翻訳領域に相補的なものも好ましい。

【０１８２】

製薬上許容される担体中に有効量のアンチセンス核酸を含む本発明の医薬組成物を、対象の病原体に感染した被験体に投与してもよい。

【０１８３】

病原体により生じる特定の疾患の治療に有効なアンチセンス核酸の量は、感染部位または症状に応じ、標準的な方法により決定できる。可能であれば、治療しようとする病原体のアンチセンス細胞毒性をin vitroで測定し、その後、ヒトで試験および使用する前に有用な動物モデル系で測定することが望ましい。

【０１８４】

アンチセンスDNAまたはRNAを細胞に送達するための多数の方法が開発されてきた。たとえば、アンチセンス分子を、病原体が存在する組織部位に直接注射してもよいし、または所望の細胞を標的化するようにデザインされた改変型アンチセンス分子(たとえば、病原体の細胞表面上で発現される受容体または抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体に連結したアンチセンス分子)を全身投与してもよい。アンチセンス分子は、送達複合体を介して所望の細胞集団に送達できる。特定の実施形態では、標的遺伝子のアンチセンス核

酸を含む医薬組成物を、生体高分子(たとえばポリ-β-1→4-N-アセチルグルコサミンポリサッカリド)、リポソーム、微粒子またはマイクロカプセルによって投与する。本発明の様々な実施形態では、このような組成物を使用して、アンチセンス核酸の持続性放出を得ることが有用であるかもしれない。特定の実施形態では、特定の同定可能な病原体抗原に特異的な抗体によって標的化したリポソームを利用することが望ましいかもしれない(Leonetti et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2448-2451；Renneisenら, 1990, J. Biol. Chem. 265:16337-16342)。

【０１８５】

5.2.7 突然変異必須遺伝子を有するアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株の構築

本発明の一実施形態では、本発明の必須遺伝子のそれぞれは、活性が調節可能である異種プロモーターの制御下に置かれる。遺伝子が必須遺伝子である場合、その遺伝子の発現を阻止すると、致死的になるかまたは成長が著しく阻害されるであろう。したがって、本発明では、標的の発現レベルがある範囲で提供されるように、異種プロモーターが使用される。条件に依存して、遺伝子は、標的遺伝子をその天然プロモーターに連結させたときに観測されるレベルに対して、過少発現されるか、過剰発現されるか、またはそれと同等のレベルで発現されうる。異種プロモーターは、同一の病原性生物のさまざまな遺伝子のプロモーターであるかまたは異なる種に由来するプロモーターであってよい。本発明の一実施形態では、異種調節性プロモーターは、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)Pgla Aプロモーターである。Pgla Aプロモーターからの転写は、マルトースの存在下で刺激され、キシロースの存在下で抑制される。したがって、標的必須遺伝子のプロモーター領域をPgla Aによって置換すれば、改変遺伝子を有するアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)宿主をマルトースおよび/またはキシロースの存在下で増殖させることにより、標的遺伝子の発現を調節することが可能になる。(以下の第6.2節に開示された例を参照されたい)

条件発現突然変異アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株のコレクションが得られるように、遺伝子の所望のサブセットで本方法を繰り返すことができる。ここで、それぞれの株は、条件発現されるさまざまな遺伝子を含む。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株の条件発現突然変異体の構築の好ましい実施形態はでは、以下の方法が使用されるが、この方法に限定されるものではない。

【０１８６】

破壊されるアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の5'および3'配列と同一である約65bpのフランキング配列を含むように優性選択性マーカーのPCR増幅を行えば、任意の所与のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子に対する遺伝子破壊カセットの構築が可能になる。

【０１８７】

標的アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子のノックアウト突然変異体が望まれる場合、一般に、Baudin et al. et al. (1993, Nucleic Acids Research 21: 3329-30)の方法に従って構築することが可能である。その場合、PCR増幅された遺伝子破壊カセットでアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株の形質転換を行い、そして野生型遺伝子が優性選択性マーカーで正確に置換された薬剤耐性形質転換体または原栄養体の選択を行うことにより、遺伝子破壊事象を生じさせることができる。そのような突然変異株は、薬剤の存在下で、または限定されるものではないがウラシルのような栄養要求物の不在下で増殖させることにより、選択することができる。破壊された遺伝子は機能せず、この遺伝子からの発現は起こらない。(以下の第6.3節および第6.4節に示される具体例を参照されたい)

本発明の他の実施形態では、天然プロモーターをテトラサイクリン調節性プロモーター系のような条件発現プロモーターと置換することにより、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子を条件発現させる。このプロモーター系は、最初、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)用に開発されたものであるが

、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)用に改変することが可能である(Gari et al., 1997, Yeast 13:837-848 ; and Nagahashi et al., 1997, Mol. Gen. Genet. 255:372-375を参照されたい)。

【０１８８】

この実施形態では、まず、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)GAL4(アミノ酸785～881)またはHAP4(アミノ酸424～554)の転写活性化ドメインに融合されたE. coli TetRテトラサイクリンリプレッサードメインまたはDNA結合ドメイン(アミノ酸1～207)を含む、トランス活性化融合タンパク質を構築することにより、条件発現を行う。E. coli TetR(アミノ酸1～207)＋サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)GAL4(アミノ酸785～881)、およびE. coli TetR(アミノ酸1～207)＋サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)HAP4(アミノ酸424～554)の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列もまた、本発明に包含される。したがって、本発明は、細胞において発現可能なトランス活性化融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)細胞を提供する。ここで、トランス活性化融合タンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含む。。

【０１８９】

アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)におけるトランス活性化融合タンパク質の発現は、限定されるものではないがアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)グルコアミラーゼプロモーターPGLA Aを提供することにより達成される。しかしながら、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において機能的である任意の調節領域、プロモーター、およびターミネーターを、融合タンパク質の発現に使用できることは明らかである。したがって、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において機能的であるプロモーター、トランス活性化融合タンパク質のコード領域、およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において機能的であるターミネーターを含む核酸分子は、本発明に包含される。そのような核酸分子は、プラスミド、コスミド、トランスポゾン、または可動遺伝因子でありうる。好ましい実施形態では、TetR-Gal4またはTetR-Hap4トランスアクチベーターが、所望の組込み物の選択に好適な栄養要求性マーカーを用いて、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)株中に安定に組込まれる

この実施形態では、プロモーター置換断片は、トランス活性化融合タンパク質のDNA結合ドメインにより認識されるヌクレオチド配列を少なくとも１コピー含む異種プロモーターをコードするヌクレオチド配列を含む。ここで、トランス活性化融合タンパク質が異種プロモーターに結合すると、異種プロモーターからの転写が増大する。異種テトラサイクリンプロモーターは、当初はサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)遺伝子発現のために開発されたものであり、テトラサイクリンオペレーター配列の可変数のコピー、すなわち、2、4、または7個のコピーを含む。テトラサイクリンプロモーターは、標的遺伝子のオープンリーディングフレームのすぐ上流に置かれたときにテトラサイクリンプロモーター依存的調節に有利な方向で、たとえばPYRG選択マーカーに隣接してサブクローニングされる。PYRG-TetプロモーターカセットのPCR増幅では、置換される調節領域、すなわち、標的遺伝子のヌクレオチド位置-200～-1(開始コドンを基準にして)の近傍、に対して相同的である約65bpのフランキング配列が組み込まれ、それにより、形質転換のための条件発現プロモーター置換断片が作製される。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)中へと形質転換する場合、プロモーター置換断片と標的遺伝子の上流調節領域との相同的組換えにより、野生型調節領域が条件調節テトラサイクリンプロモーターで置換された株が生成される。形質転換体は、ウラシル原栄養体として選択され、サザンブロットおよびPCR分析により確認される。

【０１９０】

この特定の実施形態では、プロモーターはテトラサイクリンの不在下で誘導され、テトラサイクリンの存在により抑制される。テトラサイクリンの類似体(たとえば、クロルテトラサイクリン、デームクロサイクリン、ドキシサイクリン、メクロサイクリン、メトサ

イクリン、ミノサイクリンヒドロクロリド、アンヒドロテトラサイクリン、およびオキシテトラサイクリンが挙げられるが、これらに限定されるものではない)もまた、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)標的遺伝子の条件発現突然変異体の発現を抑制するために使用することができる。

【０１９１】

本発明はまた、tetR'と呼ばれる突然変異型テトラサイクリンリプレッサー(tetR)分子に基づく、テトラサイクリンプロモーター系の代替変異体を包含する。この変異体は、tetR'が野生型tetRの代わりにまたは野生型tetRに加えて用いた場合、抗生物質エフェクター分子の結合により活性化されて(すなわち、そのコグネイトオペレーター配列に結合して)発現を促進し、抗生物質エフェクターの不在下では抑制される(すなわち、オペレーター配列に結合しない)。たとえば、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の必須性の分析は、薬剤輸送に関与する遺伝子(たとえば、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)のCaCDR1、CaPDR5、またはCaMDR1遺伝子のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)相同体)を除去するなどしてテトラサイクリンが存在しない条件下での抑制が必要とされる場合、tetRの代わりにtetR'を用いて行うことができる。本発明の方法はまた、tetRをアクチベーテードメインに融合し、tetR'を一般的なリプレッサー（たとえば、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)遺伝子のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)相同体CaSsr6またはCaTup1）に融合して、抗生物質エフェクター分子の存在下で発現を増強するかまたはさらに抑制する場合、tetRおよびtetR'分子の両方がアクチベーター／リプレッサー二元系に組み込まれるように適合化させることができる(Belli et al., 1998, Nucl Acid Res 26:942-947。参照により本明細書に組み入れられるものとする)。条件発現を提供するこれらの方法もまた本発明に包含される。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の野生型プロモーターを条件発現異種プロモーターで置換してこのプロセスを繰返すことにより、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の遺伝子の好ましいサブセットまたはその全ゲノムに対して、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の条件発現突然変異株のコレクションまたは完全なセットが得られる。

【０１９２】

本発明の他の実施形態では、本方法は、遺伝子の発現が異種プロモーターにより条件調節されるように、異種プロモーターをコードするヌクレオチド配列を含むプロモーター置換断片を用いてアレルの組換えを行って標的遺伝子を改変することにより、他の一倍体病原性真菌にも適用することができる。遺伝子の好適なサブセットは、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)やサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)などの他の生物の標的遺伝子と実質的なヌクレオチド配列相同性を共有する遺伝子を含む。たとえば、本発明の方法は、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・フラバス(Aspergillus flavus)、カンジダ・グラブラータ(Candida glabrata)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）エクソフィアラ・デルマチチジス(Exophalia dermatiditis)、フザリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum)、ヒストプラスマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、ニューモシスチス・カリニ(Phneumocystis carinii)、トリコスポロン・ベイゲリイ(Trichosporon beigelii)、リゾプス・アルヒズス(Rhizopus arrhizums)、ムコール・ルキシー(Mucor rouxii)、リゾムコール・プシラス(Rhizomucor pusillus)、もしくはアブシディア・コリムビフェラ(Absidia corymbigera)のような動物真菌病原体、または灰色かび病菌(Botrytis cinerea)、エリシフェ・グラミニス(Erysiphe graminis)、イネいもち病菌(Magnaporthe grisea)、コムギ赤さび病菌(Puccinia recodita)、セプトリア・トリチシ(Septoria triticii)、ティレチア・コントロベルサ(Tilletia controversa)、ウスチラゴ・マイディス(Ustilago maydis)のような植物真菌病原体、あるいは上記のいずれかの種の属に含まれる任意の種、をはじめとする他の一倍体病原性真菌病原体にも適用することが可能である。

【０１９３】

条件発現を達成するための手段は、テトラサイクリンプロモーター系に限定されるものではなく、他の条件プロモーターを用いて行うこともできる。そのような条件プロモーターは、たとえば、特定の条件下でプロモーターからの転写を抑制するリプレッサーにより、またはたとえばインデューサーの存在下でプロモーターからの転写を増大させるトランスアクチベーターにより、調節しうる。たとえば、先に述べたように、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)グルコアミラーゼプロモーターは、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において、キシロースの存在下では転写されないが、マルトース下で成長させた細胞では高レベルの発現を示す。機能上テトラサイクリンプロモーターの代わりに使用しうる代替プロモーターとしては、他の抗生物質に基づいて制御できるプロモーター系(たとえば、プリスチナマイシン誘導プロモーターまたはPIP)およびカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)条件調節プロモーター(たとえば、MET25、MAL2、PHO5、GAL1、GAL10、STE2、またはSTE3)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０１９４】

アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)では、多くの内因性および異種の誘導性プロモーターがタンパク質の産生のためにうまく使用されているが、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)で同定または特性づけられた内因性調節性プロモーターは比較的少ない(Van den Hondel et al (1991) In : MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI J.W. Bennett, L. Lasure, Eds. (Academic Press. Orlando, FL)。アスペルギルス(Aspergillus)で異種遺伝子発現に使用された調節プロモーターの1つは、glaA(グルコアミラーゼ)プロモーターである。glaAプロモーターからの転写は、デンプン、マルトース、またはマルトデキストリンにより誘発され、キシロースにより強く抑制される(Verdoes et al. (1994) Gene 146(2):159-65; Fowler et al. (1990) Curr Genet, 18(6):537-45)。アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)においてE. coli uidAリポーターを用いて測定した場合、glaAプロモーターの発現は、キシロースと比較してマルトースの存在下で100倍誘発された(Verdoes et al. (1994) Gene 146 (2): 159-65)。この調節は、転写レベルで行われると思われる(Verdoes et al. (1994) Gene 146 (2): 159-65 ; Fowler et al. (1990) Curr Genet, 18(6):537-45)。

【０１９５】

アスペルギルス・ニドランス(Aspergillus ndulans)で確認された異種プロモーターの例は、アスペルギルス・ニドランス(Aspergillus ndulans)において条件発現を保持するxylPプロモーター(ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum))である(Zadra et al. (2000) Appl Environ Microbiol, 66 (11): 4810-16)。プロモーター置換株の構築時に異種プロモーターの使用により得られる利点は、プロモーター置換カセットと非標的ゲノム配列との相同性が最小化されるということである。

【０１９６】

アスペルギルス・ニドランス(Aspergillus nidulans)遺伝子の条件発現を厳密に制御することが実証されたプロモーターであれば、本発明のプロモーター置換カセットに組込んでアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の必須性を明らかにすべく使用することが可能である。したがって、本発明の特定の実施形態では、A.ニドランス(A.nidulans)遺伝子alcAおよびaldAから誘導されたプロモーターをプロモーター置換カセットに組込むことが可能である。alcAおよびaldAの遺伝子は、それぞれ、アルコールおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードし、これらの遺伝子の発現は、両方とも、炭素源により厳密に制御される(Flipphi et al. (2001) J Biol Chem., 276(10): 6950-58)。これらの遺伝子は、グルコースやラクトースのような好ましい炭素源の存在下で抑制され、エタノールまたは2-ブタノンのいずれかが唯一の炭素源であるときに誘発される。本発明のプロモーター置換ストラテジーに有用な他の調節性プロモーターとしては、A.ニドランス(A. nidulans) facCおよびgabA遺伝子から誘導されるたプロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない(Stemple et al. 1998 J. Bacteriol. 180(23): 6242-6251 ; Espeso et al (2000), Molecular and Cellular Biology 20(10): 3355-3363)。

カルニチンアセチルトランスフェラーゼをコードするfacC遺伝子の発現は、酢酸および脂肪酸により誘発され、グルコースにより抑制される(Stemple et al. 1998 J. Bacteriol. 180(23): 6242-6251)。γ-アミノ酪酸パーミアーゼをコードするgabA遺伝子の発現は、酸条件下で誘発され、アルカリ成長条件下で抑制される(Espeso et al (2000), Molecular and Cellular Biology 20(10): 3355 3363)。調節性プロモーター(たとえば、ニューロスポラ・クラッサ(Neurospora crassa)銅メタロチオネイン遺伝子およびオルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子(ODC)から誘導される調節性プロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない)は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)における遺伝子必須性の確証に使用されるプロモーター置換法で利用することが可能である。N.クラッサ(N.crassa)銅メタロチオネインは、培地中の銅のレベルに従って条件調節され(Schilling et al. 1992 Current Genetics 22(3) : 197-203)、ODCは、スペルミジンにより抑制される(Williams et al. 1992, Molecular and Cellular Biology 12 (1) : 347-359; Hoyt et al. 2000, Molecular and Cellular Biology 20(80): 760-773)。本発明においてアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の必須性のプロモーター置換分析に有用な他の異種プロモーターは、ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum)由来のxylPプロモーターである。エンドキシラナーゼをコードするxylP遺伝子の発現は、キシランまたはキシロースの存在下で誘発され、グルコースにより強く抑制される(Zadra et al. (2000) Appl Environ Microbiol, 66(11): 4810-16)。したがって、プロモーター置換カセットは、N.クラッサ(N.crassa)、A.ニドランス(A. nidulans)、およびP.クリソゲナム(P.chrysogenum)においてそれぞれ同定された銅メタロチオネイン、ODC、alcA、aldA、facC、gabA、またはxylPプロモーター配列を用いて、またはそれらと相同的な単離されたアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)プロモーター遺伝子を用いて、構築することができる。

【０１９７】

試験する遺伝子の必須性は、選択された条件プロモーターを誘導又は抑制する特定の条件下でそのプロモーターを置換した株の増殖について比較することによって、調べることができる。

【０１９８】

本発明の他の実施形態では、内因性調節性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)プロモーターを用いて、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)中の遺伝子必須性を決定することが可能である。たとえば、niiA、niaD、またはcrnAの発現を調節するプロモーターは、A.フミガーツス(A.fumigatus)におけるプロモーター置換に使用しうる。これらの各遺伝子は、A.フミガーツス(A.fumigatus)において硝酸同化遺伝子クラスターの一部分である。硝酸同化クラスターは、A.ニドランス(A. nidulans)において保存されており、利用可能な窒素源に従って厳密に調節される(Cove 1979 Biol Rev Camb Philos Soc 54(3): 291-327; Kinghorn JR. GENETICAL, BIOCHEMICAL, AND STRUCTURAL ORGANIZATION OF ASPERGILLUS NIDULANS CRNA-NBA-NtAD GENE CLUSTER. In: Wray JL, Kinghorn JR (eds) Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation in Aspergillus nidulans. Oxford University Press, Oxford, pp 69-87 (1989) ; Johnstone et al 1990 Gene 90(2): 181-92)。この異化経路は、A.ニドランス(A. nidulans)の場合、亜硝酸レダクターゼ、硝酸レダクターゼ、および硝酸トランスポーターをそれぞれコードするniiA、niaD、およびcrnA遺伝子を含む(Amaar et al. 1998 Curr Genet 33 (3) : 206-15)。これらの3つの遺伝子は、アンモニア、グルタミン、またはグルタミン酸を含む主要窒素源は存在しないが硝酸、プリン、アミノ酸、および/またはアミドのような二次的窒素源は成長に利用可能である条件下で、同等に誘発される。そのような誘発条件下では、crnA誘発により、環境からの窒素の取込みが促進される。次に、niaDによってコードされる硝酸レダクターゼの発現により、硝酸が亜硝酸に変換され、その後、niiAによってコードされる亜硝酸レダクターゼにより、アンモニウムに変換される。ノーザン分析によれば、3つの各硝酸同化遺伝子は、硝酸の存在下で誘発され、アンモニウムにより劇的に抑制されることが示唆される(Amaar et al. 1998 Curr Genet 33(3): 206-15)。従って

、硝酸を含有する培地上でのプロモーター置換株の増殖(誘発条件)とアンモニウムが唯一の窒素源である培地上での増殖と、を比較することにより、試験対象の遺伝子の必須性を決定することが可能である。

【０１９９】

このほかのさらなる実施形態では、本発明は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において遺伝子の条件発現を行って遺伝子必須性を決定するのに用いられるプロモーター置換カセットを構築するための、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigauts)の他の調節性内因性プロモーターの使用に関する。該プロモーターとしては、ADH1、GAL1-10、MAL2、MET3、MET25、PCK1、およびPH05(www. stanford. edu/Saccharomyces)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの例のいずれにおいても、これらのプロモーターの調節がS.セレビシエ(S.cerevisisae)において厳密な制御下に置かれていることが実証されている。これらの各遺伝子のオーソログをアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において同定した。したがって、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)オーソログで同定された各遺伝子のプロモーター配列を用いて、標準的分子生物学的方法によりプロモーター置換カセットを構築することが可能である。A.フミガーツス(A.fumigatus)の近縁種(たとえば、A.ニガー(A. niger)、A.ニドランス(A. nidulans)、およびA.パラシチクス(A.parasiticus)が挙げられるが、これらに限定されるものではない)において見いだされる、以上に列挙した調節されているS.セレビシエ(S.cerevisiae)遺伝子のオーソログもまた、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において保存された調節を呈する可能性があり、そのためそれはアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)におけるプロモーター置換ベースの必須遺伝子決定にも好適であろう。同様に、A.フミガーツス(A.fumigatus)などの他のアスペルギルス(Aspergillus)において見いだされるプロモーター(たとえば、A.ニガー(A. niger)glaAならびにA.ニドランス(A. nidulans)alcAおよびaldAプロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない)を、本発明の本方法で使用することも可能である。たとえば、A.ニガー(A. niger)glaA遺伝子の3つの相同体を含む遺伝子ファミリーをアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において同定した。これらの各AfglaA遺伝子を調節するプロモーターは、遺伝子必須性を決定するためのプロモーター置換法に使用することが可能である。次に、調節性プロモーターを含有する置換カセットを用いてA.フミガーツス(A.fumigatus)において形質転換および正確なプロモーター置換を行うことにより、調べようとしている増殖表現型を示す遺伝子の条件発現を確立することが可能である。遺伝子必須性は、A.フミガーツス(A.fumigatus)プロモーター置換株の構築に使用した条件発現プロモーターを特異的に誘導または抑制する条件下で、増殖を比較することにより決定される。

【０２００】

標的遺伝子アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)HIS3およびアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子の改変型アレルを構築するために使用される本発明の方法の特定の適用列については、以下の第6.2節および第6.10節で説明する。

【０２０１】

本発明の他の実施形態では、条件プロモーターに依拠しない他の手段により、条件発現を達成する。たとえば、in vitroで誘導した温度感受性アレルで野生型アレルを置換することにより、条件発現を達成することが可能である。この場合には、その表現型を非許容温度で分析する。関連する方法では、活性化条件下でコード化遺伝子産物を不安定化させるようにユビキチン化シグナルをアレルに挿入し、遺伝子不活性化の結果として生じる表現型の変化を調べることができる。まとめると、これらの例により、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子を破壊し、本明細書に開示された方法を用いて条件調節することのできる方法が具体的に示される。

【０２０２】

本発明の他の実施形態では、切除可能なトランスアクチベーターにより調節される構成

プロモーターを利用することができる。該プロモーターは標的遺伝子の上流に配置され、該プロモーターに特有の基底レベルにまで発現を抑制する。たとえば、真菌細胞において、lexAオペレーターエレメントを含有する異種プロモーターを、lexA DNA結合ドメインおよびなんらかの転写アクチベータードメイン（たとえば、GAL4、HAP4、VP16）からなる融合タンパク質と組合せて使用することにより、標的遺伝子の構成的発現を引き起こすことが可能である。5-FOAにより媒介される対抗選択を利用して、融合タンパク質をコードする遺伝子が切除された細胞を選択することができる。この方法を用いれば、機能性転写アクチベーターの不在下で標的遺伝子の発現をlexA異種プロモーターによりもたらされる基底レベルまで抑制することと関連づけられるその表現型を調べることができる。この方法により生成された条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株は、以下の章で詳述する薬剤標的の確認に利用できる。この系では、異種プロモーターに関連づけられる低い基底レベルの発現が重要である。このように、この代替的シャットオフシステムを標的の確認にさらに役立つようにするには、プロモーターの発現の基底レベルは低いほうが好ましい。

【０２０３】

他の選択肢として、DNA結合性転写アクチベータードメインを含有するトランスアクチベーターを用いることなく、標的遺伝子の条件発現を達成することができる。標的遺伝子の5’部分に相同的な配列を含有するダイレクトリピートをフランキングさせたPYRG選択マーカーなどの下流に異種構成プロモーターが組込まれるように、カセットを組み立てることができる。このカセットに対して、標的の上流に相同配列をさらに追加して配置すれば、標的遺伝子またはオープンリーディングフレームの開始コドンのすぐ上流における上記異種プロモーターカセットによる天然プロモーターの相同的組換えおよび置換が促進されるであろう。異種構成プロモーターおよびPYRGマーカーが組込まれたウラシル原栄養性株を適切な培地で選択し、得られた株の増殖を同一条件下で増殖させた野生型株と対比して調べることにより、条件発現が達成される。続いて、5-FOA耐性株を選択してPYRGマーカーおよび異種構成プロモーターが欠如した分離株を取得すれば、標的遺伝子を発現させるためのプロモーターが欠如している得られた株の増殖と、同一条件下で培養された野生型株の増殖との比較が可能になる。

【０２０４】

5.3 必須遺伝子の同定および確認

5.3.1 標的遺伝子

標的探索は、以前からコストと時間のかかるプロセスであった。そのようなプロセスでは、好適な薬剤標的としての可能性に関して、新たに同定された遺伝子および遺伝子産物が個別に分析されてきた。全ゲノムのDNA配列解析は、遺伝子探索プロセスを著しく加速した。このことから、この情報を解析するために、まず当該生物の遺伝子をすべて同定し、次に、有効な無毒の薬物を探索するのに適した標的である産物をコードしているのはどの遺伝子かを見分ける上で、新しい方法およびツールが必要とされている。配列解析のみによる遺伝子探索では、公知または新規の遺伝子が薬剤標的であるかを確認することができない。遺伝子の機能を根本から解明し、遺伝子が必須遺伝子であるかどうかを決定することが、依然として、適切な薬物標的を同定するうえで本質的な障害となっている。

【０２０５】

先に述べたように、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)は、ヒトの主要な真菌病原体である。この生物において同定された特異的で感受性の高い特有の薬剤標的が欠如していることが、臨床用途に有効な無毒の化合物を開発するうえで障害となっている。アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)ゲノムの網羅的DNA配列解析が最近完了したため、新しい抗真菌薬物標的を同定しようとする取組みが復活した。それにもかかわらず、この情報を有用な薬剤標的の開発に利用するうえで、2つの主要な障害が依然として存在する。すなわち、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)において遺伝子操作を行うのに適したマーカーが不足していること、および特定の遺伝子が必須産物をコードしているかを確定することが本質的に困難であること、が

障害となっている。

【０２０６】

アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の単一または複数の突然変異体を産生するために、いくつかのストラテジーが利用できる。古典的方法では、抗生物質耐性遺伝子の挿入により対象の遺伝子を破壊する。2つの遺伝子、すなわち、ハイグロマイシン耐性を付与する遺伝子およびフレオマイシン耐性を付与する遺伝子が、一般に用いられてきた(Mattern et al., 1988, Fungal Genet. Newsl. 35:25; Punt et al., 1987, Gene 56:117-124)。それらは、GPDプロモーター、またはA.ニドランス(A. nidulans)のTRP Cターミネーター、あるいは破壊に付される遺伝子のプロモーターおよびターミネーターのいずれかの制御下に配置される。破壊は、通常、外部汚染を回避するために硝酸レダクターゼの欠損した遺伝的バックグラウンドで行われる。しかしながら、これらのシステムでは、2回の逐次的突然変異が起こるにすぎないこともある。この欠点を補うために、PYRG blasterが開発されている(d'Enfert, 1996, Curr. Genet. 30:76-82)。このシステムは、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)およびカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)ですでに開発されているURA blasterと非常によく似たものである。このシステムは、Tn5のネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードするダイレクトリピートでフランキングされたアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)PYRG遺伝子からなる。このカセットはまた、置換または挿入不活性化の対象となる標的遺伝子に対応するフランキング配列を含んでいてもよい。PYRGカセットは、ウリジン/ウラシル独立栄養性PYRG株の形質転換に続くゲノム中への遺伝子の置換または異所挿入により挿入され、挿入または置換の結果として、突然変異アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)が生成される。アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)PYRG遺伝子を含むカセットの切除は、5-フルオロオロト酸の存在下で選択される。その結果、ダイレクトリピートの１コピーがPYRG blasterカセットの挿入部位に保持されるので、突然変異表現型を保持するA.フミガーツス(A.fumigatus)ウリジン/ウラシル栄養要求体が得られる。ウリジン/ウラシル原栄養性の選択は、他の遺伝子を破壊するためにも使用することができる。形質転換は、プロトプラストを用いてまたはエレクトロポレーションにより行うことができる(Brown et. al, 1998 Mol. Gen. Genet. 259:327-335 ; Werdneretal., 1998, Curr. Genet. 33:378-385)。PYRG blasterカセットが、置換の対象となる遺伝子に対応するフランキング配列を有する場合、相同的組換えによりその遺伝子の正確な置換を行うことができる。推定上の形質転換体は、ウラシル原栄養体として選択され、その同一性および染色体構造は、サザンブロット分析およびPCR分析により確認される。

【０２０７】

しかしながら、必須遺伝子が欠失または挿入不活性化された突然変異体(本明細書中では、まとめて「ノックアウト突然変異体」と呼ぶ)は、生存できないであろう。したがって、PYRG blaster法では、標的遺伝子に固有の性質を確定するにたる明確な結果は得られないであろう。なぜなら、ネガティブな結果が得られた場合にも、生存可能な突然変異株の不十分な成長が関連した代替的な説明を同じように行いうるからである。さらに、標的遺伝子が重複している場合または標的遺伝子と同一の生化学的機能を有する遺伝子産物をコードするパラログが存在する場合、PYRG blaster法では明確な結果は得られないであろう。したがって、そのような方法は、労力がかかりすぎてゲノムワイドな分析には適さない。

【０２０８】

最後に、PYRG blaster法は、遺伝子の必須性を直接実証するうえで障害になる。したがって、必須標的遺伝子に特有な最終表現型を厳密に評価することはできない。結論としては、確認された薬剤標的遺伝子の不活性化が細胞死(すなわち、死滅性最終表現型)をもたらすか増殖阻害(すなわち、静止性最終表現型)をもたらすかを確定することは、薬剤開発における適合性について薬剤標的に優先順位をつける上でそのような情報が有用であるにもかかわらず、現在の手法によっては不可能である。

【０２０９】

明らかに、現在の遺伝子破壊法は多大な労力がかかり、標的確認のための高スループットストラテジーに向いていないので、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の必須遺伝子を明確に、迅速に、かつ正確に同定するのに有効な方法およびツールが必要とされる。本発明は、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子、該遺伝子のヌクレオチド配列、コードされた遺伝子産物の同定を提供して、薬剤標的の迅速な同定、確認、および優先順位づけを行える、つまり、薬剤スクリーニングを加速する、高スループットストラテジーを可能にすることにより、現在の薬剤探索法におけるこれらの制約を克服する。

【０２１０】

5.3.2 薬剤標的をコードする遺伝子の確認

標的遺伝子の確認とは、その遺伝子産物の機能または構造のモジュレーターを見いだすために、遺伝子産物を同定してスクリーニング法またはアッセイで使用するのに適しているかを調べるプロセスを指す。しかしながら、薬剤スクリーニングの標的として遺伝子産物の確認を行うのに使用される判定基準は、保護の対象となる宿主に依存するだけでなく、探索の対象となる化合物が有する所望の作用様式にも依存して、異なる可能性がある。

【０２１１】

本発明の一態様において、改変された必須遺伝子を有する条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株を、薬剤スクリーニングに直接使用することができる。他の態様において、ヌクレオチド配列比較などにより必須遺伝子の最初のセットをさらに特性づけることにより、真菌に特異的な遺伝子だけを含む必須遺伝子のサブセット、すなわち、病原体の宿主たとえばヒトにおいて相同体をもたない必須遺伝子産物をコードする遺伝子のサブセットを同定する。ヒトの真菌性病原体の遺伝子のそのようなサブセットのモジュレーター、好ましくは阻害剤は、ヒトを治療するために使用した場合、有毒な副作用を有する可能性がきわめて低いと予測される。

【０２１２】

同様に、1種以上の宿主種(たとえば、哺乳動物種)における相同配列をもたない改変遺伝子を有する条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株だけが含まれるように、より大きい必須遺伝子セットの他のサブセットを規定することにより、獣医学的用途での使用が期待される化合物を検出することが可能である。このほか、他の相同性判定基準を用いて、条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株のサブセットを同定し、それを用いて、抑制標的である農作物の病原体に対して活性がありかつ保護の対象となる作物における相同体をもたない抗真菌性化合物を検出する。

【０２１３】

現在のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigauts)遺伝子破壊ストラテジーでは、非必須遺伝子が同定されるので、ヌル突然変異体が生成されないことに基づいて他の遺伝子が必須であるという推論を行うことは可能である。薬剤標的がヌル表現型であれば、この標的に作用する「完全な」薬剤の絶対的効能を予測することができる。たとえば、特定の薬剤標的について死滅性(細胞死)ヌル最終表現型と静止性(成長阻害)ヌル最終表現型との差異。

【０２１４】

たとえば、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)では、フルコナゾールの薬剤標的であるCaERG11の遺伝子破壊は、URA blaster法を用いてホモ接合CaERG11欠失株の構築ができないことから、必須性があると推定される。しかしながら、病原体において、そのヌル表現型が死滅性であるか静止性であるかの直接的評価を行うことはできなかった。薬剤およびおそらく薬剤標的の両方について死滅性でなく静止性であることを生化学的に決定することができるようになったのは、フルコナゾールが発見された後である。功を奏したフルコナゾールは売れ行きが好調であるにもかかわらず、その静真菌作用様式が原因で、大きな制約が課せられる。すなわち、長期治療の後、薬剤耐性が現れる。したがって、このたび初めて、病原体内で確認された薬剤標的の死滅性ヌル表現型を本発明により同定

および評価することができるようになったので、殺真菌作用様式を特異的に示す抗真菌性薬剤を同定する目的にかなったストラテジーが提供される。

【０２１５】

必須遺伝子を含む単一の条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株または条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株の所望のコレクションを用いて、1つ以上の標的遺伝子について死滅性ヌル表現型であるか静止性ヌル表現型であるかを直接評価することができる。最初に、改変遺伝子を条件発現させるための抑制条件下でさまざまな時間にわたり液体培養により条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株をインキュベートし、抑制を軽減する成長条件で特定数の細胞をプレーティングしてから生存細胞のパーセントを測定することにより、上記の評価を確定する。非抑制条件に戻した後で残った生存細胞のパーセントは、死滅性表現型(低パーセントの生存率)であるか静止性表現型(高パーセントの生存率)であるかを表す。他の選択肢として、メチレンブルーまたはヨウ化プロピジウムのような生体染色染料を用いて、抑制条件下vs誘発条件下における特定の株の細胞の生存パーセントを定量することが可能である。公知の殺真菌性薬剤標的が条件発現アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株の株コレクションに含まれるので、この標準的殺真菌性薬剤標的と薬剤標的セットを構成する新規な標的と比較をすることができる。このようにして、標的セットの各メンバーを業界標準の死滅性薬剤標的と対比して迅速にランクづけし優先順位をつけることにより、最も迅速に作用する死滅性化合物を同定するための適切な薬剤標的およびスクリーニングアッセイを選択することができる。したがって、好ましい実施形態では、本発明の必須遺伝子の突然変異により、細胞に急速死滅性表現型を付与する。

【０２１６】

本発明の一実施形態では、以下の第6.2節に記載されているように、標的遺伝子のプロモーターをアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)グルコアミラーゼプロモーターPgla Aで置換する。アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)Pgla Aプロモーターは、マルトースの存在下で誘発され、キシロースの存在下で抑制され、グルコースの存在下またはマルトースとキシロースとの混合物の存在下で成長させた細胞では中間の発現レベルを呈する。したがって、成長培地中のマルトースおよび/またはキシロースのレベルを調整することにより、標的遺伝子からの転写量が決定される。アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)のグルコアミラーゼプロモーターPglaAのヌクレオチド配列は、特性づけされており(Verdoes et al., Gene 145:179-187(1994)。参照によりその全体が組み入れられるものとする)、PglaAのヌクレオチド配列は、EMBL Data Libraryなどの公的データベースから、アクセッション番号Z30918で入手可能である。

【０２１７】

5.4 スクリーニングアッセイ

標的遺伝子産物、該標的遺伝子産物と相互作用する他の細胞タンパク質、および該標的遺伝子産物と他の細胞タンパク質との相互作用に干渉する化合物、に結合する化合物を同定するために、後述のアッセイを設計した。かかる方法を介して同定される化合物には、本発明の標的遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性をモジュレートする（つまり、該化合物の非存在下で観察される該ポリペプチドの活性と比較して、その活性を高めるかまたは低下させる）化合物が含まれている可能性がある。あるいは、かかる方法を介して同定される化合物には、該ポリヌクレオチドの発現をモジュレートする（つまり、該化合物の非存在下で観察される該ポリヌクレオチドの発現レベルと比較して、その発現を高めるかまたは低下させる）化合物、または該ポリヌクレオチドによってコードされる発現産物の安定性を高めるかまたは弱める化合物が含まれている可能性がある。化合物、例えば本発明の方法を介して同定された化合物を、当業者に周知の標準的なアッセイを使用し、活性／発現をモジュレートするその能力について試験することができる。

【０２１８】

従って、本発明は、複数の化合物をスクリーニングして遺伝子産物の活性またはレベル

をモジュレートする化合物を同定することを含む抗真菌化合物の同定方法を提供するものであり、該遺伝子産物は配列番号2001～2594および7001～7603からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子産物、ならびにアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）で発現される場合にはそのゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603によってコードされる遺伝子産物、またはサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）もしくはカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）に天然に存在するヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子産物、ならびに配列番号2001～2594および7001～7603とからなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の相同分子種であるヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子産物である。

【０２１９】

5.4.1 in vitroスクリーニングアッセイ

本発明の標的遺伝子産物と結合しうる化合物を同定するために、in vitro系を設計する。この様式で同定される化合物は、例えば野生型および／または突然変異型標的遺伝子産物の活性をモジュレートする際に有用であり、また標的遺伝子産物の生物学的機能を解明する際に有用であって、正常な標的遺伝子産物の相互作用を混乱させる(disrupt)その他の化合物を同定するためのスクリーニング手段にて使用されるか、またはそれらの化合物自体がかかる相互作用を混乱させる際に有用である。

【０２２０】

前記標的遺伝子産物と結合する化合物を同定するために使用する本アッセイの原理は、前記標的遺伝子と試験化合物とを含む反応混合物を、これら２つの成分が相互作用して結合するのに十分な条件と時間の下で調製し、その結果該反応混合物から取り出されかつ／または検出される複合体を形成させること、に関する。これらのアッセイを様々なやり方で実施する。例えばある方法は、標的遺伝子産物または試験物質を固相上に固定し、さらに分子間結合反応を介して該固相に固定された標的遺伝子産物／試験化合物複合体をこの反応の終了時に検出することを含む。かかる方法の１実施形態では、該標的遺伝子産物は固相表面上に固定されており、また該試験化合物は固定されておらず、直接的または間接的に標識されている。

【０２２１】

実際には、マイクロタイタープレートを前記固相として利用すると都合が良い。固定された成分は非共有結合または共有結合によって固定化されている。非共有結合は、該固相表面をタンパク質溶液で被膜し、この被膜表面を乾燥させることによって容易に達成できる。あるいは、固定化した抗体、好ましくは固定化しようとするタンパク質に特異的なモノクローナル抗体を使用して該タンパク質を該固相表面に固定する。該表面は予め調製し、保存しておく。

【０２２２】

前記アッセイを実施するために、前記の固定された成分を含有する前記被膜表面に固定化されていない成分を加える。反応終了後、形成された全ての複合体が前記固相表面上に固定化されたまま残るような条件下で、未反応成分を（例えば洗浄により）取り除く。該固相表面上に固定された複合体の検出は、幾つかのやり方で達成される。予め固定化されていない成分が前標識されている場合、該表面上で固定化された標識が検出されるということは、複合体が形成されたことを示唆する。予め固定化されていない成分が前標識されていない場合、間接標識を使用し、例えばこの予め固定化されていない成分に特異的な標識抗体（該抗体も同様に、直接標識されているか、または標識抗Ig抗体で間接的に標識されている）を用いて、該表面上に固定された複合体を検出する。

【０２２３】

あるいは、液相にて反応を実施し、反応生成物を未反応成分から分離し、その後例えば、溶液中に形成された複合体を固定するための前記標的遺伝子産物または前記試験化合物に特異的な固定化抗体、および固定された複合体の検出を可能にするための該複合体中のその他の成分に特異的な第２の標識抗体を使用することにより、該複合体を検出する。

【０２２４】

5.4.1.1標的遺伝子産物と相互作用するタンパク質のためのアッセイ

タンパク質間相互作用の検出に適したいずれの方法も、新規標的タンパク質と細胞内または細胞外タンパク質との相互作用を同定する際に使用できる。

【０２２５】

本発明の標的遺伝子産物は、in vivoで、１以上の細胞内または細胞外巨大分子、例えばタンパク質と相互作用する。かかる巨大分子としては、限定するものではないが、上記方法などを介して同定される核酸分子およびタンパク質が挙げられる。これについて議論するため、かかる細胞内および細胞外巨大分子を本明細書中では「結合パートナー」と呼ぶことにする。前記相互作用を混乱させる化合物は、標的遺伝子タンパク質、特に突然変異型標的遺伝子タンパク質の活性を調節する際に有用となりうる。このような化合物としては、限定するものではないが、上記の抗体、ペプチドなどの分子が挙げられる。

【０２２６】

前記標的遺伝子産物とその単数または複数の細胞内もしくは細胞外結合パートナーとの相互作用に干渉する化合物を同定するために使用する本アッセイ系の基本原理は、該標的遺伝子産物と該結合パートナーとを含有する反応混合物をこれら２つの成分が相互作用して結合するのに十分な条件と時間の下で調製し、その結果複合体を形成させること、に関する。化合物をその阻害活性について試験するために、該反応混合物を該試験化合物の存在下または非存在下で調製する。該試験化合物は初めから該反応混合物中に含まれているか、または該標的遺伝子産物およびその細胞内もしくは細胞外結合パートナーを加えた後に加える。対照反応混合物は該試験化合物抜きでインキュベートする。その後該標的遺伝子タンパク質と該細胞内または細胞外結合パートナーとの複合体の形成を検出する。該試験化合物含有反応混合物中ではなく該対照反応中で複合体が形成される場合、該化合物が該標的遺伝子タンパク質とその相互作用性結合パートナーとの相互作用に干渉することが示唆される。さらに、該試験化合物および正常な標的遺伝子タンパク質を含有する反応混合物中での複合体形成を、該試験化合物および突然変異型標的遺伝子タンパク質を含有する反応混合物中での複合体形成と比較することもできる。正常な標的遺伝子タンパク質ではなく突然変異体を必要とする分子間相互作用を混乱させる化合物を同定することが望ましい場合、この比較は重要であろう。

【０２２７】

前記標的遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用に干渉する化合物についてのアッセイを、異種または同種フォーマットのいずれかにおいて実施する。異種アッセイは該標的遺伝子産物または該結合パートナーのいずれかを固相上に固定し、さらに反応の終結時に該固相上に固定された複合体を検出することを含む。同種アッセイでは、全反応を液相中で実行する。どちらのアプローチでも、反応物質の添加順序を変更することによって試験しようとする化合物についての異なる情報が得られる。例えば、該標的遺伝子産物と該結合パートナーとの間の相互作用に、例えば競合によって干渉する試験化合物は、この試験物質の存在下で前記反応を実施することにより、すなわち該標的遺伝子タンパク質およびこれと相互作用する細胞内もしくは細胞外結合パートナーより先に、またはこれらと同時に該試験物質を反応混合物に加えることにより、同定される。あるいは、既に形成された複合体を破壊する試験化合物、例えば該複合体中の成分のうちの1つと置き換わる、より高い結合定数をもつ化合物を、複合体が形成された後の反応混合物中に該試験化合物を加えることによって試験する。様々なフォーマットについて以下に簡単に記載する。

【０２２８】

異種アッセイ系では、前記標的遺伝子タンパク質またはその相互作用性細胞内または細胞外結合パートナーのいずれかを固相表面上に固定し、その一方で固定されていない化学種を直接的または間接的に標識する。実際には、マイクロタイタープレートを使用すると都合が良い。固定された化学種を非共有結合または共有結合によって固定化する。非共有結合は、前記固相表面を前記標的遺伝子産物または前記結合パートナーの溶液で被膜し、この被膜表面を乾燥させることによって容易に達成される。あるいは、固定しようとする

化学種に特異的な固定化抗体を使用して、該化学種を該固相表面上に固定する。該表面は予め調製して保存しておくことができる。

【０２２９】

前記アッセイを実施するために、前記で固定化した化学種のパートナーを前記試験化合物と共に、または該化合物抜きで前記被膜表面に曝す。反応終了後、未反応の成分を（例えば洗浄により）取り除くが、形成された全ての複合体は前記固相表面上に固定化されたまま残るだろう。該固相表面に固定された複合体の検出を、幾つかのやり方で達成する。固定化されていない化学種が前標識されている場合、該表面上で固定化された標識が検出されるということは、複合体が形成されたことを示唆する。固定化されていない化学種が前標識されていない場合、間接標識を使用して、例えば最初に固定化されていない化学種に特異的な標識抗体（該抗体も同様に、直接標識されているか、または標識抗Ig抗体で間接的に標識されている）を用いて、該表面上に固定された複合体を検出することができる。反応成分を加える順番に応じて、複合体形成を阻害するかまたは既に形成された複合体を破壊する試験化合物が検出される。

【０２３０】

あるいは、前記反応を液相中にて、前記試験化合物、未反応成分から分離した反応生成物、および検出される複合体の存在下または非存在下、例えば溶液中に形成された全ての複合体を固定するための結合成分のうちの１つに特異的な固定化抗体およびその固定された複合体を検出するためのもう一方のパートナーに特異的な第２の標識抗体を用いて、実施する。ここでもやはり、該液相に反応物質を加える順番に応じて、複合体を阻害するかまたは既に形成された複合体を破壊する試験化合物が同定される。

【０２３１】

本発明の代替的実施形態では、同種アッセイを使用することができる。このアプローチでは、前記標的遺伝子タンパク質とそれに相互作用する前記細胞内または細胞外結合パートナーとの間で予め形成された複合体を調製する。該複合体中では、該標的遺伝子産物またはその結合パートナーのいずれかが標識されているが、該標識により生成されるシグナルは複合体形成により消失している（例えば、該アプローチをイムノアッセイに利用している、Rubensteinによる米国特許第4,109,496号を参照されたい）。予め形成された複合体中の化学種の１つと競合しかつ置き換わる試験物質を加えることにより、バックグラウンドを超えるシグナルが生成する。このようにして、標的遺伝子タンパク質／細胞内または細胞外結合パートナー相互作用を混乱させる試験物質が同定される。

【０２３２】

特定の実施形態では、上記の組換えDNA技術を用いて固定化するための前記標的遺伝子産物を調製する。例えば、該標的遺伝子のコード領域を、結果として生じる融合タンパク質においてその結合活性が維持されるような様式でpGEX-5X-1などの融合ベクターを用いてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）遺伝子に融合する。当分野で慣例的に行われている上記方法を用いて、前記相互作用性細胞内または細胞外結合パートナーを精製し、これを使用してモノクローナル抗体を作製する。この抗体を、例えば当分野で慣例的に行われている方法によって、放射性同位体^{125}Iで標識する。異種アッセイでは、例えば前記GST-標的遺伝子融合タンパク質をグルタチオン-アガロースビーズに固定する。次に、前記試験化合物の存在下または非存在下において、相互作用および結合が起こりうる様式で前記相互作用性細胞内または細胞外結合パートナーを加える。反応期間の終了時に結合していない材料を洗い流すことができ、標識モノクローナル抗体をこの系に加えて複合体成分と結合させる。前記標的遺伝子タンパク質と前記相互作用性細胞内または細胞外結合パートナーとの相互作用を、グルタチオン-アガロースビーズに結合したまま維持されている放射能の量を測定することにより検出する。該試験化合物による該相互作用の阻害が上手くいくと、測定される放射能が減少する。

【０２３３】

あるいは、前記GST-標的遺伝子融合タンパク質と前記相互作用性細胞内または細胞外結合パートナーとを、前記固相グルタチオン-アガロースビーズ非存在下にて、液相中で混

合する。これらの化学種を相互作用させている最中に、または相互作用後に前記試験化合物を加える。この混合物をグルタチオン-アガロースビーズに加え、結合しない材料を洗い流す。この場合もやはり、前記標的遺伝子産物／結合パートナー相互作用の阻害程度を前記標識抗体を加えることによって検出し、該ビーズに結合している放射能を測定する。

【０２３４】

本発明の別の実施形態では前記と同じ技術を採用するが、ここでは前記標的遺伝子産物および／または前記相互作用性細胞内もしくは細胞外結合パートナー（該結合パートナーがタンパク質である場合）の結合ドメインに相当するペプチド断片を、それらの全長タンパク質の一方または両方の代わりに使用する。当分野で慣例的に行われているかなり多くの方法が、その結合部位を同定し、単離するために使用される。これらの方法には、限定するものではないが、それらのタンパク質のうちの１つをコードする遺伝子の突然変異誘発および免疫共沈降アッセイにおける結合の破壊についてのスクリーニングが含まれる。その後、前記複合体中の第２の化学種をコードする遺伝子において代償性突然変異が選択される。これらのタンパク質各々をコードする遺伝子の配列分析により、相互作用による結合に関わる該タンパク質の領域に相当する突然変異が明らかとなる。あるいは、一方のタンパク質を上記方法を用いて固相表面上に固定し、トリプシンなどのタンパク質分解酵素で処理しておいたその標識結合パートナーと相互作用させてこれに結合させる。洗浄後、結合ドメインを含む短い標識ペプチドは該固相材料に結合したまま残るので、これを単離してアミノ酸配列分析により同定することができる。また、前記細胞内または細胞外結合パートナーをコードする遺伝子を得た後は、短い遺伝子セグメントを遺伝子操作してこのタンパク質のペプチド断片を発現させて、該断片をその結合活性について試験し、その後精製または合成する。

【０２３５】

例えば、限定するつもりは無いが、上記した通りにGST-標的遺伝子融合タンパク質を作製し、これをグルタチオン-アガロースビーズに結合させることによって、標的遺伝子産物を固相材料に固定する。前記相互作用性細胞内または細胞外結合パートナーを^{35}Sなどの放射性同位体で標識し、これをトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いて切断する。切断生成物を前記の固定されたGST-標的遺伝子融合タンパク質に加えて結合させる。結合していないペプチドを洗い流した後、前記細胞内または細胞外結合パートナー結合ドメインに相当する標識結合材料を溶出させてこれを精製し、次いでアミノ酸配列について周知の方法により分析する。このようにして同定したペプチドを合成により製造するか、または周知の組換えDNA技術を用いて適切な促通性タンパク質（facilitative proteins）に融合する。

【０２３６】

5.4.1.2　コンビナトリアル化学ライブラリーのスクリーニング

本発明の１実施形態では、本発明の方法を用いて同定した真菌遺伝子によってコードされるタンパク質を単離し、発現させる。次に、これらの組換えタンパク質をアッセイにおける標的として使用して、潜在的な薬剤候補について化合物ライブラリーをスクリーニングする。この化学ライブラリーの作製方法は当分野で周知である。例えば、コンビナトリアル化学を用いて、本明細書中に記載のアッセイにおいてスクリーニングしようとする化合物のライブラリーを作製する。コンビナトリアル化学ライブラリーは、化学的合成または生物学的合成のいずれかにより、多くの化学的「構成単位（building block）」試薬を組み合わせて作製される様々な化学的化合物の集合体である。例えば、複数のアミノ酸を考えられる全ての組み合わせにて結合し、その結果一定の長さを有するペプチドを生じさせることにより、ポリペプチドライブラリーなどの線状コンビナトリアル化学ライブラリーを形成する。理論的には、こうした化学構成単位の組み合わせによる混合を介して、無数の化学的化合物を合成することができる。例えば、ある業界関係者の意見によれば、100個の互換性化学構成単位の合成、すなわち組み合わせによる混合の結果、理論上１億個の４量体化合物または100億個の５量体化合物が得られる（Gallopら、“Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery, Background and Peptide Combinator

ial Libraries”, Journal of Medicinal Chemistry, Vol.37, No.9, 1233-1250(1994))。天然産物のライブラリーを含め、当分野で公知の他の化学ライブラリーを使用することもできる。

【０２３７】

コンビナトリアルライブラリーを作製した後は、これを所望の生物学的特性を有する化合物についてスクリーニングする。例えば薬剤として、または薬剤を開発するために有用だと思われる化合物は、上記で論じたように同定し、発現しかつ精製する前記標的タンパク質と結合する能力を有する可能性がある。さらに、同定された該標的タンパク質が酵素である場合、候補化合物は該標的タンパク質の酵素特性に干渉する可能性がある。例えば、該標的タンパク質の酵素機能とは、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、デヒドロゲナーゼ、トランスポータータンパク質、転写酵素、複製成分、および他の公知または未知のタイプの酵素として働くことかもしれない。従って、本発明は、上記のタンパク質産物を用いてコンビナトリアル化学ライブラリーをスクリーニングすることを包含する。

【０２３８】

本発明の幾つかの実施形態においては、前記タンパク質の生化学的活性ならびに該タンパク質が作用する基質の化学構造は公知である。本発明の他の実施形態では、該標的タンパク質の生化学的活性は未知であり、また該標的タンパク質の基質として知られているものはない。

【０２３９】

本発明の幾つかの実施形態においては、化合物ライブラリーをスクリーニングして前記標的遺伝子産物の阻害物質として機能する化合物を同定する。まず最初に、小分子からなるライブラリーを当分野で周知のコンビナトリアルライブラリー作製方法を用いて作製する（Agrafiotisらに付与された米国特許第5,463,564号および第5,574,656号（発明の名称は“System and Method of Automatically Generating Chemical Compounds with Desired Properties”を参照されたい。これらの文献の開示内容は、引用によりその全内容が本明細書に含まれるものとし、これらの2つの文献は前記手法を教示する）。次に、前記ライブラリーの化合物をスクリーニングして、所望の構造および機能特性を持つ化合物を同定する（米国特許第5,684,711号を参照されたい。この文献の開示内容は引用によりその全内容が本明細書に含まれるものとし、該文献中でもライブラリーのスクリーニング方法について論じられている）。

【０２４０】

前記スクリーニング手順を例示するため、前記標的遺伝子産物、すなわち酵素、および前記ライブラリーの化学的化合物を混合して互いに相互作用させる。標識した基質をインキュベーションに加える。該基質上の標識は、代謝された基質分子から検出可能なシグナルを放出するような標識とする。このシグナルが放出されると、該シグナルをコンビナトリアルライブラリーの化合物非存在下で放出されるシグナルと比較することにより、該コンビナトリアルライブラリーの化合物が標的酵素の酵素活性に及ぼす効果を測定できるようになる。各ライブラリーの化合物の特性は符号化されているため、前記酵素に対して活性を示した化合物を分析することができ、また同定された様々な化合物に共通する特徴を抜き出して、これを今後のライブラリー反復時に併せて利用することができる。

【０２４１】

化合物ライブラリーをスクリーニングした後は、第1回目のスクリーニング時に前記標的酵素に対する活性を持つことが示されたその特徴を有する化学構造単位を用いて、次のライブラリーを作製する。この方法を用いると、次の反復で得られる候補化合物は該標的酵素の機能を阻害するのに必要な構造的および機能的特徴を有する可能性が高くなり、最終的には該酵素に対して高い特異性を示す１群の酵素阻害物質を見出すことができる。次いでこれらの化合物を哺乳動物において使用するために、抗生物質としての安全性と有効性についてさらに試験することができる。

【０２４２】

この特定のスクリーニング方法が典型例に過ぎないことは容易に理解されよう。他の複数の方法が当業者に周知である。例えば、標的タンパク質の生化学的機能が公知である場合には、こうした天然に存在する多くの標的についての広範なスクリーニング技術が知られている。例えば、幾つかの技術は、薬剤リード物質を同定し開発するために標的タンパク質を探索しかつ生化学的および遺伝学的に分析するための小分子の作製および使用を含む。かかる技術としては、PCT国際公開第9935494号、第9819162号、第9954728号に記載された方法を挙げることができるが、これらの文献の開示内容は引用によりその全内容が本明細書に含まれるものとする。

【０２４３】

同様の方法を使用して、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）以外の生物から得られるタンパク質であるが、本明細書中に記載のカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）標的タンパク質との相同性を示す該タンパク質、の活性を阻害する化合物を同定することができる。例えば、該タンパク質は、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得られるタンパク質であってよい。幾つかの実施形態では、前記タンパク質はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）以外の生物から得られるものである。

【０２４４】

5.4.1.3 in vitro酵素アッセイ

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）株を使用して、例えばカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）の公知の必須遺伝子との相同性により、細胞の生存に必須であることが示された生化学的活性についてのin vitroアッセイを開発する。アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ゲノムの配列分析により同定されたこのような必須遺伝子の幾つかは、他の生物から得られる生化学的に特性決定された遺伝子産物との間に統計学的に有意な類似性を示す。例えば、アミノ酸配列の類似性に基づいて、表１に列挙した必須かつ真菌特異的な遺伝子の多くが公知の生化学的活性を有すると推定される。

【０２４５】

そのため、十分に特性決定された多くの標準in vitro生化学的アッセイ（例えば、DNA結合、RNAプロセシング、GTP結合および加水分解、ならびにリン酸化）を、こうした有効な薬剤標的に容易に適用することができる。あるいは、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の配列決定された遺伝子コレクション内の有効な薬剤標的に関する生化学的情報を用いて、新規アッセイを開発する。同様の生化学的活性（例えば作用機構、基質クラス）を有する酵素のための当分野で公知のいずれのアッセイも、これらアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子によってコードされる酵素の阻害物質についてスクリーニングするために適用される。

【０２４６】
本発明はまた、適切な生化学的標的用のin vitroアッセイを確立する際に有用な細胞抽出物を提供する。例えば、本発明のある実施形態では、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を構成的発現条件下または転写抑制条件下のいずれかにおいて成長させて、特定の遺伝子産物を過剰生産させるかまたは枯渇させる。これら２つの条件下でインキュベートした株から得られる細胞抽出物を、同一条件下で成長させた野生型株から調製した抽出物と比較する。次いで、既存のin vitroアッセイまたは新規遺伝子産物を対象とする新しいアッセイを用いて標的を迅速に評価するために、得られた遺伝子産物を精製する必要の無いこれらの抽出物を使用する。in vitroアッセイ開発のためのかかる全細胞抽出物アプローチは通常、分泌経路に移行してからその機能的活性に不可欠な必須翻訳後修飾を受ける複数の遺伝子産物を含む細胞壁生合成経路（例えば、(1,3)-β-グルカン合成またはキチン合成）に関与する標的のために必要とされる。これらの経路、または他の細胞壁経路（例えば(1,6)-β-グルカン合成）に関与する標的遺伝子を条件発現させるための条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株により、in vitroアッセイをアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)内で直接行うことが可能となる。
【０２４７】
5.4.2　細胞ベースのスクリーニングアッセイ
薬剤の探索および開発のための化合物を同定するかまたは特性決定する際に使用する現行の細胞ベースアッセイは、試験化合物が細胞内または細胞表面上に位置する標的分子の活性をモジュレートするその能力の検出に依存していることが多い。大抵の場合、かかる標的分子は酵素、受容体などのタンパク質である。しかし、標的分子にはDNA、脂質、炭水化物およびメッセンジャーRNA、リボソームRNA、tRNA等を含むRNAなどの他の分子も含まれる。当業者であれば、多くの高感度細胞ベースアッセイ法を利用して試験化合物と特定の標的分子との結合および相互作用を検出することができる。しかし、該試験化合物が中程度または低い親和性を有するその標的分子と結合または相互作用する場合、これらの方法は通常あまり有効ではない。加えて、該標的分子が細胞内部または細菌細胞のペリプラズムなどの細胞区分内に位置する場合などには、該標的分子は溶液中の試験化合物と容易に接触し得ないだろう。従って、現行の細胞ベースアッセイ法には、中程度から低い親和性を有する標的と相互作用する化合物または容易に接触し得ない標的と相互作用する化合物を同定するかまたは特性決定する場合には有効でないという点で制約がある。
【０２４８】
本発明の前記細胞ベースアッセイ法には、現行の細胞ベースアッセイよりも有利な点が数多くある。これらの利点は、真菌の生存、成長、増殖、毒性または病原性に不可欠な少なくとも１種の遺伝子産物（標的分子）のレベルまたは活性が、その機能が存在するかどうかが真菌の生存、成長、増殖、毒性または病原性の律速段階となる程度にまで特異的に低下している感作細胞を使用することに由来する。かかる感作細胞は、影響を受けた標的分子に対して活性を示す化合物に対してより高い感受性を示す。例えば、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物を、その機能が存在するかどうかが真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性の律速段階となるようなレベルで提供する濃度のインデューサーまたはリプレッサーの存在下で条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を成長させることにより、感作細胞を得る。従って、本発明の細胞ベースアッセイでは、対象とする標的分子に対して低いかまたは中程度の有効性を示す化合物を検出することができる。何故なら、かかる化合物は、感作細胞に対して非感作細胞よりも実質的により有効だからである。その効果を感作細胞について試験した場合と非感作細胞について試験した場合とで比較すると、試験化合物は２～数倍有効、少なくとも10倍有効、少なくとも20倍有効、少なくとも50倍有効、少なくとも100倍有効、少なくとも1000倍有効、または1000倍以上有効であるといえうる。
【０２４９】
一部には病原性微生物において抗生物質耐性を呈するものが増えたため、および現在使

用されている幾つかの抗生物質に伴う重大な副作用のために、新たな標的に作用する新規抗生物質が当分野で強く求められている。しかし、細胞ベースアッセイに関して現在の技術が受けるもう１つの制約として、同一の限定されたセットの生物学的経路内で同じ種類の標的分子に対するヒットを繰り返し同定してしまうという問題がある。この問題は、かかる新たな標的に作用する化合物が廃棄されるか、無視されるか、または検出され損ねた場合に生じうる。何故なら、「古い」標的に作用する化合物はより頻繁に該標的と出くわす上に、こうした化合物は新たな標的に作用する化合物よりも有効だからである。結果として、現在使用される抗生物質の大部分は、より限定されたセットの生物学的経路内で比較的少数の標的分子と相互作用する。

【０２５０】

本発明の感作細胞を使用することにより、上記問題に対して２通りの解決策を提供する。まず第１に、本発明の感作細胞上で試験すると所望の化合物の有効性が特異的かつ実質的に増大するため、「古い」標的に作用する化合物の「ノイズ」を上回るものであれば、新たな標的であれ既知ではあるが十分に開発されていない標的であれ、対象とするこうした標的に作用する所望の化合物を検出することができる。第２に、対象とする標的に作用する化合物に細胞を感作させる際に使用する本発明の方法により、同じ生物学的経路内の他の標的分子に作用する化合物にこれらの細胞を感作させることもできる。例えば、リボソームタンパク質をコードする遺伝子を、該リボソームタンパク質の機能が真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性の律速段階となるようなレベルで発現させることにより、そのリボソームタンパク質に作用する化合物、そのリボソーム成分（タンパク質もしくはrRNA）のいずれかに作用する化合物、またはさらに該タンパク質の合成経路の部分であるいずれかの標的に作用する化合物、に前記細胞が感作されるものと予想される。従って、本発明の重要な利点は、以前の薬剤探索方法では容易にアクセスできなかった新たな標的および経路を明らかにするその能力にある。

【０２５１】

本発明の感作細胞を、標的分子の活性またはレベルを低下させることによって調製する。該標的分子は、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な本明細書中に記載の核酸から産生されるRNAやポリペプチドなどの遺伝子産物でありうる。加えて、該標的は、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な本明細書中に記載の核酸と同じ生物学的経路内にあるRNAまたはポリペプチドでありうる。このような生物学的経路としては、限定するものではないが、酵素経路、生化学的経路および代謝経路ならびに細胞膜などの細胞構造の産生に関する経路が挙げられる。

【０２５２】

医薬品化学およびコンビナトリアル化学分野で採用される現在の方法では、直接結合アッセイおよび細胞ベースアッセイを含む様々な生物学的アッセイで化合物を試験して得られる構造‐活性相関情報を利用することができる。時には、このようなアッセイで薬剤として開発するのに十分有効な化合物が直接同定されることもある。より多くの場合、最初のヒット化合物は中程度または低い有効性を示す。低いかまたは中程度の有効性を示すヒット化合物を同定した後は、指向性化合物ライブラリーを合成し、これについて試験してより有効なリード物質を同定する。通常、これらの指向性ライブラリーは、前記ヒット化合物に関連する構造であるが、様々な構造的特徴の付加、削除および置換を含めた体系的な改変を含む該構造を有する化合物からなるコンビナトリアル化学ライブラリーである。前記標的分子に対する活性について試験した場合、構造的特徴が単独で、または活性を増強するかもしくは低下させる他の特徴と併せて同定される。この情報を使用して、該標的分子に対して増強された活性を示す化合物を含有する次の指向性ライブラリーを設計する。この手順を１回または数回反復することにより、該標的分子に対して実質的に増大した活性を示す化合物を同定し、これをさらに薬剤として開発することができる。この手順は本発明の感作細胞を使用することによって容易になる。何故なら、選択された標的に作用する化合物はかかる細胞ベースアッセイで増大された有効性を呈するからである。従って、本発明によってより多くの化合物を特性決定することができ、このため他の方法で得ら

れるであろう情報よりも有用な情報が提供される。

【０２５３】

従って、本発明では、本発明の細胞ベースアッセイを用いることにより、以前は細胞ベースアッセイを使用しても容易に開発されなかった標的に作用する化合物を含め、以前には容易に同定もしくは特性決定されなかったであろう化合物を同定または特性決定することが可能となる。最初のヒット化合物から有効な薬剤リード物質を導き出す手順もまた、本発明の細胞ベースアッセイにより実質的に改善されている。何故なら、同数の試験化合物について、より多くの構造‐機能相関情報が明らかとなる可能性が高いからである。

【０２５４】

前記細胞感作方法では適切な遺伝子を選択することが必要とされる。適切な遺伝子とは、感作させようとする細胞の成長、生存、増殖、毒性または病原性に対してその発現が不可欠である遺伝子を指す。次の工程は、前記標的のレベルまたは活性を成長、生存、増殖、毒性または病原性の律速段階となるレベルまで低下させることのできる細胞を得ることである。例えば、該細胞は、前記の選択された遺伝子が調節プロモーターの制御下に置かれている条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株であってもよい。前記で選択された遺伝子から転写されるRNAの量は、該調節プロモーターに作用するインデューサーまたはリプレッサーの濃度を変更することにより、またその結果として該RNAの転写を促す該プロモーターの活性を変化させることにより、制限される。従って、この選択された遺伝子の産物の機能が真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性の律速段階となるようなRNAレベルをもたらす濃度のインデューサーまたはリプレッサーに細胞を曝露することにより、これらの細胞が感作される。

【０２５５】

前記細胞ベースアッセイの１実施形態では、本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）内の真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な配列が調節プロモーターの制御下に置かれているアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）条件発現性突然変異株を、該配列によってコードされるその遺伝子産物の機能が真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性の律速段階となるようにする濃度のインデューサーまたはリプレッサーの存在下で成長させる。この目的を達成するため、インデューサーまたはリプレッサーの種々の投与量を、真菌の増殖に不可欠な規定レベルの遺伝子産物により生じるその対応する成長阻止に対してプロットすることにより、インデューサーまたはリプレッサーの成長阻止投与量曲線を算出する。この投与量応答曲線から、インデューサーまたはリプレッサーが無い状態での成長と比較した場合に１～100％となる様々な成長速度を提供する条件を決定することができる。例えば、前記調節プロモーターがテトラサイクリンにより抑制される場合、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を様々なレベルのテトラサイクリンの存在下で成長させることができる。同様に、誘導プロモーターを使用してもよい。この場合は、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を様々な濃度のインデューサー存在下で成長させる。例えば、成長速度を有意に低下させることのないインデューサーまたはリプレッサーの最高濃度は、前記投与量応答曲線から推定することができる。細胞増殖は、OD測定を介した成長培地の濁度によってモニターすることができる。別の例では、成長を25％低下させるインデューサーまたはリプレッサー濃度を前記投与量応答曲線から予測できる。さらに別の例では、成長を50％低下させるインデューサーまたはリプレッサー濃度を前記投与量応答曲線から算出できる。また、コロニー形成単位（cfu）などの付加的パラメータを用いて細胞の成長、生存および／または生存率を測定することもできる。

【０２５６】

本発明の別の実施形態では、個々の１倍体菌株（haploid strain）を抗真菌薬または治療薬検出のための基本物質として同様に使用することができる。この実施形態では、試験生物（例えばクリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）または表２に示す他の１倍体生物のいずれか）は、異

種調節プロモーターを含むプロモーター置換断片との組換えによって１工程で前記標的遺伝子の一方のアレルを改変することにより、該遺伝子の発現が該異種プロモーターによって条件的に調節されるように構築した菌株である。かかる個々の感作１倍体細胞を全細胞ベースアッセイで使用して、影響を受けた標的に対して選択的活性を示す化合物を同定する。

【０２５７】

様々な実施形態において、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を、前記異種プロモーターが比較的低いレベルで（すなわち、部分的に抑制されて）発現され、またその成長程度が制限されている第１セット条件下で成長させる。この実験を試験化合物の存在下で繰り返し、その成長について２つ目の測定値を得る。次に該試験化合物の存在下および非存在下での成長程度を比較して、第１の指示値を得る。前記標的遺伝子が第１セット条件下よりも実質的に高いレベルで発現される非抑制成長条件を用いて、さらに２回実験を行う。その成長程度を試験化合物の存在下および非存在下、第２セット条件下で決定し、第２の指示値を得る。次いで第１の指示値と第２の指示値とを比較する。これらの指示値が実質的に同じである場合、このデータは前記試験化合物が前記試験標的を阻害しないことを示唆している。しかし、これらの2つの指示値が実質的に異なる場合、このデータは前記標的遺伝子産物の発現レベルによって前記試験化合物による阻害の程度が決定されうることを示唆しており、従ってこの遺伝子産物がこの試験化合物の標的であると思われる。複数の感作株のコレクションまたはその一部を含む全細胞アッセイを、例えば各ウェルが感作された個々の菌株を含有する一連の96ウェル、384ウェル、またはさらに1586ウェルマイクロタイタープレートでスクリーニングして、影響を受けた各標的に対して選択的活性を示す化合物を同定する。ここで、該標的には真菌特異的、病原体特異的、所望の生化学的機能、ヒト相同体、細胞局在化、およびシグナル伝達カスケード標的セットからなる群より選択されるがこれらに限定されない標的セットまたはそのサブセットが含まれるものとする。

【０２５８】

アッセイに供する細胞を上記で決定した濃度のインデューサーまたはリプレッサーに曝す。この亜致死（sub-lethal）濃度のインデューサーまたはリプレッサーの存在により、該細胞内における増殖に不可欠な遺伝子産物の量が、成長を支援しうる最低量まで低下する。このため、この濃度のインデューサーまたはリプレッサー存在下で成長させた細胞は、増殖に不可欠な対象タンパク質または対象RNAの阻害物質、ならびに増殖に不可欠なこれらの対象タンパク質または対象RNAと同じ生物学的経路内のタンパク質またはRNAの阻害物質に対して特により高い感受性を示すが、無関係なタンパク質またはRNAの阻害物質に対してはそれ程高い感受性を示さない。

【０２５９】

阻害濃度以下の（sub-inhibitory concentrations）インデューサーまたはリプレッサーで前処理した細胞は、その結果として増殖に不可欠な標的遺伝子産物を低下した量で含有しており、これらの細胞を使用して細胞成長を低下させる化合物をスクリーニングする。亜致死濃度のインデューサーまたはリプレッサーは、該遺伝子産物が律速段階ではない対照細胞よりも前記細胞が高い感受性を示す候補化合物を同定するための本アッセイの使用目的と一致する濃度であればよい。例えば、亜致死濃度のインデューサーまたはリプレッサーは、その成長阻止が少なくとも約５％、少なくとも約８％、少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約30％、少なくとも約40％、少なくとも約50％、少なくとも約60％、少なくとも約75％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％または95％以上であるような濃度であればよい。先の方法を用いて予め感作した細胞は、標的タンパク質の阻害物質に対してより高い感受性を示す。何故なら、これらの細胞が含有する阻害すべき標的タンパク質の量は、野生型細胞のそれよりも少ないからである。

【０２６０】

同様の方法を用いて毒性または病原性を抑制する化合物を同定しうることが理解されよう。かかる方法では、毒性または病原性に関与する遺伝子産物を律速段階となるレベルで

発現する細胞を候補化合物に曝した場合のその毒性または病原性を、該遺伝子産物のレベルが律速段階とならない細胞を候補化合物に曝した場合のその毒性または病原性と比較する。毒性または病原性は本明細書中に記載の技術を用いて測定できる。

【０２６１】

本発明の細胞ベースアッセイの別の実施形態では、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性にとって不可欠な遺伝子産物のレベルまたは活性が、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性にとって不可欠な配列中の突然変異、例えば温度感受性突然変異を利用することで低下しており、またこの温度感受性突然変異と併せて、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性にとって不可欠な該遺伝子産物を増殖の律速段階となるレベルで提供するインデューサーまたはリプレッサーのレベルが低下している。かかる突然変異が真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性にとって不可欠な遺伝子内で生じている温度感受性突然変異体の許容温度と制限温度との中間の温度で細胞を成長させると、成長、生存、増殖、毒性または病原性にとって不可欠な該遺伝子産物の活性が低下した細胞が得られる。真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物の活性をさらに低下させることができるよう、前記インデューサーおよびリプレッサーの濃度を選択する。前記の増殖に不可欠な遺伝子産物をコードする核酸の発現が低下しておりかつ前記許容温度と制限温度との間の温度で成長させた細胞が、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性にとって不可欠な該遺伝子産物の発現が低下しておらずかつ許容温度にて成長させた細胞よりも、試験化合物に対して実質的により高い感受性を示すかどうかを決定することにより、前記温度感受性突然変異または前記インデューサーまたはリプレッサーのいずれかを単独で用いても発見されなかったであろう薬剤を同定することができる。また、以前にインデューサーもしくはリプレッサー単独または温度感受性突然変異のみを使用して見出されていた薬剤であっても、これら２つのアプローチを組み合わせて用いた細胞では異なる感受性プロファイルを示すかもしれず、またその感受性プロファイルによって、前記遺伝子産物の１以上の活性を阻害する該薬剤のより特異的な作用が示唆されるかもしれない。

【０２６２】

温度感受性突然変異は遺伝子内の異なる部位、およびそのタンパク質の異なるドメイン内に位置している可能性がある。例えば、大腸菌(Escherichia coli)のdnaB遺伝子は複製フォークDNAヘリカーゼをコードしている。DnaBは複数のドメインを有し、これにはオリゴマー化、ATP加水分解、DNA結合、プライマーゼとの相互作用、DnaCとの相互作用、およびDnaAとの相互作用のためのドメインが含まれる。DnaBの異なるドメインでの複数の温度感受性突然変異により制限温度において異なる表現型が付与される。かかる表現型としては、DNAの分解を伴うかまたは伴わない、DNA複製の突然の停止または緩やかな停止(Wechsler,J.A.およびGross,J.D. 1971 Escherichia coli mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. Mol.Gen.Genetics 113:273-284)および成長終了または細胞死が挙げられる。従って、前記タンパク質の異なるドメインにおける温度感受性突然変異は、該タンパク質の発現が調節プロモーターの制御下にある条件発現性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株と併せて使用することができる。

【０２６３】

上記方法を、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な前記遺伝子産物の活性またはレベルを低下させるが消去まではしない、いずれの突然変異とも併せて実施しうることが理解されよう。

【０２６４】

真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物に対する抗菌物質についてスクリーニングする場合、限定量の該遺伝子産物を含有する細胞の成長阻止、毒性または病原性についてアッセイすることができる。成長阻止は、実験試料と対照試料との間で、培養物の光学密度によって測定されるその成長量を未接種の成長培地のものと直接比較することによって測定することができる。細胞増殖についてアッセイするための代替的方法には、緑色蛍光タンパク質(GFP)レポーター構築物による発光の測定、様々な酵素

活性アッセイ、および当分野で周知の他の方法が含まれる。毒性および病原性は、本明細書中に記載の技術を用いて測定できる。

【０２６５】

上記方法を固相、液相、これら２種の培地の組み合わせ、またはin vivoで実施しうることは理解されよう。例えば、増殖に不可欠な遺伝子産物を発現するために使用される調節プロモーターに作用するインデューサーまたはリプレッサーを含有する寒天培地で成長させた細胞を、該寒天の表面上に載せた化合物に曝露してもよい。この化合物の効果は、結果として生じる殺傷範囲(killing zone)、すなわち化合物を適用した位置の周辺領域であって細胞が成長しない該領域、の直径から判定することができる。複数の化合物を寒天プレートに移し、多チャネルピペット(例えば、the Beckman Multimek)および多チャネルスポッター(例えばthe Genomic Solutions Flexys)を含むがこれらに限定されない自動化および半自動化装置を用いて同時に試験してもよい。このようにして、複数のプレートおよび何千から何百万という化合物を１日で試験することができる。

【０２６６】

また、前記化合物を、以下に記すようにマイクロタイタープレートを用いて完全に液相中で試験する。マイクロタイタープレート当たり96個、384個、1536個またはそれ以上のウェルを含有するマイクロタイタープレートを用いて液相スクリーニングを実施することにより、複数のプレートおよび何千から何百万という化合物を１日でスクリーニングすることができる。自動化および半自動化装置を、試薬（例えば細胞および化合物）の添加ならびに細胞密度の測定のために使用する。

【０２６７】

前記化合物を、本明細書中に記載の方法を用いてin vivoでも試験する。

【０２６８】

上記細胞ベースアッセイ各々を使用すれば、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)以外の生物から得られる遺伝子産物であって、かつ本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)遺伝子産物との間に相同性を示す前記遺伝子産物の活性を阻害する化合物を同定しうることが理解されよう。例えば、かかる遺伝子産物は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該遺伝子産物はサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)以外の生物から得られるものである。

【０２６９】

5.4.2.1　条件発現性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株を用いる細胞ベースアッセイ

真菌の生存、成長、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子が調節プロモーターの制御下に置かれている条件発現性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)

突然変異株を、本明細書中に記載の方法を用いて構築する。本例の目的を達成するため、この調節プロモーターを本明細書中に記載のテトラサイクリン制御プロモーターとすることができるが、いずれの調節プロモーターも使用しうることは理解されよう。

【０２７０】

本発明の１実施形態では、個々の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株を、２倍体（diploid）病原性真菌細胞に対して活性な治療薬を検出するための基礎材料として使用する。この実施形態では、試験生物は、組換えにより異種プロモーターの制御発現下に置かれるよう改変された遺伝子を有する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株である。次に、この試験条件発現性アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)突然変異株を、該異種プロモーターが比較的低いレベルで（「抑制されている」）、および決定された成長程度で発現される第１セット条件下で成長させる。この測定は、光学密度、ペレット化細胞の湿重量、総細胞数計測、生菌数測定、DNA含量などの当業者に公知の適切な基準を用いて行うことができる。この実験を試験化合物の存在下で繰り返し、その成長について２つ目の測定値を得る。該試験化合物の存在下および非存在下での成長程度は、指示値という形で都合良く表現することが可能であり、これらの値を次に比較する。成長程度または指示値における相違は、該試験化合物が標的とする必須遺伝子産物と相互作用しうることの指標となる。

【０２７１】

より多くの情報を得るために、前記必須遺伝子が前記異種プロモーターの制御下でも上記第１セット条件下より実質的に高いレベルで発現される第２セットの「抑制しない」成長条件を用いてさらに２回実験を行う。その成長程度または指示値を、試験化合物の存在下および非存在下、第２セット条件下で測定する。次いで、該試験化合物の存在下および非存在下での成長程度または指示値を比較する。該成長程度または該指示値における相違は、該試験化合物が標的とする必須遺伝子産物と相互作用しうることの指標となる。

【０２７２】

さらに、第１セットおよび第２セットの成長条件下での成長程度を比較することもできる。成長程度が本質的に同じである場合、このデータから、前記試験化合物が、試験した条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が担持する改変遺伝子によってコードされる前記遺伝子産物を阻害しないことが示唆される。しかし、成長程度が実質的に異なる場合、このデータは、対象遺伝子産物の発現レベルにより該試験化合物による阻害の程度が決定されうることを示唆しており、このため該対象遺伝子産物が該試験化合物の標的である可能性が高い。

【０２７３】

条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を各々個別に試験してもよいが、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションの全セットまたはそのサブセットを同時にスクリーニングする方がより効率的であろう。従って、本発明の１態様では、例えば各ウェルが単一の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を含有している一連の96ウェルマイクロタイタープレートにおいて、アレイを確立することができる。ある典型的だがこれに限定されないアプローチでは４枚のマイクロタイタープレートを使用するが、これらのプレートは２組のペアを構成しており、1組のペアの成長培地では、各菌株に残存している活性アレルを制御する前記異種プロモーターが、もう１組のプレートペアの培地よりも高発現を支持する。各ペアのうち一方のメンバーに試験しようとする化合物を補充し、また条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株各々の成長量を標準的手法を用いて測定することにより、試験した各分離株についての指示値を得る。治療薬をスクリーニングするためにかかる方法で使用する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションは、真菌特異的、病原体特異的、所望の生化学的機能、ヒト相同体、細胞局在化、およびシグナル伝達カスケード標的セットからなる群より選択されるがこれに限定

されない条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株のサブセットを含んでいてもよい。

【０２７４】

前記の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を、各菌株に対する成長阻止投与量‐応答曲線が得られる濃度範囲のテトラサイクリンを含む培地で成長させる。まず初めに、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の種培養物を適切な培地で成長させる。続いて、該種培養物のアリコートを、様々な濃度のテトラサイクリンを含有する培地で希釈する。例えば、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を、テトラサイクリンの２倍連続希釈物を含有する重複（in duplicate）培養物中で成長させることができる。加えて、対照細胞をテトラサイクリン抜きで重複培養により成長させる。この対照培養についても、対象とする条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の最初の種培養物と同一のものから得た等量の細胞を用いて開始する。適切な時間および成長程度で成長させたこれらの細胞を、適切な技術を用いて測定する。例えば、その成長程度は該培養物の光学密度を測ることによって決定できる。前記対照培養物が対数増殖期の中ほど（mid-log phase）に到達したら、テトラサイクリン含有培養物各々についての成長割合（対照培養物と比較した場合の値）をテトラサイクリン対数濃度に対してプロットし、テトラサイクリンについての成長阻止投与量応答曲線を得る。その後0mMテトラサイクリン対照（成長阻止0％）と比較した場合に細胞成長を50％阻止するテトラサイクリン濃度（IC_{50}）を該曲線から算出する。成長を測定するための代替的方法も検討する。これらの方法の例としては、その発現が試験しようとする細胞内で遺伝子操作されていてかつ容易に測定できるタンパク質の測定が含まれる。かかるタンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）および様々な酵素が挙げられる。

【０２７５】

選択した濃度のテトラサイクリンで細胞を前処理し、次にこれを用いて候補化合物に対する細胞集団の感受性を試験する。例えば、該細胞を、該細胞の成長を少なくとも約５％、少なくとも約８％、少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約30％、少なくとも約40％、少なくとも約50％、少なくとも約60％、少なくとも約75％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％または95％以上阻止する濃度のテトラサイクリンで前処理することができる。次いで、該細胞を該候補化合物と接触させて、テトラサイクリン含有培地における該細胞の成長をテトラサイクリン欠乏培地における対照細胞の成長と比較し、該候補化合物が感作細胞（すなわち、テトラサイクリン存在下で成長させた細胞）の成長を阻止したかどうかを決定する。例えば、テトラサイクリン含有培地における細胞の成長をテトラサイクリン欠乏培地の細胞の成長と比較して、該候補化合物が感作細胞（すなわち、テトラサイクリン存在下で成長させた細胞）の成長を阻止するその程度が、該候補化合物がテトラサイクリン非存在下で成長させた細胞の成長を阻止するその程度を上回っているかどうかを決定することができる。例えば、感作細胞（すなわち、テトラサイクリン存在下で成長させた細胞）と非感作細胞（すなわち、テトラサイクリン非存在下で成長させた細胞）との間でその成長に有意な差がみられる場合、該候補化合物を使用してこの生物の増殖を阻害すること、または該化合物をさらに最適化して該生物の成長、生存、もしくは増殖を阻害する能力がより高い化合物を同定すること、が可能である。

【０２７６】

同様に、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物を律速段階となる量で発現する細胞を候補化合物に曝した場合のその毒性および病原性を、毒性または病原性に不可欠な該遺伝子産物の発現レベルが律速段階とならない細胞を候補化合物に曝した場合のその毒性または病原性と比較することができる。かかる方法では、試験動物に条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を投与し、所望の量のテトラサイクリンと該候補化合物とを含有する餌を与える。このため、該試験動物に感染している条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株は、毒

性または病原性に不可欠な遺伝子産物を律速段階となる量で発現する（すなわち、該試験動物中の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株は感作されている）。対照動物に条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を投与し、前記候補化合物を含むがテトラサイクリンは含まない餌を与える。該試験動物における該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の毒性および病原性を、前記対照動物におけるそれと比較する。例えば、該試験動物における該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の毒性および病原性を該対照動物におけるそれと比較することにより、該候補化合物がこの感作された条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異細胞（すなわち、テトラサイクリン含有餌を与えた動物における細胞）の毒性または病原性を抑制するその程度が、該候補化合物がテトラサイクリン非含有餌を与えた動物における条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異細胞の成長を阻止するその程度を上回っているかどうかを決定することができる。例えば、感作された条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異細胞（すなわち、テトラサイクリン含有餌を与えた動物における細胞）と非感作細胞（すなわち、テトラサイクリン非含
有餌を与えた動物における条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異細胞）との間でその成長に有意な差がみられる場合、該候補化合物を使用してこの生物の毒性もしくは病原性を抑制すること、または該化合物をさらに最適化して、該生物の毒性もしくは病原性を抑制する能力がより高い化合物を同定すること、が可能である。毒性または病原性は、本明細書中に記載の技術を用いて測定することができる。

【０２７７】

上記細胞ベースアッセイを使用すれば、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）以外の生物から得られる遺伝子産物であって、かつ本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子産物との相同性を示す前記遺伝子産物の活性を阻害する化合物を同定しうることが理解されよう。例えば、該遺伝子産物は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該遺伝子産物はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）またはカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）以外の生物から得られるものである。

【０２７８】

相同的な標的遺伝子が同定されている植物の真菌性病原体の多くは、当業者に公知の標準的な遺伝子操作方法、例えば形質転換および相同的組換えが適用可能である。組換え遺伝子発現系の非限定的な例としては、以下のものが挙げられる。すなわち、ステロイド系グリコアルカロイドであるα－トマチンによって誘導されるF.オキシスポラム（F.oxyspo

rum）panCプロモーター（Perez-Espinosaら、Mol Genet Genomics (2001)265(5):922-9）、高コピー数の自律複製発現ベクターにおけるウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）hsp70様遺伝子プロモーター（Keonら、Antisense Nucleic Acid Drug Dev (1999), 9(1):101-4）、C.ヘテロストロファス（C.heterostrophus）のP1もしくはGPD1（グリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ）プロモーターまたは大腸菌（E.coli）のGUSもしくはハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hph)遺伝子を用いるコクリオボラス・ヘテロストロファス（Cochliobolus heterostrophus）の一過性および安定した遺伝子発現系（Monkeら、Mol Gen Genet (1993)241(1-2):73-80）、大腸菌（E.coli）由来の該hph遺伝子とストレプトアロテイカス・ヒンドゥスタナス（Streptoalloteichus hindustanus）由来のble遺伝子を使用し、アスペルギルス・ニドランス（Aspergillus nidulans）プロモーターおよびターミネーター配列、PEG／$CaCl_2$処理によって真菌プロトプラスト中に導入したプラスミドDNAの制御下で形質転換してハイグロマイシンBおよびフレオマイシン耐性としたリンコスポリウム・セカリス（Rhynchosporium. secalis）（オオムギの葉焼け病菌）（Roheら、Curr Genet (1996),29(6):587-90）である。バナナおよびオオバコ（ムサ(Musa)種）の病原体であるマイコスファエレラ・フィジエンシス（Mycosphaerella fijiensis）、マイコスファエレラ・ムシコラ（Mycosphaerella musicola）、およびマイコスファエレラ・ユムザ（Mycosphaerella eumusae）をBalint-Kurtiら、FEMS Microbiol Lett (2001), 195(1):9-15に教示された通りにして形質転換することができる。トリコゼセン（trichothecene）産生植物病原体であるギベレラ・プリカリス（Gibberella pulicaris(フサリウム・サンブチナム（Fusarium sambucinum））は、次の３種の異なるベクター、cosHyg1、pUCH1、およびpDH25を用いて形質転換することが可能であり、これらのベクターは全て選択マーカーとしてhph（ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼをコードしている）を担持している（Salchら、Curr Genet (1993), 23(4):343-50）。ブラシカ(Brassica)種の真菌性病原体であるレプトスファエリア・マキュランス（Leptosphaeria maculans）はフレオマイシン耐性をコードするベクターpAN8-1で形質転換することができるし、そのプロトプラストはハイグロマイシンB耐性をコードする部分的に相同なベクターpAN7-1を用いて再形質転換することができる（Farmanら、Mol Gen Genet (1992) 231(2):243-7）。クリフォネクトリア・パラシティカ（Cryphonectria parasitica）の場合、かかる栗胴枯れ病菌のenpg-1に狙いを定めた破壊は、エキソン１に挿入した大腸菌（Escherichia coli）hph遺伝子のクローン化コピーを用いる相同的組換えにより達成された（Gaoら、Appl Environ Microbiol(1996), 62(6):1984-90を参照されたい）。

【０２７９】

別の例では、グロメレラ・シンギュラタ（Glomerella cingulata）f.sp.phaseoli(Gcp)を、２種の選択マーカー、すなわちアセトアミダーゼをコードしかつ唯一の窒素供給源としてアセトアミド上での成長を可能にするアスペルギルス・ニドランス（Aspergillus nidulans）のamdS＋遺伝子および抗生物質Hy存在下での成長を可能にする大腸菌（Escherichia coli）hygBR遺伝子のいずれかを用いて形質転換した。このamdS＋遺伝子はA.ニドランス（A. nidulans）調節シグナルの制御下にあるGcp中で機能し、hygBRは別の繊維状子嚢菌であるコクリオボラス・ヘテロストロファス（Cochliobolus heterostrophus）から得たプロモーターに融合した後に発現された。形質転換するプロトプラストを消化酵素複合体Novozym234を用いて作製し、次いでこれを10mM $CaCl_2$およびポリエチレングリコールの存在下でプラスミドDNAに曝した。前記amdS＋またはhygBRプラスミドのいずれかの単数または複数コピーが真菌ゲノム内に組み込まれることにより、形質転換が生じた（Rodriquezら、Gene (1987), 54(1):73-81）。相同的組換え用組み込みベクターにおける欠失の研究により、組み込み事象を目的とするならば505bp（分析した相同的プロモーターDNAがプロモーターとして機能しうる最短の長さ）で十分であることが実証された。該ベクターの相同的組み込みにより、gdpAプロモーター領域が複製された（Rikkerinkら、Curr genet (1994), 25(3):202-8）。

【０２８０】

上記細胞ベースアッセイを使用して、真菌の増殖、毒性もしくは病原性に不可欠な核酸

またはかかる核酸の遺伝子産物が位置する生物学的経路を同定することもできる。かかる方法では、真菌の増殖、毒性または病原性に不可欠な標的核酸を律速段階となるレベルで発現する細胞および該標的核酸の発現が律速段階とならない対照細胞を、様々な経路で作用することが知られている抗生物質のパネルに接触させる。該抗生物質が該標的核酸またはその遺伝子産物が位置する経路に作用する場合、該標的核酸の発現が律速段階となる細胞は該標的核酸の発現が律速段階とならない細胞よりも該抗生物質に対して高い感受性を示すだろう。

【０２８１】

対照として、前記標的遺伝子を含め、増殖、毒性または病原性に不可欠な多種の遺伝子のレベルが律速段階となる細胞のパネルを接触させることにより、前記アッセイの結果を確認することができる。前記抗生物質が特異的に作用している場合、該抗生物質に対する増強された感受性は、該標的遺伝子が律速段階となっている細胞（または該標的遺伝子と同経路内にある遺伝子が律速段階となっている細胞）でのみ観察され、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物が律速段階となっている細胞では通常は観察されないであろう。

【０２８２】

増殖、毒性または病原性に不可欠な核酸が位置する前記生物学的経路を同定するための上記方法を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）以外の生物からの核酸であってかつ本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の核酸に相同性を示す前記核酸に適用しうることが理解されよう。例えば、該核酸は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該核酸はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）以外の生物から得られるものである。

【０２８３】

同様に、前記方法を使用して、試験抗生物質などの試験化合物が作用する経路を決定することができる。真菌の生存、成長、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物を律速段階となる量で発現する個々の細胞であってかつ該遺伝子産物が公知経路内に存在する該細胞のパネルを、その作用経路を決定することが望まれる化合物と接触させる。この細胞パネルの試験化合物に対する感受性を、増殖、毒性または病原性に不可欠な該遺伝子産物をコードする核酸が律速段階レベルで発現される細胞、および増殖、毒性または病原性に不可欠な該遺伝子産物が律速段階レベルで発現されない対照細胞において測定する。該試験化合物が増殖、毒性または病原性に不可欠な特定の遺伝子産物が位置する経路に作用する場合、該特定遺伝子産物を律速段階レベルで発現する細胞は、別の経路内の遺伝子産物を律速段階レベルで発現する細胞よりも該化合物に対して高い感受性を示すだろう。加えて、真菌の増殖、毒性または病原性に不可欠な特定の遺伝子の発現が律速段階とならな

い対照細胞は、該化合物に対して増強された感受性を示さないであろう。このようにして、該試験化合物が作用する経路を決定することができる。

【０２８４】

試験化合物が作用する経路を決定するための上記方法を、本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子産物と相同性を示す遺伝子産物の活性またはレベルが律速段階となっている細胞のパネルを用いることにより、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）以外の生物に適用しうることが理解されよう。例えば、該遺伝子産物は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該遺伝子産物はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）またはカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）以外の生物から得られるものである。

【０２８５】

当業者であれば、真菌の増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子産物を律速段階レベルで産生するために使用するインデューサーもしくはリプレッサーの濃度などの前記アッセイ条件および／または該アッセイで使用する成長条件（例えばインキュベーション温度や培地成分）をさらに最適化することにより、呈示される抗生物質感作の選択性および／または規模をより高めうることが理解されよう。

【０２８６】

成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子が位置する経路、または抗生物質が作用する経路を同定するための上記方法を、本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子産物との相同性を示す遺伝子産物が律速段階となっているアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）以外の生物を用いて実施しうることが理解されよう。例えば、該遺伝子産物は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ

（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該遺伝子産物はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）以外の生物から得られるものである。

【０２８７】

さらに、上記で論じたように、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株のパネルを使用することにより、公知の作用機構を持たない抗生物質を含め、必須生物学的経路に影響を及ぼす全ての化合物の干渉点を特徴付けることができる。

【０２８８】

本発明の別の実施形態は、試験抗生物質化合物が活性を示す経路を決定する方法であって、真菌の成長、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な該経路に関与するタンパク質または核酸の活性が、細胞を該タンパク質または核酸に作用する亜致死濃度の公知抗生物質と接触させることによって低下している前記方法である。この方法は、試験抗生物質が作用する経路を決定するための上記方法と類似しているが、真菌の増殖、毒性もしくは病原性に不可欠な遺伝子産物の活性またはレベルを、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株内で該遺伝子産物を律速段階となる量で発現させることにより低下させるのではなく、むしろ該遺伝子産物の活性またはレベルを該遺伝子産物に作用する亜致死レベルの公知抗生物質を用いて低下させるという点で異なる。

【０２８９】

亜致死濃度の公知抗生物質の存在により生じる成長阻止の程度は、少なくとも約５％、少なくとも約８％、少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約30％、少なくとも約40％、少なくとも約50％、少なくとも約60％、または少なくとも約75％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％または95％以上でありうる。

【０２９０】

あるいは、この亜致死濃度の公知抗生物質を、成長阻止を測定するのではなく標的の増殖に不可欠な遺伝子産物の活性を測定することによって決定することができる。

【０２９１】

細胞を、亜致死レベルの公知抗生物質パネルの各メンバーおよび様々な濃度の前記試験抗生物質の組み合わせと接触させる。対照として、細胞を様々な濃度の前記試験抗生物質のみと接触させる。該公知抗生物質の存在下および非存在下で、該試験抗生物質のIC_{50}を決定する。公知薬剤の存在下および非存在下におけるIC_{50}が実質的に同様であれば、該試験薬剤と該公知薬剤は異なる経路に作用している。これらのIC_{50}が実質的に異なるのであれば、該試験薬剤と該公知薬剤は同一経路に作用している。

【０２９２】

本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）配列との相同性を示す遺伝子産物に作用する公知抗生物質を使用して、同様の方法を実施することができる。かかる相同的遺伝子産物は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イ

ネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Ustilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該遺伝子産物はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）またはカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）以外の生物から得られるものである。

【０２９３】

本発明の別の実施形態は、真菌の増殖、毒性または病原性に不可欠な経路に関与する標的タンパク質または核酸の活性が、細胞を該標的タンパク質または核酸に作用する亜致死濃度の公知抗生物質と接触させることによって低下されている、抗生物質として使用するための候補化合物を同定する方法である。該方法は、抗生物質として使用するための候補化合物を同定する上記方法と類似しているが、増殖、毒性もしくは病原性に不可欠な遺伝子産物の活性またはレベルを、該遺伝子産物を律速段階となるレベルで発現する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を用いて低下させるのではなく、むしろ該遺伝子産物の活性またはレベルをこの増殖に不可欠な遺伝子産物に作用する亜致死レベルの公知抗生物質を用いて低下させるという点で異なる。

【０２９４】

亜致死濃度の公知抗生物質により生じる成長阻止は、少なくとも約５％、少なくとも約８％、少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約30％、少なくとも約40％、少なくとも約50％、少なくとも約60％、または少なくとも約75％、またはそれ以上でありうる。

【０２９５】

あるいは、この亜致死濃度の公知抗生物質を、成長阻止を測定するのではなく標的の増殖に不可欠な遺伝子産物の活性を測定することによって決定することができる。

【０２９６】

対象とする試験化合物を特性決定するために、細胞を、亜致死レベルの公知抗生物質パネルおよび１種以上の濃度の該試験化合物と接触させる。対照として、細胞を同濃度の該試験化合物のみと接触させる。該公知抗生物質の存在下および非存在下において、該試験化合物のIC_{50}を決定する。該試験化合物のIC_{50}が公知薬剤の存在下および非存在下において実質的に異なるのであれば、該試験化合物は抗生物質として使用するための優れた候補物質である。上記で論じたように、上記方法を用いて候補化合物を同定した後は、コンビナトリアル化学などの標準技術を使用してその構造を最適化することができる。

【０２９７】

本明細書中に記載のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）配列との相同性を示す遺伝子産物に作用する公知抗生物質を使用して、同様の方法を実施することができる。かかる相同的遺伝子産物は、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）、アスペルギルス・フラバス（Aspergillus flavus）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラプシロプシス（Candida parapsilopsis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、エクソフィアラ・デルマチチジス（Exophiala dermatitidis）、フサリウム・オキシスポラム（Fusarium oxysporum）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、ニューモシスチス・カリニ（Pneumocystis carinii）、トリコスポロン・ベイゲリイ（Trichosporon beigelii）、ライゾパス・アルヒザス（Rhizopus arrhizus）、ムコール・ルーキシ（Mucor rouxii）、ライゾムコール・プシラス（Rhizomucor pusillus）、もしくはアブシディア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）などの動物の真菌性病原体、または灰色かび病菌（Botrytis cinerea）、エリシフェ・グラミニス（Erysiphe graminis）、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、セプトリア・トリチシ（Septoria tritici）、ティレチア・コントロベルサ（Tilletia controversa）、ウスチラゴ・マイディス（Us

tilago maydis）などの植物の真菌性病原体、または上記種のいずれかの属に属する全ての種から得ることができる。幾つかの実施形態では、該遺伝子産物はサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）以外の生物から得られるものである。

【０２９８】

本発明の別の実施形態では、病原体の潜在的薬剤標的全てを、例えば光学密度または遠心後のペレットの大きさを測定することによりその成長を各ウェルについて決定することができる96ウェルマイクロタイタープレートフォーマットを使用して、化合物ライブラリーに対して同時にスクリーニングすることができるだろう。薬剤スクリーニングのためのゲノムアプローチでは、どの標的をスクリーニングすべきか評価する際に使用される潜在的に任意で人工的な指標が排除され、その代わりに考えられる全標的のスクリーニングが可能となる。このアプローチによって、好適な過程（例えば細胞壁生合成遺伝子産物）を阻害する特定の化合物を同定することが可能となるだけでなく、そのライブラリー内の全ての殺菌性化合物を同定し、かつそれらの化合物を対応する細胞標的と関連付けることも可能となる。

【０２９９】

本発明のさらに別の実施形態では、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株をスクリーニングして合成的致死突然変異を同定することにより、重大な治療価値を有する、新規クラスに属すると考えられる薬剤標的を発見することができるであろう。例えば、２つの別個の遺伝子が共通かつ必須の細胞機能に関与する相同的なタンパク質をコードしている可能性があり、この場合、双方のファミリーメンバーを不活性化して初めて該機能の本来の性質が明らかとなるだろう。従って、ヌル表現型の遺伝子各々を個別に調べても、その組み合わされた遺伝子産物の本来の性質が明らかとなることはなく、結果として、この潜在的な薬剤標的は同定されないだろう。これらの遺伝子産物が互いに高い相同性を示す場合、一方のファミリーメンバーを阻害することが見出された化合物は他方も阻害する可能性があるため、遺伝学的に実証された合成的成長阻止とほぼ同じものであると予想される。しかし他の場合では、合成的致死性により一見無関係な（および多くは非必須の）過程が明らかとなる可能性があり、該過程では前記遺伝子産物同士が組み合わされると合成的成長障害（細胞死）が生じる。例えば、S.セレビシエ（S. cerevisiae）遺伝子RVS161を破壊しても、この単一突然変異を担持する酵母では識別可能な栄養生長表現型は何ら提示されないが、少なくとも他の９個の遺伝子がこのRSV161の不活性化と組み合わせると合成的致死効果を示すことが知られている。これらの遺伝子は、細胞骨格の組み立てやエンドサイトーシスからシグナル伝達や脂質代謝にまで及ぶ過程に関与しているため、組み合わせによる薬剤標的化計画を推進するための複数の手段が同定される。必須および非必須薬剤標的との合成的致死相互作用を明らかにすることを目的とするアプローチが現在行われており、該アプローチでは、薬剤標的に対して低下されたレベルの活性を呈すという理由ではなく、その突然変異を第２薬剤標的の阻害と組み合わせると合成的致死性を示すという理由で、前記試験化合物に対して増強された感受性を示す条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が同定される。前記化合物が感作された条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株内の薬剤標的を特異的に阻害するかどうかの識別は、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株セット全てを該化合物に対して同程度かまたはそれ以上に高い感受性を示す別の突然変異株についてスクリーニングし、次いでこれら２つの突然変異間で合成的致死性を示す２重突然変異株を遺伝学的に特性決定することにより、達成できる。

【０３００】

5.4.2.2 条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を使用する非抗真菌治療薬のスクリーニング

病原性真菌とそれらが感染する哺乳動物宿主との間に存在する生化学的類似性により、臨床的に有用な抗真菌化合物の範囲が限定される。しかし、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを用いてこの類似性を

有効活用することにより、抗真菌剤としては使用されないが癌、炎症などの広範囲の疾患の治療に有用である治療薬の発見を容易にすることができる。

【０３０１】

本発明のこの実施形態では、動物または植物の病原遺伝子との相同性を示す真菌遺伝子を選択し、この遺伝子セットを有する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を使用して、これらの遺伝子の産物に対して強力で特異的な生物活性を呈し、それ故に疾病の治療に際して医学的価値を有しうる化合物を同定する。必須および非必須遺伝子、ならびに改変遺伝子を担持するその対応する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株は、本発明の本実施形態において有用である。アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ゲノム内で見つかった遺伝子のうちの40％程度はヒトの機能的相同体と共通していると予想されている。また、ヒト遺伝子のうちの１％程度がヒトの疾患に関与しており、そのため潜在的な薬剤標的として機能しうると予想されている。従って、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクション内の多くの遺伝子はヒト病原遺伝子と相同であり、この遺伝子セットの個々のメンバーを特異的に不活性化する化合物は事実上代替的な治療価値を有する可能性がある。本発明は、改変されたアレルが動物または植物の１以上の疾患に関連した遺伝子との間で配列、構造および／または機能上の類似点を共有する真菌遺伝子である、複数の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を提供する。

【０３０２】

例えば、細胞周期の進行を促し、かつ様々な癌では大抵その秩序が乱れているシグナル伝達機構の多くは、真菌で保存されている。これらの遺伝子の多くはサイクリン、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）、CDKインヒビター、ホスファターゼ、ならびに互いに構造的および機能的に関連しあう複数の転写因子をコードしている。そのため、これらの機能的クラスのタンパク質のいずれかに対して特異性を示すことが見出された化合物は、その潜在的抗癌活性を試験するための２次スクリーニング手段により評価することができるだろう。しかし、このやり方で同定される細胞傷害性化合物は、その治療能力を示すために発癌性標的に作用する必要は無い。例えば、乳癌および卵巣癌の治療薬として期待されているタキソールファミリーの抗癌性化合物は、チューブリンに結合して微小管の組立てを促進し、それにより正常な微小管力学を混乱させる。酵母チューブリンはタキソールに対して同様の感受性を示すが、このことは酵母とヒトの間で共通する他の基本的な細胞過程に影響を及ぼす別の化合物を同じように同定し、かつその抗癌活性について評価しうることを示唆している。

【０３０３】

こうした事象の病因論は微生物分類学の域を遥かに越え、最終的には根本的な生理現象に辿り着く。多くの意味で、癌という現象はアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）などの日和見病原菌による発病過程と類似している。これらはいずれも、身体の自己細胞または自然界でそれらが属する動物相から得られる微生物のいずれかによって引き起こされる非伝染性の疾患である。これらの細胞は免疫系のチェックを受けない方法で成長し、またどちらの場合でも生命の維持に必要不可欠な器官の侵食とその結果生じる致死性の組織損傷により疾患が明らかとなる。また、これら両疾患については効果的な薬剤ベースの治療方法が見つかりにくいが、これは主に、両疾患の原因となる物質が宿主と密接に関係しているからである。

【０３０４】

実際に、癌とは無関係の過程に影響を及ぼす多数の有効な治療薬もまた、抗真菌剤スクリーニングプログラムを介して発見されている。ある臨床的に重要なクラスの化合物としては、保存されているシグナル伝達成分を阻害する免疫抑制分子であるラパマイシン、シクロスポリンA、およびFK506を挙げることができる。シクロスポリンAとFK506は別個の薬剤‐プロリルイソメラーゼ複合体（それぞれCyPA‐シクロスポリンAおよびFKBP12‐FK506）を形成し、該複合体がカルシウムおよびカルモジュリン依存性ホスファターゼ、すなわ

ちカルシニューリンの調節サブユニットに結合してこれを不活性化する。ラパマイシンも同様にFKBP12との複合体を形成するが、この薬剤‐タンパク質複合体もまたTORファミリーのホスファチジルイノシトールキナーゼに結合して翻訳および細胞周期の進行を阻害する。各々の場合において、薬物の作用機構および該薬物の標的そのものが酵母とヒトとの間で高度に保存されている。

【０３０５】

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の薬物標的を同定すること、ならびに該標的を必須遺伝子、真菌特異的および病原体特異的標的セットに分類することにより、これら標的の個々のメンバーのいずれかと相互作用して阻害する化合物についての全細胞スクリーニング手段を開発するための基盤が提供される。従って、同様の分析を用いて、他の特異的共通機能または特性を有する薬物標的をコードしている遺伝子の改変アレル対を持つ条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の他のセットを同定することもできる。例えば、ヒト遺伝子との高い相同性を示す遺伝子標的、または共通の生化学的機能、酵素活性を示す遺伝子標的、または炭素化合物の異化、生合成、分子の輸送（トランスポーター活性）、細胞局在化、シグナル伝達カスケード、細胞周期の制御、細胞接着、転写、翻訳、DNA複製などに関与する遺伝子標的を含む条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株のサブセットを確立することができる。

【０３０６】

5.4.2.3　標的遺伝子の投与量をベースとする全細胞アッセイ

コード遺伝子の発現レベルをモジュレートして遺伝子機能が付与されうる表現型を明らかにすることを含む実験を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）などの病原菌にて本発明の菌株と方法を使用することにより実施できる。薬物スクリーニングにおける薬物‐標的‐レベル変化の原理は、薬物標的の発現レベルをモジュレートして特定の薬物耐性または薬物感受性表現型を同定し、それによりこの薬物標的を特定の化合物と関連付けることを含む。しばしば、これらの表現型はこの化合物の正真正銘の薬物標的をコードする標的遺伝子を暗に示している。これが当てはまらない場合であっても、候補となる標的遺伝子は、該化合物によって阻害される経路もしくはそれに関与する過程のいずれかにおいて機能している（例えば合成的表現型を生じる）か、またはそうではなくて同定された化合物に関連する薬物耐性機構として機能している、真の標的遺伝子に関しての重要な手掛かりを提供する。

【０３０７】

所与の遺伝子産物の発現レベルは、細胞内で多コピーにて維持されているプラスミドベクター中に該遺伝子をクローニングすることによっても上昇する。また、前記コード遺伝子の過剰発現は、該遺伝子産物の対応するオープンリーディングフレームを多コピープラスミド上に担持されているより強力なプロモーターに融合することによっても達成される。これらの方策を使用して、複数の過剰発現スクリーニング手段をサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）にて上手く利用することにより、既に特性決定されている薬物標的と相互作用する新規化合物が見出されるだけでなく、既存の治療用化合物が結合するタンパク質標的が同定される。

【０３０８】

本発明の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションは、抑制条件下で標的を検証する際に有用であるだけでなく、非抑制条件下でこれらの検証済み同一薬物標的を過剰発現している、全細胞アッセイの開発および薬物スクリーニング用の菌株のコレクションとしても有用である。

【０３０９】

条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株における標的遺伝子産物発現レベルの変化を利用して、抗真菌化合物に対する耐性を詳しく調べる。既存の抗真菌治療薬に対する耐性は、利用可能な抗真菌薬の数が制限されるということ、および臨床医がそれら薬剤を処方する際に該薬剤の依存性および信頼性について不

安を抱くということ、を意味している。例えば、真菌感染症を治療するためにフルコナゾールなどのアゾールベースの化合物を常用することで、この化合物の臨床的治療価値は激しく損なわれた。条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを使用してフルコナゾールの細胞標的と相互作用する遺伝子産物を同定することにより、フルコナゾール耐性に対抗する。かかる産物を使用することによって、フルコナゾールと併せて用いて不活性化した場合に相乗効果を発揮し、その結果フルコナゾールを単独で使用した際に見られるこの化合物に対する耐性を克服する薬物標的を同定する。これは例えば、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを使用して薬物耐性を増強する遺伝子を過剰発現させることにより達成される。かかる遺伝子としては、ATP結合カセット（ABC）トランスポーターおよび多剤耐性（MDR）排出ポンプを含む新規または公知の形質膜輸出体、、多面的薬物耐性（PDR）転写因子、およびプロテインキナーゼおよびホスファターゼを挙げることができる。あるいは、示差的な薬物感受性を明確に示す遺伝子を、標的セットの個々のメンバーを低下されたレベルで（例えばキシロースの存在下、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）Pgla Aプロモーターを介した閾値発現により）発現している条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株をスクリーニングすることにより同定する。かかる遺伝子を同定することにより、既存の抗真菌治療薬の効能を高めるために薬物ベースの不活性化の標的としうる薬物耐性機構についての重要な手掛かりが提供される。

【０３１０】

本発明の別の態様では、全細胞アッセイを目的とする前記標的遺伝子の過剰発現はテトラサイクリンプロモーター系以外のプロモーターによって支援される（第5.3.1節および第6.2節を参照されたい）。例えば、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）Pgla Aプロモーターを使用してアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の薬物標的遺伝子を過剰発現させる。サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）では、PGK1プロモーターがグルコース存在下で強力な構成的発現を提供することが知られている（Guthrie,C.およびG.R.Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods Enzymol. 194:373-398を参照されたい）。

【０３１１】

本発明の別の態様では、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクション内で中程度の発現レベルを示す薬物標的各々を遺伝子操作して、独自の全細胞アッセイ開発用にあつらえた菌株を提供することができる。本発明のこの実施形態では、転写がほんの一部だけ抑制されるように決定した濃度のテトラサイクリンを含有する培地で条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を成長させる。これらの条件下では、その発現レベルを、構成的に発現される過剰産生株のものと野生株のものとの間の発現レベルで、また該野生株の発現レベルより低い発現レベルで維持することが可能である。つまり、細胞の生存に不可欠な最低発現レベルを滴定することが可能である。遺伝子発現をこの臨界状態まで抑制することにより、機能突然変異の部分的欠損により生じる表現型と類似した新規表現型（すなわち低次形質型(hypomorphic)突然変異体の表現型模写）を作り出し、全細胞アッセイの開発および薬物スクリーニングに適用可能な別の標的発現レベルを提供することができる。必須遺伝子の残りのアレルの発現を生存に不可欠な閾値レベルまで抑制することにより、結果として、この必須遺伝子の産物に対して活性な化合物により高い感受性を示す菌株が提供されるだろう。

【０３１２】

また条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株における標的遺伝子産物発現レベルの変化を利用して、抗真菌化合物に対する耐性を詳しく調べる。既存の抗真菌治療薬に対する耐性は、利用可能な抗真菌薬の数が制限されるということ、ならびに臨床医がそれら薬剤を処方する際に該薬剤の依存性および信頼性について不安を抱くということ、を意味している。例えば、真菌感染症を治療するためにフル

コナゾールなどのアゾールベースの化合物を常用することで、この化合物の臨床的治療価値が激しく損なわれた。条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを使用してフルコナゾールの細胞標的と相互作用する遺伝子産物を同定することにより、フルコナゾール耐性に対抗する。かかる産物を使用することによって、フルコナゾールと併せて用いて不活性化した場合に相乗効果を発揮し、その結果フルコナゾールを単独で使用した際に見られるこの化合物に対する耐性を克服する薬物標的を同定する。これは例えば、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを使用して薬物耐性を増強する遺伝子を過剰発現させることにより達成される。かかる遺伝子としては、ATP結合カセット（ABC）トランスポーターおよび多剤耐性（MDR）排出ポンプを含む新規または公知の形質膜輸出体、多面的薬物耐性（PDR）転写因子、およびプロテインキナーゼおよびホスファターゼを挙げることができる。あるいは、示差的な薬物感受性を明確に示す遺伝子を、標的セットの個々のメンバーを低下されたレベルで（テトラサイクリンプロモーターを介したハプロ不全または閾値発現のいずれかにより）発現している条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株をスクリーニングすることにより同定する。かかる遺伝子を同定することにより、既存の抗真菌治療薬の効能を高めるために薬物ベースの不活性化の標的としうる薬物耐性機構についての重要な手掛かりが提供される。

【０３１３】

本発明の別の態様では、全細胞アッセイを目的とする前記標的遺伝子の過剰発現は、テトラサイクリンプロモーター系以外のプロモーターによって支援される（第5.3.1節および第6.2節を参照されたい）。例えば、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）Pgla Aプロモーターを使用してアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の薬物標的遺伝子を過剰発現させる。サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）では、PGK1プロモーターがグルコース存在下で強力な構成的発現を提供することが知られている（Guthrie,C.およびG.R.Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods Enzymol. 194:373-398を参照されたい）。

【０３１４】

本発明の別の態様では、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクション内で中程度の発現レベルを示す薬物標的各々を遺伝子操作して、独自の全細胞アッセイ開発用にあつらえた菌株を提供することができる。本発明のこの実施形態では、転写がほんの一部だけ抑制されるように決定した濃度のテトラサイクリンを含有する培地で条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を成長させる。これらの条件下では、その発現レベルを、構成的に発現される過剰産生株のものと野生株のものとの間の発現レベルで、また該野生株の発現レベルより低い発現レベルで維持することが可能である。つまり、細胞の生存に不可欠な最低発現レベルを滴定することが可能である。遺伝子発現をこの臨界状態まで抑制することにより、機能突然変異の部分的欠損により生じる表現型と類似した新規表現型（すなわち低次形質型突然変異の表現型模写）を作り出し、全細胞アッセイの開発および薬物スクリーニングに適用可能な別の標的発現レベルを提供することができる。必須遺伝子の残りのアレルの発現を生存に不可欠な閾値レベルまで抑制することにより、結果として、この必須遺伝子の産物に対して活性な化合物により高い感受性を示す菌株が提供されるだろう。

【０３１５】

5.5.2.4　タグ付き菌株の使用

本発明のさらに別の態様では、１つ以上の特有のオリゴヌクレオチド配列タグすなわち「バーコード」を、有効な標的のヘテロ接合性菌株コレクション中に含まれる個々の突然変異株に組み込む。特定の好ましい実施形態では、２個の特有の配列タグを各条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株に組み込む。これらの配列タグの存在により、薬物スクリーニングに代わる全細胞アッセイアプローチが可能となる。複数の標的菌株を（個別よりむしろ）混合集団内で同時にスクリーニングして特定の薬物標的とその阻害物質との間の表現型を同定することができる。

【０３１６】
バーコード化した全てのヘテロ接合型必須菌株コレクション標的セットからなる混合集団を使用し、化合物の存在下で成長させる前および後の該混合集団における各菌株の相対的発現量を比較することにより、大規模な平行分析を実施する。特有のバーコードを付した菌株の薬物依存性枯渇または過剰発現を、該混合集団内の全バーコードをPCR増幅および蛍光標識し、得られたPCR産物を相補的オリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズさせることによって測定する。好適な実施形態では、２個の配列タグを各条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株に組み込み、その結果、前記相補的オリゴヌクレオチドアレイとのハイブリダイゼーションによって２つのシグナルを生成させる。従って、少なくとも２個の配列タグを使用することにより、前記集団中に存在する各条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の発現量のより正確な測定を提供する。バーコード化菌株間での示差的な発現は遺伝子特異的過敏性または耐性を意味しており、また対応する遺伝子産物が試験する化合物の分子標的となりうることを意味している。

【０３１７】
ある特定の実施形態では、前記突然変異株は条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株であって、この条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株セットの各々が少なくとも１個、好ましくは２個の特有の分子タグを含んでおり、またこれらのタグは通常、前記標的遺伝子を異種の条件発現されるプロモーターの制御下に置くために使用するプロモーター置換カセット内に組み込まれている。各分子タグは試験しようとする前記菌株セットの全メンバーに共通するプライマー配列に挟まれている。試験しようとする化合物の存在下および非存在下、抑制および非抑制培地中で成長させる。各菌株の相対的な成長を、組み込んだ配列タグを有するコレクション全てを同時にPCR増幅することによって評価する。

【０３１８】
本発明のある非限定的態様では、蛍光プライマーを用いて非対称的な様式でPCR増幅を行う。得られる１本鎖核酸生成物は表面に固定されたオリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズしており、対応する相補的配列セット全てを含んでいる。次いで、各蛍光分子タグ配列のレベルを解析し、試験する化合物の存在下および非存在下における、それらの培地中での該セットのGRACE株の相対的成長量を評価する。

【０３１９】
従って、試験する前記セットの条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株各々に対して、本発明の方法のある非限定的実施例においては、生き残っている集団内で見出される対応分子タグのレベルについて４つの値が得られるだろう。それらの値は、試験しようとする化合物の存在下および非存在下両方における、抑制および非抑制条件下での細胞成長に相当するだろう。該試験化合物の存在下および非存在下での成長を比較することにより、各セットの成長培地についての値すなわち「指標（indicator）」が得られる。つまり、抑制および非抑制条件下で得られる指標である。ここでもやはり、これら２つの指標値を比較することにより、試験する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株セットのその特定のメンバーにより担持されている改変アレル遺伝子対によって発現される遺伝子産物に対して前記試験化合物が活性であるかどうかが明らかとなるだろう。

【０３２０】
本発明のさらに別の態様では、前記のヘテロ接合型タグ付きまたはバーコード化コレクション中の潜在的な薬物標的遺伝子各々を、その後Tetプロモーターまたは別の強力な構成的に発現されるプロモーター（例えばCaACT1、CaADH1およびCaPGK1）のいずれかを残る無傷のアレルの上流に導入することによって、過剰発現させることができる。これらの構築により、混合集団の薬物感受性研究で使用する個々の必須遺伝子がコードする標的遺伝子産物の投与量をさらに増大させることが可能となる。過剰発現それ自体が該集団の多数のメンバーの正常な成長速度を乱す可能性があるものの、依然として偽の（mock）および

薬物処理した混合培養物間で信頼のおける比較を行って化合物特異的な成長差を確認することができるだろう。

【０３２１】

サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）では、3‐アミノ‐トリアゾール、ベノミル、ツニカマイシンおよびフルコナゾールを含む幾つかの十分に特性決定された化合物の分子薬物標的を同様のアプローチによって同定した。この研究では、HIS3、TUB1、ALG7、およびERG11（すなわち上記化合物それぞれに対する薬物標的）中にヘテロ接合型突然変異を有するバーコード化菌株に、それらの各化合物を投与した場合、混合集合中で共に成長させた際に他のヘテロ接合型バーコード化菌株よりも有意に高い感受性を示した。

【０３２２】

本発明の別の態様では、前記標的菌株に対して活性な化合物を少なくとも１つ含む化合物の複合混合物を用いて抗真菌化合物のスクリーニングを実施することができる。前記条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションをタグ付けまたはバーコード化することにより、遺伝子セットを同定および評価し、さらに最終的には特定の遺伝子セット内の個々の標的を評価するのに必要な、多数の大規模な解析が容易となる。例えば、バーコード化条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを用いる混合集団薬物スクリーニングは、包括的な全細胞アッセイとしてうまく機能する。該コレクション内の個々の必須標的遺伝子に作用する化合物を同定するには、最少量の複合化合物ライブラリーを用いれば十分である。これを実施する際に該コレクションのアレイを作製する必要は無い。また、該ライブラリーを薬物スクリーニングに供する前に、いずれか特定の化合物ライブラリーの「豊かさ（richness）」に関して説得力のある予想を立てることができるだろう。その後、例えば炭水化物ベースの化学ライブラリーが天然産物または合成的化合物ライブラリーよりも高い殺菌活性を有するかどうかを判断することが可能となる。薬物スクリーニングに利用できる標的およびアッセイの優先順位に従って、いずれかの分子複合ライブラリー中の特に有力な化合物を直ちに同定しかつ評価することができる。あるいは、本発明では、この情報を、混合集団試験において特定の化合物ライブラリーにより不活性化されることが実証された標的のみをその後のアレイフォーマット済みスクリーニング手段に含めるものとする「あつらえた」スクリーニングの開発に適用する。

【０３２３】

伝統的には、薬剤探索プログラムは個別の、または限られたセットの有効な薬物標的を当てにしてきた。先に記載した例は、かかるアプローチがもはや不要であること、また高性能な標的評価および薬物スクリーニングが本発明により可能となったことを強調するものである。しかし、個々の標的の選択をベースとする指向性アプローチも、薬剤探索プログラムの専門性、関心、方針、または予算によっては今後も好んで使用されるであろう。

【０３２４】

5.4.3　動物モデル系における標的の評価

現在、必須薬物標的の有効性は、標準的な実験室条件下での遺伝子不活性化効果を調べることにより実証される。標準的な実験室条件下で非必須であると見なされた推定上の薬物標的遺伝子を動物モデルで、例えば該標的遺伝子内の欠失についてホモ接合型菌株の病原性をその野生型に対して試験することにより、調べることができる。しかし、必須薬物標的は動物モデル研究の対象外とされている。従って、最も望ましい薬物標的がそれらの標的を評価するのに最適な条件から除かれている。

【０３２５】

本発明の実施形態では、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の条件発現性突然変異必須株コレクションにより提供される条件発現によって、宿主環境内での標的の有効性に関するこの昔ながらの制約を克服する。条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異必須菌株を接種したマウスを使用し、条件発現によって遺伝子の不活性化に及ぼす効果を調べることにより、動物研究を実施す

ることができる。アスペルギルス症モデルマウスの例については、例えばMatsumotoら、(2000) Antimicrob. Agents and Chemother 44(3):619-21およびBrownら、(2000) Mol.Microbiol. 36(6):1371-80およびBowmanら、(2001) Antimicrob. Agents and Chemother 45(12):3347481およびDannaouiら、(1999) J Med Microbiol 48(12):1087-93を参照されたい。本発明の好ましい実施形態では、致死性接種材料である条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異必須株を注射したマウスに及ぼす効果を、該マウスに適切な濃度のテトラサイクリンを与えると薬物標的遺伝子の発現が不活性化されるかどうかによって決定することができる。従って、実験室条件下で必須であると実証された遺伝子発現の欠如を、死に至るアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）感染の予防と関連付けることができる。このタイプの実験では、テトラサイクリンを補充した水で「処理した」マウスのみが感染しても生き残ると予想される。何故なら、該標的遺伝子の不活性化により、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株病原体が宿主内で死滅したからである。

【０３２６】

本発明のさらに別の実施形態では、前記該標的遺伝子の発現を調節するための温度応答性プロモーターまたは特定の薬物標的の温度感受性アレルを使用して、該遺伝子が30℃で機能するが正常体温のマウス内では不活性化されるようにすることにより、条件発現を達成することができる。

【０３２７】

前記条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションまたはその所望のサブセットもまた、動物モデル系においてその獲得された耐性／抑制を評価したり、または不活性化された薬物標的についての殺菌性／静真菌性表現型を識別したりするのに非常に適している。本発明のこの実施形態では、異なる必須薬物標的遺伝子発現が抑制された条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を、テトラサイクリンを補充した水で飼育したマウスに接種するだろう。次に、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株各々を、これらの菌株を感染させた別個のマウス集団での死亡頻度を基準として比較するだろう。感染マウスの大部分は、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株内でテトラサイクリン依存性不活性化により該必須遺伝子の真菌細胞死が生じたために健康を維持するものと予想される。しかし、薬物標的を担持する条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株は遺伝子外サプレッサーを発達させる傾向が強い。何故なら、かかる菌株は殺菌性標的というよりはむしろ静真菌性標的であって、また宿主環境内で活性な代替的生理的過程によって抑制されているからであり、このことはこの特定の菌株に感染したマウスで検出される致死感染の発生率の高さによって同定することができる。この方法により、個々の薬物標的遺伝子が宿主環境内で耐性を生じさせうる可能性を評価／ランク付けすることができる。

【０３２８】

5.4.4 結合化合物の合理的設計

本明細書中に記載したようなアッセイを介して同定される化合物は、例えば病原菌の成長を阻止する際、および／または感染症状を改善する際に有用でありうる。かかる化合物としては、限定するものではないが、他の細胞タンパク質を挙げることができる。また結合化合物としては、限定するものではないが、例えば標的遺伝子産物膜貫通受容体の細胞外部分を含む、例えば可溶性ペプチドなどのペプチド、ならびにD‐および／またはL‐立体配置のアミノ酸からなるランダムペプチドライブラリーのメンバー（例えば、Lamら、1991, Nature 354:82-84およびHoughtenら、1991, Nature 354:84-86を参照されたい）、合理的に設計された抗ペプチド性ペプチド（例えばHurbyら、Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides, “In Synthetic Peptides, A User’s Guide, W.H.Freeman, NY (1992), pp.289-307を参照されたい）、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラもしくは１本鎖抗体、

ならびにFAb、F(ab)’$_2$およびFAb発現ライブラリーのフラグメント、およびそのエピトープ結合性フラグメントを含むがこれらに限定されない）、ならびに有機小分子もしくは無機小分子を挙げることができる。受容体型標的分子の場合、かかる化合物としては、ECDに結合して前記天然リガンド（すなわちアゴニスト）により引き出される活性を模倣する有機分子（例えばペプチドミメティック(peptidomimetics)）、ならびにペプチド、抗体またはそのフラグメント、およびECD（もしくはその一部）を模倣して「中和する（neutralize）」天然リガンドに結合する他の有機化合物を挙げることができる。

【０３２９】

コンピュータモデリング技術およびコンピュータ検索技術により、標的遺伝子の発現もしくは活性をモジュレートしうる化合物の同定、または既に同定されている化合物の改良が可能となる。かかる化合物または組成物を同定した後は、その活性部位または領域を同定することが好ましい。受容体分子に影響を及ぼす化合物の場合、かかる活性部位は、典型的には受容体それ自体とリガンドとの相互作用ドメインなどの、リガンド結合部位でありうる。該活性部位を、例えばペプチドのアミノ酸配列から、核酸のヌクレオチド配列から、または関連のある化合物もしくは組成物とその天然リガンドとの複合体の研究により、当分野で公知の方法を用いて同定する。後者の場合、化学的手法またはX線結晶解析法を使用してその因子上のどこに複合体化リガンドが見出されるかを検出することにより、活性部位を見つけ出す。

【０３３０】

次に、好ましくは、前記活性部位の３次元幾何学構造を決定する。これは完全な分子構造を決定する、X線結晶構造解析法を含む公知の方法によって行う。また、固相または液相NMRを使用して、前記活性部位および／または前記リガンド結合複合体中の特定の分子内距離を測定する。当業者に公知の他の実験的構造決定方法を使用して、部分的または完全な幾何学構造を得ることもある。決定した前記活性部位構造の精度を高める天然または人工の複合体化リガンドを用いて、幾何学的構造を測定する。コンピュータベースの数値モデリング方法を使用して（例えば不完全な構造もしくは不十分な精度の構造が決定されている実施形態において）該構造を完成させるかまたはその精度を改善する。

【０３３１】

最後に、経験的に、モデリングにより、またはそれらを組み合わせることにより前記活性部位の構造を決定した後は、化合物をその分子構造についての情報と併せて含有するデータベースを検索することによって候補モジュレート化合物を同定する。かかる検索では、前記で決定した活性部位構造と合致しかつ該活性部位を規定する基と相互作用する構造を持つ化合物を探し出す。かかる検索は手動で行っても良いが、好ましくはコンピュータを使用する。この検索で見出されたこれらの化合物は、潜在的な標的または経路遺伝子産物モジュレート化合物である。

【０３３２】

一般に、前記方法では、各必須遺伝子によってコードされるポリペプチドの３次元構造を例えばX線結晶構造解析またはNMRを用いて決定し、さらにコンピュータ支援によるモデリングプログラムで決定した構造の座標を利用して前記のコードされるポリペプチドと結合しかつ／または該ポリペプチドの活性もしくは発現レベルをモジュレートする化合物を同定することを基本としている。従って、該方法では次の３つの基本工程、すなわち１）コードされる組換え（または内因性）ポリペプチドの解析用高純度結晶を作製する工程、２）該ポリペプチドの３次元構造を決定する工程、および３）コンピュータ支援による「結合(docking)」プログラムを使用して化合物構造と該ポリペプチドとの分子相互作用を解析する工程（すなわち薬物スクリーニング）、を採用する。

【０３３３】

上記の各工程を実施するための一般的手法を以下に記載するが、これらの手法もまた当業者に周知である。本明細書中に記載したものを含め、当業者に公知のいかなる方法も、同定された必須遺伝子産物各々の３次元構造を作製し、これを薬物スクリーニングアッセイにおいて使用する際に採用することができる。

【０３３４】
本明細書中で同定したアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子産物を、合理的ドラッグデザインのための分子標的として使用する。ある実施形態では、該必須遺伝子産物の３次元構造をX線結晶解析を用いて決定し、得られた結晶学的データをコンピュータによる薬物スクリーニングアッセイに使用することによって、該必須遺伝子産物に結合しかつその量または活性をモジュレートしうる物質を同定する。
【０３３５】
特別な条件下では、分子は濃縮され、溶液から、結晶配列の最小反復容積である単位格子によって規定される非常に整然とした結晶格子となる。かかる単位格子の内容物は、特定の電磁波および粒子波（例えば、X線、中性子ビーム、電子ビームなど）と相互作用してそれらを回折しうる。前記結晶格子の対称性により、回折された波同士が相互作用して回折パターンを生じる。この回折パターンを測定することにより、結晶解析学者は該結晶中の原子の３次元構造を再構築しようとする。
【０３３６】
結晶格子はその単位格子の対称性および該単位格子が包含する何らかの構造モチーフによって特徴付けられる。例えば、任意の１結晶格子について230通りの対称グループが考えられる上に、この結晶格子グループ内の単位格子は該結晶格子を構成する分子に応じて任意の次元をとることができる。ただし、生体高分子は非対称中心を持つため、対称グループは前記230通りのうちの65通りに限られている（Cantorら、Biophysical Chemistry, Vol.III, W.H.Freeman and Company (1980)を参照されたい。この文献は引用によりその全内容が本明細書中に含まれるものとする）。
【０３３７】
結晶格子は、前記単位格子内の原子間距離と同じ桁数の波長を有するそれぞれX線や電子ビームなどの電磁波または粒子波と相互作用する。回折波は該結晶に隣接して配置された検出表面上に並んだ点として測定される。各点は３次元配置hkl、および強度I(hkl)を有し、これら両方を使用して、いわゆる電子密度方程式（Electron Density Equation）を用いて該結晶の３次元電子密度を再構築する。この電子密度方程式によれば、該単位格子の３次元電子密度とは構造要素をフーリエ変換したものである。従って、理論上、検出空間内の十分な数の点に対して複数の該構造要素が知られている場合には、該単位格子の３次元電子密度を該電子密度方程式により算出することができるだろう。
【０３３８】
本発明の別の態様は、本発明の結晶および／または該結晶から得られる３次元座標を含むデータセットを薬物スクリーニングアッセイで使用する方法を含む。本発明はさらに、本発明の方法により同定される新規物質（モジュレーターまたは薬物）を提供し、併せて本発明の方法により同定される物質（モジュレーターまたは薬物）を必須遺伝子産物の活性を阻害するかまたはその量をモジュレートするために使用する方法も提供する。
【０３３９】
この薬物スクリーニング方法は構造ベースのドラッグデザインを当てにしている。この場合、前記必須遺伝子産物の３次元構造を決定し、コンピュータモデリングを併せて用いて潜在的なアゴニストおよび／または潜在的なアンタゴニストを設計する（Buggら、Scientific American, Dec.:92-98(1993)およびWestら、TIPS, 16:67-74(1995)およびDunbrackら、Folding and Design, 2:27-42(1997)）。しかし、本明細書中で同定される必須遺伝子産物の３次元構造はこれまで知られていない。このため、高品質の結晶構造解析データを得られるほど高い質を有するこれら遺伝子産物の結晶を得る必要がある。さらに、かかる結晶の３次元構造を決定する必要がある。また最終的には、かかる結晶構造解析データを基にした、関連構造をベースとするドラッグデザインのための手法が必要である。
【０３４０】
コンピュータ解析は、QUANTA、CHARMM、FlexX、INSIGHT、SYBYL、MACROMODELおよびICM（Dunbrackら、Folding and Design, 2:27-42(1997)）を含む１以上のコンピュータプログラムを用いて実施することができる。本発明のこの態様のさらに別の実施形態では、前

記で得られた３次元構造を好ましくは結合コンピュータプログラムと併せて用いることにより、最初の薬物スクリーニングアッセイを実施する。かかるコンピュータモデリングは、DOC、FlexX、GRAMおよびAUTO DOCK（Dunbrackら、Folding and Design, 2:27-42(1997)）などの結合プログラムを１以上用いて実施することができる。

【０３４１】

本明細書中で提供される各薬物スクリーニングアッセイについては、いずれかの、または全ての工程を何度も反復して実施することによりその選択を最適化できることが当然理解されよう。本発明の薬物スクリーニングアッセイでは、物質または薬物とアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子産物との間の相互作用を測定するための数多くの手段をいずれも使用することができる。

【０３４２】

かかるアッセイの１つでは、NMRベースの方法論を用いて、本発明の必須遺伝子に結合するように薬物を具体的に設計することができる（Shukerら、Science 274:1531-1534(1996)を参照されたい。この文献は引用によりその全内容が本明細書中に含まれるものとする）。NMR分光学および構造予測。パルスフィールド勾配３重共鳴プローブ（pulsed-field gradient triple resonance probe）を備えたVarian Unity Plus 500およびUnity 600分光計を使用し、Bagbyら（Cell 82:857-867(1995)を参照されたい。この文献は引用によりその全内容が本明細書中に含まれるものとする）によって記載されたようにして解析して、23℃におけるNMRスペクトルを記録した。基本骨格の^{1}H、^{15}N、および^{13}C原子の逐次共鳴割当は、増強された感受性（MuhandiramおよびKay, J.Magn.Reson., 103:203-216(1994)）と最小H_2O飽和（Kayら、J.Magn.Reson., 109:129-133(1994)）を用いる以外は以前に記載された実験（Bagbyら、Biochemistry, 33:2409-2421(1994)）と類似した複数の３重共鳴実験の組み合わせを用いて行った。側鎖^{1}Hおよび^{13}Cの割当は、溶液中で8msと16msとの混合時間を用いるHCCH-TOCSY（Baxら、J.Magn.Reson., 87:620-627 (1990)）実験を使用して行ったが、この割当は構造予測の際には使用しなかった。２次元^{1}H-^{1}HNOE分光学（NOESY）、３次元^{15}N校正NOESY-HSQC（Zhangら、J.Biomol, NMR, 4:845-858(1994)）および３次元同時補足^{15}N／^{13}C校正NOE（Pascalら、J.Magn.Reson., 103:197-201(1994)）スペクトルにおける核オーバーハウザー効果（NOE）のクロスピークは、100msNOE混合時間を用いて得た。中心平均化のために、標準的な擬似原子距離補正技術（Wuthrichら、J.Mol.Biol., 169:949-961 (1983)）を取り入れた。メチル基に関する距離については、その上限にさらに0.5Åを足した（Wagnerら、J.Mol.Biol., 196:611-639(1987)およびCloreら、Biochemistry, 26:8012-8023(1987)）。

【０３４３】

既に記載された戦略（Bagbyら、Structure, 2:107-122(1994)）を使用し、X-PLOR（Brunger, X-PLOR Manual, Version 3.1, New Haven, Conn.: Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, YaleUniversity(1993)）内で模擬アニーリングプロトコル（Nilgesら、In computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, J.C.Hoch, F.M.PoulsenおよびC.Redfield編、New York:Plenum Press, pp.451-455(1991)）を用いて、前記構造を予測する。ヘリックス内の角度（interhelical angles）を、K.Tapにより作成された社内プログラムを用いて算出した。アクセス可能な表面領域を、J.Thornton教授（University College, London）から入手可能なプログラムNaccessを用いて算出した。

【０３４４】

後述のものを含め、当業者に公知のいずれの方法も、高純度結晶を調製するために利用できる。例えば、同定された必須遺伝子産物の結晶を、バッチ結晶化、蒸気拡散（シッティングドロップ法またはハンギングドロップ法のいずれかを使用）を含むいくつかの技術および微小透析によって成長させることができる。幾つかの場合では、X線線質の結晶を得るために、該結晶をシーディングする必要がある。そのために、結晶の標準的なミクロおよび／またはマクロシーディングを利用することができる。以下に例示したのはハンギングドロップ蒸気拡散方法である。20mM Tris, pH8.0, 100mM NaCl中の必須遺伝子産物（

2.5μl、10mg／ml）のハンギングドロップと、2.7～3.2Mギ酸ナトリウムおよび100mM Trisバッファーを含有する等量の貯蔵用バッファーとをpH8.0にて混合し、４℃で維持する。１～２日後に結晶シャワー（crystal showers）が生じ、これには２～３週間以内に最大サイズ（0.3×0.3×0.15mm^3）まで成長する大きな単一の結晶が含まれている可能性がある。結晶を3.5Mギ酸ナトリウムおよび100mMトリスバッファー中にpH8.0にて回収し、3.5Mギ酸ナトリウム、100mMトリスバッファー、pH8.0、10%（v/v）ショ糖、および10%(w/v)エチレングリコール中で凍結保護処理を行ってから液体プロパン中で瞬間冷凍する。本発明の結晶を成長させた後は、X線回折データを回収することができる。

【０３４５】

従って、本教示内容を有するタンパク質結晶化技術分野の者であれば、過度の実験を行うことなく、多様な異なる生物から得られる必須遺伝子産物の多数の代替形態、またはそれらのアミノ酸配列中で保存的置換が生じている多数のポリペプチドを結晶化することができるだろう。

【０３４６】

必須遺伝子産物を含む結晶の３次元構造を決定した後は、GRAM、DOCK、FlexXまたはAUTODOCK（Dunbrackら、1997、上掲）などの結合プログラムを用いるコンピュータモデリングを使用することによりその活性の潜在的モジュレーターを調べて、これを同定する。この手順には、該潜在的モジュレーターの形状および化学構造がいかに上手く結合するかを確認するための、前記ポリペプチドまたはその断片への該潜在的なモジュレーターのコンピュータフィッティングが含まれていてもよい。コンピュータプログラムを採用して、これら２つの結合パートナー（例えば該必須遺伝子産物とその潜在的モジュレーター）の引力、反発力、および立体障害を評価する。一般に、これらのパートナー同士がよりぴったりとフィットするほどその立体障害は小さくなり、またそれらの引力が強いほどその潜在的モジュレーターは有効である。何故なら、これらの特性は結合定数の強さと一致しているからである。さらに、潜在的薬物の設計が特異的になるほど、該薬物が他のタンパク質とは同じようには相互作用しない可能性が高い。これにより、他のタンパク質との望ましくない相互作用によって副作用が生じる可能性は最小限に抑えられるだろう。

【０３４７】

化合物および化合物類似体を、コンピュータモデリングプログラムを用いて1つ以上の有望な潜在的類似体が同定されるまで組織的に改変することができる。さらに、組織的改変を有する選択した類似体を、その後コンピュータモデリングプログラムを用いて1つ以上の潜在的類似体が同定されるまで組織的に改変することができる。かかる解析は、HIVプロテアーゼ阻害剤を開発する際に有用であることが証明されている（Lamら、Science 263:380-384 (1994)およびWlodawerら、Ann.Rev.Biochem. 62:543-585 (1993)およびAppelt, Perspectives in Drug Discovery and Design 1:23-48 (1993)およびErickson, Perspectives in Drug Discovery and Design 1:109-128 (1993)）。あるいは、例えば組換えバクテリオファージによって作製したランダムペプチドライブラリーを最初にスクリーニングすることによって、潜在的モジュレーターを得ることができるだろう（ScottとSmith, Science, 249:386-390 (1990)およびCwirlaら、Proc.Natl.Acad.Sci., 87:6378-6382(1990)およびDevlinら、Science, 249:404-406 (1990)）。この様式で選択されたペプチドは、その後上記のコンピュータモデリングプログラムを用いて組織的に改変しうる。

【０３４８】

あるいはまた、これらの方法を使用して既知のモジュレート化合物またはリガンドから改良されたモジュレート化合物を同定する。この既知化合物の組成を改変し、改変による構造上の効果を、上記の経験的手法およびコンピュータモデリング方法をこの新規組成物に適用することによって決定する。次に、この変更された構造を前記化合物の活性部位構造と比較して、その適合性または相互作用結果が改善されたかどうかを決定する。この様式では、側鎖上の基の変更などによる組成の組織的変化を迅速に評価して、改善された特異性もしくは活性を示す改変型モジュレート化合物またはリガンドを得る。

【０３４９】

標的もしくは経路遺伝子または遺伝子産物ならびに関連する形質導入および転写因子の活性部位の同定に基づいてモジュレート化合物を同定するのに有用なさらなる経験的手法およびコンピュータモデリング方法も、当業者には明らかである。

【０３５０】

特定のタンパク質と相互作用する薬物のコンピュータモデリング技術について再検討している記事は数多く存在し、その中には以下のもの、すなわちRotivinenら、1988, Acta Pharmaceutical Fennica 97:159-166およびRipka, (June 16, 1988), New Scientist 54-57およびMcKinalyとRossmann, 1989, Ann.Rev.Pharmacol.Toxiciol. 29:111-122およびPerryとDavies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp.189-193(Alan R.Liss, Inc. 1989)およびLewisとDean, 1989 Proc.R.Soc.Lond. 236:125-140と1-162、ならびに核酸成分のモデル受容体に関してはAskewら、1989, J.Am.Chem. Soc. 111:1082-1090が含まれる。

【０３５１】

結合を変更しうる化合物の設計および作製については、概ね先に記載したが、天然産物または合成化学物質、ならびにタンパク質などの他の生物学的に活性な物質を含む公知化合物のライブラリーを阻害剤または活性剤である化合物についてスクリーニングすることもできるだろう。

【０３５２】

5.5 転写プロファイリング

5.5.1 遺伝子発現の解析

遺伝子発現プロファイリング技術は、好適な生化学標的を同定し、また公知化合物の作用形態を決定するための重要なツールである。アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ゲノムの大規模な配列決定およびこの情報を盛り込んだ核酸マイクロアレイの開発により、この2倍体病原菌についてゲノム規模の遺伝子発現解析を実行することができるだろう。従って本発明は、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の必須および毒性／病原性遺伝子両方についての転写応答プロファイルを得る方法を提供する。必須遺伝子の条件発現は、例えばアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）を対象とした薬物スクリーニングプログラムを設計する際に有用な調節性相互作用を言葉で説明するのに役立つ。

【０３５３】

本発明の実施形態では、前記条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションをこの病原体における必須遺伝子の発現解析のために使用する。かかる株コレクションの特に有力な適用例では、該病原体内の全必須遺伝子セットまたは必須遺伝子の所望のサブセットについての総合的転写プロファイルデータベースの構築を含む。かかるデータベースを使用して、リード抗真菌化合物の応答プロファイル特性を新規抗真菌化合物を用いて得られたプロファイルと比較し、それらを類似した作用形態を持つものと異なる作用形態を持つものとに分類する。前記菌株をリード化合物で処理した後に決定された転写応答プロファイルと、抑制条件下で特定の必須標的遺伝子を用いて得られたプロファイルとの一致（または一部重複）を利用して、該標的と該薬物の考えられる作用形態とを同定する。

【０３５４】

必須遺伝子の遺伝子発現解析により、前記病原体内でそれらの遺伝子の生物学的機能および調節について調べることも可能となり、それによって得られる情報を薬物スクリーニングプログラムに盛り込む。例えば、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）内の必須薬物標的の転写プロファイリングによって、既存の薬物標的について見出されたものと同一の細胞過程または経路に関与しているが該病原体内で直接試験しなければ同定されなかったであろう新規薬物標的を同定することが可能となる。これには該病原体に特有の遺伝子だけでなく、該病原体内で異なる機能を持つかまたは異なる調節を受ける広範な遺伝子クラスが含まれる。さらに、病原体特異的な経路を初めて見出し、これを活用することができる。

【０３５５】
本発明の別の態様では、非抑制条件下または誘導条件下における条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の遺伝子発現プロファイルを確立して、１以上の薬物標的についての過剰発現応答プロファイルを評価する。例えば、シグナル伝達経路で機能する遺伝子が過剰発現されると、かかる条件下では該経路の無秩序な活性化が見られることが多い。さらに、幾つかのシグナル伝達経路は発症過程で機能することが実証されている。条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を過剰発現させることによって作製した転写応答プロファイルにより、かかる経路によって調節される遺伝子セットに関する情報が提供される。これらの遺伝子セットのいずれかが病原機構において必須の役割を果たしている可能性があり、そのため有望な薬物標的となりうる。さらに、該発現プロファイルを解析すれば、その発現がその後の全調節カスケードの発現にとって極めて重要である遺伝子を１つ以上明らかにすることができる。従って、これらの遺伝子は薬剤探索のための特に重要な標的であり、対応する改変アレル対を持つ遺伝子を担持する突然変異体は作用機構ベースのスクリーニングアッセイの基礎を成す。現在はこのようなアプローチは不可能である。現行の薬剤探索の実施では、その作用形態が殆ど理解されていない極めて多数の「候補」化合物を見出すに過ぎない。条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを使用して作製した遺伝子の発現停止(shut-off)および過剰発現プロファイル両方を含む転写応答データベースは、１）野生株において抗真菌性阻害の結果得られる転写応答またはプロファイルを決定し、そして２）この応答を、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションを含む薬物標的を不活性化または過剰発現して得られる転写プロファイルと比較することによって、薬剤探索時の障害に対する解決策を提供する。

【０３５６】
薬物標的の遺伝的変更と野生型細胞の化学物質／化合物阻害とから得られる、一致するかまたは有意に関連し合う転写プロファイルにより、該化合物とその細胞内薬物標的とを結びつける根拠が提供され、またその作用機構が示唆される。

【０３５７】
従って、本発明は、配列番号2001～2594のうちの１つを含むヌクレオチド配列によってコードされる標的遺伝子産物、ならびにアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）で発現される場合にはそのゲノムの配列番号1～594および配列番号1001～1594によってコードされる遺伝子産物に対して化合物を評価する方法を提供し、ここで該方法は以下の工程、すなわち（ａ）野生型2倍体真菌細胞または対照細胞を該化合物と接触させて、第１の転写プロファイルを作成する工程、（ｂ）該標的遺伝子の第２のアレルが大幅に過少発現されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養された条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株などの突然変異型真菌細胞の転写プロファイルを決定し、この培養細胞についての第２の転写プロファイルを作成する工程、および第１の転写プロファイルを第２の転写プロファイルと比較して、それらのプロファイル間における類似点を特定する工程、を含む。比較のために、プロファイルにおける類似点を指示値で表すことができる。尚、この指示値が高いほど、その化合物は好ましいとされる。

【０３５８】
5.5.2　２次標的の同定

２次標的を同定するための方法を本明細書中に記載する。「２次標的」とは、本明細書中で使用する場合、その遺伝子産物が規定のセット条件下で生物の成長および／もしくは生存に関わる標的遺伝子産物（すなわち標的必須遺伝子産物）、または宿主感染中のその生物の発症機構に関与する標的遺伝子産物（すなわち標的毒性遺伝子産物）と相互作用する能力を示す遺伝子を指す。

【０３５９】
タンパク質‐タンパク質相互作用を検出するのに適したいずれの方法も、遺伝子産物と

標的遺伝子産物との相互作用を同定することによって２次標的遺伝子産物を同定するために使用できる。かかる公知の遺伝子産物は細胞内タンパク質であっても細胞外タンパク質であってもよい。かかる公知の遺伝子産物と相互作用する遺伝子産物は２次標的遺伝子産物に相当し、またそれらをコードする遺伝子は２次標的に相当する。

【０３６０】

幾つかの従来の方法のうち、採用したのは免疫共沈降法、架橋法および密度勾配またはクロマトグラフカラムを介した同時精製法である。こうした手法を利用することにより、２次標的遺伝子産物の同定が可能となる。２次標的遺伝子産物を同定した後は、これを標準的技術と併せて使用して、その対応する２次標的を同定する。例えば、この２次標的遺伝子産物の少なくとも一部のアミノ酸配列を、エドマン分解法（例えば、Creighton, 1983, “Proteins: Structures and Molecular Principles,” W.H.Freeman and Co., N.Y., pp34-49を参照されたい）などの当業者に周知の技術を用いて確認する。得られたアミノ酸配列は、２次標的遺伝子配列をスクリーニングする際に使用できるオリゴヌクレオチド混合物を作製するためのガイドとして使用できる。スクリーニングは、例えば標準的なハイブリダイゼーションまたはPCR法によって達成できる。オリゴヌクレオチド混合物を作製するための技術およびスクリーニング技術は周知である（例えば、Ausubel,上掲、を参照されたい。またPCRプロトコルについては、A Guide to Methods and Applications, 1990, Innis,M.ら編: Academic Press, Inc.,New Yorkを参照されたい）。

【０３６１】

加えて、規定のセット条件下で生物の成長および／もしくは生存に関わるタンパク質、または宿主感染中のその生物の発症機構に関与するタンパク質と相互作用するタンパク質をコードする２次標的を同時に同定する方法を採用する。これらの方法には、例えば、これらの機構に関与するかもしくは該機構にとって極めて重要であることが知られているかまたは示唆されている標識１次標的遺伝子タンパク質を用い、このタンパク質を周知技術であるλgt11ファージライブラリーの抗体プロービングと似た様式で使用することにより、発現ライブラリーを探索する方法が含まれる。

【０３６２】

In vivoでのタンパク質相互作用を検出する方法の１つ、ツーハイブリッドシステムについて詳細に記載するが、これは単に例示を目的とするものであって、限定するものではない。このシステムの１バージョンについては既に文献に記載されており（Chienら、1991, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 88:9578-9582）、これはClontech社（Palo Alto, CA）から市販されている。

【０３６３】

簡単に述べると、かかるシステムを利用して、2つのハイブリッドタンパク質をコードするプラスミドを構築する。該タンパク質の一方は、公知のタンパク質（この場合には生物の成長または病原性に関与することが知られているタンパク質）に融合させた転写活性化因子タンパク質のDNA結合ドメインからなり、他方はcDNAライブラリーの一部としてこのプラスミドに再結合させたcDNAによってコードされる未知のタンパク質に融合させた該活性化因子タンパク質の活性化ドメインからなる。その調節領域が該転写活性化因子の結合部位を含有しているリポーター遺伝子（例えばlacZ）を含有する酵母サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）株を該プラスミドで形質転換する。いずれか一方のハイブリッドタンパク質単独では該リポーター遺伝子の転写を活性化することはできない。これは、前記DNA結合ドメインハイブリッドは活性化機能を提供せず、また前記活性化ドメインハイブリッドは前記活性化因子の結合部位を特定の場所に配置できないからである。これら２つのハイブリッドタンパク質の相互作用によって機能的活性化因子タンパク質が再構成され、その結果、前記リポーター遺伝子が発現され、これが該リポーター遺伝子産物に対するアッセイにより検出される。

【０３６４】

このツーハイブリッドシステムまたは関連の方法を使用して、活性化ドメインライブラリーを公知の「ベイト（bait）」遺伝子産物と相互作用するタンパク質をスクリーニング

する。例示するためであって限定するものではないが、標的必須遺伝子産物および標的毒性遺伝子産物をこのベイト遺伝子産物として使用する。該標的必須遺伝子産物、標的毒性遺伝子産物、もしくはその一部をコードする総ゲノムまたはcDNA配列を、活性化ドメインをコードするDNAと融合する。このライブラリーと、DNA結合ドメインに融合させた前記ベイト遺伝子産物のハイブリッドをコードするプラスミドとを用いて、酵母リポーター株を同時形質転換し、得られた形質転換体から該リポーター遺伝子を発現するものをスクリーニングする。例えば、限定するものではないが、該ベイト遺伝子をベクター中にクローニングして、該遺伝子が翻訳時にGAL4タンパク質のDNA結合ドメインをコードするDNAに融合されるようにする。これらのコロニーを純化し、該リポーター遺伝子の発現を担う前記ライブラリープラスミドを単離する。次いでDNA配列解析法により該ライブラリープラスミドによってコードされるタンパク質を同定する。

【０３６５】

ベイト遺伝子産物と相互作用するタンパク質が検出される細胞株のcDNAライブラリーを、当分野で慣習的に実施されている方法を用いて作製する。本明細書中に記載した特定のシステムに従って、例えば、前記cDNA断片をベクター中に挿入して、該断片が翻訳時にGAL4の活性化ドメインに融合されるようにする。このライブラリーを該ベイト遺伝子－GAL4融合プラスミドと共に用いて、GAL4活性化配列を含むプロモーターによって駆動されるlacZ遺伝子を含有する酵母株を同時形質転換する。GAL4活性化ドメインに融合された、ベイト遺伝子産物と相互作用するタンパク質をコードするcDNAにより、活性なGAL4タンパク質が再構成され、その結果前記lacZ遺伝子の発現が促される。lacZを発現するコロニーは、X-gal存在下で青色を呈することにより検出される。次に、このcDNAをこれらの菌株から精製し、これを使用し、当分野で慣例的に行われている技術を用いて、ベイト遺伝子と相互作用するタンパク質を生産し単離する。

【０３６６】

2次標的を同定し単離した後は、本発明の方法によりさらに特性決定を行って薬剤探索のために使用する。

【０３６７】

5.5.3　遺伝子発現アレイの使用

プロファイリングを実施するために、遺伝子発現アレイおよびマイクロアレイを使用することができる。遺伝子発現アレイとは、ガラス表面、シリコン、ナイロン膜上などの特定の位置に配置されたDNA試料からなる高密度アレイである。かかるアレイは、様々な条件下での相対的な遺伝子発現を定量化するために研究者らによって使用される。この技術の１例は米国特許第5807522号に記載されている。尚、この文献は引用により本明細書中に含まれるものとする。

【０３６８】

１つのアレイを使用して、特定微生物のゲノム内の実質的に全ての遺伝子の発現を研究することが可能である。例えば、かかるアレイはアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）由来のORFに対応するPCR産物を含有する12×24cmのナイロンフィルターで構成されていてもよい。各PCR産物10ngを該フィルター上に1.5mm毎にスポットする。１本鎖標識cDNAを該アレイへのハイブリダイゼーション用に調製し（第２鎖合成または増幅工程は行わない）、該フィルターと接触するよう配置する。従って、この標識cDNAは「アンチセンス」方向に配置されている。リン光カメラ（phosphorimager）を用いて定量分析を行う。

【０３６９】

全細胞mRNA試料から作製したcDNAをかかるアレイにハイブリダイズさせて、その後当業者に公知の様々な技術を１つ以上用いて結合を検出することにより、cDNAがハイブリダイズしているアレイ上の各位置におけるシグナルが提供される。すなわち、該アレイ上の各位置で得られるハイブリダイゼーションシグナルの強度は、この試料中に存在している特定の遺伝子に対するmRNAの量を反映する。従って、様々な条件下で生育させた細胞から単離したmRNAについて得られた結果を比較することにより、この様々な条件下で生育させて

いる間の個々の遺伝子の相対的な発現量を比較することが可能となる。

【０３７０】

遺伝子発現アレイを使用して、真菌の増殖、毒性または病原性に必要とされる遺伝子産物のレベルまたは活性が低下した後の様々な時点における全mRNA発現パターンを解析する。該遺伝子産物のレベルまたは発現の低下は、前記調節プロモーターに連結された核酸の産物が真菌の生育、生存、増殖、毒性もしくは病原性の律速段階となっている条件下で条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を生育させるか、またはこの細胞を該標的遺伝子産物のレベルもしくは活性を低下させる物質と接触させることにより達成される。該アレイへのハイブリダイゼーションにより示された発現パターンの解析により、該遺伝子産物のレベルまたは活性の低下によってその発現が影響を受けるその他の遺伝子についての情報が得られる。例えば、他のmRNAのレベルが、生育、生存、増殖、毒性もしくは病原性に必要とされる遺伝子産物のレベルまたは活性が低下した後に増大するか、低下するか、または同程度で留まることに気付くことができる。従って、生育、生存、増殖、毒性もしくは病原性に不可欠な遺伝子産物のレベルまたは活性が低下した後に観察されるmRNA発現パターンにより、生育、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な他の核酸が同定される。さらに、該真菌を候補薬物化合物または公知の抗生物質に暴露した場合に観察されるmRNA発現パターンを、真菌の生育、生存、増殖、毒性または病原性に必要とされる遺伝子産物のレベルまたは活性が低下した後に観察されるものと比較する。該候補薬物化合物を用いた場合に観察されるmRNA発現パターンが遺伝子産物のレベルが低下した場合に観察されるものと類似している場合、この薬物化合物は有望な治療用候補物質といえる。従って、このアッセイは薬物開発に使用するための有望な候補薬物化合物の選択を支援する点で有用である。

【０３７１】

前記アレイ上に載せた核酸の供給源および前記アレイにハイブリダイズしている核酸の供給源が２種の異なる生物から得たものである場合、遺伝子発現によりこの２種の生物間で相同性を示す遺伝子が同定される。

【０３７２】

5.6　プロテオミクスアッセイ

本発明の別の実施形態において、および条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションにより病原体内での転写プロファイリングが可能となる非常に良く似た方法においては、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションにより、ゲノムから発現されたタンパク質相補体（protein complement）を解析するための貴重な情報源が提供される。抑制および非抑制的生育条件下における条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクションメンバーによる総体的なタンパク質発現を評価することにより、細胞のタンパク質発現パターンと必須遺伝子の非発現または発現レベルとを関係付けることができる。従って本発明は、2次元ゲル電気泳動法などのタンパク質発現パターンを確立するために当分野で周知の方法により決定される、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株における１セットのタンパク質の発現パターンを提供する。条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を、様々な条件下にて、異なる発現レベルを示す改変アレルの一方を用いて培養した場合、該菌株について複数のタンパク質発現パターンが作成されるだろう。

【０３７３】

さらに別の実施形態においては、規定された遺伝的突然変異を構築することにより、今まで特性決定されていなかった化合物で前記菌株を処理した際に観察されるタンパク質発現プロファイルと類似したプロファイルを呈する菌株を作り出すことができる。このやり方では、複数の標的に複雑な様式で作用する抗真菌化合物を、特有の真菌特異的標的に作用しかつその作用形態を決定しうる他の潜在的リード化合物と区別することができる。

【０３７４】

細胞内で発現される全タンパク質相補体の評価は、２次元ポリアクリルアミドゲル上で、または他の分離方法にて検出可能な全てのタンパク質種の確定同定に依存している。しかし、これらのタンパク質の重要な画分は量が少なく、ペプチド配列解析または質量分析によって確定同定を行うのに必要とされる閾値レベルを下回る。にもかかわらず、これらの「オーファン(orphan)」タンパク質は、個々の条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株によるタンパク質発現を解析することで検出可能である。存在量の少ない遺伝子産物を条件発現させた場合、抑制条件に対する非抑制条件下または過剰発現条件下における条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株のタンパク質プロファイル同士を比較することによってそれらを確実に同定することが容易になる。幾つかの場合、問題とする存在量の少ない遺伝子を操作することによって間接的に生じる、複数のタンパク質の定常レベルの変化が原因で、より複雑なタンパク質プロファイルが生じる。また、個々の標的を条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株コレクション内で過剰発現させることで、ペプチド配列解析または質量分析を行うのに十分な量の材料を提供することによって、オーファンタンパク質の同定を直接促すこともできる。

【０３７５】

様々な実施形態において、本発明は、2倍体病原性真菌細胞で発現されるタンパク質相補体の定量分析方法を提供する。該方法では、前記標的遺伝子に対して２つの未改変アレルを有する対照2倍体病原菌について、第１のタンパク質発現プロファイルを作成する。例えば破壊カセットを挿入するかまたは該カセットで置換することにより、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株内の該標的遺伝子の一方のアレルが不活性化されている該対照菌株の突然変異体を作製する。もう一方のアレルを、この第２のアレルの発現が異種調節プロモーターの制御下に置かれるように改変する。この第２のアレルが、対照菌株中の該遺伝子の２つのアレルの発現と比較した場合に実質的に過剰発現される条件下で、この突然変異型菌株について第２のタンパク質発現プロファイルを作成する。同様に、所望であれば、この第２のアレルが対照菌株中の遺伝子の２つのアレルの発現と比較した場合に実質的に過剰発現される条件下で、第３のタンパク質発現プロファイルを作成する。次に、第１のタンパク質発現プロファイルを第２の発現プロファイル、および可能であれば第３の発現プロファイルと比較し、第１のプロファイルでのレベルと比べて第２のプロファイルでより高いレベルにて検出される発現タンパク質、また可能であれば第３のプロファイルでより低いレベルにて検出される発現タンパク質を同定する。

【０３７６】

従って、本発明は、配列番号2001～2594および配列番号7001～7603のうちのいずれか１つを含むヌクレオチド配列によってコードされる標的遺伝子産物、ならびにアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）で発現される場合にはそのゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、および6001～6603によってコードされる標的遺伝子産物に対して化合物を評価する方法を提供し、該方法は以下の工程、すなわち（ａ）野生型2倍体真菌細胞または対照細胞を該化合物と接触させて、第１のタンパク質発現プロファイルを作成する工程、（ｂ）該標的遺伝子の第２のアレルが大幅に過少発現されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養された条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株などの突然変異型2倍体真菌細胞のタンパク質発現プロファイルを決定し、該培養細胞についての第２のタンパク質発現プロファイルを作成する工程、および第１のタンパク質発現プロファイルを第２のタンパク質発現プロファイルと比較して、それらのプロファイル間における類似点を特定する工程、を含む。比較のために、それらのプロファイル間における類似点を指示値として表すことができる。この指示値が高くなるほどその化合物は望ましいとされる。

【０３７７】

5.7　医薬組成物およびその使用

本発明の方法により本明細書中に記載したようにして同定した核酸分子を含む化合物を

、治療上有効な投与量で被験体に投与して、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）などの病原性生物による感染を治療または予防することができる。標的によっては、該化合物は被験体において、非感染性の疾患、例えばこれに限定するものではないが癌、を治療する際にも有用である。治療上有効な投与量とは、治療した被験体に健康上の利益をもたらすのに十分な化合物（核酸分子を含む）の量を意味する。典型的には、これによって限定されるものではないが、該化合物は、配列番号2001～2594および7001～7603からなる群から選択される配列を含む核酸によってコードされる遺伝子産物、ならびにアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）で発現される場合にはそのゲノムの配列番号1～594、5001～5603、1001～1594、6001～6603によってコードされる遺伝子産物の活性またはレベルを低下させることで作用する。治療しようとする被験体は植物、脊椎動物、哺乳動物、鳥類、またはヒトであってよい。これらの化合物を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）による物体の汚染を防止もしくは阻止するために使用することもできるし、またはアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）を含むバイオフィルムの該物体表面上での形成を防止または阻止するために使用することもできる。アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）を含むバイオフィルムは、手術道具、移植用機器、カテーテルおよびステントを含むがこれらに限定されない医療機器の表面上に見出される。

【０３７８】

5.7.1　有効な投与量

化合物の毒性および治療効果は、細胞培養物または実験動物において、例えばLD_{50}（集団の50％に対して致死である投与量）やED_{50}（集団の50％に対して治療上有効な投与量）を決定するための標準的製薬手法により決定することができる。毒性を示す投与量と治療効果を示す投与量との比率が治療指数であり、LD_{50}／ED_{50}で表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を使用してもよいが、非感染細胞に与えうる損傷を最小限に抑え、それによって副作用を低減するためには、かかる化合物を罹患組織部位に送り込む送達系を設計する際に注意が必要である。

【０３７９】

前記の細胞培養物アッセイおよび動物研究で得られたデータを、ヒトに使用するための投与量範囲を決定する際に使用することができる。かかる化合物の投与量は、好ましくはED_{50} を含むが殆どまたは全く毒性を持たない循環濃度範囲内とする。該投与量を、採用する投与形態および利用する投与経路に応じてこの濃度範囲内で変更することができる。本発明の方法で使用するいずれの化合物についても、その治療上有効な投与量をまず細胞培養物アッセイから概算することができる。細胞培養において決定したIC_{50}（すなわち症状の最大阻害値の半分を達成する試験化合物濃度） を含む循環血漿濃度範囲を達成する投与量を、動物モデルにおいて決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有効な投与量をより正確に決定することができる。血漿レベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィーにより測定することができる。有用な投与量は、0.001mg／kg体重～10mg／kg体重の範囲をとりうる。

【０３８０】

5.7.2　製剤と使用

本発明に従って使用する医薬組成物は、１以上の生理学的に許容される担体または賦形剤を用いる従来の様式で製剤化することができる。

【０３８１】

従って、この化合物ならびにその生理学的に許容される塩および溶媒を、吸息もしくは吸入（口または鼻を介する）または経口、舌下、非経口または直腸投与による投与のために製剤化することができる。

【０３８２】

経口投与用であれば、前記医薬組成物を、結合剤（例えばトウモロコシα化デンプン、ポリビニルピロリドンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、増量剤（例えば、ラクトース、微結晶性セルロースもしくはリン酸水素カルシウム）、滑沢剤（例えばス

テアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ）、錠剤分割物質（例えばジャガイモデンプンもしくはグリコール酸ナトリウムデンプン）、または湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）などの製薬上許容される賦形剤を用いて従来の方法により調製される形態、例えば錠剤またはカプセルの形態とすることができる。錠剤は当分野で周知の方法により被膜することができる。経口投与用の液体調製物は、例えば溶液、シロップもしくは懸濁液形態とすることができるし、またはそれらを使用前に水または他の適当なビヒクルを用いて構成するための乾燥製品とすることもできる。かかる液体調製物を、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体もしくは食用の硬化油脂）、乳化剤（例えばレシチンもしくはアカシア）、非水性ビヒクル（例えばアーモンド油、油性エステル、エチルアルコールもしくは分取した植物油）、および保存剤（例えばメチルもしくはプロピル‐p‐ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）などの製薬上許容される添加剤を用いて従来の方法により調製することができる。この調製物は必要に応じて緩衝塩、香料、着色料および甘味料をさらに含んでいてもよい。

【０３８３】

経口投与用調製物を適切に製剤化することにより、活性化合物の放出を制御することができる。

【０３８４】

舌下投与用であれば、前記組成物を従来の様式で製剤化した錠剤またはトローチ剤の形態とすることができる。

【０３８５】

吸入による投与の場合、本発明に従って使用する前記化合物を、適切な高圧ガス、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロメタン、二酸化炭素または他の適切なガスを用いて、加圧パックまたはネブライザーからエアゾールスプレーの形態で送達すると都合が良い。加圧エアゾールの場合、一定量を送達するためのバルブを備え付けることによって投与単位を決定することができる。吸息器もしくは吸入器で使用するための、前記化合物とラクトースやデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物を含有する、例えばゼラチン製のカプセルまたはカートリッジを処方することができる。

【０３８６】

前記化合物を、例えば静脈内ボーラスまたは持続性輸注などを介した注入による非経口投与（すなわち静脈内または筋肉内投与）のために処方することができる。注入用製剤は、単位投与形態、例えばアンプルまたは複数回投与用容器に保存剤を添加した形態とすることができる。該組成物は油性または水性ビヒクル中で懸濁液、溶液または乳液などの形態をとることができ、また懸濁化剤、安定剤および／または分散剤などの製剤用物質を含有していてもよい。あるいは、その活性成分を使用前に適切なビヒクル、例えば発熱成分を含まない滅菌水で構築するための粉末形態としてもよい。

【０３８７】

また前記化合物を、例えばカカオバターや他のグリセリドなどの従来の坐剤ベースを含有する坐剤や停留浣腸剤などの直腸用組成物中に処方することもできる。

【０３８８】

既に記載した製剤に加えて、前記化合物をさらに持続性調製物として使用することもできる。かかる長時間作用型製剤は、移植（例えば皮下注射もしくは筋肉内投与による）または筋肉内注射により投与することができる。従って、例えば、該化合物を適切な高分子材料もしくは疎水性材料（例えば許容可能な油中の乳液として）またはイオン交換樹脂と共に、あるいはやや溶けにくい誘導体、例えばやや溶けにくい塩として処方することができる。

【実施例】

【０３８９】

6.　実施例

6.1　アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）からのゲノムDNAの単離

市販の単離キット（DNEasy Plant Mini Kit, Qiagen, Inc.）を使用し、後述のささいな変更を加えた以外は製造業者の指示に従って、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株からゲノムDNAを単離した。簡単に述べると、湿らせた接種用ループを用いて、コンフルエントなプレートから胞子を回収し、掬い取ったこの胞子を24ウェル培養皿中の培地表面に接種することによって菌糸体を培養した。該胞子は該培地に回旋接種して均等に生育するようにし、この培養皿を振とうすることなく37℃で約14～16時間インキュベートした。菌糸体は空気と培地との接触面である培地表面で成長した。

【０３９０】

前記菌糸体を滅菌したつまようじを用いて回収し、滅菌ペーパータオルの間に挟んだ。この菌糸体を絞って過剰な水分を取り除き、回収した菌糸体を5～10分間乾燥させた。この半乾きの菌糸体を、滅菌つまようじを用いてBio101 Homogenizing Matrixチューブ内に入れた。各チューブに400μlの溶菌バッファー（バッファーAP1）を加え、該チューブをBio101 FastPrep Apparatus（Qbiogene）に入れ、速度設定を５として30秒間動かし、その後微量遠心管中で４℃、最大速度にて２分間遠心分離した。

【０３９１】

ゲノムDNAを含有する上清を滅菌1.5mlチューブに移し、100mg／mL RNアーゼ溶液４μlを各チューブに加え、これらのチューブを65℃で10分間インキュベートした。およそ130μlのタンパク質沈殿バッファー（バッファーAP2）を加え、該チューブを攪拌し、氷上で約５分間インキュベートした。得られた上清を、２ml回収チューブ内にセットした供給QIAシュレッダースピンカラム(lilac)にアプライし、微量遠心管中最大速度にて２分間遠心分離した。流通（flow-through）画分を、細胞残屑ペレットを巻き上げないようにして滅菌チューブに移し、0.5容量のDNA沈殿バッファー（バッファーAP3）および1容量のエタノール（96～100%）をこの清澄上清に加えてから、該チューブを数回転倒させることにより混合した。該上清を、形成されていたかもしれない全ての沈殿物を含め、650μlのアリコートとして2ml回収チューブ（供給）内にセットした供給DNeasyミニスピンカラムにアプライした。該カラムを微量遠心管中8000rpm以上で１分間遠心分離し、流通画分および回収チューブを廃棄した。該DNeasyカラムを供給2ml回収チューブ内に置いて500μlの洗浄バッファー（バッファーAW）を加え、このDNeasyカラムを微量遠心管中8000rpm以上で約１分間遠心分離した。流通画分を廃棄し、100μlの予熱（56～65℃）した溶出バッファー（バッファーAE）を加えることによりゲノムDNAを２回溶出させた。上記プロトコールでは通常、約50～100ngのゲノムDNA／μl（およそ200μlの溶出量）が得られる。

【０３９２】

6.2 AfHIS3遺伝子のプロモーター置換および条件発現

後述の実施例により、線状プロモーター置換カセットを用いる相同的組換えによってアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子のプロモーター置換および条件発現を達成しうることが実証される。

【０３９３】

6.2.1 AfHIS3プロモーター置換カセットの調製

前記AfHIS3遺伝子は、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）が外因性ヒスチジン欠損最少培地で成長するのに不可欠なイミダゾールグリセロールリン酸脱水酵素をコードしている。該AfHIS3遺伝子のプロモーターを、線状プロモーター置換カセットを用いて調節可能な異種プロモーターと置き換えた。このプロモーター置換カセットは、該AfHIS3プロモーターに隣接する、ヌクレオチド配列同一性を有する領域間での相同的組換えによってゲノム中に組み込まれるよう設計した。該カセットが適切に組み込まれると、該AfHIS3プロモーターが欠失し、かつアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）内で機能するアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）のグルコアミラーゼプロモーターPglaAが導入される。このカセットはまた、組み込み形質転換体を選択しかつ容易に同定するための、選択マーカーをコードする遺伝子、すなわちアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子をも含有する。

【０３９４】

前記AfHIS3遺伝子のヌクレオチド配列を、隣接する5’および3’非翻訳配列を含めて配列番号4001に示す。このゲノム配列に基づいて、プロモーター置換カセット（配列番号4002）を３つの別個の核酸断片から構築した。AfHIS3プロモーター上流のヌクレオチド配列を含む第１の断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4003および4004）は配列番号4001のヌクレオチド1～195を含む核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4003）は配列番号4001および4002のヌクレオチド1～20に相当する。下流プライマー（配列番号4003）は配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該領域の１つであるヌクレオチド27～46は、前記AfHIS3プロモーター（配列番号4001のヌクレオチド175～195）に対して相補的であり、またヌクレオチド1～26は前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子断片の5’末端（配列番号4002のヌクレオチド196～221）に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中で10ngのアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた221bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従ってアガロースゲルから精製した。

【０３９５】

前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子およびPglaAプロモーターを含有する第２の核酸断片を、野生型pyrG遺伝子を含有するプラスミドpGUS64の誘導体（Verdoesら、Gene 145:179-187(1994)）を鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4005および4006）は、配列番号4002のヌクレオチド196～3915を含有する核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4005）は配列番号70のヌクレオチド196～215に相当し、また下流プライマー（配列番号4006）は配列番号4002のヌクレオチド3897～3917に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中で10ngのpDXT5に各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた3,722bp断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０３９６】

前記AfHIS3遺伝子のATG開始コドンの下流から始まるヌクレオチド配列を含む第３の断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4007および4008）は、配列番号4002のヌクレオチド3916～4202を含む核酸断片を増幅するよう設計した。下流プライマー（配列番号4008）は配列番号70のヌクレオチド4186～4205に対して相補的である。上流プライマー（配列番号4007）は配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該領域の１つであるヌクレオチド1～21は前記pyrG－PglaA断片の3’末端（配列番号4002のヌクレオチド3896～3915）に相当し、またヌクレオチド22～41は前記AfHIS3コード配列の最初の20個のヌクレオチド（配列番号4002のヌクレオチド3916～3935）に相当する。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用して、総容量50μlの増幅バッファー中で10ngのプラスミドに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた306bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０３９７】

全長AfHIS3プライマー置換カセットを、前記の３種の断片から３方向PCR（three-way PCR）を使用して構築した。該プロモーター置換カセットを構築するために、第１および第３の核酸断片のPCR産物各25ngを100ngの第２の核酸断片（すなわち前記pyrG－Pgla断片）に添加し、この試料をPCR増幅に供した。AfHIS3プロモーター隣接領域に相当するヌクレオチド配列を含むこの２つの核酸（すなわち第１および第３の核酸断片）は、各々該pyrG

－Pgla断片の一方の末端に対して相補的なヌクレオチド配列を含む5’オーバーハングを含有している。変性時にこの5’オーバーハングのヌクレオチド配列が該pyrG－Pgla断片中に存在する相補的配列にアニーリングして、DNAポリメラーゼにより伸長しうる遊離3’末端を持つ短い２本鎖DNA領域が生成する。前記３断片のうちの２つを含有する中間PCR産物を第３の断片にアニーリングさせるか、または３つ全てを同時にアニーリングさせると、その後の伸長によって３つの核酸断片全てを含む全長産物が生成する。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4003および配列番号4008）を最終濃度0.4μMにて前記反応混合物に加えることにより、配列番号4002のヌクレオチド1～4,205に相当する全長プロモーター置換カセットが生成する。このヌクレオチド配列を自動化DNA配列解析法により確認した。

【０３９８】

得られた4,205bpのヌクレオチドからなるプロモーター置換カセットは、前記AfHIS3プロモーターのすぐ上流に195個のヌクレオチドを含有しており、またATG開始コドンから始まるAfHIS3コード配列のうちの最初の289個のヌクレオチドと機能しうる形で配置されたアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子およびPglaAプロモーターを含む3,721個のヌクレオチドを含有している。

【０３９９】

6.2.2　アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）プロトプラストの形質転換

6.2.2.1　菌糸体の成長および回収

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株の胞子約10^9個からなるアリコートを、ウリジンおよびウラシルを補充した非選択培地、例えばアスペルギルス（Aspergillus）完全培地（ACM）250mlに接種し、この培養物を250rpmで振とうしながら30℃で約14～16時間インキュベートした。インキュベーション後、該培養物を顕微鏡でチェックして、菌糸体球が形成されたかどうかを調べた。菌糸体球がはっきり確認できない場合、該培養物を37℃でさらに2～3時間インキュベートし、菌糸体球の形成を促した。250mlの1次培養物から約10通りの形質転換手順を実施することができる。

【０４００】

前記菌糸体を、内側に滅菌したチーズクロスを張った漏斗を取り付けた吸引フラスコを用いる濾過によって回収した。回収した菌糸体を0.6Mの冷$MgSO_4$滅菌溶液25mlで洗浄し、洗浄した菌糸体を約１分間乾燥させた。該菌糸体を滅菌スパチュラを用いて回収することにより前記チーズクロスから取り除き、これをチューブに入れた。ここでの菌糸体量は、最適なプロトプラスト形成のためには該チューブの容量のわずか20％を占める程度が最適である。

【０４０１】

6.2.2.2　プロトプラストの調製および回収

前記で回収した菌糸体約10ml容量を50mlコニカルチューブに入れ、浸透培地（1.2M $MgSO_4$, 10mM $NaPO_4$, pH5.8）の滅菌溶液を該チューブに加えて最終容量50mlとした。該菌糸体を0.5～1分間ボルテックスミキサーにかけて分散させた。別の2mlチューブにて、250mgのDriselase酵素（Interspex Products, San Mateo, Ca）を約1mlの浸透培地に加え、これを氷上で5分間放置した。このチューブを14,000×Gで30秒間の短い遠心分離にかけて、酵素デンプン担体をペレット化した。デンプン担体を取り除くのに失敗すると、プロトプラストを得る際に問題が生じる可能性がある。この酵素上清を滅菌チューブに移し、400mgのβ－D－グルカナーゼ（Interspex Products, San Mateo, Ca）を加えた。この酵素混合物を溶解して50mlの菌糸体調製物に加え、チューブを転倒させることにより混合した。

【０４０２】

前記チューブの中身を500mlの三角フラスコに注ぎ、100～125rpmで振とうしながら30℃で2.5時間インキュベートした。プロトプラスト形成の進行は、形成が完了するまでの様々な時点にて顕微鏡を用いて調べた。プロトプラスト形成は通常２時間以内に完了する。このプロトプラスト懸濁物を、数個の50mlコニカルチューブに、各チューブにわずか10ml

容量ずつ加えることにより分注した。この懸濁物に、等量の滅菌Trapping Buffer（0.1M Tris-Cl, pH7.0中に0.6Mソルビトールを含有）を、これら2層が混ざらないよう注意しながら静かに重層した。これらのチューブを、スイングバケット式ローターで3,000×Gにて15分間遠心分離した。浸透培地／Trapping Buffer界面に形成される、プロトプラストを含有する白濁層をトランスファーピペットで取り出し、各試料を合わせた。

【０４０３】

前記で合わせた試料を、10,000×gまで許容のプラスチック製遠心チューブに入れ、等量の滅菌STCバッファー（10mM Tris-HCl, pH7中に1.2Mソルビトール、10mM $CaCl_2$を含有）を加えた。このプロトプラスト試料を、8,000×g、4℃で8分間遠心分離することにより、該プロトプラストをペレット化した。この試料の上清を、該ペレットを巻き上げないように注意しながら取り除いた。該ペレットをトランスファーピペットを用いて5mlのSTCバッファー中に穏やかに再懸濁し、このプロトプラスト試料を、8,000×g、4℃で8分間遠心分離することにより、該プロトプラストをペレット化した。前記のSTCバッファー洗浄工程をさらに２回繰り返し、得られたプロトプラストを１つのチューブにまとめ、形質転換に適した容量（約100μlのプロトプラスト懸濁物／形質転換反応）に再懸濁した。

【０４０４】

6.2.2.3 プロトプラストの形質転換

約2.5μgの前記AfHIS3プロモーター置換カセットを、丸底15mlファルコンチューブ（VWR Scientific）内のSTCバッファー20μlに加えた。約100μlのプロトプラスト調製物アリコートと50μlのPEG溶液（10mM Tris-HCl, pH7.5中に60％PEG3350, 10mM $CaCl_2$を含有）とを加え、この試料を室温にて25分間インキュベートした。インキュベーション後、1mlのPEG溶液を加え、このチューブを静かに回転させて内容物を混合し、氷上に10分間放置した。各チューブに5mlのSTCバッファーを加え、この溶液を十分に混合した。このプロトプラスト試料を、8,000×g、4℃で8分間遠心分離することにより、各チューブのプロトプラストをペレット化した。該ペレットを巻き上げないよう注意しながら各試料の上清を取り除き、各ペレットを100μlのSTCバッファー中に穏やかに再懸濁した。得られた形質転換混合物を選択培地、例えばソルビトールを添加したウラシルおよびウリジン欠損アスペルギルス（Aspergillus）最少培地（例えば、Pontecorvoら、Adv.Genet. 5:141-238(1953)）上に塗布した。このプレートを37℃で48時間インキュベートし、その後解析した。

【０４０５】

6.2.3 AfHIS3プロモーター置換を含む株の単離

約15個の典型的なpyrG＋ヘテロカリオン形質転換体を、単離した単一コロニーについて画線培養し、誘導条件下（すなわちマルトース存在下）のヒスチジン欠損最少培地プレート上では生育できるが非誘導条件下（すなわちキシロース存在下）では生育できないコロニーをスクリーニングした。約６個のコロニーがかかる表現型を呈した。アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）は非相同的組換えを介してDNAを組み込むことが知られているので、各形質転換体におけるこの組み込み事象の完全性をQiagen 2X HotStar Amplification Kit(Qiagen, Inc.)を用いたPCR解析により確認した。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4003および4008）を２つ１組で使用して、各形質転換体の連結領域にまたがるヌクレオチド配列を含む核酸分子を増幅した。前記カセットが適切に組み込まれると1,230bpの増幅産物が得られるのに対し、内因性AfHIS3遺伝子が増幅されると4,689bpの断片が生成する。1,230bpの断片の存在を示すコロニーをさらなる解析のために保存した。

【０４０６】

6.2.4 3-アミノトリアゾールに対する滴定

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）は、前記HIS3遺伝子産物を標的とするカタラーゼ阻害剤である3-アミノトリアゾール（3-AT）に対し感受性を示す。従って、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）の生育を阻害するのに十分な3-AT濃度は、細胞中に存在するHIS3遺伝子の量に依存する。このため、前記置換プロモーターによる前記AfHIS3遺伝子の調節は、該AfHIS3遺伝子が一定の発現レベルを

超えて特異的に発現されるようにその生育条件を変更することにより、また、その結果得られる菌株の3‐ATに対する感受性の変化を示すことにより実証することができる。

【０４０７】

例えば、様々な炭素供給源または様々な比率の炭素供給源を補充した培地中で、前記のように組み込まれたPglaAプロモーターを含有する形質転換細胞を培養することにより、AfHIS3遺伝子産物量を内因性レベルと比べて増加させるかまたは減少させて、HIS3遺伝子産物の量に基づく3-ATへのより高いもしくはより低い感受性を示す細胞を作製することができる。例えば、前記PglaAプロモーターからの転写はマルトースの存在下で誘導され、キシロースの存在下で抑制され、またグルコース上で生育させた細胞からはその中間程度の活性レベルが検出されることが知られている。培地中のマルトース対キシロースの比率を調整することによって、その転写量を少なくとも段階的な様式で滴定し、細胞内の転写レベルを調節することができる。マルトース（例えば2%マルトース）存在下で生育させた細胞は3-ATの存在下で耐性が高まったが、逆にキシロース（例えば1%キシロース）存在下で生育させた細胞は3-ATに対する耐性が低下した。

【０４０８】

6.3 相同的組換えによるアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ALB1遺伝子の置換

後述の実施例により、線状遺伝子置換カセットを用いる相同的組換えによってアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子コード配列の欠失および選択マーカーをコードする遺伝子による置換を達成しうることが実証される。本実施例では、前記pyrGマーカー遺伝子から開始される転写は、前記AfALB1遺伝子の転写と同じ方向である。

【０４０９】

6.3.1 AfALB1遺伝子置換カセットの調製

前記アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）のALB1遺伝子は、分生子の呈色に関与するポリケチド合成酵素をコードする。例えば、該ALB1遺伝子のコード配列中に見出される特定の突然変異により、緑色ではなく白色の分生子が生産され、これは目視検査によって容易に判定できる。前記AfALB1遺伝子置換カセットは、該AfALB1遺伝子に隣接する、ヌクレオチド配列同一性を有する領域間での相同的組換えによりゲノム内に組み込まれるよう設計した。該カセットの適切な組み込みにより該AfLAB1遺伝子が欠失し、組み込み形質転換体の選択および容易な同定のために使用しうるアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子（例えば、Verdoesら、Gene 145:179-187 (1994)を参照されたい）が導入される。

【０４１０】

前記AfALB1遺伝子の塩基配列を、隣接する5’および3’非翻訳配列を含めて配列番号4009に示す。このゲノム配列に基づいて、前記AfALB1遺伝子置換カセット（配列番号4010）を３つの別個の核酸断片から構築した。該AfALB1遺伝子上流のヌクレオチド配列を含む第１の断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4011および4012）は配列番号4010のヌクレオチド1～570を含む核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4011）は配列番号4010のヌクレオチド1～20（配列番号77のヌクレオチド449～468）に相当する。下流プライマー（配列番号4012）は配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該領域の１つであるヌクレオチド21～40はAfALB1コード配列上流のヌクレオチド配列（配列番号4010のヌクレオチド551～570）に対して相補的であり、またヌクレオチド1～20はアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子断片の5’末端（配列番号4010のヌクレオチド571～590）に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中で10ngのアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた590bpの断片を、Qiagen MinElute PCR P

urification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従ってアガロースゲルより精製した。

【０４１１】

前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子を含有する第２の核酸断片を、野生型pyrG遺伝子を含有するプラスミドpGUS64の誘導体（Verdoesら、Gene 145: 179-187 (1994)）を鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4013および4014）は、配列番号4010のヌクレオチド571～2,776を含有する核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4013）は配列番号78のヌクレオチド571～590に相当し、また下流プライマー（配列番号4014）は配列番号4010のヌクレオチド2757～2776に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中で10ngのプラスミドに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた2,206bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０４１２】

前記AfALB1遺伝子下流のヌクレオチド配列を含有する第３の核酸断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4015および4016）は、配列番号4010のヌクレオチド2,757～3,481を含む核酸断片を増幅するよう設計した。下流プライマー（配列番号4016）は配列番号4010のヌクレオチド3,461～3,481に対して相補的である。上流プライマー（配列番号4015）は配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該領域の１つであるヌクレオチド1～21は前記pyrG断片の3’末端（配列番号4010のヌクレオチド2,757～2,776）に相当し、またヌクレオチド21～36は配列番号4010のヌクレオチド2,777～2,792に相当する。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用して、総容量50μlの増幅バッファー中で10ngのプラスミドに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた725bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０４１３】

全長AfALB1遺伝子置換カセットを、前記の３種の断片から３方向PCRを使用して構築した。該遺伝子置換カセットを構築するために、第１および第３の核酸断片（すなわちAfALB1隣接配列）各25ngを100ngの第２の核酸断片（すなわち前記pyrG断片）に添加し、この試料をPCR増幅に供した。AfALB1遺伝子隣接領域に相当するヌクレオチド配列を含む２つの核酸（すなわち第１および第３の核酸断片）は、各々該pyrG断片の一方の末端に対して相補的なヌクレオチド配列を含む5’オーバーハングを含有している。変性時にこの5’オーバーハングのヌクレオチド配列が該pyrG断片中に存在する相補的配列にアニーリングして、DNAポリメラーゼにより伸長しうる遊離3’末端を持つ短い２本鎖DNA領域が生成する。前記３断片のうちの２つを含有する中間PCR産物を第３断片にアニーリングさせるか、または３つ全てを同時にアニーリングさせると、その後の伸長によって３つの核酸断片全てを含む全長産物が生成する。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4011および配列番号4016）を最終濃度0.4μMにて前記反応混合物に加えることにより、配列番号4010の全長、すなわち3,481bpの遺伝子置換カセットが生成した。このヌクレオチド配列を自動化DNA配列解析法により確認した。

【０４１４】

6.3.2　アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）プロトプラストの形質転換および形質転換体の同定

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）のプロトプラストを、上記第6.2節にて概説した方法に従って菌糸体から調製し、およそ2.5ngの前記AfALB1遺伝子置換カセットを使用して該プロトプラストを本質的に上記した通りに形質転換した。該プロトプラストを選択培地（ウラシルおよびウリジン欠損アスペルギルス（Aspergillus）最

少培地）に塗布し、菌糸形質転換体が出現するまで37℃で培養した。単離したヘテロカリオン形質転換体を単離コロニーについて画線培養し、分生子を目視検査した。白色分生子のみを生じたコロニーをその後の解析のために保存した。置換されたALB1遺伝子の存在を、その連結領域にまたがるプライマーを用いたPCR増幅により確認した。

【０４１５】

6.4 相同的組換えによるアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）PYROA遺伝子の置換

後述の実施例により、線状遺伝子置換カセットを用いる相同的組換えによって、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子コード配列の欠失および選択マーカーをコードする遺伝子による置換を達成しうるということのさらなる根拠が提供される。本実施例では、前記pyrGマーカー遺伝子から開始される転写の方向は、AfPYORA遺伝子の転写方向と逆向き（アンチセンス）である。

【０４１６】

6.4.1 PYROA遺伝子置換カセットの調製

PYROA遺伝子はピリドキシン合成に不可欠であり、光感作物質の耐性にも間接的に必要とされる（Osmaniら、J.Biol Chem. 13;274(33):23565-9(1999)）。該PYROA遺伝子コード配列中の突然変異により、ピリドキシン栄養要求体が生成する。前記AfPYROA遺伝子置換カセットは、該AfPYROA遺伝子に隣接する、ヌクレオチド配列同一性を有する領域間での相同的組換えによりゲノム内に組み込まれるよう設計した。該カセットの適切な組み込みにより該AfPYROA遺伝子が欠失し、組み込み形質転換体の選択および容易な同定のために使用しうる前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子（例えば、Verdoesら、Gene 145:179-187 (1994)を参照されたい）が導入される。

【０４１７】

前記AfPYROA遺伝子のヌクレオチド配列を、隣接する5’および3’非翻訳配列を含めて配列番号4019に示す。また隣接するコード配列のヌクレオチド配列を配列番号4017に、その推定アミノ酸配列を配列番号4018に示す。このゲノム配列に基づいて、AfPYROA遺伝子置換カセット（配列番号4020）を３つの別個の核酸断片から構築した。該AfPYROA遺伝子上流のヌクレオチド配列を含む第１の断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4021および4022）は、配列番号4020のヌクレオチド1～576を含む核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4021）は配列番号4020のヌクレオチド1～20（配列番号4019のヌクレオチド568～587）に相当する。下流プライマー（配列番号4022）は配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該領域の１つであるヌクレオチド21～39はAfPYROAコード配列上流のヌクレオチド配列（配列番号4020のヌクレオチド538～557）に対して相補的であり、またヌクレオチド1～21は前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子断片の3’末端（配列番号4020のヌクレオチド558～576）に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中10ngのアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた576bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従ってアガロースゲルより精製した。

【０４１８】

前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子を含有する第２の核酸断片は、野生型pyrG遺伝子を含有するプラスミドpGUS64の誘導体（Verdoesら、Gene 145:179-187 (1994)）を鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4013および4014）は、配列番号4020のヌクレオチド558～2,762を含有する核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4014）は配列番号4020のヌクレオチド558～577に相当し、また下流プライマー（配列番号4013）は配列番号4020のヌクレオチド2,743～2,762に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（

pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca)を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中10ngのプラスミドに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた2,204bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０４１９】

前記AfPYROA遺伝子下流のヌクレオチド配列を含有する第３の核酸断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4023および4024）は、配列番号4020のヌクレオチド2,803～4,343を含む核酸断片を増幅するよう設計した。下流プライマー（配列番号4024）は配列番号4020のヌクレオチド4,324～4,343に対して相補的である。上流プライマー（配列番号4023）は配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該領域の１つであるヌクレオチド1～16は前記pyrG断片の5’末端（配列番号4020のヌクレオチド2,803～2,818）に相当し、またヌクレオチド17～40はAfPYROAコード配列下流のヌクレオチド（配列番号4020のヌクレオチド2819～2,842）に相当する。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca)を使用して、総容量50μlの増幅バッファー中10ngのプラスミドに各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた1,541bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０４２０】

全長AfPYROA遺伝子置換カセットを、前記の３種の断片から３方向PCRを使用して構築した。該遺伝子置換カセットを構築するために、第１および第３の核酸断片（すなわちAfPYROA隣接配列）各25ngを100ngの第２の核酸断片（すなわち前記pyrG断片）に加え、この試料をPCR増幅に供した。AfPYROA遺伝子隣接領域に相当するヌクレオチド配列を含む２つの核酸（すなわち第１および第３の核酸断片）は、各々該pyrG断片の一方の末端に対して相補的なヌクレオチド配列を含む5’オーバーハングを含有している。変性時にこの5’オーバーハングのヌクレオチド配列が該pyrG断片中に存在する相補的配列にアニーリングして、DNAポリメラーゼにより伸長しうる遊離3’末端を持つ短い２本鎖DNA領域が生成する。前記３断片のうちの２つを含有する中間PCR産物を第３の断片にアニーリングさせるか、または３つ全てを同時にアニーリングさせると、その後の伸長によって３つの核酸断片全てを含む全長産物が生成する。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4021および配列番号4024）を最終濃度0.4μMにて前記反応混合物に加えることにより、配列番号4020の全長、すなわち4,343bpの遺伝子置換カセットが生成した。このヌクレオチド配列を自動化DNA配列解析法により確認した。

【０４２１】

6.4.2　アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）のプロトプラストの形質転換および形質転換体の同定

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）のプロトプラストを、上記第6.2節にて概説した方法に従って菌糸体から調製し、およそ2.5ngの前記AfPYROA遺伝子置換カセットを使用して該プロトプラストを本質的に上記した通りに形質転換した。該プロトプラストを選択培地（ウラシルおよびウリジン欠損アスペルギルス（Aspergillus）最少培地）に塗布し、菌糸形質転換体が出現するまで37℃で培養した。単離したヘテロカリオン形質転換体を外因性ピリドキシン含有培地上の単離コロニーについて画線培養し、ピリドキシンの存在下で生育し、非存在下で生育しないコロニーをその後の解析のために保存した。置換されたPYROA遺伝子の存在を、その連結領域にまたがるプライマーを用いたPCR増幅により確認した。

【０４２２】

6.5　AfERG11遺伝子（AfERG11α）の相同体であるAfERG11βの同定およびヌクレオチド配列

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ERG11遺伝子は既にクローニングされ、そのヌクレオチド配列も決定されている（例えば、American Type Culture Co

llection受託番号第36607号、配列番号4025）。このAfERG11遺伝子のアミノ酸配列は病原菌カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）と58％の相同性を有する。AfERG11の推定アミノ酸配列を配列番号4026に示す。

【０４２３】

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ERG11遺伝子のヌクレオチド配列との間に高い相同性を有するアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子のヌクレオチド配列を配列番号4027に示す。この同定されたAfERG11遺伝子とAfERG11β相同遺伝子との間のヌクレオチド配列比較により、このERG11相同体がアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ERG11遺伝子の522個のヌクレオチドからなる領域と58％相同であることが明らかとなった。AfERG11βのアミノ酸配列は配列番号4028の約20位のアミノ酸から約500位のアミノ酸にわたる482個のアミノ酸と63.9％相同である。このアミノ酸配列は、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）ERG11遺伝子と比較した場合、該遺伝子に対して前記AfERG11遺伝子に対する配列相同性とほぼ同程度の相同性を有する。

【０４２４】

カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）およびニューロスポラ・クラッサ（Neurospora crassa）のERG11遺伝子のヌクレオチド配列をそれぞれのゲノムと比較したところ、これらの生物では対応する相同体が1つも同定されなかった。アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）が抗真菌アゾール化合物に対して比較的耐性を示すことは以前に実証されている。他の生物では、かかるアゾール化合物の標的はERG11遺伝子産物であることが知られている。従って、類似してはいるが異なるヌクレオチド／アミノ酸配列を有する別の遺伝子の存在が、観察される耐性に寄与している可能性があり、このためこの遺伝子により、AfERG11ならびにその相同体であるAfERG11βの発現または活性を阻害する物質を同定するための、薬剤探索用の優れた標的が提供される。

【０４２５】

複数のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）株を、AfERG11遺伝子またはAfERG11β遺伝子のいずれかを「ノックアウト」することによって構築した。これらの菌株各々を、２種の代表的なアゾール化合物であるケトコナゾールおよびイトラコナゾールに対する感受性について、寒天密度勾配プレート上で解析して野生型アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）株と比較した。得られたデータは、野生株CEA10がいずれのアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ノックアウト株よりもケトコナゾールおよびイトラコナゾール両方に対してより耐性であることを示唆していた。さらにまた、前記AfERG11βノックアウト株が前記AfERG11αノックアウト株よりもケトコナゾールおよびイトラコナゾール両方に対してより耐性を示すことも明らかとなり、これによりAfERG11βおよびAfERG11αの遺伝子産物はアゾール化合物に対して識別可能な感受性を示すことが実証された。

【０４２６】

従って、AfERG11β遺伝子産物はAfERG11遺伝子産物の機能を補完し、また前記アゾール化合物がAfERG11とAfERG11β遺伝子産物に示差的な阻害効果を及ぼすように思われる。該AfERG11もしくは該AfERG11β遺伝子のうちいずれか一方の、抑制条件下における調節発現、または欠失により、アゾール化合物に対して示差的な感受性を示す改変アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）株が生成し、そのため、これらの菌株はアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）内でAfERG11および／またはAfERG11βによってコードされる生合成工程に対して活性な化合物をスクリーニングするのに適している。加えて、本来のCaERG11遺伝子を欠損しているが前記AfERG11類似体の一方および／または両方を含むカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）突然変異株を作製することができる。コドン使用頻度が異なるため、C.アルビカンス（C. albicans）で発現させるためにはAfERG11およびAfERG11βのヌクレオチド配列を改変しなければならないかもしれない。かかるC.アルビカンス（C. albicans）突然変異株は、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）遺伝子産物に対して阻害活性を示す化合物をスク

リーニングする際に有用かもしれない。

【０４２７】

6.6 AfALG7遺伝子の同定およびそのヌクレオチド配列の決定

他の生物では、前記ALG遺伝子が、タンパク質N-グリコシル化のための脂質結合型オリゴ糖前駆物質を合成する際のドリコール経路において機能することが実証されている。増え続ける証拠は、細胞周期においてこれらの遺伝子が有する何らかの役割を示唆している（Kukuruzinskaら、Biochim Biophys Acta 1999 Jan 6; 1426(2):359-72）。該経路における第１の遺伝子はALG7であり、該遺伝子はドリコール－Ｐ－依存性Ｎ－アセチルグルコサミン－1－Pトランスフェラーゼをコードしている。対応するAfALG7遺伝子をコードするアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ゲノムの一部のヌクレオチド配列を配列番号4029に示す。このコード領域のヌクレオチド配列および該配列から得られる推定アミノ酸配列を、それぞれ配列番号4030および4031に示す。他の生物では、該ALG7遺伝子の産物がツニカマイシンの標的であることが証明されている。そのため、AfALG7によりコードされるポリペプチドは、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）に対して有効な新規抗真菌化合物を開発するための薬剤探索アッセイにおける使用に関して言えば非常に興味深いものである。

【０４２８】

6.7 AfAAD14遺伝子の同定およびヌクレオチド配列の決定

イソプレノイド生合成に関与するアリールアルコール脱水素酵素をコードする遺伝子は、アラビドプシス（Arabidopsis）および大腸菌（Escherichia coli）で同定されている（例えば、特許国際公開広報第99／53071号および欧州特許第1033405号を参照されたい）。対応するAfAAD14遺伝子をコードするアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）ゲノムの一部のヌクレオチド配列を配列番号4032に示す。このコード領域のヌクレオチド配列および該配列から得られる推定アミノ酸配列を、それぞれ配列番号4033および4034に示す。そのコードされるタンパク質は、その活性を阻害する化合物を同定するための薬剤探索アッセイで使用することができる。

【０４２９】

6.8 標的経路の同定

標的経路とは、該経路内の１以上の構成要素（例えば、酵素、シグナル伝達分子など）が本発明の方法によって決定される薬物標的である、遺伝子的または生化学的経路である。

【０４３０】

6.8.1 アッセイ用条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株ストックの調製

スクリーニングする細胞の安定した供給源を提供するために、宿主条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の凍結ストックを標準的な微生物操作技術を使用して調製する。例えば、該微生物の単一クローンを、細胞成長のための栄養と、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が持つ遺伝子によって耐性が付与される抗生物質とを含有する寒天プレート上で元のストックの試料を画線培養することによって、分離することができる。一晩生育させた後、分離したコロニーを該プレートから滅菌針を用いて拾い上げ、これを条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が耐性を示す抗生物質を含有する適切な液体成長培地に移す。これらの細胞を適切な生育条件下でインキュベートし、対数増殖期における培養物を回収する。該細胞を標準的技術を用いて凍結する。

【０４３１】

6.8.2 アッセイで使用するための条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の生育

アッセイを行う前に、ストックバイアルを冷凍庫から取り出して急速解凍し、１ループ分の培養物をその細胞成長のための栄養と該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が持つ遺伝子によって耐性が付与される抗生物質と

を含有する寒天プレート上で画線培養する。一晩生育させた後、ランダムに選択した分離コロニーを該プレートから（滅菌接種ループで）条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が持つ遺伝子によって耐性が付与される抗生物質を含有する培地を入れた滅菌チューブに移す。激しく攪拌して均一な細胞懸濁物とした後、該懸濁物の吸光度を測定し、必要であれば該懸濁物のアリコートを培地と抗生物質とを含む第２のチューブ内で希釈する。次いでこの培養物を、細胞がアッセイで使用するのに適した吸光度に達するまでインキュベートする。

【０４３２】

6.8.3　アッセイで使用する培地の選択

条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株の生育、生存、増殖、毒性または病原性に不可欠な遺伝子に連結された調節プロモーターのインデューサーまたはリプレッサーの2倍希釈系列を、該条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株が持つ遺伝子によって耐性が付与される適切な抗生物質を含有する培養培地で調製する。幾つかの培地を並行して試験し、３～４ウェルを使用して各培地の各濃度における該インデューサーまたはリプレッサーの効果を評価する。等量の試験培地‐インデューサーまたはリプレッサーおよび条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株細胞を384ウェルマイクロタイタープレートのウェルに加え、混合する。細胞を上記した通りに調製し、該マイクロタイタープレートに加える直前に前記試験抗生物質を含有する適切な培地で希釈する。対照として、インデューサーまたはリプレッサーを含有しない各培地を入れた幾つかのウェルにも細胞を加える。細胞成長を、ウェルの吸光度をモニターしながらインキュベートすることによって継続的にモニターする。各濃度のインデューサーまたはリプレッサーにより生じた生育阻害率は、対数増殖速度をインデューサーまたはリプレッサー非含有培地で成長している細胞が呈するそれと比較することにより算出する。インデューサーまたはリプレッサーに対して最も高い感受性を示す培地を、後述のアッセイで使用するため選択する。

【０４３３】

6.8.4　標的遺伝子産物のレベルが律速段階ではない条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株における試験抗生物質感受性の測定

公知の作用機構を有する抗生物質の2倍希釈系列を、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を維持するために使用される抗生物質を補充した、さらなるアッセイ開発用に選択された培地で作製する。異種経路に作用することが知られている試験抗生物質のパネルを、各濃度において試験抗生物質が細胞成長に及ぼす効果を評価するため使用する３～４ウェルを用いて、並行試験する。等量の試験抗生物質および細胞を384ウェルマイクロタイタープレートに加えて混合する。細胞を、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を維持するのに不可欠な前記抗生物質を補充した、アッセイ開発用に選択された培地を用いて上記の通りに調製し、マイクロタイタープレートウェルに加える直前にこれを同一培地にて希釈する。対照として、細胞を抗生物質を含まないが該抗生物質を溶解するために用いる溶媒を含有する数ウェルにも加える。細胞の生育を、マイクロタイタープレートリーダーにてウェルの吸光度をモニターしながらインキュベートすることによって継続的にモニターする。各濃度の抗生物質により生じた生育阻害率は、対数増殖速度を該抗生物質非含有培地で生育する細胞が呈するそれと比較することにより算出する。log[抗生物質の濃度]に対して阻害率をプロットすることにより、各抗生物質についてのIC_{50}値を推定することができる。

【０４３４】

6.8.5　標的遺伝子産物のレベルが律速段階である条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株における試験抗生物質感受性の測定

アッセイで使用するため選択した培養培地に、上記にて所望の量で細胞の生育を阻害することが示された種々の濃度のインデューサーまたはリプレッサー、ならびに条件発現性

アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株維持のために使用される抗生物質を補充する。上記で使用した試験化合物パネルの2倍希釈系列を、これらの培地各々について作製する。各濃度において抗生物質が細胞生育に及ぼす効果を評価するために使用する３～４ウェルを用いて、幾つかの抗生物質を各培地にて並行して試験する。等量の試験抗生物質および細胞を384ウェルマイクロタイタープレートウェルに加え、混合する。細胞を、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を維持するのに不可欠な抗生物質を補充した、本アッセイで使用するため選択した培地を用い、上記の通りに調製する。これらの細胞を1:100で希釈し、所望の量で細胞生育を阻害することが示された種々の濃度のインデューサーを含有する同一培地からなる２つのアリコートとし、適切な成長条件下でインキュベートする。前記マイクロタイタープレートウェルに加える直前に、この培養物を、前記と同濃度のインデューサーおよび条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株を維持するため使用される抗生物質を補充した温かい無菌培地で希釈することにより、適切な吸光度に調整する。対照として、細胞を、試験抗生物質を溶解するため使用する溶媒を含有するが抗生物質を含まない幾つかのウェルにも加える。細胞生育を、適切な生育条件下、マイクロタイタープレートリーダーにてウェルの吸光度をモニターしながらインキュベートすることにより継続的にモニターする。各濃度の抗生物質により生じた生育阻害率は、該抗生物質非含有培地で生育する細胞が呈するものと対数増殖速度を比較することにより算出する。log[抗生物質の濃度]に対して阻害率をプロットすることにより、各抗生物質についてのIC_{50}値を推定することができる。

【０４３５】

6.8.6　試験抗生物質の特異性の決定

真菌の増殖、毒性または病原性に必要とされる遺伝子産物のレベルが律速段階であるかまたは律速段階ではない条件下で公知の作用機構を有する抗生物質によって得られるIC_{50}を比較することにより、真菌の増殖、毒性または病原性に必要とされる遺伝子産物が存在する経路を同定することができる。真菌の増殖、毒性または病原性に必要とされる遺伝子産物を律速段階レベルで発現する細胞が特定の経路を介して作用する抗生物質に選択的な感受性を示す場合、前記条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株において調節プロモーターに連結されている遺伝子によってコードされる遺伝子産物は、該抗生物質が作用する経路に関係している。

【０４３６】

6.8.7　試験抗生物質が作用する経路の同定

上記で論じたように、前記細胞ベースアッセイを使用して試験化合物が作用する経路を決定することもできる。かかる解析では、条件発現性アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）突然変異株パネルの各メンバーにおいて調節プロモーターの制御下に置かれている遺伝子が存在する経路を上記した通りに同定する。真菌の増殖、毒性または病原性に必要とされる公知の生物学的経路内に存在する、増殖、毒性または病原性に必要とされる核酸の転写を指示する調節プロモーターを各々含有する細胞のパネルを、該核酸の遺伝子産物が律速段階であるかまたは律速段階ではない条件下で試験抗生物質が作用する経路を決定することが望まれている該抗生物質と接触させる。該遺伝子産物が律速段階となっている細胞において特定経路内の遺伝子産物に対する感受性の増大が観察され、かつ、これが他の経路内の遺伝子産物を律速段階で発現する細胞では観察されない場合、該試験抗生物質は感受性の増大が観察された経路に作用している。

【０４３７】

6.9　本明細書中に開示したアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子に対応するcDNAの解析

ACM完全培地中で24時間生育させた野生型アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株から全RNAを単離した。市販のキット（RNeasy Plant Mini Kit,カタログ番号第79004号、Qiagen Inc., Ontario, Canada）を使用し、概ね製造業者の指示に従って、菌糸体を回収し、その全RNAを単離した。通常は、菌糸体ペレットを液体窒素中

で凍結し、乳鉢と乳棒を用いてすり潰して粉末とし、塩酸グアニジンとβ－メルカプトエタノールとを含有するバッファー中で溶菌させた。この溶菌液をQIAシュレッダーカラムに通して細胞残屑を取り除き、この試料をホモジナイズした。この清澄化した溶解物をシリカゲル膜にアプライし、洗浄、乾燥し、最終的にRNアーゼを含まない水で溶出させた。

【０４３８】

次に、全RNAをDNアーゼで処理して、混入しているゲノムDNAを除去した。次いで、このDNアーゼ活性を、市販のDNアーゼ不活性化試薬（RNAqueous〔商標〕-4PCR Kit，カタログ番号第1914号、Ambion Inc.，Austin，TX）を使用し、製造業者の指示に従って除去した。

【０４３９】

第１鎖cDNA合成は、鳥類RNアーゼH逆転写酵素、オリゴdTプライマー、試薬、および概ね製造業者の指示に従う条件を用いて実施した（ThermoScript〔商標〕RT-PCR System,カタログ番号第11146-016、Invitrogen，Carlsbad，CA）。

【０４４０】

得られたcDNA産物のPCR増幅は、開始コドンの上流にハイブリダイズするよう設計された順方向プライマーと転写終結コドンの下流にハイブリダイズするよう設計された逆方向プライマーとを用いて実施した。各遺伝子を解析するためには、通常は３個の順方向プライマーと２個の逆方向プライマーを、これらの順方向および逆方向プライマーの２個１組での組み合わせ各々に対応する６回の別個のPCR増幅反応において採用する。典型的なPCR増幅プログラムは以下の通りとした。すなわち、（１）94℃で２分間、（２）94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で2分間を各35サイクル、および（３）72℃で10分間の最後の伸長、とした。各PCR増幅反応物のアリコートをアガロースゲル電気泳動によって解析し、どの反応によって最も長いPCR産物が生成したかを決定した。次いで、該当するPCR反応物をシリカゲル膜スピンカラムにアプライした後、この反応生成物を単離した。該膜に高塩バッファーを通して混入物を洗い流し、通常製造業者により推奨される試薬、材料、および手順（Concert〔商標〕Rapid PCR Purification System,カタログ番号第11458-015号、Invitrogen，Carlsbad，CA）を使用し、低塩バッファー中に２本鎖PCR産物を単離した。次いで、この単離したPCR産物、当分野で周知の方法、試薬、および装置を用いて配列決定した。これらの方法を使用して、複数のアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子各々から得たcDNAのヌクレオチド配列を決定した。

【０４４１】

6.10　AfErg8遺伝子のプロモーター置換および条件発現

後述の実施例により、線状プロモーター置換カセットを用いる相同的組換えによってアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子のプロモーター置換および条件発現を達成しうることが実証される。

【０４４２】

6.10.1　AfErg8プロモーター置換カセットの調製

前記AfErg8遺伝子のプロモーターを、線状プロモーター置換カセットを用いて異種調節プロモーターと置き換えた。このプロモーター置換カセットは、該AfErg8プロモーターに隣接する、ヌクレオチド配列同一性を有する領域間での相同的組換えによってゲノム中に組み込まれるよう設計した。該カセットが適切に組み込まれると、該AfErg8プロモーターが欠失し、かつアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）内で機能するアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）のグルコアミラーゼプロモーターPglaAが導入される。このカセットはまた、組み込み形質転換体を選択しかつ容易に同定するための、選択マーカーをコードする遺伝子、すなわちアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子も含有している。

【０４４３】

前記AfErg8遺伝子のヌクレオチド配列を、隣接する5’および3’非翻訳配列を含めて配列番号406に示す。このゲノム配列に基づいて、プロモーター置換カセット（配列番号4038）を３つの別個の核酸断片から構築した。前記AfErg8プロモーター上流のヌクレオチド

配列を含む第１の断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマーは配列番号4038の最初の部分に相当する核酸断片を増幅するよう設計した。使用した上流プライマーは、配列番号4038の第１～20位のヌクレオチドに相当する。下流プライマーは配列同一性を有する２つの別個の領域を含む。該下流プライマーの3’末端部分はAfErg8中の配列に相当しており、一方該下流プライマーの5’末端部分はアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子断片の5’末端（配列番号4002）に対して相補的であった。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用し、増幅バッファー中でアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムのアリコートに各プライマーを加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従ってアガロースゲルより精製した。

【０４４４】

前記アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子およびPglaAプロモーターを含有する第２の核酸断片を、野生型pyrG遺伝子を含有するプラスミドpGUS64の誘導体（Verdoesら、Gene 145:179-187(1994)）を鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号4005および4006）は、配列番号4002のヌクレオチド196～3915を含有する核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマー（配列番号4005）は配列番号70のヌクレオチド196～215に相当し、また下流プライマー（配列番号4006）は配列番号4002のヌクレオチド3897～3917に対して相補的である。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca)を使用し、総容量50μlの増幅バッファー中10ngのpDXT5に各プライマーを最終濃度0.4μMにて加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた3,722bpの断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０４４５】

AfErg8遺伝子のATG開始コドン以下から始まるヌクレオチド配列を含む第３の断片を、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAを鋳型として用いるPCR増幅によって得た。オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号4038の下流部分を含む核酸断片を増幅するよう設計した。上流プライマーは配列同一性を有する２つの別個の領域を含み、該プライマーの5’末端は前記pyrG－PglaA断片の3’末端に相当しており、また該プライマーの3’末端は該AfErg8遺伝子のアミノ末端コード配列に相当していた。この断片を増幅するため、市販キット（pfu Turbo Hot Start Kit, Stratagene, La Jolla, Ca）を使用して、増幅バッファー中でアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株のゲノムDNAに各プライマーを加え、製造業者の指示に従って反応させた。得られた断片を、Qiagen MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, Inc.)を使用し、製造業者の指示に従って精製した。

【０４４６】

全長AfErg8プライマー置換カセットを、前記の３種の断片から３方向PCRを使用して構築した。該プロモーター置換カセットを構築するために、第１および第３の核酸断片のPCR産物各25ngを100ngの第２の核酸断片（すなわち前記pyrG－Pgla断片）に加え、この試料をPCR増幅した。前記AfErg8プロモーター隣接領域に相当するヌクレオチド配列を含む２つの核酸（すなわち第１および第３の核酸断片）は、各々該pyrG－Pgla断片の一方の末端に対して相補的なヌクレオチド配列を含む5’オーバーハングを含有している。変性時にこの5’オーバーハングのヌクレオチド配列が該pyrG－Pgla断片中に存在する相補的配列にアニーリングして、DNAポリメラーゼにより伸長しうる遊離3’末端を持つ短い２本鎖DNA領域が生成する。前記３断片のうちの２つを含有する中間PCR産物を３番目の断片にアニーリングさせるか、または３つ全てを同時にアニーリングさせると、その後の伸長によって３つの核酸断片全てを含む全長産物が生成する。

【０４４７】

得られた5158bpのヌクレオチドからなるプロモーター置換カセットは、約640個のヌク

レオチドを前記AfErg8プロモーターのすぐ上流に含有しており、またATG開始コドンから始まるErg8コード配列のうち最初の約700個のヌクレオチドと機能しうる形で配置されたアスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）pyrG遺伝子およびPglaAプロモーターを含む約3,800個のヌクレオチドを含有している。

【０４４８】

6.10.2　アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）必須遺伝子AfErg8の条件発現

前記PglaAプロモーターの制御下で発現されたAfErg8を有するアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10株の形質転換体を、２％マルトース、２％キシロース、または１％グルコースのいずれかを炭素供給源として補充した選択最少培地にて画線培養した。上で述べたように、PglaAプロモーターからの転写率は、マルトース存在下ではキシロース存在下よりも100倍高い。図１に示すように、該PglaAプロモーターの制御下にあるAfErg8を有するアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10形質転換体は、マルトースを補充した培地でよく生育する。これとは対照的に、キシロースの存在下でAfErg8の転写が抑制されると、このアスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）CEA10形質転換体の生育が阻害され、このことは該ArErg8遺伝子が必須であることを示している。

【０４４９】

本発明は、本明細書中に記載した特定の実施形態によりその範囲が限定されるものではない。実際、当業者であれば明らかなように前述の説明および添付した図面から、本明細書中に記載したもの以外にも本発明に様々な改変を行うことが可能である。かかる改変は、別紙に記載した特許請求の範囲の適用範囲内に含まれるものとする。

【０４５０】

本明細書中で引用した様々な参考文献については、引用によりその全内容が本発明に含まれるものとする。

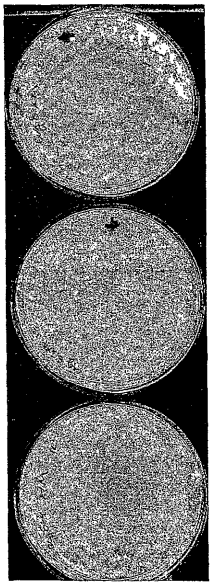
【図面の簡単な説明】

【０４５１】

【図１】2%マルトース、2%キシロース、または1%グルコースを補足した寒天培地上における、必須遺伝子AfErg 8がグルコアミラーゼプロモーターPglaAの制御下に配置された、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)の形質転換体の増殖を示している。

【図１】

Erg8PR-12 誘導株



【配列表】

2005522980000001.app

2005522980000002.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/15142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :C07K 13/00; C07H 21/04
US CL :530/350; 536/22.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/350; 536/22.1

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST, STN, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, GENBANK
search terms: aspergillus, expressed sequence tag, microbe, peptide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,090,581 A (GAVRIAS) 18 July 2000, see entire document.	1-8,12-15, 41
A	US 6,063,987 A (DAUB et al) 16 May 2000, see entire document.	1-8,12-15, 41
A	US 5,869,247 A (BARTON et al) 09 February 1999, see entire document.	1-8,12-15, 41
A	US 6,177,275 B1 (CORUZZI et al) 23 January 2001, see entire document.	1-8,12-15, 41

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

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

Date of the actual completion of the international search 18 OCTOBER 2002	Date of mailing of the international search report 22 MAY 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Robert Lawrence for ARUN CHAKRABARTI Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18142

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II *Observations where unity of invention is lacking* (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8,12-15,41

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/18142

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING
This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-8,12-13,and 41, drawn to isolated nucleic acid.
Group II, claim(s) 9-11, 35, and 36, drawn to polypeptide.
Group III, claim(s) 14-16,and 21-24 drawn to method of identifying a compound.
Group IV, claim(s) 17, drawn to method of illiciting an immune response.
Group V, claim(s) 18-20, and 38-40, drawn to an isolated strain of Aspergillus fumigatus.
Group VI, claim(s) 25-27, drawn to method of inhibiting growth of a microorganism.
Group VII, claim(s) 28-29, drawn to method of manufacturing an antimycotic compound.
Group VIII, claim(s) 30-32, and 34, drawn to method of treating an infection of a subject.
Group IX, claim(s) 33, drawn to a pharmaceutical composition.
Group X, claim(s) 37, drawn to method of evaluating a compound.
Group XI, claim(s) 42, drawn to computer.
Group XII, claim(s) 43, drawn to computer assisted method.
This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack Unity of Invention because they are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. The species are as follows:

8603 nucleotide sequences. Species (SEQ ID NO: 3001) and Group I will be examined if no extra fees are paid. For fees, total number of groups are 13+8602= 8615, because each species is charged as an extra group.

The inventions listed as Groups I-XIV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Gavrias (U.S. Patent 6,000,581) (July 13, 2000)teaches polypeptides and polynucleotides encoding those polypeptides associated with Aspergillus fumigatus of Groups I and II of the claimed invention. Naturally, claims of other groups lack the same or corresponding special technical feature.

The species listed above do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Gavrias teaches similar polynucleotide species SEQ ID #1 and polypeptides species of SEQ ID NO:2-6.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 45/00	Ａ６１Ｋ 45/00		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 31/04	Ａ６１Ｐ 31/04		４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ 14/37	Ｃ０７Ｋ 14/37		４Ｃ０８６
Ｃ０７Ｋ 16/14	Ｃ０７Ｋ 16/14		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｍ 1/00	Ｃ１２Ｍ 1/00	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
// Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｆ	
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ１２Ｐ 21/08		

(31)優先権主張番号 60/303,899
(32)優先日 平成13年7月9日(2001.7.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/316,362
(32)優先日 平成13年8月31日(2001.8.31)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
フロッピー

(72)発明者 ジャング，ボー
カナダ国 エイチ３ダブリュ ２イー６ キューベック，モントリオール，グロバート ストリート ５２３１
(72)発明者 ティシュコフ，ダニエル
アメリカ合衆国 ９２１０７ カリフォルニア州，サン ディエゴ，ナンバー ６１，ウェストポイント ロマ ブールバード ４４４４
(72)発明者 ザムディオ，カルロス
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア州，ラ ホヤ，ナンバー ８８，ヴィラ ラ ホヤ

ドライブ　８７２４
(72)発明者　エロシュキン，アレクセイ，エム．
アメリカ合衆国　９２１３０　カリフォルニア州，サン　ディエゴ，ルエッテ　サン　ラファエル　ドライブ　３８０３
(72)発明者　フ，ウェンキ
カナダ国　エイチ９ビー　２ケー６　キューベック，ドラードーデスーオーメアウクス，ハイマン　ドライブ　１２０７
(72)発明者　レミエックス，セバシティアン，エム．
カナダ国　エイチ３ケー　３シー４　キューベック，モントリオール，アパートメント　２０９，センター　２８５５

Ｆターム(参考)　2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA49 BA80 CA03 CA04 DA11 FA02 HA14
4B029 AA07 BB20 FA15
4B063 QA18 QQ58 QR32 QR80 QR82 QS34
4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA60 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA14 AA17 BA01 BA02 BA08 BA23 BA35
BA41 DA41 NA14 ZB352
4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB11 BB41 BB43 CC02 CC03 CC05
CC13 CC21 CC22 CC23 EE01
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA10 DA76 EA29 EA50

专利名称(译)	鉴定和使用烟曲霉的必需基因		
公开(公告)号	JP2005522980A	公开(公告)日	2005-08-04
申请号	JP2002583605	申请日	2002-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	领虎制药公司		
申请(专利权)人(译)	Eritora制药公司		
[标]发明人	ジャングボー ティシュコフダニエル ザムディオカルロス エロシュキンアレクセイエム フウェンキ レミエックスセバシティアンエム		
发明人	ジャング,ボー ティシュコフ,ダニエル ザムディオ,カルロス エロシュキン,アレクセイ,エム. フ,ウェンキ レミエックス,セバシティアン,エム.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/37 C07K14/38 C07K16/14 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12R1/68 A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 C07K14/38 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/37 C07K16/14 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA49 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/DA11 4B024/FA02 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA18 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA60 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA14 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/DA41 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC13 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA10 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA50		
优先权	60/285697 2001-04-23 US 60/287066 2001-04-27 US 60/295890 2001-06-05 US 60/303899 2001-07-09 US 60/316362 2001-08-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明使得可以通过实验确认烟曲霉基因组中的基因是否必需以及该基因是否对毒性或致病性是必需的。，核苷酸序列，方法和组合物。该方法涉及构建遗传变体，其中靶基因置于条件表达下。鉴定对于恶性感染的发展很重要的必需基因和这样的基因，为开发筛选针对烟曲霉的新药的方法提供了基础。本发明进一步提供了烟曲霉基因，其是必需基因并且可以是药物scroptin的靶标。靶基因的核苷酸序列可用于各种药物发现目的，例如用于重组蛋白的表达，杂交测定和核酸阵列的构建。本发明还包括在各种筛选方法中使用含有由本发明的必需基因编码的蛋白质和必需基因的修饰等位基因的基因工程细胞。

アスペルギルス・フミガーツス染色体配列の呼称	カンジダ・アルビカンス相同体の呼称	ゲノム配列の配列番号	イントロンを有するコード配列の配列番号	オープンリーディングフレームの配列番号	遺伝子産物のアミノ酸配列の配列番号
AfYMR290C	CaYMR290C	1	1001	2001	3001
AfYPR034W	CaYPR034W	2	1002	2002	3002
AfORF6_4497	CaORF6_4497	3	1003	2003	3003
AfYJL068C	CaYJL068C	4	1004	2004	3004
AfYIL068C	CaYIL068C	5	1005	2005	3005
AfYHR196W	CaYHR196W	6	1006	2006	3006
AfYMR197C	CaYMR197C	7	1007	2007	3007
AfYLR100W	CaYLR100W	8	1008	2008	3008
AfYDL065C	CaYDL065C	9	1009	2009	3009
AfYDL043C	CaYDL043C	10	1010	2010	3010
AfYJL054W	CaYJL054W	11	1011	2011	3011
AfYHR072W2	CaYHR072W2	12	1012	2012	3012
AfYPR119W	CaYPR119W	13	1013	2013	3013
AfYDR613W	CaYDR613W	14	1014	2014	3014
AfYGR235C	CaYGR235C	15	1015	2015	3015
AfYDR353W	CaYDR353W	16	1016	2016	3016
AfYNR053C	CaYNR053C	17	1017	2017	3017
AfYLR332C	CaYLR332C	18	1018	2018	3018
AfYER025W	CaYER025W	19	1019	2019	3019
AfYOR272W	CaYOR272W	20	1020	2020	3020
AfYGL206C	CaYGL206C	21	1021	2021	3021
AfYMR208W	CaYMR208W	22	1022	2022	3022
AfYKL018W	CaYKL018W	23	1023	2023	3023
AfYJR008W	CaYJR008W	24	1024	2024	3024
AfYIL075C	CaYIL075C	25	1025	2025	3025
AfYER070W	CaYER070W	26	1026	2026	3026
AfYMR113W	CaYMR113W	27	1027	2027	3027
AfYIR011C	CaYIR011C	28	1028	2028	3028
AfYER012W	CaYER012W	29	1029	2029	3029
AfORF6_8837	CaORF6_8837	30	1030	2030	3030
AfYJR002W	CaYJR002W	31	1031	2031	3031
AfYPL043W	CaYPL043W	32	1032	2032	3032
AfYNL110C	CaYNL110C	33	1033	2033	3033
AfORF6_4899	CaORF6_4899	34	1034	2034	3034
AfORF6_5199	CaORF6_5199	35	1035	2035	3035
AfYFR052W	CaYFR052W	36	1036	2036	3036
AfYMR146C	CaYMR146C	37	1037	2037	3037
AfYGL003C	CaYGL003C	38	1038	2038	3038
AfYFL008W	CaYFL008W	39	1039	2039	3039
AfYDL026C	CaYDL026C	40	1040	2040	3040
AfYHR070W	CaYHR070W	41	1041	2041	3041
AfYLR115W	CaYLR115W	42	1042	2042	3042
AfYLR197W	CaYLR197W	43	1043	2043	3043
AfYOL022C	CaYOL022C	44	1044	2044	3044
AfYIL082C	CaYIL082C	45	1045	2045	3045
AfYPR056W	CaYPR056W	46	1046	2046	3046