

(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2005-514899

(P2005-514899A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	4 B O 6 3
C O 7 K 14/37	C O 7 K 14/37	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 134 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-555238 (P2002-555238)
 (86) (22) 出願日 平成13年12月26日 (2001.12.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月21日 (2003.8.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/049486
 (87) 国際公開番号 W02002/053728
 (87) 国際公開日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (31) 優先権主張番号 60/259,128
 (32) 優先日 平成12年12月29日 (2000.12.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/792,024
 (32) 優先日 平成13年2月20日 (2001.2.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/314,050
 (32) 優先日 平成13年8月22日 (2001.8.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

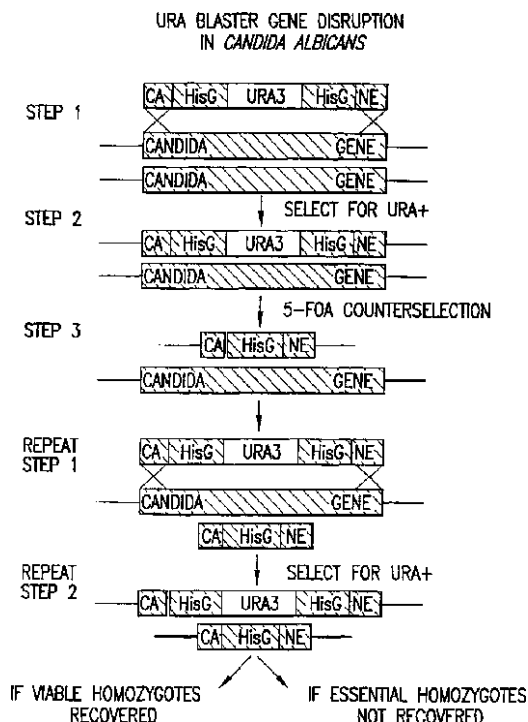
(71) 出願人 501299451
 エリトラ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カルフォルニア 92121 サン ディエゴ ダンヒル ストリート 3510 スイート エー
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物標的探索のための遺伝子破壊法

(57) 【要約】

本発明は、二倍体病原生物のゲノム中のいずれかの遺伝子が必須遺伝子であるか否か、または毒性もしくは病原性に必要な遺伝子であるか否かを実験的に決定することができる方法および組成物を提供する。該方法は、特定の遺伝子の第1対立遺伝子を不活性化する一方、該遺伝子の他方の対立遺伝子を条件付き発現下に置くことを含む。必須遺伝子および有害な感染の伝播に重要な遺伝子の同定は、上記病原生物に対する新規薬剤のスクリーニング開発の基本を提供する。本発明はさらに、カンジダ・アルビカンスの遺伝子であって、必須であることがわかっているものおよび薬物スクリーニングの潜在的な標的であるものを提供する。標的遺伝子のヌクレオチド配列を種々の薬物探索のために用いることができる。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などが含まれる。該必須遺伝子によりコードされるタンパク質の使用、および必須遺伝子の改変対立遺伝子を含む遺伝子操作細胞の種々のスクリーニング方法への使用も、本発明に包含される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子の両対立遺伝子が改変された二倍体真菌細胞株を構築する方法であって、以下のステップ：

(a) 二倍体真菌細胞の第1対立遺伝子を、発現可能な選択マーカークをコードする第1のヌクレオチド配列を含む遺伝子破壊カセットを用いて遺伝子組換えすることにより改変して、該遺伝子の第1対立遺伝子が不活性化されているヘテロ接合性二倍体真菌細胞を提供すること；および

(b) 該ヘテロ接合性二倍体真菌細胞における遺伝子の第2対立遺伝子を、異種プロモーターをコードする第2の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遺伝子組換えすることにより、異種プロモーターによって遺伝子の第2対立遺伝子の発現が制御されるように改変すること、

を含んでなり、かつ、該遺伝子が配列番号7001～7932からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的に構成されるポリペプチドをコードするものである、
上記方法。

10

【請求項2】

それぞれに異なる遺伝子の対立遺伝子が改変されている二倍体真菌細胞の集団を構築する方法であって、以下のステップ：

(a) 二倍体真菌細胞の第1の遺伝子の第1対立遺伝子を、発現可能な選択マーカークをコードする第1のヌクレオチド配列を含む遺伝子破壊カセットを用いて遺伝子組換えすることにより改変して、該遺伝子の第1対立遺伝子が不活性化されているヘテロ接合性二倍体真菌細胞を提供すること；および

20

(b) 該ヘテロ接合性二倍体真菌細胞における第1の遺伝子の第2対立遺伝子を、異種プロモーターをコードする第2の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遺伝子組換えすることにより、異種プロモーターによって該遺伝子の第2対立遺伝子の発現が制御されるように改変して、第1の遺伝子の改変された対立遺伝子対を含む二倍体真菌細胞の第1の株を得ること；および

(c) 上記ステップ(a)および(b)を複数回繰り返す、1回繰り返す毎に異なる遺伝子が改変されることにより、それぞれに異なる遺伝子の改変対立遺伝子対を含む二倍体真菌細胞の集団を得ること、

30

を含んでなり、かつ、上記それぞれに異なる遺伝子が配列番号7001～7932からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的に構成されるポリペプチドをコードするものである、
上記方法。

【請求項3】

遺伝子破壊カセット内の選択マーカークが、第1領域と第2領域の間に配置されており、ここで、第1領域と第2領域は、二倍体真菌細胞の遺伝子の第1対立遺伝子の非連続領域と別々にハイブリダイズするものである、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

選択マーカークが、CaSAT1、CaBSR1、CaURA3、CaHIS3、CaLEU2、CaTRP1、およびこれらの組合せからなる群より選択されるものである、請求項3記載の方法。

40

【請求項5】

二倍体真菌細胞が、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラタム (*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 (*Trichospor*

50

on beigelii)、リゾプス・アルヒズムス (*Rhizopus arrhizums*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、アブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recondita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*) および黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) からなる群より選択される種の真菌細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

遺伝子が配列番号 6001~6932 からなる群より選択されるオープンリーディングフレームに対応する、請求項 1 または 2 記載の方法。

10

【請求項 7】

以下のステップ：

(c) DNA結合ドメインと転写活性化ドメインを含むトランス活性化融合タンパク質をコードする、二倍体真菌細胞内で発現可能なヌクレオチド配列を導入すること；
をさらに含み、ここで、プロモーター置換断片中の異種プロモーターは、トランス活性化融合タンパク質のDNA結合ドメインが結合するヌクレオチド配列の少なくとも1コピーを含んでいるために、トランス活性化融合タンパク質の結合が異種プロモーターからの転写を増大させることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 8】

プロモーター置換断片が選択マーカーをさらに含む、請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 9】

選択マーカーが、CaHIS3、CaSAT1、CaBSR1、CaURA3、CaLEU2、CaTRP1、およびこれらの組合せからなる群より選択されるものである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

1つの遺伝子の改変対立遺伝子を含む二倍体真菌細胞株であって、該遺伝子の第1対立遺伝子は発現可能な選択マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子破壊カセットにより不活性化されており、該遺伝子の第2対立遺伝子の発現は、該遺伝子の第2対立遺伝子のコード領域に機能し得る形で連結された異種プロモーターにより制御されており、かつ、該遺伝子は配列番号 7001~7932 からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的に構成されるポリペプチドをコードするものであることを特徴とする、上記二倍体真菌細胞株。

30

【請求項 11】

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活性化融合タンパク質をコードする、二倍体真菌細胞内で発現可能なヌクレオチド配列をさらに含み、かつ、プロモーター置換断片中の異種プロモーターは、トランス活性化融合タンパク質のDNA結合ドメインが結合するヌクレオチド配列の少なくとも1コピーを含んでいるために、トランス活性化融合タンパク質の結合が異種プロモーターからの転写をモジュレートすることを特徴とする、請求項 10 記載の二倍体真菌細胞。

【請求項 12】

遺伝子が、細胞の増殖および/または生存に必須な遺伝子であるか、または宿主生物に対する真菌細胞の毒性および/または病原性に寄与する遺伝子であることを特徴とする、請求項 10 または 11 記載の二倍体真菌細胞株。

40

【請求項 13】

遺伝子が配列番号 6001~6932 からなる群より選択されるオープンリーディングフレームに対応することを特徴とする、請求項 10 または 11 記載の二倍体真菌細胞株。

【請求項 14】

配列番号 7001~7932 のアミノ酸配列をコードする異なる遺伝子の実質的に全てが改変されており、かつそれらが集団内の異なる二倍体真菌株の中に存在することを特徴とする、請求項 10 記載の二倍体真菌細胞株の集団。

【請求項 15】

50

それぞれの株が異なる遺伝子の改変された対立遺伝子を含み、該遺伝子のそれぞれが細胞の増殖および/または生存に必須な遺伝子であり、かつ、該遺伝子が配列番号7001~7932のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的に構成されるポリペプチドをコードすることを特徴とする、請求項10記載の二倍体真菌細胞株の集団。

【請求項16】

それぞれの遺伝子が配列番号6001~6932からなる群より選択されるオープンリーディングフレームに対応することを特徴とする、請求項15記載の二倍体真菌細胞株の集団。

【請求項17】

それぞれの株が異なる遺伝子の改変対立遺伝子を含み、該遺伝子のそれぞれが真菌細胞の宿主生物に対する毒性および/または病原性に寄与する遺伝子であることを特徴とする、請求項10記載の二倍体真菌細胞株の集団。

10

【請求項18】

真菌細胞の宿主生物に対する毒性および/または病原性に寄与する二倍体真菌ゲノム中遺伝子の実質的に全ての改変されたものが集団の中に存在している、請求項17記載の二倍体真菌細胞株の集団。

【請求項19】

集団中に存在する必須遺伝子の全てが、類似の生物学的活性、類似の細胞内分布、構造的相同性、配列相同性、殺傷性(cidal)最終表現型、静菌性(static)最終表現型、ヒト遺伝子に対する配列相同性、生物に関する排他性(exclusivity)からなる群より選択される特性を共有していることを特徴とする、請求項14記載の二倍体真菌細胞株の集団。

20

【請求項20】

それぞれの株の細胞が、各株に特有の配列を有する約20ヌクレオチドの少なくとも1つの分子タグをさらに含む、請求項14、15、17または19記載の二倍体真菌細胞株の集団。

【請求項21】

分子タグが遺伝子破壊カセット内に存在している、請求項20記載の集団。

【請求項22】

複数の核酸分子を含む核酸分子マイクロアレイであって、各核酸分子が配列番号6001~6932までの配列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するヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、上記マイクロアレイ。

30

【請求項23】

複数の核酸分子を含む核酸分子マイクロアレイであって、各核酸分子は、二倍体真菌細胞の増殖に必須であるかまたは宿主生物に対する二倍体真菌細胞の毒性および/または病原性に寄与する遺伝子のヌクレオチド配列にハイブリダイズしうるヌクレオチド配列を含み、かつ、該遺伝子が配列番号7001~7932からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的に構成されるポリペプチドをコードするものであることを特徴とする、上記マイクロアレイ。

【請求項24】

真菌の生存に必須な遺伝子を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項10記載の二倍体真菌細胞を、遺伝子の第2対立遺伝子が実質的に発現抑制されるかまたは発現されない条件下で培養すること：および

40

(b) 細胞の生存活性を測定すること、ここで、対照に比べて生存活性が消失または低減している場合は、改変された遺伝子が真菌の生存に必須であることを示す；を含む、上記方法。

【請求項25】

真菌の増殖に必須な遺伝子を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項10記載の二倍体真菌細胞を、その遺伝子の第2対立遺伝子が実質的に発現抑制されるかまたは発現されない条件下で培養すること：および

(b) 細胞の増殖を測定すること、ここで、対照に比べて細胞の増殖が消失または低減している場合は、改変された遺伝子が真菌の増殖に必須であることを示す；

50

を含む、上記方法。

【請求項 26】

真菌の毒性および/または病原性に寄与する遺伝子を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項 10 または 11 記載の二倍体真菌細胞を、その遺伝子の第 2 対立遺伝子が実質的に発現抑制されるかまたは発現されない条件下で培養すること；および

(b) 宿主細胞または生物に対する細胞の毒性および/または病原性を測定すること、ここで、対照に比べて毒性および/または病原性が低減している場合は、改変された遺伝子が真菌の毒性および/または病原性に寄与するものであることを示す；

を含む、上記方法。

10

【請求項 27】

抗真菌剤に対する二倍体真菌の耐性に寄与する遺伝子を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項 10 記載の二倍体真菌細胞を、抗真菌剤の存在下、かつ第 2 対立遺伝子が実質的に過剰発現される条件下で培養すること；および

(b) 細胞の生存活性を測定すること、ここで、対照に比べて生存活性が増加している場合は、改変された遺伝子が二倍体真菌の抗真菌剤に対する耐性に寄与するものであることを示す；

を含む、上記方法。

【請求項 28】

20

二倍体真菌細胞の増殖を阻害する抗真菌剤を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項 12 記載の二倍体真菌細胞を得ること；および

(b) 該二倍体真菌細胞を、試験化合物の存在下、かつその遺伝子の第 2 対立遺伝子が発現抑制される条件下で培養すること；

を含み、対照に比べて該二倍体真菌細胞の増殖が消失または低減している場合は、試験化合物が抗真菌剤であることを示す、上記方法。

【請求項 29】

哺乳動物の疾患の治療用の治療薬を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 二倍体細胞の改変された遺伝子は必須遺伝子であり、かつ疾患に関連する哺乳動物の遺伝子に配列相同性を示すものである、請求項 10 記載の二倍体真菌細胞を得ること；および

30

(b) 該二倍体真菌細胞を、試験化合物の存在下、かつその遺伝子の第 2 対立遺伝子が過剰発現または発現抑制される条件下で培養すること；

を含み、該二倍体真菌細胞の増殖が対照の増殖と比較して差がある場合は、試験化合物が治療薬であることを示す、上記方法。

【請求項 30】

二倍体真菌細胞の増殖または繁殖の阻害とタンパク質レベルの変動とを相関付ける方法であって、以下のステップ：

(a) 遺伝子の 2 つの野生型対立遺伝子を含む対照の二倍体真菌細胞についての第 1 のタンパク質発現プロファイルを作成すること；

40

(b) 請求項 12 記載の二倍体真菌細胞を、遺伝子の第 2 対立遺伝子が実質的に発現抑制されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養して、培養した細胞についての第 2 のタンパク質発現プロファイルを作成すること；および

(c) 第 1 のタンパク質発現プロファイルと第 2 のタンパク質発現プロファイルとを比較してタンパク質レベルの差を特定すること；

を含む、上記方法。

【請求項 31】

二倍体真菌細胞の増殖または繁殖の阻害と遺伝子転写産物レベルの変動とを相関付ける方法であって、以下のステップ：

(a) 遺伝子の 2 つの野生型対立遺伝子を含む対照の二倍体真菌細胞についての転写産

50

物プロフィールを作成すること；

(b) 請求項 1 2 記載の二倍体真菌細胞を、遺伝子の第 2 対立遺伝子が実質的に発現抑制されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養して、培養した細胞についての第 2 の転写産物プロフィールを作成すること；および

(c) 第 1 の転写産物プロフィールと第 2 の転写産物プロフィールとを比較して遺伝子転写産物レベルの差を特定すること；

を含む、上記方法。

【請求項 3 2】

カンジダ・アルビカンス (*Candida Albicans*) の繁殖に必要な、配列番号 7001 ~ 7932 のうちの 1 つのアミノ酸配列によって本質的に構成されてい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。

10

【請求項 3 3】

ヌクレオチド配列が配列番号 6001 ~ 6932 のうちの 1 つである、請求項 3 2 記載の核酸分子。

【請求項 3 4】

配列番号 6001 ~ 6932 のうちの 1 つの断片を含む核酸分子であって、該断片は、配列番号 6001 ~ 6932 のうちの 1 つの連続した少なくとも 10ヌクレオチド、少なくとも 20ヌクレオチド、少なくとも 25ヌクレオチド、少なくとも 30ヌクレオチド、少なくとも 50ヌクレオチドおよび少なくとも 100ヌクレオチドを含む断片からなる群より選択されたものであることを特徴とする、上記核酸分子。

20

【請求項 3 5】

以下の

(a) 配列番号 6001 ~ 6932 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 7001 ~ 7932 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 核酸分子に、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、ここで、ストリンジェントな条件は、約 45 で 6 × 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) 中でフィルターに結合した DNA にハイブリダイゼーションさせた後、約 50 ~ 65 で 0.2 × SSC / 0.1% SDS で 1 回以上洗浄することを含むこととする、上記核酸分子。

30

【請求項 3 6】

配列番号 4001 ~ 4932 および 5001 ~ 5932 からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる、請求項 3 4 または 3 5 記載の核酸分子。

【請求項 3 7】

配列番号 6001 ~ 6932 の配列、配列番号 6001 ~ 6932 の連続した少なくとも 25ヌクレオチドを含む断片、配列番号 6001 ~ 6932 に相補的な配列および配列番号 6001 ~ 6932 の連続した少なくとも 25ヌクレオチドを含む断片に相補的な配列からなる群より選択された配列に少なくとも 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・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の生物から得た精製または単離された核酸分子。

40

【請求項 3 8】

上記生物が、アブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*)、黄色コウジ菌 (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ツブリネンシス (*Candida dublinensis*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・パラプシロプシス (*Candida parapsilopsis*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe*

50

graminis)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatiditis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*Histoplasma capsulatum*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、プッチニア・グラミニス (*Puccinia graminis*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、プッチニア・ストリイフォルミス (*Puccinia striiformis*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾプス・アルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、セプトリア・アベナエ (*Septoria avenae*)、セプトリア・ノドルム (*Septoria nodorum*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、チレチア・トリチシ (*Tilletia tritici*)、トリコスポロン・ベイゲリ (*Trichosporon beigelii*)、および黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) からなる群より選択される、請求項 37 記載の精製または単離された核酸。

【請求項 39】

請求項 32、33、34、35、または 37 記載の核酸分子に機能しうる形で連結したプロモーターを含むベクター。

【請求項 40】

プロモーターが制御可能であることを特徴とする、請求項 39 記載のベクター。

【請求項 41】

プロモーターが、アブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*)、黄色コウジ菌 (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ツブリネンシス (*Candida dublinensis*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・パラプシロプシス (*Candida parapsilopsis*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatiditis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*Histoplasma capsulatum*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、プッチニア・グラミニス (*Puccinia graminis*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、プッチニア・ストリイフォルミス (*Puccinia striiformis*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾプス・アルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、セプトリア・アベナエ (*Septoria avenae*)、セプトリア・ノドルム (*Septoria nodorum*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、チレチア・トリチシ (*Tilletia tritici*)、トリコスポロン・ベイゲリ (*Trichosporon beigelii*)、および黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) からなる群より選択される生物で活性であることを特徴とする、請求項 39 記載のベクター。

【請求項 42】

請求項 39 記載のベクターを含有する、宿主細胞。

【請求項 43】

配列番号 63 ~ 123 の配列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 44】

配列番号 7001 ~ 7932 の配列からなる群より選択されたアミノ酸配列に、FASTAバージョン 3.0t78 を用いてデフォルトパラメーターで測定した場合に、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・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の生物から得た精製または単離されたポリペプチド。

【請求項 45】

10

20

30

40

50

生物が、アブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*)、黄色コウジ菌 (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ツブリネンシス (*Candida dublinensis*)、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・パラプシロプシス (*Candida parapsilopsis*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、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*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatiditis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*Histoplasma capsulatum*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、プッチニア・グラミニス (*Puccinia graminis*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、プッチニア・ストリイフォルミス (*Puccinia striiformis*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、リゾプス・アルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、セプトリア・アベナエ (*Septoria avenae*)、セプトリア・ノドルム (*Septoria nodorum*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、チレチア・トリチシ (*Tilletia tritici*)、トリコスポロン・ベイゲリ (*Trichosporon beigeli*)、および黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 4 記載のポリペプチド。

10

20

【請求項 4 6】

第 2 のポリペプチドに融合した第 1 のポリペプチドの断片を含む融合タンパク質であって、該断片は、配列番号 7001~7932 の配列からなる群より選択されるアミノ酸配列の連続する少なくとも 6 残基からなるものである、上記融合タンパク質。

【請求項 4 7】

ポリペプチドを作製する方法であって、配列番号 7001~7932 の配列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に機能しうる形で連結したプロモーターを含むベクターを細胞に導入し、該細胞を培養して上記ヌクレオチド配列を発現させることを含む、上記方法。

【請求項 4 8】

ポリペプチドを作製する方法であって、配列番号 7001~7932 の配列からなる群から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に機能しうる形で連結した異種プロモーターを含む細胞を用意し、該細胞を培養して上記ヌクレオチド配列を発現させることを含む、上記方法。

30

【請求項 4 9】

配列番号 6001~6932 の配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸にコードされる遺伝子産物の活性を変化させる化合物を同定する方法であって、以下のステップ：

- (a) 化合物に上記遺伝子産物を接触させること；および
- (b) 化合物が該遺伝子産物の活性を変化させるか否かを測定すること；

40

を含む、上記方法。

【請求項 5 0】

上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 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

上記遺伝子産物がポリペプチドであり、かつその活性が酵素活性、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から選択されることを特徴とする、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 2】

動物の免疫応答を誘発する方法であって、配列番号 7001~7932 の配列のうちの 1 つの連

50

続する少なくとも6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に導入することを含む、上記方法。

【請求項53】

配列番号6001~6932の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む遺伝子の第1対立遺伝子が不活性化されており、該遺伝子の第2対立遺伝子が異種プロモーターの制御下にあることを特徴とする、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)株。

【請求項54】

異種プロモーターの制御下にある、配列番号6001~6932の配列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ことを特徴とする、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)株。

10

【請求項55】

異種プロモーターが制御可能なものであることを特徴とする、請求項53または54記載の株。

【請求項56】

配列番号7001~7932の配列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に結合する化合物または結合パートナーを同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 複数の化合物または1つ以上の結合パートナーを含む調製物にポリペプチドまたはその断片を接触させること；および

(b) ポリペプチドまたはその断片に結合する化合物または結合パートナーを同定すること；

20

を含む、上記方法。

【請求項57】

カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)の増殖または繁殖を阻害する能力を有する化合物を同定する方法であって、以下のステップ：

(a) カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)細胞に配列番号6001~6932の配列からなる群より選択される核酸によりコードされる遺伝子産物のレベルまたは活性を、野生型細胞に比べて低下させること、ただし、該細胞にとってこのレベルの低下は致命的なものではない；および

(b) 化合物に該細胞を接触させること；および

(c) 化合物が該細胞の増殖または繁殖を阻害するか否かを測定すること；

30

を含む、上記方法。

【請求項58】

上記遺伝子産物のレベルまたは活性を低下させるステップが、該遺伝子産物が低下したレベルで発現される条件下で制御可能なプロモーターにより該遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を転写させることを含むものである、請求項57記載の方法。

【請求項59】

上記遺伝子産物が、配列番号7001~7932の配列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ことを特徴とする、請求項58記載の方法。

【請求項60】

カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)細胞の増殖または繁殖を阻害する方法であって、(i)配列番号6001~6932の配列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減するかまたは活性を阻害する化合物、または(ii)配列番号6001~6932の配列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減するかまたは活性を阻害する化合物に、細胞を接触させることを含む、上記方法。

40

【請求項61】

遺伝子産物が配列番号7001~7932の配列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ことを特徴とする、請求項60記載の方法。

【請求項62】

50

化合物が抗体、抗体断片、アンチセンス核酸分子またはリボザイムである、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 3】

抗真菌性化合物を製造するための方法であって、以下のステップ：

(a) 複数の候補化合物をスクリーニングし、配列番号6001～6932の配列からなる群より選択された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減させる化合物を同定すること；および

(b) かかる同定された化合物を製造すること；
を含む、上記方法。

【請求項 6 4】

上記遺伝子産物が配列番号6001～6932の配列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ことを特徴とする、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 5】

対象のカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)による感染を治療するための方法であって、配列番号6001～6932の配列からなる群より選択された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減させる化合物を治療に有効な量で含む医薬組成物を該対象に投与することを含む、上記方法。

【請求項 6 6】

化合物が抗体、抗体断片、アンチセンス核酸分子またはリボザイムである、請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 6 7】

物体のカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)による混入を予防または含有するための方法であって、配列番号6001～6932の配列からなる群より選択された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減させる化合物を有効な量で含む組成物に物体を接触させることを含む、上記方法。

【請求項 6 8】

表面にカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)を含むバイオフィルムが形成することを予防または阻害するための方法であって、配列番号6001～6932の配列からなる群より選択された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減させる化合物を有効な量で含む組成物に表面を接触させることを含む、上記方法。

【請求項 6 9】

薬学的に許容されうる担体中に配列番号6001～6932の配列からなる群より選択された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減させる化合物を治療に有効な量で含む医薬組成物。

【請求項 7 0】

対象が、植物、脊椎動物、哺乳動物、鳥類動物およびヒトからなる群より選択される、請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 7 1】

請求項 4 3 または 4 4 記載のポリペプチドに結合する抗体調製物。

【請求項 7 2】

モノクローナル抗体を含む、請求 7 1 記載の抗体調製物。

【請求項 7 3】

配列番号6001～6932の配列の1つを含むヌクレオチド配列によりコードされる標的遺伝子産物について化合物を評価するための方法であって、以下のステップ：

(a) 化合物に野生型二倍体真菌細胞を接触させて第1のタンパク質発現プロフィールを作成すること；

(b) 標的遺伝子の第2対立遺伝子を実質的に発現抑制されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養した、請求項 1 2 記載の二倍体真菌細胞のタンパク質発現プロフィールを測定し、該培養細胞についての第2のタンパク質発現プロフィールを作

10

20

30

40

50

製すること；および

(c) 第1のタンパク質発現プロフィールと第2のタンパク質発現プロフィールとを比較してプロフィールの類似性を特定すること；
を含む、上記方法。

【請求項74】

配列番号6001～6932の配列の1つを含むヌクレオチド配列によりコードされる標的遺伝子産物について化合物を評価するための方法であって、以下のステップ：

(a) 化合物に野生型二倍体真菌細胞を接触させて第1の転写プロフィールを作成すること；

(b) 標的遺伝子の第2対立遺伝子が実質的に発現抑制されるか、発現されないか、または過剰発現される条件下で培養した、請求項12記載の二倍体真菌細胞の転写プロフィールを測定し、該培養細胞についての第2の転写プロフィールを作製すること；および

(c) 第1の転写プロフィールと第2の転写プロフィールとを比較してプロフィールの類似性を特定すること；
を含む、上記方法。

10

【請求項75】

抗真菌性化合物を同定するための方法であって、複数の化合物をスクリーニングして、配列番号6001～6932の配列からなる群より選択されたヌクレオチド配列を有する遺伝子のサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中に天然に存在するオーソログ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の活性またはレベルを低減させる化合物を同定することを含む、上記方法。

20

【請求項76】

配列番号1～932、1001～1932、2001～2932、3001～3932、4001～4932、5001～5932、および6001～6932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7001～7932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んでなる、コンピューターまたはコンピューター読取可能媒体。

【請求項77】

真菌のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と、配列番号6001～6932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7001～7932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配列相同性を検出することを含んでなる、真菌の推定必須遺伝子を同定するためのコンピューターを利用した方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2000年12月29日に出願された米国仮出願第60/259,128号、2001年2月20日に出願された米国出願第09/792,024号、および2001年8月22日に出願された米国仮出願第60/314,050号(これらの開示内容は参照によりその全体を本明細書に組み入れるものとする)についての優先権を主張するものである。

【0002】

40

1. 緒言

本発明は、(1)治療的介入(therapeutic intervention)に有効な標的としての遺伝子産物の同定および確認に有用な株(strains)を構築する方法、(2)治療的介入に有効な標的としての遺伝子産物を同定および確認する方法、(3)同定された必須遺伝子の収集、ならびに(4)新規薬物発見のためのスクリーニング方法およびアッセイ手順に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 発明の背景

薬物スクリーニング目的での細胞標的の確認には、一般に、その遺伝子産物の不活化によりその細胞が生存不能のままになるという実験的証明が含まれる。したがって、例えば

50

病原性真菌によって発現される同必須遺伝子産物に対して活性な薬物は、有効な治療薬であると予測される。同様に、真菌の病原性および毒性に必要な遺伝子産物も、薬物スクリーニングプログラムに好適な標的を提供するものと予想される。この場合の標的確認は、毒力因子をコードする遺伝子の不活化によって、動物モデル研究において病原性が低いか、または理想的には無毒性であることが示される真菌株が作出されるという証拠に基づくものである。薬物標的の同定および確認は、新規薬物の検出および発見にとって重要な問題である。なぜなら、これらの標的が医薬品工業におけるハイスループットスクリーニングの基礎を形成しているからである。

【0004】

標的の発見は、従来から費用と時間のかかるプロセスであり、かかるプロセスでは、新たに同定された遺伝子および遺伝子産物を、個別に薬物標的として適切であるかの可能性について解析している。全ゲノムのDNA配列分析は、遺伝子発見プロセスを著しく促進させた。したがって、新しい方法およびツールには、この情報を分析し、第1に生物の遺伝子全てを同定し、次いで、どの遺伝子が、有効な無毒性の薬物発見に適した標的である産物をコードしているかを見分けることが必要である。配列分析による遺伝子発見だけでは公知または新規の遺伝子を薬物標的として確認することはできない。遺伝子が必須であるかどうかの基本的な決定からのその遺伝子の機能の解明は、適切な薬物標的の同定に本質的な障害を依然として提供する。これらの障害は、特に、二倍体生物において明白である。

10

【0005】

C.アルビカンス(*C.albicans*)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、特有の薬物標的が無いということが、臨床上的使用に有効な無毒性化合物の開発を妨げている。全C.アルビカンスのゲノムのDNA配列分析が最近完了したが、このことが新たな抗真菌薬物標的を同定しようとする取り組みを復活させた。それにもかかわらず、有用な薬物標的の開発に対するかかる情報の利用には、2つの主な障害、すなわち、C.アルビカンスにおける遺伝子操作に適したマーカーの不足、およびこの二倍体生物において特定の遺伝子が必須産物をコードしているかどうかを確立することの固有の困難性、が残っている。2000年2月18日に出願された同時係属中の仮特許出願は、有力な選択マーカーの同定と、そのマーカーをコードする2つの遺伝子の構築を開示している。これらのマーカーは、C.アルビカンスの形質転換および遺伝子破壊に好適である。

20

30

【0006】

C.アルビカンス(図1)における遺伝子破壊の現在の方法は、典型的には、「URAプラスター」遺伝子カセットをそのゲノム内への組み込みに使用し、目的の標的遺伝子と置き換える多段階プロセスを含む。URAプラスターカセットは、CaURA3マーカーを含み、このマーカーは、対応する栄養要求性宿主内で選択可能であり、かつサルモネラ・チフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)HisG遺伝子の定方向リピート(direct repeat)が隣接している。URAプラスターカセットはまた、置換すべき遺伝子に対応するランキング配列も有し、この配列は、相同的組換えによってその遺伝子の正確な置換を容易にする。推定上のヘテロ接合性形質転換体は、欠失した標的遺伝子の対立遺伝子の1つを有しており、ウラシル原栄養体として選択され、その正体および染色体構造はサザンロットおよびPCR分析によって確認される。染色体内部組換え事象がHisGリピート間で生じ、CaURA3遺伝子の切出しおよび組み込みカセットの消失が生じている分離株を、5-フルオロオロチン酸(5-FOA)含有培地上で選択した。これは、標的遺伝子の第2の対立遺伝子の破壊に対して、Ura-プラスターの再利用を含むプロセス全体の繰り返しを可能にする。標的遺伝子が非必須である場合、ホモ接合性遺伝子破壊が第2ラウンドの遺伝子置換で生じ、サザンロットおよびPCR分析で同定される。

40

【0007】

しかしながら、ホモ接合性欠失株は、必須の遺伝子の両対立遺伝子が欠けており、生存可能ではないであろう。したがって、Uraプラスター法は、標的遺伝子の必須の性質を確

50

立する明白な結果をもたらさないだろう。なぜなら、生存可能な突然変異株の増殖の低さといった代わりの説明が、得られた負の結果について同様に考えられ得るからである。必須遺伝子同定のためのさらに最近の手法には、Wilson, R.B., Davis, D., Mitchell, A.P. (1999) J. Bacteriol. 181:1868-74に開示された手法などがあり、複数の栄養要求性マーカーおよびPCRベースの遺伝子破壊方法を使用している。そのような方法は、Uraプラスターカセットを使用する必要性を効果的に克服するが、所与の遺伝子が必須であるかどうか、よって潜在的に有用な標的であるかどうかの決定は、多大な労力を要し、ゲノムワイド分析 (genome-wide analyses) に不適なままである。カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) における遺伝子破壊に対してUraプラスターカセットまたは複数の栄養要求性マーカーベースの方法を用いる場合、所与の遺伝子が必須であるという統計学的に確かな結論をサポートするにはかなりの労力が必要である。典型的には、30~40個の第2ラウンドの形質転換体全てを、その遺伝子が必須であるという特許請求の範囲に対する統計的支持がなされる前に、破壊断片と予め構築された破壊対立遺伝子との間の相同的組換えから得られた再構築されたヘテロ接合性株として (PCRまたはサザンブロット分析を用いて) 確認しなければならない。さらに、第2の突然変異は、形質転換ステップまたは5-FOA対抗選択 (Uraプラスターカセットが再利用される場合) のいずれかで選択可能であるので、2つの独立に構築されたヘテロ接合性株は、第2の対立遺伝子の破壊の試みの際に調べられるのが好ましい。さらに、特定の表現型が標的遺伝子のホモ接合性突然変異 (第2の突然変異ではない) に関連しているという証拠は、遺伝子の野生型コピーを破壊株に形質転換により戻すことによる欠陥の補完を必要とする。

10

20

【0008】

最後に、Uraプラスター法は遺伝子の不可欠性の直接的な立証を妨げる。したがって、必須の標的遺伝子に特徴的な末端表現型を決定的に評価することは不可能である。その結果、確認された薬物標的遺伝子の不活化により、細胞死 (すなわち殺傷最終表現型) 対増殖抑制 (すなわち静的最終表現型) が生じるかどうかを確立することは、そのような情報が、薬物開発における適合性に関して薬物標的に優先順位をつけることにおいて提供する価値にもかかわらず、現在の手法では不可能である。

【0009】

明らかに、現在の遺伝子破壊法は多大な労力を要し、標的確認のためのハイスループット方法に対してかなり不応性であるので、二倍体の病原性真菌、特にカンジダ・アルビカ 30
ンス中の必須遺伝子の明白、迅速かつ正確な同定に有効な方法およびツールが必要とされている。本発明は、迅速な同定、確認および薬物標的の優先順位づけをもたらすことで薬物スクリーニングを促進するハイスループット方法を可能にすることによって、現在の薬物発見手法におけるこれらの制約を克服するものである。

30

【発明の開示】

【0010】

3. 発明の概要

本発明は、生物のゲノム内の各遺伝子について、その遺伝子が、必須であるか否か、およびさらには病原性生物については、毒性または病原性に必須であるか否かについて実験的に決定することを可能とする効果的かつ効率的な方法を提供する。必須遺伝子および毒 40
性感染の拡大に重要な遺伝子の同定および評価により、病原性生物に対する新規な薬物についてのハイスループットスクリーニングの開発の基本が提供される。

40

【0011】

本発明は、倍数性とは関係なく任意の生物、特に病原性真菌で実施することができる。好ましくは、病原性真菌は二倍体病原性真菌であり、例えば、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) などを含むが、これらに限定されない。

【0012】

ある実施形態では、本発明は、遺伝子の1つの対立遺伝子が発現可能な優性選択マーカー 50

50

ーを含むカセットの挿入またはこれによる置換によって改変されている、二倍体真菌株を構築する方法に関する。このカセットは、遺伝子組換えによって染色体内に導入されることにより、遺伝子の第1対立遺伝子が不活性化したヘテロ接合体株を提供する。

【0013】

遺伝子のもう一方の対立遺伝子を、遺伝子組換えにより、異種プロモーターを含むプロモーター置換断片を導入することにより、遺伝子の第2対立遺伝子の発現が異種プロモーターによって制御されるように改変する。異種プロモーターからの発現は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含むトランスアクチベータータンパク質が存在することにより制御することができる。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これに結合し、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、タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現によって細胞中に産生される。

10

【0014】

遺伝子の両方の対立遺伝子が改変されている二倍体真菌を構築するためのかかる方法を、生物の各遺伝子それぞれについて平行して実施することにより、遺伝子の改変対立遺伝子をそれぞれに含む二倍体真菌細胞の集団を構築することを可能にする。この集団は、したがって、二倍体生物の遺伝子の実質的に全ての改変対立遺伝子を含む。本明細書中に用いる場合、「実質的に全て」という語は、少なくとも全体の少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または99%を意味する。好ましくは二倍体生物のゲノムの全遺伝子すべてが集団中に存在する。

20

【0015】

遺伝子の改変対立遺伝子を含む二倍体病原性真菌株などの二倍体生物も本発明に包含される。ここで、該生物では、遺伝子の第1対立遺伝子が発現可能な優性選択マーカーをコードするヌクレオチド配列を挿入またはこれで置換することによって不活性化されており、該遺伝子の第2対立遺伝子もまた、該第2対立遺伝子の発現が異種プロモーターにより制御されるように改変されている。本発明の1態様では、突然変異体二倍体病原性真菌株中の改変対立遺伝子が、株の増殖、生存活性および生存に必要な必須遺伝子に相当する。本発明の他の態様では、改変対立遺伝子が宿主生物に対する病原性二倍体真菌株の毒性および病原性に必要な遺伝子に相当する。両方の場合、必須遺伝子および毒性/病原性遺伝子が潜在的な薬物標的である。

30

【0016】

したがって、本発明は、それぞれが異なる遺伝子の改変対立遺伝子を含む複数の株をそれぞれに含む、突然変異二倍体真菌株の集団を包含する。本発明の株の集団は、真菌のゲノム中の実質的に全ての異なる必須遺伝子、または病原性真菌のゲノム中の実質的に全ての異なる毒性遺伝子についての改変対立遺伝子を含む。

【0017】

他の実施形態では、本発明は、基盤上のアレイ中に特定可能な位置に配置された複数の所定のヌクレオチド配列を含む核酸マイクロアレイにも関する。所定のヌクレオチド配列は、二倍体病原性生物の増殖および生存に必要な該二倍体病原性生物の必須遺伝子のヌクレオチド配列、該生物の病原性または毒性に寄与する遺伝子のヌクレオチド配列、および/または各突然変異株をマークするために用いた特有な分子タグに相補的でこれらにハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含みうる。

40

【0018】

本発明はまた、二倍体生物の生存に必要な遺伝子、および二倍体病原性生物の毒性および/または病原性に寄与する遺伝子を同定するための方法にも関する。まず、本発明は、突然変異真菌細胞などの二倍体生物の突然変異体を用意する。該突然変異体は、ある遺伝子の1つの対立遺伝子が破壊カセットの挿入または該カセットによる置換によって不活性化しており、他方の対立遺伝子は該第2の対立遺伝子の発現が異種プロモーターの制御下となるように、異種制御プロモーターを含む核酸分子によって改変されている。第2に、このような突然変異細胞を、改変された遺伝子の第2対立遺伝子が実質的に発現されない条

50

件下で培養する。そして、該細胞の生存活性または病原性を測定する。生存活性の消失または顕著な増殖不全が認められる場合は、該突然変異細胞において改変された遺伝子は、病原性真菌の生存に必須であることを示す。同様に、突然変異細胞の毒性および/または病原性の消失が認められる場合には、改変された遺伝子が病原性真菌の毒性および/または病原性に寄与する遺伝子であることを示す。

【0019】

本発明の他の実施形態では、本明細書中に開示する方法によって構築された突然変異病原性真菌株が病原性真菌に対する効果的な抗真菌剤の検出に有用である。本発明の突然変異細胞を、試験化合物の存在下または非存在下の異なる増殖条件下で培養する。すると、増殖速度を比較することにより、標的遺伝子産物に対する活性のある化合物か否かを示す。標的遺伝子の第2対立遺伝子を実質的に発現抑制することができ、これにより、改変対立遺伝子によって発現される遺伝子産物に対して活性のある化合物に対する感受性が増大した細胞を提供する。あるいは、第2対立遺伝子を実質的に過剰発現させて、標的遺伝子の改変対立遺伝子により発現される遺伝子産物に対して活性のある化合物に耐性が増大された細胞を提供する。

10

【0020】

本発明の他の実施形態では、本明細書中に開示する方法によって構築された株は、ヒトなどの動物または植物の非感染性疾患の治療に有効な治療薬のスクリーニングに用いられる。植物または動物の対応物と標的のアミノ酸配列の類似性、または配列類似性の欠損の結果として、同定された活性な化合物は植物または動物における疾患、特にヒトにおける癌や免疫障害などの疾患の治療に対する治療的用途を有しうる。

20

【0021】

他の実施形態では、本発明はさらに、既知の薬物の存在下などの種々の条件下で、必須および/または毒性遺伝子の発現を解析するための転写プロファイリングおよびプロテオミクス技術の使用を包含する。このような研究から得られる情報は、既知の薬物の標的および機序を解明するため、既知の薬物と同じ様式で作用する新規薬物を発見するため、および生物の増殖および生存に必須な遺伝子産物と、生物の毒性および病原性に寄与する遺伝子産物との間の相互作用の概要を明らかにするために用いることができる。

【0022】

本発明のさらなる実施形態では、病原性生物の遺伝子のセットを薬物スクリーニングに対する潜在的な標的として同定する。かかる遺伝子は、該方法および本明細書中に開示された基準を用いて、病原性真菌の生存ならびに/または病原性真菌の毒性および/もしくは病原性に必須であると特定された遺伝子を含む。本発明により提供される病原性生物の必須遺伝子または病原性遺伝子（即ち、標的遺伝子）のポリヌクレオチドを種々の薬物発見の目的により利用することができる。限定はされないが、該ポリヌクレオチドを、特性解析、スクリーニングまたは治療用途のための組換えタンパク質の発現に使用することができ、病原性生物が侵入したまたは存在する（恒常的に、または特定の進行段階もしくは疾患状態のいずれかにおいて）宿主組織に対するマーカーとしての使用；潜在的にオーソログである必須遺伝子または毒性遺伝子を同定するための近縁のまたは近縁ではない他の病原性生物のDNA配列と比較するための使用；発現パターンの試験のための核酸アレイに接着させるためのオリゴマーの選択および作製するための使用；DNA免疫化技術を用いた抗タンパク質抗体の誘起するための使用；抗DNA抗体を誘起するためのまたは他の免疫応答を誘発するための抗原；および治療薬（アンチセンスなど）としての使用が可能である。該ポリヌクレオチドが他のタンパク質に結合するまたは結合する可能性のあるタンパク質をコードする場合（レセプター-リガンド相互作用における場合など）、ポリヌクレオチドは、それに結合する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ためのアッセイまたは結合相互作用の阻害剤を同定するためのアッセイに用いることもできる。

30

40

【0023】

本発明により提供される、必須遺伝子および毒性遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはタンパク質（即ち標的遺伝子産物）は、生物学的活性の測定に用いることがで

50

き、ハイスループットスクリーニングのための複数のタンパク質からなるパネルまたはアレイの構成要素としての使用；抗体の誘起または免疫応答の誘発のための使用；生物学的液体におけるタンパク質（またはその受容体）のレベルの定量的測定のために設計されるアッセイにおける使用；病原性生物が侵入したまたは存在する（恒常的に、または特定の進行段階もしくは疾患状態のいずれかにおいて）宿主組織に対するマーカーとしての使用；およびもちろん、関連する受容体またはリガンド（結合パートナーという場合もある）の単離、特に毒性因子の場合における単離への使用が挙げられる。タンパク質が他のタンパク質に結合する場合（例えば、レセプター-リガンド相互作用における場合など）、該タンパク質を用いて、それと結合する他のタンパク質の同定または結合相互作用の阻害剤の同定が可能である。これらの結合相互作用に關与するタンパク質を用いて、結合相互作用のペプチドもしくは低分子阻害剤またはアゴニスト（病原性生物の侵入性および病原性に關与するものを含む）をスクリーニングするために用いることもできる。

10

【0024】

これらの薬物の探索に有用な物はいずれも全ては、研究用製品として市販されるキットに開発することが可能である。キットは、本発明の複数の必須遺伝子および毒性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。

【0025】

4. 図面の簡単な説明

（以下参照）。

20

【0026】

5. 本発明の詳細な説明

5.1 遺伝子破壊および薬物標的の同定 (Drug Target Discovery)

本発明は、薬物標的の同定および評価のための系統的で効率的な方法を提供する。該方法は、ゲノム情報ならびに個々の遺伝子の生物学的機能に基づく。

【0027】

本発明の方法により、遺伝子突然変異体の集団が作製される。該集団においては、特定の遺伝子の量を変化させて(モジュレートして)、増殖、生存および/または病原性に関するそれら遺伝子の機能を調べることができるようにしてもよい。そのような研究から得られた情報により、潜在的な薬物標的としての個々の遺伝子産物の同定が可能となる。さらに本発明は、遺伝子突然変異体を個々にもしくは集団として、薬物スクリーニングにおよび薬物作用機構の研究に使用する方法を提供する。

30

【0028】

一般的に、遺伝子破壊実験において、二倍体の生物におけるある遺伝子の対立遺伝子の両方についてのホモ接合性欠失を作製できないという観察によって、それ自体で、該遺伝子が必須遺伝子であるという結論が支持されるわけではない。むしろ、問題の遺伝子の発現が該遺伝子を有する細胞の生存度と結びついていることの直接的な証明が、問題の遺伝子が必須であるという明白な立証のために必要である。

【0029】

所定の遺伝子が細胞の生存に必須であることの直接的な証明は、一倍体の時期がある二倍体の生物において該遺伝子の発現を破壊することによって、立証することができる。例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、二倍体細胞型における遺伝子破壊法を通じて遺伝子産物を完全に除去し、続いて孢子形成および減数分裂の結果としての4つの分子の分離により、単一の突然変異による差異を有する一倍体酵母株の直接比較が可能となることによって、上記の証明が行われる。しかしながら、このような方法は大部分の病原性二倍体細胞型を含む無性生殖酵母株に適用することができず、推定上の必須遺伝子の発現を排除するためには別の方法が必要である。

40

【0030】

一実施形態において、本発明はある生物の二倍体突然変異型細胞の作製方法を提供する。この方法では、その突然変異型細胞において特定の遺伝子の量を変化させる(モジュレ

50

ートする)ことができる。この本発明の方法によって、生物の二倍体細胞中の標的遺伝子の一方の対立遺伝子を破壊し、一方で第2の対立遺伝子を、該対立遺伝子のプロモーターを異種の制御プロモーターに置換することによって改変する。このようにして構築された株を、改変型対立遺伝子対(すなわち、双方の対立遺伝子が上記のように改変されている遺伝子)を含むと言う。生物のゲノムDNA配列が利用可能な場合には、この工程を生物の各々全ての遺伝子について繰り返すことができ、それによって、突然変異型生物(各生物は、破壊された対立遺伝子と条件付きで発現することができる対立遺伝子とを有する)の集団を構築することができる。したがって、この遺伝子破壊戦略は、ある生物に対する潜在的な薬物標的遺伝子の実質的に完全なセットを提供する。この突然変異型生物集団は、改変型対立遺伝子対の実質的に完全なセットを含み、ハイスループット薬物スクリーニングアッセイ開発のための基礎を形成する。生物のゲノム配列が完全に配列決定されていない場合でさえも、このような突然変異型生物の集団を作製することができる。より小さな突然変異型生物集団を作製し得ることが意図される。この場合、各突然変異型生物においては、所望の遺伝子サブセットのうち一方の対立遺伝子が破壊され、このサブセットにおける遺伝子のもう一方の対立遺伝子が条件付き発現下に置かれる。このような株の構築に用いられる本発明の方法を本明細書ではGRACE法と呼ぶ。GRACE法の頭字語は、遺伝子置換および条件付き発現(gene replacement and conditional expression)というフレーズに由来する。

10

【0031】

一方の対立遺伝子の条件付き発現とともにもう一方の対立遺伝子の破壊を含むGRACE法は、URAプラスターカセットを用いた破壊の反復サイクルと、続くその減失に対する対抗選択に頼る方法の限界を克服する。GRACE法により、病原性真菌などの二倍体病原性微生物における大規模な標的評価が可能となる。

20

【0032】

二倍体細胞に適用する本発明のGRACE法は、以下の2ステップを含む：(i)挿入、トランケーションおよび/または欠失による一方の野生型対立遺伝子のコード領域および/または非コード領域の破壊を生じる遺伝子置換、および(ii)プロモーター置換または条件付きタンパク質不安定性による残るもう一方の野生型遺伝子の条件付き発現(図2)。該方法の詳細な説明は、後節で規定する。

【0033】

GRACE法を適用することで生じ、単離された突然変異型生物を、本明細書ではその生物のGRACE株と呼ぶ。ある生物のそのような突然変異型株は、本発明に包含される。特定の実施形態において、特定の生物のゲノム中の実質的に全ての異なる遺伝子をGRACE法による改変に供することによって生成されるGRACE株の集団が提供される。この集団において、各々の株が異なる遺伝子の改変型対立遺伝子を含み、該生物の実質的に全ての遺伝子が集団において提示される。目的の生物における全ての遺伝子に対するGRACE株が生成されることが意図される。あるいは、ある生物のGRACE株のより小さな集団を生成することができ、その場合には、該生物の所望の遺伝子サブセットがGRACE法によって改変される。

30

【0034】

一般的には、生物の生存度および/または正常な増殖が、ある遺伝子の発現に結び付けられるかまたは依存する場合に、該遺伝子が必須であると考えられる。細胞における必須機能は、部分的には該細胞の遺伝子型に、および部分的には細胞環境に依存する。必須機能、例えばエネルギー代謝、細胞構造の生合成、遺伝材料の複製および修復などの中には、複数の遺伝子を必要とするものがある。したがって、生物における多数の遺伝子の発現がその生物の増殖および/または生存に必須である。したがって、規定の条件セット下にあるGRACE株の生存度または正常な増殖が、改変型対立遺伝子対のうち残存する機能的な対立遺伝子の条件付き発現に結び付けられるかまたは依存する場合には、この株においてGRACE法で改変された遺伝子を生物の「必須遺伝子」と呼ぶ。

40

【0035】

生物の病原性が少なくとも部分的にある遺伝子の発現に関連する場合には、一般的に該

50

遺伝子は生物の毒性/病原性に寄与すると考えられる。生物の多数の遺伝子が、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、規定の宿主または宿主由来の規定の細胞セットに対するGRACE株の毒性および/または病原性が、改変型対立遺伝子対のうちの残存する機能的な対立遺伝子の条件付き発現に関連する場合には、この株においてGRACE法で改変された遺伝子を生物の「毒性遺伝子」と呼ぶ。

【0036】

本発明は、病原生物の必須遺伝子を同定し、かつ薬物同定プログラムにおけるそれら遺伝子の有用性を評価するための便利で効率的な方法を提供する。同様に、本発明の方法を用いて病原生物の毒性遺伝子を同定することができる。GRACE法によって同定される、これらの生物の必須遺伝子および毒性遺伝子の正体は、本発明に包含される。生物の実質的に全ての必須遺伝子および毒性遺伝子が、本発明のGRACE法によって同定され評価され得る。

10

【0037】

このように同定された各々の必須遺伝子および毒性遺伝子は、生物に対する潜在的な薬物標的に対応し、個々にまたは集団として薬物スクリーニングの種々の方法に用いることができる。薬物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および毒性遺伝子を、遺伝子産物の構造的特徴、機能的特性および発現プロフィールに基づいてサブセットに分類し、区分することができる。各サブセット内の必須遺伝子および毒性遺伝子によってコードされる遺伝子産物は、類似の生物学的活性、類似の細胞内局在、構造的相同性および/または配列相同性を共有し得る。また類似のもしくは遠縁の分類学的グループ中の他の生物に対する配列相同性もしくは類似性(例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 遺伝子もしくはヒト遺伝子に対する相同性)または他の生物(例えば、*S. cerevisiae*もしくはヒト)の遺伝子に対する配列類似性もしくは相同性の完全な欠如に基づいて、サブセットを作成してもよい。また、改変型遺伝子を有する生物による殺菌最終表現型または静菌最終表現型の提示に基づいてサブセットを作成してもよい。必須遺伝子セットまたは毒性遺伝子セットと呼ばれるこのようなサブセットは、薬物スクリーニングプログラムにおいて1つのグループとして都合よく研究することができる。このようなサブセットが本発明によって提供される。したがって、本発明は複数の突然変異型生物、例えば各GRACE株が異なる遺伝子の改変型対立遺伝子を含む、GRACE株の集団を提供する。この場合の各遺伝子は細胞の増殖および/または生存に必須なものである。この集団は本発明の種々の方法にしがって使用することができる。この場合、集団中の各株の細胞は、用途に関連する同一の操作または処理に付することができる。あるいは、集団中の各株の細胞を、用途に関連する操作または処理の前にプールする。さらに、集団のコンセプトはデータ回収、プロセッシングおよび説明にもおよび、異なる真菌細胞株または集団中の異なる真菌株から得られたデータをひとつのセットとして統合させて扱う。

20

30

【0038】

特定の実施形態においては、病原性真菌のゲノム中の実質的に全ての必須遺伝子がGRACE法によって同定され、その必須遺伝子の改変型対立遺伝子対を含有するGRACE株がGRACE株集団に含まれる。別の特定の実施形態においては、病原性真菌のゲノム中の実質的に全ての毒性遺伝子がGRACE法によって同定され、その毒性遺伝子の改変型対立遺伝子対を含有するGRACE株がGRACE株集団に含まれる。

40

【0039】

カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) において、ゲノム全体に対するGRACE株集団は*C. albicans*のゲノム配列分析に基づく約7000個の遺伝子の改変型対立遺伝子対を含み得る。*C. albicans*の必須遺伝子の完全なセットは、約1000個の遺伝子を含むと算出されている。本発明は、*C. albicans*のこれらの遺伝子のうちの幾つかの正体、および薬物標的としてのこれらの遺伝子およびそれらの遺伝子産物の種々の使用を提供する。さらに、この病原体の毒性に関与する遺伝子数についての推定値は、100~400遺伝子である。一旦、必須遺伝子の正体が既知になれば、GRACE法以外のその他の方法によって作製した

50

1コピー以上の突然変異した必須遺伝子を含む種々の型の突然変異体が考えられ、それらは本発明に包含される。

【0040】

また本発明は生物学的方法およびコンピューター使用の方法、ならびに同定された*C. albicans*の必須遺伝子および毒性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試薬を提供する。二倍体生物のGRACE株から得られた情報を用いて、一倍体生物における相同配列を同定することができる。またこのような相同遺伝子の正体および使用も本発明に包含される。

【0041】

考察を明快にするために、本発明を下記の小節で病原性真菌であるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) を例にして説明する。しかしながら、植物およびヒトを含む動物に対するその他の病原体および寄生虫の必須遺伝子および毒性遺伝子に、その原理を同様に適用することができる。GRACE法は、生活環に複相を有する病原生物のいずれにも適用することができる。したがって、二倍体病原生物という用語は、二倍体形態のみで存在する生物に限定されず、生活環に単相と複相の双方を有する生物も包含する。

10

【0042】

例えば、薬物標的の同定および評価のためのGRACE法は、その他の病原性真菌に直接的に適用することができる。不完全菌類 (*Deuteromycetous fungi*)、すなわち性周期および古典遺伝学にあてはまらない真菌 (この中には、*C. albicans* が含まれる) は、ヒト真菌病原体の大部分に相当する。アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) はこの門の医学的に重要なもう1つのメンバーである。より厳密には、この門には子嚢菌および担子菌のメンバーが含まれる。*A. fumigatus*、子嚢菌は、免疫無防備状態の患者において、呼吸器感染または侵入性アスペルギルス症 (IA) を引き起こす主要な空気感染性真菌因子である。20年前では比較的知られていなかったが、今日、IAの症例数は1年当たり数千例であると推定されている。IAの死亡率は50%を超え、アンホテリシン (*amphotericin*) Bもフルコナゾールもあまり有効ではない。これらの問題を合わせると、この生物の新規な薬物標的の同定はこの生物において標的評価されている現状によって限定されている。

20

【0043】

以下の理由により、*C. albicans* で示したGRACE法は *A. fumigatus* への使用に容易に適応される。*A. fumigatus* は一倍体ゲノムを有するが、GRACE法を単純化して野生型プロモーターを1ステップで条件付きプロモーターに置換する方法とすることができる。カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) とは対照的に、*A. fumigatus* は普遍遺伝コードに忠実であるので、*C. albicans* に対してGRACE法を操作するために必要であるような広範な部位特異的突然変異誘発を必要としないだろう。さらに *A. fumigatus* に対する、形質転換、および相同的組換えによる遺伝子破壊などの必須な分子生物学技法が開発されている。選択マーカーが *A. fumigatus* におけるこれらの技法に利用可能である。選択マーカーとしては、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、ならびに栄養要求性マーカー、*ura3* が挙げられる。さらには、公的および民間の双方の *A. fumigatus* ゲノム配列決定プロジェクトが存在する。したがって、配列情報はGRACE法を用いた推定上の必須遺伝子の同定ならびにこれらの薬物標的の実験的評価の双方に利用可能である。GRACE法を適用することができるさらなる病原性不完全菌類には、アスペルギルス・フラビス (*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 (*Coccidioides immitis*) が含まれる。

30

40

【0044】

本発明の別の態様において、薬物標的の同定および評価のためのGRACE法は担子菌の病原性真菌に適用される。この門の特に医学的に重要な1メンバーは、クリプトコッカス・ネオフォルマンス (*Cryptococcus neoformans*) である。この空気伝染性病原体は、AIDS患者において生命を危うくする感染の原因として一般にみとめられているうちの4番目 (7~8%) に相当するものである。*C. neoformans* に対する形質転換および遺伝子破壊ストラテジーは存在しており、また公的に資金が提供されたこの生物に対するゲノム配列決定プ

50

プロジェクトが整っている。*C. neoformans*は性周期を有し、したがってGRACE法を一倍体株および二倍体株の双方に用いることが可能である。その他の医学的に重要な担子菌類としては、トリコスポロン・ベイゲリ (*Trichosporon beigelii*) およびシゾフィラム・コムユーン (*Schizophyllum commune*) が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

同様に、医学的に関連する真菌病原体が本発明を用いる合理的薬物標的の同定に好適である。したがって、さらに植物真菌病原体および動物病原体を調査して農業的および獣医学的目的の新規な薬物標的を同定することができる。果実、木の実、野菜、イネ、ダイズ、オートムギ、オオムギおよびコムギを含めた多くの農作物の品質および収量は、植物真菌病原体によってかなり低減される。例としては、葉の病斑 (*Septoria tritici*)、包穎の病斑 (*Septoria nodorum*)、様々なコムギさび病 (*Puccinia recondita*, *Puccinia graminis*)、ウドンコ病 (様々な種)、および茎/根茎 (*stem/stock*) の腐敗病 (*Fusarium spp.*) を引き起こすコムギ真菌病原体が挙げられる。その他の特に有害な植物病原体の例としては、ジャガイモ飢饉の原因微生物 (*Phytophthora infestans*)、オランダエルム病を引き起こす子囊菌類 (*Ophiostoma ulmi*)、トウモロコシ黒穂病を引き起こす病原体 (*Ustilago maydis*)、イネいもち病を引き起こす病原体 (*Magnaporthe oryzae*, *Peronospora parasitica* (Century et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Jul 3; 92 (14): 6597-601)); *Cladosporium fulvum* (トマト葉部かび病原菌); *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* および *Fusarium avenaceum*, (コムギ, Abramson ら, J Food Prot 2001 Aug; 64 (8): 1220-5); *Alternaria brassicicola* (ブロッコリ; Mora ら, Appl Microbiol Biotechnol 2001 Apr; 55 (3): 306-10); *Alternaria taquetica* (Gamboa-Angulo ら, J Agric Food Chem 2001 Mar; 49 (3): 1228-32); 穀類病原菌 *Bipolaris sorokiniana* (Apoga ら, FEMS Microbiol Lett 2001 Apr 13; 197 (2): 145-50); イネ苗枯病原菌 *Pyricularia grisea* (Lee ら, Mol Plant Microbe Interact 2001 Apr; 14 (4): 527-35); 薬黒穂病菌 *Microbotryum violaceum* (Bucheli ら, Mol Ecol 2001 Feb; 10 (2): 285-94); *Verticillium longisporum* comb. Nov (ナタネ立枯病, Karapapa ら, Curr Microbiol 2001 Mar; 42 (3): 217-24); *Aspergillus flavus* ワタ感染症 (Shieh ら, Appl Environ Microbiol 1997 Sep; 63 (9): 3548-52); 眼点病 (eyespot) 病原菌 *Tapesia yellundae* (Wood ら, FEMS Microbiol Lett 2001 Mar 15; 196 (2): 183-7); *Phytophthora cactorum* 株 P381 (イチゴ葉部壊死, Orsomando ら, J Biol Chem 2001 Jun 15; 276 (24): 21578-84); *Sclerotinia sclerotiorum*, 遍在性ネクロトロフィック (necrotrophic) 真菌 (ヒマワリ, Poussereau ら, Microbiology 2001 Mar; 147 (Pt 3): 717-26); コショウ/クランベリー, 炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Kim ら, Mol Plant Microbe Interact 2001 Jan; 14 (1): 80-5); *Nectria haematococca* (エンドウマメ, Han ら, Plant J 2001 Feb; 25 (3): 305-14); *Cochliobolus heterostrophus* (Monke ら, Mol Gen Genet 1993 Oct; 241 (1-2): 73-80), *Glomerella cingulata* (Rodriguez ら, Gene 1987; 54 (1): 73-81) 偏性病原菌 *Bremia lactucae* (レタスべと病; Judelson ら, Mol Plant Microbe Interact 1990 Jul-Aug; 3 (4): 225-32) *Rhynchosporium secalis* (Rohe ら, Curr Genet 1996 May; 29 (6): 587-90), *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*), *Leptosphaeria maculans* (Farman ら, Mol Gen Genet 1992 Jan; 231 (2): 243-7), *Cryphonectria parasitica* および *Mycosphaerella fijiensis* および *Mycosphaerella musicola*, それぞれ黒色または黄色シガトール病の原因物質, ならびに *Septoria* によるバナナ葉枯病を引き起こす *Mycosphaerella eumusae* (バナナ & プランテン, Balint-Kurti ら, FEMS Microbiol Lett 2001 Feb 5; 195 (1): 9-15) 等を挙げることができる。抗真菌剤耐性を有する植物病原体の新たな出現および単一栽培実施への依存の増大は、新規かつ改良された抗真菌性化合物の必要性が増大していることを明らかに示す。本発明は、植物および家畜の病原体および寄生虫における薬物標的を同定および検証することを包含する。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虫における薬物標的を同定および検証するためのGRACE法の適用を包含する。表Iに、医学的、農業的または商業的な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挙げる。

【表1】

表I： 代表的な一倍体および二倍体真菌

子囊菌

<u>動物病原体：</u>	<u>植物病原体：</u>	<u>一般に商業上重要なもの</u>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Alternaria solanii</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Alternaria spp</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
<i>Blastomyces dermatidis</i>	<i>Cercospora zeae-maydis</i>	<i>Pichia pastoris</i>	
<i>Candida spp including</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>	
<i>Candida dublinensis</i>	<i>Claviceps purpurea</i>	<i>Ashbya gossipii</i>	
<i>Candida glabrata</i>	<i>Corticium rolfsii</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	
<i>Candida krusei</i>	<i>Endothia parasitica</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
<i>Candida parapsilopsis</i>	<i>Erysiphe graminis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Erysiphe triticii</i>	<i>Candida utilis</i>	
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Kluveromyces lactis</i>	
<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Plasmopara viticola</i>		
<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>		20
<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Ophiostoma ulmi</i>		
	<i>Rhizoctonia species including oryzae</i>		
	<i>Septoria species including</i>		
	<i>Septoria avenae</i>		
	<i>Septoria nodorum</i>		
	<i>Septoria passerinii</i>		
	<i>Septoria triticii</i>		
	<i>Venturia inequalis</i>		
	<i>Verticillium dahliae</i>		
	<i>Verticillium albo-atrum</i>		
	担子菌		30
<u>動物病原体：</u>	<u>植物病原体：</u>	<u>一般に商業上重要なもの</u>	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Puccinia spp including</i>	<i>Agaricus campestris</i>	
<i>Trichosporon beigeli</i>	<i>Puccinia coronata</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
	<i>Puccinia graminis</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	
	<i>Puccinia recondita</i>	<i>Trametes versicolor</i>	
	<i>Puccinia striiformis</i>		
	<i>Tilletia spp including</i>		
	<i>Tilletia caries</i>		
	<i>Tilletia controversa</i>		40
	<i>Tilletia indica</i>		
	<i>Tilletia tritici</i>		
	<i>Tilletiafoetida</i>		
	<i>Ustilago maydis</i>		
	<i>Ustilago hordei</i>		

接合菌

動物病原体：植物病原体：一般に商業上重要なもの*Absidia corymbifera**Mucor rouxii**Rhizomucor pusillus**Rhizopus arrhizus*

カンジダ・グラブラータ(Candida glabrata)を除く全てのカンジダ種は、生活環に単相を欠く真正の二倍体種であり、したがってGRACE法の適用を受ける。

10

【0046】

5.2 GRACE株の構築

本発明にしたがって、二倍体生物のGRACE株において、遺伝子の一方の対立遺伝子のみを削除する一方で、第二の対立遺伝子を異種プロモーターの制御下に置いて、その活性を調節することができる。その遺伝子が必須である場合、対立遺伝子を両方とも削除すると、致死となるか、又は増殖がひどく損なわれる。したがって、本発明において、異種プロモーターは、第二の対立遺伝子の発現レベルの範囲を定めるために使用される。条件に応じて、第二の対立遺伝子は、その対立遺伝子とその天然プロモーターに結合している場合と比較して、非発現性、低発現性、過剰発現性又は通常レベルの発現性であり得る。異種プロモーターは、同じ病原生物の異なる遺伝子から得られるプロモーターであるか、又は異なった種から得られるプロモーターであり得る。

20

【0047】

標的遺伝子の正確な置換は、目的の株において発現できる選択マーカー(好ましくは優性選択マーカー)を含む遺伝子破壊カセットを用いることにより、容易になる。2つの別個の優性選択マーカーを利用できることにより、標的遺伝子の両方の対立遺伝子において、従来の方法に固有の対抗選択工程を必要とすることなく、遺伝子置換工程を実施できるようになる。

【0048】

特に、本発明は、遺伝子の両方の対立遺伝子を改変する、二倍体病原性真菌細胞株の構築のための方法を含む。この方法は、(a)二倍体病原性真菌細胞の遺伝子の第一の対立遺伝子を、その細胞内で発現できる選択マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子破壊カセットを用いて組換えを行うことにより改変し、このことにより遺伝子の第一の対立遺伝子が不活性化されたヘテロ接合体の病原性真菌細胞を提供する工程、及び(b)異種プロモーターを含むプロモーター置換断片によって組換えを行うことにより、遺伝子の第二の対立遺伝子が異種プロモーターにより制御されるように、ヘテロ接合体の二倍体病原性真菌細胞における遺伝子の第二の対立遺伝子を改変する工程を含む。

30

【0049】

この方法を、遺伝子の所望のサブセットについて繰り返すことにより、それぞれの株が異なった遺伝子の改変型対立遺伝子対を含むGRACE株の集団を作製する。この方法を病原性真菌の遺伝子の全てについて反復することにより、病原性真菌のゲノム全体に相当するGRACE株の完全なセットを得ることができる。このように本発明は、その細胞のそれぞれが異なった遺伝子の改変型対立遺伝子対を含む、二倍体病原性真菌細胞の集団を構築するための方法を提供する。この方法は、対立遺伝子対を改変する工程を複数回反復することを含み、各反復により、異なる対立遺伝子対が改変され、このことによりそれぞれ異なった遺伝子の改変型対立遺伝子対を含む二倍体病原性真菌細胞の集団が提供される。

40

【0050】

GRACE株構築のための好適な実施例は、次の2工程法を用いる。C.アルピカンス(C.albicans)を例として用いる。

【0051】

5.2.1 遺伝子破壊によるヘテロ接合体構築

50

ヘテロ接合性突然変異体を作製するために、いくつかの当技術分野で既知の方法を利用することができる。それほど好ましくない実施例において、栄養要求性マーカー(限定しないが、例えば、CaURA3、CaHIS3、CaLEU2又はCaTRP1)を、所望ならば遺伝子破壊のために用いることができる。しかし、二倍体真菌におけるヘテロ接合体構築の好適な方法においては、遺伝的に改変された優性選択マーカーを利用する。C.アルビカンスは、1ミリリットル当たり200マイクログラムの濃度のヌクレオシド様の抗生物質であるストレプトトリシンに感受性である。C.アルビカンス中の大腸菌SAT1(*Escherichia coli* SAT1)遺伝子の存在により、薬物がアセチル化されて非毒性になり、1ミリリットル当たり200マイクログラムの濃度のストレプトトリシンの存在下でも、株が増殖できる。C.アルビカンスにおけるSAT1遺伝子の発現は、そのDNA配列がこの生物体の遺伝コードと適合するように変更する遺伝子操作を行い、かつCaACT1プロモーター(Morschhauserら、(1998) *Mol. Gen. Genet.* 257:412-420)及びCaPCK1ターミネーター配列(Leukerら、(1997) *Gene* 192:235-40)を与えることにより可能となる。この遺伝的に改変されたマーカーは、CaSAT1と呼ばれ、2001年2月16日に出願された同時継続中の米国通常特許出願の主題である。

10

【0052】

C.アルビカンスは、第二の殺真菌性化合物であるブラストサイジンに対しても感受性があり、それと同系のパチルス・セレウス(*Bacillus cereus*)由来の耐性遺伝子であるBSRは、同様に、C.アルビカンス(CaBSR1)において発現するように遺伝的に操作されると、優性薬物耐性表現型を与えることが示された。破壊すべきC.アルビカンス遺伝子の5'及び3'の配列と同一の約65bpの隣接配列を含むように、それぞれの優性選択マーカーをPCR増幅することにより、あらゆるC.アルビカンス遺伝子について遺伝子破壊カセットの構築が可能となる。

20

【0053】

Baudinら(1993, *Nucleic Acids Research* 21:3329-30)の方法を利用することにより、PCR増幅された遺伝子破壊カセットによるC.アルビカンス株の形質転換、及び優性選択マーカーにより野生型遺伝子が正確に置換された薬物耐性形質転換体の選択に続いて遺伝子破壊の結果を得ることができる。このような突然変異体株は、限定しないが、ストレプトトリシンのような薬物の存在下における増殖に対して選択することができる。得られる遺伝子破壊は、二倍体C.アルビカンスにおいて一般的にヘテロ接合性であり、相同染色体上の対立遺伝子対の一方のコピーが破壊され、他方の相同染色体上のもう一方の対立遺伝子は、初めの親株にみられるような野生型対立遺伝子として残る。破壊された対立遺伝子は機能せず、その遺伝子のこの対立遺伝子からの発現はない。この方法を、生物のゲノム中のすべての遺伝子について反復することにより、その生物のすべての遺伝子について、遺伝子破壊のセットを得ることができる。この方法は、所望の遺伝子のサブセットに対して適用することもできる。

30

【0054】

5.2.2. テトラサイクリン制御プロモーターによる条件付き発現

本発明の実施例において使用される条件付き発現系は、制御プロモーター及びプロモーター活性を制御するための手段を含む。先の第5.1.1節に記載のように構築されるヘテロ接合体の残存する野生型対立遺伝子の条件付き発現は、そのプロモーターを、S.セレビスイエ(*S. cerevisiae*)について最初に開発されるが、C.アルビカンスで用いるために改変されるテトラサイクリン制御プロモーター系によって置換することにより達成される。Gariら、1997, *Yeast* 13:837-848;及びNagahashiら、1997, *Mol. Gen. Genet.* 255:372-375を参照のこと。

40

【0055】

要約すると、条件付き発現は、第一に、S.セレビスイエGAL4(アミノ酸785~881)又はHAP4(アミノ酸424~554)の転写活性化ドメインと融合した大腸菌TetRテトラサイクリンリプレッサドメイン又は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達成される。C.アルビカンスの遺伝コードに対応させるために、複数のCTGコドン修正が誘導される。大腸菌TetR(アミノ酸1~207)にS.セレビスイエGAL

50

4(アミノ酸785~881)を加えたもの、及び大腸菌TetR(アミノ酸1~207)に*S.セレビシエ*HAP4(アミノ酸424~554)を加えたもの(これらの両方とも、*C.アルビカンス*における適切な発現のために改変されている)の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は、本発明に含まれる。したがって、本発明は、細胞で発現され得る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ことができる、一倍体又は二倍体細胞を提供し、ここで、トランス活性化融合タンパク質は、DNA結合ドメイン及び転写活性化ドメインを含む。

【0056】

*C.アルビカンス*におけるトランス活性化融合タンパク質の構成性発現は、CaACT1プロモーター及びCaACT1ターミネーター配列を与えることにより達成される。しかし、*C.アルビカンス*において機能的であるあらゆる制御領域、プロモーター及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。このように、*C.アルビカンス*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、及び*C.アルビカンス*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、本発明に含まれる。このような核酸分子は、プラスミド、コスミド、トランスポゾン又は可動遺伝因子であり得る。好適な実施形態において、TetR-Gal4又はTetR-Hap4トランス活性化因子を、それぞれura3及びhis3栄養要求性マーカーを用いることにより、*C.アルビカンス*株に安定的に結合させることができる。

10

【0057】

この実施形態において、本発明はさらに、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、プロモーター置換断片を提供する。ここで、トランス活性化融合タンパク質の結合は、異種プロモーターの転写を増加させる。異種テトラサイクリンプロモーターは、最初に*S.セレビシエ*遺伝子発現のために開発され、ADH13'ターミネーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列の可変数のコピー(2、4又は7つのコピー)及びCYC1基準プロモーターを含む。そのテトラサイクリンプロモーターは、目的の遺伝子のオープンリーディングフレームのすぐ上流に配置された場合、テトラサイクリンプロモーター依存的制御に有利な方向で、CaHIS3及びCaSAT1選択マーカーの両方に隣接するようにサブクロニングされた。CaHIS3-TetプロモーターカセットのPCR増幅は、標的遺伝子のヌクレオチド位置-200~-1(開始コドンに対して)の辺りのプロモーター配列と相

20

30

【0058】

この特定の実施形態において、プロモーターはテトラサイクリンの不在下で導入され、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(クロー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及びオキシテトラサイクリン等があるが、これらに限定されない)もまた、GRACE株において、改変型対立遺伝子の発現の抑制のために用いることができる。

40

【0059】

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株も包含する。この変異株は、tetR'が野生型tetRに代えて、又は野生型tetR'に加えて用いられる場合、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、それと同系のオペレーター配列に結合して)発現を促進し、また抗生物質エフェクターの不在下においては、抑制される(すなわち、オペレーター配列に結合しない)。例えば、GRACE法は、薬物輸送に関与する遺伝子(例

50

例えば、CaCDR1、CaPDR5又はCaMDR1)を遮断するなどして、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に、tetRに代えて、tetR'を用いて行うことができる。GRACE法はまた、tetRが活性化因子ドメインに融合し、tetR'が一般的なりプレッサー(例えば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において発現を増強するか、又はさらに抑制する場合、tetR及びtetR'分子の両方を、活性化因子/リプレッサーの二元系に組み入れるように適合させることができる(Belliら、1998, Nucl Acid Res 26:942-947。参照により本明細書に組み入れる)。条件付き発現を提供するこれらの方法もまた意図される。

【0060】

本発明のもう一つの実施形態において、この方法は、遺伝子の発現が異種プロモーターにより条件付きで制御されるようにして、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た対立遺伝子の組換えにより、遺伝子の対立遺伝子の一方を改変することにより、一倍体病原性真菌にも適用することができる。一倍体病原生物の遺伝子の好適なサブセット又はその完全なゲノムの遺伝子に対してこの方法を反復することにより、条件付き突然変異株の集団又は完全なセットを得ることができる。遺伝子の好適なサブセットは、他の生物(例えば、C.アルピカンス及びS.セレピシエ)の標的遺伝子に対するヌクレオチド配列の実質的な相同性を共有する遺伝子を含む。例えば、本発明に対する変形は、限定しないが、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス(*Aspergillus flavus*)、カンジダ・グラブラータ(*Candida glabrata*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス(*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム(*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(*Trichosporon beigelii*)、リゾプス・アルルヒズス(*Rhizopus arrhizus*)、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・コリムビゲラ(*Absidia corymbigera*)等の動物真菌病原体、又は灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌(*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌(*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌(*Puccinia recondita*)、コムギ葉枯病菌(*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌(*Tilletia controversa*)、黒穂病菌(*Ustilago maydis*)等の植物真菌病原体又は上記の種のいずれかの属に入る他の任意の種のような一倍体真菌病原体に適用することができる。

【0061】

条件付き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ず、他の条件付きプロモーターを用いて行うことができる。このような条件付きプロモーターは、例えば、誘導因子が存在する場合等に、特定の条件下において、プロモーターからの転写を抑制するリプレッサー、又はプロモーターからの転写を増加するトランス活性化因子により制御され得る。例えば、C.アルピカンスのCaPCK1プロモーターは、グルコースの存在下では転写されないが、スクシナートのような他の炭素源上で増殖した細胞中では、高レベルで発現し、したがって、GRACE株における改変型対立遺伝子の条件付き発現に適合させることもできる。このためには、上記の説明におけるテトラサイクリンプロモーターの代わりにCaPCK1プロモーターを用いるグルコース含有培地上では、CaHIS1及びCaSAT1の両方が増殖に必須であることが示される。この場合、CaPCK1プロモーターは、生物に対してではなく、発現される遺伝子に対して異種性であり、このような異種プロモーターも本発明に含まれる。テトラサイクリンプロモーターと機能的に置換することができる代替的なプロモーターは、限定しないが、他の抗生物質に基づいて制御できるプロモーター系(例えば、プリスチナマイシン誘導プロモーター又はPIP)並びにカンジダ・アルピカンス(*Candida albicans*)条件付き制御プロモーター(例えば、MET25、MAL2、PHO5、GAL1、GAL10、STE2又はSTE3)を含む。

【0062】

10

20

30

40

50

GRACE法の好適な実施形態において、遺伝子破壊を行うことにより、ヘテロ接合体株を構築し、そして薬物標的評価の工程によって、ヘテロ接合体株集団として分離して集めることができる。このような*C. albicans*ヘテロ接合体株集団は、集団内で評価された標的に対するハプロインサフィエンスに基づく薬物スクリーニング法を可能とする。ここで使用する「ハプロインサフィエンス」の語は、所与の遺伝子についてのヘテロ接合体株が、特定の遺伝子産物の通常の二倍体レベルの約半分発現することにより示される現象を言う。結果として、これらの株は、コードされる遺伝子産物のレベルが低い構築物を提供し、これらは抗真菌化合物のスクリーニングにおいて直接利用できる。ここで、そのヘテロ接合性誘導体と比較して、この二倍体の親と異なる感受性が示されれば、コードされる遺伝子産物に対してその薬物が活性を有することを示す。

10

【0063】

本発明のこの実施形態に従った対立遺伝子の改変の順序は決定的ではなく、条件付き発現をする対立遺伝子をまず構築し、残存する野生型対立遺伝子の破壊を続けて行うような、異なった順序でこれらの工程を実施することができることは、当業者には明らかである。しかし、プロモーター置換工程が第一に行われる場合、遺伝子破壊工程において使用されるものと相溶性のある配列を削除するように注意するべきである。

【0064】

標的遺伝子CaKRE9の改変型対立遺伝子を構築するために使用されるGRACE法の特定の適用については、第6章で説明する。

【0065】

20

5.2.3 条件付き発現の他の方法

本発明の他の実施形態においては、条件付き発現は、条件プロモーターを利用する以外の方法で達成することができる。例えば、条件付き発現はヘテロ接合型株の野生型対立遺伝子を *in vitro* で誘導した温度感受性対立遺伝子に置換することによって達成され得る。その後、その表現型を、発現できない温度 (*nonpermissive temperature*) にて分析する。関連する方法では、ユビキチン化シグナルを残りの野生型対立遺伝子に挿入して活性化条件時での遺伝子産物を不安定化させることを、遺伝子不活性化の結果おこる表現型への影響を確認するために採用することができる。まとめると、これらの実施例は、*C. albicans* (*C. albicans*) 遺伝子を破壊し、GRACE法を用いて条件的に制御することが可能な方法を示す。

30

【0066】

本発明の他の実施形態においては、切除可能なトランスアクチベーターにより制御される構成性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て、該プロモーターに固有の基本レベルにまで発現を抑制する。例えば、真菌細胞において、*lexA* オペレーター因子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何らかの転写アクチベータードメイン (例えば、*GAL4*、*HAP4*、*VP16*) からなる融合タンパク質と組合せて使用して、標的遺伝子の構成性発現を引き起こすことができる。*5-FOA* により仲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を切除した細胞を選択することができる。この方法によって、機能し得る転写アクチベーターの不在下での *lexA* 異種プロモーターによる発現の基本レベルへの標的遺伝子の抑制に関する表現型の確認が可能となる。この手順で生じたGRACE株は、以下の章で詳述する薬物標的評価に利用できる。この系では、異種プロモーターに関わる低い基本レベルの発現が重要である。このように、この代替的なシャットオフシステムを標的評価のためにより有用なものとするためには、プロモーターの発現基本レベルが低いことが好ましい。

40

【0067】

あるいは、標的遺伝子の条件付き発現は、DNA結合性の転写アクチベーター領域を含有するトランスアクチベーターを使用せずに達成することができる。異種構成性プロモーターを、例えば *URA3* 選択マーカー (標的遺伝子の 5' 部分と相同な配列を含有する直接反復配列と隣接する) の下流に含ませるように、カセットを組み込むことができる。このカセットに標的遺伝子の上流に相同配列をさらに加えた場合、相同的組換えが容易になり、ま

50

た、天然プロモーターを、標的遺伝子の開始コドンまたはオープンリーディングフレームの直ぐ上流にある上記異種プロモーターカセットで置換することが容易になる。条件付き発現は、異種構成性プロモーターとURA3マーカートを切除した（即ち、結果として標的遺伝子の発現に必要な該遺伝子の上流の調節配列を欠く）菌株を、5-FOA含有培地を使用して選択し、そして、選択した菌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査することによって実現される。

【0068】

5.2.4 繊維状植物病原性真菌のGRACE株

特定の実施形態では、本発明の薬物標的の同定方法を繊維状植物病原性真菌に適用することができる。さまざまな繊維状真菌が植物病害を生じ、かかる真菌には、ウスチラゴ(*Ustilago*)、フサリウム(*Fusarium*)、コレトトリチューム(*Colletotrichum*)、ボトリティス(*Botrytis*)、セプトリア(*Septoria*)、リゾクトニア(*Rhizoctonia*)、プッシニア(*Puccinia*)、ティレッチア(*Tilletia*)およびゲマノミセス(*Gaeumannomyces*)属の種が挙げられる。特に、フサリウム(*Fusarium*)群の病原性真菌は作物に多くの経済的に重大な病害を生じ、またヒトに感染症を引き起こすものもある。例えば、コムギ黒星病を生じる*F. graminearum*等の植物病原性種は、壊滅的な経済への影響（例えば、米国において過去10年間に渡り26億ドルもの作物被害）を及ぼし得る。

【0069】

真菌における遺伝子工学に適用可能な主要な技法および試薬は、一般的に本発明において有用である。多くの繊維状植物病原性真菌の形質転換手法はYeltonらによるアスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)に対して開発されたプロトコール(1984. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1470-1474)に基づく。このプロトコールには、菌糸体由来または新しく発芽した分生子胞子由来細胞壁物質をNovozyme 234によりプロトプラストを調製する工程が含まれる。プロトプラストは、ろ過、遠心分離および（いくつかの種においては）グラジエント精製法により、細胞壁片から分離する。DNAはCaCl₂およびポリエチレングリコールの存在下で導入され、プロトプラストは浸透圧安定剤（例：ソルビトール）を含有する培地上で再生させる。*A. nidulans*代謝遺伝子（例えば、TrpC、ArgBおよびamdS遺伝子(アセトアミド上で増殖)は一般的に選択マーカーとして使用されている。その他の真菌に対する代謝マーカーとしてはPyrG遺伝子および硝酸塩還元酵素遺伝子が挙げられる。優性選択マーカーとしては通常、ハイグロマイシン、ベノミル、ピアロホス、フレオマイシンおよびさらに最近ではピリチアミンに対する耐性遺伝子を挙げることもできる。ハイグロマイシンに対する耐性が形質転換体を得るための最も一般的な選択法であり、多くのベクターはPuntらによって開発されたマーカー(pAN7-1; Gene. 56: 117-124, 1987)に基づいている。マーカー遺伝子の転写を駆動するプロモーターには*A. nidulans*のtrpCおよびgpdプロモーターが含まれるが、特性解析されているより多くのプロモーターを使用することができる。十分に研究されている制御プロモーターが窒素代謝に関わる遺伝子（例えば、Michael Hynes、George MarzlufおよびHerb Arst研究室による出版物を参照されたい）から入手可能である。さらに、制御プロモーターは、ポリガラクトツロナーゼをコードするpgl遺伝子（炭素源としてペクチンと一緒に増殖させた場合に誘導される）に対するプロモーターなどの植物病原体について同定されている(Di PietroおよびRoncero. 1998. MPMI 11: 91-98.)。通常、形質転換DNAの標的組込みは、*S. cerevisiae*の場合よりも低い頻度で生じるが、それでもなお遺伝子置換またはGRACEプロモーター置換方法に対しては十分である。

【0070】

好ましい実施形態において、本発明は、担子菌類（例えば、ウスチラゴ(*Ustilago*)種を含む）の改変された株および必須遺伝子を包含する。特に、黒穂病菌(*Ustilago maydis*)（トウモロコシ黒穂病）は、経済的に重要なムギなまぐさ黒穂病およびさび病などの多くの真菌植物病原体に関連する二形態性の担子菌類真菌である。その他のウスチラゴ(*Ustilago*)種、例えば、堅黒穂菌(*U. hordei*)は、オオムギ、オートムギおよびコムギなどの小粒穀類作物の共通病原体である。ウスチラゴ(*Ustilago*)種では、出芽形態では一倍体、

10

20

30

40

50

単細胞であって非病原性であり、この細胞型は、必須遺伝子を同定するために容易に適用しうる分子生物学的方法において、遺伝子的に取り扱いやすいモデル系として役立つ(Ban uett, F. Annual Reviews in Genetics (1995) 29 ; 179-208)。反対の交配型である2つの一倍体細胞の融合により、病原性を有し、成長のために宿主植物を必要とする二核性の繊維状形態を形成する。GRACE法は、農業目的に適した新規植物病原性必須標的を同定するための黒穂病菌(*U. maydis*)および堅黒穂菌(*U. hordei*)の標的の検証に適用することができる。黒穂病菌(*U. maydis*)と堅黒穂菌(*U. hordei*)との比較分析は、この分析が必須遺伝子の同定に役立ち得ることから、有意な利点となり得る。

【0071】

黒穂病菌(*U. maydis*)および堅黒穂菌(*U. hordei*)は、本発明の薬物標的の同定方法で使用 10
するGRACE株を構築するための好ましい植物病原性真菌である。ウスチラゴ(*Ustilago*)種では、相同組み換えによる遺伝子置換が有効である。1 kbのフランキング配列を使用する標的破壊は、取り込み正確度70~90%のプロトプラストに基づく形質転換方法(典型的にはマイクログラムあたり50~100コロニーが得られる)と同程度の高さで得られる。例えば、ノーセオスリシン(nourseothricin: NSR)、ハイグロマイシン B (*hygB*)、フレオマイシン、ペノミル、カルボキシシン、およびゲネチシンを含む優性選択マーカー、ならびに自己複製・組み込みプラスミドが利用可能である(Kojic M, およびHolloman WK Can J Microbiol 2000 46: 333-8, ならびに Gold, S., G. Bakkeren, J. Davies および J. W. Krontad. 1994. Gene 142: 225230)。したがって、標準的遺伝子破壊実験は、黒穂病菌(*U. maydis*)の選択に適切な優性選択マーカー(例えば、ノーセオスリシン、ハイグロマイシン B 20
、フレオマイシンまたはカルボキシシンなどの選択マーカーを使用することができる)を含有する遺伝子破壊カセットを使用して当業者により行うことができる。これらは三元PCR法(Wach, A. 1996. Yeast Vol. 12: 259-265)により増幅して適切な長さの隣接する相同配列に付加し、正確な遺伝子置換を可能にする。あるいは、栄養要求性マーカーを、対応する黒穂病菌(*U. maydis*)または堅黒穂菌(*U. hordei*)いずれかの栄養要求性変異株内の破壊カセットの安定した組み込みのために選択して使用することができる。適切な黒穂病菌(*U. maydis*)または堅黒穂菌(*U. hordei*)遺伝子破壊カセットを構築するための代替的組み換えDNA法も当業者であれば容易に利用することができる。

【0072】

得られた破壊カセットの形質転換は、Wangら, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 86 30
5-869.に記載の通りに行うことができる。簡潔に述べると、黒穂病菌(*U. maydis*)の形質転換は、分解酵素(例えば、NovozymeまたはSigma L 1412)による細胞壁の除去、DNAの添加、PEGによる細胞の処理、1 M ソルビトールを含む培地上へのプレーティング、および抗生物質による選択を伴う。形質転換体は3~5日目にあらわれる。あるいは、二倍体の黒穂病菌(*U. maydis*)株も公的に入手することができ、必須遺伝子の分析のために使用されている(例えば、Holdenら, 1989. EMBO J. 8: 1927-1934)。具体的には、一方の対立遺伝子を上記に概説したように二倍体真菌において破壊し、ヘテロ接合型株をトウモロコシ苗に注入する。二倍体胞子を14日後に採取し、この胞子を減数分裂子孫を得るために発芽させる。次いで、得られた子孫のランダム胞子分析を行うことによって、集団中のい 40
ずれかの同定可能な破壊対立遺伝子が存在しないことについて一倍体株をスクリーニングする。次いで、対立遺伝子を欠失しつづけても生存可能な任意の一倍体株を同定する統計分析を行うことによって、遺伝子の不在に基づいて対象の遺伝子の必須性を調べることができる。

【0073】

黒穂病菌(*U. maydis*)のGRACE制御可能プロモーター系を使用するPCRに基づくプロモーター置換実験は、GRACEテトラサイクリンプロモーターを制御する機能性トランスアクチベータータンパク質を初めに構築することにより当業者によって実施することができる。トランスアクチベータータンパク質は高レベルで構成的に発現されなければならない。可能な黒穂病菌(*U. maydis*)制御配列は、UmTEF 1およびUmHSP70プロモーターならびにそれぞれ 50
の3'UTR配列を含む。得られたトランスアクチベーターは、優性選択マーカー(例: Hy

gB)を含有する適切な黒穂病菌(*U. maydis*)プラスミド(例えば、pCM54 ; Tsukudaら, 1988 . *Mol. Cell. Biol.* 8: 3703-3709)中にサブクローニングし、任意の黒穂病菌(*U. maydis*)同株性野性型株(例えば、518 (a2 b2)および521 (a1 b1) (Banuett, F. *Trends in Genetics* (1992) 8: 174-180))中に形質転換することができる。あるいは、安定した栄養要求性変異を含むいくつかの黒穂病菌(*U. maydis*)および堅黒穂菌(*U. hordei*)株を公的に入手することができ、同族の栄養要求性マーカーカセットとともに使用することによりトランスアクチベータータンパク質を導入し安定して発現させることができる。

【0074】

黒穂病菌(*U. maydis*)および堅黒穂菌(*U. hordei*)は一倍体真菌生物であるので、テトラサイクリンプロモーター置換カセットを使用する正確なプロモーター置換を伴うシングルステップとして、GRACE法を適用することができる。好ましくは、この方法は、Tetプロモーターと融合させて適切な相同配列に隣接させたNSR優性選択マーカーを含む三元PCR産物を使用し、また、Tetトランスアクチベータータンパク質を構成的に発現する黒穂病菌(*U. maydis*)株中にプロモーター置換カセットを形質転換させることにより行うことができる。別の代替りの優性選択マーカーを使用することもできる。野生型プロモーターと優性選択マーカー融合Tet条件付きプロモーターとの間の相同組み換えによる正確な置換によって、条件付き変異黒穂病菌(*U. maydis*)株の1ステップでの構築を可能にする。プロモーター置換カセットの正確な組み込みは、PCRを利用した遺伝子型決定法および/またはサザンブロット分析法により実験的に調べることができる。

10

【0075】

あるいは、内因性制御可能プロモーターを黒穂病菌(*U. maydis*)の条件付き変異株の構築に適用することができる。使用しうる好ましい制御可能プロモーターとしては、限定するものではないが、炭素源によって制御されるcrg1遺伝子プロモーター(Bottin, A., Kamper, J. and Kahmann, R. *Mol. Gen. Genet.* 253: 342-352 (1996)を挙げることができ、nar1遺伝子プロモーターも遺伝子発現を制御するために開発されている(Brachmann, A.ら . 2001. *Mol. Microbiol.* 42: 1047-1063)。

20

【0076】

堅黒穂菌(*U. hordei*)は、黒穂病菌(*U. maydis*)と比較した場合に、黒穂病菌(*U. maydis*)と比較した場合に、菌体が培地中でよりゆっくりと成長し、交配によってオオムギが完全に成長するまでに完全な成長サイクル(2ヶ月間)を必要とする点以外は、非常に類似した生活環を有する。堅黒穂菌(*U. hordei*)は、小粒穀類に経済的により重要な病害を引き起こすウスチラゴ(*Ustilago*)種の多くの群に密接に関連する。これらその他の種には、*U. tritici*、*U. nuda*、*U. avenae*および*U. kolleri*が含まれる。本発明の方法に従う堅黒穂菌(*U. hordei*)も、重要な穀類病害を引き起こすムギなまぐさ黒穂病病原体との類似性を有意に示す。堅黒穂菌(*U. hordei*)の一倍体および安定な二倍体株が入手することができ、安定な堅黒穂菌(*U. hordei*)の二倍体の形成は(*Int. J. Plant Sci.* 155: 15-22)、黒穂病菌(*U. maydis*)について上記したようなランダム孢子分析による遺伝子必須性を評価を可能にする。

30

【0077】

堅黒穂菌(*U. hordei*)における遺伝子破壊は黒穂病菌(*U. maydis*)におけるのと同じ様式で達成することができ、共通の選択マーカー(例えば、ハイグロマイシン耐性)が両方の種において機能する(Bakkeren, G. および J. Kronstad. 1996. *Genetics* 143: 1601-1613.)。遺伝子置換は交配型に関する遺伝子座の複数の遺伝子について示されている(Lee, N., G. Bakkeren, K. Wong, J. E. Sherwood および J. W. Kronstad. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 96: 15026-15031.)。黒穂病菌(*U. maydis*)と比較した場合に、堅黒穂菌(*U. hordei*)の形質転換におけるひとつのわずかな技術的差異は、堅黒穂菌(*U. hordei*)のDNAの取り込みは電気穿孔により促進される点である。GRACE株の構築に使用するのに好ましい標的遺伝子としては、パントテン酸生合成に関与するpan1 (Bakkeren, G., および J. W. Kronstad. 1993. *The Plant Cell* 5: 123-136) およびGaサブユニットをコードするfil1 (Lichter A, Mills D. 1997. *Mol Gen Genet.* 256: 426-435)が挙げられる。

40

50

【0078】

種々の実施形態において、*E. coli*から単離されたhph遺伝子（ハイグロマイシン耐性をコード）を選択マーカーとして一般に使用することができ、GUSをレポーター遺伝子として使用することができる。有用な組み換え制御可能遺伝子発現系の非限定的例としては以下のものを挙げることができる。ステロイド性糖質アルカロイド トマチンにより誘導される*F. oxysporum panC* プロモーター (Perez-Espinosa ら, Mol Genet Genomics 2001 Jul; 265 (5): 922-9); 高コピー数の自己複製発現ベクターにおける黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) hsp70様遺伝子プロモーター (Keon ら, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1999 Feb; 9 (1): 101-4); *C. heterostrophus*のプロモーターP1もしくはGPD1(グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素)、またはGUS、または*E. coli*のハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hph)を使用するトウモロコシごま葉枯病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)の一過性または安定した遺伝子発現系(Monke ら, Mol Gen Genet 1993 Oct; 241 (1-2): 73-80); *Aspergillus nidulans*プロモーターおよびターミネーター配列の制御下で、*E. coli*由来のhph遺伝子および*Streptoalloteichus hindustanus*由来のble遺伝子を使用してハイグロマイシン Bおよびフレオマイシン耐性にして、PEG/CaCl₂処理により真菌プロトプラスト中にプラスミドDNAを導入した*Rhynchosporium secalis* (オオムギ葉焼け病菌)(Rohe ら, Curr Genet 1996 May; 29 (6): 58790)。バナナおよびプランテンの病原体(*Musa spp.*) *Mycosphaerella fijiensis*、*Mycosphaerella musicola*、および*Mycosphaerella eumusae*は、Balint-Kurti ら, FEMS Microbiol Lett 2001 Feb 5; 195 (1): 9-15に教示されているように形質転換することができる。トリコセセン産生植物病原体*Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*)は、3種類の異なるベクター(cosHyg1、pUCH1、およびpDH25、これらすべてが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する)遺伝子を担持する)で形質転換することができる(Salch ら, Curr Genet 1993; 23 (4): 343-50)。Brassica spp.の真菌病原体*Leptosphaeria maculans*は、フレオマイシン耐性をコードしているベクターpAN8-1で形質転換することができ、プロトプラストをハイグロマイシン Bをコードしている部分的に相同的なベクターpAN7-1で再び形質転換することができる(Farman ら, Mol Gen Genet 1992 Jan; 231 (2): 243-7)。Cryphonectria parasiticaに関して、このクリ葉枯れ病菌のenpg-1の標的破壊は、*Escherichia coli*のhph遺伝子のクローニングコピーをエクソン1中へ挿入して相同組み換えすることにより達成した(Gao ら, Appl Environ Microbiol 1996 Jun; 62 (6): 1984-90参照)。

【0079】

その他の例として、*Glomerella cingulata* sp. *phaseoli* (Gcp)は、アセトアミダーゼをコードし、単一の窒素供給源としてアセトアミド上での生育を可能にしている*Aspergillus nidulans*のamdS + 遺伝子および抗生物質Hyの存在下での生育を可能にしている*Escherichia coli*のhygBR遺伝子、2種類の選択マーカーのうちのいずれかを用いて形質転換することができる。amdS + 遺伝子は、*A. nidulans*制御シグナルの制御下Gcp中で機能し、hygBRは、別の繊維状子嚢菌*Cochliobolus heterostrophus*由来のプロモーターとの融合した後で発現した。形質転換しようとするプロトプラストは消化酵素複合体Novozym 234で作製し、次いで、10 mM CaCl₂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に曝露した。形質転換は、単コピーまたは複数コピーのamdS+ または hygBRプラスミドのうちいずれかの遺伝子の真菌ゲノム中への組み込みにより行われた(Rodriguez et al., Gene 1987; 54 (1): 73-81); 相同組み換えのための組み込みベクター; 欠失研究により、505 bp (プロモーター機能を依然として有することができる相同プロモーターDNAの最小の長さ)は組み込みを目標とするのに十分な長さであることが示された。ベクターの相同組み込みは、gdpAプロモーター領域の重複を生じた(Rikkerink ら, Curr Genet 1994 Mar; 25 (3): 2028)。

【0080】

5.3 必須遺伝子と病原性遺伝子の同定

5.3.1 必須遺伝子

本発明は、GRACE株中の改変された遺伝子が、対象の病原性生物において必須遺伝子であるのか病原性遺伝子であるのかを決定する方法を提供する。ある遺伝子がある生物において必須遺伝子であるかどうかを決定するために、該遺伝子の改変型対立遺伝子を含むGRACE株を、条件付き発現される遺伝子の改変型第二対立遺伝子が実質的に低発現されるか発現されない条件下で培養する。GRACE株の生育性および/または増殖を同じ条件下で培養した野生型株のそれと比較する。生育性または増殖の喪失または低下は、該遺伝子が病原性真菌の生育に必須であることを示す。したがって、本発明は、二倍体病原性生物における必須遺伝子を同定するための方法を提供し、該方法は、数多くのGRACE株を、各GRACE株において改変された遺伝子の第二の対立遺伝子が実質的に低発現されるか発現されない条件下で培養するステップ；該細胞の生育性および/または増殖の指標を判定するステップ；および、それを野生型細胞の生育性および/または増殖の指標と比較するステップを含む。第二の対立遺伝子の発現レベルは、未改変の対立遺伝子の50%より低くてよく、30%より低くてよく、20%より低くてよく、そして好ましくは10%よりも低くてよい。使用する異種プロモーターに応じて、発現のレベルは、例えば抗生物質、金属イオン、特定の化学物質、栄養物質、pH、温度などにより制御され得る。

10

【0081】

本明細書ではカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) を、GRACE法で分析した例として利用する。

【0082】

例えば、GRACE法を用いた*C. アルビカンス*の条件遺伝子発現は、CaKRE1、CaKRE5、CaKRE6、およびCaKRE9を用いて行われている(図3)。CaKRE5、CaKRE6、およびCaKRE9は、Uraブラスター法(Ura blaster method)を用いて遺伝子を破壊することにより示されるように、*C. アルビカンス*において必須である、または条件付きで必須である(CaKRE9を持たない株はグルコース上では生育できないが、ガラクトース上では生育できる)と予想される。CaKRE1は、Uraブラスター法を用いて、*C. アルビカンス*において必須ではない遺伝子であることが実証されている。上記遺伝子に関してヘテロ接合型の株を、CaSAT1破壊用カセットおよびそれに続く野生型対立遺伝子の天然プロモーターのテトラサイクリン制御プロモーターへの置換を利用した、PCRに基づく遺伝子破壊法により構築した。これらの株の各々の旺盛な増殖は、発現が通常はテトラサイクリンの不在下でおこることを示唆する。テトラサイクリンを増殖培地に添加すると、これらのテトラサイクリンプロモーターにより制御される遺伝子の発現は大幅に減少するか消失する。テトラサイクリンの存在下では、上記の3つの必須の*C. アルビカンス*遺伝子のうちの1つをそれぞれ含むGRACE株細胞は増殖が停止する。予想通り、CaKRE1 GRACE株のみがCaKRE1の発現が抑制されたにもかかわらず旺盛な増殖を示す。

20

30

【0083】

標的評価におけるGRACE法の有用性をさらに調査するために、既知の必須遺伝子CaTUB1、CaALG7、CaAUR1、およびCaFKS1の発現を制御した4つの異なるGRACE株の増殖を誘導的条件と抑制的条件とで比較し、予想される必須遺伝子CaSAT2およびCaKRE1についても同様にして比較した(図4)。予想通り、CaTUB1、CaALG7、CaAUR1、およびCaFKS1のGRACE株は、必須ではないCaKRE1 GRACE株と異なり、抑制的条件下では増殖しなかった。そのうえ、予想通り、CaSAT2 GRACE株は、この遺伝子が*C. アルビカンス*において必須であることを示す。CaSAT2遺伝子(*C. アルビカンス*において使用する有力な選択マーカーとして作られたものである)は、*S. セレピシエ*の遺伝子と相同な*C. アルビカンス*の遺伝子であるが、大腸菌のSat1遺伝子とは関係が無い。

40

【0084】

導かれた他の破壊データに基づく全ての場合において、このことは、テトラサイクリン制御遺伝子がテトラサイクリンの存在下で機能しないレベルにまで抑制される場合に予想される反応である。さらに、条件付き遺伝子破壊のGRACE法を、その*S. セレピシエ*における等価物が必須ではないことが知られている2つの異なる*C. アルカピンス*遺伝子(CaYPD1、およびCaYNL194c)に適用すると、これらの株をテトラサイクリンの存在下でインキュ

50

ベートしたときに増殖の阻害は観察されなかった。これらの結果は、GRACE株を用いた条件付き遺伝子発現の方法が遺伝子の必須性の信頼できる指標であることを証明する。

【0085】

更にまた、*C.アルカピンス*における必須遺伝子の完全なセットを同定する迅速で正確な手段としての本発明の有用性が、遺伝子破壊と条件付き発現とからなるGRACEの二段階法を用いる、多くの遺伝子のヌル表現型(null phenotype)の分析により示された。標的遺伝子を、真菌特異的かつ必須であるとして選択した。そのような遺伝子を、下記のスクリーニングアッセイにおいて標的必須遺伝子と称する。

【0086】

文献検索により、合計89個の遺伝子についてURAプラスターに基づく遺伝子破壊実験の報告があることがわかり、そのうち13個は、ホモ接合型欠失株が構築できないということに基づいて、必須であると推測された。13個の遺伝子とは、CaCCT8 (Rademacherら, *Micr obiology*, UK 144, 2951-2960 (1998)); CaFKS1 (Mioら, *J. Bacteriol*, 179, 4096-105); およびDouglasら, *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2471-9 (1997)); CaHSP90 (Swob odaら, *Infect Immun* 63, 4506-14 (1995)); CaKRE6 (Mioら, *J. Bacteriol* 179, 2363-7 2 (1997)); CaNMT1 (Weinbergら, *Mol Microbiol* 16, 241-50 (1995)); CaPRS1 (Payneら, *J. Med. Vet. Mycol.* 35, 305-12 (1997)); CaPSA1 (Careら, *Mol Microbiol* 34, 792-798 (1999)); CaRAD6 (Careら, *Mol Microbiol* 34, 792-798 (1999)); CaSEC4 (Maoら, *J . Bacteriol* 181, 7235-7242 (1999)); CaSEC14 (Monteolivaら, *Yeast* 12, 1097-105 (1 996)); CaSNF1 (Petterら, *Infect Immun.* 65, 4909-17 (1997)); CaTOP2 (Kellerら, *Bi ochem J.*, 329-39 (1997)); およびCaEFT2 (Mendozaら, *Gene* 229, 183-1991 (1999))である。*C. アルピカンス*のこれら13個の必須だと推定される遺伝子、並びにCaTUB1、CaALG 1、およびCaAUR1は、元々はGRACE法により同定されたものではなかった。しかしながら、これら17個の遺伝子のいずれか1つの改変対立遺伝子を含むGRACE株およびそれらの使用は、本発明に包含される。例えば、図4においてはCaTUB1、CaALG1およびCaAUR1 GRACE株であり、図3においてはCaKRE6 GRACE株である。これら17個の遺伝子はいずれも、本発明の方法を比較するための対照としてもよく、または、本発明の必須遺伝子の収集における必須性についての陽性対照としてもよい。これら17個の遺伝子のうちのいずれかに対応するヌクレオチド配列を含む核酸分子は、本発明の薬物探索法において薬物標的として使用してもよく、または、個別にまたは小集団で、本発明のキットもしくは核酸マイクロアレイ 30

【0087】

従来の方法を使用するのと対照的に、GRACE法の応用によって既に、全*C.アルピカンス*研究共同体の全ての努力によりこれまでに決定されたよりも、非常に多くの*C.アルピカンス*の必須遺伝子を同定している。本明細書とともに示すデータは、本発明の方法に固有の迅速さを確立し、そしてそれゆえに、GRACE法を*C.アルピカンス*ゲノムの全遺伝子の調査に適用範囲を拡張することの実現可能性、この二倍体真菌病原体の必須遺伝子の完全なセットの同定、および他の種へのその応用を確立する。

【0088】

GRACE株における改変型遺伝子の必須性を評価するには別の方法が利用可能である。本発明によれば、GRACE株における改変された遺伝子対立遺伝子の発現の抑制は、トランスアクチベータータンパク質をコードする遺伝子の相同的組換えを介した切除により実現し得る。好ましい実施形態では、標的遺伝子の条件付き発現がテトラサイクリン制御プロモーターを用いて達成される場合、(非抑制的条件下での)構成性発現は、トランスアクチベーター遺伝子(TetR-GAL4AD)の相同的組換えを介した切除により抑制され得る。この方法では、絶対的に達成できる抑制レベルは、トランスアクチベータータンパク質のテトラサイクリンによる不活性化により生じる抑制レベルとは独立に生じる。トランスアクチベーター遺伝子の切除は、GRACE株の構築に用いる選択マーカーおよび組み込み手法に基づいて可能になる。TetR-GAL4ADトランスアクチベーター遺伝子を含むCaURA3-標識プラスミドをCaLEU2遺伝子座に安定して組み込むことにより、当該組み込まれたプラスミド 40 50

に隣接するCaLEU2のタンデム複製(tandem duplication)がおこる。後に、5-FOA含有培地上で対抗選択を行って、CaURA3-標識トランスアクチベーター遺伝子の切除を選択することができ、そして、この代替的な抑制手法が標的遺伝子が必須であることを証明するかどうかを直接に試験することができる。

【0089】

5-FOAを含有する培地上で必須であるとされたが、テトラサイクリン添加培地上で増殖の減失が何ら検出できない遺伝子の3つの例は、遺伝子CaYCL052c、CaYNL194cおよびCaYJR046cである。おそらくは、このことは、標的遺伝子が、トランスアクチベーター遺伝子を完全に除去した条件下では、テトラサイクリンの添加により遺伝子産物が不完全に不活性化された条件下よりもさらに低い発現の基本レベルを示すことに拠るものであろう。かくして、GRACE法は、所定の遺伝子が宿主株の生育に必須であるかどうかを決定するための2つの独立した方法を提供する。

【0090】

5.3.2 毒性/病原性遺伝子

本発明はまた、毒性/病原性遺伝子を同定するために二倍体病原性生物のGRACE株を用いる方法を提供する。病原性生物の必須遺伝子を明らかにするのに加えて、GRACE法は、該病原性生物により引き起こされる疾患の治療に有用な薬物のスクリーニングに関わっている可能性のある他の遺伝子および遺伝子産物の同定を可能にする。したがって、病原体の必須でない遺伝子および遺伝子産物であって、それにもかかわらず病気の発生過程において不可欠な役割を示す遺伝子および遺伝子産物は、予防薬の開発のための潜在的な薬物標的として役立つことがあり、かつ、既存の殺傷性の(cidal)治療法と組合せて治療計画を改良するために使用することもできる。毒性および/または病原性に関わる遺伝子およびそれらの産物は、潜在的な薬物標的のもう一つの重要なクラスとなりうる。そのうえ、毒性および/または病原性に関わる遺伝子のうちのいくつかは、種特異的であることがあり、そして、病原体の特定の株に特有のことがある。C. アルピカンス配列決定計画により同定された遺伝子のうちの約6~7%がS. セレピシエには存在しないと推定されている。このことは、病原性または毒性の過程に関与する可能性のある、420個ものカンジダ・アルピカンス特異的遺伝子を表している。この遺伝子のセットのかかる大規模な機能評価は、本発明のGRACE法を用いた場合にのみ実現できる。

【0091】

必須遺伝子は好ましい標的を提供するものの、同定された必須ではないC.アルピカンス特異的遺伝子にも価値はあるであろう。病原性の発生における必須ではないC.アルピカンス特異的遺伝子の潜在的な役割を、毒性アッセイ(例えば、口腔上皮細胞吸着アッセイおよびマクロファージアッセイ)ならびにマウスまたは他の動物モデルを用いた種々のC.アルピカンス感染研究(例えば、経口、経膈、全身性)により、評価しそして序列をつけてもよい。必須遺伝子について先に記載したのと同様にして、GRACE株集団を含む必須でない遺伝子が病原性に必要であるかどうかを細胞アッセイまたはマウスモデル系で実証することは、同様に実現可能性がある。したがって、テトラサイクリン(または他の遺伝子不活性化手段)による遺伝子不活性化の条件下でマウスに真菌感染を引き起こすことができないGRACE株は、遺伝子のGRACE毒性/病原性サブセットを明確にする。病原性遺伝子の明確にされたサブセット、例えば、病原性発生の特定の段階(例えば、吸着または侵入)に必要な遺伝子を、株のうちでGRACE病原性サブセットを、対応する過程を測定するin vitroアッセイに適用することによって、決定することができる。例えば、GRACE病原性株を、口腔吸着アッセイまたはマクロファージアッセイで各遺伝子の条件付き発現により調査すると、吸着または細胞侵入のそれぞれに必要な病原性の要因が同定される。そのうえ、部分的に不活性化されただけで毒性または増殖速度の実質的な低下を示す必須遺伝子は、最低限の阻害性を示す特異性の高い化合物でさえそれに対して治療上の価値を示す「多因性」薬物標的を示す。

【0092】

したがって、ある遺伝子がある宿主中で病原性生物の毒性/病原性に寄与しているのか

10

20

30

40

50

どうかを判定するために、該遺伝子の改変された対立遺伝子を含む該病原菌のGRACE株を、条件付き発現下にある該遺伝子の第二の改変された対立遺伝子が実質的に低発現されるか発現されない条件下で、宿主細胞または宿主動物に感染させる。宿主細胞および/または宿主動物を適切な期間該GRACE株と接触させた後、該細胞および/または動物の状況を、同じ条件下において野生型株で感染させた細胞および/または動物と比較する。感染細胞の形態、生理機能、および/または生化学の種々の側面は当該技術分野で公知の方法で測定できる。動物モデルを用いた場合、疾患の進行、症状の重篤度、および/または宿主の生存を測定できる。GRACE株が示す毒性または病原性の喪失または減少はいずれも、該株において改変された遺伝子が、ウイルスの毒性および/または病原性に寄与していることまたは重要であることを示している。かかる遺伝子を、下記のスクリーニングアッセイにおいて標的毒性遺伝子と呼ぶ。 10

【0093】

本発明の他の実施形態においては、GRACE法は、病原性の発生に必須であることが知られている遺伝的経路の同定および説明のために利用できる。例えば、S.セレビスエにおける広範な研究は、細胞吸着、シグナル伝達、細胞骨格集合 (cytoskeletal assembly) を含む、酵母と菌糸形態との間の二形態転換において機能する多数の過程を明らかにしている。C.アルビカンス、A.フミガツス (*A. fumigatus*)、およびC.ネオフォルマンス (*C. neoformans*) などの病原性真菌において、機能的に相同な細胞経路に關与するオーソログ (ortholog) 遺伝子の欠失は、明確に、付随する毒性の喪失を示す。したがって、C.アルビカンスおよび他の病原性真菌に見られるオーソログ (ortholog) 遺伝子のGRACE株を利用すると、それを不活性化すると菌糸の発達と病原性を低減させることになる、潜在的な抗真菌薬物の標的遺伝子を迅速に評価できる。 20

【0094】

5.3.3 薬物標的をコードする遺伝子の評価

標的遺伝子の評価とは、遺伝子産物が、その遺伝子産物の機能もしくは構造のモジュレーターを見つけるための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と同定されるプロセスを指す。しかし、薬物スクリーニングの標的として遺伝子産物を評価するために使用される基準は、防御しようとする宿主、ならびに探索される化合物が持つ所望の作用様式によって異なり得る。

【0095】

本発明の1つの態様において、必須遺伝子の改変型対立遺伝子対のみを有すると同定および分類されたGRACE株のセットを薬物スクリーニングで直接使用することができる。 30

【0096】

他の態様において必須遺伝子の最初のセットは、例えばヌクレオチド配列比較を用いてさらに特徴付けられ、菌類に対して特異的なこれらの遺伝子のみを含む必須遺伝子のサブセット、つまり病原体の宿主 (例えばヒト等) において相同体 (homolog) を持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。ヒトの真菌病原体におけるこのような遺伝子のサブセットのモジュレーター (および好ましくはインヒビター) は、ヒトを治療するために用いられる場合に毒性の副作用を持つ可能性がずっと低いと思われる。 40

【0097】

同様に、より大きな必須遺伝子セットの他のサブセットは、獣医学的用途で使うことができる期待される化合物を検出するために、1以上の宿主 (例えば哺乳動物) 種において相同配列を持たない改変型対立遺伝子対を担持するGRACE株のみを含むものと定義することができる。さらに、他の相同性基準を用いて、農芸に関する病原体に対して活性である抗菌化合物であって防御しようとする作物において相同体を持たない標的を阻害する化合物の検出に使用されるであろうGRACE株のサブセットを同定することができるであろう。

【0098】

現在のC.アルビカンス遺伝子破壊法は、ホモ接合性ヌル突然変異体の作製に失敗したこ 50

とから、非必須遺伝子を同定し、また他の遺伝子が必須であるという推測を可能とする。薬物標的のヌル表現型は、この標的に作用する「完璧な」薬物の絶対的な効力を予測する。例えば、特定の薬物標的についての殺傷性（細胞死）vs静的（阻害的成長）の最終的なヌル表現型の差異等である。URAプラスター法を用いてホモ接合性CaERG11欠失株を構築するのに失敗したので、CaERG11（フルコナゾールの薬物標的）の遺伝子破壊は重要であると考えられる。しかし、そのヌル表現型が殺傷性であるか静的であるかの直接的評価は、病原体中で行うことができず、またフルコナゾールの発見後に初めて、薬物およびおそらく薬物標的の両方が殺傷性ではなく静的であると生化学的に決定することが可能となった。フルコナゾールは市場で成功を収めているが、その静真菌的な作用様式は、その主な限界（すなわち長期にわたる治療の後の薬物耐性）に貢献している。したがって、初めて、本発明により提供される病原体の中で評価された薬物標的について殺傷性ヌル表現型を同定および評価する能力は、今や、静真菌的な作用様式を特に示す抗真菌薬を同定するための直接的手法を可能とする。

10

【0099】

必須遺伝子を含む単一のGRACE株またはGRACE株の所望の集団を用いて、1以上の標的遺伝子を殺傷性もしくは静的ヌル表現型のいずれかを示すものとして直接評価することができる。これは、液体培養中での様々な時間の間に第2対立遺伝子を条件付き発現させるための抑制条件下でまずGRACE株をインキュベートし、そして、抑制を和らげる増殖条件に所定数の細胞を接種した後に生細胞のパーセンテージを測定することによって、決定される。非抑制条件に戻した後に残る生細胞のパーセンテージは、殺傷性（低生存率）または静的（高生存率）表現型のいずれかを反映する。あるいは、メチレンブルーやヨードプロピジウムなどの生体染料（vital dye）を用いて、抑制条件vs誘導条件下で特定の株についての細胞の生存率（%）を定量しうる。公知の殺菌性薬物標的としては、GRACE株集団に含まれるもの（例えばCaAUR1）があり、この標準的な殺菌性薬物標的と該薬物標的セットを含む新規標的との直接比較を行うことができる。このように、標的セットの各メンバーをすぐにランク付けし、業界標準の殺傷性薬物標的に対して優先順位を付け、適当な薬物標的および最も迅速に作用する殺傷性化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを選択する。

20

【0100】

5.4. 必須遺伝子および毒性遺伝子

30

5.4.1. 標的をコードする核酸、ベクターおよび宿主細胞

本発明の方法を実施することにより、生物のゲノム中の実質的に全ての遺伝子の必須性および毒性への貢献度を決定することができる。本発明の方法によって過去に明らかにされた二倍体病原性生物（カンジダ・アルビカンス等）の必須遺伝子および毒性遺伝子の同定により、本発明者らはこれらの機能を研究しおよび薬物標的としてのこれらの有用性を評価することができるようになった。個々の必須遺伝子または毒性遺伝子の遺伝子産物の構造および機能についての情報によって、その病原性生物の中でのその発現もしくは機能を阻害する化合物を見つけるための試薬およびアッセイを設計することができる。したがって、本発明は、ある遺伝子またはその産物とその病原性生物の成長、生存もしくは増殖にとって必須であるか否か、あるいはある遺伝子またはその産物が宿主に対するその生物の毒性または病原性に貢献することについての情報を提供する。この情報に基づいて、本発明はさらに、様々な実施形態において、ある病原性生物に対抗して作用する薬物を発見するために、該病原性生物の毒性または病原性に必要および/または貢献する遺伝子のヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列の新規な使用を提供する。さらに、本発明は特に、非病原性酵母（例えばサッカロミセス・セレビシエ等）におけるこれらの必須遺伝子のオーソログ（ortholog）を同定するための上記情報の使用、および薬物スクリーニング法におけるこれらのオーソログの使用を提供する。S.セレビシエにおける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公知であるが、これらのS.セレビシエ遺伝子が病原性真菌に対する薬物を発見するのに有用であることは認識されていなかった。

40

【0101】

50

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または生物学的に活性なリボ核酸（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も含み得る。「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頻度の情報を用いてタンパク質に変換されることができる。

【0102】

本明細書中で使用される「標的遺伝子」という用語は、本発明で（特に薬物スクリーニングで）有用な必須遺伝子または毒性遺伝子のいずれかを指す。「標的必須遺伝子」および「標的毒性遺伝子」という用語は、遺伝子の2つのグループを別々に指すのに適している場合に用いられる。しかし、幾つかの遺伝子は毒性に貢献し、且つ生物の生存に必須であることが考えられる。本発明の標的遺伝子は、従来公知の方法および/または以下に教示する方法によって、薬物標的として、一部特徴付ける、完全に特徴付ける、または評価することができる。本明細書中で使用される「標的生物」という用語は、病原性生物を指し、その必須遺伝子および/または毒性遺伝子は本発明において有用である。

10

【0103】

「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を含むがこれらに限定されない）、またはこれらのヌクレオチドの配列を指す。「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語もまた、本明細書において、ヌクレオチドのヘテロポリマー（未改変のもしくは改変されたDNAまたはRNAであってもよい）を指すのに交換可能に使用される。例えば、ポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域からなる混合物であるDNA、および一本鎖領域および二本鎖領域からなる混合物を有する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もしくはRNAまたはこれら両方を含む三本鎖領域から構成される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、あるいは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またはRNA主鎖も含み得る。一般に、本発明によって提供される核酸セグメントは、ゲノムの断片または短いオリゴヌクレオチドから、一連のオリゴヌクレオチドから、または個々のヌクレオチドから組み立てて、合成核酸を提供することができる。

20

30

【0104】

ポリペプチドまたはタンパク質を指すために本明細書中で使用される「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（例えば微生物または哺乳動物の）発現系に由来することを意味する。「微生物（の）」とは、微生物または真菌（例えば酵母等）発現系において作製される組換えポリペプチドまたはタンパク質を指す。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。多くの細菌培養（例えば大腸菌）において発現されるポリペプチドまたはタンパク質は、グリコシル化修飾を含まない。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。

【0105】

「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）遺伝子発現において調節的役割を果たす1以上の遺伝子エレメント、例えばプロモーターやエンハンサー等、（2）mRNAに転写されタンパク質に翻訳される構造配列またはコード配列であって（1）のエレメントに機能的に連結されている配列、および（3）適当な転写開始および終結配列、からなるアセンブリを含む転写ユニット（発現構築物とも呼ばれる）を含み得る。「機能的に連結されている」とは、調節領域および発現対象のDNA配列が、転写および最終的には翻訳を可能とするような形で連結および配置されている連結を指す。C. albicansの場合、その珍しいコドン使用頻度のために、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において産生されるようにするためには、他の生物に由

40

50

来するコード配列を改変する必要がある場合がある。酵母もしくは真核生物発現系において使用するための構造ユニットとしては、好ましくは、宿主細胞により翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能とするリーダー配列が挙げられる。あるいは、組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列 (transport sequence) 無しで発現される場合、これはN末端メチオニン残基を含み得る。この残基は、その後発現された組換えタンパク質から切断されるまたは切断されずに、最終的な産物を提供する。

【0106】

「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、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、異種ポリペプチドもしくはタンパク質、および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りコードされるRNAを発現する。またこの用語は、遺伝子発現において調節的役割を果たす1以上の安定に組み込まれた組換え遺伝子エレメント (例えばプロモーターやエンハンサー等) を有する宿主細胞も意味する。本明細書中で定義される組換え発現系は、発現させようとする内因性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。

10

【0107】

「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、また遺伝子によりコードされる20種の通常使用されるアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。「活性ポリペプチド」という用語は、任意の天然ポリペプチドの生物学的および/または免疫学的活性を保持する形態のポリペプチドを指す。「天然ポリペプチド」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であって、特にそのポリペプチドの翻訳後修飾 (例えばタンパク質分解プロセッシング、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、リピド化 (lipidation) およびアシル化などを含むがこれらに限定されない) により生じる様々なポリペプチドが予期される。

20

【0108】

本明細書中で使用される「単離された」という用語は、天然源においてそ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 (例えば核酸やポリペプチド等) から分離された該核酸またはポリペプチドを指す。1つの実施形態において、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、存在する所定の生物学的高分子群の少なくとも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、特に分子量1000ダルトン未満の分子が存在し得る)。

30

【0109】

表IIは、それぞれのGRACE株においてテトラサイクリン抑制系下で条件付き発現させたとき、またはトランスアクチベータータンパク質をコードする遺伝子を5-FOAアッセイにおいてそれぞれのGRACE株において切り出したときの、*C.アルビカンス*において重要であることが示された真菌特異的遺伝子からなるセットをリストアップしている。

【表 2】

表 II 必須遺伝子および関連オリゴヌクレオチドの配列識別子

遺伝子名	KO 上流	KO下流	Tet 上流	Tet 下流	プライマー A	プライマー B	DNA 配列	タンパク質 配列
CaYDL105W	1	1001	2001	3001	4001	5001	6001	7001
CaYJL090C	2	1002	2002	3002	4002	5002	6002	7002
CaYLR127C	3	1003	2003	3003	4003	5003	6003	7003
CaYNL151C	4	1004	2004	3004	4004	5004	6004	7004
CaYPL083C	5	1005	2005	3005	4005	5005	6005	7005
CaYHR036W	6	1006	2006	3006	4006	5006	6006	7006
CaYNL256W	7	1007	2007	3007	4007	5007	6007	7007
CaYOL149W	8	1008	2008	3008	4008	5008	6008	7008
CaYDR361C	9	1009	2009	3009	4009	5009	6009	7009
CaYDR407C	10	1010	2010	3010	4010	5010	6010	7010
CaYBR070C	11	1011	2011	3011	4011	5011	6011	7011
CaYOR148C	12	1012	2012	3012	4012	5012	6012	7012
CaYJR041C	13	1013	2013	3013	4013	5013	6013	7013
CaYGR090W	14	1014	2014	3014	4014	5014	6014	7014
CaYBR123C	15	1015	2015	3015	4015	5015	6015	7015
CaYHR118C	16	1016	2016	3016	4016	5016	6016	7016
CaYKR063C	17	1017	2017	3017	4017	5017	6017	7017
CaYOR004W	18	1018	2018	3018	4018	5018	6018	7018
CaYML025C	19	1019	2019	3019	4019	5019	6019	7019
CaYKL033W	20	1020	2020	3020	4020	5020	6020	7020
CaYDR498C	21	1021	2021	3021	4021	5021	6021	7021
CaYIR011C	22	1022	2022	3022	4022	5022	6022	7022
CaYMR220W	23	1023	2023	3023	4023	5023	6023	7023
CaYPR105C	24	1024	2024	3024	4024	5024	6024	7024
CaYDL153C	25	1025	2025	3025	4025	5025	6025	7025
CaYPL128C	26	1026	2026	3026	4026	5026	6026	7026
CaYER026C	27	1027	2027	3027	4027	5027	6027	7027
CaYKL004W	28	1028	2028	3028	4028	5028	6028	7028
CaYMR200W	29	1029	2029	3029	4029	5029	6029	7029
CaYPR165W	30	1030	2030	3030	4030	5030	6030	7030
CaYHR007C	31	1031	2031	3031	4031	5031	6031	7031
CaYJL087C	32	1032	2032	3032	4032	5032	6032	7032
CaYLR229C	33	1033	2033	3033	4033	5033	6033	7033
CaYER118C	34	1034	2034	3034	4034	5034	6034	7034

10

20

30

40

CaYPL228W	35	1035	2035	3035	4035	5035	6035	7035
CaYPL160W	36	1036	2036	3036	4036	5036	6036	7036
CaYHR101C	37	1037	2037	3037	4037	5037	6037	7037
CaYML085C	38	1038	2038	3038	4038	5038	6038	7038
CaYBR243C	39	1039	2039	3039	4039	5039	6039	7039
CaYLR342W	40	1040	2040	3040	4040	5040	6040	7040
CaYOL026C	41	1041	2041	3041	4041	5041	6041	7041
CaYGR251W	42	1042	2042	3042	4042	5042	6042	7042
CaYDR118W	43	1043	2043	3043	4043	5043	6043	7043
CaYJL085W	44	1044	2044	3044	4044	5044	6044	7044
CaYDR052C	45	1045	2045	3045	4045	5045	6045	7045
CaYGR002C	46	1046	2046	3046	4046	5046	6046	7046
CaYLL004W	47	1047	2047	3047	4047	5047	6047	7047
CaYOR075W	48	1048	2048	3048	4048	5048	6048	7048
CaYMR005W	49	1049	2049	3049	4049	5049	6049	7049
CaYHR172W	50	1050	2050	3050	4050	5050	6050	7050
CaYGL122C	51	1051	2051	3051	4051	5051	6051	7051
CaYOR287C	52	1052	2052	3052	4052	5052	6052	7052
CaYMR149W	53	1053	2053	3053	4053	5053	6053	7053
CaYKR071C	54	1054	2054	3054	4054	5054	6054	7054
CaYDR412W	55	1055	2055	3055	4055	5055	6055	7055
CaYKR025W	56	1056	2056	3056	4056	5056	6056	7056
CaYJR112W	57	1057	2057	3057	4057	5057	6057	7057
CaYMR277W	58	1058	2058	3058	4058	5058	6058	7058
CaYKR083C	59	1059	2059	3059	4059	5059	6059	7059
CaYNL245C	60	1060	2060	3060	4060	5060	6060	7060
CaYNL181W	61	1061	2061	3061	4061	5061	6061	7061
CaYNL260C	62	1062	2062	3062	4062	5062	6062	7062
CaYDR365C	63	1063	2063	3063	4063	5063	6063	7063
CaYNL149C	64	1064	2064	3064	4064	5064	6064	7064
CaYGL029W	65	1065	2065	3065	4065	5065	6065	7065
CaYOR057W	66	1066	2066	3066	4066	5066	6066	7066
CaYIL022W	67	1067	2067	3067	4067	5067	6067	7067
CaYMR203W	68	1068	2068	3068	4068	5068	6068	7068
CaYOR206W	69	1069	2069	3069	4069	5069	6069	7069
CaYBR167C	70	1070	2070	3070	4070	5070	6070	7070
CaYDR016C	71	1071	2071	3071	4071	5071	6071	7071
CaYNL306W	72	1072	2072	3072	4072	5072	6072	7072

10

20

30

40

CaYJR067C	73	1073	2073	3073	4073	5073	6073	7073
CaYDR362C	74	1074	2074	3074	4074	5074	6074	7074
CaYLR355C	75	1075	2075	3075	4075	5075	6075	7075
CaYLR105C	76	1076	2076	3076	4076	5076	6076	7076
CaYML127W	77	1077	2077	3077	4077	5077	6077	7077
CaYPL011C	78	1078	2078	3078	4078	5078	6078	7078
CaYKL108W	79	1079	2079	3079	4079	5079	6079	7079
CaYCR035C	80	1080	2080	3080	4080	5080	6080	7080
CaYML114C	81	1081	2081	3081	4081	5081	6081	7081
CaYNL118C	82	1082	2082	3082	4082	5082	6082	7082
CaYDR527W	83	1083	2083	3083	4083	5083	6083	7083
CaYBR256C	84	1084	2084	3084	4084	5084	6084	7084
CaYGL233W	85	1085	2085	3085	4085	5085	6085	7085
CaYLR103C	86	1086	2086	3086	4086	5086	6086	7086
CaYOR340C	87	1087	2087	3087	4087	5087	6087	7087
CaYPR175W	88	1088	2088	3088	4088	5088	6088	7088
CaYJR093C	89	1089	2089	3089	4089	5089	6089	7089
CaYCL031C	90	1090	2090	3090	4090	5090	6090	7090
CaYML130C	91	1091	2091	3091	4091	5091	6091	7091
CaYAL033W	92	1092	2092	3092	4092	5092	6092	7092
CaYNL062C	93	1093	2093	3093	4093	5093	6093	7093
CaYNL132W	94	1094	2094	3094	4094	5094	6094	7094
CaYDL193W	95	1095	2095	3095	4095	5095	6095	7095
CaYDR489W	96	1096	2096	3096	4096	5096	6096	7096
CaYJL069C	97	1097	2097	3097	4097	5097	6097	7097
CaYPL063W	98	1098	2098	3098	4098	5098	6098	7098
CaYNL232W	99	1099	2099	3099	4099	5099	6099	7099
CaYNR054C	100	1100	2100	3100	4100	5100	6100	7100
CaYGR245C	101	1101	2101	3101	4101	5101	6101	7101
CaYPR162C	102	1102	2102	3102	4102	5102	6102	7102
CaYHR058C	103	1103	2103	3103	4103	5103	6103	7103
CaYKR081C	104	1104	2104	3104	4104	5104	6104	7104
CaYNL240C	105	1105	2105	3105	4105	5105	6105	7105
CaYPR168W	106	1106	2106	3106	4106	5106	6106	7106
CaYKL099C	107	1107	2107	3107	4107	5107	6107	7107
CaYLR008C	108	1108	2108	3108	4108	5108	6108	7108
CaYOL142W	109	1109	2109	3109	4109	5109	6109	7109
CaYDL015C	110	1110	2110	3110	4110	5110	6110	7110

10

20

30

40

CaYDR472W	111	1111	2111	3111	4111	5111	6111	7111
CaYNR046W	112	1112	2112	3112	4112	5112	6112	7112
CaYDR473C	113	1113	2113	3113	4113	5113	6113	7113
CaYGL207W	114	1114	2114	3114	4114	5114	6114	7114
CaYHR088W	115	1115	2115	3115	4115	5115	6115	7115
CaYIR015W	116	1116	2116	3116	4116	5116	6116	7116
CaYHR197W	117	1117	2117	3117	4117	5117	6117	7117
CaYMR218C	118	1118	2118	3118	4118	5118	6118	7118
CaYKL182W	119	1119	2119	3119	4119	5119	6119	7119
CaYDR325W	120	1120	2120	3120	4120	5120	6120	7120
CaYLL003W	121	1121	2121	3121	4121	5121	6121	7121
CaYNR026C	122	1122	2122	3122	4122	5122	6122	7122
CaYNL251C	123	1123	2123	3123	4123	5123	6123	7123
CaYPL126W	124	1124	2124	3124	4124	5124	6124	7124
CaYLR002C	125	1125	2125	3125	4125	5125	6125	7125
CaYJL061W	126	1126	2126	3126	4126	5126	6126	7126
CaYLR071C	127	1127	2127	3127	4127	5127	6127	7127
CaYML031W	128	1128	2128	3128	4128	5128	6128	7128
CaYIL147C	129	1129	2129	3129	4129	5129	6129	7129
CaYJL025W	130	1130	2130	3130	4130	5130	6130	7130
CaYOR353C	131	1131	2131	3131	4131	5131	6131	7131
CaYKR008W	132	1132	2132	3132	4132	5132	6132	7132
CaYMR033W	133	1133	2133	3133	4133	5133	6133	7133
CaYNL313C	134	1134	2134	3134	4134	5134	6134	7134
CaYGL225W	135	1135	2135	3135	4135	5135	6135	7135
CaYNL308C	136	1136	2136	3136	4136	5136	6136	7136
CaYDR353W	137	1137	2137	3137	4137	5137	6137	7137
CaYIL068C	138	1138	2138	3138	4138	5138	6138	7138
CaYPR190C	139	1139	2139	3139	4139	5139	6139	7139
CaYOR174W	140	1140	2140	3140	4140	5140	6140	7140
CaYDL150W	141	1141	2141	3141	4141	5141	6141	7141
CaYAL041W	142	1142	2142	3142	4142	5142	6142	7142
CaYMR227C	143	1143	2143	3143	4143	5143	6143	7143
CaYPL043W	144	1144	2144	3144	4144	5144	6144	7144
CaYDR324C	145	1145	2145	3145	4145	5145	6145	7145
CaYOL022C	146	1146	2146	3146	4146	5146	6146	7146
CaYOL069W	147	1147	2147	3147	4147	5147	6147	7147
CaYGR156W	148	1148	2148	3148	4148	5148	6148	7148

10

20

30

40

CaYDL003W	149	1149	2149	3149	4149	5149	6149	7149
CaYDR228C	150	1150	2150	3150	4150	5150	6150	7150
CaYKR062W	151	1151	2151	3151	4151	5151	6151	7151
CaYDR398W	152	1152	2152	3152	4152	5152	6152	7152
CaYNL126W	153	1153	2153	3153	4153	5153	6153	7153
CaYKL089W	154	1154	2154	3154	4154	5154	6154	7154
CaYMR028W	155	1155	2155	3155	4155	5155	6155	7155
CaYDR299W	156	1156	2156	3156	4156	5156	6156	7156
CaYOL034W	157	1157	2157	3157	4157	5157	6157	7157
CaYGR119C	158	1158	2158	3158	4158	5158	6158	7158
CaYDL111C	159	1159	2159	3159	4159	5159	6159	7159
CaYHR052W	160	1160	2160	3160	4160	5160	6160	7160
CaYKL021C	161	1161	2161	3161	4161	5161	6161	7161
CaYLL031C	162	1162	2162	3162	4162	5162	6162	7162
CaYHR040W	163	1163	2163	3163	4163	5163	6163	7163
CaYML015C	164	1164	2164	3164	4164	5164	6164	7164
CaYIL004C	165	1165	2165	3165	4165	5165	6165	7165
CaYDR302W	166	1166	2166	3166	4166	5166	6166	7166
CaYPR133C	167	1167	2167	3167	4167	5167	6167	7167
CaYDL195W	168	1168	2168	3168	4168	5168	6168	7168
CaYCR052W	169	1169	2169	3169	4169	5169	6169	7169
CaYFR042W	170	1170	2170	3170	4170	5170	6170	7170
CaYNR017W	171	1171	2171	3171	4171	5171	6171	7171
CaYOR254C	172	1172	2172	3172	4172	5172	6172	7172
CaYFL029C	173	1173	2173	3173	4173	5173	6173	7173
CaYBR265W	174	1174	2174	3174	4174	5174	6174	7174
CaYNL312W	175	1175	2175	3175	4175	5175	6175	7175
CaYBR155W	176	1176	2176	3176	4176	5176	6176	7176
CaYGR280C	177	1177	2177	3177	4177	5177	6177	7177
CaYJL203W	178	1178	2178	3178	4178	5178	6178	7178
CaYIR012W	179	1179	2179	3179	4179	5179	6179	7179
CaYMR093W	180	1180	2180	3180	4180	5180	6180	7180
CaYPR137W	181	1181	2181	3181	4181	5181	6181	7181
CaYLR298C	182	1182	2182	3182	4182	5182	6182	7182
CaYBR192W	183	1183	2183	3183	4183	5183	6183	7183
CaYPR112C	184	1184	2184	3184	4184	5184	6184	7184
CaYLL011W	185	1185	2185	3185	4185	5185	6185	7185
CaYER082C	186	1186	2186	3186	4186	5186	6186	7186

10

20

30

40

CaYDL217C	187	1187	2187	3187	4187	5187	6187	7187
CaYFL035C	188	1188	2188	3188	4188	5188	6188	7188
CaYOR262W	189	1189	2189	3189	4189	5189	6189	7189
CaYLR323C	190	1190	2190	3190	4190	5190	6190	7190
CaYAR007C	191	1191	2191	3191	4191	5191	6191	7191
CaYBL023C	192	1192	2192	3192	4192	5192	6192	7192
CaYBL026W	193	1193	2193	3193	4193	5193	6193	7193
CaYBL030C	194	1194	2194	3194	4194	5194	6194	7194
CaYBL035C	195	1195	2195	3195	4195	5195	6195	7195
CaYBL040C	196	1196	2196	3196	4196	5196	6196	7196
CaYBL050W	197	1197	2197	3197	4197	5197	6197	7197
CaYBL076C	198	1198	2198	3198	4198	5198	6198	7198
CaYBR002C	199	1199	2199	3199	4199	5199	6199	7199
CaYBR029C	200	1200	2200	3200	4200	5200	6200	7200
CaYBR080C	201	1201	2201	3201	4201	5201	6201	7201
CaYBR091C	202	1202	2202	3202	4202	5202	6202	7202
CaYBR135W	203	1203	2203	3203	4203	5203	6203	7203
CaYBR142W	204	1204	2204	3204	4204	5204	6204	7204
CaYBR143C	205	1205	2205	3205	4205	5205	6205	7205
CaYBR160W	206	1206	2206	3206	4206	5206	6206	7206
CaYBR196C	207	1207	2207	3207	4207	5207	6207	7207
CaYBR198C	208	1208	2208	3208	4208	5208	6208	7208
CaYBR202W	209	1209	2209	3209	4209	5209	6209	7209
CaYBR234C	210	1210	2210	3210	4210	5210	6210	7210
CaYBR236C	211	1211	2211	3211	4211	5211	6211	7211
CaYBR237W	212	1212	2212	3212	4212	5212	6212	7212
CaYBR253W	213	1213	2213	3213	4213	5213	6213	7213
CaYBR254C	214	1214	2214	3214	4214	5214	6214	7214
CaYCL003W	215	1215	2215	3215	4215	5215	6215	7215
CaYCL017C	216	1216	2216	3216	4216	5216	6216	7216
CaYCL054W	217	1217	2217	3217	4217	5217	6217	7217
CaYCR012W	218	1218	2218	3218	4218	5218	6218	7218
CaYCR057C	219	1219	2219	3219	4219	5219	6219	7219
CaYCR072C	220	1220	2220	3220	4220	5220	6220	7220
CaYDL030W	221	1221	2221	3221	4221	5221	6221	7221
CaYDL043C	222	1222	2222	3222	4222	5222	6222	7222
CaYDL055C	223	1223	2223	3223	4223	5223	6223	7223
CaYDL060W	224	1224	2224	3224	4224	5224	6224	7224

10

20

30

40

CaYDL084W	225	1225	2225	3225	4225	5225	6225	7225
CaYDL087C	226	1226	2226	3226	4226	5226	6226	7226
CaYDL126C	227	1227	2227	3227	4227	5227	6227	7227
CaYDL132W	228	1228	2228	3228	4228	5228	6228	7228
CaYDL141W	229	1229	2229	3229	4229	5229	6229	7229
CaYKL059C	230	1230	2230	3230	4230	5230	6230	7230
CaYDL108W	231	1231	2231	3231	4231	5231	6231	7231
CaYKL060C	232	1232	2232	3232	4232	5232	6232	7232
CaYHR070W	233	1233	2233	3233	4233	5233	6233	7233
CaYGR195W	234	1234	2234	3234	4234	5234	6234	7234
CaYOL102C	235	1235	2235	3235	4235	5235	6235	7235
CaYOR074C	236	1236	2236	3236	4236	5236	6236	7236
CaYGL155W	237	1237	2237	3237	4237	5237	6237	7237
CaYLR305C	238	1238	2238	3238	4238	5238	6238	7238
CaYNL222W	239	1239	2239	3239	4239	5239	6239	7239
CaYDR236C	240	1240	2240	3240	4240	5240	6240	7240
CaYBL020W	241	1241	2241	3241	4241	5241	6241	7241
CaYNL261W	242	1242	2242	3242	4242	5242	6242	7242
CaYDR246W	243	1243	2243	3243	4243	5243	6243	7243
CaYNL075W	244	1244	2244	3244	4244	5244	6244	7244
CaYOR145C	245	1245	2245	3245	4245	5245	6245	7245
CaYOL077C	246	1246	2246	3246	4246	5246	6246	7246
CaYBR257W	247	1247	2247	3247	4247	5247	6247	7247
CaYHR170W	248	1248	2248	3248	4248	5248	6248	7248
CaYNL263C	249	1249	2249	3249	4249	5249	6249	7249
CaYKR068C	250	1250	2250	3250	4250	5250	6250	7250
CaYPR016C	251	1251	2251	3251	4251	5251	6251	7251
CaYGR172C	252	1252	2252	3252	4252	5252	6252	7252
CaYHR089C	253	1253	2253	3253	4253	5253	6253	7253
CaYMR197C	254	1254	2254	3254	4254	5254	6254	7254
CaYHR188C	255	1255	2255	3255	4255	5255	6255	7255
CaYPL266W	256	1256	2256	3256	4256	5256	6256	7256
CaYBR011C	257	1257	2257	3257	4257	5257	6257	7257
CaYCL059C	258	1258	2258	3258	4258	5258	6258	7258
CaYDL008W	259	1259	2259	3259	4259	5259	6259	7259
CaYDL097C	260	1260	2260	3260	4260	5260	6260	7260
CaYDL143W	261	1261	2261	3261	4261	5261	6261	7261
CaYDL205C	262	1262	2262	3262	4262	5262	6262	7262

10

20

30

40

CaYDL208W	263	1263	2263	3263	4263	5263	6263	7263
CaYDR002W	264	1264	2264	3264	4264	5264	6264	7264
CaYDR013W	265	1265	2265	3265	4265	5265	6265	7265
CaYDR023W	266	1266	2266	3266	4266	5266	6266	7266
CaYDR037W	267	1267	2267	3267	4267	5267	6267	7267
CaYDR045C	268	1268	2268	3268	4268	5268	6268	7268
CaYDR054C	269	1269	2269	3269	4269	5269	6269	7269
CaYDR086C	270	1270	2270	3270	4270	5270	6270	7270
CaYDR087C	271	1271	2271	3271	4271	5271	6271	7271
CaYDR091C	272	1272	2272	3272	4272	5272	6272	7272
CaYDR167W	273	1273	2273	3273	4273	5273	6273	7273
CaYDR172W	274	1274	2274	3274	4274	5274	6274	7274
CaYDR189W	275	1275	2275	3275	4275	5275	6275	7275
CaYDR196C	276	1276	2276	3276	4276	5276	6276	7276
CaYDR212W	277	1277	2277	3277	4277	5277	6277	7277
CaYDR238C	278	1278	2278	3278	4278	5278	6278	7278
CaYDR280W	279	1279	2279	3279	4279	5279	6279	7279
CaYDR331W	280	1280	2280	3280	4280	5280	6280	7280
CaYDR373W	281	1281	2281	3281	4281	5281	6281	7281
CaYDR376W	282	1282	2282	3282	4282	5282	6282	7282
CaYDR390C	283	1283	2283	3283	4283	5283	6283	7283
CaYDR394W	284	1284	2284	3284	4284	5284	6284	7284
CaYDR404C	285	1285	2285	3285	4285	5285	6285	7285
CaYDR429C	286	1286	2286	3286	4286	5286	6286	7286
CaYDR454C	287	1287	2287	3287	4287	5287	6287	7287
CaYEL020W-A	288	1288	2288	3288	4288	5288	6288	7288
CaYEL026W	289	1289	2289	3289	4289	5289	6289	7289
CaYER003C	290	1290	2290	3290	4290	5290	6290	7290
CaYER006W	291	1291	2291	3291	4291	5291	6291	7291
CaYER012W	292	1292	2292	3292	4292	5292	6292	7292
CaYER021W	293	1293	2293	3293	4293	5293	6293	7293
CaYER036C	294	1294	2294	3294	4294	5294	6294	7294
CaYER094C	295	1295	2295	3295	4295	5295	6295	7295
CaYER125W	296	1296	2296	3296	4296	5296	6296	7296
CaYER148W	297	1297	2297	3297	4297	5297	6297	7297
CaYER159C	298	1298	2298	3298	4298	5298	6298	7298
CaYFL002C	299	1299	2299	3299	4299	5299	6299	7299
CaYFL005W	300	1300	2300	3300	4300	5300	6300	7300

10

20

30

40

CaYFL017C	301	1301	2301	3301	4301	5301	6301	7301
CaYFL022C	302	1302	2302	3302	4302	5302	6302	7302
CaYFL038C	303	1303	2303	3303	4303	5303	6303	7303
CaYFL045C	304	1304	2304	3304	4304	5304	6304	7304
CaYFR004W	305	1305	2305	3305	4305	5305	6305	7305
CaYFR037C	306	1306	2306	3306	4306	5306	6306	7306
CaYFR050C	307	1307	2307	3307	4307	5307	6307	7307
CaYFR052W	308	1308	2308	3308	4308	5308	6308	7308
CaYDL029W	309	1309	2309	3309	4309	5309	6309	7309
CaYDL147W	310	1310	2310	3310	4310	5310	6310	7310
CaYDL148C	311	1311	2311	3311	4311	5311	6311	7311
CaYDR060W	312	1312	2312	3312	4312	5312	6312	7312
CaYDR062W	313	1313	2313	3313	4313	5313	6313	7313
CaYDR211W	314	1314	2314	3314	4314	5314	6314	7314
CaYDR328C	315	1315	2315	3315	4315	5315	6315	7315
CaYER025W	316	1316	2316	3316	4316	5316	6316	7316
CaYER136W	317	1317	2317	3317	4317	5317	6317	7317
CaYER171W	318	1318	2318	3318	4318	5318	6318	7318
CaYFL008W	319	1319	2319	3319	4319	5319	6319	7319
CaYGL001C	320	1320	2320	3320	4320	5320	6320	7320
CaYGL008C	321	1321	2321	3321	4321	5321	6321	7321
CaYGL011C	322	1322	2322	3322	4322	5322	6322	7322
CaYGL022W	323	1323	2323	3323	4323	5323	6323	7323
CaYGL044C	324	1324	2324	3324	4324	5324	6324	7324
CaYGL048C	325	1325	2325	3325	4325	5325	6325	7325
CaYGL068W	326	1326	2326	3326	4326	5326	6326	7326
CaYGL097W	327	1327	2327	3327	4327	5327	6327	7327
CaYGL112C	328	1328	2328	3328	4328	5328	6328	7328
CaYGL120C	329	1329	2329	3329	4329	5329	6329	7329
CaYGL130W	330	1330	2330	3330	4330	5330	6330	7330
CaYGR029W	331	1331	2331	3331	4331	5331	6331	7331
CaYGR060W	332	1332	2332	3332	4332	5332	6332	7332
CaYGR094W	333	1333	2333	3333	4333	5333	6333	7333
CaYGR103W	334	1334	2334	3334	4334	5334	6334	7334
CaYGR185C	335	1335	2335	3335	4335	5335	6335	7335
CaYGR211W	336	1336	2336	3336	4336	5336	6336	7336
CaYGR218W	337	1337	2337	3337	4337	5337	6337	7337
CaYGR246C	338	1338	2338	3338	4338	5338	6338	7338

10

20

30

40

CaYGR253C	339	1339	2339	3339	4339	5339	6339	7339
CaYHL015W	340	1340	2340	3340	4340	5340	6340	7340
CaYHR005C-A	341	1341	2341	3341	4341	5341	6341	7341
CaYHR019C	342	1342	2342	3342	4342	5342	6342	7342
CaYHR020W	343	1343	2343	3343	4343	5343	6343	7343
CaYHR024C	344	1344	2344	3344	4344	5344	6344	7344
CaYHR062C	345	1345	2345	3345	4345	5345	6345	7345
CaYHR072W	346	1346	2346	3346	4346	5346	6346	7346
CaYHR072W-A	347	1347	2347	3347	4347	5347	6347	7347
CaYHR090C	348	1348	2348	3348	4348	5348	6348	7348
CaYHR122W	349	1349	2349	3349	4349	5349	6349	7349
CaYHR143W-A	350	1350	2350	3350	4350	5350	6350	7350
CaYHR148W	351	1351	2351	3351	4351	5351	6351	7351
CaYHR165C	352	1352	2352	3352	4352	5352	6352	7352
CaYHR166C	353	1353	2353	3353	4353	5353	6353	7353
CaYHR169W	354	1354	2354	3354	4354	5354	6354	7354
CaYHR190W	355	1355	2355	3355	4355	5355	6355	7355
CaYIL003W	356	1356	2356	3356	4356	5356	6356	7356
CaYIL021W	357	1357	2357	3357	4357	5357	6357	7357
CaYIL075C	358	1358	2358	3358	4358	5358	6358	7358
CaYIL078W	359	1359	2359	3359	4359	5359	6359	7359
CaYIL142W	360	1360	2360	3360	4360	5360	6360	7360
CaYIR008C	361	1361	2361	3361	4361	5361	6361	7361
CaYIR022W	362	1362	2362	3362	4362	5362	6362	7362
CaYJL001W	363	1363	2363	3363	4363	5363	6363	7363
CaYJL014W	364	1364	2364	3364	4364	5364	6364	7364
CaYJL050W	365	1365	2365	3365	4365	5365	6365	7365
CaYJL074C	366	1366	2366	3366	4366	5366	6366	7366
CaYJL081C	367	1367	2367	3367	4367	5367	6367	7367
CaYJL104W	368	1368	2368	3368	4368	5368	6368	7368
CaYJL111W	369	1369	2369	3369	4369	5369	6369	7369
CaYJL143W	370	1370	2370	3370	4370	5370	6370	7370
CaYJL167W	371	1371	2371	3371	4371	5371	6371	7371
CaYJL194W	372	1372	2372	3372	4372	5372	6372	7372
CaYJR006W	373	1373	2373	3373	4373	5373	6373	7373
CaYJR017C	374	1374	2374	3374	4374	5374	6374	7374
CaYJR064W	375	1375	2375	3375	4375	5375	6375	7375
CaYJR065C	376	1376	2376	3376	4376	5376	6376	7376

10

20

30

40

CaYJR072C	377	1377	2377	3377	4377	5377	6377	7377
CaYJR123W	378	1378	2378	3378	4378	5378	6378	7378
CaYKL012W	379	1379	2379	3379	4379	5379	6379	7379
CaYKL019W	380	1380	2380	3380	4380	5380	6380	7380
CaYKL028W	381	1381	2381	3381	4381	5381	6381	7381
CaYKL058W	382	1382	2382	3382	4382	5382	6382	7382
CaYKL104C	383	1383	2383	3383	4383	5383	6383	7383
CaYKL144C	384	1384	2384	3384	4384	5384	6384	7384
CaYKL145W	385	1385	2385	3385	4385	5385	6385	7385
CaYKL172W	386	1386	2386	3386	4386	5386	6386	7386
CaYKL210W	387	1387	2387	3387	4387	5387	6387	7387
CaYKR079C	388	1388	2388	3388	4388	5388	6388	7388
CaYKR086W	389	1389	2389	3389	4389	5389	6389	7389
CaYLL018C	390	1390	2390	3390	4390	5390	6390	7390
CaYLR005W	391	1391	2391	3391	4391	5391	6391	7391
CaYLR009W	392	1392	2392	3392	4392	5392	6392	7392
CaYLR022C	393	1393	2393	3393	4393	5393	6393	7393
CaYLR026C	394	1394	2394	3394	4394	5394	6394	7394
CaYLR051C	395	1395	2395	3395	4395	5395	6395	7395
CaYLR060W	396	1396	2396	3396	4396	5396	6396	7396
CaYLR078C	397	1397	2397	3397	4397	5397	6397	7397
CaYLR100W	398	1398	2398	3398	4398	5398	6398	7398
CaYLR116W	399	1399	2399	3399	4399	5399	6399	7399
CaYLR117C	400	1400	2400	3400	4400	5400	6400	7400
CaYLR129W	401	1401	2401	3401	4401	5401	6401	7401
CaYLR147C	402	1402	2402	3402	4402	5402	6402	7402
CaYLR153C	403	1403	2403	3403	4403	5403	6403	7403
CaYLR163C	404	1404	2404	3404	4404	5404	6404	7404
CaYLR175W	405	1405	2405	3405	4405	5405	6405	7405
CaYLR186W	406	1406	2406	3406	4406	5406	6406	7406
CaYLR197W	407	1407	2407	3407	4407	5407	6407	7407
CaYLR208W	408	1408	2408	3408	4408	5408	6408	7408
CaYLR222C	409	1409	2409	3409	4409	5409	6409	7409
CaYLR259C	410	1410	2410	3410	4410	5410	6410	7410
CaYLR276C	411	1411	2411	3411	4411	5411	6411	7411
CaYLR277C	412	1412	2412	3412	4412	5412	6412	7412
CaYLR291C	413	1413	2413	3413	4413	5413	6413	7413
CaYLR293C	414	1414	2414	3414	4414	5414	6414	7414

10

20

30

40

CaYLR347C	415	1415	2415	3415	4415	5415	6415	7415
CaYLR378C	416	1416	2416	3416	4416	5416	6416	7416
CaYLR397C	417	1417	2417	3417	4417	5417	6417	7417
CaYML064C	418	1418	2418	3418	4418	5418	6418	7418
CaYML069W	419	1419	2419	3419	4419	5419	6419	7419
CaYML092C	420	1420	2420	3420	4420	5420	6420	7420
CaYML093W	421	1421	2421	3421	4421	5421	6421	7421
CaYML125C	422	1422	2422	3422	4422	5422	6422	7422
CaYML126C	423	1423	2423	3423	4423	5423	6423	7423
CaYMR113W	424	1424	2424	3424	4424	5424	6424	7424
CaYMR131C	425	1425	2425	3425	4425	5425	6425	7425
CaYMR146C	426	1426	2426	3426	4426	5426	6426	7426
CaYMR208W	427	1427	2427	3427	4427	5427	6427	7427
CaYMR213W	428	1428	2428	3428	4428	5428	6428	7428
CaYMR240C	429	1429	2429	3429	4429	5429	6429	7429
CaYMR260C	430	1430	2430	3430	4430	5430	6430	7430
CaYMR308C	431	1431	2431	3431	4431	5431	6431	7431
CaYMR314W	432	1432	2432	3432	4432	5432	6432	7432
CaYNL002C	433	1433	2433	3433	4433	5433	6433	7433
CaYNL006W	434	1434	2434	3434	4434	5434	6434	7434
CaYNL061W	435	1435	2435	3435	4435	5435	6435	7435
CaYNL102W	436	1436	2436	3436	4436	5436	6436	7436
CaYNL113W	437	1437	2437	3437	4437	5437	6437	7437
CaYNL178W	438	1438	2438	3438	4438	5438	6438	7438
CaYNL189W	439	1439	2439	3439	4439	5439	6439	7439
CaYNL244C	440	1440	2440	3440	4440	5440	6440	7440
CaYNL247W	441	1441	2441	3441	4441	5441	6441	7441
CaYNL287W	442	1442	2442	3442	4442	5442	6442	7442
CaYNR043W	443	1443	2443	3443	4443	5443	6443	7443
CaYOL005C	444	1444	2444	3444	4444	5444	6444	7444
CaYOL010W	445	1445	2445	3445	4445	5445	6445	7445
CaYOL094C	446	1446	2446	3446	4446	5446	6446	7446
CaYOL139C	447	1447	2447	3447	4447	5447	6447	7447
CaYOR048C	448	1448	2448	3448	4448	5448	6448	7448
CaYOR056C	449	1449	2449	3449	4449	5449	6449	7449
CaYOR063W	450	1450	2450	3450	4450	5450	6450	7450
CaYOR103C	451	1451	2451	3451	4451	5451	6451	7451
CaYOR116C	452	1452	2452	3452	4452	5452	6452	7452

10

20

30

40

CaYOR117W	453	1453	2453	3453	4453	5453	6453	7453
CaYOR151C	454	1454	2454	3454	4454	5454	6454	7454
CaYOR157C	455	1455	2455	3455	4455	5455	6455	7455
CaYOR159C	456	1456	2456	3456	4456	5456	6456	7456
CaYOR168W	457	1457	2457	3457	4457	5457	6457	7457
CaYOR194C	458	1458	2458	3458	4458	5458	6458	7458
CaYOR207C	459	1459	2459	3459	4459	5459	6459	7459
CaYOR210W	460	1460	2460	3460	4460	5460	6460	7460
CaYOR217W	461	1461	2461	3461	4461	5461	6461	7461
CaYOR224C	462	1462	2462	3462	4462	5462	6462	7462
CaYOR232W	463	1463	2463	3463	4463	5463	6463	7463
CaYOR259C	464	1464	2464	3464	4464	5464	6464	7464
CaYOR261C	465	1465	2465	3465	4465	5465	6465	7465
CaYOR272W	466	1466	2466	3466	4466	5466	6466	7466
CaYOR294W	467	1467	2467	3467	4467	5467	6467	7467
CaYOR310C	468	1468	2468	3468	4468	5468	6468	7468
CaYOR335C	469	1469	2469	3469	4469	5469	6469	7469
CaYOR341W	470	1470	2470	3470	4470	5470	6470	7470
CaYPL010W	471	1471	2471	3471	4471	5471	6471	7471
CaYPL076W	472	1472	2472	3472	4472	5472	6472	7472
CaYPL094C	473	1473	2473	3473	4473	5473	6473	7473
CaYPL117C	474	1474	2474	3474	4474	5474	6474	7474
CaYPL122C	475	1475	2475	3475	4475	5475	6475	7475
CaYPL131W	476	1476	2476	3476	4476	5476	6476	7476
CaYPL211W	477	1477	2477	3477	4477	5477	6477	7477
CaYPL235W	478	1478	2478	3478	4478	5478	6478	7478
CaYPL252C	479	1479	2479	3479	4479	5479	6479	7479
CaYPR019W	480	1480	2480	3480	4480	5480	6480	7480
CaYPR025C	481	1481	2481	3481	4481	5481	6481	7481
CaYPR034W	482	1482	2482	3482	4482	5482	6482	7482
CaYPR055W	483	1483	2483	3483	4483	5483	6483	7483
CaYPR056W	484	1484	2484	3484	4484	5484	6484	7484
CaYPR082C	485	1485	2485	3485	4485	5485	6485	7485
CaYPR103W	486	1486	2486	3486	4486	5486	6486	7486
CaYPR107C	487	1487	2487	3487	4487	5487	6487	7487
CaYPR108W	488	1488	2488	3488	4488	5488	6488	7488
CaYPR110C	489	1489	2489	3489	4489	5489	6489	7489
CaYPR113W	490	1490	2490	3490	4490	5490	6490	7490

10

20

30

40

CaYPR176C	491	1491	2491	3491	4491	5491	6491	7491
CaYPR183W	492	1492	2492	3492	4492	5492	6492	7492
CaYPR186C	493	1493	2493	3493	4493	5493	6493	7493
CaYPR187W	494	1494	2494	3494	4494	5494	6494	7494
CaYGL123W	495	1495	2495	3495	4495	5495	6495	7495
CaYHR042W	496	1496	2496	3496	4496	5496	6496	7496
CaYIL062C	497	1497	2497	3497	4497	5497	6497	7497
CaYJR042W	498	1498	2498	3498	4498	5498	6498	7498
CaYJR063W	499	1499	2499	3499	4499	5499	6499	7499
CaYJR076C	500	1500	2500	3500	4500	5500	6500	7500
CaYKL013C	501	1501	2501	3501	4501	5501	6501	7501
CaYLR196W	502	1502	2502	3502	4502	5502	6502	7502
CaYLR272C	503	1503	2503	3503	4503	5503	6503	7503
CaYNR035C	504	1504	2504	3504	4504	5504	6504	7504
CaYPR088C	505	1505	2505	3505	4505	5505	6505	7505
CaYDR397C	506	1506	2506	3506	4506	5506	6506	7506
CaYAL032C	507	1507	2507	3507	4507	5507	6507	7507
CaYBR060C	508	1508	2508	3508	4508	5508	6508	7508
CaYBR154C	509	1509	2509	3509	4509	5509	6509	7509
CaYDL028C	510	1510	2510	3510	4510	5510	6510	7510
CaYDR088C	511	1511	2511	3511	4511	5511	6511	7511
CaYDR235W	512	1512	2512	3512	4512	5512	6512	7512
CaYDR267C	513	1513	2513	3513	4513	5513	6513	7513
CaYDR460W	514	1514	2514	3514	4514	5514	6514	7514
CaYEL032W	515	1515	2515	3515	4515	5515	6515	7515
CaYER013W	516	1516	2516	3516	4516	5516	6516	7516
CaYER048W-A	517	1517	2517	3517	4517	5517	6517	7517
CaYER172C	518	1518	2518	3518	4518	5518	6518	7518
CaYFR031C	519	1519	2519	3519	4519	5519	6519	7519
CaYGL065C	520	1520	2520	3520	4520	5520	6520	7520
CaYGL073W	521	1521	2521	3521	4521	5521	6521	7521
CaYGL091C	522	1522	2522	3522	4522	5522	6522	7522
CaYGL103W	523	1523	2523	3523	4523	5523	6523	7523
CaYGL116W	524	1524	2524	3524	4524	5524	6524	7524
CaYGL201C	525	1525	2525	3525	4525	5525	6525	7525
CaYGL245W	526	1526	2526	3526	4526	5526	6526	7526
CaYGL247W	527	1527	2527	3527	4527	5527	6527	7527
CaYGR047C	528	1528	2528	3528	4528	5528	6528	7528

10

20

30

40

CaYGR074W	529	1529	2529	3529	4529	5529	6529	7529
CaYGR083C	530	1530	2530	3530	4530	5530	6530	7530
CaYGR128C	531	1531	2531	3531	4531	5531	6531	7531
CaYHR074W	532	1532	2532	3532	4532	5532	6532	7532
CaYHR107C	533	1533	2533	3533	4533	5533	6533	7533
CaYIL126W	534	1534	2534	3534	4534	5534	6534	7534
CaYJL010C	535	1535	2535	3535	4535	5535	6535	7535
CaYJL011C	536	1536	2536	3536	4536	5536	6536	7536
CaYJL026W	537	1537	2537	3537	4537	5537	6537	7537
CaYJL039C	538	1538	2538	3538	4538	5538	6538	7538
CaYJL041W	539	1539	2539	3539	4539	5539	6539	7539
CaYJR045C	540	1540	2540	3540	4540	5540	6540	7540
CaYKL049C	541	1541	2541	3541	4541	5541	6541	7541
CaYKL152C	542	1542	2542	3542	4542	5542	6542	7542
CaYKL181W	543	1543	2543	3543	4543	5543	6543	7543
CaYLR086W	544	1544	2544	3544	4544	5544	6544	7544
CaYLR115W	545	1545	2545	3545	4545	5545	6545	7545
CaYLR223C	546	1546	2546	3546	4546	5546	6546	7546
CaYLR274W	547	1547	2547	3547	4547	5547	6547	7547
CaYLR336C	548	1548	2548	3548	4548	5548	6548	7548
CaYML065W	549	1549	2549	3549	4549	5549	6549	7549
CaYML098W	550	1550	2550	3550	4550	5550	6550	7550
CaYMR043W	551	1551	2551	3551	4551	5551	6551	7551
CaYMR112C	552	1552	2552	3552	4552	5552	6552	7552
CaYMR281W	553	1553	2553	3553	4553	5553	6553	7553
CaYMR288W	554	1554	2554	3554	4554	5554	6554	7554
CaYMR290C	555	1555	2555	3555	4555	5555	6555	7555
CaYMR309C	556	1556	2556	3556	4556	5556	6556	7556
CaYNL039W	557	1557	2557	3557	4557	5557	6557	7557
CaYNL110C	558	1558	2558	3558	4558	5558	6558	7558
CaYNL221C	559	1559	2559	3559	4559	5559	6559	7559
CaYNL317W	560	1560	2560	3560	4560	5560	6560	7560
CaYNR053C	561	1561	2561	3561	4561	5561	6561	7561
CaYOL038W	562	1562	2562	3562	4562	5562	6562	7562
CaYOR095C	563	1563	2563	3563	4563	5563	6563	7563
CaYOR204W	564	1564	2564	3564	4564	5564	6564	7564
CaYOR249C	565	1565	2565	3565	4565	5565	6565	7565
CaYOR250C	566	1566	2566	3566	4566	5566	6566	7566

10

20

30

40

CaYOR257W	567	1567	2567	3567	4567	5567	6567	7567
CaYOR370C	568	1568	2568	3568	4568	5568	6568	7568
CaYPL151C	569	1569	2569	3569	4569	5569	6569	7569
CaYPL204W	570	1570	2570	3570	4570	5570	6570	7570
CaYPL209C	571	1571	2571	3571	4571	5571	6571	7571
CaYPL242C	572	1572	2572	3572	4572	5572	6572	7572
CaYPR048W	573	1573	2573	3573	4573	5573	6573	7573
CaYPR086W	574	1574	2574	3574	4574	5574	6574	7574
CaYPR178W	575	1575	2575	3575	4575	5575	6575	7575
CaYIL109C	576	1576	2576	3576	4576	5576	6576	7576
CaYKL045W	577	1577	2577	3577	4577	5577	6577	7577
CaYLR316C	578	1578	2578	3578	4578	5578	6578	7578
CaYBR087W	579	1579	2579	3579	4579	5579	6579	7579
CaYGR048W	580	1580	2580	3580	4580	5580	6580	7580
CaYPL169C	581	1581	2581	3581	4581	5581	6581	7581
CaYGR186W	582	1582	2582	3582	4582	5582	6582	7582
CaYNL131W	583	1583	2583	3583	4583	5583	6583	7583
CaYLR088W	584	1584	2584	3584	4584	5584	6584	7584
CaYKL193C	585	1585	2585	3585	4585	5585	6585	7585
CaYJR007W	586	1586	2586	3586	4586	5586	6586	7586
CaYJL034W	587	1587	2587	3587	4587	5587	6587	7587
CaYDL207W	588	1588	2588	3588	4588	5588	6588	7588
CaYDL017W	589	1589	2589	3589	4589	5589	6589	7589
CaYAL035W	590	1590	2590	3590	4590	5590	6590	7590
CaYBR038W	591	1591	2591	3591	4591	5591	6591	7591
CaYBR159W	592	1592	2592	3592	4592	5592	6592	7592
CaYDR120C	593	1593	2593	3593	4593	5593	6593	7593
CaYER070W	594	1594	2594	3594	4594	5594	6594	7594
CaYGL003C	595	1595	2595	3595	4595	5595	6595	7595
CaYGL206C	596	1596	2596	3596	4596	5596	6596	7596
CaYAL043C	597	1597	2597	3597	4597	5597	6597	7597
CaYBL097W	598	1598	2598	3598	4598	5598	6598	7598
CaYBL105C	599	1599	2599	3599	4599	5599	6599	7599
CaYBR079C	600	1600	2600	3600	4600	5600	6600	7600
CaYBR088C	601	1601	2601	3601	4601	5601	6601	7601
CaYDL145C	602	1602	2602	3602	4602	5602	6602	7602
CaYDL166C	603	1603	2603	3603	4603	5603	6603	7603
CaYDR145W	604	1604	2604	3604	4604	5604	6604	7604

10

20

30

40

CaYDR170C	605	1605	2605	3605	4605	5605	6605	7605
CaYDR301W	606	1606	2606	3606	4606	5606	6606	7606
CaYDR531W	607	1607	2607	3607	4607	5607	6607	7607
CaYFL024C	608	1608	2608	3608	4608	5608	6608	7608
CaYFR002W	609	1609	2609	3609	4609	5609	6609	7609
CaYGR264C	610	1610	2610	3610	4610	5610	6610	7610
CaYHR023W	611	1611	2611	3611	4611	5611	6611	7611
CaYHR027C	612	1612	2612	3612	4612	5612	6612	7612
CaYJL008C	613	1613	2613	3613	4613	5613	6613	7613
CaYJL033W	614	1614	2614	3614	4614	5614	6614	7614
CaYJL054W	615	1615	2615	3615	4615	5615	6615	7615
CaYJL109C	616	1616	2616	3616	4616	5616	6616	7616
CaYJL125C	617	1617	2617	3617	4617	5617	6617	7617
CaYJL156C	618	1618	2618	3618	4618	5618	6618	7618
CaYJR002W	619	1619	2619	3619	4619	5619	6619	7619
CaYKL192C	620	1620	2620	3620	4620	5620	6620	7620
CaYLL034C	621	1621	2621	3621	4621	5621	6621	7621
CaYLR029C	622	1622	2622	3622	4622	5622	6622	7622
CaYLR167W	623	1623	2623	3623	4623	5623	6623	7623
CaYLR243W	624	1624	2624	3624	4624	5624	6624	7624
CaYLR249W	625	1625	2625	3625	4625	5625	6625	7625
CaYLR321C	626	1626	2626	3626	4626	5626	6626	7626
CaYLR383W	627	1627	2627	3627	4627	5627	6627	7627
CaYMR239C	628	1628	2628	3628	4628	5628	6628	7628
CaYNL088W	629	1629	2629	3629	4629	5629	6629	7629
CaYNL163C	630	1630	2630	3630	4630	5630	6630	7630
CaYNR038W	631	1631	2631	3631	4631	5631	6631	7631
CaYOL097C	632	1632	2632	3632	4632	5632	6632	7632
CaYOR260W	633	1633	2633	3633	4633	5633	6633	7633
CaYPL028W	634	1634	2634	3634	4634	5634	6634	7634
CaYPL153C	635	1635	2635	3635	4635	5635	6635	7635
CaYPL210C	636	1636	2636	3636	4636	5636	6636	7636
CaYPL217C	637	1637	2637	3637	4637	5637	6637	7637
CaYPR010C	638	1638	2638	3638	4638	5638	6638	7638
CaYPR144C	639	1639	2639	3639	4639	5639	6639	7639
CaYPR169W	640	1640	2640	3640	4640	5640	6640	7640
CaYDL140C	641	1641	2641	3641	4641	5641	6641	7641
CaYDL031W	642	1642	2642	3642	4642	5642	6642	7642

10

20

30

40

CaYHR186C	643	1643	2643	3643	4643	5643	6643	7643
CaYPL093W	644	1644	2644	3644	4644	5644	6644	7644
CaYKL035W	645	1645	2645	3645	4645	5645	6645	7645
CaYDL058W	646	1646	2646	3646	4646	5646	6646	7646
CaYDR341C	647	1647	2647	3647	4647	5647	6647	7647
CaYGL238W	648	1648	2648	3648	4648	5648	6648	7648
CaYFR028C	649	1649	2649	3649	4649	5649	6649	7649
CaYNL172W	650	1650	2650	3650	4650	5650	6650	7650
CaYDR190C	651	1651	2651	3651	4651	5651	6651	7651
CaYEL055C	652	1652	2652	3652	4652	5652	6652	7652
CaYPR041W	653	1653	2653	3653	4653	5653	6653	7653
CaYGR255C	654	1654	2654	3654	4654	5654	6654	7654
CaYBR055C	655	1655	2655	3655	4655	5655	6655	7655
CaYER022W	656	1656	2656	3656	4656	5656	6656	7656
CaYKL014C	657	1657	2657	3657	4657	5657	6657	7657
CaYIL046W	658	1658	2658	3658	4658	5658	6658	7658
CaYMR015C	659	1659	2659	3659	4659	5659	6659	7659
CaYNL280C	660	1660	2660	3660	4660	5660	6660	7660
CaYML075C	661	1661	2661	3661	4661	5661	6661	7661
CaYCR042C	662	1662	2662	3662	4662	5662	6662	7662
CaYMR235C	663	1663	2663	3663	4663	5663	6663	7663
CaYIL026C	664	1664	2664	3664	4664	5664	6664	7664
CaYPL085W	665	1665	2665	3665	4665	5665	6665	7665
CaYGR005C	666	1666	2666	3666	4666	5666	6666	7666
CaYOL144W	667	1667	2667	3667	4667	5667	6667	7667
CaYHR005C	668	1668	2668	3668	4668	5668	6668	7668
CaYGR013W	669	1669	2669	3669	4669	5669	6669	7669
CaYIL115C	670	1670	2670	3670	4670	5670	6670	7670
CaYGR147C	671	1671	2671	3671	4671	5671	6671	7671
CaYOR336W	672	1672	2672	3672	4672	5672	6672	7672
CaYPR159W	673	1673	2673	3673	4673	5673	6673	7673
CaYJL174W	674	1674	2674	3674	4674	5674	6674	7674
CaYOL130W	675	1675	2675	3675	4675	5675	6675	7675
CaYNL048W	676	1676	2676	3676	4676	5676	6676	7676
CaYER007W	677	1677	2677	3677	4677	5677	6677	7677
CaYGL106W	678	1678	2678	3678	4678	5678	6678	7678
CaYDL102W	679	1679	2679	3679	4679	5679	6679	7679
CaYDL007W	680	1680	2680	3680	4680	5680	6680	7680

10

20

30

40

CaYER031C	681	1681	2681	3681	4681	5681	6681	7681
CaYDR226W	682	1682	2682	3682	4682	5682	6682	7682
CaYOR349W	683	1683	2683	3683	4683	5683	6683	7683
CaYNL148C	684	1684	2684	3684	4684	5684	6684	7684
CaYPR119W	685	1685	2685	3685	4685	5685	6685	7685
CaYMR055C	686	1686	2686	3686	4686	5686	6686	7686
CaYFL018C	687	1687	2687	3687	4687	5687	6687	7687
CaYNL238W	688	1688	2688	3688	4688	5688	6688	7688
CaYPL231W	689	1689	2689	3689	4689	5689	6689	7689
CaYNL025C	690	1690	2690	3690	4690	5690	6690	7690
CaYJL141C	691	1691	2691	3691	4691	5691	6691	7691
CaYLR306W	692	1692	2692	3692	4692	5692	6692	7692
CaYLR300W	693	1693	2693	3693	4693	5693	6693	7693
CaYKL046C	694	1694	2694	3694	4694	5694	6694	7694
CaYDR311W	695	1695	2695	3695	4695	5695	6695	7695
CaYDR449C	696	1696	2696	3696	4696	5696	6696	7696
CaYER023W	697	1697	2697	3697	4697	5697	6697	7697
CaYGL040C	698	1698	2698	3698	4698	5698	6698	7698
CaYGR009C	699	1699	2699	3699	4699	5699	6699	7699
CaYNR003C	700	1700	2700	3700	4700	5700	6700	7700
CaYOL066C	701	1701	2701	3701	4701	5701	6701	7701
CaYOR119C	702	1702	2702	3702	4702	5702	6702	7702
CaYMR049C	703	1703	2703	3703	4703	5703	6703	7703
CaYNR050C	704	1704	2704	3704	4704	5704	6704	7704
CaYPL203W	705	1705	2705	3705	4705	5705	6705	7705
CaYER113C	706	1706	2706	3706	4706	5706	6706	7706
CaYOR280C	707	1707	2707	3707	4707	5707	6707	7707
CaYGR006W	708	1708	2708	3708	4708	5708	6708	7708
CaYJL122W	709	1709	2709	3709	4709	5709	6709	7709
CaORF6_3320	710	1710	2710	3710	4710	5710	6710	7710
CaORF6_7574	711	1711	2711	3711	4711	5711	6711	7711
CaORF6_6275	712	1712	2712	3712	4712	5712	6712	7712
CaORF6_1979	713	1713	2713	3713	4713	5713	6713	7713
CaORF6_8942	714	1714	2714	3714	4714	5714	6714	7714
CaYJL153C	715	1715	2715	3715	4715	5715	6715	7715
CaYNL277W	716	1716	2716	3716	4716	5716	6716	7716
CaYIL104C	717	1717	2717	3717	4717	5717	6717	7717
CaYOL027C	718	1718	2718	3718	4718	5718	6718	7718

10

20

30

40

CaYJL134W	719	1719	2719	3719	4719	5719	6719	7719
CaYLL012W	720	1720	2720	3720	4720	5720	6720	7720
CaORF6_7779	721	1721	2721	3721	4721	5721	6721	7721
CaORF6_3262	722	1722	2722	3722	4722	5722	6722	7722
CaORF6_7304	723	1723	2723	3723	4723	5723	6723	7723
CaORF6_2028	724	1724	2724	3724	4724	5724	6724	7724
CaORF6_1717	725	1725	2725	3725	4725	5725	6725	7725
CaORF6_1780	726	1726	2726	3726	4726	5726	6726	7726
CaORF6_1932	727	1727	2727	3727	4727	5727	6727	7727
CaORF6_1934	728	1728	2728	3728	4728	5728	6728	7728
CaORF6_2193	729	1729	2729	3729	4729	5729	6729	7729
CaORF6_2398	730	1730	2730	3730	4730	5730	6730	7730
orf6.3168	731	1731	2731	3731	4731	5731	6731	7731
orf6.3295	732	1732	2732	3732	4732	5732	6732	7732
orf6.3939	733	1733	2733	3733	4733	5733	6733	7733
orf6.4497	734	1734	2734	3734	4734	5734	6734	7734
orf6.4499	735	1735	2735	3735	4735	5735	6735	7735
orf6.4537	736	1736	2736	3736	4736	5736	6736	7736
orf6.4747	737	1737	2737	3737	4737	5737	6737	7737
orf6.4899	738	1738	2738	3738	4738	5738	6738	7738
orf6.4974	739	1739	2739	3739	4739	5739	6739	7739
orf6.5147	740	1740	2740	3740	4740	5740	6740	7740
orf6.5199	741	1741	2741	3741	4741	5741	6741	7741
orf6.5210	742	1742	2742	3742	4742	5742	6742	7742
orf6.5520	743	1743	2743	3743	4743	5743	6743	7743
orf6.569	744	1744	2744	3744	4744	5744	6744	7744
orf6.5739	745	1745	2745	3745	4745	5745	6745	7745
orf6.6011	746	1746	2746	3746	4746	5746	6746	7746
orf6.7375	747	1747	2747	3747	4747	5747	6747	7747
orf6.7629	748	1748	2748	3748	4748	5748	6748	7748
orf6.8025	749	1749	2749	3749	4749	5749	6749	7749
orf6.804	750	1750	2750	3750	4750	5750	6750	7750
orf6.8362	751	1751	2751	3751	4751	5751	6751	7751
orf6.8377	752	1752	2752	3752	4752	5752	6752	7752
orf6.8395	753	1753	2753	3753	4753	5753	6753	7753
orf6.8482	754	1754	2754	3754	4754	5754	6754	7754
orf6.8837	755	1755	2755	3755	4755	5755	6755	7755
orf6.889	756	1756	2756	3756	4756	5756	6756	7756

10

20

30

40

orf6.8938	757	1757	2757	3757	4757	5757	6757	7757
orf6.9113	758	1758	2758	3758	4758	5758	6758	7758
CaLYS4	759	1759	2759	3759	4759	5759	6759	7759
CaTRP5	760	1760	2760	3760	4760	5760	6760	7760
CaPRO1	761	1761	2761	3761	4761	5761	6761	7761
CaPBS2	762	1762	2762	3762	4762	5762	6762	7762
CaYBL041W	763	1763	2763	3763	4763	5763	6763	7763
CaYBR170C	764	1764	2764	3764	4764	5764	6764	7764
CaYDR188W	765	1765	2765	3765	4765	5765	6765	7765
CaYGR098C	766	1766	2766	3766	4766	5766	6766	7766
CaYGR267C	767	1767	2767	3767	4767	5767	6767	7767
CaYGR274C	768	1768	2768	3768	4768	5768	6768	7768
CaYJL002C	769	1769	2769	3769	4769	5769	6769	7769
CaYKL125W	770	1770	2770	3770	4770	5770	6770	7770
CaYLL035W	771	1771	2771	3771	4771	5771	6771	7771
CaYPL016W	772	1772	2772	3772	4772	5772	6772	7772
CaYPL218W	773	1773	2773	3773	4773	5773	6773	7773
CaYKL141W	774	1774	2774	3774	4774	5774	6774	7774
CaYHR174W	775	1775	2775	3775	4775	5775	6775	7775
CaYDR356W	776	1776	2776	3776	4776	5776	6776	7776
CaYNL124W	777	1777	2777	3777	4777	5777	6777	7777
CaYAL015C	778	1778	2778	3778	4778	5778	6778	7778
CaYBR001C	779	1779	2779	3779	4779	5779	6779	7779
CaYCL035C	780	1780	2780	3780	4780	5780	6780	7780
CaYCR048W	781	1781	2781	3781	4781	5781	6781	7781
CaYDR379W	782	1782	2782	3782	4782	5782	6782	7782
CaYER059W	783	1783	2783	3783	4783	5783	6783	7783
CaYGR070W	784	1784	2784	3784	4784	5784	6784	7784
CaYGR209C	785	1785	2785	3785	4785	5785	6785	7785
orf6.1498	786	1786	2786	3786	4786	5786	6786	7786
orf6.2086	787	1787	2787	3787	4787	5787	6787	7787
orf6.3026	788	1788	2788	3788	4788	5788	6788	7788
orf6.3261	789	1789	2789	3789	4789	5789	6789	7789
orf6.3819	790	1790	2790	3790	4790	5790	6790	7790
orf6.3864	791	1791	2791	3791	4791	5791	6791	7791
orf6.3972	792	1792	2792	3792	4792	5792	6792	7792
orf6.4005	793	1793	2793	3793	4793	5793	6793	7793
orf6.4010	794	1794	2794	3794	4794	5794	6794	7794

10

20

30

40

orf6.4114	795	1795	2795	3795	4795	5795	6795	7795
orf6.4153	796	1796	2796	3796	4796	5796	6796	7796
orf6.4206	797	1797	2797	3797	4797	5797	6797	7797
orf6.4293	798	1798	2798	3798	4798	5798	6798	7798
orf6.4463	799	1799	2799	3799	4799	5799	6799	7799
orf6.4555	800	1800	2800	3800	4800	5800	6800	7800
orf6.4628	801	1801	2801	3801	4801	5801	6801	7801
orf6.4837	802	1802	2802	3802	4802	5802	6802	7802
orf6.4854	803	1803	2803	3803	4803	5803	6803	7803
orf6.4923	804	1804	2804	3804	4804	5804	6804	7804
orf6.4927	805	1805	2805	3805	4805	5805	6805	7805
orf6.5092	806	1806	2806	3806	4806	5806	6806	7806
orf6.5279	807	1807	2807	3807	4807	5807	6807	7807
orf6.5786	808	1808	2808	3808	4808	5808	6808	7808
orf6.5919	809	1809	2809	3809	4809	5809	6809	7809
orf6.5920	810	1810	2810	3810	4810	5810	6810	7810
orf6.6022	811	1811	2811	3811	4811	5811	6811	7811
orf6.6026	812	1812	2812	3812	4812	5812	6812	7812
orf6.6030	813	1813	2813	3813	4813	5813	6813	7813
orf6.6069	814	1814	2814	3814	4814	5814	6814	7814
orf6.6140	815	1815	2815	3815	4815	5815	6815	7815
orf6.6218	816	1816	2816	3816	4816	5816	6816	7816
orf6.6390	817	1817	2817	3817	4817	5817	6817	7817
orf6.6550	818	1818	2818	3818	4818	5818	6818	7818
orf6.6562	819	1819	2819	3819	4819	5819	6819	7819
orf6.6660	820	1820	2820	3820	4820	5820	6820	7820
orf6.6664	821	1821	2821	3821	4821	5821	6821	7821
orf6.6670	822	1822	2822	3822	4822	5822	6822	7822
orf6.6700	823	1823	2823	3823	4823	5823	6823	7823
orf6.6933	824	1824	2824	3824	4824	5824	6824	7824
orf6.6939	825	1825	2825	3825	4825	5825	6825	7825
orf6.7203	826	1826	2826	3826	4826	5826	6826	7826
orf6.7214	827	1827	2827	3827	4827	5827	6827	7827
orf6.7847	828	1828	2828	3828	4828	5828	6828	7828
orf6.7893	829	1829	2829	3829	4829	5829	6829	7829
orf6.8239	830	1830	2830	3830	4830	5830	6830	7830
orf6.8461	831	1831	2831	3831	4831	5831	6831	7831
orf6.8607	832	1832	2832	3832	4832	5832	6832	7832

10

20

30

40

orf6.8654	833	1833	2833	3833	4833	5833	6833	7833
orf6.8716	834	1834	2834	3834	4834	5834	6834	7834
CaYPR198W	835	1835	2835	3835	4835	5835	6835	7835
orf6.1031	836	1836	2836	3836	4836	5836	6836	7836
orf6.1035	837	1837	2837	3837	4837	5837	6837	7837
orf6.1302	838	1838	2838	3838	4838	5838	6838	7838
orf6.1752	839	1839	2839	3839	4839	5839	6839	7839
orf6.2119	840	1840	2840	3840	4840	5840	6840	7840
orf6.2277	841	1841	2841	3841	4841	5841	6841	7841
orf6.2355	842	1842	2842	3842	4842	5842	6842	7842
orf6.2417	843	1843	2843	3843	4843	5843	6843	7843
orf6.2463	844	1844	2844	3844	4844	5844	6844	7844
orf6.2715	845	1845	2845	3845	4845	5845	6845	7845
orf6.2865	846	1846	2846	3846	4846	5846	6846	7846
orf6.3078	847	1847	2847	3847	4847	5847	6847	7847
orf6.3170	848	1848	2848	3848	4848	5848	6848	7848
orf6.3203	849	1849	2849	3849	4849	5849	6849	7849
orf6.3517	850	1850	2850	3850	4850	5850	6850	7850
orf6.3623	851	1851	2851	3851	4851	5851	6851	7851
orf6.3676	852	1852	2852	3852	4852	5852	6852	7852
orf6.3804	853	1853	2853	3853	4853	5853	6853	7853
orf6.4003	854	1854	2854	3854	4854	5854	6854	7854
orf6.4037	855	1855	2855	3855	4855	5855	6855	7855
orf6.4386	856	1856	2856	3856	4856	5856	6856	7856
orf6.4898	857	1857	2857	3857	4857	5857	6857	7857
orf6.5286	858	1858	2858	3858	4858	5858	6858	7858
orf6.5335	859	1859	2859	3859	4859	5859	6859	7859
orf6.5517	860	1860	2860	3860	4860	5860	6860	7860
orf6.5752	861	1861	2861	3861	4861	5861	6861	7861
orf6.7453	862	1862	2862	3862	4862	5862	6862	7862
orf6.7500	863	1863	2863	3863	4863	5863	6863	7863
orf6.7621	864	1864	2864	3864	4864	5864	6864	7864
orf6.7699	865	1865	2865	3865	4865	5865	6865	7865
orf6.7983	866	1866	2866	3866	4866	5866	6866	7866
orf6.8076	867	1867	2867	3867	4867	5867	6867	7867
orf6.8143	868	1868	2868	3868	4868	5868	6868	7868
orf6.8690	869	1869	2869	3869	4869	5869	6869	7869
orf6.9105	870	1870	2870	3870	4870	5870	6870	7870
orf6.1740	871	1871	2871	3871	4871	5871	6871	7871

10

20

30

40

orf6.2265	872	1872	2872	3872	4872	5872	6872	7872
orf6.2307	873	1873	2873	3873	4873	5873	6873	7873
orf6.2584	874	1874	2874	3874	4874	5874	6874	7874
orf6.2709	875	1875	2875	3875	4875	5875	6875	7875
orf6.2898	876	1876	2876	3876	4876	5876	6876	7876
orf6.3102	877	1877	2877	3877	4877	5877	6877	7877
orf6.3507	878	1878	2878	3878	4878	5878	6878	7878
orf6.3754	879	1879	2879	3879	4879	5879	6879	7879
orf6.3955	880	1880	2880	3880	4880	5880	6880	7880
orf6.4050	881	1881	2881	3881	4881	5881	6881	7881
orf6.4735	882	1882	2882	3882	4882	5882	6882	7882
orf6.4748	883	1883	2883	3883	4883	5883	6883	7883
orf6.4766	884	1884	2884	3884	4884	5884	6884	7884
orf6.5263	885	1885	2885	3885	4885	5885	6885	7885
orf6.5701	886	1886	2886	3886	4886	5886	6886	7886
orf6.5918	887	1887	2887	3887	4887	5887	6887	7887
orf6.6139	888	1888	2888	3888	4888	5888	6888	7888
orf6.6214	889	1889	2889	3889	4889	5889	6889	7889
orf6.6250	890	1890	2890	3890	4890	5890	6890	7890
orf6.6255	891	1891	2891	3891	4891	5891	6891	7891
orf6.6561	892	1892	2892	3892	4892	5892	6892	7892
orf6.6665	893	1893	2893	3893	4893	5893	6893	7893
orf6.6753	894	1894	2894	3894	4894	5894	6894	7894
orf6.6768	895	1895	2895	3895	4895	5895	6895	7895
orf6.6808	896	1896	2896	3896	4896	5896	6896	7896
orf6.6921	897	1897	2897	3897	4897	5897	6897	7897
orf6.6972	898	1898	2898	3898	4898	5898	6898	7898
orf6.6993	899	1899	2899	3899	4899	5899	6899	7899
orf6.6997	900	1900	2900	3900	4900	5900	6900	7900
orf6.7164	901	1901	2901	3901	4901	5901	6901	7901
orf6.7180	902	1902	2902	3902	4902	5902	6902	7902
orf6.7314	903	1903	2903	3903	4903	5903	6903	7903
orf6.7478	904	1904	2904	3904	4904	5904	6904	7904
orf6.7883	905	1905	2905	3905	4905	5905	6905	7905
orf6.7923	906	1906	2906	3906	4906	5906	6906	7906
orf6.8232	907	1907	2907	3907	4907	5907	6907	7907
orf6.8441	908	1908	2908	3908	4908	5908	6908	7908
orf6.8465	909	1909	2909	3909	4909	5909	6909	7909
orf6.8543	910	1910	2910	3910	4910	5910	6910	7910

10

20

30

40

orf6.8747	911	1911	2911	3911	4911	5911	6911	7911
orf6.8766	912	1912	2912	3912	4912	5912	6912	7912
orf6.8967	913	1913	2913	3913	4913	5913	6913	7913
orf6.848	914	1914	2914	3914	4914	5914	6914	7914
orf6.893	915	1915	2915	3915	4915	5915	6915	7915
orf6.1000	916	1916	2916	3916	4916	5916	6916	7916
orf6.1364	917	1917	2917	3917	4917	5917	6917	7917
orf6.2113	918	1918	2918	3918	4918	5918	6918	7918
orf6.2481	919	1919	2919	3919	4919	5919	6919	7919
orf6.2565	920	1920	2920	3920	4920	5920	6920	7920
orf6.3020	921	1921	2921	3921	4921	5921	6921	7921
orf6.3597	922	1922	2922	3922	4922	5922	6922	7922
orf6.6093	923	1923	2923	3923	4923	5923	6923	7923
orf6.6260	924	1924	2924	3924	4924	5924	6924	7924
orf6.6934	925	1925	2925	3925	4925	5925	6925	7925
orf6.6946	926	1926	2926	3926	4926	5926	6926	7926
orf6.2546	927	1927	2927	3927	4927	5927	6927	7927
orf6.4262	928	1928	2928	3928	4928	5928	6928	7928
orf6.4676	929	1929	2929	3929	4929	5929	6929	7929
orf6.5777	930	1930	2930	3930	4930	5930	6930	7930
orf6.7959	931	1931	2931	3931	4931	5931	6931	7931
orf6.8887	932	1932	2932	3932	4932	5932	6932	7932

10

20

30

40

50

【0110】

1実施形態において、本発明は、932個の必須遺伝子の同定を提供する。多くのこれらの遺伝子のヌクレオチド配列およびリーディングフレームは公知であるが、これらの遺伝子がカンジダ・アルビカンスの成長および/または生存に必須であるという事実は、本発明者等が発見するまで知られていなかった。したがって、これらの遺伝子およびこれらの遺伝子産物の使用は、本発明に包含される。また、表IIには、本明細書中において同定された各必須遺伝子のオープンリーディングフレーム、推定アミノ酸配列、および関連オリゴヌクレオチド配列を同定するために使用される配列番号も記載されている。各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関連オリゴヌクレオチド配列との対比を容易にするために、配列識別子(sequence identifier)を配列番号1000個ごとの8ブロックに体系づけた。8ブロックの配列番号(配列の種類に対応)は、配列番号を有する932個の配列と、プレースホルダー(place holder)として機能する配列を有しない166個の配列番号を有する。したがって、必須遺伝子の関連する8つの配列のそれぞれは1000ごとに区切られている。例えば、配列番号1、1001、2001、3001、4001、5001、6001、および7001はそれぞれ、ロックアウト(K0)プライマー上流および下流、tetプロモーター上流および下流、プライマーAおよびB自体、コード領域のヌクレオチド配列および必須遺伝子のアミノ酸配列を表す。この例では必須遺伝子はCaYDL105Wである。

【0111】

上記番号付けスキームにしたがって、配列番号6001~配列番号6932はそれぞれ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同定する。配列番号1~62として示されるヌクレオチド配列は、カンジダ・アルビカンス配列決定ブ

プロジェクトによってアセンブルされたカンジダ・アルビカンスゲノム配列データベースのバージョン6から得た(インターネットでスタンフォード大学およびミネソタ大学のウェブサイトにアクセス可能である; <http://www-sequence.stanford.edu:8080>および<http://alces.med.umn.edu/Candida.html>を参照)。

【0112】

同定された必須遺伝子の推定アミノ酸配列が配列番号7001~7932に記載されており、これらは、リーディングフレームを決定した配列番号6001~6932のヌクレオチド配列の概念的翻訳によって得られる。当分野において周知であるように、コドンCTGは、他の生物においては通常ロイシンに翻訳されるが、*C.アルビカンス*ではセリン残基に翻訳される。したがってORFの概念的翻訳は、*C.アルビカンス*のコドン使用頻度を用いて行われる。

10

【0113】

このDNA配列は、配列決定反応によって作製されたものであり、誤って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得るマイナーエラーを含み得る。しかし、このようなマイナーエラーが仮に配列データベース中に存在したとしても、本発明の必須遺伝子としてのORFの同定を妨げるものではない。ORFの配列は、本発明で提供され、*C. albicans*ゲノム中の対応する遺伝子を一義的に同定するために個別に使用することができることから、ORFに対応する遺伝子のクローンをいくつかの当技術分野において公知の方法のいずれかにより容易に単離することができる。次いで、配列決定を繰り返すことにより、配列を確認し、エラーを修正することができる。ORFまたはその一部を明らかにすることにより、対象のコード配列を一義的に同定し、そして、完全長cDNAまたはゲノム配列を得るための十分な指針を提供することにより、完全な遺伝子が実質的に提供される。本発明の方法によって同定されたORFに対応する必須遺伝子の利用は、ORFのマイナーなエラーの影響は受けない。

20

【0114】

例えば、スプライシング時における配列のマイナーなエラーおよび変動は、本発明で提供される配列に基づく条件付発現*C. albicans*突然変異株またはGRACE株の構築には影響を及ぼさない。なぜならば、これらの方法は、染色体DNA配列と、プライマーまたは組み換えDNA中の遺伝子との間の、絶対的な配列同一性を必要としないからである。いくつかの場合では、*C. albicans*遺伝子の正確なリーディングフレームは、既知のサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の配列とその全体のアミノ酸配列を比較することによって同定することができる。したがって、本発明は、本発明によって同定されたORFに対応する*C. albicans*遺伝子、本発明によって同定されたORFに対応する*C. albicans*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に対応する遺伝子に由来するポリヌクレオチドおよびポリペプチドの様々な用途を包含する。特定のヌクレオチド配列と遺伝子との間の関係について本明細書中において言及する場合、「一致」または「一致している」という用語は、特定の配列がその遺伝子と有効に同一であることを指す。通常、一致とは、配列決定時におけるマイナーなエラー、対立遺伝子のバリエーションおよび/またはスプライシング時におけるバリエーションがない場合の実質的な配列同一性である。一致は、遺伝子配列と、その遺伝子から転写されるmRNAまたはその一部との間の転写的関係であり得る。この一致は、ポリペプチドに翻訳されないmRNAの部分と遺伝子のDNA配列との間でも存在する。

30

40

【0115】

配列番号1~5932は、対応する同定必須遺伝子のためのGRACE株を構築するために設計および使用されたオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを指す。すなわち、配列番号1~932は、ノックアウト上流プライマー(KO-UP);配列番号1001~1932はノックアウト下流プライマー(KO-Down);配列番号2001~2932はテトラサイクリンプロモーター上流プライマー(Tet-Up);配列番号3001~3932はテトラサイクリンプロモーター下流プライマー(Tet-Down);および配列番号4001~4932と5001~5932は、それぞれのGRACE株を同定するためのプライマー(それぞれプライマーAおよびプライマーB)である。したがって、オリゴヌクレオチドの各セットを用いて、ユニークな必須遺伝子およびユニークなGR

50

ACE株を、例えばハイブリダイゼーションやPCRによって同定することができる。

【0116】

表IIに記載された必須遺伝子は、当業者に周知のクローニング法を用いて得ることができ、そのような手法としては適当なcDNAまたはgDNA(ゲノムDNA)ライブラリーの中の遺伝子を検出するための適当なプローブの使用があるがこれに限定されない。例えばSambrookら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories(本明細書中に参照として全て組み込まれる)を参照されたい。本明細書中で同定された配列のためのプローブは、本明細書中に配列番号6001~6932として開示されたDNA配列に基づいて合成することができる。

【0117】

本明細書中で使用される「標的遺伝子」(すなわち必須および/または毒性遺伝子)とは、(a)配列番号6001~配列番号6932に記載されたDNA配列および/またはその断片の少なくとも1つを含む遺伝子、(b)ユニバーサルな遺伝コードまたはC.アルピカンスのコードン使用頻度を用いて配列番号7001~配列番号7932に記載されたアミノ酸配列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、高ストリンジェント条件下、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(例えばAusubel, F.M.ら編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc.およびJohn Wiley & Sons, Inc., New York, pp.6.3.1-6.3.6および2.10.3を参照されたい)下において、配列番号6001~配列番号6932に記載されたヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズする任意のDNA配列。ここで該ストリンジェントな条件とは、例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)中で約45にてハイブリダイズさせた後、約50~65で0.2×SSC/0.1% SDS中で1回以上洗浄する条件であり、また該高ストリンジェント条件とは、例えばフィルターに結合させた核酸に6×SSC中で約45にてハイブリダイズさせた後、約68で0.1×SSC/0.2% SDS中で1回以上洗浄する条件である。好ましくは、本明細書中に開示されるDNA配列の相補配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドは、遺伝子産物(例えば標的遺伝子によりコードされる遺伝子産物と機能的に同等な遺伝子産物など)をコードする。

【0118】

先に記載したように、標的遺伝子配列は、C.アルピカンスにおいて配列番号7001~7932のアミノ酸配列のうちの1つを含んでなるまたはからなるポリペプチドをコードする縮重ヌクレオチド配列だけでなく、C.アルピカンス以外の生物において翻訳されたときに配列番号7001~7932のアミノ酸配列のうちの1つを含んでなるまたは本質的に構成されるアミノ酸またはその断片を生成するであろう縮重ヌクレオチド配列も含む。当業者であれば、適当なコードンをどのように選択すべきか、またはC.アルピカンスまたは他の生物において標的遺伝子配列を用いたときに配列番号6001~6932のヌクレオチド配列をどのように改変すべきかが分かるであろう。さらに、「標的遺伝子」という用語は、特定の実施形態において、サッカロミセス・セレビシエまたはその変異体において天然に生じる遺伝子であって、配列番号6001~配列番号6932に記載されたDNA配列のうちの1つを有するC.アルピカンス遺伝子と非常に高いヌクレオチド配列相同性を有する遺伝子、すなわちS.セレビシエにおけるオーソログを包含する。C.アルピカンス遺伝子に適用することができる薬物スクリーニング法は、非病原性S.セレビシエにおいて同じ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。しかしながら、特定の実施形態においては、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の遺伝子以外の標的遺伝子を使用する。

【0119】

他の実施形態において、本発明は、以下のポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドを発現する宿主細胞、およびこのようなヌクレオチドの発現産物も包含する：(a)その機能的ドメインに対応する標的遺伝子産物の一部をコードするポリヌクレオチド、およびこ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であって、受容体型遺伝子産物の場合は、このようなドメインはシグナル配列、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)を含むがこれらに限定されない；(

10

20

30

40

50

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であって、そのドメインのうちの一つの全体または一部が欠失もしくは変更され、また受容体型遺伝子産物の場合は、このような突然変異体は、シグナル配列が切断された成熟タンパク質、TMの全てまたは一部が欠失した可溶性受容体、およびCDの全てまたは一部が欠失した非機能的受容体を含むがこれらに限定されない；ならびに(d)他のポリペプチドに融合されたそのドメインのうちの一つまたは標的遺伝子産物を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0120】

また本発明は、標的遺伝子配列のDNA配列にハイブリダイズし、したがって該DNA配列の相補配列である、ポリヌクレオチド(好ましくはDNA分子)も含む。このようなハイブリダイゼーション条件は、上記に記載した当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、またやや高いストリンジェント条件であってもよい。上記記載のDNA配列にハイブリダイズする本発明の核酸分子は、ストリンジェントもしくは高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」)を含む。一般に、14~70ヌクレオチド長のオリゴの場合、融解温度(T_m)は以下の式を用いて算出される：

$$T_m() = 81.5 + 16.6 (\log [\text{一価カチオン (モル)}] + 0.41 (\% G+C) - (500/N)$$

式中、Nはプローブの長さである。ハイブリダイゼーションがホルムアミドを含む溶液中で行われる場合、融解温度は以下の等式を用いて算出される：

$$T_m() = 81.5 + 16.6 (\log [\text{一価カチオン (モル)}]) + 0.41 (\% G+C) - (0.61) (\% \text{ホルムアミド}) + (500/N)$$

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ハイブリッドでは) T_m より約20~25 低い温度、または(RNA-DNAハイブリッドでは) T_m 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は、例えば(14塩基オリゴでは)37、(17塩基オリゴでは)48、(20塩基オリゴでは)55、および(23塩基オリゴでは)60 での6×SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウムでの洗浄を指す。このようなオリゴの例は、配列番号4001~4932および5001~5932に記載されている。

【0121】

これらの核酸分子は、例えば標的遺伝子の調節において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またはこれらをコードすることができる。さらに、このような配列は、リボザイムおよび/または3重らせん配列の一部として使用することができ、また、標的遺伝子調節にも有用である。またさらに、このような分子は、病原体の存在を検出することができる診断方法の成分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に詳細に記載する。

【0122】

本発明の標的遺伝子の断片は少なくとも10ヌクレオチド長であってもよい。他の実施形態において、該断片は、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するヌクレオチド長であってもよい。あるいは、該断片は、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同一性であるまたはこれ以上の連続するアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を含むものであってもよい。また本発明の標的遺伝子の断片は、上記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)等の機能的ドメインをコードする核酸分子のようなコード領域の一部も指す。

【0123】

本発明の必須遺伝子を同定・特性決定するために、コンピュータアルゴリズムを用いてコンピュータデータベース検索および比較分析を行い、分析結果はコンピュータ中に保存するかコンピュータで表示する。配列情報を分析するためのこのようなコンピュータ化されている装置は、同種または異種の他の遺伝子および遺伝子産物に関して、遺

10

20

30

40

50

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利であり、また、新規遺伝子およびそれら遺伝子産物の推定される機能を提供することができる。コードされるヌクレオチド配列およびアミノ酸配列などの生物学的情報は、コンピューターのデータストリーム(data stream)として表される。本明細書中で使用する場合、「コンピューター」という用語は、限定するものではないが、パーソナルコンピューター、データ端末、コンピューターワークステーション、ネットワーク、コンピューターデータ保存検索システム、ならびに配列情報および分析結果を表すためのグラフィックディスプレイが含まれる。通常、コンピューターは、データ入力手段、表示手段、プログラム可能プロセッシングユニット、およびデータ保存手段を含んでなる。「コンピューター読取り可能媒体」を用いて配列のデータ、リストおよびデータベースを保存することができ、例えば、限定するものではないが、コンピューターメモリ、磁気保存装置(例えば、フロッピーディスクおよび磁気テープ)、光学-磁気保存装置、光学保存装置(例えばコンパクトディスク)等を挙げることができる。したがって、本発明は、配列番号1~932、1001~1932、2001~2932、3001~3932、4001~4932、5001~5932、および6001~6932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7001~7932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ーまたはコンピューター読取可能媒体も包含する。好ましい実施形態において、配列は、該配列に関連するその他の注釈および生物学的情報とリンクする形態に加工(curated)・保存される。本発明の目的は、本発明のヌクレオチド配列を使用して、配列相同性検索、配列アラインメント、構造予想またはモデル構築を行うための指令がプログラムされた1種以上のコンピューターを提供することでもある。この場合、該ヌクレオチド配列には、好ましくは配列番号1~932、1001~1932、2001~2932、3001~3932、4001~4932、5001~5932、および6001~6932からなる群より選択される1以上のヌクレオチド配列、ならびに/または配列番号7001~7932からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列が含まれる。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含み、かつ、それらを送信・分配することができるコンピューターも本発明において意図するものである。さらに、本発明は、公的・民間の配列データベース中で類似する配列を同定するためにコンピューターを利用した方法において、既知の機能を有する他の遺伝子産物との構造的類似性に基づいて遺伝子産物の推定される機能特性をコンピューターを利用して提供する方法において、ならびに、遺伝子産物モデルをコンピューターを利用して構築する方法において、配列番号1~932、1001~1932、2001~2932、3001~3932、4001~4932、5001~5932、および6001~6932からなる群より選択される1以上のヌクレオチド配列、ならびに/または配列番号7001~7932からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列を利用することを包含する。ある特定の実施形態において、本発明は、真菌の推定必須遺伝子を同定するためのコンピューターを利用した方法であって、真菌のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と、配列番号1~932、1001~1932、2001~2932、3001~3932、4001~4932、5001~5932、および6001~6932からなる群より選択される1以上のヌクレオチド配列または配列番号7001~7932からなる群より選択される1以上のアミノ酸配列との配列相同性を検出することを含んでなる、前記方法も包含する。

【0124】

5.4.2 相同標的遺伝子

上記のカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)のヌクレオチド配列に加え、他の種に存在し得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技術により同定し単離し、さらに過度の実験を行うことなく本発明の方法を使用することができる。例えば、アスペルギルス・フミガツス(*Aspergillus fumigatus*)、黄色コウジ菌(*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*)、ヒストプラズマ・カプスラータム(*Histoplasma capsulatum*)、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*)、プッチニア・セコンジリ(*Puccinia secondilii*)、ニューモシスチス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、または上記種のいずれかの属に含まれるいずれかの種の相同標的遺伝子が

ある。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*)、小孢子菌属 (*Microsporum*)、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*)、クリプトコックス属 (*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*)、クラエケラ属 (*Klaeckera*)、クリユイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、リボミセス属 (*Lipomyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、ロドスポリジウム属 (*Rhodospiridium*)、ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)およびヤロピア属 (*Yarrowia*)その他の酵母も含まれる。また、これらの標的遺伝子配列の相同体としては、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*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*)、クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigelii*)、リゾプス・アルヒズムス (*Rhizopus arrhizums*)、ムコール・ルキシ (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*)、もしくはアブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*)などの動物病原菌、またはアルテナリア・ソラニ (*Alternaria solani*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病 (*Puccinia recondita*)、菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria tritici*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*)、黒星病菌 (*Venturia inaequalis*)、半身萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*)、もしくは上記種のいずれかの属に含まれるいずれかの種などの植物病原菌から同定、単離されたものも挙げることができる。

10

20

30

【0125】

したがって、本発明は、標的遺伝子のポリヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0126】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号6001~6932からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも50%同一であるヌクレオチド配列であって、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) および/またはカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の種由来のものであるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸を包含する。別の実施形態において、本発明は、配列番号6001~6932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の核酸と、中程度に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であって、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) および/またはカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の種由来のものであるヌクレオチド配列、を含んでなる単離された核酸を包含する。特定の実施形態において、配列番号6001~6932のうちのいずれか1つの配列と少なくとも50%同一であるかまたは中程度に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はアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) またはクリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) 由来である。別の特定の実施形態において、配列番号6001~6932のうちのいずれか1つの配列と少なくとも50%同一であるかまたは中程度に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はアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) および/またはクリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) 以外の種に由来する。

40

50

【0127】

さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号7001～7932からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、該ポリペプチドがサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) および/またはカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の種由来のものである該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸を包含する。特定の実施形態において、配列番号7001～7932のうちのいずれか1つの配列と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列はアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) またはクリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) 由来である。

【0128】

別の特定の実施形態において、配列番号7001～7932のうちのいずれか1つの配列と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列はアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) および/またはクリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) 以外の種に由来する。

【0129】

*S. cerevisiae*の必須/病原性遺伝子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が公開されているが、薬物スクリーニングにおけるかかる *S. cerevisiae*の必須/病原性遺伝子相同体またはオーソログの使用についてはほとんど知られておらず、したがって本発明により特にそれらを提供する。かかる *S. cerevisiae*の必須/病原性遺伝子相同体またはオーソログのヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列を使用するために、データベース(例えば、Stanford Genomic Resources (www-genome.stanford.edu), Munich Information Centre for Protein Sequences (www.mips.biochem.mpg.de), またはProteome (www.proteome.com))を使用して配列の同定・検索を行なうことができる。*S. cerevisiae*のオーソログは、配列番号6001～6932のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列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って同定することもできる。

【0130】

本発明のヌクレオチド配列は、配列番号6001～6932で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%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をさらに含む。さらに、本発明のヌクレオチド配列は、配列番号7001～7932で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%以上のアミノ酸配列同一性または相同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含む。

【0131】

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のパーセンテージを決定するために、その配列を最適に比較できるようにアラインさせる(例えば、第2のアミノ酸またはヌクレオチド配列と最適な状態にアラインするために第1のアミノ酸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あるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置に第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが存在するならば、その分子はその位置において同一である。2つの配列間の同一性%は配列を共有している同一位置数の関数である(すなわち、同一性%=同一オーバーラッピング位置数/全位置数×100%)。ある実施形態では、2つの配列が同じ長さである。

【0132】

2つの配列間の同一性%の決定は数学的アルゴリズムによっても達成することができる。2つの配列の比較に使用する数学的アルゴリズムの好ましい例は、限定されるものではないが、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873-5877の場合のように改変したKarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 2264-2268のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、Altschulら, 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

10

20

30

40

50

ヌクレオチドプログラムパラメータ設定、例えばスコア=100、ワード長=12によりBLASTヌクレオチド検索を行い、本発明の核酸分子と相同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設定、例えばスコア=50、ワード長=3によりBLASTタンパク質検索を行い、本発明のタンパク質分子と相同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入れたアラインメントを得るために、Altschulら, 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。また、PSI-BLASTを使用して分子(遺伝基質)間の遠類関係を調べる繰り返し検索を行うこともできる。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI-BLASTプログラムを利用する場合には、各プログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを使用することができる(例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。配列比較に使用する数学的アルゴリズムの別の好ましい例は、限定されるものではないが、MyersおよびMiller, (1988) CABIOS 4: 11-17のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、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。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを使用する場合には、PAM120 weight residue table、ギャップ長ペナルティ 12およびギャップペナルティ 4を使用できる。これらのアルゴリズムのいずれもが、本発明の配列を含んでなるコンピューターにおいて使用するための一組の指令としてコード化することができる。

10

【0133】

相同標的遺伝子を単離するために、上記の*C. albicans*標的遺伝子配列を標識、使用して、対象とする生物体から得られたmRNAから構築したcDNAライブラリーをスクリーニングすることができる。標識配列の起源である生物種とは異なる生物体からcDNAライブラリーを誘導する場合にはハイブリダイゼーション条件を低ストリンジェンシーなものにすべきである。cDNAスクリーニングにより同種または異種のいずれかのスプライシングし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。また、標識断片をさらに好適なストリンジェント条件で用いて、対象とする生物体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ができる。低ストリンジェント条件について当業者は周知であるが、ライブラリーおよび標識配列の起源である生物種によって異なると考えられる。かかる条件に関する指針については、例えばSambrookら, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; およびAusubelら, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.)を参照。

20

30

【0134】

さらに、対象とする標的遺伝子にある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鎖反応(PCR)を行うことで相同標的遺伝子配列を単離することができる。この反応の鑄型は、対象とする生物体から調製した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、配列決定して、増幅された配列が相同標的遺伝子配列の配列を示していることを確認することができる。

【0135】

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。また、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。

40

【0136】

PCRテクノロジーは全長cDNA配列の単離にも利用することができる。例えば、標準的な手法にしたがって、対象とする生物体からRNAを単離することができる。第1鎖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。次いで、標準末端トランスフェラーゼ反応を用いてRNA/DNAハイブリッドにグアニンを「末端に連結(tail)」し、ハイブリッドをRNAアーゼHで消化し、さらにその後、ポリ-Cプライマーによって第2鎖合成を開始する。このようにして、増幅断片上流にある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戦略の

50

概要については、例えばSambrookら, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; およびAusubelら, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.)を参照。

【 0 1 3 7 】

さらに、対象とする生物から単離されたDNAまたは合成されたcDNAを用いて発現ライブラリー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作製された遺伝子産物を発現させ、以下に記載する*C. albicans*遺伝子産物に対して誘起される抗体に関連する標準的抗体スクリーニング技術により、スクリーニングすることができる。(スクリーニング技術に関しては、例えばHarlow, E.およびLane, eds., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harborを参照。)かかる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を行うことができる。

10

【 0 1 3 8 】

また、増殖、毒性または病原性に関係する標的遺伝子またはポリペプチドと所望のレベルの相同性を有する配列を同定するためのデータベースを検索することで相同標的遺伝子またはポリペプチドを同定してもよい。当業者ならば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と少なくとも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。別の実施形態では、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係するポリペプチドまたはその一部と少なくとも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。

20

【 0 1 3 9 】

また、機能的に同種である標的配列またはポリペプチドを、遺伝子機能を排除または改変した表現型を有する突然変異体を作り出すことで同定してもよい。例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) およびアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) などの所与の真菌種の1個または全ての遺伝子に対してこれを行うことができる。ある真菌種の遺伝子に変異があることにより、機能的相補性検定により、他の種の機能的類似遺伝子(オーソログ)または関連遺伝子(パラログ)の同定方法が提供される。

30

【 0 1 4 0 】

所与の種、例えばカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 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コピーを作製し、そのライブラリーをベクターへクローニングすることで、第2の種、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) でその遺伝子を発現(例えば、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) プロモーターまたはサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) プロモーターによって)させることができる。かかるライブラリーを「異種ライブラリー」という。カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 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所定のサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 変異体へ形質転換し、さらに変異性欠陥の全体または一部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を「異種機能的補完」といい、この例ではサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の変異遺伝子と機能的に関連のあるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) の遺伝子の同定がなされる。この機能的補完法では本来、核酸またはポリペプチドの配列類似性がなくとも遺伝子機能を修復することが可能である; すなわち、この方法によれば、配列類似性比較によってかかる保存を現すまたは示すことができない場合であっても、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可能である。

40

50

【0141】

調べようとする遺伝子が必須遺伝子である場合には、異種機能的補完検定の実施に関して数多くの可能性が存在する。必須遺伝子の変異は、限定されるものではないが、温度感受性対立遺伝子、調節可能なプロモーターから条件のより発現される対立遺伝子、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にする対立遺伝子などの条件対立遺伝子であってよい。また、必須遺伝子に変異を有する鎖を天然型遺伝子のコピー(同一種由来の変異遺伝子の野生型コピー)を用いて選択マーカを含むベクターで増殖させることで、ベクターおよびそこに含まれる野生型対立遺伝子のコピーをほとんどまたは全く有していない鎖の選択が可能になる。このように構築された鎖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変異を機能的に補完し得るクローンを、野生型遺伝子を有するプラスミドの維持を許容しない培地で選択する。

10

【0142】

以下の例では、機能的相補性によるサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 遺伝子のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 相同体、KRE9の同定について説明する。(Lussierら 1998, "The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall -1,6-glucan 合成 and is essential for growth on glucose," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9825-30)。宿主株は重度の増殖欠陥表現型を有する KRE9 のサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) ハプロイドヌル変異体、kre9::HIS3 であった。宿主株は LYS-2 に基づく pRS317 シャトルベクター上に天然のサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) KRE9 遺伝子の野生型コピーを有しており、それをカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) ゲノムライブラリーで形質転換した。選択マーカとして URA3 遺伝子を有する、多重コピープラスミド YEp352 をベクターとして使用してこの異種ライブラリーを構築した。kre9::HIS3 変異宿主の増殖を助けるプラスミドをスクリーニングするために、ヒスチジン、リジンおよびウラシルの不在下で増殖可能な約 20,000 コロニーを窒素源として -アミノアジパートを含有する最少培地に複製播種し、LYS-2 プラスミドに基づく KRE9 のコピーはないが、機能的に補完するカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) オーソログ、CaKRE9 のコピーを有する細胞の選択を可能とした。これらの細胞をさらにリジン不在下での増殖能力のないことにより pRS317-KRE9 プラスミドが存在しないことについても調べ、YEp352 に基づくカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) ゲノム DNA をそれらから回収した。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) kre9::HIS3 変異体の再形質転換では、増殖を部分的に修復できるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) の特定の 8kb ゲノムインサートを回収した。選択に関する機能的補完性を利用したさらなるサブクローニングにより、機能的カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) KRE9 遺伝子を含有する 1.6kb DNA 断片を得た。

20

30

【0143】

異種機能的補完性試験はカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) とサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) との間の遺伝情報の交換に制限されるものではない; 上記の真菌種のいずれかの対を用いて機能的補完性検定を行うことができる。例えば、菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) の CRE1 遺伝子は *Aspergillus nidulans* の CREA 遺伝子の creAD30 変異体を機能的に補完することができる (Vautardら 1999, "The glucose repressor gene CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*), " FEBS Lett. 453: 54-58 参照)。

40

【0144】

さらに別の実施形態では、遺伝子発現アレイに置かれた核酸とアレイとハイブリダイズす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、その組合せによっては2種類の相同遺伝子の迅速な同定が可能である。

【0145】

さらに別の実施形態では、本発明は(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)のいずれかを含んでなるヌクレオチド配列を含有する DN

50

Aベクター；(b)コード配列の発現を指示する制御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；および(c)宿主細胞でコード配列の発現を指示する制御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した宿主細胞もまた包含する。他の種(*S. 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した宿主細胞もまた意図するものである。また、他の種の相同標的遺伝子の変異対立遺伝子を含有する遺伝子操作した宿主細胞も意図するものである。本明細書で使用する制御エレメントとしては、限定されるものではないが、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制御する当業者に公知なその他のエレメントが挙げられる。かかる制御エレメントとしては、限定されるものではないが、*lac*系、*trp*系、*tet*系およびその他の抗生物質に基づく抑制系(例えば、*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領域、*fd*コートタンパク質の制御領域および3-ホスホグリセリン酸キナーゼの真菌類プロモーター、酸ホスファターゼ、酵母接合フェロモン反応性プロモーター(例えば、*STE2*および*STE3*)および炭水化物代謝に関係する遺伝子から単離したプロモーター(例えば、*GAL*プロモーター)、リン酸反応性プロモーター(例えば、*PH05*)、またはアミノ酸代謝(例えば、*MET*遺伝子)が挙げられる。本発明は本明細書で開示したDNAベクター配列のいずれもの断片を包含する。

10

【0146】

種々の技術を利用して同定された必須遺伝子および毒性遺伝子をさらに特性解析することができる。第1に、同定された遺伝子のヌクレオチド配列を用いて、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ができる1以上の公知な配列モチーフとの相同性を示すことができる。当技術分野で周知のコンピュータプログラムを使用して、かかる関係を確認することができる。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技術により、その遺伝子を別の生物体、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)に関して構築した同様のマップと相関させ得る染色体マップおよび遺伝子マップに配置することができる。かかる特性解析によって得られた情報よりカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)およびその他の病原体に対する薬物を発見するためのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いる好適な方法を示すことができる。

20

30

【0147】

上記の使用を行うための方法については当業者には周知である。かかる方法を開示する参考文献としては、限定されるものではないが、“*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,” 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. FritschおよびT. Maniatis eds., 1989, および“*Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*,” Academic Press, Berger, S. L.およびA. R. Kimmel eds., 1987が挙げられる。同定された必須遺伝子のポリヌクレオチドおよびポリペプチドのいくつかの使用については以下で詳細に記載する。

【0148】

5.4.3 標的遺伝子産物

本発明の方法および組成物に使用され、包含される標的遺伝子産物としては、配列番号6001~6932に記載した標的遺伝子配列のような上記の標的必須遺伝子配列によってコードされる遺伝子産物(例えば、RNAまたはタンパク質)が挙げられる。表2では、配列番号7001~7932のアミノ酸配列を、*C. albicans*のコドン使用頻度により配列番号6001~6932の各ヌクレオチド配列から論理的に推測している。しかしながら、*C. albicans*以外の生物体で発現させる場合、配列番号7001~7932のアミノ酸配列を含んでなる標的遺伝子のタンパク質産物は普遍的遺伝子コードによって翻訳されたヌクレオチド配列によりコードされ得る。コドン使用頻度のかかる違いを調整するのに必要な変更については当業者には明らかである。

40

【0149】

50

さらに、本発明の方法および組成物では機能的に同等な遺伝子産物であるタンパク質およびポリペプチドも使用しさらに包含する。かかる機能的に同等な遺伝子産物としては、限定されるものではないが、配列番号7001~7932で記載したアミノ酸配列を実質的に含んでなるまたはからなるポリペプチドの天然の変異体が挙げられる。

【0150】

かかる同等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、例えばアミノ酸残基の欠失、付加または置換を含有する可能性はあるが、結果としてサイレントな変化であるため、機能的に同等な標的遺伝子産物が生じる。保存的アミノ酸置換は関連残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性における類似性に基づいてなされ得る。例えば、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)が挙げられる;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)が挙げられる;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)が挙げられる;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。

10

【0151】

ある特定の実施形態では、配列番号7001~7932のうち1つを有するポリペプチドの天然の変異体の混合物を含んでなる組成物を提供する。当技術分野では、*C. albicans*においてコドンCTGを認識するtRNA分子の99%がセリン残基により帯電しており、1%がロイシン残基により帯電していることが分かっていることから、生合成中にロイシンを伸長しているポリペプチド鎖に組み込む可能性がある。よって、コドンCTGを含んでなるヌクレオチド配列を*C. albicans*で翻訳させる場合、得られるポリペプチドのわずかな割合のものが(*C. albicans*のコドン使用頻度にしたがって)CTGによりコードされたセリン残基が存在すると予測される位置にロイシン残基を有していると思われる。かかるヌクレオチド配列の翻訳産物は、ヌクレオチド配列のCTGコドンに対応する位置に少数のロイシン/セリン変異を有するポリペプチド混合物を含んでなると考えられる。

20

30

【0152】

本明細書で使用する「機能的に同等」とは、表2に記載した1種以上の標的遺伝子配列によりコードされる*C. albicans*標的遺伝子産物と実質的に同じ*in vivo*活性を示し得るポリペプチドをいう。また、以下で記載するアッセイの一部として使用する場合の「機能的に同等」とは、標的遺伝子産物の対応する部分が他の細胞または細胞外分子と相互作用するのと実質的に同じ方法でかかる他の分子と相互作用し得るペプチドまたはポリペプチドをいう。好ましくは、本発明の機能的に同等な標的遺伝子産物が表2に記載した1種以上の標的遺伝子配列によりコードされる標的遺伝子産物と同じサイズまたはほぼ同じサイズでもある。

【0153】

本発明の*C. albicans*必須遺伝子によってコードされる標的遺伝子産物の生物学的機能は、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)におけるそれらに対応する相同体の機能によって予測することができる。したがって、本発明の*C. albicans*遺伝子産物は次の生物学的機能を1つ以上有しうる。

40

【0154】

代謝: アミノ酸代謝、アミノ酸生合成、セリンファミリーの同化型硫黄還元および生合成、アミノ酸代謝制御、アミノ酸輸送、アミノ酸分解(異化)、その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制御、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、環状ヌクレオチドおよび非通常ヌクレ

50

オチドの代謝、ヌクレオチド代謝制御、ポリヌクレオチド分解、ヌクレオチド輸送、その他のヌクレオチド代謝活性、リン酸代謝、リン酸の利用、リン酸の利用の制御、リン酸輸送、その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制御、C化合物および炭水化物の輸送、その他の炭水化物代謝活性、脂質、脂肪酸、イソプレノイド代謝、脂質、脂肪酸、イソプレノイド生合成、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、イソプレノイドの利用、脂質、脂肪酸、イソプレノイド生合成の制御、脂質および脂肪酸の輸送、脂質および脂肪酸の結合、その他の脂質、脂肪酸、イソプレノイドの代謝活性、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制御、ビタミン、補因子および補欠分子族の輸送、その他のビタミン、補因子および補欠分子族の活性、2次代謝、1次代謝性糖誘導体の代謝、配糖体生合成、1次アミノ酸由来2次産物の生合成、アミン類生合成。

10

【0155】

エネルギー：解糖および糖新生、ペントースリン酸経路、トリカルボン酸回路、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タンパク質、その他の電子伝達および膜関連エネルギー保存タンパク質、呼吸、発酵、エネルギー保存代謝（グリコゲン、トレハロース）、グリオキシリル酸回路、脂肪酸酸化、その他のエネルギー発生活性。

【0156】

細胞増殖、細胞分裂およびDNA合成：細胞増殖、発芽(budding)、細胞の有極性およびフィラメント形成、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合成と複製、組み換えとDNA修復、細胞周期制御と有糸分裂、細胞周期チェックポイントタンパク質、サイトカイン、その他の細胞増殖、細胞分裂およびDNA合成活性。

20

【0157】

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

30

【0158】

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、その他のタンパク質合成活性。

【0159】

タンパク質のデスティネーション(destination)：タンパク質の折り畳みおよび安定化、タンパク質のターゲティング、ソーティング(sorting)およびトランスロケーション、タンパク質の修飾、脂肪酸による修飾（例えば、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、その他のタンパク質修飾、タンパク質複合体の組み立て、タンパク質分解、細胞質および核分解、リソソームおよび液胞分解、その他のタンパク質分解、その他のタンパク質分解性タンパク質、その他のタンパク質デスティネーション活性。

40

【0160】

輸送促進：チャンネル/孔、イオンチャンネル、イオン輸送体、金属イオン輸送体（Cu、Fe等）、その他のカチオン輸送体（Na、K、Ca、NH₄等）、アニオン輸送体（Cl、SO₄、PO₄等）、C化合物および炭水化物輸送体、その他のC化合物輸送体、アミノ酸輸送体、ペプチド輸送体、脂質輸送体、プリンおよびピリミジン輸送体、アラントインおよびアラントイン酸輸送体、ATPase輸送体、ABC輸送体、薬物輸送体、その他の輸送促進物質。

【0161】

細胞輸送および輸送機構：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

50

ク等)、ペルオキシソーム輸送、液胞輸送、細胞外輸送(分泌)、細胞内取り込み、細胞骨格依存型輸送、輸送機構、その他の輸送機構、その他の細胞内輸送活性。

【0162】

細胞の生合成:細胞壁(細胞エンベロープ)の生合成、原形質膜の生合成、細胞骨格の生合成、小胞体の生合成、ゴルジの生合成、細胞内輸送小胞の生合成、核の生合成、染色体構造の生合成、ミトコンドリアの生合成、ペルオキシソームの生合成、エンドソームの生合成、液胞およびリソソームの生合成、その他の細胞の生合成活性。

【0163】

細胞間コミュニケーション/シグナル伝達:細胞内コミュニケーション、非特異的シグナル伝達、2次メッセンジャー形成、Gタンパク質活性の制御、主要キナーゼ、その他の非特異的シグナル伝達活性、形態形成、Gタンパク質、Gタンパク質活性制御、主要キナーゼ、その他の形態形成活性、浸透圧感受性(osmosensing)、受容体タンパク質、メディエータータンパク質、主要キナーゼ、主要ホスファターゼ、その他の浸透圧感受性活性、栄養応答経路、受容体タンパク質、2次メッセンジャー形成、Gタンパク質、Gタンパク質活性の制御、主要ホスファターゼ、その他の栄養応答経路活性、フェロモン応答発生、受容体タンパク質、Gタンパク質、Gタンパク質活性の制御、主要キナーゼ、主要ホスファターゼ、その他のフェロモン応答活性、その他のシグナル伝達活性。

10

【0164】

細胞レスキュー(cell rescue)、細胞防御、細胞死および細胞老化:ストレス応答、修復、その他のDNA修復、解毒、解毒に關与するシトクロムP450、その他の解毒、細胞死、細胞老化、外因性ポリヌクレオチドの分解、その他の細胞レスキュー活性。

20

【0165】

イオン恒常性:カチオン恒常性、金属イオン恒常性、プロトン恒常性、その他のカチオン恒常性、アニオン恒常性、硫酸塩恒常性、リン酸塩恒常性、塩化物恒常性、その他のアニオン恒常性。

【0166】

細胞構成(タンパク質は対応するオルガネラに局在する):細胞壁構成、原形質膜構成、細胞質構成、細胞骨格構成、中心体構成、小胞体構成、ゴルジ体構成、細胞内輸送小胞構成、核構成、染色体構造、ミトコンドリア構成、ペルオキシソーム構成、エンドソーム構成、液胞およびリソソーム構成、内膜構成、細胞外/分泌蛋白質。

30

【0167】

本発明の別の実施形態では、標的遺伝子産物がサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のRNAまたはタンパク質である該遺伝子産物が利用される。

【0168】

標的遺伝子産物の1以上のドメイン(例えば、シグナル配列、TM、ECD、CDまたはリガンド結合ドメイン)、末端切断型または欠失型標的遺伝子産物(例えば、標的遺伝子産物の1以上のドメインが欠失しているポリペプチド)、および融合標的遺伝子タンパク質(例えば、全長もしくは末端切断型もしくは欠失型標的遺伝子産物が、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が非関連タンパク質と融合しているタンパク質)に対応するペプチドおよびポリペプチドも本発明の範囲に包含される。かかるペプチドおよびポリペプチド(キメラタンパク質またはキメラポリペプチドとも称する)は、表IIに列記した標的遺伝子のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列に基づいて当業者により容易に設計することができる。融合タンパク質の例としては、限定するものではないが、エピトープと結合する試薬を使用するアフィニティークロマトグラフィーにより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を挙げることができる。その他の融合タンパク質の例としては、細胞膜に固定されることにより標的遺伝子ポリペプチドが細胞表面上に表される融合タンパク質、酵素に対する融合タンパク質(例えば、*Kluyveromyces lactis*のLAC4遺伝子にコードされる3-ガラクトシダーゼ(Leuckerら, 1994, *Mol. Gen. Genet.*, 245: 212-217))、蛍光タンパク質に対する融合タンパク質(例えば、*Renilla reniformis*由来のタンパク質(Srikanthaら, 1996, *J. Bacterio*

40

50

1. 178: 121-129)、またはマーカー機能を付与し得る発光タンパク質に対する融合タンパク質などあらゆるアミノ酸配列に対する融合タンパク質が含まれる。したがって、本発明は、第1のポリペプチドの断片と融合させた第2のポリペプチドを含む融合タンパク質であって、この第1のポリペプチドの断片が配列番号7001~7932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個の連続する残基からなるものである、前記融合タンパク質を提供する。

【0169】

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

10

【0170】

本発明の標的遺伝子産物は、好ましくは(すなわち、標的遺伝子産物に対して向けられた抗体によって認識される遺伝子産物の)エピトープ断片を提示するのに必要な少なくとも同じ数の連続アミノ酸残基を含んでなる。例えば、かかるタンパク質断片またはペプチドは特異的に発現された全長の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んでなることができる。別の実施形態では、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個以上の連続したアミノ酸残基を含んでなることができる。

【0171】

本発明の方法および組成物に使用され、包含される標的遺伝子産物は、本発明の1種以上の上記標的遺伝子配列によりコードされるアミノ酸配列(ここで、これらの配列またはその断片の1以上のエキソンによりコードされることの多いドメインは欠失している)も包含する。本発明の標的遺伝子産物は、またさらに、限定されるものではないが、糖付加、アセチル化およびミリスチル化などの翻訳後修飾を含んでなる。

20

【0172】

本発明の標的遺伝子産物は、例えば合成技法または当業者には周知の技術を用いる組換えDNA技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技術により合成または製造する。例えば、参照によりその全体を本明細書に組み入れるCreighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N.Y. を参照。例えば、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。

30

【0173】

あるいは、当業者に周知の組換えDNA法を用いて、配列番号1~61で示されるもののような標的遺伝子タンパク質コード配列および適当な転写/翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築してもよい。これらの方法としては、例えば、in vitro組換えDNA法、合成技法およびin vivo組換え法/遺伝学的組換え法が挙げられる。例えば、Sambrookら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Plaら, Yeast 12:1677-1702 (1996)(参照により本明細書にその全文を組み入れる)およびAusubel, 1989, 前掲に記載の方法を参照。あるいは、標的遺伝子タンパク質配列をコードし得るRNAは、例えばシンセサイザーを用いて化学的に合成することもできる。例えば、Oligoヌクレオチド合成, 1984, Gait, M.J編, IRL Press, Oxford)(参照により本明細書にその全文を組み入れる)に記載の技術を参照。

40

【0174】

本発明の標的遺伝子コード配列を発現させるには種々の宿主-発現ベクター系を用いることができる。かかる宿主-発現ベクター系は、対象とするコード配列がそれによって産生され、次ぎに精製されるビヒクルであるが、適当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際に本発明の標的遺伝子タンパク質をin situで発現することができる細胞である。これらのものとしては、限定されるものではないが、標的遺伝子

50

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(例えば、大腸菌、枯草菌); 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(例えば、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(例えば、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(例えば、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(例えば、Tiプラスミド)で形質転換した植物細胞; あるいは哺乳類細胞ゲノム由来プロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)、または哺乳類ウイルス由来プロモーター(例えば、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類細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3)が挙げられる。必要であれば、コード領域のヌクレオチド配列はその翻訳産物が正しいアミノ酸配列を有するように、宿主のコドン使用頻度にしたがって変更してもよい。

【0175】

細菌系では、発現される標的遺伝子タンパク質に意図される使用に応じていくつかの発現ベクターが有利に選択できる。例えば、抗体の作製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かかるタンパク質を大量に産生させる際には、例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ことを指示するベクターが望まれ得る。かかるベクターとしては、限定されるものではないが、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が個々にlacZコード領域とフレーム内で連結し得る大腸菌発現ベクター-pUR278 (Rutherら, 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。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、かかる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た後に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部分から遊離し得るようにトロンピ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設計されている。

【0176】

哺乳類宿主細胞で標的遺伝子を発現させようとする場合には、ウイルスに基づくいくつかの発現系を利用できる。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、対象とする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、例えば後期プロモーターと三部リーダ配列と連結させることができる。このキメラ遺伝子は次ぎに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(例えば、領域E1またはE3)に挿入すると、活性があり、かつ、感染宿主において標的遺伝子産物を発現させ得る組換えウイルスが得られる(例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659参照)。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異的開始シグナルも必要とされ得る。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全標的遺伝子を適当な発現ベクターに挿入する場合には、さらなる翻訳制御シグナルは必要でない。しかし、標的遺伝子コード配列の一部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読み取り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および合成双方の種々の起源のものであってよい。発現効率は適当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ら, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544参照)。

【0177】

10

20

30

40

50

さらに、挿入配列の発現を調節する、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ッシングする宿主細胞系統を選択することができる。タンパク質産物のかかる修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)はタンパク質機能にとって重要であり得る。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および特定のメカニズムを持っている。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構を有する真核宿主細胞が使用できる。

【0178】

組換えタンパク質を長期にわたって高い収率で生産するには、安定発現が好ましい。例えば、標的遺伝子タンパク質を安定発現する細胞系が操作可能である。宿主細胞は適当な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、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形質転換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日間増殖させ、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、細胞はそれらの染色体にプラスミドを安定して組み込むことができ、次ぎに細胞増殖巢から増殖させ、これを次ぎにクローン化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操作に有利に用いることができる。かかる操作細胞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特に有用であり得る。

10

20

【0179】

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ら, 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スフェラーゼ(Lowyら, 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-, hgp^rt-, またはap^rt-細胞で使用できる。また、メトトレキサート(Wiglerら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareら, 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ら, 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ら, 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。

30

【0180】

あるいは、融合タンパク質は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で容易に精製することができる。例えば、Janknechtらにより記載されている系はヒト細胞系で発現した非変性融合タンパク質の精製を容易にする(Janknechtら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976)。この系では、対象とする遺伝子を、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に翻訳上融合されるようにワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。組換えワクシニアウイルスに感染させた細胞からの抽出物をNi²⁺ニトリロ酢酸-アガロースカラムに添加し、ヒスチジンタグ付きタンパク質をイミダゾール含有バッファーで選択的に溶出する。また、標的遺伝子産物のカルボキシ末端における融合も考えられる。

40

【0181】

本明細書に記載されているものの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、¹²⁵Iなどの放射性同位元素、基質に曝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。

【0182】

50

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。かかる抗体としては、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。

【0183】

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17sにコードされ、それから発現し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。あるいは、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してもよい。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、クロマト電気泳動、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、高分解二次元ポリアクリルアミド電気泳動、等電点電気泳動その他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その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んでなるアフィニティークロマトグラフィー法も考えられる。

【0184】

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で個体に投与して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公知である。

【0185】

5.4.4 標的遺伝子産物特異的抗体

ここでは上記の1以上の標的遺伝子産物のエピトープを特異的に認識し得る抗体の作製方法を記載する。かかる抗体としては、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。

【0186】

標的遺伝子または遺伝子産物に対する抗体を作製するには、種々の宿主動物を標的遺伝子タンパク質またはその一部を注射することで免疫化する。かかる宿主動物としては、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には、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、ブ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-Guérin)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(そのアミノ酸配列は配列番号7001から7932の1つの、少なくとも6個または少なくとも8個の連続する残基を含んでなる)を含んでなる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。

【0187】

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には、上記のような宿主動物を、これもまた上記のようなアジュバントを添加した、異

10

20

30

40

50

なる発現の、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。必要であれば、抗体分子は、動物から(例えば、血液から)単離してもよいし、Aタンパク質クロマトグラフィーなどの周知の技術によってさらに精製してIgG画分を得てもよい。

【0188】

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いずれの技術によっても得ることができる。これらには、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ら, 1983, Immunology Today 4:72; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030)、およびEBV-ハイブリドーマ法(Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)が挙げられる。かかる抗体はIgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそのいずれかのサブクラスをはじめ、いずれ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。

10

【0189】

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(例えば、抗体ファージ提示ライブラリー)を目的のポリペプチドでスクリーニングすることで、本発明のポリペプチドに対して向けられたモノクローナル抗体を同定および単離できる。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(例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01;およびStratagene SurfZAP™ 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特に向いている方法および試薬の例は、例えば米国特許第5,223,409号; PCT公報第W0 92/18619号; PCT公報第W0 91/17271号; PCT公報第W0 92/20791号; PCT公報第W0 92/15679号; PCT公報第W0 93/01288号; PCT公報第W0 92/01047号; PCT公報第W0 92/09690号; PCT公報第W0 90/02809号; Fuchsら(1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hayら(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。

20

30

【0190】

さらに、標準的組換えDNA技術を用いて作製できる、ヒト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(例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号;およびBossら、米国特許第4,816,397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)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1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(例えば、Queen、米国特許第5,585,089号を参照のこと。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)。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、PCT公報第W0 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W0 86/01533号;米国特許第4,816,567号;欧州特許出願第125,023号;Betterら(1988) Science 240:1041-1043;Liuら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443;Liuら(1987) J. Immunol. 139:3521-3526;Sunら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218;Nishimuraら(1987) Canc. Res. 47:999-1005;Woodら(1985) Nature 314:446-449;およびShawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559;Morrison(1985) Science 229:1202-1207;Oiら(1986) Bio/Techniques 4:214;米国特許第5,225,539号;Jonesら(1986) Nature 321:552-525;Verhoeyanら(1988) Science 239:1534;ならびにBeidlerら(1988) J. I

40

50

mmunol. 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。

【0191】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に望ましい。このような抗体は、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(例えば、本発明のポリペプチド全体またはその一部)で通常の様式で免疫化する。抗原に向けられた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。したがって、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概要については、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、例えば、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号を参照のこと。

10

【0192】

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)」と称される技術を用いて産生できる。この方法においては、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えば、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導く(Jespersら(1994) Bio/technology 12:899-903)。

20

【0193】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術により産生できる。例えば、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得る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。あるいはまた、Fab発現ライブラリーを構築して(Huseら, 1989, Science 246:1275-1281)、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ簡単な同定を可能にできる。

【0194】

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できる。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 10^{-6} M 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 10^{-7} M 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 10^{-8} M 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 10^{-11} M 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 10^{-13} M 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 10^{-14} M 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、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。

30

【0195】

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、孢子)および生物のライフサイクル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として(例えば、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(dichlorotriazinylamine)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、

40

50

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¹²⁵I、¹³¹I、³⁵Sまたは³Hが挙げられる。

【0196】

さらに、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治療のために用いて、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係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

10

【0197】

治療成分がコンジュゲートされたまたはされていない抗体は、単独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できる。

【0198】

5.4.5 アンチセンス分子

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、具体的な、遺伝子に基づいた治療的アプローチであり得る(レビューについては、69章、5節 "Cancer: Principle and Practice of Oncology"、第4版、DeVitaら編、J.B. Lippincott, Philadelphia 1993に掲載のSteinを参照)。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、薬学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。

20

【0199】

別の実施形態では、本発明は、*C.アルビカンス*(*C.albicans*)などの対象とする生物中の標的遺伝子のin vitro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合せて、順番にまたは同時に使用してもよい。

30

【0200】

別の実施形態では、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分子を調節可能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、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)のGRACE株、または別の二倍体病原性生物から構築された別のGRACE株においてアンチセンスRNA分子を発現させる。本実施形態の別の態様では、アンチセンスRNA分子を、カンジダ・アルビカンスまたは別の二倍体病原性生物(アスペルギルス・フミガツス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス(*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマチジチス(*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム(*Histoplasma capsulatum*)、ニューモシスチス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、トリコスポロン・ベイジェリー(*Trichosporon beigellii*)、リゾプス・アルルヒズス(*Rhizopus arrhizus*)、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

40

50

ビゲラ (*Absidia corymbigera*)などの動物真菌類病原体、または灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*)などの植物真菌類病原体、または上記種の属に該当するあらゆる種を含む)の野生型または他の非GRACE株において発現させる。

【0201】

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得る。アンチセンス分子は、相補的標的遺伝子mRNA転写物に結合し、翻訳を低下させるかまたは予防する。絶対的相補性は、好ましいが必須ではない。本明細書でいうRNAの一部に「相補的な」配列は、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する；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テストできるか、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。

【0202】

メッセージの5'端(例えば、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、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。Wagner, R., 1994, Nature 372:333-335を全般的に参照のこと。

【0203】

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むことができる。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、本発明にしたがって使用できる。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設計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。

【0204】

標的遺伝子配列の選択に関係なく、in vitro調査をまず行って、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。これらの調査では、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、これらの調査では、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。

【0205】

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は改変体であり得る。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されて、例えば、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。アンチセンス分子は、ペプチド(例えば、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(例えば、Krolら, 1988, BioTechniques 6:958-976を参照)、または挿入剤(intercalating agents)(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照)などの他のさらなる群を含み得る。この目的のために、アンチセンス分子を別の分子(例えば、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。

【0206】

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)、ワイプトキソシン(wybutoxosine)、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、(acp.3)_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つの改変型塩基部分を含み得る。

10

【0207】

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つの改変型糖部分も含む。

20

【0208】

さらに別の実施形態では、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。

【0209】

さらに別の実施形態では、アンチセンス分子は、 β -アノマーオリゴヌクレオチドである。 β -アノマーオリゴヌクレオチドは、通常の α -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と共に特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gautierら, 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ら, 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148) またはキメラRNA-DNA類似体(Inoueら, 1987, FEBS Lett. 215:327-330)である。

30

【0210】

本発明のアンチセンス分子は、例えば自動化DNA合成器(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。例えば、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された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)。

【0211】

標的遺伝子のコード領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドを使用できる一方で、転写された非翻訳領域に相補的なものも好ましい。

40

【0212】

薬学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、対象とする病原体に感染した被検体に投与できる。

【0213】

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、標準的な技術により決定できる。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、ヒトでテスト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。

50

【0214】

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。例えば、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設計された改変型アンチセンス分子(例えば、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(例えばポリ-β-D-4-N-アセチルグルコサミンポリサッカリド)、リボソーム、微粒子またはマイクロカプセルを介して投与する。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、特異的な同定可能な病原体抗原に特異的な抗体を介して標的化したリボソームを利用することが望ましいかもしれない(Leonettiら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2448-2451; Renneisenら, 1990, J. Biol. Chem. 265:16337-16342)。

10

【0215】

5.4.6 リボザイム分子

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(総説として、例えば、Rossi, J., 1994, Current Biology 4:469-471参照)。リボザイムの作用機構は、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、それに次ぐ、内ヌクレオチド結合分解性(endonucleolytic)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切断に携わ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、参照により全文を本明細書に組み入れる、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配列の特異的且つ効果的な内ヌクレオチド結合分解性切断を触媒する、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。

20

【0216】

特異的な標的遺伝子mRNA転写産物を触媒的に切断するよう設計されたり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されうる場合、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。

30

【0217】

本発明のリボザイムはまた、Tetrahymena thermophilaに本来存在し(IVSまたはL-19 I VS 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って記述された(Zaugら, 1984, Science, 224:574-578; ZaugおよびCech, 1986, Science, 231:470-475; Zaugら, 1986, Nature, 324:429-433; University Patents Inc.によって発表された国際出願番号W088/04300; BeenおよびCech, 1986, Cell, 47:207-216)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。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。

40

【0218】

アンチセンス法の場合と同様に、リボザイムは(例えば、改善された安定性、ターゲ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が発現している細胞に送達されるべきである。アンチセンス分子とは

50

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、連続してまたは同時に組合せて用いることができる。

【0219】

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される。これらは、例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。別の方法としては、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。

10

【0220】

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'末端にリボもしくはデオキシリボヌクレオチドの隣接配列を付加すること、或いは、オリゴデオキシリボヌクレオチド骨格中のホスホジエステラーゼ結合より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。

20

【0221】

5.5 スクリーニングアッセイ

下記のアッセイは、標的遺伝子産物、標的遺伝子産物と相互作用する他の細胞内タンパク質、および標的遺伝子産物と他の細胞内タンパク質との相互作用を妨げる化合物に結合する化合物を同定するために考案された。このような方法によって同定される化合物は、本発明の標的遺伝子によってコードされるポリペプチドの活性を調節する（すなわち、その化合物の非存在下で観察される活性と比べて、その活性を増加または減少させる）化合物を含む。あるいは、このような方法によって同定される化合物は、そのポリヌクレオチドの発現を調節する（すなわち、その化合物の非存在下で観察される発現レベルと比べて、発現を増加もしくは減少させる）、またはその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増加もしくは減少させる化合物を含む。本発明の方法によって同定されるような化合物は、それらの活性・発現を調節する能力について、当業者において既知の標準的なアッセイを用いて調べることができる。

30

【0222】

したがって、本発明は、遺伝子産物の活性またはレベルを調節する化合物を同定するための多数の化合物のスクリーニングを含む、抗カビ化合物の同定のための方法を提供する。当該の遺伝子産物は、配列番号6001～6932からなる群から選択されたヌクレオチド配列、またはサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において天然に存在するヌクレオチド配列、および、配列番号6001～6932からなる群から選択されたヌクレオチド配列を持つオーソログ遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされている。

40

【0223】

5.5.1 *in vitro*でのスクリーニングアッセイ

本発明の標的遺伝子産物に結合できる化合物を同定するために、*in vitro*でのシステムが設計された。この方法で同定された化合物は、例えば、野生型および/または突然変異の標的遺伝子産物の活性を調節するために有用であり、標的遺伝子産物の生物学的機能を解明するために有用であり、正常な標的遺伝子産物の相互作用を妨げる他の化合物を同定するためのスクリーニングに利用され、または、このような相互作用の阻害のためにそれ自体有用である。

【0224】

50

標的遺伝子産物に結合する化合物を同定するために用いたアッセイの原理は、2つの成分が相互作用して結合し、その後、反応混合物から除去および/または検出される複合体を形成しうる十分な時間および条件下で、標的遺伝子産物と試験化合物を含む反応液を調製することを含む。これらのアッセイは、様々な方法で行われる。例えば、1つの方法は、標的遺伝子産物または検体を固相上へ固着させ、分子間の結合反応を介して、反応終末に固相に固定した標的遺伝子産物/試験化合物複合体を検出することを含む。そのような方法の1つの実施形態では、標的遺伝子産物は固体表面上へ固着され、固着されていない試験化合物は直接的または間接的のいずれかで標識される。

【0225】

実際には、マイクロタイタープレートが固相として簡便に利用される。固定化される成分は、非共有または共有結合によって固定される。非共有結合は、単に固体表面をタンパク質の溶液で覆い、覆われた表面を乾燥することによって行われうる。あるいは、固定化されるタンパク質に特異的な固定された抗体、望ましくはモノクローナル抗体が、固相表面にタンパク質を固定させるために用いられる。表面を調製して保存する。

【0226】

かかるアッセイを行うために、固定されていない成分は、固定された成分を維持する被覆表面に添加される。反応が完了した後、形成された任意の複合体が固相表面に固定されたまま残るような条件下で、(例えば洗浄によって)反応していない成分が除去される。固相表面に固定された複合体の検出は様々な方法で行われる。前述の固定されていない成分が事前に標識されている場合、表面上に固定された標識の検出は複合体が形成されたことを示す。前述の固定されていない成分が事前に標識されていない場合、表面上に固定された複合体を検出するために、間接的な標識が用いられる。例えば、前述の固定されていない成分に特異的な標識抗体が用いられる(抗体自身は、直接標識されるか、または標識抗Ig抗体で間接的に標識される)。

【0227】

あるいは、反応は液相で行われ、反応生成物は反応しなかった成分から分離され、複合体が検出される。例えば、溶液中で形成された複合体を固定するための、標的遺伝子産物または試験化合物に特異的な固定化抗体、および、固着された複合体の検出を可能にするための、複合体の他方の成分に特異的な標識二次抗体が用いられる。

【0228】

5.5.1.1. 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-タンパク質相互作用を検出するために適切な任意の方法は、新しい標的タンパク質と細胞あるいは細胞外タンパク質との相互作用を特定するために使用されうる。

【0229】

本発明の標的遺伝子産物は *in vivo* で、1つ以上の細胞性のあるいは細胞外のタンパク質のような高分子と相互作用する。このような高分子は、上述の方法で同定された核酸分子およびタンパク質を含むが、それに限定されるものではない。これを論述するために、このような細胞性および細胞外の高分子は本明細書では「結合パートナー」と呼ぶ。このような相互作用を阻害する化合物は、標的遺伝子タンパク質、特に突然変異の標的遺伝子タンパク質の活性を調節するのに有用でありうる。このような化合物は、上述されたような、抗体、ペプチドなどの分子を含むが、それに限定されるものではない。

【0230】

標的遺伝子産物とその細胞性もしくは細胞外の結合パートナーとの相互作用を阻害する化合物を同定するために用いられたアッセイ系の基本原理は、双方が相互作用して結合し、その後、複合体を形成しうるのに十分な時間および条件下で、標的遺伝子産物と結合パートナーとを含む反応混合物を調製することを含む。ある化合物の阻害活性を調べるために、反応混合物はその試験化合物を含むものと含まないものが調製される。試験化合物は初めから反応混合物に含まれているかまたは、標的遺伝子産物とその細胞性もしくは細胞外の結合パートナーの添加に続いて加えられる。対照の反応混合物は試験化合物なしでインキュベートされる。標的遺伝子タンパク質と細胞性または細胞外の結合パートナーとの

10

20

30

40

50

間での複合体の形成は、その後検出される。対照反応混合物で複合物が形成され、試験化合物を含む反応混合物では形成されないことは、その化合物が標的遺伝子タンパク質とそれに相互作用する結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。加えて、試験化合物と正常な標的遺伝子タンパク質を含む反応混合物中での複合体形成は、また、試験化合物と突然変異の標的遺伝子タンパク質を含む反応混合物中での複合体形成と比較されうる。この比較は、正常な標的遺伝子産物ではなく突然変異を含む分子間相互作用を阻害する化合物を同定することが望ましい場合に、重要でありうる。

【0231】

標的遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を阻害する化合物のためのアッセイは、異種のまたは同種の形式のいずれかで実施される。異種アッセイは、固相上に標的遺伝子産物または結合パートナーのいずれかを固定させ、反応の後に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、反応のすべては液相で行われる。いずれの方法でも、反応物の添加の順序は、調べる化合物に関する異なる情報が得られるように変更される。例えば、標的遺伝子産物と結合パートナーとの間の相互作用を、例えば競合によって、阻害する試験化合物は、試験物質の存在下で反応を行うことによって、すなわち標的遺伝子産物および相互作用する細胞性または細胞外の結合パートナーより先に、あるいはそれと同時に試験物質を反応混合物に添加することによって、同定される。代わりに、既に形成された複合体を阻害する試験化合物、例えば複合体の構成要素の1つと置換するようなより高い結合定数を持つ化合物は、複合体が形成された後、試験化合物を反応混合物に添加することによって調べられる。様々な形式は以下に簡潔に記述される。

【0232】

異種アッセイ系において、標的遺伝子タンパク質または相互作用性細胞性もしくは細胞外結合パートナーのいずれかを固体表面に固定し、一方で固定していない種を直接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用いるのが便利である。固定化種を非共有結合的または共有結合的接着のいずれかによって固定する。非共有結合的吸着は、単に固体表面を標的遺伝子産物または結合パートナーの溶液でコートし、そしてコートした表面を乾かすことによって達成される。あるいは、固定化される種に特異的な固定化抗体を用いて、種を固体表面に固定する。表面はあらかじめ準備し、保存しておく事ができる。

【0233】

アッセイを行うために、固定化種のパートナーを試験化合物と共にまたはそれなしでコート化表面に曝露する。反応終了後、未反応成分を除去し（例えば洗浄によって）、そして形成したいかなる複合体も固体表面に固定されて維持されるようにする。固体表面に固定された複合体の検出はいくつかの方法で達成される。非固定化種が予め標識化されている場合、表面に固定化された標識の検出は複合体が形成されたことを示す。非固定化種が予め標識化されていない場合、間接的標識を用いて表面に固定化された複合体を検出するようにする。例えば、最初に固定化していない種に特異的な標識化抗体を用いる（抗体を次に、標識化抗Ig抗体で直接的に標識化または間接的に標識化する）。反応成分の添加の必要性によって、複合体形成を阻害するまたは既に形成した複合体を破壊させる試験化合物が検出される。

【0234】

あるいは、反応を、試験化合物の存在下または非存在下で液相中で行い、反応産物を未反応成分および検出された複合体から分離する（例えば、結合化合物の1つに特異的な固定化抗体を用いて、液体中で形成されたあらゆる化合物も固定するようにし、そして2番目に、他のパートナーに特異的な標識化抗体を用いて固定化化合物を検出するようにする）。再び、液層に反応物を添加する必要性によって、化合物形成を阻害するまたは既に形成した複合体を破壊させる試験化合物を同定する。

【0235】

本発明の別の実施形態において、同種アッセイを用いることができる。この研究方法において、標的遺伝子タンパク質と相互作用的細胞性または細胞外結合パートナーとの既に

10

20

30

40

50

形成した複合体を準備し、ここで標的遺伝子産物またはその結合パートナーは標識されており、しかし、該標識によって生じるシグナルは、複合体形成のために消失する（例えば、この研究方法をイムノアッセイに用いているRubensteinによる米国特許第4,109,496号を参照）。既に形成した複合体由来の種の1つに競合し置換する試験物質の添加は、バックグラウンド以上のシグナルを生じる結果となる。この方法において、標的遺伝子タンパク質/細胞性または細胞外結合パートナー相互作用を破壊させる試験物質を同定する。

【0236】

特定の実施形態において、前記の組換えDNA技術を用いて固定化のために標的遺伝子産物を準備する。例えば、標的遺伝子コード領域を融合ベクターを用いて、pGEX-5X-1のようなグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）遺伝子と融合させると、得られる融合タンパク質においてその結合活性が維持される。当技術分野で日常的に行われている前記の方法を用いて、相互作用細胞性または細胞外結合パートナーを精製し、そしてモノクローナル抗体を作出するために用いる。例えば、当技術分野で日常的に行われている方法によって抗体を放射性同位体¹²⁵Iで標識する。異種アッセイにおいて、例えばGST標的遺伝子融合タンパク質はグルタチオン-アガロースビーズに固定される。次に、相互作用細胞性または細胞外結合パートナーを、相互作用および結合を起こす方法で試験化合物の存在下または非存在下において加える。反応時間の終わりに、非結合物質を洗い去り、そして標識化モノクローナル抗体を該系に加え、そして合成化合物に結合するようにする。標的遺伝子タンパク質および相互作用細胞性または細胞外結合パートナー間の相互作用は、グルタチオン-アガロースビーズと結合した残存する放射能の量の測定によって検出する。試験化合物による相互作用の阻害が成功すると、結果として測定した放射能が減少する。

10

20

【0237】

あるいは、GST標的遺伝子融合タンパク質および相互作用細胞性または細胞外結合パートナーを、固相グルタチオン-アガロースビーズの存在しない液体中で共に混合する。試験化合物を、種が相互作用する際またはその後に加える。この混合物をグルタチオン-アガロースビーズに加え、そして非結合物質を洗い去る。再び標的遺伝子産物/結合パートナー相互作用の阻害の程度を標識化抗体の添加およびビーズに結合した放射能の測定により検出する。

【0238】

本発明の別の実施形態において、全長タンパク質の1つまたは両方の代わりに、標的遺伝子産物および/あるいは相互作用細胞性または細胞外結合パートナー（結合パートナーがタンパク質である場合において）の結合領域に対応するペプチド断片を用いて、これらの同様の技術が使用される。当技術分野で日常的に行われている方法のいくつかは結合部位の同定および単離に用いられる。これらの方法はタンパク質の1つをコードする遺伝子の突然変異および免疫共沈降アッセイにおける結合の破壊に対するスクリーニングを含むが、しかしこれに限定されない。次に、複合体中の2番目の種をコードする遺伝子における補完性の突然変異を選抜する。各々のタンパク質をコードする遺伝子の配列解析は、相互作用結合に含まれるタンパク質の領域に対応する突然変異を示す。あるいは、上記の方法を用いて1つのタンパク質を固体表面に固定し、そしてトリプシンなどのタンパク質分解酵素で処理したその標識化結合パートナーと相互作用および結合させるようにする。洗浄の後、結合領域を含む短い標識化ペプチドは固相物質に結合して残留し、そしてアミノ酸配列によって単離および同定することができる。また、細胞性または細胞外結合パートナーをコードする遺伝子を一度得れば、短い遺伝子断片を遺伝子操作することにより、タンパク質のペプチド断片を発現させるようにし、それらを結合活性について試験し、そして精製または合成する。

30

40

【0239】

例えば、限定するわけではないが、GST標的遺伝子融合タンパク質を作製し、グルタチオンアガロースビーズへの結合させることにより標的遺伝子産物を上述のように固相物質に固定させる。相互作用細胞性または細胞外結合パートナーを³⁵Sなどの放射性同位体

50

で標識し、トリプシン等のタンパク質分解酵素で切断する。切断産物を固定化GST標的遺伝子融合タンパク質に加え、結合させる。非結合ペプチドを洗い去った後、標識化結合材料で細胞性または細胞外結合パートナー結合領域に相当するものを溶出、精製し、そして周知の方法によりアミノ酸配列を解析する。このように同定されたペプチドを周知の組換えDNA技術を用いて、合成的に生成または適切な容易なタンパク質に融合する。

【0240】

5.5.1.2 コンビナトリアルケミストリーライブラリーのスクリーニング

本発明の1つの実施形態において、本発明の方法を用いて同定された菌類の遺伝子によってコードされるタンパク質を単離および発現させる。次にこれらの組換えタンパク質をアッセイの標的として用い、潜在的な薬物候補のための化合物のライブラリーをスクリーニングする。化学ライブラリーの作製は当技術分野において公知である。例えば、コンビナトリアルケミストリーはここに記述するアッセイにおいてスクリーニングするための化合物のライブラリーを作製するのに用いる。コンビナトリアルケミストリーライブラリーは、複数の化学的「ビルディングブロック」試薬を結合させることにより化学合成または生物学的合成のいずれかで作製された種々の化合物の集団である。例えば、ポリペプチドライブラリーのような線状のコンビナトリアルケミストリーライブラリーは、所与の長さのペプチドを得るために考えられ得る全ての組合せにおいてアミノ酸を結合させることで作られる。このような化学的ビルディングブロックの組合せた混合によって、理論上、無数の化学化合物を合成する事ができる。例えば、1人の研究者は、100種の交換可能な化学ビルディングブロックの系統的な組合せの混合の結果、1億個の四量体化合物または100億個の五量体化合物の理論上における合成を生じる事を認めた(Gallopら、"Application of Combinational Technologies to Drug Discovery, Background and Peptide Combinatorial Libraries," Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 37, No. 9, 1233-1250 (1994))。当業者に知られている他の化学ライブラリーもまた用いてもよく、天然産物ライブラリーも含む。

10

20

【0241】

一度作製したら、コンビナトリアルライブラリーを望ましい生化学的性質を有する化合物に対してスクリーニングする。例えば、薬物としてまたは薬物を開発するために有用となるであろう化合物は、上記のように同定、発現および精製した標的タンパク質と結合する能力を有するかも知れない。さらに、もし同定した標的タンパク質が酵素であれば、候補化合物は標的タンパク質の酵素的性質を妨害するかも知れない。例えば、標的タンパク質の酵素的機能は、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、輸送タンパク質、転写酵素、複製コンポーネントおよび既知または未知のあらゆるタイプの酵素として役立ててもよい。したがって、本発明は前述のタンパク質産物を用いて組合せ化学ライブラリーをスクリーニングする事を意図する。

30

【0242】

本発明のいくつかの実施形態において、タンパク質の生化学的活性と同様にタンパク質が働く基質の化学的構造が知られている。本発明の他の実施形態において、標的タンパク質の生化学的活性は未知であり、および標的タンパク質は既知の基質を有さない。

【0243】

本発明のいくつかの実施形態において、化合物のライブラリーをスクリーニングして標的遺伝子産物の阻害剤として機能する化合物を同定するようにする。初めに、当技術分野で周知の組合せライブラリー形成の方法を用いて小さな分子のライブラリーを作出する。「所望の特性を有する化合物を自動的に作製するための系および方法(System and Method of Automatically Generating Chemical Compounds with Desired Properties)」と題されたAgrafiotisらの米国特許第5,463,564および5,574,656号の2つは(この開示は参考により全文を本明細書に組み込まれる)これについて教示するものである。次に、ライブラリー化合物をスクリーニングして、所望の構造的および機能的性質を有する化合物を同定する。米国特許第5,684,711号は(その開示が参照により全文を本明細書中に組み込む)、ライブラリーのスクリーニングのための方法を述べている。

40

50

【0244】

スクリーニングの手順を説明すると、標的遺伝子産物、酵素およびライブラリーの化合物を混合して、互いに相互作用可能とする。標識化基質をインキュベーションに加える。基質の標識は、代謝された基質分子から放出されて検出可能である。シグナルの放出は、コンビナトリアルライブラリーの化合物の非存在下で放出されるシグナルと比較することにより、標的酵素の酵素活性におけるコンビナトリアルライブラリーの化合物の効果を測定することを可能にする。各々のライブラリー化合物の特徴を符号化し、酵素に対する活性を示す化合物を解析する事ができ、そして同定された多様な化合物に共通の性質を特定することができ、そしてライブラリーの更なる相互作用に結び付ける事ができる。

【0245】

一度化合物のライブラリーをスクリーニングすれば、標的酵素に対する活性を有すると初回のスクリーニングで示された性質を有する化学ビルディングブロックを用いて次のライブラリーを作製する。この方法を用いて、酵素に対して高い特異性を有する一群の酵素阻害剤が見つかるまで、候補化合物を次々と反復すると、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性質をより有するようになる。次に、これらの化合物を哺乳動物に用いるための抗生物質としてのそれらの安全性および有効性に対してさらに試験することができる。

【0246】

この特定のスクリーニング方法がただの具体例であるということは、容易にわかるであろう。他の方法は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わかっている場合、多数の天然に存在する標的についての多様なスクリーニング技術が知られている。例えば、いくつかの技術は、薬物リード物質を同定および開発するために、標的タンパク質を生化学的および遺伝子学的に調べ、そして解析するための小さなポリペプチドの生成して利用することを含む。このような技術はPCT国際公開W09935494、W09819162、W09954728に記述されている方法を含み、この開示は参照によって全文を本明細書に組み込むものとする。

【0247】

同様の方法を、ここに記述したカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 標的タンパク質と相同的なカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の生物由来のタンパク質の活性を阻害する化合物を同定するために用いてもよい。例えば、タンパク質はアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatiditis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigeli*)、リゾプス・アルルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、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・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*) のような動物真菌病原体、または灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) のような植物真菌病原体、あるいはあらゆる上記の種の属の中に含まれるあらゆる種由来のものでもよい。いくつかの実施形態において、タンパク質はサッカロミセス・セレピシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の生物由来である。

【0248】

5.5.1.3 in vitro 酵素アッセイ

1 実施形態において、細胞の生存活性に必須であることが示されている生化学的活性に

10

20

30

40

50

ついでに *in vitro* アッセイを開発するために GRACE 法および株を用いることができる。GRACE 条件付き発現方法によって同定されるいくつかの必須遺伝子は、他の生物由来の生化学的に特性解析された遺伝子産物との統計的に重要な類似性を示す。例えば、アミノ酸配列の類似性に基づくと、表 II に列挙したいくつかの必須の菌類特異的遺伝子が以下の生化学的活性を有する事が予想される。

【 0 2 4 9 】

CaRH01	(1,3)-D-グルカン合成および極性に関する GTPase	
CaYHR118c(ORC6)	複製起点複合体のサブユニット	
CaYPL128c(TBP1)	テロメア結合タンパク質	
CaYNL256w	ジヒドロプロテロエート合成酵素	10
CaYKL004w(AUR1)	ホスファチジルイノシトール：セラミドホスホイノシトール転移酵素	
CaYJL090c(DPB11)	DNA polB サブユニット	
CaYOL149w(DCP1)	mRNA デキャッピング酵素	
CaYNL151c(RPC31)	RNA polIII サブユニット	
CaYOR148c(SPP2)	RNA スプライシング	
CaYER026c(CH01)	ホスファチジルセリン合成酵素	

したがって、いくつかのよく特性解析された標準的な *in vitro* 生化学的アッセイ（例えば、DNA 結合、RNA 修飾、GTP 結合および加水分解ならびにリン酸化）は容易にこれらの効果的な薬物標的に適応される。例えば効果的な標的である CaRH01 は、広範なかかるタンパク質のために開発された標準的な GTPase アッセイを適用することにより *in vitro* に基づく薬物スクリーニングに用いられる。あるいは、我々の GRACE 株の集団中の効果的な薬物標的と関係する生化学的情報を用いた新規のアッセイが開発される。当技術分野で知られている、同様の生化学的活性（例えば、作用機構、基質の種類）を有する酵素についてのあらゆるアッセイが、これらの必須な *C. albicans* 遺伝子によってコードされる酵素の阻害剤のスクリーニングに適応される。

【 0 2 5 0 】

例えば、多数の性質により、*C. albicans* 遺伝子である CaTBF1 が *in vitro* アッセイ開発の候補となる。CsTBF1 は *S. cerevisiae* における対応物であるテロメア結合因子 TBF1 と重要な相同性を共有する。さらに、CaTBF1p が認識する DNA 配列は既知であり、比較的短く（Koeringら、Nucleic Acid Res. 28:2519-2526、参照として全文を本明細書に組み込むものとする）、このエレメントに対応するオリゴヌクレオチドの安価な合成を可能にする。さらに、このアッセイに必要なのは標的タンパク質およびこれを認識するヌクレオチド配列を含む DNA 断片のみであるため、CaTBF1p タンパク質の精製だけが *in vitro* 結合アッセイを開発するために必要である。この *in vitro* アッセイの 1 つの好適な実施形態は、DNA エレメントのウェルの底への交差結合、タンパク質 - DNA 結合を促進するための放射性標識化 CaTBF1p のインキュベーション、非結合材料の除去のための一連の洗浄、および結合した放射性標識化 CaTBF1p の割合の測定を含む。あるいは、精製した CaTBF1p をウェルに付着させ、そして放射性標識化オリゴヌクレオチドを加える。薬物スクリーニングはハイスループットスクリーニング技術の使用を含み、このアッセイにおいて測定されるタンパク質 - DNA 結合を阻害する化合物の検索によって実施される。

【 0 2 5 1 】

同様に、第 2 の有効な薬物標的である CaORC6 をこのタイプのアッセイに用いる。というのは、この *S. cerevisiae* の相同体である ORC6 が酵母染色体の複製起点の中の DNA エレメントに直接結合するためである（Mizushimaら、2000、Genes & Development 14:1631-1641、参考により全文を本明細書に組み込むものとする）。これらのあらゆる標的の生化学的精製も可能であり、例えば、*C. albicans* のヘテロ接合体株の PCR に基づく構築物によるもので、その CaORC6 タンパク質をコードする遺伝子は炭素末端ヘキサヒスチジンタグを含むように修飾されており、標準的な Ni^{+2} アフィニティーカラムクロマトグラフィー技術を用いたキメラタンパク質の精製を可能にする。

【0252】

CaDPB11様の他の標的については、*S. cerevisiae*における相同体はSld2pと物理的に結合するタンパク質をコードし（Kamimuraら、1998, *Cell Biol.* 18:6102-6109、参考により全文を本明細書に組み込むものとする）、前述のものと同様の*in vitro*アッセイを開発する。さらに、既知の物理的相互作用に基づいたツーハイブリッドアッセイはGRACE株の集団におけるあらゆる確認された標的のために開発される。

【0253】

本発明はまた、好適な生化学的標的のための*in vitro*アッセイの確立において有用な細胞抽出物を提供する。例えば、本発明の実施形態において、GRACEにより得られる*C. albicans*株を恒常的発現条件下または転写抑制条件下のいずれかで増殖させ、過剰生産または特定の遺伝子産物を減少させるようにする。これらの2つの条件下でインキュベートした株から生じた細胞抽出物を同様に増殖させた野生型株から調製した抽出物と比較する。次に、これらの抽出物を標的の迅速な評価のために用いるが、それには、遺伝子産物を精製することなく、既存の*in vitro*アッセイまたは新規の遺伝子産物に対する新しいアッセイを用いる。*in vitro*アッセイ開発のためのこのような全細胞抽出物研究方法は、細胞壁合成経路（例えば、(1,3)- β -グルカン合成またはキチン合成）に含まれる標的（機能的活性に必要とされる不可欠な翻訳後修飾を受ける前に分泌経路を通過する複数の遺伝子産物を含む）のために特に不可欠である。これらまたは他の細胞壁経路（例えば(1,6)- β -グルカン合成）に關与する標的遺伝子の条件付き発現のためのGRACEに由来する株は、*C. albicans*において直接実行される*in vitro*アッセイを可能にする。

【0254】

5.5.2 細胞に基づいたスクリーニングアッセイ

種々の実施形態において、本発明の方法によって同定された必須遺伝子を細胞に基づいたスクリーニングアッセイで使用することができる。通常、細胞中の標的必須遺伝子は、遺伝子操作することにより、構成的にまたは誘導的に過剰発現または過少発現させることができる。必須遺伝子が同定されれば、かかる細胞の構築は当技術分野において周知の方法によって達成することができる。本発明のGRACE株は、本発明の細胞に基づいたスクリーニングアッセイにおいて使用することができる遺伝子操作細胞の型の非限定的な例である。

【0255】

薬物の発見および開発に向けた化合物の確認または特性決定に使用される現在の細胞に基づいたアッセイは、被験化合物が細胞内または細胞表面に存在する標的分子の活性を調節する能力の検出に依存する場合が非常に多い。ほとんどの場合、そのような標的分子は、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類、脂質、炭水化物ならびにメッセンジャーRNA類、リボソームRNA類、tRNA類などのRNA類のような他の分子も含まれる。被験化合物と具体的な標的分子との結合および相互作用の検出を行う上で、当業者は多くの高感度の細胞に基づいたアッセイ方法を利用可能である。しかしこれらの方法は、被験化合物が、親和性が中程度または低い標的分子と結合その他の相互作用を行う場合には、一般的にあまり効果的ではない。さらに標的分子は、溶液中で被験化合物に容易に近づくことができなない場合がある。それは例えば、標的分子が細胞内にある場合または細菌細胞の周辺質のような細胞区画内にある場合である。したがって、現在の細胞に基づいたアッセイ方法には、標的と中程度または低い親和性で相互作用する化合物または容易に近づけない標的と相互作用する化合物の確認または特性決定には有効ではないという点で制限がある。

【0256】

本発明の細胞に基づいたアッセイ方法は、現在の細胞に基づいたアッセイに勝る大きい長所を有する。その長所は、真菌の増殖、有毒性または病原性に必要な少なくとも1種類の遺伝子産物（標的分子）のレベルまたは活性が、その機能の有無が真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性の律速段階となる程度まで特異的に低下した感作細胞の使用に由来するものである。そのような感作細胞は、影響された標的分子に対して活性化化合物

に対してかなり感受性が高くなる。例えば、感作細胞は、真菌の成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性に必要なレベルの遺伝子産物を提供して、その機能の有無が真菌の成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性の律速段階となる濃度の誘導因子または抑制因子存在下でGRACE株を成長させることで得られる。そこで本発明の細胞に基づいたアッセイは、そのような化合物が非感作細胞に対してよりも感作細胞に対してかなり強力であることから、対象となる標的分子に対して低または中程度の効力を示す化合物を検出することができる。その効果は、非感作細胞と比較して感作細胞で試験を行った場合に、被験化合物が、2ないし数倍強力、少なくとも10倍強力、少なくとも20倍強力、少なくとも50倍強力、少なくとも100倍強力、少なくとも1000倍強力、または1000倍よりさらに強力となり得るようなものであることができる。

10

【0257】

一部には、病原菌における抗生物質耐性が認められるため、そしていくつかの現在使用されている抗生物質に関連する強い副作用のため、新たな標的で作用する新規抗生物質が、当業界では切望されている。しかし、細胞に基づいたアッセイに関係する現行技術における別の限界として、同じ限られた種類の生体経路で同じ種類の標的分子に対するヒット (hit) を繰り返し確認するという問題がある。新標的と比較して、「旧」標的で作用する化合物の方がより高頻度で遭遇し、より強力であることから、それはそのような新たな標的で作用する化合物を廃棄したり、無視したり、あるいは検出しない場合に生じ得る。その結果、現在使用されている抗生物質の大半が、より限られた種類の生体経路内の比較的少数の標的分子と相互作用する。

20

【0258】

本発明の感作細胞を使用することで、2通りの方法で上記の問題が解決される。第一に、新標的であるか既知であるがほとんど利用されていない標的であるかを問わず、対象となる標的で作用する所望の化合物を、本発明の感作細胞で試験を行った場合に、そのような所望の化合物の効力における特異的かつ実質的な上昇のため、「旧」標的で作用する化合物の「ノイズ」より上で検出することができる。第二に、対象標的で作用する化合物に対して細胞を感作するのに使用される方法は、同じ生体経路内の他の標的分子で作用する化合物に対してその細胞を感作させる場合もある。例えば、リボソームタンパク質の機能が真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に対して律速となるようなレベルでのリボソームタンパク質をコードする遺伝子の発現は、そのリボソームタンパク質で作用する化合物に対して、リボソームのいずれかの構成要素(タンパク質またはrRNA)で作用する化合物に対して、あるいはさらにタンパク質合成経路の一部である標的で作用する化合物に対して細胞を感作することが予想される。そこで、本発明の重要な利点は、これまで薬物開発方法で容易に利用できなかった新たな標的および経路を明らかできるという点である。

30

【0259】

本発明の感作細胞は、標的分子の活性またはレベルを低下させることで得られる。標的分子は、本明細書に記載の真菌の成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な核酸から産生されるRNAまたはポリペプチドなどの遺伝子産物であることができる。さらに標的は、本明細書に記載の真菌の成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な核酸と同じ生体経路でのRNAまたはポリペプチドであることができる。そのような生体経路には、酵素的、生化学的および代謝的経路ならびに細胞膜などの細胞構造の産生に關与する経路などがあるが、これらに限定されるものではない。

40

【0260】

医化学および複合的化学の分野で現在使用されている方法は、直接結合アッセイおよび細胞に基づいたアッセイなどの各種生物アッセイでの化合物の試験から得られる構造 - 活性相関データを利用することができる。場合により化合物を、十分に強力なアッセイで直接、開発対象薬物として確認する。さらに多くの場合、初回ヒット化合物は中程度または低い効力を示す。ヒット化合物が低または中程度の効力を有することが示されたら、指向的化合物ライブラリーを合成し、試験を行って、より強力な主導的化合物を確認する。そ

50

の指向的ライブラリーは、ヒット化合物と関連するが、各種構造的特徴の付加、削除および置換などの系統的变化を有する構造を持った化合物からなる複合化学ライブラリーである。標的分子に対する活性について試験をする場合、単独または他の特徴との組合せで活性を促進または低下させる構造的特徴を確認する。このデータを用いて、標的分子に対する活性が高い化合物を含むその後の指向的ライブラリーを設計する。このプロセスを1回または数回繰り返した後、標的分子に対してかなり高い活性を有する化合物を確認し、薬物としてさらに開発することができる。選択された標的で作用する化合物はそのような細胞に基づいたアッセイで高い効力を示すことから、このプロセスは本発明の感作細胞を使用することで促進される。そこで、より多くの化合物の特性決定を行って、他の方法で得られると思われるより多くの有用なデータを得ることができる。

10

【0261】

そこで、本発明の細胞に基づいたアッセイを用いて、以前には細胞に基づいたアッセイを用いて容易に利用できなかった標的で作用する化合物など、これまでは容易に確認および特性決定されなかったと考えられる化合物の確認または特性決定を行うことが可能となる。同数の被験化合物の場合に、より多くの構造-機能相関データが明らかになる可能性があることから、初期ヒット化合物から強力な薬物に進展させるプロセスも、本発明の細胞に基づいたアッセイによって大幅に改善される。

【0262】

この細胞感作方法には必ず、好適な遺伝子の選択がある。好適な遺伝子は、感作される細胞の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に発現が必要である遺伝子である。次の段階は、標的のレベルまたは活性を、それが成長、生存、増殖、有毒性または病原性の律速となるレベルまで低下させることができる細胞の取得である。例えば細胞は、選択遺伝子が調節プロモーターの制御下にあるGRACE株であることができる。選択遺伝子から転写されたRNAの量は、調節プロモーターに作用することで、RNAのプロモーター推進転写の活性を変える誘発因子または抑制因子の濃度を変えることによって制限される。そこで、選択遺伝子産物の機能が真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性の律速となるほどのRNAレベルを生じる誘発因子もしくは抑制因子濃度に細胞を曝露することで、その細胞を感作する。

20

【0263】

細胞に基づいたアッセイの1実施形態では、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) の真菌成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な配列が調節プロモーターの制御下にあるGRACE株を、その配列がコードする遺伝子産物の機能が、真菌の成長、生存、増殖、有毒性、または病原性の律速となるようにする濃度の誘発因子もしくは抑制因子の存在下に成長させる。その目標を達成するため、真菌増殖に必要な制限されたレベルの遺伝子産物によって生じる相当する成長阻害に対して誘発因子または抑制因子の各種用量をプロットすることで、誘発因子または抑制因子の成長阻害用量曲線を計算する。この用量-応答曲線から、誘発因子または抑制因子のない成長と比較して1~100%の各種成長速度を与える条件を決定することができる。例えば、調節プロモーターをテトラサイクリンによって抑制する場合、GRACE株を各種レベルのテトラサイクリン存在下に成長させることができる。同様に、誘導性プロモーターを用いることができる。その場合、GRACE株を、各種濃度の誘発因子存在下に成長させる。例えば、成長速度をほとんど低下させない誘発因子または抑制因子の最高濃度を、前記用量-応答曲線から推算することができる。細胞増殖は、OD測定による増殖培地濁度によってモニタリングすることができる。別の例では、成長を25%低下させる誘発因子または抑制因子の濃度を、用量-応答曲線から予測することができる。さらに別の例では、成長を50%低下させる誘発因子または抑制因子の濃度を、用量-応答曲線から予測することができる。さらには、コロニー形成単位 (cfu) などの別の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。

30

40

【0264】

本発明の別の実施形態では、個々の一倍体株を同様に、抗真菌薬または治療薬の検出の

50

ための基礎として用いることができる。この実施形態では、試験微生物(例：表Iに示したアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)または他の一倍体微生物)は、異種調節プロモーターを含むプロモーター置換フラグメントで組換え、遺伝子発現を異種プロモーターによって条件的に調節するようにすることで、1段階で標的遺伝子の単一对立遺伝子を修飾することによって構築された株である。個々の二倍体GRACE株同様、感作単一倍体細胞を全細胞に基づいたアッセイ法で用いて、影響された標的に対する優先的活性を示す化合物を確認することもできる。

【0265】

各種実施形態において、異種プロモーターが比較的低レベルで発現される(すなわち部分的に抑制)第1の組合せの条件下で成長させ、成長程度を測定する。この実験を被験化合物存在下に繰り返し、2回目の成長測定値を得る。そうして、被験化合物の存在下および不在下での成長程度を比較して、第1の指標値を得る。標的遺伝子が第1の組合せの条件よりかなり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回の実験を行う。成長程度を、第2の組合せの条件下に被験化合物の存在下および不在下にて測定して、第2の指標値を得る。次に、第1および第2の指標値を比較する。指標値が実質的に同じである場合、そのデータは被験化合物が試験標的を阻害しないことを示唆している。しかし上記2つの指標値が実質的に異なる場合、データは標的遺伝子産物の発現レベルが被験化合物による阻害程度を決定し得ることを示している。したがって、遺伝子産物とその被験化合物の標的である可能性が高い。複数の感作株の集団またはサブセットを含む全細胞に基づいたアッセイも、例えば一連の96ウェル、384ウェルまたは1586ウェル微量定量プレートでスクリーニングすることができ、各ウェルには感作した個々の株を含有させて、真菌特異的、病原体特異的な所望の生化学的機能、ヒト同族体、細胞局在および信号伝達カスケード標的セットからなる群から選択される標的セットまたはサブセット(これらに限定されるものではない)を含む各影響を受けた標的に対して優先的活性を示す化合物を確認する。

【0266】

アッセイ対象の細胞を、上記測定された濃度の誘発因子または抑制因子に曝露する。この亜致死濃度での誘発因子または抑制因子の存在によって、増殖に必要な遺伝子産物の量を、成長を支持する細胞において最低の量まで低下させる。したがって、この濃度の誘発因子または抑制因子存在下での細胞成長は、対象とする増殖に必要なタンパク質またはRNAの阻害薬に対して、ならびに対象とする増殖に必要なタンパク質またはRNAと同じ生体経路におけるタンパク質またはRNAの阻害薬に対して特異的により感受性が高いが、無関係のタンパク質またはRNAの阻害薬に対しては特異的に感受性が低い。

【0267】

亜阻害濃度の誘発因子または抑制因子で前処理することで、増殖に必要な標的遺伝子産物の量が低下している細胞を用いて、細胞成長を低下させる化合物のスクリーニングを行う。誘発因子または抑制因子の亜致死濃度は、その遺伝子産物が非律速である対照細胞より細胞が感受性が高い候補化合物を確認するためのアッセイの所期の使用と一致する濃度であることができる。例えば誘発因子または抑制因子の亜致死濃度は、成長阻害が少なくとも約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%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または95%強となるようにすることができる。前記の方法を用いて前感作した細胞は、その細胞が野生型細胞より少ない標的タンパク質を含むことから、標的タンパク質に対する感受性が高い。

【0268】

同様の方法を用いて、有毒性または病原性を阻害する化合物を確認することができることは明らかであろう。そのような方法では、有毒性または病原性に関与する律速レベルの遺伝子産物を発現する候補化合物に曝露した細胞の有毒性または病原性を、遺伝子産物レベルが律速でない候補化合物に曝露した細胞の有毒性または病原性と比較する。有毒性ま

たは病原性は、本明細書に記載の方法を用いて測定することができる。

【0269】

本発明の細胞に基づいたアッセイの別の実施形態では、真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物のレベルまたは活性を、真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な配列における温度感受性突然変異などの突然変異ならびに温度感受性突然変異との併用で、増殖に対して律速である真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物レベルを提供する誘発因子または抑制因子レベルを用いて低下させる。突然変異が真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子におけるものである温度感受性突然変異株の許容温度と制限温度の間の中間温度で細胞を成長させることで、成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物の活性が低下した細胞が得られる。誘発因子または抑制因子の濃度を選択して、真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物の活性をさらに低下させる。増殖に必要な遺伝子産物をコードする核酸の発現が低下し、許容温度と制限温度の間の温度で成長する細胞が、真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物の発現が低下しておらず、許容温度で成長する細胞より、被験化合物に対してかなり感受性が高いか否かを測定することで、温度感受性突然変異あるいは誘発因子または抑制因子単独を用いて認められなかった可能性のある薬物を確認することができる。誘発因子または抑制因子単独あるいは温度感受性突然変異単独を用いて以前に認められた薬物も、上記2種類の手法を組合せて細胞で使用した場合に異なる感受性プロファイルを有する場合があります、その感受性プロファイルは、遺伝子産物の1以上の活性の阻害における薬物のより特異的な作用を示す場合がある。

【0270】

温度感受性突然変異は、遺伝子内の各種部位で局在する場合があります、タンパク質の異なる領域内にある場合があります。例えば、大腸菌のdnaB遺伝子は、複製フォークDNAヘリカーゼをコードする。DnaB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領域などのいくつかの領域を有する。DnaBの各種領域における温度感受性突然変異は、制限温度で各種表現型を与え、それにはDNA破壊を伴うまたは伴わないDNA複製における突然の停止または緩やかな停止(Wechsler, J. A. and Gross, J. D. 1971 *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA合成. *Mol. Gen. Genetics* 113: 273-284) および成長または細胞死の終了などがある。したがって、タンパク質の各種領域における温度感受性突然変異を、タンパク質の発現が調節プロモーターの制御下にあるGRACE株と組合せて使用することができる。

【0271】

上記の方法を、真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物の活性またはレベルを低下させるがなくすものではない突然変異を用いて行うことができることは明らかであろう。

【0272】

真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物に対して抗菌剤のスクリーニングを行う場合、その遺伝子産物を限られた量で含む細胞の成長阻害、有毒性または病原性のアッセイを行うことができる。成長阻害は、実験サンプルと対照サンプルの間で、未接種増殖培地と比較した培養物の光学密度によって測定される成長量を直接比較することで測定することができる。別の細胞増殖アッセイ方法には、緑色蛍光タンパク質(GFP)レポーター構築物放出の測定、各種酵素的活性アッセイおよび当業界で公知の他の方法などがある。有毒性および病原性は、本明細書に記載の方法を用いて測定することができる。

【0273】

上記の方法は、固相、液相、その2種類の培地の組合せまたはin vivoで行うことが可能であることは明らかであろう。例えば、増殖に必要な遺伝子産物を発現するのに用いられる調節プロモーターで作用する誘発因子または抑制因子を含む栄養寒天で成長させた細胞を、寒天表面にスポット添加した化合物に曝露させることができる。化合物の効果は、

生じる殺菌ゾーンの直径、細胞が成長しない化合物添加箇所周囲の面積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、多チャンネルピペット（例：Beckman Multimek）および多チャンネルスポッタ（例：Genomic Solutions Flexys）など（これらに限定されるものではない）の自動および半自動装置を用いて同時に調べることができる。このようにして、複数のプレートおよび数千ないし数百万個の化合物を1日に調べることができる。

【0274】

化合物はまた、以下に記載の微量定量プレートを用いて完全に液相で調べる。液相スクリーニングを、1個の微量定量プレート当たり96、384、1536またはそれ以上のウェルを有する微量定量プレートで行って、1日に複数のプレートおよび数千ないし数百万の化合物のスクリーニングを行うことができる。試薬添加（例：細胞および化合物）および細胞密度測定用に自動および半自動装置を用いる。

10

【0275】

化合物についてはさらに、本明細書に記載の方法を用いて *in vivo* で試験を行う。

【0276】

上記各細胞に基づいたアッセイを用いて、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 遺伝子産物に対して相同性であるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の微生物からの遺伝子産物の活性を阻害する化合物を確認することができることは明らかであろう。例えば、標的遺伝子産物は、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigeli*)、リゾプス・アルルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*) またはアブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*) などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) または上記いずれかの菌種の属に属する菌種などの植物性真菌病原体からのものであることができる。一部の実施形態において遺伝子産物は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の微生物からのものである。

20

30

【0277】

5.5.2.1 GRACE株を用いる細胞に基づいたアッセイ

真菌の成長、生存、増殖、有毒性または病原性に必要な遺伝子の一方の対立遺伝子が失活し、他方の対立遺伝子が調節プロモーターの制御下にあるGRACE株は、本明細書に記載の方法を用いて構築される。この例に関して、調節プロモーターは本明細書に記載のテトラサイクリン調節プロモーターであることができるが、いずれの調節プロモーターも使用可能であることは明らかであろう。

40

【0278】

本発明の1実施形態においては、個々のGRACE株を、二倍体病原性真菌細胞に対して活性化治療薬の検出のための基礎として用いる。この実施形態では、試験微生物は、遺伝子の第1の対立遺伝子が発現可能な優性選択マーカーをコードするヌクレオチド配列の挿入またはそれによる置換によって失活しており、第2の対立遺伝子が組換えによって修飾されて、第2の対立遺伝子が異種プロモーターの制御された発現下にある修飾対立遺伝子対を有するGRACE株である。この試験GRACE株を、異種プロモーターが比較的低レベルで発現

50

される（「抑制」）第1の組合せの条件下で成長させ、成長程度を測定する。この測定は、光学密度、ペレット化細胞の湿重量、総細胞数、生存数、DNA含有量などの当業者には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、被験化合物存在下で行い、第2回の成長測定値を得る。指標値によって簡便に表すことができる被験化合物の存在下および不在下での成長の程度を比較する。成長値または指標値の程度における相違によって、被験化合物が標的必須遺伝子産物と相互作用することができる指標が得られる。

【0279】

さらに多くのデータを得るため、異種プロモーターの制御下、第2の対立遺伝子が上記の第1の組合せの条件の場合よりかなり高いレベルで発現される第2の組合せの「非抑制」成長条件を用いて、さらに別の2種類の実験を行う。成長値または指標値の程度を、この第2の組合せの条件下に、被験化合物の存在下および不在下で測定する。被験化合物の存在下および不在下での成長値または指標値の程度を比較する。成長値または指標値の程度における相違は、標的必須遺伝子産物と相互作用可能性の指標を与える。

【0280】

さらに、第1および第2の成長条件での成長程度も比較することができる。成長程度が実質的に同じである場合、そのデータは、調べたGRACE株が有する修飾対立遺伝子対がコードする遺伝子産物を被験化合物が阻害しないことを示唆する。しかし、成長程度が実質的に異なる場合、そのデータは、対象遺伝子産物の発現レベルが被験化合物による阻害の程度を決定し得ることを示す。したがって、対象遺伝子産物とその被験化合物の標的であると考えられる。

【0281】

各GRACE株を個別に調べることができるが、GRACE株集団のセットまたはサブセットを1回でスクリーニングするのがより有効である。したがって本発明の1態様においては、アレイを構成することができ、例えば一連の96ウェル微量定量プレートで、各ウェルが1種類のGRACE株を有するようにする。ある代表的な手法では（それに限定されるものではないが）、2つのプレート対を有する4個の微量定量プレートを用い、一方の対における増殖培地が、他方のプレート対における培地より、各株での残りの活性対立遺伝子を制御する異種プロモーターを多く発現させるようにする。各プレート対の1個のプレートに被験化合物を補給し、各GRACE株の成長測定値を、各被験単離物についての指標値を得るための標準法を用いて求める。そのような治療薬スクリーニング法で使用される二倍体病原性GRACE株の集団は、例えば微生物の全ての修飾対立必須遺伝子対の実質的に全ての群を含むことができ、その微生物または集団の全ての修飾対立必須遺伝子対の実質的に全ての群は、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、細胞局在および信号伝達カスケード標的群からなる群（これらに限定されるものではない）から選択されるGRACE株のサブセットから選択することができる。

【0282】

GRACE株を、ある範囲のテトラサイクリン濃度を有する培地で増殖させて、各株について成長阻害用量 - 応答曲線を得る。最初に、GRACE株のシード培養物を適切な培地で増殖させる。次に、シード培養物のアリコートを含む濃度のテトラサイクリンを含む培地で希釈する。例えばGRACE株を、テトラサイクリンの2倍連続希釈液を含む2連の培地で増殖させることができる。さらに、対照細胞をテトラサイクリン不在下で2連で増殖させる。対照培養物は、対象のGRACE株の同じ初期シード培養物由来の等量の細胞から開始する。細胞を適切な期間増殖させ、成長程度を適切な方法を用いて測定する。例えば成長程度は、培養物の光学密度を測定することで求めることができる。対象培養物が中間対数期（mid-log phase）に達したら、各テトラサイクリン含有培養物についての成長パーセント（対象培養物に対して）を、テトラサイクリンの対数濃度に対してプロットして、テトラサイクリンに関する成長阻害用量 - 応答曲線を得る。0 mMのテトラサイクリン対照（0%成長阻害）と比較して細胞成長を50%阻害するテトラサイクリン濃度（ IC_{50} ）を、その曲線から計算する。別の成長測定方法も想定される。その方法の例としては、操作により被験細胞で発現され、その発現を容易に測定可能なタンパク質の測定などがある。そのような

10

20

30

40

50

タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）および各種酵素などがある。

【0283】

細胞を選択濃度のテトラサイクリンで前処理してから、候補化合物に対する細胞群の感受性を調べるのに使用する。例えば細胞を、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%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または95%強だけ成長を阻害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。次に、細胞を候補化合物と接触させ、テトラサイクリン含有培地での細胞の成長を、テトラサイクリンを含まない培地での対照対照の成長と比較して、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増殖させた細胞）の成長を阻害するか否かを確認する。例えば、テトラサイクリン含有培地での細胞の成長を、テトラサイクリンを含まない培地での細胞の成長と比較して、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増殖させた細胞）の成長を、テトラサイクリン不在下で成長させた細胞の成長を候補化合物が阻害するより大きい程度に阻害するか否かを確認する。例えば、感作細胞（すなわち、テトラサイクリン存在下で増殖させた細胞）と非感作細胞（すなわち、テトラサイクリン不在下で増殖させた細胞）との間で成長に有意差が認められる場合、その候補化合物を用いて微生物の増殖を阻害することができるか、あるいはその微生物の成長、生存または増殖を阻害するさらに高い能力を有する化合物の確認をさらに至適化することができる。

10

【0284】

同様に、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物を律速量で発現する候補化合物に曝露した細胞の有毒性または病原性を、有毒性または病原性に必要な遺伝子産物の発現レベルが律速量ではない候補化合物に曝露された細胞の有毒性または病原性と比較することができる。そのような方法では、試験動物にGRACE株を接種し、所望量のテトラサイクリンおよび候補化合物を含む飼料を摂取させる。そうして、試験動物を感染させたGRACE株は、律速量の有毒性または病原性に必要な遺伝子産物を発現する（すなわち、試験動物におけるGRACE細胞を感作する）。対照動物にGRACE株を接種し、候補化合物を含有するがテトラサイクリンを含有しない飼料を摂取させる。試験動物におけるGRACE株の有毒性または病原性を、対照動物におけるものと比較する。例えば、試験動物におけるGRACE株の有毒性または病原性を、対照動物におけるものと比較して、候補化合物が感作GRACE細胞（すなわち、飼料がテトラサイクリンを含んでいた動物における細胞）の有毒性または病原性を、飼料にテトラサイクリンが含まれていなかった動物で候補化合物がGRACE細胞の成長を阻害する程度より高い程度まで阻害するか否かを確認することができる。例えば、感作GRACE細胞（すなわち、飼料がテトラサイクリンを含んでいた動物における細胞）と非感作細胞（すなわち、飼料がテトラサイクリンを含まなかった動物における細胞）との間で成長に有意差が認められる場合、その候補化合物を用いて、微生物の誘導性または病原性を阻害することができるか、あるいは微生物の有毒性または病原性を阻害する能力がさらに高い化合物の確認をさらに至適化することができる。有毒性または病原性は、本明細書に記載の方法を用いて測定することができる。

20

30

【0285】

上記細胞に基づいたアッセイを用いて、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）遺伝子産物に対して相同性であるカンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）以外の微生物からの遺伝子産物の活性を阻害する化合物を確認することができることは明らかであろう。例えば、前記遺伝子産物は、アスペルギルス・フミガツス（*Aspergillus fumigatus*）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）、アスペルギルス・フラビス（*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 kruselii*）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ（*Cryptococcus neoformans*）、コクシジオイデス・イミチス（*Coccidioides immitis*）、エキソファリア・デルマティディティス（*Exophiala dermatitidis*）、フサリウム・オキシスポルム（*Fusarium oxysporum*）、ヒ

40

50

ストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigelii*)、リゾプス・アルルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、ムコール・ルキシシー (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*) またはアブシディア・コリムピゲラ (*Absidia corymbigera*) などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) または上記いずれかの菌種の属に属する菌種などの植物性真菌病原体からのものであることができる。一部の実施形態において遺伝子産物は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の微生物からのものである。 10

【0286】

上記の細胞に基づいたアッセイを用いて、真菌の増殖、有毒性または病原性に必要な核酸あるいは核酸などの遺伝子産物が関わる生体経路を確認することもできる。そのような方法では、真菌の増殖、有毒性もしくは病原性に必要な律速レベルの標的核酸を発現する細胞および標的核酸の発現が律速レベルではない対照細胞を、各種経路で作用することが知られている抗生物質群と接触させる。抗生物質が、標的核酸またはその遺伝子産物が関わる経路で作用する場合、標的核酸の発現が律速レベルである細胞は、標的核酸の発現が律速レベルではない細胞より、抗生物質に対する感受性が高い。 20

【0287】

対照として、標的遺伝子などの、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な多くの異なる遺伝子レベルが律速である細胞群と接触させることで、アッセイ結果を確認することができる。抗生物質が特異的に作用している場合、標的遺伝子が律速レベルである細胞（または標的遺伝子と同じ経路の遺伝子が律速レベルである細胞）でのみ抗生物質に対する高い感受性が認められ、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な遺伝子産物が律速レベルである細胞では一般的に認められない。 20

【0288】

増殖、有毒性もしくは病原性に必要な核酸が関わる生体経路を確認するための上記方法は、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 核酸と相同性であるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の微生物からの核酸に適用することができることは明らかであろう。例えばその核酸は、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatiditis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigelii*)、リゾプス・アルルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、ムコール・ルキシシー (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*) またはアブシディア・コリムピゲラ (*Absidia corymbigera*) などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) または上記いずれかの菌種の属に属する菌種などの植物性真菌病原体からのものであることができる。一部の実施形態において前記核酸は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の微生物からのものである。 30 40

【0289】

同様に、上記方法を用いて、被験抗生物質などの被験化合物が作用する経路を確認する 50

ことができる。遺伝子産物が既知経路に関わっている、それぞれが真菌の増殖、有毒性もしくは病原性に必要な律速量の遺伝子産物を発現する細胞群を、作用する経路を確認することが望ましい化合物と接触させる。細胞群の被験化合物に対する感受性を、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な遺伝子産物をコードする核酸の発現が律速レベルである細胞および増殖、有毒性もしくは病原性に必要な遺伝子産物の発現が律速レベルではない対照細胞において求める。被験化合物が増殖、有毒性または病原性に必要な特定の遺伝子産物が関わる経路で作用する場合、その特定の遺伝子産物の発現が律速レベルである細胞は、他の経路での遺伝子産物が律速レベルである細胞より、化合物に対する感受性が高い。さらに、真菌の増殖、有毒性または病原性に必要な特定遺伝子の発現が律速レベルではない対照細胞は、その化合物に対して高い感受性を示さない。このようにして、被験化合物が作用する経路を確認することができる。

10

【0290】

被験化合物が作用する経路を確認するための上記方法を、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 遺伝子産物と相同性である遺伝子産物の活性またはレベルが律速レベルである細胞群を用いることで、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の微生物に適用できることは明らかであろう。例えば、その遺伝子産物は、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigeli*)、リゾプス・アルルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*) または アブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*) などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) または上記いずれかの菌種の属に属する菌種などの植物性真菌病原体からのものであることができる。一部の実施形態において前記遺伝子産物は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の微生物からのものである。以下の示す実施例6.4は、そのようなアッセイを行う1法について説明するものである。

20

30

【0291】

当業者であれば、真菌の増殖、有毒性もしくは病原性に必要な遺伝子産物を律速レベルで産生するのに用いられる誘発因子もしくは抑制因子の濃度などのアッセイ条件および/またはそのアッセイに用いられる成長条件 (例: インキュベーション温度および培地成分) をさらに至適化することで、示される抗生物質感作の選択性および/または強さをさらに高めることが可能であることは明らかである。

40

【0292】

成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な遺伝子が関わる経路または抗生物質が作用する経路を確認するための上記方法を、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 遺伝子産物と相同性である遺伝子産物が律速レベルであるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 以外の微生物を用いて行うことができることは明らかであろう。例えばその遺伝子産物は、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・

50

イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*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 (*Trichosporon beigeli*)、リゾプス・アルルヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、ムコール・ルキシー (*Mucor rouxii*)、リゾムコール・プシラス (*Rhizomucor pusillus*) または アブシディア・コリムビゲラ (*Absidia corymbigera*) などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、うどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recodita*)、コムギ葉枯病菌 (*Septoria triticii*)、オオムギなまぐさ黒穂病菌 (*Tilletia controversa*)、黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) または上記いずれかの菌種の属に属する菌種などの植物性真菌病原体からのものであることができる。一部の実施形態において前記遺伝子産物は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 以外の微生物からのものである。

10

【0293】

さらに、上記で議論したように、GRACE株群を用いて、作用機序未知の抗生物質などの、必須生体経路に影響する何らかの化合物の介入箇所の特性決定を行うことができる。

【0294】

本発明の別の実施形態は、被験抗生物質化合物が活性である生体経路の決定方法であって、真菌の成長、生存、増殖、有毒性もしくは病原性に必要な経路に関与するタンパク質の核酸の活性を、そのタンパク質もしくは核酸に対して作用する亜致死濃度の既知抗生物質と細胞を接触させることで低下させる方法である。その方法は、GRACE株において律速量で遺伝子産物を発現することで真菌の増殖、有毒性もしくは病原性に必要な遺伝子産物の活性またはレベルを低下させるのではなく、遺伝子産物の活性またはレベルを、その遺伝子産物に対して作用する亜致死レベルの既知抗生物質を用いて低下させる以外、被験抗生物質がどの経路に作用するかを決定するための上記方法と類似している。

20

【0295】

亜致死濃度の既知抗生物質が存在することで生じる成長阻害は、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%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または95%強であることができる。

30

【0296】

別法として、成長阻害を測定するのではなく、標的の増殖に必要な遺伝子産物の活性を測定することで、前記既知抗生物質の亜致死濃度を求めることができる。

【0297】

亜致死レベルの既知抗生物質群の各薬物と各種濃度の被験抗生物質とを組合せたものと、細胞を接触させる。対照として、その細胞を各種濃度の被験構成物質のみと接触させる。前記の既知抗生物質の存在下および不在下での被験抗生物質の IC_{50} を求める。前記既知薬物の存在下および不在下での IC_{50} が実質的に同様である場合、被験薬物と既知薬物は異なる経路に作用している。その IC_{50} 値が実質的に異なる場合、被験薬物と既知薬物は同じ経路に作用している。

40

【0298】

同様の方法を、本明細書に記載のカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 配列と相同性の遺伝子産物に作用する既知抗生物質を用いて行うことができる。その相同性遺伝子産物は、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フラビス (*Aspergillus flavis*)、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・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、エキソファリア・デルマティディティス (*Exophiala dermatitidis*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、ヒストプラズマ・カプスラータム (*Hist*

50

oplasma 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(Trichosporon beigelii)、リゾプス・アルルヒズス(Rhizopus arrhizus)、ムコール・ルクシー(Mucor rouxii)、リゾムコール・プシラス(Rhizomucor pusillus)またはアブシディア・コリムビゲラ(Absidia corymbigera)などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌(Botrytis cinerea)、うどんこ病菌(Erysiphe graminis)、イネいもち病菌(Magnaporthe grisea)、コムギ赤さび病菌(Puccinia recodita)、コムギ葉枯病菌(Septoria triticii)、オオムギなまぐさ黒穂病菌(Tilletia controversa)、黒穂病菌(Ustilago maydis)または上記いずれかの菌種の属に属する菌種などの植物性真菌病原体からのものであることができる。一部の実施形態において前記遺伝子産物は、サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)以外の微生物由来のものである。

10

【0299】

本発明の他の実施形態は、抗生物質として使用するための候補化合物を同定する方法であり、該方法においては、細胞を標的タンパク質または核酸に対して作用する公知の抗生物質の致死量以下の濃度に接触させることによって、真菌の増殖、毒性または病原性に必要な経路に關与する標的タンパク質または核酸の活性を減じる。この方法は、遺伝子産物の律速濃度を発現するGRACE株を用いて増殖、ビルレンスまたは病原性に要求される遺伝子産物の活性または濃度を減じるよりもむしろ、遺伝子産物活性または濃度が、増殖に必要な遺伝子産物に対して作用する知られた抗生物質の致死量以下の濃度を用いて減少することを除いて、抗生物質として使用する候補化合物を同定する上記のものと類似する。

【0300】

20

知られた抗生物質の致死量以下の濃度による増殖阻害は、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%、少なくとも約75%、又はそれ以上であり得る。

【0301】

あるいは、公知の抗生物質の致死量以下の濃度は、増殖阻害を測定するよりもむしろ、標的増殖に必要な遺伝子産物の活性を測定することにより決定できる。

【0302】

目的の試験化合物を特性評価するために、細胞を、致死量以下の濃度の公知の抗生物質のパネル、及び1つ以上の濃度の試験化合物と接触させる。対照として、細胞を、同一濃度の試験化合物単独と接触させる。公知の抗生物質の存在下及び不在下における試験化合物の IC_{50} を測定する。試験化合物の IC_{50} が、公知の薬物の存在下及び不在下で実質的に異なる場合、該試験化合物は、抗生物質としての使用するための良好な候補物質となる。既に考察したように、候補化合物が上記の方法を用いて同定されると、その構造を、コンビナトリアルケミストリーなどの標準方法を用いて最適化し得る。

30

【0303】

同様の方法が、本明細書に記載されたカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)配列と相同の遺伝子産物に作用する公知の抗生物質を用いて実施できる。相同遺伝子産物は、アスペルギルス・フミガツス(Aspergillus fumigatus)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・フラビス(Aspergillus flavis)、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・ネオフォルマンズ(Cryptococcus neoformans)、コクシジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis)、エキソファリア・デルマティディティス(Exophiala dermatiditis)、フサリウム・オキシスポルム(Fusarium oxysporum)、ヒストプラズマ・カプスラータム(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(Trichosporon beigelii)、リゾプス・アルルヒズス(Rhizopus arrhizus)、ムコール・ルクシー(Mucor rouxii)、リゾムコール・プシラス(Rhizomucor pusillus)またはアブシディア・コリムビゲラ(Absidia corymbigera)などの動物性真菌病原体あるいは灰色かび病菌(Botrytis cinerea)、うどんこ病菌(Erysiphe graminis)、イネいもち病菌(

40

50

Magnaporthe grisea)、コムギ赤さび病菌(Puccinia recondita)、コムギ葉枯病菌(Septoria triticii)、オオムギなまぐさ黒穂病菌(Tilletia controversa)、黒穂病菌(Ustilago maydis)などの植物性真菌病原体、または上記種のいずれかの属に入る任意の種に由来するものであってもよい。幾つかの実施形態において、遺伝子産物は、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)以外の生物に由来する。

【0304】

代表的な標的遺伝子産物は、CaTBF1によりコードされる。多くの特徴により、このC.albicans遺伝子産物が貴重な薬物標的となる。第1に、CaTBF1によりコードされるタンパク質は、その活性を阻害する化合物の*in vitro*の高スループットスクリーニングと適合する。全細胞アッセイにおいて、この遺伝子産物の改変発現を*in vitro*アッセイと平行して行うことにより、同定される阻害化合物として可能性ある物質のスペクトルを広げることができる。さらに、CaTbf1pと染色体テロメラーゼとの間の予想された物理的相互作用の証拠は、薬物スクリーニングのためのルーハイブリッドアッセイの開発に使用できた。最後に、CaTBF1が真菌特異的遺伝子であることから、そのヌクレオチド配列は、真菌感染に対するPCRに基づく診断手段の設計に寄与することができた。

10

【0305】

好ましい薬物標的を表すGRACE誘導収集株に含まれる、他に確認された薬物標的には、以下のC.albicans遺伝子によりコードされた産物が含まれる：CaRHO1、CaERG8、CaAUR1およびCaCHO1、並びに配列番号：1~62によりコードされるものである。本発明のGRACE法を用いてこれらの遺伝子を操作する能力は、これら重要な遺伝子産物の阻害剤を同定するために設計された、現在使用されている薬物スクリーニングの実務を改善することとなる。

20

【0306】

本発明の他の実施形態において、病原体に対する薬物標的でありうるものは、例えば光学密度又は遠心分離後のペレットサイズにより測定される増殖を各ウェルごとに測定できる96ウェルマイクロタイタープレートフォーマットを用いて、化合物のライブラリーに対して同時にスクリーニングできた。薬物スクリーニングのためのゲノム法は、どの標的をスクリーニングすべきかの評価において用いられる潜在的に恣意的かつ人為的な基準に頼ることをやめ、その代わり全ての可能性のある標的をスクリーニングすることを可能にする。この方法は、好ましい過程(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可能性を提供するのみならず、そのライブラリー内の全ての殺真菌性化合物を確認する可能性並びにこれらをコグネイト細胞標的と結合する可能性も提供する。

30

【0307】

本発明のさらに他の実施形態において、GRACE株をスクリーニングして、総合的な致死性変異を同定でき、それによって重要な治療的価値を有する薬物標的の潜在的な新規クラスを発見することができた。例えば、2種の分離遺伝子は、共通かつ本質的な細胞機能に關与する相同タンパク質をコードし、この機能の本質的性質は、双方のファミリーのメンバーを不活化したときにのみ明らかとなる。したがって、各遺伝子のヌル表現型を別々に試験しても、組合わされた遺伝子産物の本質を明らかにされず、その結果、この潜在的薬物標的は同定されない。遺伝子産物が、互いに高度相同であれば、1つのファミリーのメンバーを阻害すると判った化合物は、他のものを阻害する可能性が高く、したがって、遺伝学的に示された総合的増殖阻害に近似するものと予想される。しかしながら、他の場合、総合的な致死性は、表面上無関係な(また、しばしば非本質的な)プロセスを明らかにするが、これらを組合せると、相乗的増殖障害(細胞死)を生じる。例えば、S.cerevisiae遺伝子RVS161の破壊は、この単独変異を有する酵母において認識可能な栄養繁殖のいかなる増殖表現型をも示さないが、少なくとも他の9種の遺伝子はRVS161の不活化と組合せると総合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、細胞骨格構築およびエンドサイトーシスからシグナル導入および脂質代謝までの範囲の過程に關与し、組合せの薬物標的ストラテジーを追跡する複数の手段を同定する。必須のお

40

50

よび非必須の薬物標的による総合的致死性相互作用を明らかにする直接的方法が実施され、該方法においては、薬物標的に対する活性を減じたレベルで発現することではなく、その変異が第2の薬物標的の阻害と組合せて総合的に致死性となることによって、GRACE株またはヘテロ接合体株は、試験化合物に対して増強された感受性を示すものとして同定される。該化合物が、感作GRACE株またはヘテロ接合体の薬物標的を特異的に阻害するか否か、又は第2の標的化が全GRACE株又はヘテロ接合体株をスクリーニングすることによって達成されるかを認識することにより、該化合物に対して等しいかまたはより大きな感受性を示す追加の変異株を設定し、次いで2つの変異間で総合的致死性を示す二重変異株の遺伝学的特性評価を行う。

【0308】

10

5.5.2.2 GRACE株による非抗真菌性治療剤のスクリーニング

病原性の真菌とそれ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は、臨床上有用な抗有糸核分裂化合物の範囲を限定する。しかし、この類似性は、GRACE株集団を用いて開発され、抗真菌剤として使用されないが、癌、炎症などの幅広い疾病の治療に有用な治療剤の発見を促進できる。

【0309】

本発明のこの実施形態において、動物または植物における疾病発生遺伝子に相同な真菌遺伝子が選択され、この一連の遺伝子のGRACE株は、これら遺伝子産物に対して強力かつ特異的なバイオアベイラビリティを示す化合物の同定に使用され、したがって疾病治療において潜在的な医薬上の価値を有する。必須および非必須の遺伝子並びにこのような遺伝子の修飾対立遺伝子対を担持する対応するGRACE株は、本発明のこの実施形態において有用である。C. albicansゲノム内に見出された40%もの遺伝子は、ヒトの機能性相同物を共有することが予知されている。またヒト遺伝子の1%程度がヒトの疾病に関与し、したがって潜在的な薬物標的として機能すると予知されている。したがって、GRACE株集団内の多くの遺伝子は、疾病を引き起こすヒト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化する化合物は、実際に別の治療的価値を有する。本発明は、修飾対立遺伝子が、動物または植物の1種以上の疾病に関連する遺伝子と、配列類似性、構造的類似性および/または機能的類似性を共有する真菌遺伝子であるような、複数のGRACE株を提供する。

20

【0310】

30

例えば、細胞サイクルの進行を促進し、種々の癌においてしばしば損動するシグナル伝達機構の多くが、真菌類において保存されている。これら遺伝子の多くは、サイクリン、サイクリン依存キナーゼ類(CDK)、CDK阻害剤、ホスファターゼ類並びに構造的および機能的に関連する転写因子をコードする。その結果、これらの機能的タンパク質のクラスの中の任意のものに特異性を示すことが判った化合物は、潜在的抗癌活性に関して試験する第2のスクリーニングにより評価できた。しかし、この方法で同定された細胞毒性化合物は、治療上の可能性を示すために、癌を引き起こす標的に作用させる必要はない。例えば、乳癌および卵巣癌の治療薬として有望である抗癌化合物のタキソールファミリーは、チューブリンと結合し、微小管の構築を促進し、それにより通常の微小管動態を破壊する。酵母チューブリンは、タキソールに対し同様の感受性を示し、これは、酵母とヒトとの間で共有される他の基本的細胞過程に影響を与える追加の化合物を同様に同定でき、抗腫瘍活性を評価できることを示唆する。

40

【0311】

異常発生現象は、微生物の分類境界をはるかに超えて拡大し、究極的には基礎的な生理学を反映する。多くの点、癌の現象は、C. albicansなどの日和見病原体による異常発生の過程と類似している。両者は、体自体の細胞または天然動物相に由来する微生物のいずれかにより発生した非感染性の疾病である。これらの細胞は、免疫系によりチェックされない挙動で増殖し、両者の場合において、疾病は、生体器官の転移増殖および最終的には死に至る組織損傷により発現する。主に、両者の場合の原因因子が宿主に対して高度な関連性を有することから、両者の疾病に関して、有効な薬物に基づく治療は、わかりにくい

50

【0312】

実際、癌に無関係な過程に影響を与える多くの成功した治療薬はまた、抗真菌薬スクリーニングプログラムを通して発見されている。化合物のうち1つの临床上重要なクラスには、保存されたシグナル伝達構成要素を阻害する免疫抑制薬分子であるラパマイシン、シクロスポリンAおよびFK506が含まれる。シクロスポリンAおよびFK506は、カルシウムおよびカルモジュリン依存ホスファターゼ、カルシネウリンの調節サブユニットと結合し不活化する別個の薬物-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)を形成する。ラパマイシンはまた、FKBP12と複合体化するが、しかしこの薬物-タンパク質複合体はまた、ホスファチジルイノシトールキナーゼ類のTORファミリーに結合して、翻訳および細胞サイクル進行を阻害する。各場合において、薬物作用および薬物標的自身両方の機構は、酵母からヒトまで高度に保存されている。

10

【0313】

*C. albicans*標的薬物の同定、および標的を必須遺伝子、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は、これら標的の任意の個々のメンバーと相互作用し、これを阻害する化合物についての全細胞スクリーニングを開発するための基礎を提供する。したがって、同様の分析を使用して、他の特異的な共通の機能または特性を有する薬物標的をコードする改変対立遺伝子対を有するGRACE株の他のセットを同定できる。例えば、ヒト遺伝子に対して高度に相同な遺伝子標的、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作用、生合成、分子輸送(輸送体活性)、細胞局在化、シグナル伝達カスケード、細胞サイクル制御、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んで成るGRACE株のサブセットを確立できる。生化学的機能の例示リストを第5.4.3節に示す。

20

【0314】

5.5.2.3 標的遺伝子投与に基づく全細胞アッセイ

そこから遺伝子機能を推測し得る表現型を示すコード遺伝子の発現レベルを調節することを含む実験は、本発明の株と方法を用いてカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)などの病原性二倍体真菌類において実施できる。薬物スクリーニングの薬物-標的-レベルの変異の原理は、薬物標的の発現レベルを変動させて特定の薬物耐性または薬物感受性の表現型を同定すること、それにより薬物標的を特定の化合物に結合させることを含む。多くの場合、これらの表現型は、この化合物の実際の薬物標的をコードする標的遺伝子の指標となる。これがあてはまらない例の場合、それでもなお候補標的遺伝子は、該化合物により阻害されたもの(例えば、総合的表現型の産生)に関連する経路または過程のいずれかにおいて機能するか、またはその代わりに同定化合物に関連する薬物耐性機構として機能する真の標的遺伝子についての重要な洞察を提供し得る。

30

【0315】

標的タンパク質の発現レベルの変動はまた、薬物スクリーニングおよび薬物標的の双方に取り入れられる。二倍体生物における遺伝子産物の全細胞発現レベルは、その産物をコードする遺伝子の1種の対立遺伝子を破壊させることにより改変され、それにより“ハプロインサフィシエント”表現型が生じ、その機能活性が半分に減じる。ヘテロ接合体*S. cerevisiae*株集団は、このようなハプロインサフィシエントスクリーニングに用いられ、薬物に基づく耐性および過敏性の表現型をヘテロ接合体薬物標的に結びつける。非必須遺伝子は、一倍体欠失株集団を用い、特定の表現型または“化学型”について化合物ライブラリーに対して直接スクリーニングする。しかし、この方法は、標的遺伝子が必須である二倍体生物に用いることはできない。

40

【0316】

所定の遺伝子産物の発現レベルはまた、遺伝子を、細胞内に多コピーで維持されるプラスミドベクターにクローン化することにより上昇する。コード遺伝子の過剰発現は、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る

50

より強力なプロモーターと融合することによっても達成される。これらの方法を用いて、多くの過剰発現スクリーニングが*S. cerevisiae*に使用されて成功を治め、特性評価された薬物標的と相互作用する新規化合物を発見すると同時に、既存の治療用化合物が結合したタンパク質標的が同定された。

【0317】

G R A C E 株集団は、薬物標的についての劇的な範囲の遺伝子発現レベルを、病原体内に直接供することにより、全細胞薬物スクリーニングにおける*S. cerevisiae*の代用的使用を排除する(図5)。本発明の一実施形態では、これは、G R A C E 株を構築するための*C. albicans*適応テトラサイクリンプロモーター系を用いて達成される。非抑制条件下(すなわちテトラサイクリンの無い)で増殖した30種の異なるG R A C E 株のノーザン法解析は、試験した条件付き発現遺伝子の83%が、野生型の3倍以上の過剰発現レベルを維持し、および試験した全ての遺伝子の60%が、G R A C E 株構築に用いられた野生型*C. albicans*株の5倍以上の発現を示した。各G R A C E 株が、実際はヘテロ接合体であるので、それぞれヘテロ接合体株と比較すると、発現範囲は恐らく2倍になる。したがってほとんどのG R A C E 株について、これは、標準の2 μ に基づく多コピープラスミドを用いて*S. cerevisiae*において典型的に達成されるものに匹敵する上昇した発現レベルを表し、CaACT1プロモーターにより供されたものと同等の構成的発現の絶対レベルを表す。したがって、本発明のG R A C E 株集団は、抑制条件下での標的確認に有用であるのみならず、全細胞アッセイ開発および薬物スクリーニングのための、非抑制条件下で同様に確認された薬物標的を過剰発現する株の集団としても有用である。

10

20

【0318】

G R A C E 株における標的遺伝子産物の発現レベルの変異はまた、抗真菌性化合物に対する耐性を探索するのに用いられる。既存の抗真菌治療薬に対する耐性は、限定された数の利用できる抗真菌薬物、および臨床医がそれらを処方する際にもつ不安にさせる依存性と信頼性の双方を反映する。例えば、真菌感染の治療のためのフルコナゾールなどのアゾールベース化合物への依存症は、この化合物の臨床治療上の価値を劇的に削減した。G R A C E 株集団は、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を除去するのに用いられる。このような産物を同定して、フルコナゾールと一緒に不活化される際に、相乗効果をもたらし、それにより、この化合物が単独で使用される際に見られるフルコナゾール耐性に打ち勝つ薬物標的を同定する。例えば、これは、G R A C E 株集団を用い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。このような遺伝子には、ATP-結合カセット(ABC)輸送体、および多剤耐性(MDR)流出ポンプ、多形質発現性薬物耐性(PDR)転写因子、並びにプロテインキナーゼおよびホスファターゼなどの新規または既知の原形質膜エクスポーターが含まれる。あるいは、示差的薬物感受性を特異的に示す遺伝子は、標的セットの個々のメンバーを減少したレベル(テトラサイクリンプロモーターによるハプロインサイフェンセントリー発現または閾値発現のいずれかによる)で発現するG R A C E 株をスクリーニングすることにより同定される。このような遺伝子を同定することにより、既存の抗真菌治療薬の効力を増強するための薬物に基づく不活化に目標を定めることができる薬物耐性機構に対し重要な手がかりを提供する。

30

40

【0319】

本発明の他の態様において、全細胞アッセイを目的とする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り支持される(5.3.1節参照)。例えば、CaPGK1プロモーターは、*C. albicans*薬物標的遺伝子を過剰発現させるのに用いられる。*S. cerevisiae*において、PGK1プロモーターは、グルコース存在下、強力な構成的発現をもたらすことが知られている。Guthrie、C.、およびG. R. Fink、1991年、Guide to yeast genetics and molecular biology、Methods Enzymol. 194: 373~398を参照。CaPGK1プロモーター(CaKRE9、CaERG11、CaALG7、CaTUB1およびCaAUR1)の制御下に置かれた5種の*C. albicans*

50

遺伝子の予備的解析は、ノーザンブロット解析により判定したところ、野生型に対し劇的な過剰発現を示した。全ての遺伝子において達成された過剰発現のレベルは、テトラサクリンプロモーターにより得られたものを3～4倍上回る。さらに、テトラサクリンプロモーターを用いて構成的に発現された際に、有意に過剰発現されなかったCaAUR1は、野生型CaAUR1発現レベルに相対して5倍過剰発現され、CaPGK1プロモーターは、テトラサクリンプロモーターにより通常過剰発現しない遺伝子を過剰発現するのに有用であることを示唆した。

【0320】

本発明の他の態様において、GRACE株集団内の個々の薬物標的の中間発現レベルは、ユニークな全細胞アッセイの開発に適合させる株を提供するように遺伝子操作される。本発明のこの実施形態において、GRACE株は、転写の部分的抑制のみを提供するために決定されたテトラサクリン濃度を含有する培地中で増殖される。これらの条件下で、構成的に発現された過剰産生株と野生型株との間の発現レベル、同時に野生型株よりも低い発現レベルを維持することは可能である。すなわち、細胞生存に最小限必要な発現レベルを滴定することは可能である。遺伝子発現をこの厳しい状態に抑制することにより、機能変異の部分的損失（すなわち、低次形態変異体の表現型）により産生した表現型に似た新規表現型を産生することが可能であり、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できる追加の標的発現レベルを提供する。残っている必須遺伝子の対立遺伝子の発現を生存に必要な閾値レベルに抑制することは、この必須遺伝子産物に対して活性化化合物への増強された感受性を有する株を提供する。

10

20

【0321】

薬物スクリーニングのための全細胞アッセイにおける標的レベル発現の有用性を証明するために、CaHIS3ヘテロ接合体株とテトラサクリンプロモーター制御CaHIS3GRACE株の両方を、3-アミノトリアゾール(3-AT)に対し感受性の野生型(二倍体)CaHIS3株と比較した(実施例6.3)。これらの実験から導かれたデータは、病原体内に合成された標的遺伝子産物の明確なレベルが、全細胞アッセイに基づく薬物スクリーニングに直接適用でき、GRACE法を用いて確認された新規薬物標的に対して活性化新規抗真菌化合物を同定できることを明らかに示す。

【0322】

5.5.2.4 タグ化株の使用

本発明のさらに別の態様において、ユニークなオリゴヌクレオチド配列タグまたは“バーコード”が、確認された標的のヘテロ接合体株集団内に含まれる個々の変異株に取り込まれる。これらの配列タグの存在は、薬物スクリーニングに対する代替の全細胞アッセイ法を可能にする。多標的株は、混合集合(別々よりも)において同時にスクリーニングが可能であり、特定の薬物標的とその阻害剤との間で表現型を同定することができる。

30

【0323】

大スケールの平行分析を、全バーコード化ヘテロ接合体必須株集団標的セットの混合集合を用いて実施し、化合物存在下、増殖前後で混合集合内における個々の株の相対的表現を比較する。ユニークなバーコード化株の薬物依存的枯渇または過剰表現は、混合集合内の全バーコードのPCR増幅、および蛍光標識化、および生じたPCR産物の相補的オリゴヌクレオチドアレイへのハイブリッド形成によって測定される。バーコード化株間の示唆的表現は、遺伝子特異的過敏性または耐性を示し、対応する遺伝子産物が、試験した化合物の分子標的を表しうることを示唆する。

40

【0324】

1つの具体的実施形態において、変異株は、GRACE株であり、各GRACE株のセットは、ユニークな分子タグを含んで成り、これは一般に、改変される第1の対立遺伝子対に置き換えるのに用いられたカセット内に取り込まれる。各分子タグには、試験したセットの全てのメンバーに共通であるプライマー配列に隣接する。増殖は、試験した化合物の存在下又は不在下で抑制培地および非抑制培地で実施される。各株の相対的増殖は、埋め込まれた配列タグの全集団の同時PCR増幅を実施することにより評価される。

50

【0325】

本発明の1つの非限定的態様において、PCR増幅は、蛍光プライマーにより非対称の様式で実施され、生じた1本鎖核酸産物は、表面に固定され、相補配列の対応するセットをすべて含むオリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズする。次に各蛍光分子タグ配列のレベル解析が実施され、試験した化合物の存在下及び不在下において、これら培地中のGRACE株セットの相対的増殖量を評価する。

【0326】

したがって、この方法の1つの非限定的実施例においては、試験した各GRACE株のセットに対し、生存集合内に見出された対応する分子タグのレベルについての4つの値が存在した。これらは、試験した化合物の存在下及び不在下の双方において、抑制条件および非抑制条件下での細胞増殖に対応する。試験化合物の存在下及び不在下における増殖の比較は、増殖培地の各セットに対する値または“指標”を提供する；すなわち、抑制条件および非抑制条件下で導かれた指標である。再度この2つの指標値の比較すると、試験化合物が、試験GRACEセットの特定のメンバーにより担持される改変対立遺伝子対により発現された遺伝子産物に対し活性であるかどうかを示すことになる。

10

【0327】

本発明のさらに別の態様において、このヘテロ接合体のタグ化またはバーコード化集団における各々の潜在的薬物標的は、続いてのTetプロモーターまたは残っている破壊されていない対立遺伝子の上流の他の強力な構成的発現プロモーター（たとえば、CaACT1、CaADH1およびCaPGK1）のいずれかを導入することにより過剰発現し得る。これらの構築物によって、混合固体群薬物感受性試験において使用される個々の必須遺伝子のコード標的遺伝子産物の投与量をさらに増加させることができる。過剰発現はそれ自体、多くの集合メンバーの正常な増殖速度を混乱させるが、さらに信頼性のある比較を模擬培養と薬物処理混合培養との間で行うことにより、化合物に特異的な増殖差を同定できる。

20

【0328】

*S. cerevisiae*において、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などのいくつかの十分に特性評価された化合物の分子薬物標的が同様の方法で同定された。この試験において、HIS3、TUB1、ALG7およびERG11におけるヘテロ接合変異体を担持するバーコード化株（すなわち、上記の化合物に対するそれぞれの薬物標的）は、混合固体群において一緒に増殖する場合の他のヘテロ接合体バーコード化株よりも、それぞれの化合物によりチャレンジした場合に有意により大きな感受性を示した。

30

【0329】

本発明の他の態様において、抗真菌化合物のスクリーニングは、標的株に対して活性な少なくとも1種の化合物を含んで成る化合物の複雑な混合物を用いて実施できる。GRACE株集団をタグ化またはバーコード化することは、遺伝子セットを同定するのに必要な、並びに特定の遺伝子セット内の個々の標的を評価しおよび究極的に評価するのに必要な多くの大スケール分析を促進する。例えば、バーコード化GRACE株集団を用いる混合集合薬物スクリーニングは、包括的な全細胞アッセイとして有効に機能する。複雑な化合物ライブラリーの最小量は、集団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のに十分である。これは、集団を整列させる必要なしに行なわれる。また、任意の特定の化合物ライブラリーの‘豊富さ’に関する強力な予知を、薬物スクリーニングに委託する前に行うことができる。したがって例えば、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化合物ライブラリーよりも大きな殺真菌活性を所有するかどうかを評価することが可能となる。任意の分子複合ライブラリー内の特に強力な化合物を直ちに同定でき、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したがって評価できる。あるいは、本発明は、“適合”スクリーニングの開発に対しこの情報の適用を提供し、特定の化合物ライブラリーにより混合集合実験において不活化されていることが示された標的のみが、引き続きアレイフォーマット化スクリーニングに含まれる。

40

50

【0330】

慣例的に、薬物発見プログラムは、確認された薬物標的の個々のまたは限定されたセットに依存していた。前記の例は、このようなアプローチはもはや必要ではなく、高スループット標的評価と薬物スクリーニングが可能であることを強調する。しかしながら、個々の標的の選択に基づいた直接のアプローチも、専門的技術、興味、戦略、または薬物発見プログラムの予算に依って、依然として好ましいと思われる。

【0331】

5.5.3 動物モデル系における標的評価

現在、必須の薬物標的の確認が、標準的実験室条件下で遺伝子不活化効果を調べることにより証明されている。標準的実験室条件下で必須でないと思われる推定の薬物標的遺伝子が、動物モデル内、例えば野生型に対して標的遺伝子の欠失したヘテロ接合体の病原性を試験することにより調べられる。しかし、必須の薬物標的は、動物モデル試験から排除される。したがって、最も望ましい薬物標的は、最も妥当条件からそれらの標的評価まで省略される。

10

【0332】

本発明の特定の1実施形態において、GRACE必須株集団により提供される条件付きの発現は、宿主環境内の標的確認に対するこの長年の限界を克服する。動物試験は、GRACE必須株を接種したマウスを用い、条件付きの発現による遺伝子不活化効果を試験することにより実施できる。本発明の好ましい実施形態において、GRACE必須株の致死接種物を注入されたマウスに対する効果は、マウスが薬物標的遺伝子発現を不活化するために適切な濃度のテトラサクリンを与えられているかどうか依存して決定できた。したがって、実験室条件下で必須であると証明された遺伝子の発現の欠失は、*C. albicans*の末期感染の予防と関連しうる。このタイプの実験は、テトラサクリン補足水で“処理された”マウスのみが、標的遺伝子の不活化が宿主内のGRACE株病原体を殺したため感染に生き残ると予想される。

20

【0333】

本発明のさらに他の実施形態においては、遺伝子が30で機能的であるが、マウスの正常な体内温度では不活性となるように、標的遺伝子または特定の薬物標的の温度感受性対立遺伝子を制御するための温度応答プロモーターを用いて、条件付発現を達成できた。

【0334】

必須遺伝子に関して上記と同様に、GRACE株集団を含む非必須遺伝子が、マウスモデル系の病原性に必要であるかを同等に証明することができる。ヌル表現型の増殖を減少させ、病原体の毒性を減じ得る複数の遺伝子がこのセットに含まれる。遅い増殖の表現型を示す多くの変異体は、GRACE株を構築するのに用いられる条件付発現法により単純に不完全に不活化された他の必須遺伝子（別法により証明される）において低次形態変異を表し得る。このような株の1つの重要な用途は、任意の所定の必須遺伝子が、毒性の過程で二重に機能するかを評価することである。部分的にのみ不活化される場合、実質的に減少した毒性と増殖速度を示す必須遺伝子は、それに対して最小限の阻害高特異性化合物さえも治療上の価値を示すと思われる“多因子性の”薬物標的を表す。ひとまとめにして、テトラサイクリンによる遺伝子不活化条件下（または別の遺伝子不活化手段）でマウスの真菌感染を引き起こせない全てのGRACE株は、病原性に必要な遺伝子サブセット、すなわちGRACE病原性サブセットを規定する。病原性遺伝子のより明らかなサブセット、例えば発病における特定の段階（例えば、癒着または侵襲）に必要なこれらの遺伝子は、対応する過程を測定する*in vitro*アッセイにGRACE株病原性サブセットを適用することにより決定できる。例えば、個々の遺伝子の条件付発現によるバックル癒着アッセイまたはマクロファージアッセイにおいてGRACE病原性株を調査することにより、それぞれ癒着または細胞浸潤に必要なこれらの病原性因子を確認する。

30

40

【0335】

GRACE株集団またはその所望のサブセットはまた、動物モデル系内にいて獲得耐性/抑制を評価し、不活化薬物標的に対する殺真菌性/静真菌性表現型間を識別するのに都

50

合がよい。本発明のこの実施形態において、各種必須の薬物標的遺伝子の発現において抑制されるGRACE株を、テトラサイクリンの補足水で飼育されたマウスに接種する。次に各GRACE株を、それらが感染した異なるマウス集団に関する死亡頻度によって比較する。GRACEにおける必須遺伝子のテトラサイクリン依存性不活化によってもたらされる真菌細胞死によって、感染マウスのほとんどが健康を維持すると予想される。しかし、遺伝子外抑圧をより発生し易い薬物標的を担持するGRACE株は、殺真菌性標的よりも静真菌性標的であり、または宿主環境内で活性化別の生理学的過程により抑制されるので、この特定の株に感染したマウスで検出された致死性感染の高い発生率により同定できる。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発生し得る可能性を評価/ランク付けることが可能である。

10

【0336】

GRACE株は本目的に非常に適しているが、必須遺伝子の改変対立遺伝子または改変必須遺伝子を有する株を薬物標的評価のための動物モデルにおいて使用することも意図するものである。

【0337】

5.5.4 結合化合物の合理的デザイン

本明細書に記載されたようなアッセイを介して同定された化合物は、例えば感染症因子の増殖阻害、および/または感染症の改善に有用であり得る。化合物は、限定しないが、他の細胞タンパク質を含むことができる。結合化合物は、限定しないが、ペプチド類、例えば溶解性ペプチド、例えば標的遺伝子産物トランスメンブランレセプター類の細胞外部分を含むペプチド類、並びにD-および/またはL-配位アミノ酸類から作られた無作為ペプチドライブラリーのメンバー(Lamら、1991年、Nature 354: 82~84; Houghtenら、1991年、Nature 354: 84~86を参照)、合理的にデザインされたアンチペプチド(Hurbyら、Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides, "In Synthetic Peptides, A User's Guide", W. H. Freeman、ニューヨーク(1992年)、pp. 289~307を参照)、抗体(限定しないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、抗イディオタイプ、キメラまたは1本鎖抗体、およびFab、F(ab')₂およびFab発現ライブラリー断片、およびそれらのエピトープ結合断片を含む)、および小さな有機分子または無機分子を挙げることができる。レセプター型標的分子の場合、このような化合物には、ECDに結合し、天然のリガンド(すなわちアゴニスト類)により引き起こされる活性を擬態する有機分子(ペプチド擬似体など); 並びにペプチド、抗体又はその断片、及びECD(またはその部分)を擬態し、結合して天然リガンドを“中和する”その他の有機分子(例えばペプチドミメチック類)が含まれる。

20

30

【0338】

コンピューターモデリングおよび検索技術は、化合物の同定または既に同定された化合物の改良を可能にし、標的遺伝子の発現または活性を変調できる。このような化合物または組成物を同定して、好ましくは活性部位または領域を同定する。レセプター分子に影響を与える化合物の場合、このような活性部位は、一般にはリガンドとレセプター自体との相互作用ドメインなどのリガンド結合部位であると思われる。活性部位は、例えば、アミノ酸のペプチド配列、核酸のヌクレオチド配列または天然リガンドを有する関連化合物の複合体または組成物の研究からなど、当業界で公知の方法を用いて同定される。後者の場合、化学的方法またはX線結晶回折法を使用して、複合リガンドがどこに見られるかを見つけたことにより、活性部位を見出す。

40

【0339】

次に好ましくは、活性部位の三次元幾何学構造が決定される。これは、完全な分子構造を決定するX線結晶回折法など、公知の方法で行なわれる。固相または液相NMRはまた、活性部位および/またはリガンド結合複体内の、ある一定の分子内距離を測定するために使用される。当業者に知られた他の実験的構造決定法は、部分的または完全な幾何学

50

構造を得るためにまた使用される。この幾何学構造は、決定される活性部位構造の精度を増す複合リガンド、天然物または人工物とともに測定される。コンピューターベースの多くのモデリング法は、構造を完全なものにするために（例えば、不完全なまたは不十分な精密構造を決定する実施形態において）、またはその精度を改善するために使用される。

【0340】

最後に、活性部位の構造を決定して、実験、モデリング、または組合せにより、候補モジュレート化合物が、分子構造の情報を伴った化合物を含む検索データベースにより同定される。このような検索は、決定された活性部位構造とマッチし、活性部位を規定する基と相互作用する構造を有する化合物を探索する。このような検索は手動でできるが、好ましくはコンピューターを用いる。この検索から見出されたかかる化合物は、可能性のある標的または経路の遺伝子産物をモジュレートする化合物である。

10

【0341】

あるいは、これらの方法は、既知のモジュレート化合物またはリガンドから改良したモジュレート化合物を同定するのに使用される。既知の化合物の構成要素は変更され、変更による構造的な効果は、実験的および上記のコンピューターモデリング法を用いて新規組成物に適用して決定される。次に、変化した構造を化合物の活性部位の構造と比較して、改良された適合 (fit) または相互作用が得られるかを測定する。この様式で、側鎖を変えることなど、構成要素の系統的な変化を迅速に評価して、変更されたモジュレート化合物または特異性または活性の改良されたリガンドを獲得する。

【0342】

20

標的もしくは経路の遺伝子または遺伝子産物の活性部位および関連するシグナル伝達および転写因子の同定に基づくモジュレート化合物を同定するのに有用なさらなる実験的およびコンピューターモデリング法は、当業者にとって明らかである。

【0343】

以下のものをはじめ、特定の蛋白質と相互作用する薬物のコンピューターモデリングの技術を概説する多くの文献がある：Rotivinenら、1988年、Acta Pharmaceutica Fennica 97:159~166；Ripka、(1988年6月16日)、New Scientist 54~57；McKinallyおよびRossmann、1989年、Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:111=112；PerryおよびDavies、OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp.189~193 (Alan R. Liss社、1989年)；LewisおよびDean、1989年、Proc. R. Soc. London 236:125~140および1~162；および核酸成分のモデルレセプターに関して、Askewら、1989年、J. Am. Chem. Soc. 111:1082~1090

30

結合性を変化させ得る化合物の設計および製造するために、参照として一般的なものを上記したが、天然の産物または合成化学物質を含む既知の化合物、並びに蛋白質を含む他の生物学的活性物質のライブラリーを、阻害剤または活性化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。

40

【0344】

5.6 転写プロフィール

5.6.1 遺伝子発現解析

遺伝子発現プロファイリング法は、好適な生化学的標的の同定、並びに既知の化合物の作用様式の決定にとって重要な手段である。C. albicansゲノム配列の完成およびこの情報を取り込む核酸マイクロアレイの開発は、この複相病原性真菌類を用いて実施するゲノム全体に亘る遺伝子発現解析を可能にする。したがって、本発明は、カンジダ・アルピカンス (Candida albicans) の必須遺伝子および毒性/病原性遺伝子の双方に関する転写応答プロフィールを獲得する方法を提供する。必須遺伝子の条件付き発現は、例えばC. albicansに焦点を合わせた薬物スクリーニングプログラムの設計に有用な制御的相互作用の

50

概要を明らかにするのに寄与する。

【0345】

本発明の実施形態において、GRACE株集団は、この病原体内の必須遺伝子の発現解析に使用される。このような株集団の1つの特に強力な用途には、病原体内全体の必須遺伝子セット、または必須遺伝子の所望のサブセットに関する包括的な転写プロファイルデータベースの構築が含まれる。このようなデータベースは、リード抗真菌性化合物に特徴的な応答プロファイルと新規抗真菌化合物により得られたプロファイルと比較するのに用いられ、類似のものと別の作用様式のものとの区別する。リード化合物で株を処理した後に測定された転写応答プロファイルを、抑制条件下で、特定の必須標的遺伝子によって得られたものとのマッチング（または部分的な重ね合わせ）することは、標的と可能性のある薬物作用様式を同定するのに用いられる。

10

【0346】

必須遺伝子の遺伝子発現解析はまた、病原体内の調べようとする遺伝子の生物学的機能および制御をも可能にし、この情報は薬物スクリーニングプログラムに組込まれる。例えば、*C. albicans*の必須薬物標的の転写プロファイルは、既存の薬物標的について解明されたものと同じの細胞内プロセスまたは経路に関与する新規薬物標的の同定、またはさもなければ病原体で直接実験することなく同定できなかった新規薬物標的の同定を可能にする。これらは、病原体に特有な遺伝子を含むのみならず、病原体内で別個の機能を有するかまたは異なる制御に関与する広範な遺伝子種も含む。さらに、病原体特異的経路が明らかにされ、初めて解明される。

20

【0347】

本発明の他の態様において、非抑制または誘導条件下でGRACE由来株の遺伝子発現プロファイルは、1種以上の薬物標的に関する過剰発現応答プロファイルを評価するために確立される。例えば、シグナル伝達経路において機能を果たす遺伝子の過剰発現は、上記条件下で経路の無制御な活性を示すことが多い。さらに、幾つかのシグナル経路は、病原性の発生過程において機能を果たすことが証明された。*C. albicans*のGRACE株を過剰発現することにより生成された転写応答プロファイルは、このような経路により制御される遺伝子セットに係る情報、すなわち、そのうちのいずれが病原性の発生において不可欠な役割を潜在的に担っており、したがって有望な薬物標的であるかという情報を提供する。さらに、発現プロファイルの解析により、その発現が調節カスケード全体に続く発現に重要な1種以上の遺伝子を明らかにすることができる。したがって、これらの遺伝子は、薬物探索にとって特に重要な標的であり、対応する改変対立遺伝子対を担持する変異体は、作用機序に基づくスクリーニングアッセイの基礎を成す。現在、このようなアプローチは不可能である。現行の薬物探索では、大量の数の「候補」化合物が得られているが、それらの作用様式はほとんど解明されていない。GRACE株集団を用いて作成される遺伝子シャットオフおよび過剰発現のプロファイル双方を含む転写応答データベースは以下のことによって、この薬物発現の障壁に対する解決を提供するものである；1)野生株の抗真菌性阻害により得られる転写応答またはプロファイルを決定する、そして、2)この応答をGRACE株集団を含む薬物標的の不活性化または過剰発現により得られる転写プロファイルと比較する。

30

40

【0348】

薬物標的の遺伝子変更および野生型細胞の化学物質/化合物阻害双方から生じる適合した、または関連性の高い転写プロファイルは、化合物をその細胞の薬物標的と結合させる証拠を提供しその作用機序を示唆する。

【0349】

したがって、本発明は、配列同定番号1~61の1つを含んで成るヌクレオチド配列によりコード化された標的遺伝子産物に対する該化合物を評価する方法を提供し、この方法は以下のステップを含んで成る。すなわち、(a)野生型二倍体真菌細胞または対照細胞を化合物と接触させ、第1の転写プロファイルを生成するステップ、(b)標的遺伝子の第2の対立遺伝子が実質的に過小発現されるか発現されない、または過剰発現される条件

50

下で培養され、培養細胞に関して第2の転写プロフィールを生成しているGRACEなどの変異体の二倍体真菌細胞の転写プロフィールを決定し、第1の転写プロフィールを、第2の転写プロフィールと比較して、それらのプロフィールにおける類似性を特定するステップ。比較において、プロフィール間の類似性は、指標値として表現され、この指標値が高いほど、該化合物はより望ましい。

【0350】

5.6.2 第2標的の同定

第2標的の同定を目的としてここに方法を記載する。ここに用いられる“第2標的”とは、その遺伝子産物が、所定の条件セット下で、生物の増殖および/または生存に關与する標的遺伝子産物（すなわち標的必須遺伝子産物）、または宿主の感染時に生体の病理機構に關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表す遺伝子を言う。

10

【0351】

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り第2標的遺伝子産物を同定するために、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するのに好適な任意の方法を用いることができる。このような知られた遺伝子産物は細胞内タンパク質でも、または細胞外タンパク質でもあり得る。このような知られた遺伝子産物と相互作用する遺伝子産物は、第2標的遺伝子産物であり、それらをコード化する遺伝子は第2標的である。

【0352】

従来から用いられる方法には、共免疫沈殿、架橋、および勾配またはクロマトグラフィーカラムによる共精製がある。このような方法を利用することにより、第2標的遺伝子産物の同定が可能である。第2標的遺伝子産物が同定されると、それは対応する第2標的を同定するために、標準的方法と組合せて用いられる。例えば、エドマン分解法（例えば、Creighton、1983年、“Proteins: Structures and Molecular Principles”、W. H. Freeman & Co、ニューヨーク州pp. 34~49を参照）によるなど、当業者によく知られた方法を用いて、第2標的遺伝子産物のアミノ酸配列の少なくとも一部分を確認する。得られたアミノ酸配列は、第2標的遺伝子配列のスクリーニングに使用し得るオリゴヌクレオチド混合物生成の指標として用いることができる。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法により達成できる。オリゴヌクレオチド混合物の生成法およびスクリーニング法はよく知られている（例えば、Ausubel、上記、およびPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、1990年、Innis、M.ら、編集 Academic Press、Inc、ニューヨークを参照）。

20

30

【0353】

さらに、これらの方法を用いることにより、所定の条件セット下で、生物の増殖および/または生存に關与するタンパク質または宿主の感染時に生体の病理機構に關与するタンパク質と相互作用するタンパク質をコード化する第2標的を同時に同定することができる。これらの方法としては、例えば知られた、またはこれらの機構に關与していると示唆される、またはこれらの機構に重要であると示唆される標識化第1標的遺伝子タンパク質により、gt11ファージライブラリーの抗体プローブ化というよく知られた方法と同様の方法でこのタンパク質を用いる、発現ライブラリーのプローブ化が挙げられる。

40

【0354】

In vivoでのタンパク質相互作用を検出する一方法であるツーハイブリッドシステムを、限定のためではなく、例示のみの目的で詳細に記載する。このシステムの一変法の記載は既にあり（Cheinら、1991年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88: 9578~9582）、Clontech社（カリフォルニア州パロアルト）から市販されている。

【0355】

手短に言うと、このような方法を利用して、ハイブリッドタンパク質をコード化する2

50

種のプラスミドを構築する。1つは知られたタンパク質、この場合は生物の増殖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した転写活性化因子タンパク質のDNA結合ドメインから成り、もう1つは、cDNAライブラリーの部分として、このプラスミド内に組換えられたcDNAによりコード化される未知のタンパク質に融合した活性化因子タンパク質の活性化ドメインから成る。プラスミドを、調節領域に転写活性化因子の結合部位を含むリポーター遺伝子(例えば、lacZ)を含有する酵母株*S. cerevisiae*へ形質転換する。どちらのハイブリッドタンパク質も単独ではリポーター遺伝子の転写を活性化できない。DNA結合ドメインハイブリッドは活性化機能を与えないために、また活性化ドメインハイブリッドは活性化因子の結合部位に局在化できないために、活性化できない。この2種のハイブリッドタンパク質の相互作用により、機能し得るハイブリッドタンパク質が再構成され、リポーター遺伝子の発現が生じ、これがリポーター遺伝子産物に関するアッセイによって検出される。

10

20

30

40

50

【0356】

このツーハイブリッドシステムまたはそれに関連する方法を、知られた“おとり”遺伝子産物と相互作用するタンパク質に関する活性化ドメインライブラリーのスクリーニングに用いる。限定のためではなく例示の目的で標的必須遺伝子産物および標的毒性遺伝子産物がおとり遺伝子産物として用いられている。標的必須遺伝子産物、標的病原性遺伝子産物またはそれらの部分をコード化する全ゲノムまたはcDNA配列を活性ドメインをコード化するDNAに融合する。ライブラリーと、DNA結合ドメインに融合されたおとり遺伝子産物のハイブリッドをコード化するこのプラスミドを、酵母のリポーター株に共形質転換し、その結果生じた形質転換体をリポーター遺伝子を発現するものに関してスクリーニングする。限定のためではなく例示の目的で、おとり遺伝子をGAL4タンパク質のDNA結合ドメインをコード化するDNAに翻訳融合されるようにベクター内にクローン化する。これらのコロニーを精製し、リポーター遺伝子発現の原因となるライブラリー-プラスミドを単離する。次にDNA配列決定を利用して、ライブラリー-プラスミドがコード化するタンパク質を同定する。

【0357】

おとり遺伝子産物と相互作用するタンパク質が検出されることになる細胞系のcDNAライブラリーを当業界で慣例化した方法を用いて作製する。ここに記載された特定の方法により、例えばcDNA断片を、GAL4活性化ドメインに翻訳融合されるようにベクター内に挿入する。このライブラリーをおとり遺伝子-GAL4融合プラスミドと共に、GAL4活性化配列を含有するプロモーターにより駆動されるlacZ遺伝子を含む酵母株内に共形質転換する。cDNAがコード化するタンパク質は、GAL4活性化ドメインに融合され、それがおとり遺伝子産物と相互作用して、活性GAL4タンパク質を再構成し、それによってlacZ遺伝子発現を駆動する。lacZを発現するコロニーは、X-gal存在下、青色により検出される。次にcDNAをこれらの株から精製して、当業界で慣例化した方法を用いておとり遺伝子と相互作用するタンパク質を生産し、単離するために用いることができる。

【0358】

第2標的を同定し単離したら、これをさらに特性化して、本発明の方法による薬物発見に用いる。

【0359】

5.6.3 遺伝子発現アレイの使用

プロファイリングを行うために、遺伝子発現アレイおよびマイクロアレイを用いることができる。遺伝子発現アレイとは、ガラス表面上、シリコン上、またはナイロン薄膜上などの特異的な位置に沈着したDNAサンプルの高密度アレイである。このようなアレイは、異なる条件下相対的な遺伝子発現を定量化するために研究者により使用される。この技術の例が米国特許第5807522号に見られ、これは参照により本発明細書に組み入れられる。

【0360】

単一アレイを用いて、特定の微生物のゲノムにおける実質的に全ての遺伝子発現を研究することができる。例えば、アレイはカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) からの ORF に相当する PCR 産物を含む 12 × 24 cm のナイロンフィルターから構成されていてもよい。それぞれ 10 ナノグラムの産物をフィルター上に 1.5 mm 毎にスポットする。一本鎖の標識された cDNA を、(第 2 のストランド合成または増幅ステップは行わない) アレイにハイブリダイズさせるために調製し、そしてフィルターに接触させる。それゆえ、標識された cDNA は「アンチセンス」配向である。ホスホリメジャーを用いて定量分析を行う。

【0361】

1 実施形態において、必須遺伝子の PCR 産物は、本発明のオリゴヌクレオチドプライマー対 (すなわち、配列番号 4001 ~ 4932 および配列番号 5001 ~ 5932) を使用して作製することができる。10 ng の各 PCR 産物をフィルター上に 1.5 mm ごとにスポットする。各 PCR 産物は、配列番号 6001 ~ 6932 からなるヌクレオチド配列の群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。

10

【0362】

総細胞 mRNA のサンプルからの cDNA を、そのようなアレイにハイブリダイズさせた後、当業者に知られている 1 つまたはそれ以上の多くの技術により結合を検出すると、cDNA がハイブリダイズするアレイ上の各点においてシグナルが得られる。それゆえアレイ中のそれぞれの位置で得られたハイブリダイゼーションシグナルの強度は、サンプル中に存在していた特定の遺伝子についての mRNA 量を反映している。それゆえ、異なる条件下で増殖した細胞から単離した mRNA について得られた結果を比較すれば、異なる条件下で増殖している間でのそれぞれの個々の遺伝子の発現の相対量を比較することができる。

20

【0363】

遺伝子発現アレイは、真菌の繁殖、毒性または病原性のために必要とされる遺伝子産物のレベルまたは活性を低下させた後の多くの時点で、全 mRNA 発現パターンを分析するために用いられる。調節可能なプロモーターに結合した核酸産物が真菌の増殖、残存、増殖、毒性または病原性に関して律速となる条件下に GRACE 株が増殖することにより、または標的遺伝子産物のレベルまたは活性を低下させる薬剤と細胞とを接触させることにより、遺伝子産物のレベルまたは活性の低下が起こる。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分析により、遺伝子産物のレベルまたは活性の低下により発現が影響を受ける他の遺伝子についての情報が得られる。例えば、他の mRNA レベルは、増殖、生存、繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子産物のレベルまたは活性の低下の後に増加、減少または維持することを観察してもよい。それゆえ、増殖、生存、繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子産物のレベルまたは活性の低下の後に観察される mRNA 発現パターンは、増殖、生存、繁殖、毒性または病原性に必要な他の核酸を特定する。加えて、真菌類を候補薬剤化合物または知られている抗生物質に暴露したときに観察される mRNA 発現パターンを、真菌類の増殖、生存、繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子産物のレベルまたは活性が低下する時に観察される mRNA 発現パターンと比較する。候補薬剤化合物を用いたときに観察される mRNA 発現パターンが、遺伝子産物のレベルが低下する時に観察される mRNA 発現パターンと同様の場合、薬剤化合物は有力な治療候補である。それゆえ、薬剤開発に使用するための有力な候補薬剤化合物の選択を補助するものとして、該アッセイは有用である。

30

40

【0364】

アレイに沈着した核酸の源およびアレイにハイブリダイズする核酸の源が 2 種の異なる微生物からである場合、遺伝子発現は 2 種の微生物中の相同性遺伝子と一致する。

【0365】

5.7 プロテオミクスアッセイ

本発明の他の実施形態において、および変異株集団 (例えば GRACE 株集団) が病原体内で転写プロファイリングが出来るのとほぼ同様の方法において、変異株集団はゲノム

50

の発現されたタンパク質の総量を分析するための貴重な供給源を提供する。抑圧および非抑圧増殖条件下における G R A C E 株集団のメンバーによる全タンパク発現を評価することにより、細胞のタンパク発現のパターン間の相関が、必須遺伝子の非発現または発現レベルにより得られる。したがって、本発明は、タンパク質発現パターンを確立するための当技術分野における周知の方法（限定するものではないが、例えば、2次元ゲル電気泳動法など）により測定される G R A C E 株における一連のタンパク質の発現パターンを提供する。タンパク質のセットは、配列番号7000~7932のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質を含んでなる。株を異なる条件でおよび修飾した一方の対立遺伝子の発現レベルが異なるように培養すると、複数のタンパク質発現パターンが1つの G R A C E 株に関して発生しうる。好ましい変異株の集団は G R A C E 株の集団である。 10

【0366】

また他の実施形態において、まだ定義していない化合物で株を処理することにより観察される株に相当するタンパク発現プロファイルを示す株を作り出すために、明確な遺伝子突然変異を構築することができる。このように、真菌特異的標的で作用し、そしてその活性モードを測定することができる他の有力なリード化合物から、複雑な方法で多くの標的に作用する抗真菌化合物を区別することは可能である。

【0367】

細胞内で発現したタンパク質の総数を計算することは、2次元ポリアクリルアミドゲルでまたは他の分離技術により検出可能な全タンパク質種を確実に同定することに依存する。しかしながら、これらのタンパク質の大部分は極めて低量であり、ペプチド配列決定または質量分析法により確実に同定するために必要な閾値に達していない。それにも関わらず、これらの「みなしご(orphan)」タンパク質は、個々の G R A C E 株によるタンパク質発現の分析を用いて検出可能である。抑圧的対非抑圧的条件または過剰発現条件下での G R A C E 株のタンパク質プロファイルを比較することにより、低量の遺伝子産物の条件付き発現は確実な同定を促進する。多くの場合、多重タンパク質に関する定常状態レベルが変化するため、より複雑なタンパク質プロファイルになる結果となり、これは問題になっている低量の遺伝子をマニピュレートすることにより間接的に引き起こされる。G R A C E 株集団内の個々の標的を過剰発現させると、ペプチド配列決定または質量分析法のために十分な物質を提供することにより、みなしごタンパク質の同定を直接的に助けることも 20 30

【0368】

多くの実施形態において、本発明は、二倍体病原性真菌細胞の発現タンパク質量の定量分析法を提供する。最初のタンパク質発現プロファイルを対照二倍体病原性真菌（これは標的遺伝子のための2種の非修飾対立遺伝子を有する）について開発する。例えば G R A C E 株において標的遺伝子の1つの対立遺伝子が不活性化されている対照株の突然変異体が、遺伝子破壊カセットの挿入または置換により発生する。この第2の対立遺伝子の発現が異種の制御されたプロモーターの制御下であるように他の対立遺伝子を修飾する。第2のタンパク質発現プロファイルはこの突然変異体真菌のために開発され、これは対照株中の遺伝子の2つの対立遺伝子の発現と比較して、第2の対立遺伝子が実質的に過剰発現される条件下に行われる。同様に、所望であれば、第3のタンパク質発現プロファイルは、対照株中の遺伝子の2つの対立遺伝子の発現と比較して、第2の対立遺伝子が実質的に不十分に発現される条件下に開発される。そして最初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と、および妥当な場合、第2のプロファイルにおいて高レベルで、そして妥当な場合、最初のプロファイルにおけるレベルと比較して第3のプロファイルにおける低レベルで、検出された発現タンパク質を同定するために第3のタンパク質発現プロファイルと比較する。 40

【0369】

したがって、本発明は、配列番号1から61の1つを含むヌクレオチド配列によりコード化された標的遺伝子産物に対して化合物を評価する方法を提供する。この方法は、(a 50

野生型二倍体真菌細胞または対照細胞を化合物と接触させ、そして最初のタンパク質発現プロフィールを発生させ、(b) GRACE株などの、標的遺伝子の第2の対立遺伝子が実質的に不十分に発現され、発現されない、または過剰に発現される条件下に培養された、突然変異体二倍体真菌細胞のタンパク質発現プロフィールを決定し、培養細胞についての第2のタンパク質発現プロフィールを発生させて、プロフィールにおける同一性を同定するために、第2のタンパク質発現プロフィールと第1のタンパク質発現プロフィールとを比較するステップを含む。比較において、プロフィールの同一性は、指示値として表すことができ、より高い指示値の化合物が好ましい。

【0370】

5.8 医薬組成物およびその使用

10

本明細書に記載する本発明の方法により同定される核酸分子を含む化合物は、カンジダ・アルビカンスなどの病原性生物による感染症を処置または予防するために、治療的に効果的な用量で被験者に投薬できる。標的によっては、本化合物は、被験者における癌などに制限はされないがこれらの非感染症の治療にも有用である。治療的に効果的な用量とは、処置された被験者に健康上の利益を与えるのに十分な(核酸分子を含む)化合物の量を指す。通常、化合物は、配列番号1~62から成る群より選択される配列を含む核酸によりコード化された遺伝子産物の活性またはレベルを低下させることにより作用するが、これに限定されるものではない。処置されるべき被験者は、植物、脊椎動物、哺乳動物、鳥類、またはヒトであり得る。これらの化合物は、カンジダ・アルビカンスによる対象の汚染を予防または阻止するために用いることも、またはカンジダ・アルビカンスを含むバイオフィルムの表面での形成を予防または抑制するために用いることもできる。カンジダ・アルビカンスを含むバイオフィルムは、外科用具、移植用装置、カテーテルおよびステントなどの医療用具表面に見られるが、これらに限定されるものではない。

20

【0371】

5.8.1 効果的用量

化合物の毒性および治療的有効性は、例えばLD₅₀(集団の50%を死に至らしめる用量)およびED₅₀(集団の50%に治療的効果がある用量)を決定するための、培養細胞または実験動物中の標準薬剤処方により決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を用いるときは、感染していない細胞への潜在的な損傷を最小化し、それによって副作用を減少させるために、病気に冒された組織部位にこの種の化合物を標的化する送達システムを設計することに注意を払わねばならない。

30

【0372】

ヒトに使用するための用量範囲を明確にするために、細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを用いることができる。このような化合物の用量は、毒性がほとんどないか全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内であることが好ましい。使用した投薬形態および使用した投薬方法によって、用量をこの範囲内で変えることができる。本発明の方法に使用したどの化合物においても、治療的に効果的な用量を細胞培養アッセイから最初に見積もることができる。細胞培養中で決定したようにIC₅₀(すなわち、症状を最大抑制の半分にする試験化合物の濃度)を含む循環血漿中濃度範囲を実現するために動物モデルに用量を製剤化できる。ヒトに有用な用量をより正確に決定するために、このような情報を用いることができる。例えば高速液体クロマトグラフィーにより、血漿中レベルを測定できる。有効な用量は、体重1kgに対して0.001mgから10mgの範囲である。

40

【0373】

5.8.2 製剤および使用

本発明にしたがって使用するための薬剤組成物を、1つ以上の生理学的に許容できる担体または賦形剤を用いた従来の方法によって製剤化できる。

【0374】

それゆえ、該化合物およびこれらの生理学的に許容できる塩および溶液を吸入またはガス吸入(経口または経鼻)による投与、または経口、舌下、非経口または直腸投与のため

50

に製剤化できる。

【0375】

経口投与のためには、薬剤組成物は、例えば、接着剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンブ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、乳糖、微結晶性のセルロースまた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、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（例えば、馬鈴薯デンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容できる賦形剤を用いて従来の方法により調製した錠剤またはカプセル剤の形態を取ることができる。錠剤は当技術分野においてよく知られている方法によってコーティングを施すことができる。経口投与のための液体調製品は、例えば、溶液、シロップまたは懸濁液の形態であり、または使用前に水またはその他の適切な媒体で構成する乾燥製品として存在することができる。このような液体調製品は、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體または食用硬化油脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステル類、エチルアルコール、または分別植物油）；および保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピルまたはソルビン酸）などの薬学的に許容できる添加剤を用いて従来の方法により調製できる。調製品は、緩衝塩、香味料、着色料および甘味剤を適当に含むこともできる。

10

【0376】

経口投与にのための調製品は、活性化合物の放出を制御するように適切に製剤化できる。

20

【0377】

舌下投与ため、組成物を従来の方法によって製剤化した錠剤またはトローチ剤の形態にすることができる。

【0378】

吸入による投与ため、本発明にしたがって使用するための化合物は、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エタン、二酸化炭素またはその他の適切な気体などの適切な噴霧剤を用い、加圧包装されたエアゾール噴霧器またはネブライザーの形で簡便に送達される。加圧エアゾール噴霧器の場合、用量単位は、定量を送達するための供給弁によって決定することができる。吸入器または通気器での使用において、例えばゼラチンなどのカプセルおよびカートリッジは、化合物および乳糖またはでんぷんなどの適切な粉末基剤の混合粉末を含むように製剤化できる。

30

【0379】

例えばボラス注射または連続注入などの注射による非経口投与（例えば、静脈内または筋肉内投与）のために化合物を製剤化できる。注射用製剤は、保存剤を加えて例えばアンプル中または多用量容器中に単位用量形態で提供できる。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳化液などの形態をとることができ、および懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤化剤を含むことができる。あるいは、活性成分は使用前に、例えば滅菌パイロジェンフリー水などの適切な担体で構成される粉末形態にできる。

40

【0380】

化合物は、例えば、ココアバターまたはその他のグリセリド類などの従来からの坐薬基材を含む坐薬または保持浣腸剤などの直腸配合物にも製剤化できる。

【0381】

前述の製剤に加えて、化合物は蓄積調製品としても製剤化できる。この種の長時間作用性製剤は埋め込み（例えば、皮下へのまたは筋肉内への）によってまたは筋肉内注射によって投与できる。それゆえ例えば、化合物は、適切な重合体材料または疎水性材料（例えば、許容できる油脂中の乳化液などの）またはイオン交換樹脂とともに、または例えば、やや溶けにくい塩などのやや溶けにくい誘導體類として製剤化できる。

【0382】

50

6. 実施例

6.1 CaKRE9の修飾対立遺伝子を含むGRACE株の構築

ステップ1(すなわち、遺伝子交換)にて使用したSAT選択可能標識をPCR増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーは、pRC18-ASP中のSAT破壊カセット(disruption cassette)と相補的な25個のヌクレオチド、およびCaKRE9オープンリーディングフレームに隣接する領域と相同の65個のヌクレオチドを含む。PCR増幅後に産出された2.2kbのcakre9::SAT破壊フラグメント、およびその結果得られる形質転換後の相同性組み換えによる最初の野生型CaKRE9対立遺伝子の遺伝子置換を図2に示す。PCR条件は以下の通りである: 5~50ngのpRC18-ASP、100pmolの各プライマー、200μMのdNTP、10mMのトリス(pH8.3)、1.5mMのMgCl₂、50mMのKCl、1単位のTaq DNAポリメラーゼ(Gibco)。PCR増幅時間は、94で5分間、54で1分間、72で2分間を1サイクル、94で45秒間、54で45秒間、72で2分間を30サイクルである。BraunおよびJohnsonによるカンジダ・アルビカンスに合わせた酢酸リチウム法(B.R.BraunおよびA.D.Johnsonの「転写性抑制TUPIによるカンジダ・アルビカンス中のフィラメント形成制御」、Science、277巻、105~109頁、1997年)を用い、30および42でのインキュベーション時間を短くし(それぞれ1時間および5分間)、および形質転換される物質をより多くする(エタノールで沈殿させたcakre9::SAT PCR産物50μg)など少し修飾して、形質転換を行った。ストレプトスライシン(400μg/ml)を含むYPD培地上にレプリカをプレートする前に、SATの発現のためにプレインキュベーション時間を与えるように、形質転換細胞をYPDプレート上に塗布して30で終夜インキュベートした。ストレプトスライシン-耐性コロニーを36時間後検出し、CaKRE9およびcakre9::SAT対立遺伝子の両方を増幅する適切なプライマーを用いるPCR分析により、cakre9::SAT/CaKRE9ヘテロ接合型を同定した。

【0383】

ステップ2(すなわち、プロモーター置換)にて使用する条件付きプロモーターをPCR増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーは、pBSK-HT4中のCaHIS3-標識テトラサイクリン制御プロモーターカセットに相補的な25個のヌクレオチド、および転写開始点およびCaKRE9オープンリーディングフレームのヌクレオチド1~65に関する、-270から-205のプロモーター領域と相同な65個のヌクレオチドを含む。得られた2.2kbのPCR産物を、ステップ1にて生成したcakre9::SAT/CaKRE9ヘテロ接合型株であってYNB寒天上に選択されたHis⁺形質転換体に形質転換した。cakre9::SAT対立遺伝子およびCaHIS3-Tet-CaKRE9対立遺伝子の両方を含むポナファイドCaKRE9 GRACE株をPCR分析により決定した。典型的には、所定の薬剤標的の最終表現型を正確に決定するために、2つの独立したGRACE株を構築し評価する。最終表現型は、必須遺伝子の遺伝子産物が無いことにより引き起こされる。

【0384】

6.2 CaKRE9 GRACE株の表現型決定

得られたGRACE株の最終表現型を3種の独立した方法で評価した。最初に、YNBプレートおよび100μg/mlテトラサイクリンを含む、YNBプレートの両方におよそ1.0×10⁶細胞をストリーキングし、室温で48時間後の増殖速度を比較して、CaKRE9 GRACE株の最終表現型を素早く決定した。CaKRE9などの必須遺伝子では、テトラサイクリンの存在下で有意な増殖は検出されない。第2の手段として、テトラサイクリンプロモーター制御標的遺伝子の発現のために通常必要であるトランスアクチベーター遺伝子を(目標とする組み込みが行われている間に形成されるCaLEU2配列複製間の組み換えにより)切除したura-細胞を選択するために、625μg/mlの5-フルオロオロチン酸(5FOA)および100μg/mlのウリジンを含むカザミノ酸プレート上にCaKRE9 GRACE株をストリーキングすることにより、遺伝子の

必須性を決定することができる。再び、このような条件下必須でないGRACE株は盛んに増殖するのに対して、必須GRACE株は増殖しない。テトラサイクリンが欠乏しているかまたは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを補足したかの何れかの5.0 ml のYNB中でインキュベートした終夜での培養 2.0×10^3 細胞/ ml を用い、そして30で24および48時間インキュベートした後の吸光度(O.D.600)を測定して、必須GRACE株に関連する最終表現型の定量的評価を行った。典型的には、必須GRACE株において、48時間後に吸光度の有意な増加は検出されない。示された必須遺伝子に対する細胞死(殺傷性の(cidal))最終表現型と増殖抑制(静菌性の(static))最終表現型との間の区別は、インキュベート24および48時間後の上記テトラサイクリン-処置培養から(T=0で 2×10^3 個の洗浄した細胞相当体からの多くのコロニー形成単位(CFU)の数により判断して)、生細胞の割合を決定することにより行われる。殺傷性の最終表現型を産出する必須GRACE株は、抑制条件下でインキュベートした後に生細胞の割合が低下(すなわち、 $< 2 \times 10^3$ CFU)していることを示すものである。

10

【0385】

6.3 細胞全体のアッセイにおける標的レベル変化

薬剤スクリーニングのための細胞全体のアッセイにおける標的レベル発現の有用性を示すために、3-アミノトリアゾール(3-AT)に対する選択性に関して、CaHIS3ヘテロ接合型株とテトラサイクリンプロモーター-制御CaHIS3 GRACE株の両方を、野生型(二倍体)CaHIS3株と比較した(図6)。3-ATはCaHIS3によりコード化される酵素であるリン酸イミダゾールグリセロールデヒドラターゼの拮抗阻害剤であり、薬剤および薬剤標的それぞれに対するモデルとして共に用いる。テトラサイクリンプロモーターにより維持されるCaHIS3の構成性発現レベルによりなされる過剰発現は、野生型およびCaHIS3ヘテロ接合型株の両方の増殖を完全に阻害するのに十分なレベルで3-AT耐性を与える(図6A)。観察された表現型は、ノーザンブロット分析により決定されたCaHIS3の7.5倍の予測された過剰発現を考慮して予測されたものと一致している(図5参照)。ヘテロ接合型CaHIS3株は、野生型またはテトラサイクリンプロモーターに基づく過剰生産CaHIS3株の何れにも著しい効果がない、中間体である3-AT濃度に対して高められた感受性を示す(図6B)。3-ATに対する特異な感受性のために評価した第3のCaHIS3発現レベルは、通常は完全に除外するために用いられるテトラサイクリンが0.1%である閾値濃度を用いて、GRACE CaHIS3株の部分的抑制により生じた。

20

30

【0386】

このCaHIS3発現レベルは、生存可能ために必要な最低発現レベルを表し、予測されるように、中間の3-AT濃度でヘテロ接合型CaHIS3株に相対して高められた薬剤感受性を示している(図6C)。同様に、フルコナゾールおよびツニカマイシンに対するGRACE株-特異的薬剤抵抗性および感受性表現型は、これらそれぞれについて知られている薬剤標的、CaERG11およびCaALG7、の発現レベルが増加することおよび減少することにより示されてきた。これらの結果をまとめると、3種の異なる発現レベルがカンジダ・アルピカンスGRACE株集団を用いて達成され、そしてこれらは知られている薬剤およびこれら知られている薬剤標的の間の予測された薬剤感受性表現型を示すことが明示される。更には、これらの実験は、GRACE法を用いて確認されたこれらの新規な薬剤標的に対する新規な抗真菌性化合物を同定するために、病原体内で合成された標的遺伝子産物のレベルが、全細胞アッセイに基づく薬剤スクリーニングに如何にはつきり直接適応するかを明確に示している。

40

【0387】

6.4 標的経路の同定

標的経路とは、1つ以上の経路の成分(例えば、酵素、情報伝達分子など)が、本発明の方法により決定される薬剤標的である、遺伝経路または生化学経路である。

【0388】

6.4.1 アッセイのためのGRACE株貯蔵物の調製

50

スクリーニングのための一定の細胞源を得るために、宿主 G R A C E 株の凍結貯蔵物を標準の微生物学技術を用いて調製した。例えば、細胞増殖のための栄養物および G R A C E 株がそれに対する抵抗力を付与する遺伝子を含む抗生物質を含む寒天プレート上に最初の貯蔵物サンプルをストリーキングすることにより、微生物の単一クローンを単離することができる。終夜で増殖させた後、単離したコロニーを無菌針を用いてプレートから取り出し、そして G R A C E 株がそれに対して抵抗力を持つ抗生物質が含まれる適切な液体増殖培地に移す。指数関数的増殖で株を産出する適切な増殖条件下で細胞をインキュベートする。細胞は標準の技術を用いて凍結する。

【0389】

6.4.2 アッセイに使用するための G R A C E 株の増殖

アッセイを行う前に、貯蔵バイアルを冷凍庫から取り出し、素早く解凍し、そして細胞増殖のための栄養素および G R A C E 株がそれに対して抵抗力を付与する遺伝子を含む抗生物質を含む寒天プレート上に培養液を1ループ分だけストリーキングする。終夜で増殖させた後、無作為に選択し単離したコロニーを、G R A C E 株がそれに対して抵抗力を与える遺伝子を含む抗生物質を含む培地を含む無菌チューブにプレート(無菌種菌ループ)から移す。均一の細胞懸濁液を形成するために激しく攪拌した後、懸濁液の吸光度を測定し、そして必要であれば、懸濁液の一部を培地と抗生物質とを含む第2のチューブ中に希釈する。そして細胞がアッセイに使用するために適切な吸光度になるまで培養液をインキュベートする。

【0390】

6.4.3 アッセイに使用する培地の選択

G R A C E 株の真菌の繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子に結合している調節可能なプロモーターのためのインデューサーまたはリプレッサーの2倍希釈群を、G R A C E 株がそれに対する抵抗力を与える遺伝子を含む適切な抗生物質を含む培養液中で発生させる。多くの培地を横に並べて試験し、それぞれの培地中それぞれの濃度でインデューサーまたはリプレッサーの効果を評価するために3から4のウェルを用いる。等容量の試験培地-インデューサーまたはリプレッサーおよび G R A C E 株を、384ウェルのマイクロタイタープレートのウェルに加え、混合する。細胞を上述のように調製し、試験抗生物質を含む適切な培地中に希釈した後、直ちにマイクロタイタープレートウェルに添加する。対照として、インデューサーまたはリプレッサーを含まないそれぞれの培地の多くのウェルにも細胞を添加する。ウェルの吸光度を監視することにより、インキュベートによる細胞増殖を常時監視する。インデューサーまたはリプレッサーのそれぞれの濃度により引き起こされる増殖抑制の割合を、インデューサーまたはリプレッサーのない培地中での細胞増殖により示される増殖に対して対数増殖速度を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最も高い感受性を有する培地を、以下に示すアッセイで使用するために選択する。

【0391】

6.4.4 標的遺伝子産物のレベルが律速でない G R A C E 株における試験抗生物質感受性の測定

知られた作用機構の抗生物質の2倍希釈群を、G R A C E 株を維持するために使用する抗生物質を用いて補足したアッセイをさらに開発するために選択した培養液中で発生させる。異なる経路で作用することが知られている試験抗生物質の集合を、それぞれの濃度で細胞増殖に対する試験抗生物質の効果を評価するために用いられている3から4のウェルをと横に並べて試験する。等容量の試験抗生物質および細胞を、384ウェルのマイクロタイタープレートのウェルに加え、混合する。G R A C E 株を維持するために必要な抗生物質を用いて補足したアッセイ開発のために選択した培地を用いて、細胞を上述のように調製し、同一の培地に希釈した後、直ちにマイクロタイタープレートウェルに添加する。対照として、抗生物質が欠乏しているが、抗生物質を溶解するために用いた溶剤は含んでいる多くのウェルにも細胞を添加する。ウェルの吸光度を監視するマイクロタイタープレートリーダー中でインキュベートすることにより細胞増殖を常時監視する。抗生物質のそ

10

20

30

40

50

れぞれの濃度により引き起こされる増殖抑制の割合を、抗生物質のない培地中での細胞増殖により示される増殖に対して対数増殖速度を比較することにより算出する。 \log [抗生物質濃度] に対する抑制割合のプロットから、それぞれの抗生物質についての IC_{50} 値を推定する。

【0392】

6.4.5 標的遺伝子産物のレベルが律速となる G R A C E 株における試験抗生物質感受性の測定

アッセイに使用するために選択した培養液に、上述のように所望量だけ細胞増殖を抑制することが示されている濃度で、インデューサーまたはリプレッサー並びに G R A C E 株を維持するために用いる抗生物質を補足する。上記で用いた試験抗生物質のパネルの 2 倍希釈群を、これらそれぞれの培地中で発生させる。それぞれの濃度で細胞増殖に対する抗生物質の効果を評価するために用いる 3 から 4 のウェルとともに、多くの抗生物質をそれぞれの培地中で横に並べて試験する。等容量の試験抗生物質および細胞を、384 ウェルのマイクロタイタープレートのウェルに加え、混合する。G R A C E 株を維持するために必要な抗生物質を用いて補足したアッセイに使用するために選択した培地を用いて、細胞を上述のように調製する。所望量だけ細胞増殖を抑制することが示されているインデューサー濃度を含む同一の培地の 2 分割に 1 : 100 で細胞を希釈し、そして適切な増殖条件下でインキュベートする。G R A C E 株を維持するために用いられるインデューサーおよび抗生物質を同一濃度で補足した加温殺菌培地中に希釈することにより適切な吸光度に培養液を調整した後、直ちにマイクロタイタープレートウェルに添加する。対照として、抗生物質を含んではいないが、試験抗生物質を溶解するために用いた溶剤は含んでいる多くのウェルにも細胞を添加する。ウェルの吸光度を監視するマイクロタイタープレートリーダー中で適切な増殖条件下にインキュベートすることにより細胞増殖を常時監視する。抗生物質のそれぞれの濃度により引き起こされる増殖抑制の割合を、抗生物質のない培地中での細胞増殖により示される増殖に対して対数増殖速度を比較することにより算出する。 \log [抗生物質濃度] に対する抑制割合のプロットから、それぞれの抗生物質についての IC_{50} 値を推定する。

10

20

【0393】

6.4.6 試験抗生物質の特異性の測定

真菌の繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子産物レベルが律速である場合または律速でない場合の条件で、作用機構が知られている抗生物質により発生した IC_{50} の比較により、真菌の繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子産物が存在する経路の同定が可能になる。真菌の繁殖、毒性または病原性に必要な遺伝子産物を律速するレベルで発現する細胞が、特定の経路で作用する抗生物質に選択的に感受性がある場合、G R A C E 株中の調節可能なプロモーターに結合した遺伝子によりコード化される遺伝子産物は、抗生物質が作用する経路に含まれる。

30

【0394】

6.4.7 試験抗生物質が作用する経路の同定

上述のように、細胞に基づくアッセイを、試験抗生物質が作用する経路を決定するために用いることもできる。このような分析において、G R A C E 株のパネルの各メンバーにおける調節可能なプロモーターの制御下に遺伝子が存在する経路は、上述のように同定される。真菌の繁殖、毒性または病原性に必要な、知られている生物学的経路にある、繁殖、毒性または病原性を必要とする核酸の転写を指揮する調節可能なプロモーターをそれぞれ含む細胞のパネルを、試験抗生物質と接触させる。該抗生物質については、核酸の遺伝子産物が律速であるかまたは律速でない条件下に作用する経路を決定することが望ましい。高められた感受性が、遺伝子産物が特定の経路にある遺伝子産物に対して律速である細胞内で観察されるが、他の経路にある遺伝子産物を律速レベルで発現する細胞内では観察されない場合、試験抗生物質は、高められた感受性が観察される経路に作用している。

40

【0395】

本明細書中で引用した全ての参考文献を、個々の刊行物または特許または特許出願がそ

50

の全てを特定してかつ個別に本明細書中に参照により組み入れることを指示した場合と同程度に、あらゆる目的のためにその全体を本明細書中に参照により組み入れるものとする。

【0396】

本発明は、本明細書に記載した特定の実施形態の範囲に制限されるものではない。実際、本明細書に記載したものに加えて本発明の多くの改変が、前述の記載および添付している図面から当業者に明らかになるであろう。このような改変は添付した特許請求の範囲の見地内であることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0397】

【図1】図1は、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) における遺伝子破壊のためのURAプラスター法を示す。

【図2】図2は、遺伝子 (CaKRE9) の一方の対立遺伝子の遺伝子破壊の構築、および異種プロモーターによる条件付きの調節制御下にもう一方の対立遺伝子を置く、該標的遺伝子のもう一方の対立遺伝子のプロモーター置換を行うGRACE法を示す。

【図3】図3は、GRACE技術を用いた、KRE1、KRE5、KRE6およびKRE9の条件付き遺伝子発現を示す。

【図4】図4は、GRACE技術を用いた、CaKRE1、CaTUB1、CaALG7、CaAUR1、CaFKS1およびCaSAT2の条件付き遺伝子発現を示す。

【図5】図5は、非抑制条件下での発現の上昇を示すための、GRACE株から単離したCaHIS3、CaALR1、CaCDC24およびCaKRE9のmRNAのノーザンプロット分析を示す。

【図6】図6は、3-アミノトリアゾール (3-AT) の存在下および不在下での野生型二倍体CaHIS3株の増殖と比較したCaHIS3ヘテロ接合体株およびテトラサイクリンプロモーター制御CaHIS3 GRACE株の増殖を示す。

【0398】

図6Aは、阻害レベルの3-アミノトリアゾールの存在下での、テトラサイクリンプロモーター制御イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼを構成的に発現するCaHIS3 GRACE株と比較した、野生型株およびCaHIS3ヘテロ接合体株の増殖を示す。

【0399】

図6Bは、中間レベルの3-アミノトリアゾールの存在下での、野生型株、ハプロインサフィシエント (haploinsufficient) CaHIS3ヘテロ接合体株、およびテトラサイクリンプロモーター制御イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼを構成的に発現するCaHIS3 GRACE株、の増殖を示す。

【0400】

図6Cは、中間レベルの3-アミノトリアゾールの存在下での、野生型株、一倍体不全 (ハプロインサフィシエント : haploinsufficient) CaHIS3ヘテロ接合体株、およびテトラサイクリンプロモーター制御イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼを最少量で発現するCaHIS3 GRACE株、の増殖を示す。

【0401】

図6Dは、中間レベルの3-アミノトリアゾールの存在下での、テトラサイクリンプロモーター制御イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼを最少量で発現するCaHIS3 GRACE株の高感受性を示す。

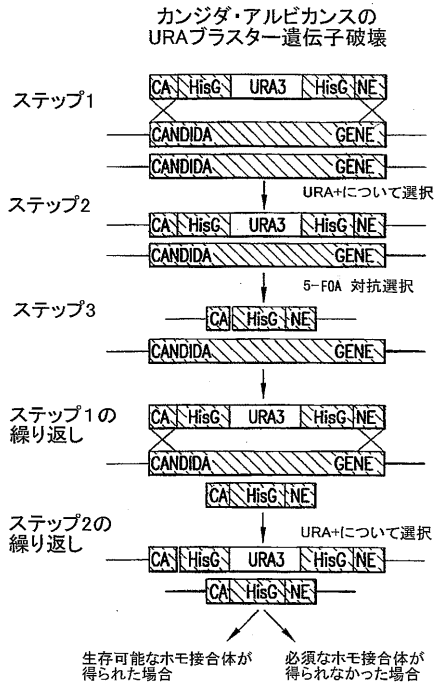
10

20

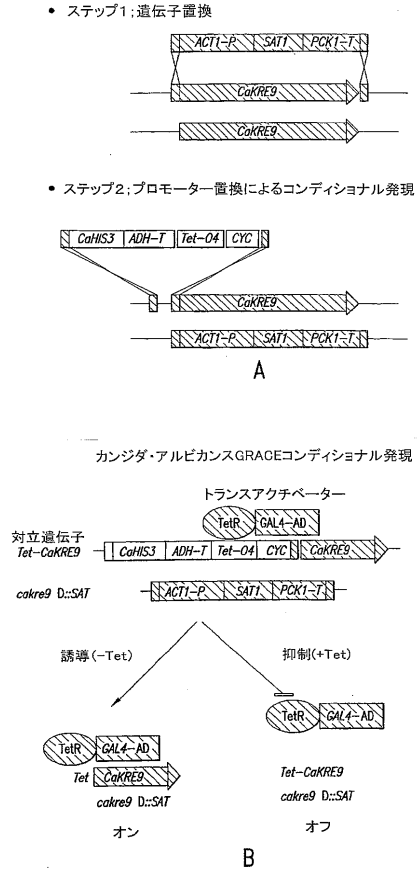
30

40

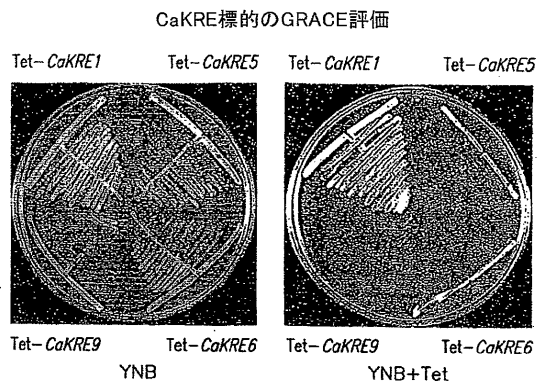
【 図 1 】



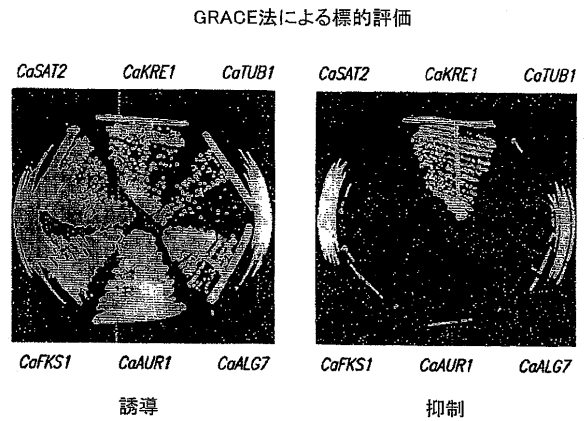
【 図 2 】



【 図 3 】

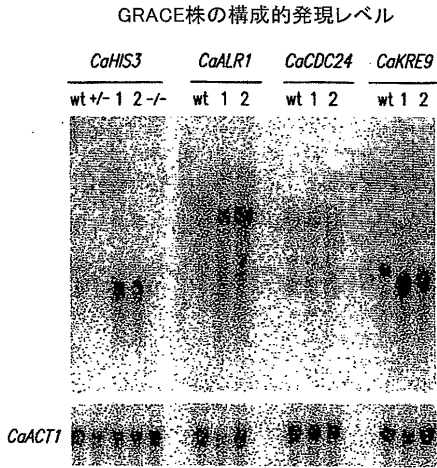


【 図 4 】

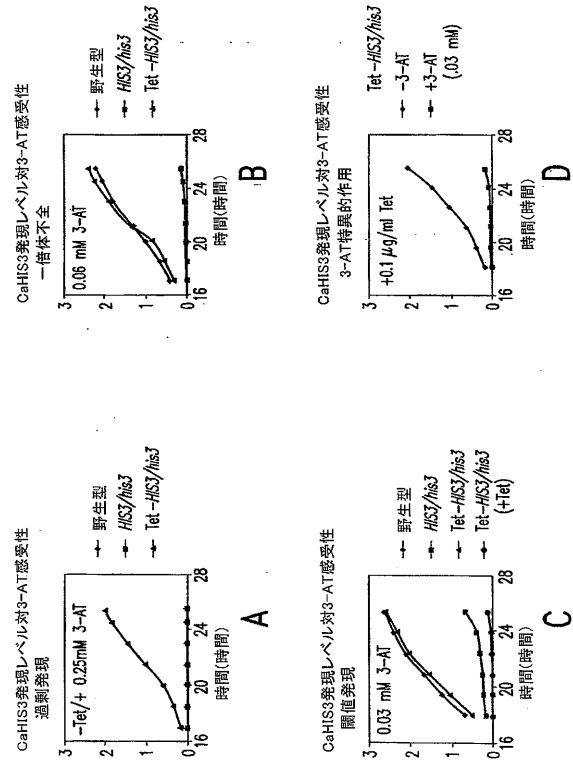


遺伝子	サッカロミセス・セレビジェ	カンジダアルビカンス URA プラスター	カンジダアルビカンス GRACE
KRE1	生存可能	生存可能	生存可能
KRE5	必須	必須	必須
KRE6	必須 + <i>skn1Δ</i>	必須	必須
KRE9	必須 + <i>knh1Δ</i>	必須	必須

【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 01/49486
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/10 C12N15/90 C07K14/40 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
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 practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 53781 A (BERLIN VIVIAN ; MITOTIX INC (US); SMITH SUSAN E (US); CSANK CSILLA) 14 September 2000 (2000-09-14) figure 1	1-68, 70-75, 77
A	GARI ELOI ET AL: "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " YEAST, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 13, no. 9, 1997, pages 837-848, XP000926574 ISSN: 0749-503X the whole document	1-21, 24-31
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 August 2002		Date of mailing of the international search report 22. 11. 02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	Application No
PCT/US	01/49486

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EBI 'Online! EMBL27 November 2000 (2000-11-27) SYCHROVA'H.: Database accession no. AJ251115 XP002209764 abstract	34,35, 37,42
P,X	WO 01 60975 A (BOONE CHARLES ;BUSSEY HOWARD (CA); JIANG BO (CA); ROEMER TERRY (CA) 23 August 2001 (2001-08-23) SEQ ID No 1, 63 table II	1-68, 70-75,77

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/49486

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

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

1. Claims Nos.: 76
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(vi) PCT - Program for computers
2. Claims Nos.: 69
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

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.:
1-68, 70-75, 77 (all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 A9486

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 69

Present claim 69 relates to an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it reduces the activity or level of a gene product.

Whereas the claims cover all compounds having this characteristic or property, the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any such compound. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International application No.
PCT/US 01/49486

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: Claims: 1-68, 70-75,
77 (all partially): Invention 1

An isolated nucleic acid molecule comprising a sequence encoding a gene product required for proliferation of *C. albicans*, said gene product consisting of the amino acid sequence SEQ ID NO:63; other subject-matter referring to said gene product.

2. Claims: Claims: 1-68, 70-75,
77 (all partially): Inventions 2-994

Idem as subject 1 but limited to each of the polypeptides comprising the amino acid sequences SEQ ID NO:2-63 and 7001-7932.
For the sake of conciseness, the first subject-matter is separately defined, the other subject-matters are defined by analogy thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter	Application No
PCT/US	01/49486

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0053781 A	14-09-2000	AU 3526200 A EP 1161544 A	28-09-2000 12-12-2001
WO 0160975 A	23-08-2001	AU 4320401 A	27-08-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/14	C 0 7 K 16/14	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	F
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(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, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

(72) 発明者 ロエマー, テリー
カナダ国 エイチ4 ブイ 1 エックス4 ケベック, モントリオール, コンノート アヴェニュー
4 9 3 5

(72) 発明者 ジャン, ボウ
カナダ国 エイチ3 ダブリュ 2 イー6 ケベック, モントリオール, グロベルト ストリート
5 2 3 1

(72) 発明者 ブーネ, シャルレス
カナダ国 エム4 ティー 1 ケイ9 オンタリオ, トロント, グレンローズ アベニュー 2 5 4

(72) 発明者 ブッセイ, ハワード
カナダ国 エイチ3 ゼット 2 エヌ1 ケベック, ウエストマウント, ピクトリア アベニュー
3 2 5

(72) 発明者 オルセン, カリ, エル.
カナダ国 9 2 1 1 7 サン ディエゴ, ビスタ デ ラ オリラ 3 5 6 0

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA13 FB02
4B024 AA01 AA13 BA31 BA40 BA41 CA02 CA04 DA12 EA04 FA02
GA11 HA01
4B063 QA01 QA18 QQ07 QQ43 QR32 QR55 QS32
4B064 AG01 AG27 AG31 CA06 CA19 CC24 DA01 DA15
4B065 AA73X AA99Y AB01 BA02 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB352
4H045 AA10 AA11 BA10 CA15 DA76 DA86 EA29 EA52 FA74

专利名称(译)	用于药物目标搜索的基因破坏方法		
公开(公告)号	JP2005514899A	公开(公告)日	2005-05-26
申请号	JP2002555238	申请日	2001-12-26
[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	ロエマーテリー ジャンボウ ブーネシャルレス ブッセイハワード オルセンカリエル		
发明人	ロエマー,テリー ジャン,ボウ ブーネ,シャルレス ブッセイ,ハワード オルセン,カリ,エル.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/10 C07K14/37 C07K14/40 C07K16/14 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12N15/1082 C07K14/37 C07K14/40 C12R1/645 C12R1/725		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61K48/00 A61P31/10 C07K14/37 C07K16/14 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA40 4B024/BA41 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ07 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS32 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA73X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA15 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	60/259128 2000-12-29 US 09/792024 2001-02-20 US 60/314050 2001-08-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，这可确定任何基因的所需的基因是否是否必需基因，或有毒的或病原性基因组二倍体致病生物实验和一个组成。的方法，同时去激活特定基因的第一等位基因和条件式下放置所述基因的其他等位基因。基因必需基因和不良感染的传播重要的鉴别提供了筛选和新药开发的病原微生物的基础。本发明还涉及白色念珠菌的基因，提供它对于那些和药物筛选的潜在目标被发现是至关重要的。靶基因的核苷酸序列可用于各种药物发现。重组蛋白的表达，杂交测定和核酸阵列的构建等。由必需基因编码的蛋白质，以及使用包含必需基因的修饰的等位基因遗传操作的细胞的各种筛选方法的使用也包括在本发明所涵盖。

遺伝子名	KO 上流	KO 下流	Tet 上流	Tet 下流	プライマー A	プライマー B	DNA 配列	タンパク質配列
CaYDL105W	1	1001	2001	3001	4001	5001	6001	7001
CaYJL090C	2	1002	2002	3002	4002	5002	6002	7002
CaYLR127C	3	1003	2003	3003	4003	5003	6003	7003
CaYNL151C	4	1004	2004	3004	4004	5004	6004	7004
CaYPL083C	5	1005	2005	3005	4005	5005	6005	7005
CaYHR036W	6	1006	2006	3006	4006	5006	6006	7006
CaYNL256W	7	1007	2007	3007	4007	5007	6007	7007
CaYOL149W	8	1008	2008	3008	4008	5008	6008	7008
CaYDR361C	9	1009	2009	3009	4009	5009	6009	7009
CaYDR407C	10	1010	2010	3010	4010	5010	6010	7010
CaYBR079C	11	1011	2011	3011	4011	5011	6011	7011
CaYOR148C	12	1012	2012	3012	4012	5012	6012	7012
CaYJR041C	13	1013	2013	3013	4013	5013	6013	7013
CaYGR090W	14	1014	2014	3014	4014	5014	6014	7014
CaYBR123C	15	1015	2015	3015	4015	5015	6015	7015
CaYHR118C	16	1016	2016	3016	4016	5016	6016	7016
CaYKR063C	17	1017	2017	3017	4017	5017	6017	7017
CaYOR004W	18	1018	2018	3018	4018	5018	6018	7018
CaYML025C	19	1019	2019	3019	4019	5019	6019	7019
CaYKL033W	20	1020	2020	3020	4020	5020	6020	7020
CaYDR498C	21	1021	2021	3021	4021	5021	6021	7021
CaYIR011C	22	1022	2022	3022	4022	5022	6022	7022
CaYMR220W	23	1023	2023	3023	4023	5023	6023	7023
CaYPR105C	24	1024	2024	3024	4024	5024	6024	7024
CaYDL133C	25	1025	2025	3025	4025	5025	6025	7025
CaYPL128C	26	1026	2026	3026	4026	5026	6026	7026
CaYER026C	27	1027	2027	3027	4027	5027	6027	7027
CaYKL004W	28	1028	2028	3028	4028	5028	6028	7028
CaYMR200W	29	1029	2029	3029	4029	5029	6029	7029
CaYPR165W	30	1030	2030	3030	4030	5030	6030	7030
CaYHR007C	31	1031	2031	3031	4031	5031	6031	7031
CaYJL087C	32	1032	2032	3032	4032	5032	6032	7032
CaYLR239C	33	1033	2033	3033	4033	5033	6033	7033
CaYER118C	34	1034	2034	3034	4034	5034	6034	7034