(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 961 T2** 2005.08.25

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 974 656 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 961.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP97/04019**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 911 447.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/020134**
(86) PCT-Anmeldetag: **05.11.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.05.1998**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.01.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.07.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.08.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/31**
C07K 14/245, C07K 14/25, C07K 14/315, C07K 16/12, C12N 1/21, C12P 21/02, A61K 48/00

(30) Unionspriorität:
29352296 06.11.1996 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Osaka, JP

(74) Vertreter:
Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

(72) Erfinder:
NAKANISHI, Akira, Kita-ku, Tokyo 115, JP; OSHIDA, Tadahiro, Setagaya-ku, Tokyo 157, JP; MATSUSHITA, Tadahiro, Matsudo-shi, Chiba 270, JP; ONUKI, Tetsuo, Satte-shi, Saitama 340-01, JP

(54) Bezeichnung: **INHIBITORPROTEIN DER DNA-GYRASE.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screenen und Identifizieren eines antimikrobiellen Mittels und ähnlichem, durch Testen der Wirkung von Verbindungen auf die Aktivität von DGI.

[0002] Seit Penicillin entdeckt wurde, wurden verschiedene Antibiotika verwendet, um Mikrobeninfektionen zu behandeln, und sie besitzen einen großen Beitrag zu medizinischen Behandlungen. Die Hauptantibiotika, die zur Zeit in klinischen Behandlungen verwendet werden, sind β-Lactamantibiotika und neue Chinolonantibiotika. Es wurde gefunden, dass die Wirkung und der Mechanismus der neuen Chinolonantibiotika die Inhibierung von bakterieller DNA-Gyrase ist.

[0003] Bakterielle DNA-Gyrase ist ein essentielles Enzym für Replikation und Proliferation von Bakterien, weil die Gyrase eine negative superhelikale Struktur in chromosomale DNA einführt oder verwickelte Tochter-DNA unmittelbar nach Abschluss der Replikation entwirrt und trennt, und sie ist aus zwei Untereinheiten (A und B) gebildet.

[0004] Als DNA-Gyrase-Inhibitoren sind Verbindungen wie Novobiocin und Cyclothiazin zusätzlich zu den neuen Chinolonantibiotika bekannt, aber proteinöse Inhibitoren waren nicht bekannt.

[0005] Bezüglich der Kontrolle von DNA-Gyrase-Aktivität haben Horiuchi et al. berichtet, dass jeweils LetD und LetA Proteine, die auf dem F Faktor kodiert sind, der ein Plasmid von Escherichia coli ist, in die Inaktivierung von DNA-Gyrase bzw. Reaktivierung von inaktiver Gyrase involviert sind (Journal of Biological Chemistry, Vol. 267, S. 12244–12551, 1992). Jedoch wird die Inaktivierung mit LetD Protein nur in Experimenten mit vollständigen mikrobiellen Zellen gefunden, und die Inaktivierungswirkung wird nicht in in vitro Rekonstitutionsexperimenten beobachtet. Darüber hinaus gibt es keinen Bericht über DNA-Gyrase-inhibierende Proteine, die auf einem bakteriellen Chromosom kodiert sind.

[0006] Seit kurzem wird das Auftreten von Bakterien, die tolerant gegenüber dem herkömmlichen β-Lactam oder neuen Chinolonantibiotika sind, ein ernstes Problem, und Antibiotika mit neuer/m Wirkung und Mechanismus, die Wirksamkeit gegenüber diesen toleranten Bakterien besitzen, wurden gewünscht.

[0007] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Screenen und Identifizieren eines antimikrobiellen Mittels mit neuer/m Wirkung und Mechanismus bereitzustellen, in welchem die Aktivität von DGI und die dessen Expression unter Verwendung von DGI oder einem Gen dafür moduliert werden.

[0008] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben gefunden, dass, wenn die superhelikale Aktivität jeder Fraktion gemessen wird und jede Fraktion mit SDS-Polyacrylamid Elektrophorese während des Durchführens der Reinigung von Escherichia coli DNA-Gyrase unter Verwendung von Novobiocin Affinitätssäulenchromatographie analysiert wird, Fraktionen vorliegen, die ein Holoenzym von DNA-Gyrase enthalten, aber sie zeigen nicht die superhelikale Aktivität, und diese Fraktionen haben gemeinsam, dass sie ein Protein mit ungefähr 18 kDa enthalten. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben den absolut neuen Befund herausgefunden, dass das ungefähr 18 kDa Protein die Wirkung besitzt, die DNA-Gyrase Aktivität (superhelikale Aktivität) zu inhibieren, und nannten das 18 kDa Protein "DNA-Gyrase-inhibierendes Protein" (DGI) (auch als GyrI bezeichnet). Weiterhin haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung ein Gen, das dieses Protein kodiert (dgi Gen) (auch als gyrI Gen bezeichnet) aus dem Chromosom von Escherichia coli kloniert, um ein Verfahren zur Herstellung von DGI bereitzustellen. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben darüber hinaus ein System zum Messen von DGI Aktivität unter Verwendung von gereinigtem DGI konstruiert, und ein System zum Messen von Expression von DGI unter Verwendung einer Promotorregion des dgi Gens. Darüber hinaus haben die **[TEXT FEHLT]**on des dgi Gens. Darüber hinaus haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung gefunden, dass das Wachstum von Bakterien durch Modulieren der Aktivität oder Expression von DGI kontrolliert werden kann, und sie haben dabei die Erfindung vollendet.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren einer medizinischen Verbindung, umfassend Testen der Wirkung des Modulierens der DNA-Gyrase inhibierenden Aktivität, die DGI besitzt.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0010] Fig. 1 ist eine Abbildung, die ein Elutionsmuster von DNA-Gyrase in Novobiocin Sepharose Säulenchromatographie zeigt.

[0011] Fig. 2 ist eine Abbildung von SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Fraktionen, die durch Novobiocin Sepharose Säulenchromatographie erhalten wurden.

[0012] Fig. 3 ist eine Abbildung von Agarose Gelelektrophorese, welche das Verschwinden von DNA-Gyrase Aktivität durch Fraktion Nr. 32 zeigt.

[0013] Fig. 4 ist eine Abbildung von SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese, welche die Expression in großen Mengen von DGI in Escherichia coli zeigt.

[0014] Fig. 5 ist eine Abbildung von Agarose Gelelektrophorese, welche die Inhibierungswirkung gegenüber DNA-Gyrase superhelikaler Aktivität durch gereinigtes 18 kDa Protein zeigt.

[0015] Fig. 6 ist eine Abbildung, welche die Änderung von dgi Promotoraktivität in dem Vermehrungszustand von Escherichia coli zeigt.

[0016] Fig. 7 ist eine Abbildung, welche die Wirkung von Expression von antisense RNA des dgi Gens auf das Wachstum von Escherichia coli zeigt.

[0017] Fig. 8 ist eine Abbildung von Elektrophorese, welche den Nachweis von Escherichia coli DGI durch Western Blot unter Verwendung eines anti-DGI Antikörpers zeigt.

[0018] Sequenz ID NR: 1 des Sequenzprotokolls, das im Folgenden angegeben ist, zeigt jeweils die Aminosäuresequenz des N-Terminus (16 Reste) von DGI, das von Escherichia coli abgeleitet ist, Sequenz ID NR: 2 und 3 zeigen die Basensequenzen von synthetischen Primer DNAs, die für die Klonierung des dgi Gens, das Escherichia coli DGI kodiert, verwendet wurden, Sequenz ID NR: 4 und 5 zeigen die Basensequenzen von synthetischen Primer DNAs, die für die Herstellung eines Expressionsvektors für Escherichia coli DGI verwendet wurden, Sequenz ID NR: 6 zeigt die Basensequenz eines DNA-Fragments, das ein Escherichia coli dgi Gen enthält, und die Aminosäuresequenz des darin kodierten DGI, und Sequenz ID NR: 7 zeigt die Aminosäuresequenz von Escherichia coli DGI. Sequenz ID NR: 8 stellt jeweils die Basensequenz eines DNA-Fragments dar, welches das dgi Gen enthält, das von einem Mikroorganismus des Shigella Genus abgeleitet ist, und die darin kodierte Amiosäuresequenz von DGI, und Sequenz ID NR: 9 stellt die Aminosäuresequenz von DGI dar, die von einem Mikroorganismus des Shigella Genus abgeleitet ist.

[0019] Als ein Bakterium, das erfindungsgemäßes DGI bildet, kann Escherichia coli geeigneterweise verwendet werden. Spezifische Stämme können den Escherichia coli KL16 Stamm (National Institute of Genetics, Genetic Strain Research Center, Zugangs Nr. ME8002), außerdem den K-12 Stamm (Genetics, Vol. 38, S. 51–64, 1953), außerdem den ML1410 (Microbiology and Immunology, Vol. 22, S. 367–375, 1978), ebenso ATCC25922, ebenso NIHJ JC-2, ebenso den JM109 Stamm (ATCC 53323), ebenso GI724 (Invitrogen Co., USA) und so weiter, einschließen.

[0020] DGI der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls weitreichend und allgemein in verschiedenen anderen Bakterien als E. coli anwesend, und Beispiele solcher Bakterien können Mikroorganismen, die zu dem Shigella Genus, Citrobacter Genus, Pseudomonas Genus, Bacillus Genus, Enterococcus Genus und Staphylococcus Genus gehören, einschließen. Besondere Beispiele von Stämmen schließen Shigella boydii IID67 (NIHJ 1130 Typ 7) (Japanese Journal of Bacteriology, Vol. 50, S. 1019–1031, 1995, Tabelle 1-1), ebenso ATCC35964, ebenso ATCC49348, Shigella dysenteriae IID633 (NIHJ 177249 Typ 3) (Japanese Journal of Bacteriology, Vol. 50, S. 1019–1031, 1995, Tabelle 1-1), ebenso ATCC13313, ebenso ATCC23351, ebenso ATCC49345, Shigella sonnei TRRL10805, ebenso ATCC11060, ebenso ATCC29930, Citrobacter freundii IID976 (NIH 17), Peusodomonas aeruginosa ATCC27853, Bacillus subtilis ATCC6633, Enterococcus faecalis ATCC29212, Staphylococcus aureus RN450 (Journal of Bacteriology, Vol. 174, S. 4952–4959, 1992) und so weiter, ein.

[0021] Die Reinigung von DGI kann aus einer bakteriellen Kultur durch verschiedenes Kombinieren von Reinigungsverfahren, wie Ammoniumsulfatpräzipitation, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie, unter Verwendung seiner physiologischen Aktivität (die Wirkung des Inhibierens der superhelikalen Aktivität von DNA-Gyrase) als einen Index, z. B. wie unten gezeigt, durchgeführt werden.

[0022] Wenn die Tatsache, dass DGI in kombinierter Form mit DNA-Gyrase anwesend ist, verwendet wird, werden beispielsweise Nukleinsäureentfernung, Ammoniumsulfatpräzipitation und Fraktionierung unter Verwendung einer Novobiocin Affinitätssäule aus einer extrahierten Flüssigkeit aus mikrobiellen Zellen in der log-

arithmischen Wachstumsphase, gemäß dem DNA-Gyrase Reinigungsverfahren (Aoyama et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 32, S. 104–109, 1988), durchgeführt. Weil Novobiocin an DNA-Gyrase bindet, wird Novobiocin Affinitätschromatographie zur Fraktionierung und Reinigung von DNA-Gyrase verwendet. Für jede Fraktion wird die superhelikale Aktivität von DNA-Gyrase gemessen, und SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wird durchgeführt, und Fraktionen werden gesammelt, in denen die Anwesenheit eines Proteins, das einem DNA-Gyrase Holoenzym entspricht, durch die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese bestätigt wird, aber die keine superhelikale Aktivität zeigen, nämlich in denen DNA-Gyrase mit DGI koexistent ist. DGI kann aus den Fraktionen durch Gelfiltration unter Verwendung von Sephadex G-75 und ähnlichem isoliert und gereinigt werden.

[0023] Alternativ dazu, unter Verwendung einer extrahierten Flüssigkeit aus mikrobiellen Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, kann DGI auch durch Ammoniumsulfatpräzipitation, starker Anionen Austauschchromatographie und Verwendung von Q-Sepharose Schnellflusssäulen (Pharmacia Co.), Gelfiltration unter Verwendung einer TSK Gel Toyopearl HW-55 Säule (Toso Co.) und SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese gereinigt werden.

[0024] Die superhelikale Aktivität von DNA-Gyrase kann in Übereinstimmung mit z. B. dem Verfahren, das in Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 32, S. 104–109, 1988 beschrieben ist, gemessen werden. Die DGI Aktivität, nämlich die Wirkung des Inhibierens der superhelikalen Aktivität von DNA-Gyrase, kann gemessen werden unter Verwendung des superhelikalen Aktivitätsmessungssystems.

[0025] Das gereinigte DGI, das von Escherichia coli abgeleitet ist, war ein Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 18 kDa. Und die Aminosäuresequenz seines N-Terminus ist durch Sequenz ID NR: 1, die im Folgenden angegeben ist, dargestellt.

[0026] Die Homologiesuche unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz Datenbank (EBML/Genbank/DDBJ) zeigte, dass die N-terminale Sequenz von DGI identisch zu der N-terminalen Aminosäuresequenz eines angenommenen Produktes (hypothetisches Protein) YeeB in der sbcB Region (EMBL Zugangs Nr. U00009) der chromosomalen DNA von Escherichia coli K-12 Stamm ist. Darüber hinaus entsprach das Molekulargewicht von DGI jenem des hypothetischen Proteins YeeB. Aus den oben genannten Tatsachen glaubten die Erfinder, dass YeeB DGI war, und dass ein DGI kodierendes Gen (dgi Gen) in einem Teil anwesend war, der die translationale Region von YeeB enthält, und die Erfinder haben somit das Escherichia coli dgi Gen basierend auf der Basensequenz vor und nach der translationalen Region des yeeB Gens kloniert.

[0027] EMBL Zugangs Nr. U00009 beschreibt die Basensequenz der sbcB Region von chromosomaler DNA von Escherichia coli K-12 Stamm und die Aminosäure Primärsequenz eines strukturellen Genproduktes, das von der Basensequenz von der Person, die in der Registrierung benannt ist, angenommen wurde. Jedoch sind physiologische Aktivität und Funktionen von solchen hypothetischen Produkten (wie YeeB und ähnlichen), die sehr wichtige Informationen sind, darin überhaupt nicht bekannt oder vorgeschlagen, und es ist nicht einmal bekannt, ob die hypothetischen Produkte wirklich in einer Zelle exprimiert werden oder nicht. Darüber hinaus wird von dem sbmC Gen (Genprodukt SbmC) berichtet, das in der sbcB Region anwesend ist und dieselbe Sequenz wie das yeeB besitzt (EMBL Zugangs Nr. X84885 und Molecular Microbiology, Vol. 18, S. 301–311, 1995). Jedoch gibt es bezüglich des sbmC Gens einige Beschreibungen in Verbindung mit der Toleranz gegenüber einer peptidösen antibiotischen Substanz Microcin B17 und auf der Annahme, dass es eines der SOS Gene ist, aber es ist immer noch nicht offenbart, welche physiologische Aktivität und Funktion das Genprodukt besitzt.

[0028] Das dgi Gen von Escherichia coli kann kloniert werden durch Durchführen einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit Escherichia coli chromosomaler DNA als einer Matrize unter Verwendung eines Primers, der auf der Basis der Basensequenz vor und hinter der yeeB translationalen Region der oben genannten sbcB Region designed und synthetisiert ist (EMBL Zugangs Nr. U00009). Nach wahlweiser Spaltung mit einem geeigneten Restriktionsenzym können PCR Produkte in ein Vektorplasmid ligiert werden, das in dem Escherichia coli Wirt vermehrungsfähig ist.

[0029] Ein dgi Gen, das von Escherichia coli oder einem anderen Bakterium als Escherichia coli abgeleitet ist, kann einfach kloniert werden, beispielsweise durch Herstellen der Bibliothek einer gewünschten bakteriellen chromosomalen DNA und ihrem Screenen unter Verwendung eines markierten DNA-Fragments, das einen Teil oder das gesamte dgi Gen von Escherichia coli als eine Sonde enthält. Beispielsweise kann dies durchgeführt werden durch Verwenden eines DNA-Fragments des dgi Gens umfassend die Basensequenz, die in Sequenz ID NR: 6 oder Sequenz ID NR: 8 gezeigt ist, als eine Sonde und Selektieren von Genen, die mit dem

Fragment unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Die DNA-Basensequenz der positiven Klone, die so erhalten werden, wird bestimmt, und dadurch kann die DNA-Sequenz des dgi Gens bestimmt werden, und von seiner translationalen Region kann die Aminosäuresequenz von DGI erhalten werden. Solche dgi Gene, die von anderen Bakterien als Escherichia coli abgeleitet sind, besitzen für gewöhnlich eine Homologie von 70% oder mehr, vorzugsweise 80% oder mehr, weiter bevorzugt 90% oder mehr in der Basensequenz.

[0030] DNA-Bibliotheken können beispielsweise hergestellt werden durch das Verfahren, das in "Molecular Cloning" (geschrieben von Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., publiziert von Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989) beschrieben ist. Alternativ dazu, wenn kommerziell erhältliche Bibliotheken vorliegen, können diese verwendet werden.

[0031] DGI kann in einer Wirtszelle durch Genrekombinationstechniken unter Verwendung einer DGI kodierenden DNA, wie dem dgi Gen, exprimiert werden. Ein Expressionsplasmid wird hergestellt durch Verbinden einer DGI kodierenden DNA stromabwärts von einem geeigneten Promotor (z. B. λpL Promotor, trp Promotor, lac Promotor oder T7 Promotor, falls Escherichia coli als ein Wirt verwendet wird), und ihr Einfügen in einen Vektor, der in einem Wirtsmikroorganismus (z. B. pBR322, pUC18 oder pUC19, wenn Escherichia coli als ein Wirt verwendet wird) funktionell ist. Alternativ dazu kann eine DGI kodierende DNA mit einem Expressionsvektor, der einen geeigneten Promotor enthält, ligiert werden. Weil das normale Wachstum einer Wirtszelle reprimiert ist, wenn eine große Menge von DGI exprimiert wird, ist es bevorzugt, einen Vektor zu verwenden, der einen Promotor enthält, der die Fähigkeit besitzt, die Expressionsinduktion zu kontrollieren, um große Mengen an DGI zu exprimieren, der Expressionsvektor kann pLEX (erhältlich von Invitrogen Co.) und pET (erhältlich von Novagen Co.) einschließen, falls Escherichia coli als ein Wirt verwendet wird.

[0032] Eine Wirtszelle, die mit dem so erhaltenen Expressionsvektor transformiert wird (d. h. ein replikationsfähiger Expressionsvektor, der eine DGI kodierende DNA enthält), wird kultiviert, und das gewünschte DGI kann aus der Kulturbrühe oder so erhaltenen mikrobiellen Zellen hergestellt werden.

[0033] Als eine DGI kodierende DNA kann ein natürlich vorkommendes Gen eines Mikroorganismus verwendet werden, aber sie ist nicht darauf beschränkt. Beispielsweise kann irgendeine DNA, welche die Aminosäuresequenz, die durch Sequenz ID NR: 7 gezeigt ist, kodiert, in dem Fall von Escherichia coli DGI verwendet werden, während irgendeine DNA, welche die Aminosäuresequenz, die durch Sequenz ID NR: 9 gezeigt ist, kodiert, im Fall von DGI eines Mikroorganismus des Shigella Genus verwendet werden kann. Ein Codon, das jeder Aminosäure entspricht, ist bekannt, und somit kann eine DNA designed werden, die einer Aminosäuresequenz entspricht, und sie kann als eine Polypeptid kodierende DNA verwendet werden, ohne Beschränkung auf irgendwelche native dgi Gene. Ein bis sechs Codons sind bekannt, die jede Aminosäure kodieren, und irgendeines dieser Codons kann wahlweise ausgewählt werden; beispielsweise kann eine Sequenz mit höherer Expressionswirksamkeit unter Berücksichtigung der Frequenz der Verwendung von Codons in einem Wirt, der für Expression verwendet wird, designed werden. Eine DNA mit einer designten Basensequenz kann erhalten werden durch, z. B. chemische Synthese oder teilweise Modifikation eines natürlich vorkommenden Gens. Künstliche teilweise Modifikation einer Basensequenz und darin Einführen von Mutationen kann durch das bekannte seitenspezifische Mutationseinführungsverfahren durchgeführt werden (Mark, D. F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences, Vol. 81, S. 5662–5666 (1984)), unter Verwendung eines Primers, eines synthetischen Oligonukleotids, das eine gewünschte Modifikation kodiert.

[0034] In Escherichia coli, in dem eine große Menge an DGI exprimiert wird, kann abnormale Zellteilung beobachtet werden. Und, wenn die DGI Expression durch Exprimieren einer antisense RNA des dgi gens reprimiert wird, kann die Verlängerung eines Bakteriums beobachtet werden, und solche Abnormalität in der Morphologie wird auch beobachtet, wenn Escherichia coli mit einem neuen Chinolonmittel, das ein Gyrase Inhibitor ist, behandelt wird (Takeshi Nishino et al., Chemotherapy, 41(s-5), 50–66, 1993). Daraus wird eine medizinische Verbindung, welche die DGI Aktivität moduliert (steigert oder inhibiert) oder die Expression des dgi Gens moduliert (steigert oder inhibiert), als nützlich für antimikrobielle Mittel erachtet.

[0035] Unter Verwendung des DGI der vorliegenden Erfindung, kann eine zu testende Verbindung untersucht werden, ob sie die Wirkung besitzt, die DGI Aktivität (DNA-Gyrase-inhibierende Aktivität) zu modulieren oder nicht. Darüber hinaus kann eine zu testende Verbindung untersucht werden, ob sie die Wirkung der Modulation der Expression des dgi Gens besitzt oder nicht, unter Verwendung eines Promotors des dgi Gens der vorliegenden Erfindung. Durch solche Assays kann beispielsweise eine medizinische Verbindung, die für ein antimikrobielles Mittel nützlich ist, gescreent und identifiziert werden.

[0036] Als das Verfahren zum wirksamen Untersuchen, ob eine zu testende Verbindung die Wirkung, die DGI

Aktivität zu modulieren, unter Verwendung eines Promotors des dgi Gens der vorliegenden Erfindung, besitzt oder nicht, ist beispielhaft ein Verfahren angegeben, umfassend die Verwendung eines rekombinanten Plasmids, das erhalten wird durch Ligieren eines Indikatorgens stromabwärts einer Promotorregion in dem dgi Gen, und das designed ist, um das Indikatorgen unter der Kontrolle des Promotors des dgi Gens zu exprimieren. Die Promotoraktivität wird wirksam gemessen, wobei als ein Index die Expression eines Indikatorproteins in einer transformierten Wirtszelle durch Transformieren der Wirtszelle mit dem so erhaltenen rekombinanten Plasmid verwendet wird. Es besteht das Problem zwischen den heterogenen Spezies, dass die Expressionswirksamkeit unterschiedlich ist, und deshalb sind ein Mikroorganismus, der als ein Wirt verwendet wird, und die Quelle eines dgi Promotors vorzugsweise homogen. Als Indikatorproteine (Indikatorgene) sind beispielhaft β-Galactosidase (lacZ Gen), Luciferase (luc Gen) und alkalische Phosphatase (phoA Gen) ausgeführt.

[0037] Substanzen, welche die Expression des dgi Gens modulieren, können beispielsweise eine antisense DNA oder RNA des dgi Gens einschließen. Solche DNA oder RNA kann durch chemische Synthese oder ähnliches erhalten werden. Auch kann eine antisense RNA erhalten werden durch Exprimieren eines Plasmids in einen Wirt, wobei ein Fragment, das einen Teil des Gens enthält, in einen Expressionsvektor in einer reversen Richtung (in einer antisense Richtung) eingeführt wird.

[0038] Darüber hinaus kann ein Antikörper (monoklonaler oder polyklonaler Antikörper), der spezifisch das DGI erkennt, unter Verwendung eines gereinigten DGI erhalten werden. Beispielsweise können polyklonale Antikörper durch das herkömmliche Verfahren erhalten werden, wie ein Verfahren umfassend Inokulieren eines geeigneten Wirtstieres (wie eines Kaninchens oder einer Maus) mit einem gereinigten DGI, seinem Fragment oder einem synthetischen Peptid, das eine Teilsequenz davon enthält, und Sammeln von Antiserum. Monoklonale Antikörper können durch technische Verfahren hergestellt werden, wie die herkömmlichen Hybridomaverfahren, unter Verwendung von gereinigtem DGI, seinem Fragment oder einem synthetischen Peptid, das eine Teilsequenz davon als ein Antigen enthält. Der so erhaltene Antikörper kann beispielweise verwendet werden zum Nachweisen, Quantifizieren oder Reinigen des DGI.

[0039] Das DGI der vorliegenden Erfindung kann seine Fragmente und ihre Homologe einschließen. Solche Fragmente oder Homologe können irgendein Material sein, solange es entweder eine biologische Aktivität besitzt, die jener von DGI ähnlich ist (im Wesentlichen derselbe Typ und Wirksamkeit wie DGI), oder immunologische Gleichwertigkeit dazu. Insbesondere, als DGIs, sind beispielhaft ausgeführt, zusätzlich zu jenen, welche die Aminosäuresequenz, die durch Sequenz ID NR: 7 oder 9 gezeigt ist, umfassen, jene, die eine Aminosäuresequenz umfassen, wobei eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, substituiert oder hinzugefügt sind in der Aminosäuresequenz, die durch Sequenz ID NR: 7 oder 9 gezeigt ist. Der Grad der Deletion, Substitution oder Addition von Aminosäuren kann derart sein, dass die Stärke die DNA-Gyrase Aktivität zu inhibieren, nicht verloren wird, und allgemein 1 bis ungefähr 30, vorzugsweise 1 bis ungefähr 15, weiter bevorzugt 1 bis ungefähr 7 werden darauf verwendet. Solche Proteine besitzen eine Homologie von normalerweise 80% oder mehr, vorzugsweise 90% oder mehr, weiter bevorzugt 95% oder mehr im Vergleich zu der Aminosäuresequenz, die durch Sequenz ID NR: 7 oder 9 dargestellt ist.

[0040] Als Gene, welche das DGI der vorliegenden Erfindung kodieren, sind beispielhaft ausgeführt, zusätzlich zu den DNAs, welche die Basensequenzen umfassen, die durch Sequenz ID NR: 6 oder 8 dargestellt sind, jene mit der Fähigkeit mit einer DNA unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren, welche die Basensequenz umfasst, die durch Sequenz ID NR: 6 oder 8 dargestellt ist. Irgendeine dieser hybridisierbaren DNAs kann eine sein mit der Stärke, dass ein Protein, das durch die DNA kodiert wird, die DNA-Gyrase Aktivität inhibiert. Solche DNAs besitzen eine Basensequenzhomologie von normalerweise 70% oder mehr, vorzugsweise 80% oder mehr, weiter bevorzugt 90% oder mehr der Basensequenz, die durch Sequenz ID NR: 6 oder 8 dargestellt ist. Diese DNAs können mutante Gene, die natürlicherweise gefunden werden, künstlich modifizierte mutierte Gene und homologe Gene, die von heterogenen Organismen abgeleitet sind, einschließen.

[0041] Die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen in der vorliegenden Erfindung können derart ausgeführt werden, dass Hybridisierung in einer Hybridisierungslösung mit 5 × SSPE (5 mal die Konzentration von SSPE) oder mit einer entsprechenden Salzkonzentration unter den Temperaturbedingungen von 37 bis 42°C für ungefähr 12 bis 18 Stunden angewandt wird, Vorwaschen wird durchgeführt, falls notwendig, in 5 × SSPE oder einer Lösung mit einer entsprechenden Salzkonzentration, und Waschen wird durchgeführt in 1 × SSPE oder einer Lösung mit einer entsprechenden Salzkonzentration unter den Temperaturbedingungen von 50 bis 65°C. Um höhere Stringenz zu erhalten, wird das Waschen in einer Lösung mit einer niedrigeren Salzkonzentration, wie 0,1 × SSPE oder einer Lösung mit einer entsprechenden Salzkonzentration durchgeführt.

[0042] Die vorliegende Erfindung wird detaillierter mit den Beispielen unten beschrieben, aber diese Beispiele

beschränken nicht den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung.

[0043] In den folgenden Beispielen wurde jedes Verfahren, wenn es nicht spezifisch anders angegeben ist, in Übereinstimmung mit dem Verfahren durchgeführt, das in "Molecular Cloning" (geschrieben von Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. und publiziert durch Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989) beschrieben ist, oder wenn kommerziell erhältliche Reagenzien und Kits verwendet wurden, wurden diese entsprechend den Anweisungen dafür verwendet.

Beispiele

Beispiel 1 Isolierung und Identifizierung von Escherichia coli DNA-Gyrase-inhibierendem Protein (DGI)

(1) Kultur des Bakteriums

[0044] Unter Verwendung des Escherichia coli KL 16 Stamms als einen Stamm, wurde das Kultivieren wie folgt durchgeführt. In 1000 ml reinem Wasser wurde 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 3 g KH_2PO_4, 5,25 g K_2HPO_4, 0,57 g Natriumcitratdihydrat und 0,12 g $MgSO_4$ gelöst, und nach der Sterilisierung wurden ein getrennt sterilisiertes Caseinhydrolysat und Glucose hinzugefügt, so dass die Konzentration davon 1% erreichte, um ein Kulturmedium herzustellen. 150 ml dieses Mediums wurde in eine Erlenmeyer Flasche mit 500 ml Volumen eingeführt, und 10 ml des kultivierten Mediums (über Nacht kultiviert) wurde hinzugefügt, um Rotation und Schütteln (160 rpm) bei 37°C durchzuführen. Kulturmedium in der späten logarithmischen Wachstumsphase (ungefähr 1,0 von OD600) wurde schnell gekühlt und danach zentrifugiert (5000 rpm × 10 min) bei 4°C, um die Zellen zu sammeln. Es wurde zweimal mit einem TED Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA und 1 mM Dithiothreitol) gewaschen, und es wurde, nach Messen des Nassgewichts, in einem entsprechenden Volumen des TED Puffers suspendiert, und in jeweils ungefähr 20 ml portioniert und bei –80°C konserviert.

(2) Reinigung von Escherichia coli DNA-Gyrase

[0045] Die Reinigung von DNA-Gyrase wurde in Übereinstimmung mit dem Verfahren von Aoyama et al. (Antimicrobial Agents und Chemotherapy, Vol. 32, S. 104–109, 1989) wie folgt durchgeführt.

[0046] Die bakteriellen Zellen, die bei –80°C konserviert wurden, wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, und 0,5 ml 0,5 M Dithiothreitol, 2 ml 0,5 M EDTA, 4 ml 0,5 M KCl und 2 ml einer Lysozymlösung bei 30 mg/ml wurden schrittweise pro 20 ml davon hinzugefügt, um langsames Schütteln bei Raumtemperatur für 15 Minuten durchzuführen. Danach wurde Brij 58 (erhältlich von Sigma Co.) zu 0,5% Konzentration hinzugefügt, und es wurde Bewegung in Eis für 30 Minuten durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde ultrazentrifugiert (35000 rpm × 1 Stunde) bei 4°C, und ein Überstand wurde abgetrennt. Zu dem Überstand wurde 20% Streptomycin zu der Endkonzentration von 2% hinzugefügt, und Nukleinsäuren wurden entfernt. Danach wurde Bewegung für 30 Minuten in Eis durchgeführt, und Zentrifugation (12000 rpm × 15 min) wurde durchgeführt bei 4°C, um einen Überstand zu erhalten. 0,39 g Ammoniumsulfat wurde pro ml des Überstands hinzugefügt und zentrifugiert (12000 rpm × 20 min), um ein Präzipitat zu erhalten. Das Präzipitat wurde in 20 ml eines TED Puffers suspendiert und danach in 4000 ml eines TED Puffers bei 4°C dialysiert, um einen Rohextrakt (50 ml) zu erhalten. Der Rohextrakt wurde auf eine Novobiocin-Sepharose Säule (Bettvolumen 30 ml) geladen, die zuvor mit einem TED Puffer äquilibriert worden war. Die Novobiocin-Sepharose Säule wurde verwendet, die durch Koppeln von Novobiocin (erhältlich von Sigma Co.) an Epoxy aktivierte Sepharose 6B (erhältlich von Pharmacia Co.) in Übereinstimmung mit dem Verfahren von Staudenbauer & Orr et al. (Nucleic Acids Resarch, Vol. 9, S. 3589–3603, 1989), hergestellt worden war. Nach dem Waschen der Säule mit 6 mal dem Volumen eines TED Puffers, wurde sie aufeinanderfolgend mit TED Puffern eluiert, die jeweils 0,2 M KCl, 2 M KCl, 5 M Harnstoff, 2 M KCl-5 M Harnstoff und 2 M KCl-5 M Harnstoff (pH 4,0) enthielten, und fraktioniert. Jeweils 3 ml der Fraktionen des Eluats wurden einem TED Puffer – 50% Glycerin bei 4°C über Nacht dialysiert, und danach wurde die superhelikale Aktivität jeder Fraktion durch das Verfahren, das in den Referenzbeispielen unten beschrieben ist, gemessen.

[0047] Die Fraktionen, in denen Aktivität gefunden wurde, wurden als eine Fraktion gesammelt, die das Holoenzym von DNA-Gyrase (Komplex aus Untereinheiten A und B) enthält. Ein Teil der Fraktionen, die nicht die aktiven Fraktionen waren, wurde verwendet, und eine verdünnte aktive Fraktion wurde hinzugefügt, um zu untersuchen, ob die superhelikale Aktivität zurückgewonnen wurde oder nicht. Die Fraktionen, deren superhelikale Aktivität zurückgewonnen wurde, wurden als grob gereinigte Untereinheit A Fraktionen gesammelt. Danach wurde ein Teil dieser Untereinheit A Fraktion zu den anderen Fraktionen hinzugefügt, um zu untersuchen, ob die superhelikale Aktivität zurückgewonnen wurde oder nicht. Die Fraktionen deren Aktivität zurückgewon-

nen wurde, wurden als grob gereinigte Untereinheit B Fraktionen gesammelt. Das Elutionsmuster von Proteinen von der Novobiocin-Sepharose Säule ist in Fig. 1 gezeigt. DNA-Gyrase Holoenzym (Komplex aus Untereinheiten A und B), Untereinheit A und Untereinheit B wurden in Fraktionen gefunden, die mit jeweils 5 M Harnstoff eluierten, Fraktionen eluierten jeweils mit 2 M KCl und Fraktionen eluierten mit 2 M KCl + 5 M Harnstoff.

(3) Reinigung von Untereinheiten A und B von Escherichia coli DNA-Gyrase

[0048] Die Reinigung von Untereinheiten A und B wurde wie folgt durchgeführt. 85 ml der grob gereinigten Untereinheit A Fraktion (verdünnt mit einem TED Puffer, fünffach), erhalten im obigen (2) wurde auf eine Heparin-Sepharose CL-6B (erhältlich von Pharmacia Co.) Säule (Bettvolumen 15 ml) geladen, die mit einem 10% Glycerin enthaltenden TED Puffer äquilibriert worden war. Nach dem Waschen mit demselben Puffer, wurde sie mit 10% Glycerin enthaltenden TED Puffern eluiert, die jeweils 0,05 M KCl, 0,2 M KCl, 2 M KCl, 2 M KCl-5 M Harnstoff und 2 M KCl-5 M Harnstoff (pH 4,0) enthalten, und fraktioniert. Jeder Fraktion (5 µl) wurden die Holoenzym Fraktion (ungefähr 2,5 µl), die aus dem obigen (2) erhalten wurde, hinzugefügt, und hinsichtlich der superhelikalen Aktivität gemessen, und gereinigte Untereinheit A enthaltende Fraktionen wurden bestimmt.

[0049] 35 ml der Untereinheit B Fraktion (verdünnt mit TED Puffer, fünffach), erhalten in dem obigen (2), wurde auf einen Novobiocin-Sepharose Säule (Bettvolumen 10 ml) geladen, die mit einem 10% Glycerin enthaltenden TED Puffer äquilibriert worden war. Nach dem Waschen mit demselben Puffer wurde sie mit 10% Glycerin enthaltenden TED Puffern eluiert, die jeweils 2 M KCl, 2,5 M Harnstoff, 5 M Harnstoff, 2 M KCl-5 M Harnstoff und 2 M KCl-5 M Harnstoff (pH 4,0) enthalten, und fraktioniert. Jede Fraktion, zu der die gereinigte Untereinheit A Fraktion hinzugefügt wurde, wurde hinsichtlich der superhelikalen Aktivität gemessen, und gereinigte Untereinheit B Fraktionen wurden bestimmt. Jede der gereinigten Untereinheit Fraktionen wurde unter Verwendung eines 50% Glycerin enthaltenden TED Puffers dialysiert und bei –20°C konserviert.

(4) Isolierung von Escherichia coli DNA-Gyrase-inhibierendem Protein

[0050] All die Fraktionen, die durch die Novobiocin-Sepharose Säulenchromatographie im obigen (2) erhalten wurden, wurden einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, um die Elektrophoresemuster von aktiven und inaktiven Fraktionen zu vergleichen. Als ein Ergebnis besaßen die Fraktionen Nr. 32 und 33 ein Elektrophoresebild, welches dem Holoenzym entsprach, während sie keine superhelikale Aktivität zeigten, und es wurde beobachtet, dass sie eine gemeinsame Bande des 18 kDa Proteins besitzen (Fig. 2).

[0051] Fraktion Nr. 32 (0,4 ml) wurde auf eine Sephadex G-75 (Säulenvolumen 3,5 ml) geladen, die mit einem 10% Glycerol enthaltenden TED Puffer äquilibriert worden war, und Gelfiltration wurde durchgeführt. Nach der Fraktionierung durch Elution mit einem TED Puffer wurde ein Teil jeder Fraktion abgenommen und einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unterzogen, um die Bande des 18 kDa Proteins zu bestätigen, und das Protein in den Fraktionen, in denen das 18 kDa Protein, d. h. das DNA-Gyrase-inhibierende Protein (DGI) als eine einzelne Bande erschien, wurde als gereinigtes DGI gesammelt. Als ein Ergebnis wurden ungefähr 1,5 µg gereinigtes DGI aus 26,5 g nassen bakteriellen Zellen erhalten.

(5) DNA-Gyrase-inhibierende Aktivität von DGI

[0052] Nr. 32 Fraktion (5 µl) wurde dem Messsystem für die superhelikale Aktivität von DNA-Gyrase, das in den unten erwähnten Referenzbeispielen beschrieben ist, hinzugefügt, d. h. eine Reaktionsflüssigkeit (15 µl) enthaltend relaxierte pBR322 DNA (0,1 µg), Untereinheit A (1 U) und Untereinheit B (1 U). Damit reagiert, wurde die relaxierte Plasmid DNA nicht in die superhelikale Form (Fig. 3) umgewandelt. Daraus wurde bestätigt, dass Nr. 32 Fraktion einen Inhibitor der superhelikalen Aktivität der DNA-Gyrase enthielt. Es wurde außerdem bestätigt, dass das gereinigte DGI, das in dem obigen (4) erhalten wurde, vollständig die superhelikale Aktivität von DNA-Gyrase bei einer Konzentration von 8 µg/ml inhibierte.

(6) Bestimmen der N-terminalen Aminosäuresequenz von DGI, das von Escherichia coli abgeleitet ist

[0053] Die N-terminale Aminosäuresequenz des gereinigten DGI, die in dem obigen (4) erhalten wurde, wurde unter Verwendung eines Peptid Sequenzierers LF3400 (erhältlich von Beckman Co.) bestimmt. Die so erhaltene Aminosäuresequenz der N-terminalen 16 Reste wurde durch Sequenz ID NR: 1 in dem Sequenz Protokoll, das im Folgenden erwähnt ist, dargestellt.

Beispiel 2 Klonieren des Escherichia coli dgi Gens und Bestimmen seiner Basensequenz

[0054] Unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz Datenbank (EMBL/Genbank/DDBJ) wurde eine Homologiesuche für die N-terminale Aminosäuresequenz von Escherichia coli DGI durchgeführt, die in dem oben erwähnten Absatz (6) von Beispiel 1 bestimmt wurde, und dabei wurde gefunden, dass die N-terminale Sequenz von DGI identisch war mit der N-terminalen Aminosäuresequenz eines Produkts YeeB, das vermutlich in der sbcB Region (EMBL Zugangs Nr. U00009) von Escherichia coli K-12 Stamm chromosomaler DNA existiert. Das Molekulargewicht von YeeB, das von der Sequenz geschätzt wurde, betrug 18081 Dalton, und es war identisch zu dem Molekulargewicht von DGI. Daraus wurde angenommen, dass das vermutliche YeeB DGI war, und dass das DGI kodierende Gen (dgi Gen) in einem Abschnitt anwesend war, der eine Translationsregion des yeeB Gens enthält.

[0055] So wurde eine Region, die der 189.–1370. Base von dem 5'-Ende der oben erwähnten sbcB Region (EMBL Zugangs Nr. U00009) entspricht, aus E. coli KL16 Stamm chromosomaler DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR), wie unten erwähnt, kloniert. Es wurden Oligonukleotid Primer, in denen BamHI Erkennungsstellen in beide Enden einer betroffenen Sequenz eingebaut wurden, designed und mit einem DNA Synthetisierer synthetisiert (die Sequenz des sense Primers ist jeweils in Sequenz ID NR: 2 und die Sequenz des antisense Primers in Sequenz ID NR: 3 des unten erwähnten Sequenzprotokolls gezeigt). Die PCR Reaktion wurde in einem PCR Puffer durchgeführt (Zusammensetzung: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) und 1% Triton X-100), versetzt mit 0,5 mg/ml E. coli KL16 chromosomaler DNA, 800 µM dNTP Mischung, 0,66 µM des sense Primers, 1 µM des antisense Primers, 2 mM $MgCl_2$ und 0,025 U/µl Taq Polymerase (30 Zyklen von 2 Minuten bei 94°C, 2 Minuten bei 51°C und 3 Minuten bei 72°C), um DNA zu amplifizieren. Das 1,2 kbp DNA Fragment, das durch die PCR erhalten wurde, wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und in ein Vektorplasmid pUC19 ligiert (erhältlich von Takara Shuzo Co.), und das so erhaltene rekombinante Plasmid wurde in E. coli des JM109 Stammes eingeführt. Diese rekombinanten Plasmide wurden verwendet, um die Basensequenz des 1,2 kbp DNA Fragments durch das Dideoxy Verfahren mit einem Fluoreszenz DNA Sequenzierer (erhältlich von Hitachi Co.) zu bestimmen. Die so erhaltene Basensequenz und die Aminosäuresequenz eines Proteins, das durch einen offenen Leserahmen darin kodiert wird, wurden in Sequenz ID NR: 6 gezeigt. Die Sequenz war identisch zu der Sequenz (yeeB Gen) in der sbcB Region (EMBL Zugangs Nr. U00009) von E. coli K-12, die bereits bei einer DNA Basensequenz Datenbank registriert war. Weiterhin war die N-terminate Aminosäuresequenz des Proteins, das durch den offenen Leserahmen kodiert wurde, identisch zu der N-terminalen Sequenz von DGI, und es wurde angenommen, dass die DNA und Aminosäuresequenzen, die durch Sequenz ID NR: 6 dargestellt wurden, die DNA Sequenz des dgi Gens von E. coli und die Aminosäuresequenz von DGI waren.

Beispiel 3 dgi Gene von verschiedenen bakteriellen Chromosomen

[0056] DGI war wichtig für bakterielles Wachstum, und von ihm wird angenommen, dass es allgemein präsent ist. So wurde Southern Hybridisierung mit verschiedenen bakteriellen chromosomalen DNAs unter Verwendung eines DNA-Fragments des dgi Gens, das in dem obigen Beispiel 2 erhalten wurde, durchgeführt.

[0057] Die Southern Hybridisierung wurde in Übereinstimmung mit dem Verfahren, das in Molecular Cloning (Vol. 2, 6.2–6.19 und 9.31–9,46, 1989) beschrieben ist, durchgeführt. Es wurden Chromosomen verwendet, die von verschiedenen Bakterien abgeleitet waren, die hergestellt wurden durch das herkömmliche Verfahren und anschließend mit EcoRI gespalten wurden. Als eine Sonde wurde ein NdeI-gespaltenes Fragment verwendet, das in dem Gen lag, das von E. coli abgeleitet ist, das in dem obigen (6) von Beispiel 2 kloniert und mit ^{32}P markiert wurde. Die Hybridisierung wurde unter normal stringenten Bedingungen durchgeführt. Dies bedeutet nach Schütteln für 4 Stunden bei 42°C in einer Prähybridisierungslösung (5 × SSPE, 5 × Denhardt's Lösung, 0,5% SDS und 50% Formamid) enthaltend SSPE (180 mM NaCl, 1 mM EDTA und 10 mM Natriumphosphat (pH 7,7)), eine markierte Sonde wurde hinzugefügt, und die Hybridisierung wurde bei 42°C für 14 Stunden durchgeführt, und das Waschen wurde unter den folgenden drei Bedingungen durchgeführt:
Waschbedingung 1: 0,1% SDS, 0,1% SSPE, 65°C
Waschbedingung 2: 0,1% SDS, 0,1% SSPE, 52°C
Waschbedingung 3: 0,1% SDS, 1 × SSPE, 52°C

[0058] Die Stärke der Hybridisierung wurde wie folgt bewertet:
+++: eindeutige Hybridisierungsbande in Autoradiographie nach Waschen unter der Waschbedingung 1
++ : eindeutige Hybridisierungsbande in Autoradiographie nach Waschen unter der Waschbedingung 2
+ : eindeutige Hybridisierungsbande in Autoradiographie nach Waschen unter der Waschbedingung 3

[0059] Die Ergebnisse davon wurden in Tabelle 1 unten gezeigt.

Tabelle 1

Stammname	Hybridisierungsstärke
Escherichia coli K-12	+++
Escherichia coli ML1410	+++
Escherichia coli ATCC25922	+++
Escherichia coli NIHJ JC-2	+++
Shigella boydii IID627	+++
Shigella dysenteriae IID633	+++
Shigella sonnei TRRL10805	+++
Citrobacter freundii IID976	++
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	+
Bacillus subtilis ATCC6633	+
Enterococcus faecalis ATCC29212	+
Staphylococcus aureus RN450	+

+++ starke Hybridisierung
++ mittlere Hybridisierung
+ leicht schwache Hybridisierung

[0060] Wie in Tabelle 1 gezeigt, wurden Fragmente gefunden, die unter stringenten Bedingungen mit dem Fragment des dgi Gens hybridisierten (das NdeI Fragment entspricht der 225.–815. Base der Sequenz ID NR: 6), das von Escherichia coli abgeleitet ist, in Mikroorganismen des Shigella Genus, Citrobacter Genus, Pseudomonas Genus, Bacillus Genus, Enterococcus Genus und Staphylococcus Genus.

[0061] Es wurde berücksichtigt, dass homologe dgi Gene in diesen Mikroorganismen anwesend waren, und dass insbesondere Gene des Shigella Genus und Citrobacter Genus eine extrem hohe Homologie mit jenen des Escherichia Genus aufwiesen. Homologe Gene wie diese waren in vielen Arten von Mikroorganismen verteilt, und deshalb wurde vorgeschlagen, dass DGI wichtig für bakterielles Wachstum ist.

Beispiel 4 Expression in großen Mengen des E. coli DGI durch Genrekombination und ihre Reinigung

(1) Herstellung eines Vektors für DGI Expression

[0062] Um große Mengen des DGI Proteins herzustellen, wurde ein DGI Expressionssystem unter Verwendung des Vektorplasmids pLEX (erhältlich von Invitrogen Co.) für die folgende Proteinexpression konstruiert. Das System des Expressionsvektors pLEX betrifft die Kontrollexpression eines betroffenen Gens durch transkriptionelle Regulation mit Tryptophan als einem Induktor. Dies bedeutet, dass, wenn Tryptophan abwesend ist, das c1 Repressorprotein vom λ1 Gen unter dem trp Promotor exprimiert wurde und an die Operatorregion des P_L Promotors auf dem Vektor band, um die Transkription des betroffenen Gens, das stromabwärts des P_L Promotors ligiert war, zu reprimieren. Andererseits, wenn Tryptophan anwesend war, wurde ein Tryptophan-Repressorkomplex gebildet, der fest an den trp Operator band, um die Expression des c1 Repressorproteins zu inhibieren, und dadurch wurde der c1 Repressor von dem P_L Promotor dissoziiert, um die Transkription des betroffenen Gens zu starten.

[0063] Als ein Fragment, das in das Plasmid pLEX eingebaut wurde, wurde ein Fragment durch PCR hergestellt, in dem die Restriktionsenzym NdeI-Erkennungsstellen an beiden Enden der dgi Genregion hinzugefügt wurden (ein Fragment, das der 255.–815. Base der Sequenz ID NR: 6 entspricht), dessen Basensequenz in Beispiel 2 oben bestimmt wurde. Chromosomale DNA des E. coli KL 16 Stammes wurde als eine Matrizen DNA für die PCR verwendet, und die Primer wurden unter Verwendung eines DNA Synthetisierers synthetisiert. (Die Sequenz des sense Primers wurde durch Sequenz ID NR: 4 gezeigt, und die Sequenz des antisense Primers wurde durch Sequenz ID NR: 5 gezeigt). Das so erhaltene PCR Produkt wurde in ein Vektorplasmid pT7BIueT ligiert (erhältlich von Novagen Co.) und in E. coli JM109 eingeführt, um ein rekombinantes Plasmid herzustellen. Das resultierende rekombinante Plasmid wurde mit NdeI gespalten und durch Agarose Gelelektrophorese getrennt, und danach wurde ein NdeI Fragment mit 473 bp aus dem Gel gereinigt und in pLEX ligiert. Es wurde in E. coli GI724 (Invitrogen Co., USA) durch das Elektroporationsverfahren eingeführt, um ein rekombinantes Plasmid herzustellen, und die Insertionsrichtung des Insertionsfragments wurde durch das Spaltungsmuster mit EcoRV entschieden. Das rekombinante Plasmid pCA17 wurde erhalten, worin das Insertionsfragment enthaltend das dgi Gen, in der richtigen Richtung (sense Richtung), inseriert war. Die Elektroporation wurde unter Verwendung eines Electrocell Manipulators 600 (erhältlich von BM KiKi K. K.) nach den Bedingungen der potentiellen Differenz 2,25 kV und dem elektrischen Widerstand 129 Ω durchgeführt. Der GI724 Stamm, der mit dem rekombinanten Plasmid pCA17 transformiert wurde, worin das Insertionsfragment enthaltend das dgi Gen, in das Vektorplasmid pLEX in positiver Richtung inseriert wurde, d. h. E. coli GI724 (pCA17) Stamm, wurde beim National Institute of Bioscience and Human-Technology (NIBH) (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-Ken Japan) unter der Zugangs Nr. FERM BP-6133 am 6. Oktober 1997 hinterlegt.

(2) Expression in großen Mengen von E. coli DGI

[0064] Der E. coli GI724 (pCA17) Stamm, der in dem vorhergehenden Absatz (1) erhalten wurde, wurde einer Schüttelkultur in RM Medium enthaltend 100 µg/ml Ampicillin (42 mM Na_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_3, 8,5 mM NaCl, 18 mM NH_4Cl (pH 7,4), 2 Casaminosäure, 1% Glycerol und 1 mM $MgCl_2$), unterzogen. Wenn der OD_{600} Wert ungefähr 0,5 erreichte, wurde Tryptophan in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt, und dadurch wurde die Expression von DGI Protein induziert. Danach wurde die Schüttelkultivierung für 5 Stunden bei 37°C fortgesetzt. Ein ml der Kulturbrühe wurde abgenommen und zentrifugiert, um die bakteriellen Zellen zu sammeln. Die so erhaltenen Zellen wurden gelöst in 100 µl SDS Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 138 mM SDS, 1,5 M Glycerin und 280 mM 2-Mercaptoethanol), und sie wurden der Bakteriolyse durch Erhitzen für 5 Minuten bei 95°C und der anschließenden Lagerung in Eis, unterzogen. 20 µl des Überstandes wurden hinsichtlich Proteinexpression durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getestet. Als ein Ergebnis (**Fig. 4**) wurde gefunden, dass die Stämme, die mit pCA17 transformiert wurden, große Mengen eines ungefähr 18 kDa Proteins exprimierten, das DGI entsprach. Andererseits wurden in den Stämmen, die durch das rekombinante Plasmid pCA18 transformiert wurden, in dem die dgi Gen enthaltenden Insertionsfragmente in reverser Richtung (antisense Richtung) inseriert worden waren, oder die Stämme, die mit dem Vektor pLEX transformiert wurden, keine Expression in großen Mengen gefunden. Wenn die Stämme, die eine große Menge an DGI exprimierten, mit dem Mikroskop beobachtet wurden, waren sie schlank und gestreckt, und es wurde angenommen, dass sie in ihrer Zellteilung abnormal waren. Daraus wird gefolgert, dass medizinische Mittel, welche die Aktivität und/oder Expression des DGI verstärken, nützlich als antimikrobielle Mittel sind.

(3) Reinigung von E. coli DGI

[0065] Auf die gleiche Weise wie im obigen (2) wurde der E. coli Stamm GI724 (pCA17) kultiviert und der Expressionsinduktion mit Tryptophan unterzogen. Die bakteriellen Zellen, die durch Zentrifugation erhalten wurden, wurden in 10 ml Lösung A (30 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 30 mM NaCl) suspendiert und mit Ultraschall in Eis pulverisiert. Nach der Pulverisierung wurde eine Zentrifugation (bei 4°C, 8000 rpm für 20 Minuten) durchgeführt, und der so erhaltene Überstand wurde einer Ammoniumsulfatpräzipitation mit 60% Sättigung, gefolgt von weiterer Zentrifugation bei 17000 × G für 20 Minuten unterzogen. Die erhaltenen Pellets wurden in 30 ml einer TED Lösung (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA und 1 mM DTT) gelöst und mit derselben Lösung dialysiert. Nach der Dialyse wurden sie auf eine Q-Sepharose Schnellflusssäule (0,55 cm^2 × 9 cm) (erhältlich von Pharmacia Co.) geladen, die mit einer TED Lösung äquilibriert worden war, und einem linearen Konzentrationsgradienten (von 0,025 M bis 0,8 M) NaCl unterzogen, und Elution und Fraktionierung des Proteins wurden mit 140 ml einer TED Lösung (lineare Geschwindigkeit 150 cm/Std.) durchgeführt. Jede Fraktion wurde einer SDS-PAGE unterzogen, und Fraktionen, in denen die 18 kDa Proteinbande bestätigt wurde, wurden gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden durch Gelfiltration unter Verwendung einer TSK Gel Toyopearl HW-55 (2,25 cm^2 × 32 cm) (erhältlich von Toso Co.) fraktioniert, die mit einer TED Lösung äquilibriert worden war, und Fraktionen, in denen die 18 kDa Proteinbande bestätigt wurde, wurden durch Zentrifugation auf 200 µl konzentriert. Nachdem das Konzentrat einer SDS-PAGE unterzogen wurde, wurde das betroffene DGI Pro-

tein aus dem Gel extrahiert und einer Gelfiltration unterzogen, wieder mit TSK Gel Toyopearl HW-55, um gereinigtes DGI (600 µg) zu erhalten. Die Menge des Proteins wurde aus der Absorptionsmessung bei 595 nm unter Verwendung einer Lösung von Coomassie Brilliant Blue Farbstoff für Proteinquantifizierung berechnet.

Beispiel 5 Messung der DGI Aktivität

[0066] Unter Verwendung des gereinigten DGI, das in Beispiel 4 oben erhalten wurde, wurde die DGI Aktivität, d. h. die inhibierende Aktivität gegenüber DNA-Gyrase Aktivität (superhelikale Aktivität) gemessen. Jeweils 5 µl DNA-Gyrase Untereinheit A (1 U) und Untereinheit B (1 U) wurden jeweils zu einer Reaktionsmischung für die Aktivitätsmessung hinzugefügt (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 4 mM Spermidin, 1,5 mM ATP, 1 mM DTT, 30 µg/ml t-RNA, 15 µg/ml BSA und 0,1 µg relaxierte pBR322 DNA), und DGI (Proteinkonzentration 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 oder 0,39 µg/ml) wurden dazu für die Reaktion für 1 Stunde bei 37°C hinzugefügt. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Hinzufügen von 3 µl Proteinase K (1 mg/ml), während die Temperatur bei 37°C für 30 Minuten gehalten wurde, wurde die Reaktionsmischung einer Elektrophorese mit 0,8% Agarosegel unterzogen, mit einer 0,5 µg/ml Lösung aus Ethidiumbromid gefärbt und unter Strahlung der ultravioletten Strahlen photographiert. Die Menge an superhelikaler DNA wurde mit einem Densitometer (Shimadzu-wavelength flying spot Scanner CS-9000, erhältlich von Shimadzu Seisakusho Co.) gemessen. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von DNA-Gyrase-inhibierender Aktivität wurde durch Vergleichen der superhelikalen DNA Mengen, die erhalten wurden, wenn das DGI Protein hinzugefügt wurde, mit jenen, die erhalten wurden, wenn kein DGI Protein hinzugefügt wurde, gemessen. Das Ergebnis davon war in **Fig. 5** dargestellt. Wenn DGI in einer Konzentration von 6 µg/ml oder mehr hinzugefügt wurde, inhibierte es vollständig die superhelikale Aktivität von DNA-Gyrase. Bei einer niedrigeren Konzentration als der obigen Konzentration wurde die Umwandlung in superhelikale DNA in einem unvollständigen Zustand beendet, und eine Bande, die eine Spur von der relaxierten DNA hinterließ, wurde nachgewiesen.

[0067] Wie oben gezeigt, konnte ein DGI Aktivitätsmesssystem konstruiert werden. In dem vorliegenden Messsystem, wenn die DGI Aktivität durch Vergleichen der Reaktion in der Anwesenheit oder Abwesenheit einer medizinischen Lösung (oder Suspension) durchgeführt wurde, kann die Wirkung von medizinischen Mitteln zu modulieren (aktivitätsverstärkende Wirkung oder aktivitätsinhibierende Wirkung) nachgewiesen werden, und somit kann das Screenen oder Identifizieren eines medizinischen Mittels, das die DGI Aktivität moduliert, durchgeführt werden.

Beispiel 6 Messung der Promotor Aktivität des E. coli dgi Gens

(1) Herstellung eines Plasmids zur Messung der Promotoraktivität

[0068] In der 5' stromaufwärts Region des E. coli dgi Gens gibt es eine Region (yeeC Gen), die ein vermutliches Produkt YeeC in der sbcB Region (EMBL Zugangs Nr. U00009) kodiert. Beide Gene liegen in einem Abstand von ungefähr 122 bp, und zwischen diesen Genen werden eine palindrome Struktur, die als ein p Faktor abhängiger Terminator von yeeC erachtet wird, und eine in der –10 und –35 Region typische Sequenz, von der angenommen wird, dass sie ein Promotor des dgi Gens ist, erkannt. Ein DNA Fragment, das die Promotorregion des dgi Gens enthält, wurde an das lac Gen ligiert, um ein Plasmid herzustellen, und ein System, das die Fähigkeit besitzt, die dgi Promotoraktivität zu messen, wurde unter Verwendung der β-Galactosidase Aktivität als ein Index konstruiert.

[0069] Ein DNA-Fragment, an das BamHI Erkennungsstellen an beiden Enden eines 1,2 kbp DNA-Fragments hinzugefügt wurden (ein Fragment, das der 3. bis 1184. Base von Sequenz ID NR: 6 entspricht), das die Promotorregion des dgi Gens, die Transkriptionsinitiationsregion und die 5'-Seite der Translationsregion enthält, wurde durch PCR hergestellt. Als Primer wurden zwei Arten von Oligonukleotiden verwendet, die synthetisiert wurden durch Hinzufügen der BamHI Erkennungsstelle an die beiden Enden der betroffenen Region. Als Matrizen wurde die chromosomale DNA des E. coli KL 16 Stammes verwendet. Ein Fragment, das durch PCR erhalten wurde, wurde doppelt mit BamHI und RsaI gespalten, um ein 283 bp DNA-Fragment herzustellen, das die vermutete Promotorregion, die Transkriptionsinitiationsregion und die 33 bp des 5'-Endes der translationalen Region enthält. Das Vektorplasmid pLGlacZ7 (Plasmid, Vol. 32, S. 233–237, 1994) wurde mit BamHI gespalten, und danach wurden stumpfe Enden hergestellt, zusammen mit dem zuvor erhaltenen 283 bp DNA-Fragment, und die beiden wurden ligiert, um ein rekombinantes Plasmid herzustellen. So wurde ein rekombinantes Plasmid erhalten, in dem ein dgi Promotor enthaltendes Fragment stromaufwärts des lacZ Gens in derselben Richtung ligiert wurde, d. h. Plasmid pCA15, das ein fusioniertes Protein der N-terminalen 11 Aminosäurereste des DGI Proteins und β-Galactosidase exprimiert. Darüber hinaus wurde das rekombinante Plasmid pCA16 erhalten, in dem ein dgi Promotor enthaltendes Fragment in reverser Richtung eingeführt wurde.

(2) Messung der DGI Promotoraktivität

[0070] Unter Verwendung eines E. coli JM109 Stammes, der mit dem rekombinanten Plasmid pCA15, das im obigen (1) erhalten wurde, transformiert war, wurde die Messung wie folgt durchgeführt. Eine Flüssigkeit, in welcher der oben genannte Stamm über Nacht kultiviert wurde, wurde in einer solchen Menge in 10 ml eines LB Mediums, enthaltend 50 μg/ml Kanamycin, inokuliert, dass der OD_{600} Wert 0,1 betrug, und sie wurde einer Schüttelkultur bei 37°C unterzogen. Das Kulturmedium wurde stündlich hinsichtlich der Trübung bei 600 nm gemessen und in einer Menge von ungefähr 0,3 bis 0,5 ml abgenommen. Das abgenommene Kulturmedium wurde derart verdünnt, dass der OD_{600} Wert 0,1 betrug, und anschließend wurden 1 ml davon als Probe verwendet und zentrifugiert (14000 rpm, 1 Minute), um bakterielle Zellen zu erhalten, die in 1 ml eines Z Puffers (60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$ und 50 mM β-Mercaptoethanol) suspendiert wurden. Nach Ultraschallpulverisierung wurden sie zentrifugiert, und der Überstand wurde in einer Menge von 600 μl als eine Probenlösung abgenommen, dessen β-Galactosidase Aktivität wie folgt gemessen wurde. 600 μl der Probenlösung wurde bei 28°C für 5 Minuten gehalten, und anschließend wurden 200 μl einer Lösung (4 mg/ml) eines Reaktionssubstrates ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid) dazu hinzugefügt, und sie wurde bei dieser Temperatur für 5 Minuten zur Reaktion gehalten, und die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 500 μl 1 M Natriumcarbonat abgestoppt. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Absorptionen bei 420 nm und 550 nm gemessen, und die β-Galactosidase Aktivität und die spezifische Aktivität pro μg des Proteins wurden in Übereinstimmung mit dem Verfahren von Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989), gemessen. Die Proteinmengen in den Probenlösungen wurden unter Verwendung einer CBB Färbelösung für Proteinquantifizierung gemessen.

[0071] Fig. 6 zeigte der Ergebnisse der Veränderung in der dgi Promotoraktivität während der Zeit beim Wachstum (unter Verwendung der Expression von β-Galactosidase als ein Index). Es wurde gefunden, dass die β-Galactosidase Aktivität pro μg des mikrobiellen Proteins den niedrigsten Wert in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600}: 0,5) 2 Stunden nach Kultivierung zeigte, während sie bis zu 6 Stunden danach anstieg, wo die Pausenphase (OD_{600}: 1,2) erreicht war.

[0072] Auf dieselbe Weise, wie oben erwähnt, wurde die dgi Promotoraktivität für E. coli JM109 Stämme gemessen, in die jeweils Plasmid pCA15, pCA16 und pLGlacZ7 eingeführt wurde. Als ein Ergebnis betrugen die β-Galactosidase Aktivitäten pro μg des mikrobiellen Proteins 18 Stunden nach Kultivierung jeweils 216, 14 und 0 Einheiten/μg. So wurde eine stärkere Expression der β-Galactosidase in E. coli mit pCA15 im Vergleich zu den Kontrollplasmiden (pCA16 und pLGlacZ7) beobachtet. Daraus wurde bestätigt, dass die dgi Promotoraktivität einfach unter Verwendung des Plasmids pCA15 mit β-Galactosidase Aktivität als ein Index gemessen werden kann.

[0073] Wie oben gezeigt wurde, konnte das dgi Promotoraktivitätsmesssystem konstruiert werden. In diesem Messsystem wird das Kultivieren mit oder ohne dem Hinzufügen einer Lösung eines medizinischen Mittels (oder Suspension) durchgeführt, und durch Vergleichen der dgi Promotoraktivitäten kann die Wirkung der medizinischen Mittel, die Expression des dgi Gens zu modulieren (expressionsverstärkende Wirkung oder expressionsinhibierende Wirkung) nachgewiesen werden. Somit kann Screenen oder Identifizieren eines medizinischen Mittels, das die DGI Expression moduliert, durchgeführt werden.

Beispiel 7 Expressionskontrolle des E. coli dgi Gens mit antisense RNA

(1) Expressionskontrolle des dgi Gens durch Einführen eines antisense RNA Expressionsplasmids

[0074] Es wurde ein antisense Expressionsvektor durch Einführen eines Fragments hergestellt, das die Translationsregion des dgi Gens (ein Fragment, das der 255. bis 728. Base der Sequenz ID NR: 6 entspricht) enthält, stromabwärts des Tryptophan (trp) Promotors des Vektorsplasmids pLEX (erhältlich von Invitrogen Co.).

[0075] Der Vektor wurde in E. coli GI724 Stamm eingeführt. Der antisense RNA exprimierende Stamm, der so erhalten wurde, wurde unter den Bedingungen mit oder ohne Hinzufügen von Tryptophan kultiviert, und die Veränderung über die Zeit in der Zahl der lebenden Zellen und Trübung (OD_{600}) wurde gemessen. Die Ergebnisse davon wurden in Fig. 7 gezeigt. Wenn keine Expressionsinduktion durch Hinzufügen von Tryptophan durchgeführt wurde, waren die Zahl der lebenden Zellen und die Trübung nach 24 Stunden auf jeweils 1×10^9 cfu/ml und 1,0 angestiegen. Andererseits, wenn Tryptophan hinzugefügt wurde, um die Expression der dgi Gen antisense RNA zu induzieren, besaß die Zahl der lebenden Zelle eine Tendenz leicht von 4×10^7 cfu/ml auf 1

× 10^8 cfu/ml innerhalb von 8 Stunden nach dem Hinzufügen anzusteigen, aber sie war auf 5 × 10^6 cfu/ml nach 24 Stunden abgefallen. Der OD_{600} Wert war auf 0,4 nach 8 Stunden nach dem Hinzufügen erhöht, aber er zeigte einen fast konstanten Wert von 0,5 selbst noch nach 24 Stunden. Darüber hinaus wurde eine Verlängerung der Bakterien in dem Fall des antisense RNA exprimierenden Stamms beobachtet. Es wurde beobachtet, dass eine solche Abnormalität in der Morphologie ebenfalls beobachtet wurde, wenn E. coli mit einem neuen Chinolon-Gyrase Inhibitor behandelt wurde (Takeshi Nishino et al., Chemotherapy, Vol. 41(s-5), S. 50–66, 1993). Aus dem obigen Ergebnis wird gefolgert, dass in E. coli, wenn die Expression der dgi antisense RNA induziert wird, die Expression des dgi Gens reprimiert ist und das normale Wachstum der Bakterien inhibiert ist. Mit anderen Worten ist ein medizinisches Mittel, das die Expression des dgi Gens inhibiert, nützlich als ein antimikrobielles Mittel.

Beispiel 8 Polyklonaler Antikörper gegen E. coli DGI Protein

(1) Herstellung eines anti DGI Antiserums

[0076] 25 µg Gerbu Adjuvans (erhältlich von NACALAI TESQUE INC.) wurde zu 200 µl (entspricht 100 µg) einer Lösung des gereinigten DGI hinzugefügt, das in dem obigen Abschnitt (4) von Beispiel 3 erhalten wurde, und für 5 Minuten bei Raumtemperatur, um sie kräftig zu mischen, geschüttelt, das subkutan in den Rücken eines Kaninchens verabreicht wurde, um eine primäre Immunisierung durchzuführen. Eine und 3 Wochen nach der Primärimmunisierung wurde eine Auftrischungsimmunisierung in derselben Weise durchgeführt. Nach der Immunisierung wurde eine kleine Blutmenge von einer Ohrvene abgenommen, sein Antikörpertiter wurde bestimmt. Zu dem Zeitpunkt, an dem der Anstieg im Titer des Serumantikörpers bestätigt wurde, wurden ungefähr 50 ml Blut von der Ohrarterie abgenommen. Das resultierende Blut wurde für 1 Stunde bei 37°C stehen gelassen und weiterhin über Nacht bei 4°C, und danach zentrifugiert, um ein Serum zu erhalten. Das erhaltene Antiserum wurde nach Filterfiltration (Porendurchmesser 0,45 µm) portioniert, um bei –80°C gelagert zu werden.

(2) Reinigung eines anti-DGI Antikörpers (IgG) und Dot Blot Test

[0077] Unter Verwendung eines E-Z-SEP (Markenname, erhältlich von Pharmacia Co., ein Kit zum Reinigen von Antikörpern), wurde eine IgG Fraktion aus dem Antiserum gereinigt. Die IgG Konzentration in dem gereinigten Antikörper wurde in Übereinstimmung mit dem verdünnten Dot Blot Verfahren (experimentelles Protokoll für anti-Peptid Antikörper, Shujun Sha, geschrieben von Shinobu Omi et al., S. 73 und 74) gemessen, und es wurde gefunden, dass sie 300 mg/ml betrug.

[0078] Unter Verwendung des Dot Blot Testens, wurde die minimale Menge des Antigenproteins, das mit dem Antikörper erkannt werden kann, getestet. Dazu wurden 0,5 µl des gereinigten DGI bei einer Konzentration von 20, 10, 5, 2,5 oder 1,25 µg/ml auf eine Nitrocellulose Membran aufgespottet und getrocknet und danach in einem 20 mg/ml BSA enthaltenden TBS (0,15 M NaCl und 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)) geblockt. Die Membran wurde in das anti-DGI Antigen, das mit dem BSA enthaltenden TBS (1000-fach Verdünnung) verdünnt wurde, untergetaucht und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der resultierenden Membran wurde sie zusammen mit einem anti-Kaninchen IgG Antikörper (erhältlich von Gibco BRL Co.), der mit Meerrettich Peroxidase (HRP) markiert war für 0,5 Stunden bei 37°C inkubiert, und danach wurde die Bindung des Antikörpers durch Peroxidasefärbung unter Verwendung von Diaminobenzidin (DAB) als ein Substrat nachgewiesen. Als ein Ergebnis wurde gefunden, dass die minimale Proteinmenge des Antigens (DGI), die der Antikörper nachweisen konnte, ungefähr 5 ng ist.

(3) Nachweis von E. coli DGI durch Western Blot

[0079] E. coli, das DGI stark exprimierte (E. coli GI724 (pCA17) Stamm, der im obigen Beispiel 4 erhalten wurde) wurde einer Ultraschallpulverisierung und nachfolgender Zentrifugation unterzogen, und der resultierende Überstand wurde durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran (erhältlich von Millipore Co.) transferiert. Die transferierte PVDF Membran wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, und sie wurde, nach Bestätigung der Elektrophoresemuster der Proteine, mit Methanol entfärbt und in der 20 mg/ml BSA enthaltenden TBS geblockt. Die Membran wurde in den anti-DGI Antikörper, der mit dem BSA enthaltenden TBS (1000-fach Verdünnung) verdünnt worden war, für die Reaktion untergetaucht, und sie wurde einer Peroxidasefärbung unter Verwendung des HRP markierten anti-Kaninchen IgG Antikörpers und dem Substrat DAB in derselben Weise, wie in (2) oben beschrieben, unterzogen. Als ein Ergebnis, wie in **Fig. 8** gezeigt, kann ein Protein mit einem Molekulargewicht von 18 kDa, entsprechend dem DGI, spezifisch nachgewiesen werden. Daraus wird angenommen,

dass der erhaltene anti-DGI Antikörper (IgG) verwendet werden könnte, um das DGI nachzuweisen oder zu quantifizieren.

Referenzbeispiel – Verfahren zum Messen der superhelikalen Aktivität von DNA-Gyrase

[0080] In Übereinstimmung mit dem Verfahren, das in Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 32, S. 104–109, 1998, beschrieben ist, wurde das Folgende durchgeführt.

[0081] 0,5 µg pBR322 DNA (der superhelikale Typ, erhältlich von Takara Shuzo Co.) und 1 µl Topoisomerase I (erhältlich von Takara Shuzo Co.) (6 U/µl) wurden zu 20 µl einer Reaktionsflüssigkeit (35 mM Tris-HCl (pH 8,0), 72 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 5 mM Spermidin und 0,01% Rinderserumalbumin) hinzugefügt und für 2 Stunden bei 37°C reagiert, um relaxierte pBR322 DNA herzustellen. 5 µl einer zu untersuchenden Probenlösung, 5 µl DNA-Gyrase Untereinheit A (1 U/1,25 µl) und 5 µl Untereinheit B (1 U/1,25 µl) wurden zu 5 µl der Reaktionsflüssigkeit zum Messen der superhelikalen Aktivität hinzugefügt (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 4 mM Spermidin, 1,5 mM ATP, 1 mM Dithiothreitol, 30 µg/ml t-RNA (von Hefe abgeleitet) und 15 µg/ml bovines Serumalbumin) enthaltend 0,1 µg der relaxierten pBR322 DNA, und die Reaktion wurde für 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Zu der Mischung wurden 3 µl Proteinase K (1 mg/ml) hinzugefügt, und die Temperatur wurde bei 37°C für weitere 30 Minuten gehalten, um die Reaktion abzustoppen. Die reagierte Flüssigkeit wurde einer Elektrophorese mit 0,8% Agarose Gelektrophorese (Elektrophoresepuffer TAE; 40 mM Tris-Acetat und 1 mM EDTA) unterzogen, und das Gel wurde, nach Färben mit einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung, unter der Strahlung von ultravioletten Strahlen photographiert. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von DNA-Gyrase Inhibition wurde durch Vergleichen der Mengen der superhelikalen DNA in den Fällen mit und ohne Hinzufügen einer zu untersuchenden Probe, getestet. Wie bei der Enzymaktivität wurde die Enzymmenge, die notwendig ist, um 50% der Menge der relaxierten Plasmid DNA in die superhelikale DNA zu überführen, als eine Einheit (U) ausgedrückt.

Beispiel 9 Klonierung des dgi Gens des Shigella Genus Mikroorganismus

[0082] Wie in dem obigen Beispiel 3 gezeigt ist, wurde gefunden, dass ein EcoRI Fragment, das stark mit dem dgi Gen von E. coli hybridisiert, in dem Chromosom des Shigella Genus erkannt wurde, und dass die Größe des Fragments ungefähr 7 kb beträgt. So wurde das Chromosom von Shigella dysenteriae IID633 mit EcoRI gespalten und einer Agarose Elektrophorese unterzogen, um ein ungefähr 7 kb DNA-Fragment zu gewinnen. Das erhaltene DNA-Fragment wurde an die EcoRI gespaltenen Stellen von pUC19 ligiert, und das so erhaltene rekombinante Plasmid wurde in den E. coli JM109 Stamm eingeführt. Unter Verwendung eines DNA-Fragments, welches das dgi Gen, das von E. coli abgeleitet ist, als eine Sonde enthält, wurde eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Als ein Ergebnis der Analyse von 10 Stämmen von positiven Kolonien wurde gefunden, dass 6 Stämme ein EcoRI DNA-Fragment von 7,5 kb auf dem pUC19 enthielten. Das Insertionsfragment wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Als ein Ergebnis der Analyse durch die Hybridisierung mit einem E. coli dgi Gen enthaltenden DNA-Fragment wurde angenommen, dass das dgi Gen des Shigella Genus auf einem 1,5 kb Aval Fragment anwesend war.

[0083] Um die Basensequenz zu bestimmen, wurden verschiedene Deletionsplasmide aus Plasmiden hergestellt, die das DNA Fragment enthalten, und unter Verwendung dieser Plasmide wurde die Basensequenz durch das Dideoxy Verfahren mit einem Fluoreszenz DNA Sequenzierer (erhältlich von Hitachi Co., SQ5500) bestimmt. Die Sequenz von 1444 bp wurde bestimmt. Die 1444 bp DNA Basensequenz von Shigella dysenteriae wurde mit der Sequenz um das E. coli dgi Gen verglichen, und es wurde dabei gefunden, dass die hohe Homologie von 98,3% über den gesamten Bereich beobachtet wurde, und dass ein offener Leserahmen (ORF), welcher der Region von der 966. Base bis zu der 1169. Base davon entspricht, der ORF des dgi Gens war. Sequenzen, die als Promotor und Ribosomen Bindungsregionen erachtet wurden, wurden stromaufwärts des ORF beobachtet, während eine Sequenz, die vermutlich ein ρ-unabhängiger Terminator ist, anschließend an den ORF beobachtet wurde. Die DNA Sequenz des 1444 bp Fragments, die das dgi Gen, das von Shigella dysenteriae abgeleitet ist, enthält, und die Aminosäuresequenz des DGI, die darin kodiert ist, sind in Sequenz ID NR: 8 dargestellt. Die Aminosäuresequenz desselben wurde auch in Sequenz ID NR: 9 gezeigt. Es wurde angenommen, dass DGI von Shigella dysenteriae ein Polypeptid ist, das 157 Aminosäuren enthält und ein Molekulargewicht von ungefähr 18 Kilodalton, ähnlich wie in E. coli DGI, aufwies. Die Aminosäuresequenzen der beiden DGIs besaßen eine Homologie in Höhe von 96,8%.

[0084] Das normale Wachstum von Bakterien kann inhibiert werden durch Modulieren der Aktivität oder Expression des DNA-Gyrase-inhibierenden Proteins (DGI) der vorliegenden Erfindung. Unter Verwendung des DNA-Gyrase-inhibierenden Proteins (DGI) der vorliegenden Erfindung und seines Gens (dgi Gen), kann die

DGI Aktivität oder die Promotoraktivität des dgi Gens gemessen werden, und diese Messverfahren sind nützlich als Verfahren zum Screenen und Identifizieren eines medizinischen Mittels, das die Fähigkeit besitzt, die DGI Aktivität und die Expression des dgi Gens zu modulieren. Das Screening Verfahren und das Identifizierungsverfahren sind nützlich zum Entwickeln von antimikrobiellen Mitteln oder landwirtschaftlichen Chemikalien, die auf neuer Wirkung und Mechanismus beruhen. Darüber hinaus ist die antisense RNA oder DNA des dgi Gens nützlich als ein medizinisches Mittel, welches die Expression von DGI inhibiert, und anti-DGI Antikörper können zum Nachweisen oder Quantifizieren des DGI verwendet werden.

SEQUENZPROTOKOLL

Sequenz ID NR: 1

Sequenzlänge: 16

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Protein

Fragment Typ: N-terminales Fragment

Ursprüngliche Quelle

Organismus: *Escherichia coli*

Stamm: KL16

Sequenzbeschreibung

Met Asn Tyr Glu Ile Lys Gln Glu Glu Lys Arg Thr Val Ala Gly Phe
1 5 10 15 16

Sequenz ID NR: 2

Sequenzlänge: 30

Sequenztyp: Nukleinsäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

Sequenzbeschreibung

CTGGATCCAT CAGCGGGTAG GGGAAATTGA 30

Sequenz ID NR: 3

Sequenzlänge: 30

Sequenztyp: Nukleinsäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

Sequenzbeschreibung

GTGGATCCCA GACTAACATC AGCGGTAACG 30

Sequenz ID NR: 4

Sequenzlänge: 24

Sequenztyp: Nukleinsäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

Sequenzbeschreibung

CACATATGAA CTACGAGATT AAGC 24

Sequenz ID NR: 5

Sequenzlänge: 28

Sequenztyp: Nukleinsäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Andere Nukleinsäure, synthetische DNA

Sequenzbeschreibung

CACATATGAG CGAAAAAATT GAAAGGCG 28

Sequenz ID NR: 6

Sequenzlänge: 1224

Sequenztyp: Nukleinsäure

Strang: Doppelt

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Genomische DNA

Ursprüngliche Quelle:

Organismus: *Escherichia coli*

Stamm: KL16

Sequenzbeschreibung

```
CCATCAGCGG GTAGGGGAAA TTGAACTTTA CGACCGTGAT AAACAGGTGG CGCACTGGCC  60
GCTGGTTACC CTGGAATCTG TCGGGGAACG CAGCATGTTT TCTCGCCTGA GTGATTATTT 120
CCACCATAAG GCCTGACCTT TCTTTTGCAG CAGACTGGCA GGAGTGCGAG TCTGCTCGCA 180
TAATCAACAC TCATTCCTTG TGGTTTTAAT TTTGCAACTA TACTGTATAT AAAAACAGTA 240
TCAATGGAGG CGTC                                                  254
ATG AAC TAC GAG ATT AAG CAG GAA GAG AAA CGT ACC GTT GCA GGT       299
Met Asn Tyr Glu Ile Lys Gln Glu Glu Lys Arg Thr Val Ala Gly
 1               5                  10                  15
TTC CAT CTC GTT GGC CCG TGG GAA CAG ACG GTA AAG AAA GGC TTT       344
Phe His Leu Val Gly Pro Trp Glu Gln Thr Val Lys Lys Gly Phe
                20                  25                  30
GAG CAG TTG ATG ATG TGG GTA GAT AGC AAA AAT ATT GTG CCG AAG       389
Glu Gln Leu Met Met Trp Val Asp Ser Lys Asn Ile Val Pro Lys
                35                  40                  45
GAG TGG GTT GCT GTC TAT TAC GAC AAT CCA GAT GAA ACA CCC GCC       434
Glu Trp Val Ala Val Tyr Tyr Asp Asn Pro Asp Glu Thr Pro Ala
                50                  55                  60
GAA AAA TTA CGC TGC GAC ACC GTC GTG ACG GTG CCG GGT TAC TTT       479
Glu Lys Leu Arg Cys Asp Thr Val Val Thr Val Pro Gly Tyr Phe
                65                  70                  75
ACG CTT CCC GAA AAC AGT GAG GGC GTC ATT CTG ACA GAA ATT ACA       524
Thr Leu Pro Glu Asn Ser Glu Gly Val Ile Leu Thr Glu Ile Thr
                80                  85                  90
GGT GGT CAG TAT GCG GTG GCG GTA GCT CGT GTA GTC GGT GAT GAT       569
Gly Gly Gln Tyr Ala Val Ala Val Ala Arg Val Val Gly Asp Asp
                95                 100                 105
TTT GCT AAA CCC TGG TAT CAG TTC TTT AAT AGT CTC TTG CAG GAC       614
Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Gln Phe Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asp
               110                 115                 120
AGT GCT TAT GAA ATG TTA CCA AAG CCC TGC TTC GAG GTT TAT TTG       659
Ser Ala Tyr Glu Met Leu Pro Lys Pro Cys Phe Glu Val Tyr Leu
               125                 130                 140
AAC AAT GGC GCG GAA GAT GCG TAC TGG GAT ATC GAA ATG TAT GTT       704
Asn Asn Gly Ala Glu Asp Gly Tyr Trp Asp Ile Glu Met Tyr Val
               140                 145                 150
GCG GTG CAG CCA AAA CAT CAC                                      725
Ala Val Gln Pro Lys His His
               155     157
```

```
TAATTCATCT CAGGGCGGTG TGTTAACGCG ATGACCACTC TTTTTTTTGA AAGCGAAAAG  785
AGTAAGATGC GCCTTTCAAT TTTTTCGCTC CTGCCGGGAA ATTACACTGT TCCCGGTTTG  845
TCCGTCGGAT AATTCAGAGG CGCGCCTTCT GGCCGACAGA TGAGTTATGA GCGCTTTTAA  905
TCTCATTACG GAGTTTCTGC GTGCGTGCCG ATAAGTCATT AAGCCCGTTT GAAATCCGGG  965
TATACCGCCA TTACCGCATT GTGCATGGTA CTCGGGTCGC GCTGGCATTC CTGCTCACTT 1025
TTCTCATTAT CCGCCTGTTT ACTATCCCGG AAAGCACCTG GCCGCTGGTC ACCATGGTGG 1085
TGATTATGGG GCCAATCTCG TTCTGGGGTA ACGTTGTCCC TCGCGCCTTT GAGCGTATTG 1145
GCGGTACGGT GTTGGGTTCG ATTTTAGGTC TTATCGCTCT GCAACTGGAG TTAATCTCGT 1205
TACCGCTGAT GTTAGTCTG                                              1224
```

Sequenz ID NR: 7

Sequenzlänge: 157

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Protein

Ursprüngliche Quelle

Organismus: *Escherichia coli*

Stamm: KL16

Sequenzbeschreibung

```
Met Asn Tyr Glu Ile Lys Gln Glu Glu Lys Arg Thr Val Ala Gly
 1               5                  10                  15
Phe His Leu Val Gly Pro Trp Glu Gln Thr Val Lys Lys Gly Phe
            20                  25                  30
Glu Gln Leu Met Met Trp Val Asp Ser Lys Asn Ile Val Pro Lys
            35                  40                  45
Glu Trp Val Ala Val Tyr Tyr Asp Asn Pro Asp Glu Thr Pro Ala
            50                  55                  60
Glu Lys Leu Arg Cys Asp Thr Val Val Thr Val Pro Gly Tyr Phe
            65                  70                  75
Thr Leu Pro Glu Asn Ser Glu Gly Val Ile Leu Thr Glu Ile Thr
            80                  85                  90
Gly Gly Gln Tyr Ala Val Ala Val Ala Arg Val Val Gly Asp Asp
            95                  100                 105
Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Gln Phe Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asp
           110                 115                 120
Ser Ala Tyr Glu Met Leu Pro Lys Pro Cys Phe Glu Val Tyr Leu
           125                 130                 135
Asn Asn Gly Ala Glu Asp Gly Tyr Trp Asp Ile Glu Met Tyr Val
           140                 145                 150
Ala Val Gln Pro Lys His His
           155     157
```

Sequenz ID NR: 8

Sequenzlänge: 1444

Sequenztyp: Nukleinsäure

Strang: Doppelt

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Genomische DNA

Ursprüngliche Quelle

Organismus: *Shigella dysenteriae*

Stamm: IID633

Sequenzbeschreibung

```
CCGAGTTTTA TCATATGTAC AGTGAGAAAA GTCTCACCTG GAACGGTATC ACCCAGCAAA   60
ACCGTAACGG GTTATTGTGG GATAAAACCA TGAATGTTGA CGGCCTGAAA ACGGGTCATA  120
CTTCTGGTGC CGGGTTTAAT CTCATTGCTT CGGCTGTCGA TGGGCAGCGT CGTCTCATTG  180
CAGTGGTAAT GGGGGCTGAC AGTGCAAAAG GTCGTGAGGA AGAGGCAAGA AAATTACTGC  240
GTTGGGGGCA ACAAAACTTT ACTACGGTGC AAATTTTGCA CCGTGGGAAA AAGGTCGGTA  300
CGGAACGCAT CTGGTATGGC GATAAAGAAA ATATCGACCT GGGAACGGAA CAAGAGTTCT  360
GGATGGTGCT ACCGAAAGCC GAAATTCCAC ATATCAAAGC CAAATATACC CTTGATGGTA  420
AAGAGCTCAC CGCGCCAATT AGCGCCCATC AGCGGGTAGG GGAAATTGAA CTTTACGACC  480
GTGATAAACA GGTGGCGCAC TGGCCGCTGG TTACCCTGGA ATCTGTCGGG GAAGGCAGCA  540
TGTTTTCTCG CCTGAGTGAT TATTTCCACC ATAAGGCCTG ACCTTTCTTT TGCAGCAGAC  600
TGGCAGGAGT GCGAGTCTGC TCGCATAATC AACACTCATT CCTTGTGGTT TTAATATCGC  660
AATTATACTG TATATAAAAA CAGTGTTGAT GGAGCGTC                          698
ATG AAC TAC GAG ATT AAG CAG GAA GAT AAA CGT ACC GTT GCA GGT         743
Met Asn Tyr Glu Ile Lys Gln Glu Asp Lys Arg Thr Val Ala Gly
 1               5                  10                  15
TTC CAT CTC GTT GGC CCG TGG GAA CAG ACG GTA AAG AAA GGC TTT         788
Phe His Leu Val Gly Pro Trp Glu Gln Thr Val Lys Lys Gly Phe
            20                  25                  30
GAG CAG TTG ATG ATG TGG GTA GAT AGC AAA AAT ATT GTG CCG AAG         833
Glu Gln Leu Met Met Trp Val Asp Ser Lys Asn Ile Val Pro Lys
            35                  40                  45
GAG TGG GTT GCT GTC TTT TAC GAC AAT CCA GAT GAA ACA CCC GCC         878
Glu Trp Val Ala Val Phe Tyr Asp Asn Pro Asp Glu Thr Pro Ala
            50                  55                  60
GAA AAA TTA CGC TGC GAC ACC GTC GTG ACG GTG CCG AAT AAC TTT         923
Glu Lys Leu Arg Cys Asp Thr Val Val Thr Val Pro Asn Asn Phe
            65                  70                  75
ACG CTC CCC GAA AAC AGT GAG GGC GTC ATT CTG ACA GAA ATT TCA         968
Thr Leu Pro Glu Asn Ser Glu Gly Val Ile Leu Thr Glu Ile Ser
            80                  85                  90
```

```
GGT GGT CAG TAT GCG GTT GCG GTG GCT CGT GTA GTC GGT GAT GAT      1013
Gly Gly Gln Tyr Ala Val Ala Val Ala Arg Val Val Gly Asp Asp
                95                  100                 105
TTT GCT AAA CCC TGG TAT CAG TTC TTT AAT AGC CTC TTG CAG GAC      1058
Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Gln Phe Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asp
                110                 115                 120
AGT GCT TAT GAA ATG TTA CCA AAG CCC TGC TTC GAG GTT TAT TTG      1103
Ser Ala Tyr Glu Met Leu Pro Lys Pro Cys Phe Glu Val Tyr Leu
                125                 130                 135
AAC AAT GGC GCG GAA GAT GGG TAC TGG GAT ATC GAA ATG TAT GTT      1148
Asn Asn Gly Ala Glu Asp Gly Tyr Trp Asp Ile Glu Met Tyr Val
                140                 145                 150
GCG GTG CAG CCA AAA CAT CAC                                     1169
Ala Val Gln Pro Lys His His
                155     157
TAATTCATCT CAGGGCGGTG TGTTAACGCG ATGACCACTC TTTTTTTGAA AGCGAAAAGA  1229
GTAAGATGCG CCTTTCAATT TTTTCGCTCC TGCCGGGAAA TTACACTGTT CCCGGTTTGT  1289
CCGTCGGATA ATTCAGAGCC GGGCCTTCTG GCCGACAGAT GAGTTATGAG CGCTTTTAAT  1349
CTTCATTACG GAGTTTCTGC GTGCGTGCCG ATAAGTCATT AAGCCCGTTT GAAATCCGGG  1409
TATACCGCCA TTACCGCATT GTGCATGGTA CTCGG                           1444
```

Sequenz ID NR: 9

Sequenzlänge: 157

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: Linear

Molekularer Typ: Protein

Ursprüngliche Quelle

Organismus: *Shigella dysenteriae*

Stamm: IID633

Sequenzbeschreibung

```
Met Asn Tyr Glu Ile Lys Gln Glu Asp Lys Arg Thr Val Ala Gly
  1               5                  10                  15
Phe His Leu Val Gly Pro Trp Glu Gln Thr Val Lys Lys Gly Phe
                20                  25                  30
Glu Gln Leu Met Met Trp Val Asp Ser Lys Asn Ile Val Pro Lys
                35                  40                  45
```

```
Glu Trp Val Ala Val Phe Tyr Asp Asn Pro Asp Glu Thr Pro Ala
                50                  55                  60
Glu Lys Leu Arg Cys Asp Thr Val Val Thr Val Pro Asn Asn Phe
                65                  70                  75
Thr Leu Pro Glu Asn Ser Glu Gly Val Ile Leu Thr Glu Ile Ser
                80                  85                  90
Gly Gly Gln Tyr Ala Val Ala Val Ala Arg Val Val Gly Asp Asp
                95                 100                 105
Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Gln Phe Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asp
               110                 115                 120
Ser Ala Tyr Glu Met Leu Pro Lys Pro Cys Phe Glu Val Tyr Leu
               125                 130                 135
Asn Asn Gly Ala Glu Asp Gly Tyr Trp Asp Ile Glu Met Tyr Val
               140                 145                 150
Ala Val Gln Pro Lys His His
               155     157
```

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren einer medizinischen Verbindung, umfassend den Schritt des Testens der Wirkung des Modulierens der DNA-Gyrase-inhibierenden Aktivität eines Proteins, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
(i) einem Protein, das von einer DNA oder dem Komplement davon, welche mit einem DNA-Fragment, das die durch SEQ ID NR: 6 oder SEQ ID NR: 8 dargestellte Basensequenz umfaßt, unter stringenten Bedingungen hybridisiert, kodiert wird, wobei die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen derart ausgeführt wird, daß die Hybridisierung in einer Hybridisierungslösung mit 5 × SSPE oder einer mit entsprechender Salzkonzentration für 12 bis 18 Stunden unter der Temperaturbedingung von 37 bis 42°C angewandt wird, das Vorwaschen, wenn erforderlich, in 5 × SSPE oder einer Lösung mit einer dem entsprechenden Salzkonzentration ausgeführt wird und das Waschen in 1 × SSPE oder einer Lösung mit einer entsprechenden Salzkonzentration unter der Temperaturbedingung von 50 bis 65°C ausgeführt wird, und
(ii) einem Protein, welches entweder
(1) die durch SEQ ID NR: 7 dargestellte Aminosäuresequenz,
(2) eine Aminosäuresequenz, worin 1 bis 30 Aminosäuren in der durch SEQ ID NR: 7 dargestellten Aminosäuresequenz deletiert, substituiert oder hinzugefügt sind,
(3) die durch SEQ ID NR: 9 dargestellte Aminosäuresequenz oder
(4) eine Aminosäuresequenz, worin 1 bis 30 Aminosäuren in der durch SEQ ID NR: 9 dargestellten Aminosäuresequenz deletiert, substituiert oder hinzugefügt sind, umfaßt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die medizinische Verbindung ein antimikrobielles Mittel ist.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das Protein ein Protein ist, das von einer DNA, welche die durch SEQ ID NR: 6 oder SEQ ID NR: 8 dargestellte Basensequenz umfaßt, kodiert wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das Protein ein Protein ist, das entweder (1) die durch SEQ ID NR: 7 dargestellte Aminosäuresequenz oder (2) die durch SEQ ID NR: 9 dargestellte Aminosäuresequenz umfaßt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das Protein von einem Mikroorganismus, der zur Gattung Escherichia gehört, stammt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das Protein von einem Mikroorganismus, der zur Gattung Shigella gehört, stammt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das Protein von einem Mikroorganismus, der zur Gattung Citrobacter, zur Gattung Pseudomonas, zur Gattung Bacillus, zur Gattung Enterococcus oder zur Gattung Staphylococcus gehört, stammt.

8. Verwendung eines Proteins, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
(i) einem Protein, das von einer DNA oder dem Komplement davon, welche mit einem DNA-Fragment, das die durch SEQ ID NR: 6 oder SEQ ID NR: 8 dargestellte Basensequenz umfaßt, unter stringenten Bedingungen hybridisiert, kodiert wird, wobei die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen derart ausgeführt wird, daß die Hybridisierung in einer Hybridisierungslösung mit 5 × SSPE oder einer mit entsprechender Salzkonzentration für 12 bis 18 Stunden unter der Temperaturbedingung von 37 bis 42°C angewandt wird, das Vorwaschen, wenn erforderlich, in 5 × SSPE oder einer Lösung mit einer dem entsprechenden Salzkonzentration ausgeführt wird und das Waschen in 1 × SSPE oder einer Lösung mit einer entsprechenden Salzkonzentration unter der Temperaturbedingung von 50 bis 65°C ausgeführt wird, und
(ii) einem Protein, welches entweder
(1) die durch SEQ ID NR: 7 dargestellte Aminosäuresequenz,
(2) eine Aminosäuresequenz, worin 1 bis 30 Aminosäuren in der durch SEQ ID NR: 7 dargestellten Aminosäuresequenz deletiert, substituiert oder hinzugefügt sind,
(3) die durch SEQ ID NR: 9 dargestellte Aminosäuresequenz oder
(4) eine Aminosäuresequenz, worin 1 bis 30 Aminosäuren in der durch SEQ ID NR: 9 dargestellten Aminosäuresequenz deletiert, substituiert oder hinzugefügt sind, umfaßt,
zur Herstellung einer medizinischen Verbindung zum Behandeln einer bakteriellen Infektion.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

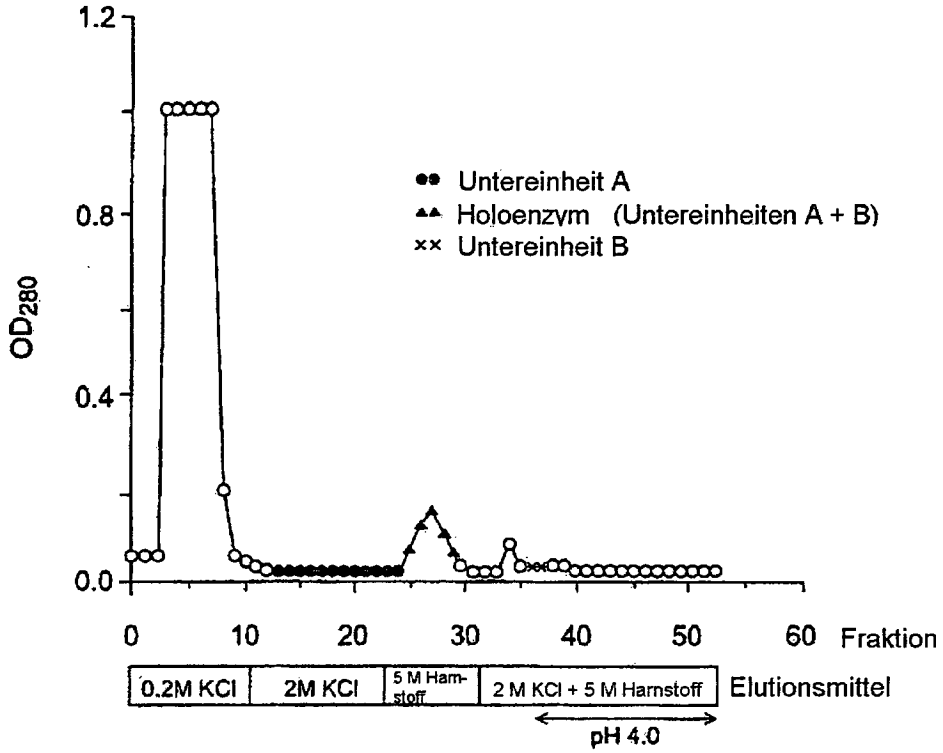


Fig. 2

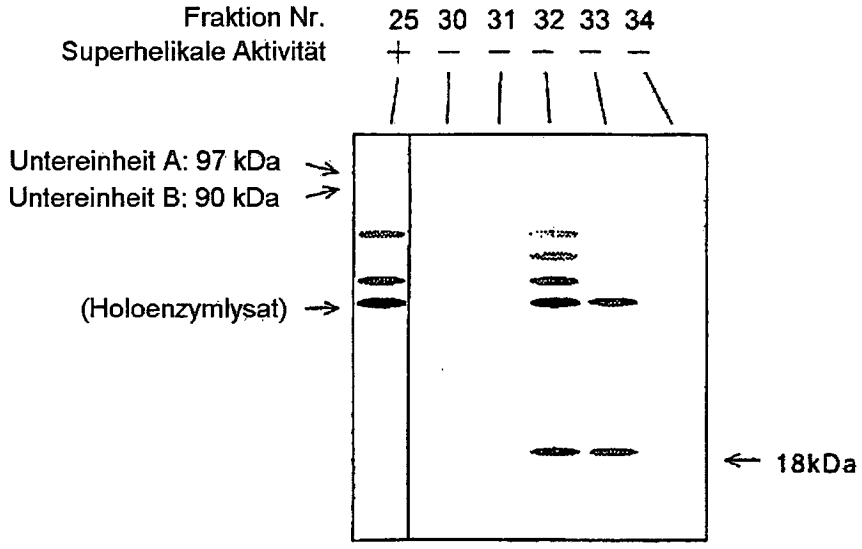
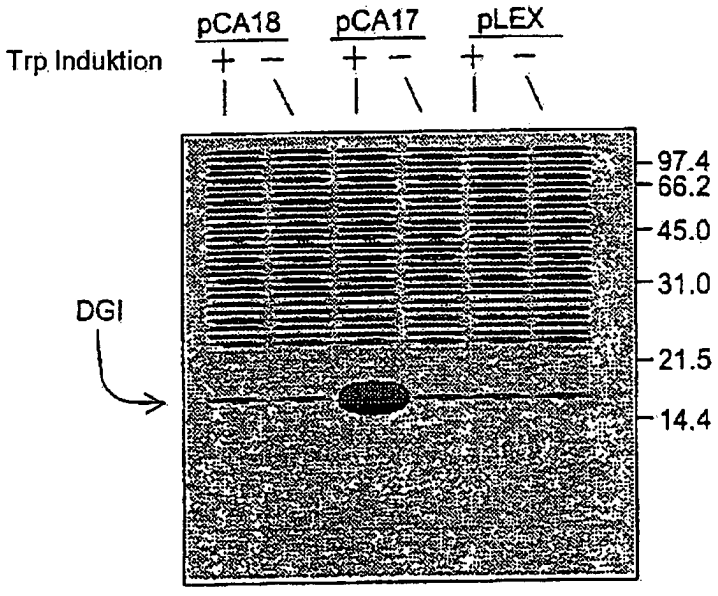


Fig. 3



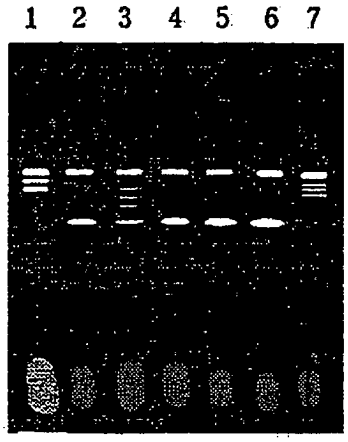
a: Fraktion Nr. 32 nicht hinzugefügt
b: Fraktion Nr. 32 hinzugefügt
c: relaxierte DNA
d: superhelikale DNA

Fig. 4



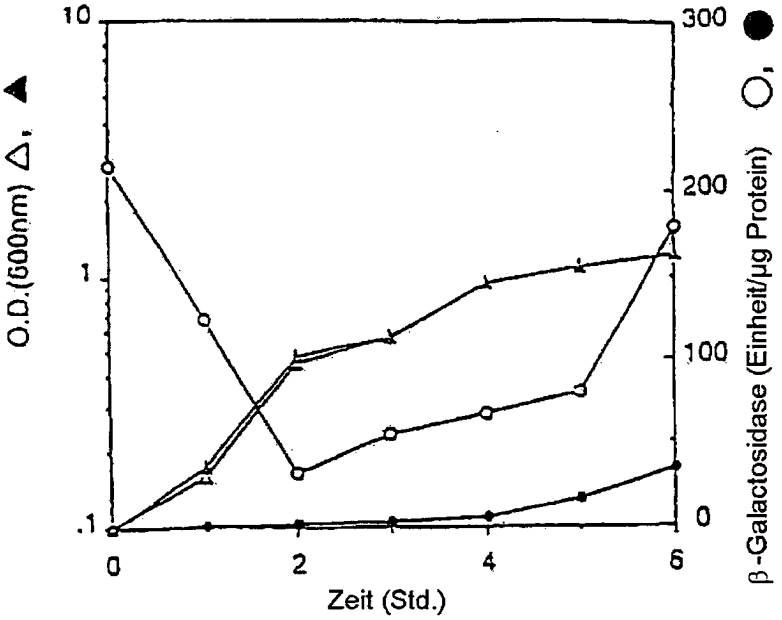
Spur 1, 2: E. coli (pCA18)
Spur 3, 4: E. coli (pCA17)
Spur 5, 6: E. coli (pLEX)
(Spur 1, 3 und 5 wurden durch Tryptophan induziert)
Spur M (nicht gezeigt): Molekulargewichtsmarker (kDa)

Fig. 5



Spur 1: 6 µg/ml DGI hinzugefügt
Spur 2: Kontrolle, kein DGI hinzugefügt
Spur 3: 3 µg/ml DGI hinzugefügt
Spur 4: 1,5 µg/ml DGI hinzugefügt
Spur 5: Kontrolle, kein DGI hinzugefügt
Spur 6: superhelikale DNA
Spur 7: relaxierte DNA

Fig. 6



Proliferationskurve (pCA15: △ , pCA16; ▲) von E. coli JM109 (pCA15) und E. coli JM109 (pCA16) und β-Galaktosidase Aktivität (pCA15: ○ , pCA16; ●)

Fig. 7

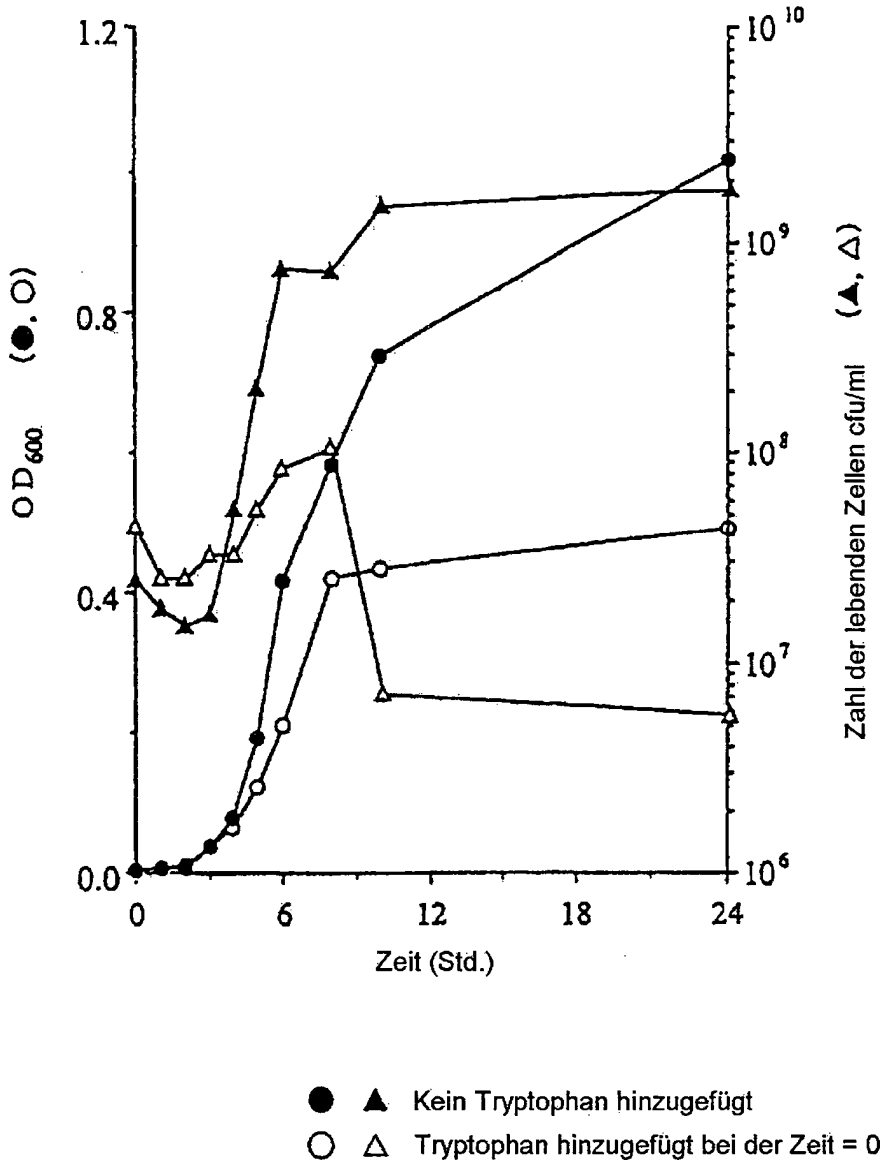
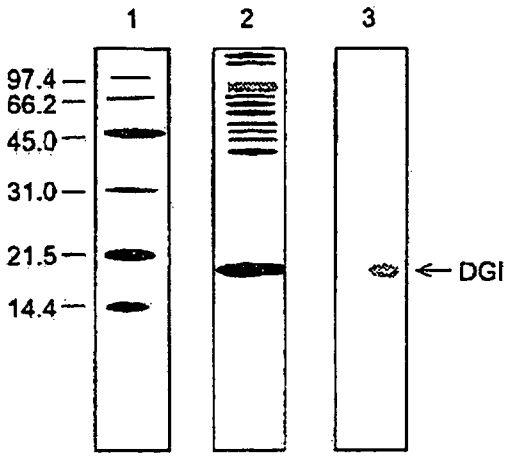

1.2
0.8
0.4
0.0
OD600 (●, ○)
10 10
10 9
10 8
10 7
10 6
(▲, △)
Zahl der lebenden Zellen cfu/ml
0
6
12
18
24
Zeit (Std.)
● ▲ Kein Tryptophan hinzugefügt
○ △ Tryptophan hinzugefügt bei der Zeit = 0

Fig. 8



Spur 1: Molekulargewichtsmarker (kDa)
Spur 2: Zellextrakt, gefärbt mit CBB
Spur 3: Zellextrakt, gefärbt mit anti-DGI Antikörper Peroxidase