

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4838404号
(P4838404)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/315 (2006.01)		C O 7 K	14/315 Z N A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K	37/02
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P	31/04
C 1 2 N 1/20 (2006.01)		C 1 2 N	1/20 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 8 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願平11-503143	(73) 特許権者	500178854
(86) (22) 出願日	平成10年6月9日(1998.6.9)		ユニバーシティ オブ フロリダ
(65) 公表番号	特表2002-504825 (P2002-504825A)		アメリカ合衆国 フロリダ 32611,
(43) 公表日	平成14年2月12日(2002.2.12)		ゲインズビル, グリントー ホール
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/012003		186
(87) 国際公開番号	W01998/056411	(74) 代理人	100059959
(87) 国際公開日	平成10年12月17日(1998.12.17)		弁理士 中村 稔
審査請求日	平成17年6月9日(2005.6.9)	(74) 代理人	100067013
審査番号	不服2008-22301 (P2008-22301/J1)		弁理士 大塚 文昭
審査請求日	平成20年9月1日(2008.9.1)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	08/871, 924		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成9年6月10日(1997.6.10)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小川 信夫
微生物の受託番号	ATCC 55676	(74) 代理人	100086771
			弁理士 西島 孝喜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な抗菌性ポリペプチド及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ストレプトコッカスミュータンス J H 1 1 4 0 株 (ATCC 55676) の培養液から単離されたランチバイオティックであるミュータシン 1 1 4 0 であって、他のストレプトコッカスミュータンスホストタンパク質を含まないこと、

- (a) 抗生物質活性、
- (b) 約 2 2 アミノ酸又は修飾アミノ酸残基、
- (c) 少なくとも 2 つのランチオン残基、
- (d) 少なくとも 3 つのチオエーテル橋、
- (e) 少なくとも 1 つの 2 , 3 - ジデヒドロアラニンアミノ酸残基、
- (f) 少なくとも 1 つの 2 , 3 - ジデヒドロブチリンアミノ酸残基、及び
- (g) S - [アミノピニル] - 基、

を有すること、

エタンチオールで誘導体化したミュータシン 1 1 4 0 のエドマンシークエンシングは下記表に示す結果を与えること、

サイクル	同定残基
1	phe
2	lys
3	S-EC
4	trp
5	S-EC
6	leu
7	S-EC
8	β -M-S-EC
9	pro
10	gly
11	S-EC
12	ala
13	arg
14	β -M-S-EC
15	gly
16	S-EC
17	phe
18	asn
19	S-EC
20	tyr
21	検出されない
22	検出されない

10

20

表中、チオエチルシステイン (S - E C) 及び β -メチルチオエチルシステイン (β -M-S-EC) は、ランチオニン (L a n)、3-メチルランチオニン (M e L a n)、2,3-ジデヒドロアラニン (D h a) 及び 2,3-ジデヒドロ-2-アミノ酪酸 (D h b) のエタンチオール誘導体から得られたものであること、
を特徴とするミュータシン 1140。

30

【請求項 2】

1つのランチオニン残基が、アミノ酸残基 16 と 21 の間にある請求項 1 記載のミュータシン 1140。

【請求項 3】

S-[アミノビニル]-基が、アミノ酸残基 19 と 21 の間にある請求項 1 記載のミュータシン 1140。

【請求項 4】

抗生物質活性が、数属のグラム陽性菌に対する広いスペクトルの活性である請求項 1 記載のミュータシン 1140。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のミュータシン 1140 を含む組成物。

40

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のミュータシン 1140 を含む医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のミュータシン 1140 及び担体を含む歯磨き剤。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載のミュータシン 1140 の有効量を、微生物の発育を制御することが所望される領域に適用することを特徴とする微生物の発育を制御する方法。

【発明の詳細な説明】

関連出願についての説明

50

該当しない。

発明の背景

本発明は、国立歯科衛生研究所補助金第DE0429号によって援助された研究プロジェクトのもとに政府助成により行なわれた。政府は本発明の権利を所有する。

本発明は、新規なポリペプチド及びそのポリペプチドをコードしている核酸配列に関する。該ポリペプチドは、微生物の選択有利性を与える微生物の産生したバクテリオシン、例えば、ミュータシンに関する。本発明は、該ポリペプチド又は核酸配列の有利な活性又は性質を利用する使用方法が含まれる。

ミュータスレンサ球菌として集団的に知られる表現型が同じ細菌は、虫歯の原因である主要な病因物質と考えられている。ヒト疾患と最も一般に関連がある種はストレプトコッカス・ミュータス(*Streptococcus mutans*)である。S.ミュータスの病原性としては、バクテリオシン様阻害物質(BLIS)又はバクテリオシンと一般に言われる抗菌物質を生産する能力が含まれる。ストレプトコッカス・ミュータスの産生したバクテリオシンは、ミュータシンとして既知である。この物質は、歯垢に見られる密に詰まった競合する生物の環境において定着維持に必要な選択力を与える微生物によって生産される。

これまで、大部分のバクテリオシンは、少量で特殊な培養条件下でのみつくられることから依然として部分的にしか確認されていない。更に、ミュータシンは液体培養液から単離することが困難であることが知られる。ミュータシンの活性スペクトル及び化学的性質及び物理的性質は大きく変動することがある。

ある種のバクテリオシンペプチド又はS.ミュータスII型の産生したミュータシンが、最近、ランチバイオティック(lantibiotic)と呼ばれるペプチドのグループに属するものとして確認された。Novakら(1996) *Anal. Biochem.* 236:358-360. ランチバイオティックは、典型的にはいくつかのチオエーテル橋をもち、アミノ酸のランチオニン又は -メチルランチオニンが含まれる多環式ペプチドである。更に、ランチバイオティックは、
-不飽和アミノ酸、例えば、2,3-ジデヒドロアラニン及び2,3-ジデヒドロ-2-アミノ酪酸が含まれ、これらは各々セリン残基及びトレオニン残基の転写後修飾産物である。

ある種のランチバイオティックは、主にグラム陽性菌に対して抗生物質活性を示した(Bierbaum & Sahl (1993) *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 278-1-22)。ナイシン及びエピデルミンは、これまでに同定された20種ほどのランチバイオティックの最もよく知られた例である。特定のヒドロキシルアミノ酸の脱水及び隣接システインをジデヒドロアミノ酸に付加することによるチオエーテルアミノ酸の形成を含むいくつかの翻訳後修飾事象を受けるプレプロペプチドとしてリボソーム合成される。翻訳後プロセッシングはリーダー配列の切断を含み、成熟分子の細胞外スペースへの輸送と一致する。成熟ランチバイオティック分子は、通常は約20~35残基であり、チオエーテル結合により桿状構造にかなりの剛性度を与える周期性セグメントが生じる。

現在、ある種のランチバイオティック、例えば、“A型”ランチバイオティックの生物活性は、多くの分子と標的細菌の膜との結合に基づいてイオンチャネルを形成し、よって脱相乗作用を示すことが証明されている。全ての生合成過程の迅速な消失が起こり、標的細胞死に至る。“B型”ランチバイオティックとして知られる他のランチバイオティックは、ある種の酵素を特異的に阻害することによりその効果を示すものである。

ランチバイオティック生産の遺伝子が数種の細菌において研究された。一般的には、プレプロランチバイオティックの構造遺伝子がランチバイオティックの翻訳後修飾に関与する産物をコードしている遺伝子とクラスター形成することがわかった。ある場合には、これらの遺伝子はオペロン又はオペロン様構造を形成することが既知である(例えば、SchneIIら(1992) *Eur. J. Biochem.* 204:57-68)。ランチバイオティックの生産には、プロセッシングプロテアーゼ、ATP結合カセット輸送体ファミリーの輸送体、調節タンパク質、及び専用プロデューサー自己保護メカニズムが必要である。少なくとも7種の遺伝子がエピデルミン生合成に関与することがわかった。

ランチバイオティックの性質は、市販の製品に活用された。ランチバイオティック、ナイシンは、食品医薬品局(FDA)の“一般に安全性が確認された(GRAS)”合格証が与えられた

10

20

30

40

50

食品保存剤として開発された。40カ国を超える国では亜硝酸塩や硝酸塩よりはこの種類が用いられている。この化合物、おそらくは他のランチバイオティックの経口毒性はラットにおいて極めて低い(LD₅₀=7g/kg;Hurst, (1981) Adv. Appl. Microbiol. 27:85-123)。口洗剤(Howellら, (1993) J. Clin. Periodontal 20:335-339)としての使用を含むナイシンの他の用途が多くの研究室で活発に試験されている。

抗生物質活性を有する新規なランチバイオティック化合物の発見は、ある種の病原性微生物において発育してきたことが最近わかった現在用いられる抗生物質に対して耐性が高いという観点で特に重要である。特にビルレント病原性細菌に対してユニークな又は優れた活性を有する新規なランチバイオティック化合物は、細菌感染症に対する集積において新規な対抗手段を与えるのに有利である。

10

発明の要約

本発明は、ミュータシン1140として同定されたランチバイオティックがストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)から同定されたことである。ランチバイオティックミュータシン1140は、数属の細菌に対して広い活性スペクトルを有する。

本発明は、また、未変性宿主においてランチバイオティックミュータシン1140の合成と関連がある遺伝要素を同定及び配列決定することである。これらの遺伝要素は、他の微生物宿主におけるランチバイオティックミュータシン1140の合成を促進する。

本発明の他の目的は、細菌感染症又は寄生虫感染症をもつヒト又は他の動物の治療方法を提供することである。本発明の具体的な目的は、虫歯又は他の口腔病態を引き起こす病原生物体による感染又は定着に対して動物を治療することである。治療方法は、標的微生物と該化合物の有効量、又はその化合物を含む組成物とを接触させて標的微生物の発育又は増殖を殺滅、阻止、又は制御することを特徴とする。

20

更に、本発明の核酸配列は、本発明のポリペプチドを生産する適切な宿主細胞を形質転換する標準遺伝子工学操作に用いられる。本ポリペプチド又はポリヌクレオチドの他の使用は、現在用いる知識及び本明細書に示された説明の観点で当業者により認識される。

図面のいくつかの見解の簡単な説明

図1は、本発明のポリペプチドの提唱した二次構造を示す図である。アミノ酸の略号は、ala-S-ala=ランチオニン; abu-S-ala=3-メチルアンチオニン; dha= , -ジデヒドロアラニン; dhb= , -ジデヒドロブチリンが含まれる。C末端システインを19位のdhaに付加し、酸化してS-アミノビニル-D-システインを得る。

30

発明の詳細な説明

JH1140と称するストレプトコッカス・ミュータンス株から最初に同定された新規な抗生物質が記載される。ミュータシン1140と呼ばれる抗生物質は、他のランチバイオティックと同様に、宿主生物体における単一遺伝子転写物から翻訳された前駆体タンパク質の翻訳後修飾産物である多環状ペプチドである。ミュータシン1140の同定した分子構造を図1に示す。

ストレプトコッカス・ミュータンスの乳酸デヒドロゲナーゼ欠損変異体は、虫歯の置換治療の潜在的な使用が研究されてきた。LDHの特性を含まないこの微生物による炭水化物の発酵は、中性終末産物の十分な量を得るピルビン酸代謝の別の経路を用いるのでLDH欠損株は少ない総酸を環境に滲出する。結果として、この細菌のLDH欠損変異体は、う蝕が少ない。従って、これらの細菌は、虫歯の置換治療にエフェクター株として研究されている。しかしながら、効果的な置換株であるためには、株は優れた競合定着特性を示してその種の他の株に対して競合しかつ野生型株による続きの再定着を防止しなければならない。従って、優れた定着特性及びLDH欠損表現型双方をもつ株を見出す努力が行われてきた。

40

競合株を用いて高められた競合性の微生物によって用いられた進化的戦略の1つは、競合株が感受性のある抗生物質の合成である。以前には定着特性が良好であることが報告された、以前はJH1000と呼ばれたS.ミュータンス株、JH1005と呼ばれるエチルメタンシルホン酸誘導変異体、及びJH1140として知られるその株の自然変異体がBLISと呼ばれる強力な広範囲スペクトルバクテリオシン様阻害物質を生産したことがわかった。下記のように、BLISは種々の細菌種の代表的な株の発育を阻止することがわかった。更に、試験したほとん

50

ど全ての既知のストレプトコッカス・ミュータンス株がBLIS物質に感受性があった。これらの株の同遺伝子型変異体の分析から、げっ歯類モデルとヒト患者双方にBLIS生産と定着能間に良好な相関が示された。遺伝子法を用いて、BLIS活性に関与する転写物を同定及び配列決定した。遺伝子がlanAと名付けられるBLIS活性に関与するペプチドをコードしている単一転写物のゲノムコピーを下記に配列番号1として示す。配列番号1に有するオープンリーディングフレームの産生した転写物の推定アミノ酸配列を下記に配列番号2として同定する。配列番号2は、プレタンパク質型であり、タンパク質分解切断及び宿主生物体内に有する他の因子による他のプロセッシング後に図1に示されるミュータシン1140の合成がもたらされる。

宿主微生物におけるミュータシン1140の適切な合成には、タンパク質の前駆体型をペプチド系抗生物質の有効型と活性型に適切に処理する他の酵素の存在が必要である。lanBと称する酵素の1つをコードしている遺伝子もクローン化及び配列決定し、下記に配列番号3として示す。下記の配列番号4は、配列番号3に含まれるオープンリーディングフレームの推定アミノ酸配列である。

本明細書に用いられる“ミュータシン1140”という用語は、ストレプトコッカス・ミュータンス株1140の産生したペプチド系抗生物質、及びランチバイオティックの生物効力を損ねない少量の挿入、欠失又は他の変異株の産生した関連ペプチドに適用するものである。図1に示した化学構造は正しいと思われるが、分子の構造を解明するためにこれまで用いられた分析法の限界のために図1の構造と細菌の、特にペプチドのカルボキシル端で産生した分子の実際の構造間にわずかな差がある可能性があることは理解されなければならない。ミュータシン1140という用語は、そのわずかな差がある場合の実際の分子を記載するものである。また、ストレプトコッカス・ミュータンスの他の進化的に関連のある株、又は他の種の極めて関連のある株がこの同じランチバイオティックの対立遺伝子分子を生産することは予想され、ミュータシン1140という用語も同様にそれらを包含するものである。

ミュータシン1140がスタフィロコッカス・エピデルミディス(*Staphylococcus epidermidis*)の産生したエピデルミンとして知られる他の抗生物質に進化的に関連のある抗生物質であることがわかった。JH1000由来の変異体株JH1005由来の下記に示される遺伝子配列は、スタフィロコッカス・エピデルミディスから以前に配列決定された遺伝子であるepiA、epiB及びepiDに高度の相同性を有する配列が含まれ、抗生物質エピデルミンの生合成に関係していることがわかった。本明細書に示されるlanAとlanBの遺伝子は、抗生物質エピデルミンと関連があるepiAとepiBの遺伝子とほぼ同じであると思われる。

本発明の抗生物質ポリペプチドミュータシン1140は、未変性宿主生物体、即ち、レンサ球菌生物体が培養内で増殖された培養液から単離され、続いてポリペプチド系抗生物質が培養液から単離される。更に、下記のlanAとlanBのコード配列の提示は、他のレンサ球菌種又は他の細菌種の株に形質転換される配列をコードしている人工遺伝子の構築を可能にする。ミュータシン1140抗生物質を生産する2種のレンサ球菌株は、受託番号55676(JH1140)及び55677(JH1000)としてアメリカン・タイプ・カルチャア・コレクション、メリーランド州ロックビルに寄託されている。ミュータシン1140抗生物質はこれらの菌株、又はレンサ球菌種の他の関連株から回収され、ミュータシン1140を合成する遺伝的能力が下記の配列番号1~4からの情報を用いて導入される。

ミュータシン1140の生産表現型を新しい株に導入することの潜在的複雑さは、ペプチドが宿主株内の他の遺伝要素により翻訳後修飾を受けるという事実である。上記のように、下記に示されるlanB遺伝子は翻訳後修飾が必要であるが十分な遺伝成分ではない。他の翻訳後修飾遺伝子は、上記の寄託したJH1140株のゲノム内に含まれている。ミュータシン1140コンピテント宿主からのDNAを他のレンサ球菌株にランダム型遺伝子伝達実験を行うことにより、他の遺伝子成分が下記に示されるlanA及びlanBのほかに未変性産生レンサ球菌宿主株の産生したミュータシン1140の完全成熟型及び生物活性型を得るために必要であるものが容易に同定される。その操作は当該技術において通常の技術レベルの範囲である。同定されると、これらの他の遺伝子成分はlanA及びlanBと共にミュータシン1140を生

10

20

30

40

50

産する新しいホストに導入される。

ミュータシン1140が生体外で合成されることも特に予想される。多くの手法は、相対する従来の有機化学的手法によるペプチド分子の合成に見られる。例えば、固相ポリペプチド合成はペプチドの生成を可能にし、その技術はミュータシン1140のサイズのペプチドが微生物ホストの外部で容易に合成される点まで発展した。

ミュータシン1140抗生物質は抗生物質として一般に有効であることが予想される。抗生物質がヒト口腔に存在する一般のレンサ球菌株によって生産されるので、ヒト種に比較的非毒性であると予想される。この結論は、哺乳動物に全く非毒性であることが既知であるエピデルミンのような既存の抗生物質と同じ特性によって更に支持される。使用方法においては、ミュータシン1140は、微生物の発育を阻止することが所望される領域に適用される。担体は、抗生物質の送達を援助するために用いられる。その送達においては、ランチバイオティックの有効量を送達することが所望され、その有効量はランチバイオティック量が所望の微生物阻止レベルを得る量を求める経験的試験により容易に求められる。

10

実施例 1 - ランチバイオティックの精製

次の手順を用いてストレプトコッカス・ミュータンスJH1140からランチバイオティックを精製した。

0.5% LEアガロース(SeaKem)を含むトッド・ヒューイトブイヨン(THB; Difco)の4リットルのバッチを滅菌し、90mmのペトリ平板に注入した。その平板を37℃で一晩乾燥した。プレーンハートインフュージョンスタータープレート上のJH1140の純粋培養物を用いて3mlのTHBに接種し、細胞浮遊液を10秒間攪拌した。約0.3mlの細胞浮遊液をBHI寒天平板の表面上に塗り広げ、ろうそくびん中37℃で一晩インキュベートした。

20

10本の接種器をエタノール火炎滅菌し、これを用いて上記のように調製した塗沫平板からのJH1140を上記のように調製した平板の均一な間隔をとった穿刺に接種した。平板をろうそくびん中37℃で72時間インキュベートした。寒天を平板全体から擦り取り、遠心びんに入れた。そのびんを-20℃で一晩貯蔵した。

次に、そのびんをソルバールRC2B遠心機で4,000rpm、室温において60分間、次に8,000rpmで30分間遠心分離した。上清を回収し、ブッフネル漏斗でワットマン#1ろ紙を通過させた。

4リットルのピーカー中のろ過した抽出液(約3,000ml)に100mlのクロロホルムを加えた。その溶液をマグネチックスターラー上に置き、高速で120分間攪拌した。攪拌棒を取出し、溶液を一晩静置した。

30

水(上)層を吸引し、捨てた。乳白色の綿状物を含むクロロホルム層を50mlの三角遠心管に分割し、約4,000rpmで8分間遠心分離した。水性残留物を吸引して除去した。透明なクロロホルム層をパスツールピペットを用いて取出し、綿状物を得、これを5mlのクロロホルムで2回洗浄した。クロロホルムを窒素ガス流を用いて綿状物から蒸発させ、その管をこのプロセス中45~50℃の水浴中に入れて蒸発を促進させた。

乾燥した残留物を0.5mlの50%エタノールに溶解し、溶解しない物質を13,000×g、室温で2分間遠心分離により除去した。次に、ランチバイオティックを含む透明画分を使用するまで-20℃で貯蔵した。

実施例 2 - ランチバイオティック活性のバイオアッセイ

40

ランチバイオティックの抗菌活性を次の手順により求めた。

5mlのTHBにS.ラッタス(rattus)株BHT-2(1mg/mlストレプトマイシンに対して耐性がある)を接種し、37℃で放置しながら一晩発育させた。ランチバイオティック活性を試験すべき0.02mlの画分をマイクロタイターウェル内で蒸留水で2倍に連続希釈した。BHIブイヨン、0.75%寒天、1mg/mlストレプトマイシン、及び上からの1:10,000希釈S.ラッタスBHT-2一夜培養物を含む上層寒天を42℃で調製し、0.2mlを各マイクロタイターウェルにピペットで分注した。寒天を固化させるために室温で5分後、平板を37℃で一晩インキュベートした。

最少阻止濃度(MIC)を目視検査によりS.ラッタスBHT-2の発育を阻止する試験画分の最大希釈の逆数として求めた。

50

実施例 3 - ランチバイオティックの活性スペクトル

ミュータシン1140を産生する株の単コロニーをプレーンハートインフュージョン培地に穿刺接種し、ろうそくびん中37℃で一晩インキュベートした。指示株の3滴のトッド・ヒューイトブイヨン一夜培養物を3mlの溶融した上層寒天と混合し、平板の表面上に均一に注いだ。更に24時間インキュベートした後、試験株の周囲の透明ゾーンを測定した。

種々の細菌の代表的な株について重層法を用いることによりJH1140の産生したミュータシン1140の阻害活性に対する感受性を試験した。S.ミュータンスのほかに、ストレプトコッカス・ミティス(*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、及びアクチノマイセス(*Actinomyces*)種を含むたいていのグラム陽性菌が感受性のあることがわかった。阻害因子は、試験した125のうち124のS.ミュータンスを阻害した。グラム陰性菌は、ミュータシン1140による阻害に対していつも耐性があった。次の表は、ランチバイオティックについて見られた活性スペクトルを纏めたものである。部分的に精製したミュータシン1140は、上記のように調製した標的株の菌叢に5µlの試料をスポットすることにより証明したJH1140の示した活性スペクトルと同じであった。これも表に示す。

表1
ミュータシン感受性アッセイ^a

指示株	標的株	試験株	
		JH1140	JH1005 株
ミュータンス レンサ球菌	FA1(a)	+	+/-
	BHT-2(b)	+	+
	LM7(e)	+	+
	Ingbritt(c)	+	+
	MT-3(c)	+	+
	10449(c)	+	+
	JC2(c)	+	+
	GS5(c)	+	+
	PK1(c)	+	+
ストレプトコッカス・サリバリウス (<i>Streptococcus salivarius</i>)	SS2	+	+
	O2	+	+
	O4	+	+
ストレプトコッカス・サングイス (<i>Streptococcus sanguis</i>)	Fc-1	+	+
	KJ3	+	+
	Challis	-	+
ストレプトコッカス・ミティス	MT	+	+
	RE-7	+	+
	26	+	+
ストレプトコッカス・ピオゲネス	STA628	+	
ストレプトコッカス・フェカリス (<i>Streptococcus faecalis</i>)	RF	-	
ストレプトコッカス・アウレウス	DC3	+	+
ラクトバシラス・カゼイ (<i>Lactobacillus casei</i>)	Lac-6	-	+
ラクトバシラス・サリバリウス	UCL-37	+	
アクチノマイセス・イスラエリイ (<i>Actinomyces israelii</i>)	X523	+	
	10048	+	
	12104	+	+
アクチノマイセス・ネスランディイ (<i>Actinomyces naeslundii</i>)	N16	+	+
	6-60B	+	+
	W1528	+	
アクチノマイセス・ビスコーサス (<i>Actinomyces viscosus</i>)	T6	+	
	M100	+	
	207-79	-	
マイクロコッカス・ルテウス (<i>Micrococcus luteus</i>)	381	-	
ウオリネナ・レクタ (<i>Wolinella recta</i>)	371	-	
キャプトサイトファガ・スプチゲナ (<i>Capnocytophaga sputigena</i>)	4	-	

^a ミュータシンに対する感受性を記載されたように求めた。指示株を試験株の直径が 10-15mm のゾーンを示す感受性(+)、感受性でない(-)、又は直径が<5mm を示すわずかに感受性(+/-)として評価した。

初期定常期中にのみ検出できる量で阻害因子が生産され、JH1140のトッド・ヒューイトブイオン培養物から回収された。透明ゾーンから採取した白金耳量の寒天が無菌であることがわかったので他のS.ミュータンス株に対する阻害因子の作用は殺菌作用であった。無細胞培養液の阻害活性を試験した条件下でトリプシンで処理することにより完全に不活性化

10

20

30

40

50

した。トリプシンインヒビターを反応混合液に100 µg/mlの濃度で混合するとこの不活性化が妨げられた。100mg/mlのプロナーゼで処理することにより阻害活性が約50%不活性化された。高い濃度のプロナーゼ(250 µg/ml)又は長時間処理(1時間)がバクテリオシン活性の完全な不活性化をもたらした。DNase I、RNase A、リパーゼ、サーモリシン、及びリゾチームによる不活性化に対して完全に耐性があることがわかった。本実験により示されたインヒビターのタンパク様の種類は、バクテリオシンの広範囲ファミリーに包含するために形式的に認定される。本バクテリオシンポリペプチドのアミノ酸配列を求めた。

実施例 4 - ランチバイオティックペプチドの確認

化学誘導体化と電気噴霧イオン化質量分光法の組み合わせによりランチバイオティック中の修飾アミノ酸の総数に対する情報が求められる。エタンチオール誘導体化ミュータシン1140をエドマン分解すると次の表に示される結果が得られた。この手順をMezerら, (1994) *Analyt. Biochem.* 223:185-190に記載されるように行った。

表 2

エタンチオールで誘導体化したミュータシン 1140 のエドマンシークエンシング

<u>サイクル</u>	<u>予想残基</u>	<u>同定残基</u>	
1	phe	phe	
2	lys	lys	
3	ser	S-EC ^a	
4	trp	trp	
5	ser	S-EC	10
6	leu	leu	
7	cys	S-EC	
8	thr	β -M-S-EC ^a	
9	pro	pro	
10	gly	gly	
11	cys	S-EC	
12	ala	ala	
13	arg	arg	
14	thr	β -M-S-EC	20
15	gly	gly	20
16	ser	S-EC	
17	phe	phe	
18	asn	asn	
19	ser	S-EC	
20	tyr	tyr	
21	cys	ND ^b	
22	cys	ND	

^a 下記に示されるマイヤーズスキームに従ってランチオニン(Lan)、3-メチルランチオニン(MeLan)、2,3-ジデヒドロアラニン(Dha)及び 2,3-ジデヒドロ-2-アミノ酪酸(Dhb)のエタンチオール誘導体化から得られたチオエチルシステイン(S-EC)及び β -メチルチオエチルシステイン(β -M-S-EC):

^b 検出されない

これらの分析から図 1 に示される化学構造が示された。

実施例 5 - 遺伝分析

ランチバイオティックを生産する株の遺伝分析を行った。分析は、ストレプトコッカス・ミュータンスとエシェリキア・コリ(Excherichia coli)双方の温度依存性複製のラクトコ

30

40

50

ッカス・ラクチス(Lactococcus lactis)潜在プラスミドpWV01のrepA(ts)誘導体であるプラスミドpTV1-OKを用いた。プラスミドは、レンサ球菌のエリスロマイシン耐性を与えるトランスポゾンを含む。トランスポゾン突然変異誘発をpTV1-OKを保有するランチバイオティック産生株JH1005について行った。エリスロマイシン耐性クローンを15 µg/ml 抗生物質を用いてBHI寒天に選択し、次に抗生物質を含まない同じ培地に穿刺接種した。ろうそくびん中37 で一晩インキュベートした後、平板にBHT-2 1mlあたり約10⁶コロニー形成単位を含む3mlの上層寒天を重層した。BHT-2菌叢の発育阻止を生じなかった穿刺したクローンを回収し、エリスロマイシンとの培地上に画線することにより精製した。ランチバイオティック生産に關与する遺伝要素にトランスポゾンをもったこれらの変異体から染色体DNAを単離し、Tn917挿入断片に隣接するDNAをエシェリキア・コリ株MC1061の中へクローン化した。隣接するDNAをアプライドバイオシステムズモデル373A DNAシーケンサーを用いてアプライドバイオシステムズの発表したTaqダイデオキシターミネーターとダイプライマーサイクルシーケンシングのプロトコルを用いてフロリダ大学ICBRで配列決定した。相同性サーチは、BLASTプログラムを用いて回収した配列により行った。lanA及びlanBと称する回収した配列を下記に配列番号1及び配列番号3として示す。これらの配列は、epiA及びepiBに対して相同性を有することがわかった。これらのDNA配列のオープンリーディング配列により、下記に配列番号2及び配列番号4に示されたタンパク質が生産される。

実施例6 - 製剤及び投与

本発明の化合物、ポリペプチド、及びポリヌクレオチドは、種々の非治療及び治療用途に有効である。試験から、本発明の化合物、ポリペプチド、及びポリヌクレオチドが生化学プローブ又は細菌発育を制御することに有効であることは明らかである。

新規な化合物及びそれを含む組成物の治療用途は、適切な治療法及び当業者に現在又は予想して既知の手法によって達成されるように企図される。更に、本発明の化合物は他の有効な化合物及び組成物の調製のための出発物質又は中間体としての使用がある。

上記の指示においてホストへの用量投与は、感染症の同定、必要とするホストの種類、年齢、体重、全身状態、あるとすれば同時治療の種類、治療の回数、及び治癒比に左右される。

本発明の化合物は、医薬的に有効な組成物を調製する既知の方法に従って処方される。周知でありかつ当業者に容易に入手できる多くの原料における処方が詳述される。例えば、E.W. Martinによるレミントンの薬局方には、本発明に關連して用いられる製剤が記載されている。一般に、本発明の組成物は、生物活性化合物の有効量を適切な担体と合わせて組成物の効果的な投与を促進するように処方される。

本明細書に記載された実施例及び実施態様が単に例示のためであること及びその観点で様々な修正又は変化が当業者に示唆されかつ本出願の真意及び範囲内並びに後記請求の範囲の範囲内に含まれることは理解されなければならない。

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人: ヒルマン, ジェフレイ

(ii) 発明の名称 新規抗菌性ポリペプチド及び使用方法

(iii) 配列の数: 4

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Quarles & Brady

(B) STREET: 1 South Pinckney St

(C) CITY: Madison

(D) STATE: WI

(E) COUNTRY: US

(F) ZIP: 53703

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

10

20

30

40

50

- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - (A) NAME: Seay, Nicholas J
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 27386 10
 - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 920308.90649
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 - (A) TELEPHONE: 608-251-5000
 - (B) TELEFAX: 608-251-9166
- (2) SEQ ID NO:1:
 - (i) 配列の特徴:
 - (A) 長さ: 1316bp
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 二本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状 20
 - (ii) 分子の種類: DNA (ゲノム)
- (ix) 特徴:
 - (A) 特徴を表す記号: -35_signal
 - (B) 存在位置: 738..742
- (ix) 特徴:
 - (A) 特徴を表す記号: -10_signal
 - (B) 存在位置: 757..763
- (ix) 特徴:
 - (A) 特徴を表す記号: RBS
 - (B) 存在位置: 784..791 30
- (ix) 特徴:
 - (A) 特徴を表す記号: CDS
 - (B) 存在位置: 796..987
- (xi) 配列: SEQ ID NO:1:

AATCTATTTT GTAGAGAATT TAGAGAAATT ATTAATTAC CAAGATATGT TTGCAATAAC 60
 ATTTTAAAAA TTTTAAAAA AAATTATTAC TTAATTTTTCAT GATAAGTCAG TAGATATGTC 120
 TGAATTAGAA CATTATATTA ATATAGTTGA AGAAATAAAT CCTACGATTG CTTCAATTCT 180
 TAAATCTAAT TTGAATCAGC TTTTATAAAG TTTTAGCCAT TAAAGCCATC TTGATAAATT 240
 TTATATCTTT CATATTCATT AAATGTGGAG ATAATGAAAA AGCAACGGTT ATGCTATCGC 300
 TGCTTTTTTT GTGATTAGAA GCTATGTTAT CATGGAGTTA TAGTAATGAA ACATAGTGAC 360
 AGTTCATCCT TTCTTATTAT AAAAGTGGTA ATAAGAGAAG TGGTAAACAA AGAGTTAGTA 420
 AAATAATACG TTTAACCATA ATATTTCCCTC CTTTAATTTA TTATAAGATT CAAAAAGGTA 480
 ATATTCCTAT ATTTGCAAAT ATGGGATAAA ATAATTTTAA AAAAGCAGAT TTGCAATTTT 540
 AAAAAAATAG AGGCTAATGG TGGTATTATA TTATTGTAAA TATATGTTTA CTCAGTAATA 600
 GTGATTTACT ATTACAACAG ATTTTGTGTG TATCTTAGAT ATTTCTGCTA GCATTAGTTA 660
 TCTGTAGATG TACTACTTAA TAAGTATATA ATTATAATTA TATAATAACT ATTATCAGAT 720
 TACCGTTAAA AGTTTTCTGA TATGCTTCTA CTGAACAATT TATGTTTCAGT TACACACATG 780
 AAAAAAGGAGG ATATT ATG TCA AAC ACA CAA TTA TTA GAA GTC CTT GGT ACT 831

10
20

Met Ser Asn Thr Gln Leu Leu Glu Val Leu Gly Thr

1 5 10

GAA ACT TTT GAT GTT CAA GAA GAT CTC TTT GCT TTT GAT ACA ACA GAT 879
 Glu Thr Phe Asp Val Gln Glu Asp Leu Phe Ala Phe Asp Thr Thr Asp
 15 20 25
 ACT ACT ATT GTG GCA AGC AAC GAC GAT CCA GAT ACT CGT TTC AAA AGT 927
 Thr Thr Ile Val Ala Ser Asn Asp Asp Pro Asp Thr Arg Phe Lys Ser
 30 35 40
 TGG AGC CTT TGT ACG CCT GGT TGT GCA AGG ACA GGT AGT TTC AAT AGT 975
 Trp Ser Leu Cys Thr Pro Gly Cys Ala Arg Thr Gly Ser Phe Asn Ser
 45 50 55 60
 TAC TGT TGC TGA TTGTATAAAA GATTTAGATT GTGCCGCATG TTAGCGGCAC 1027
 Tyr Cys Cys *

30
40

AATCTTTTGA TATTAGAGGT ATTAATATGT TAAATACACA ATTATTAGAA GTCCTTGGTA 1087
 CTA AAAACTTT TGATGTTCAA GAAGATTTAT TTGAGTTTAA TATAACAGAT ACTATTGTAC 1147
 TGCAGGCTAG TGATAGTCCA GATACTCATA GTAGGGGTCC CGAGCGCTTA GTGGGAATTT 1207
 GTATCGATAA GGGGTACAAA TTCCCACTAA ACCAATGTTT CAAGGCCTAT TTATTTTTTA 1267
 TATTC AATTC TCTTAAGTGT TTAGGAATAG ATAACAAGTC AAATTTATA 1316

(2) SEQ ID NO:2:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 64アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: 蛋白質

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

Met Ser Asn Thr Gln Leu Leu Glu Val Leu Gly Thr Glu Thr Phe Asp

1 5 10 15

Val Gln Glu Asp Leu Phe Ala Phe Asp Thr Thr Asp Thr Thr Ile Val

20 25 30

Ala Ser Asn Asp Asp Pro Asp Thr Arg Phe Lys Ser Trp Ser Leu Cys

35 40 45

Thr Pro Gly Cys Ala Arg Thr Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Cys Cys *

50 55 60

(2) ID NO:3:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1323bp

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(ix) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: -35_signal

(B) 存在位置: 177..182

(ix) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: -10_signal

(B) 存在位置: 191..196

(ix) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: RBS

(B) 存在位置: 218..224

(ix) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 228..782

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

10

20

30

40

TAGTAAAGTG GGTAGTTTCA ATATCTGCCC TCCTCGAAAAG ATCTCCGTCA GTTTC AATAG	60	
TTACTGTTGT TAACTATAAA TTATACTTAA ATTGATAGGA AACTTGGTCG TGACATTATC	120	
ATATGTTGAT ATTGGAAGAG AATCAAATTT ATAAAGACAA TTAAATCTAA ATTTGATGAA	180	
TATTTAGATG AATTATTACT AGGTTGACAG TCATGTTAGG AGAAGAG ATG AAC GAT	236	
		Met Asn Asp
		65
		10
TTT CAA TTT CAA GAT TAT TTT ATG TAC AGA AAA CCA TTA GGC AAC TTT	284	
Phe Gln Phe Gln Asp Tyr Phe Met Tyr Arg Lys Pro Leu Gly Asn Phe		
70 75 80		
TCT AAT TTT TTT AGT ATA ACT GAT ACG ATG GAT CCC ATT GAG TTA CTA	332	
Ser Asn Phe Phe Ser Ile Thr Asp Thr Met Asp Pro Ile Glu Leu Leu		
85 90 95		20
CAT AGT GAT CCG ATA TTT GCT GAA GGA GTA TAT TTG GCC TCT TCA TCT	380	
His Ser Asp Pro Ile Phe Ala Glu Gly Val Tyr Leu Ala Ser Ser Ser		
100 105 110 115		
CTT AGA GCA GCC ATA AAT AAA CTT AAG AAT CAT ACT GCG AGT ACT AAG	428	
Leu Arg Ala Ala Ile Asn Lys Leu Lys Asn His Thr Ala Ser Thr Lys		
120 125 130		30
GAT AAA AAG AAT GCA AGA GAG ACT ATT TTT CAA TAC TAT GCC CGT TAT	476	
Asp Lys Lys Asn Ala Arg Glu Thr Ile Phe Gln Tyr Tyr Ala Arg Tyr		
135 140 145		
AAC ACG AGA TCA ACT CCG TTT GGC TTG TTT TCG TCC ATC GGA GTA GGT	524	
Asn Thr Arg Ser Thr Pro Phe Gly Leu Phe Ser Ser Ile Gly Val Gly		
150 155 160		
GCT TTT TCG GCT TAC CTT AAA AAA GAA AAG TCT CGT TAT GAA AAA TCT	572	
Ala Phe Ser Ala Tyr Leu Lys Lys Glu Lys Ser Arg Tyr Glu Lys Ser		40
165 170 175		
ATT AAT ATT GAT CTT TTT TGG GCT TAT AAA GTA GCA GAT AAA CTA GAA	620	
Ile Asn Ile Asp Leu Phe Trp Ala Tyr Lys Val Ala Asp Lys Leu Glu		
180 185 190 195		

AGT ATG CCT GAA ATT TTA AAT ACT TTA AAA GTA GTT GCT AAT AAT GCT	668
Ser Met Pro Glu Ile Leu Asn Thr Leu Lys Val Val Ala Asn Asn Ala	
200 205 210	
TTG CAA AAG TCA GAT AAT TTT TGG CTT TTG GAT ACG CGA AGT CAT TTT	716
Leu Gln Lys Ser Asp Asn Phe Trp Leu Leu Asp Thr Arg Ser His Phe	
215 220 225	
GGT CTT ATG AAT TCT TTT CAT TTT ATC TTG TAC GAC TTC TAT TCT TTC	764
Gly Leu Met Asn Ser Phe His Phe Ile Leu Tyr Asp Phe Tyr Ser Phe	
230 235 240	
CTT CAA GAT AGA CCA TAA GAATTGATAT ATCAGCTGGA TTCACACCAG	812
Leu Gln Asp Arg Pro *	
245	
AAATACGGCT AGCTTGACCA ATAGTTTCTG GGTAAATTTT CTAAATTTT TGACGTGCTT	872
CGGTCGCAAT AGAATCAATG GCATCCCAAT CGATATTCTT AGGAATTCGA GCTCGGTACC	932
CGGGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA TGCAAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTACA	992
ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG CACATCCCCC	1052
TTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG	1112
CAGCCTGAAT GCGGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT	1172
TTCACACCGC ATATGGTGCA CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA	1232
GCCCCGACAC CCGCCAACAC CCGCTGACGC GCCCTGACGG GCTTGTCTGC TCCCGGCATC	1292
CGCTTACAGA CAAGCTGTGA CCGTCTCCGG G	1323

(2) SEQ ID NO:4:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 185アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: 蛋白質

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

10

20

30

40

Met Asn Asp Phe Gln Phe Gln Asp Tyr Phe Met Tyr Arg Lys Pro Leu
 1 5 10 15
 Gly Asn Phe Ser Asn Phe Phe Ser Ile Thr Asp Thr Met Asp Pro Ile
 20 25 30
 Glu Leu Leu His Ser Asp Pro Ile Phe Ala Glu Gly Val Tyr Leu Ala
 35 40 45
 Ser Ser Ser Leu Arg Ala Ala Ile Asn Lys Leu Lys Asn His Thr Ala
 50 55 60
 Ser Thr Lys Asp Lys Lys Asn Ala Arg Glu Thr Ile Phe Gln Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ala Arg Tyr Asn Thr Arg Ser Thr Pro Phe Gly Leu Phe Ser Ser Ile
 85 90 95
 Gly Val Gly Ala Phe Ser Ala Tyr Leu Lys Lys Glu Lys Ser Arg Tyr
 100 105 110
 Glu Lys Ser Ile Asn Ile Asp Leu Phe Trp Ala Tyr Lys Val Ala Asp
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ser Met Pro Glu Ile Leu Asn Thr Leu Lys Val Val Ala
 130 135 140
 Asn Asn Ala Leu Gln Lys Ser Asp Asn Phe Trp Leu Leu Asp Thr Arg
 145 150 155 160
 Ser His Phe Gly Leu Met Asn Ser Phe His Phe Ile Leu Tyr Asp Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Phe Leu Gln Asp Arg Pro *
 180 185

10

20

30

40

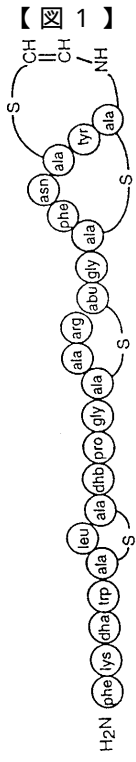


FIG. 1

フロントページの続き

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ヒルマン ジェフリー ディー

アメリカ合衆国 フロリダ州 32608 ゲインズビル サウスウエスト トゥエンティシックス
ス プレイス 6424

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 六笠 紀子

審判官 富永 みどり

(56)参考文献 国際公開第96/40865(WO, A1)

Infect. Immun. (1990) Vol. 58, p. 4126 - 4135

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

PUBMED

JSTPLUS

WPI

BIOSIS

UNIPROT

GENSEQ

GENBANK

EMBL

DDBJ