

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年8月2日 (02.08.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/086583 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 1/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

G01N 23/20 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/051518

(22) 国際出願日:

2007年1月30日 (30.01.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-021384 2006年1月30日 (30.01.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1048002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 淳 (SAITO, Jun) [JP/JP]; 〒2228567 神奈川県横浜市港北区師岡町

760番地 明治製菓株式会社内 Kanagawa (JP). 山田雅胤 (YAMADA, Mototsugu) [JP/JP]; 〒2228567 神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明治製菓株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 吉武 賢次, 外 (YOSHITAKE, Kenji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: CRYSTAL OF ENOYL-ACYL CARRIER PROTEIN REDUCTASE (FabK)

(54) 発明の名称: エノイル-アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶



(57) Abstract: A crystal of enoyl-acyl carrier protein reductase (FabK), in particular, a crystal of FabK originating in *Streptococcus pneumoniae* which has excellent qualities and can be obtained at a high reproducibility. Thus, for example, an FabK-specific inhibitor can be efficiently designed, which highly contributes to the discovery of a drug having a novel function mechanism.

(57) 要約: 高品質で再現性良く得られるエノイル-アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶、特に肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 由来 FabK の結晶が開示されている。本発明により FabK の特異的阻害剤の効率的な設計等が可能となり、新規作用機序の新薬創出に活用できる。

WO 2007/086583 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

エノイルーアシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶

発明の背景

[0001] 発明の分野

本発明はX線結晶構造解析および阻害剤の設計等に利用可能なエノイルーアシルキャリアプロテイン (FabK) の結晶に関する。

[0002] 背景技術

細菌における脂肪酸の生合成はタイプIIの脂肪酸シンターゼ (FAS) 系と呼ばれる一連の酵素群により行われる。一方、哺乳動物などの真核生物においては、脂肪酸の生合成はタイプIのFAS系と呼ばれる単一の多機能酵素により触媒されており、細菌の脂肪酸生合成系とは大きく異なる。そのため、タイプIIのFAS系酵素を阻害する化合物は、選択的かつ新規な抗菌剤としての可能性が示唆される (Prog. Lipid Res. (2001), 40, 467-497)。

[0003] 細菌の脂肪酸生合成系では四つの酵素反応が順次進行してサイクルを形成し、複数回のサイクルを経て、長鎖の飽和脂肪酸が生合成される。サイクルの第1工程は β -ケトアシル-ACPシンターゼによる縮合反応であり、はじめのサイクルでは β -ケトアシル-ACPシンターゼIII (FabH) がマロニル-ACPとアセチル-CoAとを縮合する。二回目以降のサイクルでは β -ケトアシル-ACPシンターゼIまたはII (FabB または FabF) がマロニル-ACPとアシル-ACPとを縮合する。第2工程ではNADPH-依存性 β -ケトアシル-ACPレダクターゼ (FabG) による還元反応が起こる。第3工程では β -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (FabA または FabZ) により脱水され、トランス-2-エノイル-ACPが得られる。第4工程では、エノイル-ACPレダクターゼ (FabI、FabK、または FabL) により還元されてアシル-ACPを生ずる。一サイクル当たり二個の炭素原子が付加され、最終的にパルミチル-ACP (16C) が得られるが、このサイクルは主にパルミチル-ACPによるエノイル-ACPレダクターゼのフィードバック阻害を介して停止する (Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology (1996), 612-636, American Society for Microbiology, Washington D.C. および J. Biol. Chem. (1996), 271, 1833-1836)。すなわち、エノイル-ACPレダ

クターゼが細菌の脂肪酸合成経路の律速酵素であり、細菌における脂肪酸生合成の重要な調節ポイントである。

[0004] また、大腸菌 (*Escherichia coli*) や黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) などに存在するエノイル—ACPLレダクターゼであるFabIが生育に必須な酵素であることは、大腸菌のFabI温度感受性変異株の解析から明らかにされた (*J. Biol. Chem.* (1995), 270,26538–26542)。抗菌作用はエノイル—ACPLレダクターゼを阻害することにより発現されると考えられるから、FabIは抗菌剤の標的として重要なタンパク質であるといえる。

[0005] また、FabIが広域スペクトル抗生物質トリクロサンの標的であることも明らかにされている。NADおよびトリクロサンと、大腸菌由来FabIとの複合体結晶構造についても研究されており、その天然基質を模倣することによってトリクロサンが特異性の高いFabIの阻害剤として作用することが示されている。FabIとNADおよびトリクロサンの複合体に関する立体構造データは特異的な阻害剤設計において重要な情報を提供する。この情報に基づいて設計した阻害剤が、細菌感染症の治療に有用である可能性が見出されている (*Nature*(1998)394,531–532、*J. Biol. Chem.*(1998),273,30316–30320、*Nature*(1999)398,383–384、および*J. Med. Chem.*(2003),46,1627–1635)。

[0006] また、ゲノム解析研究により大腸菌や黄色ブドウ球菌などのほとんどの細菌は、エノイル—ACPLレダクターゼとしてFabIを有していることが知られている。しかし、いくつかの菌種ではFabIの代わりにFabKが存在していることが明らかになっている。とりわけ、临床上重要な病原菌である肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は、エノイル—ACPLレダクターゼとしてFabKのみを有しており、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) および腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) ではFabIとFabKの両方を有していることが明らかにされている (*Nature*(2000),406,145–146)。そのため、より広範な抗菌活性を有する抗菌剤を創出するには、FabIだけでなくFabKも阻害する必要がある。

[0007] さらに、FabKは肺炎連鎖球菌において生育に必須であり、補酵素としてFMNを1:1のモル濃度比で有するフラビンタンパク質であることが明らかにされている (*Biochem. J.*(2003),370,1055–1062)。その他、FabKを弱いながらも阻害する化合物の報告はあるが、本発明者らの知る限りでは、これまでにFabKを強く阻害する化合物やFa

bKの立体構造に関する報告はない。

[0008] FabKを阻害する化合物を効率的に設計するためにはFabKの立体構造情報が有用である。FabKの結晶構造を明らかにすることにより、FabK特異的な阻害剤が設計できれば、代表的な薬剤耐性菌であるペニシリン耐性肺炎連鎖球菌 (PRSP) を含む肺炎連鎖球菌に対する特効薬の創出に非常に有用である。また、FabIおよびFabK両方に特異的な阻害剤を設計できれば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や多剤耐性緑膿菌を対象に含む、より広範な抗菌剤の創出に非常に有用である。そのため、X線結晶構造解析によりFabKの立体構造を決定し、効率的な阻害剤の設計を可能とする高品質のFabK結晶の創出が望まれている。

発明の概要

[0009] 本発明者らは、今般、種々の結晶化条件を検討した結果、X線結晶構造解析によりFabKの立体構造を決定し、効率的な阻害剤の設計を可能とする高品質のFabKの結晶化に成功した。

[0010] 従って、本発明は、FabKの結晶の提供をその目的としている。

[0011] そして、本発明によるFabKの結晶は、具体的には、空間群が $P2_1$ 、 $P2_12_12_1$ 、 $I22_2$ 、または $C222_1$ のものであり、より具体的には下記の(a)～(e)のいずれかで定義されるものである：

(a) 空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a=50\pm5\text{Å}$ 、 $b=126\pm13\text{Å}$ 、 $c=53\pm5\text{Å}$ 、 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、および $\beta=113\pm11^\circ$ であり、

(b) 空間群が $P2_12_12_1$ であり、単位格子定数が $a=59\pm6\text{Å}$ 、 $b=74\pm7\text{Å}$ 、 $c=126\pm13\text{Å}$ 、および $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であり、

(c) 空間群が $P2_12_12_1$ であり、単位格子定数が $a=87\pm9\text{Å}$ 、 $b=160\pm16\text{Å}$ 、 $c=183\pm18\text{Å}$ 、および $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であり、

(d) 空間群が $I22_2$ であり、単位格子定数が $a=117\pm12\text{Å}$ 、 $b=187\pm19\text{Å}$ 、 $c=215\pm22\text{Å}$ 、および $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であり、

(e) 空間群が $C222_1$ であり、単位格子定数が $a=59\pm6\text{Å}$ 、 $b=85\pm9\text{Å}$ 、 $c=126\pm13\text{Å}$ 、および $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ である。

[0012] 本発明によるFabKの結晶は、多波長異常分散法 (MAD法) により分解能 2.2Å

のX線回折強度データを得ることが可能な良質な結晶であって、FabKの立体構造の解析を可能とするものである。従って、本発明のFabKの結晶を利用することにより、FabKを阻害する化合物の効率的な設計等に役立つ立体構造情報を取得できる。本発明による結晶が提供されることは、創薬において極めて意義がある。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、本発明のSe-His-FabK結晶の顕微鏡写真を示す。

[図2]図2は、決定したFabKの非対称単位中の構造のリボン図を示す。

[図3]図3は、点変異部分(A141S)の電子密度図とモデルを示す。

発明の具体的説明

[0014] FabKの結晶

本発明によるFabKの結晶は上述の(a)～(e)のいずれかで定義されるものである。本発明の好ましい態様によれば、FabKは、ストレプトコッカス属(*Streptococcus*)または肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)由来のものであり、より好ましい態様によれば、配列表の配列番号1～4のいずれかひとつのアミノ酸配列を有するタンパク質であることが好ましい。本発明の別の好ましい態様によれば、結晶を構成するタンパク質中の少なくとも一つのメチオニン残基がセレノメチオニンに置換されたものであることが好ましい。さらに、本発明によるFabKの結晶の好ましい具体例は以下の通りである：

[0015] まず、本発明の一つの好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a=50.26\text{ \AA}$ 、 $b=126.69\text{ \AA}$ 、 $c=53.63\text{ \AA}$ 、 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、および $\beta=112.46^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0016] また、本発明の別の好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a=50.61\text{ \AA}$ 、 $b=125.95\text{ \AA}$ 、 $c=53.01\text{ \AA}$ 、 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、および $\beta=112.78^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0017] また、本発明の別の好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a=58.92\text{ \AA}$ 、 $b=73.89\text{ \AA}$ 、 $c=126.50\text{ \AA}$ 、および $\alpha=\beta=$

$\gamma = 90^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0018] また、本発明の別の好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $C222_1$ であり、単位格子定数が $a = 58.99 \text{ \AA}$ 、 $b = 84.60 \text{ \AA}$ 、 $c = 126.17 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号3に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0019] また、本発明の別の好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $P2_12_12_1$ であり、単位格子定数が $a = 86.99 \text{ \AA}$ 、 $b = 160.41 \text{ \AA}$ 、 $c = 183.25 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0020] また、本発明の別の好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $I222$ であり、単位格子定数が $a = 117.20 \text{ \AA}$ 、 $b = 186.58 \text{ \AA}$ 、 $c = 214.79 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0021] また、本発明の別の好ましい態様によれば、FabKの結晶は空間群が $I222$ であり、単位格子定数が $a = 118.38 \text{ \AA}$ 、 $b = 190.30 \text{ \AA}$ 、 $c = 213.04 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶である。この態様において、FabKは配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するものであることがより好ましい。

[0022] X線を照射して回折強度データを取得するためのX線発生装置は特に限定されない、好ましくは財団法人高輝度光科学研究センターの大型放射光施設SPring-8などの第三世代の放射光施設を利用する。得られたX線回折強度データを処理することにより、結晶学的パラメータを特定することが可能である。X線回折強度を測定するため、結晶を多価アルコール含有の抗凍結溶液中に浸した後、凍結させる。凍結状態でX線回折データを収集し、X線回折像を得る。ここで、多価アルコールとしてはスクロース、トレハロース、またはグリセロールなどが挙げられる。とりわけ、グリセロールが好ましい。抗凍結溶液中の多価アルコールの濃度は好ましくは10%～20%である。

[0023] 位相決定には、分子置換法、重原子同型置換法、または多波長異常分散法(MA

D法)などが用いられる。好ましくは、重原子同型置換法またはMAD法などが挙げられる。すなわち、ネイティブ結晶および重原子誘導体結晶の回折データ間の回折強度差、あるいは異なる波長間で測定した回折データの回折強度差から電子密度を計算するための初期位相を求めることにより、立体構造を決定することが可能である。本発明にあつては、波長を変えることのできる前記大型放射光施設SPring-8を利用可能であつた。その結果、セレノメチオニンを導入した結晶を用いたMAD法によるX線結晶構造解析を実施し、その後、得られたFabKの立体構造をサーチモデルとした分子置換法による構造決定を行うことができた。

[0024] FabKの結晶化

本発明によるFabKの結晶を得る方法は、蒸気拡散法(例えば、ハンギングドロップ法、シッティングドロップ法、またはサンドイッチドロップ法などが挙げられる)、バルクバッチ法、マイクロバッチ法、マイクロ透析法、または自由界面拡散法などのいかなる方法を用いてもよく、好ましくは蒸気拡散法が挙げられ、さらに好ましくはハンギングドロップ法が挙げられる。本発明者らの得た知見によれば、FabKの結晶はクラスター化する傾向にあるため、シーディング法により良質な単結晶を得ることが好ましい。本発明の好ましい態様によれば、結晶化に用いるタンパク質としては配列番号1~4に示されるアミノ酸配列を有するHis-FabKおよびFabKが好ましく、精製の簡便さから配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するFabKが最も好ましい。結晶化に用いる精製タンパク質の濃度は10mg/mL程度であることが好ましい。そして、タンパク質溶液に沈殿剤、塩類、緩衝液、または添加剤などを適当量加えて結晶化を行う。

[0025] 本発明のFabKの結晶化に用いられる好ましい沈殿剤としては、ポリエチレングリコールなどの水溶性高分子、イソプロパノール、および2-メチル-2, 4-ペンタジオール(MPD)などの有機溶媒などが挙げられる。さらに好ましい沈殿剤としては、ポリエチレングリコールである。さらに沈殿剤の成分としては、アンモニウム塩を用いることが好ましい。アンモニウム塩としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、または酢酸アンモニウムなどが挙げられ、好ましくは、塩化アンモニウムまたは酢酸アンモニウムなどである。これらを一種または二種以上用いてもよい。また、緩衝剤としては公知の緩衝剤を用いることができるが、MES (pH5.5-7.0)を用いることが好ましい。

。沈殿剤の組み合わせは、

(1) 8－15%ポリエチレングリコール1000、8－15%MPD、0. 1M塩化アンモニウム、0. 2M塩化カルシウム、5mMジチオスレイトール、および0. 1M MES(pH5. 5－7. 0)、

(2) 20－25%ポリエチレングリコール1000、0. 1M塩化アンモニウム、0. 2M酢酸アンモニウム、5mMジチオスレイトール、および0. 1M MES(pH5. 5－7. 0)、ならびに

(3) 2. 5－10%ポリエチレングリコール8000、2. 5－10%ポリエチレングリコール1000、0. 1M塩化アンモニウム、0. 2M酢酸アンモニウム、5mMジチオスレイトール、および0. 1M MES(pH5. 0－6. 5)

の三通りが挙げられるが、とりわけ(1)の組み合わせが好ましく、最も再現性良く、高品質の結晶を得ることができる。

[0026] (1)の条件は、通常市販されている結晶化条件スクリーニングキットには含まれていない。上記沈殿剤の組成は、ポリエチレングリコールとMPDを組み合わせた上で、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、またはジチオスレイトール等を単独、または組み合わせる独自の条件である。なお、高分解能でのX線結晶構造解析に利用するためには(1)の条件で得られる結晶は、マイクロシーディング法によりクラスター化を抑制することが重要である点に留意が必要である。

[0027] FabKの取得

(1)FabKの発現

FabKをコードするDNA断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特にDNA発現ベクターの形態とする。その後、前記DNA分子、特に前記DNA発現ベクターにより宿主細胞の形質転換を行う。そして、その形質転換体を培養することによりFabKを得る。

[0028] 前記DNA分子はベクター分子にFabKをコードするDNA断片を組み込むことによって得ることができる。本発明の好ましい態様によれば、このベクターはプラスミドである。本発明において利用されるベクターは使用する宿主細胞の種類を考慮し、ウィルス、プラスミド、またはコスミドベクターなどから適宜選択することができる。例えば宿主

細胞が大腸菌の場合はpUC系またはpBR系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYEp系、YRp系、またはYCp系のプラスミドベクターが挙げられる。宿主細胞としては宿主－ベクター系が確立されているものであれば利用可能であり、好ましくは大腸菌が挙げられる。宿主細胞の形質転換により得られた形質転換体を適当な条件で培養し、得られた形質転換体の細胞抽出液を慣用の方法に従い回収することができる。ここで、FabKに付加的ポリペプチド、例えばグルタチオン－S－トランスフェラーゼ(GST)またはヒスチジン残基に富むポリペプチド(His－tag)を融合タンパク質として発現することも慣用の技術により可能である。

[0029] (2) FabKの精製

His－tagを融合して大腸菌で発現させたFabK(His－FabK)は、金属イオンを配位させたアフィニティーカラムを用いた慣用の技術により容易に精製が可能である。前記金属イオンの好ましいものとしてはニッケルイオンが挙げられる。精製したHis－FabKを50mMトリス塩酸(pH8.0)、50mM塩化アンモニウム、5mMジチオスレイトール、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、および1mMベンズアミジン溶液で透析した後、陰イオン交換カラム、疎水性相互作用カラム、およびゲルろ過カラムを用いた一般的なクロマトグラフィーの手法を組み合わせることで精製することが可能である。また、配列番号1または3に示されるアミノ酸配列を有するHis－FabKを各々分取することができる。さらに、His－tagを融合せずに大腸菌で発現させたFabKは陰イオン交換カラム、疎水性相互作用カラム、およびゲルろ過カラムを用いた一般的なクロマトグラフィーの手法を組み合わせることで精製することが可能である。また、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列を有するFabKを各々分取することができる。

[0030] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例によって限定されない。また、各種ベクターの作製またはタンパク質の発現等は、特に記載のない限り、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition(Sambrook and Russell 著, Cold Spring Harbor laboratory Press刊(2001))などに記載の公知の手法により実施可能である。

実施例

[0031] 実施例1:肺炎連鎖球菌由来FabKの大腸菌発現系の構築

(1)肺炎連鎖球菌R6株由来のゲノムDNAの単離

肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) R6株 (ATCC49619)を血液寒天基礎培地(ベクトン・ディッキンソン社製)で二酸化炭素濃度5%、37℃の条件下で18時間培養し、低速遠心によって集菌した。得られた菌体からDNeasy Tissue Kit (QIAGEN社製)を用い、添付の説明書に記載の方法に従って、ゲノムDNAを調製した。

[0032] (2)肺炎連鎖球菌R6株由来FabK発現ベクターの構築

FabKをコードするDNAを単離するため以下のプライマーを設計した。

[0033] FabK-F. P. : 5' - GGAATTCCATATGAAAACGCGTATTACAGAA - 3'
' (配列番号5)

His-FabK-R. P. : 5' - CCGCTCGAGGTCATTTCTTACAACCTCCTGT
- 3' (配列番号6)

FabK-R. P. : 5' - CCGCTCGAGTTAGTCATTTCTTACAACCTCC - 3' (配列番号7)

[0034] 前記(1)で単離したゲノムDNAを鋳型に前記プライマーを用いて、Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ社製)でポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を添付の説明書の記載に従い実施した。His-tag付のFabK (His-FabK)を作製する場合には配列番号5および6のプライマーを使用した。一方、タグなしのFabKを作製する場合には配列番号5および7のプライマーを使用した。増幅したDNA断片はNdeIおよびXhoIで消化した。この断片を予めNdeIおよびXhoIで切断したベクターpET-21b(+) (Novagen社製)にDNA Ligation Kit ver. 2 (タカラバイオ社製)を添付の説明書に記載の方法に従って用い、サブクローニングした。得られた組換えプラスミドを大腸菌COMPETENT high DH5α (TOYOBO社製)に添付の説明書に記載の方法に従い導入し、形質転換体を得た。形質転換体を50 μg/mLのアンプシリンを含むLB agarプレート上にて、37℃で一晩培養し、アンプシリン耐性コロニーを取得した。取得したコロニーから組換えプラスミド (His-FabK/pET-21b(+)) およびFabK/pET-21b(+))を調製しDNA配列を確認し、配列番号1および2に記載のSWISSPROT Accession番号Q8DR17に登録されている肺炎連鎖球菌

菌R6株由来のFabKをコードすることを確認した。

[0035] 実施例2: FabK (His-FabKおよびFabK) の発現

実施例1の(2)で得られたHis-FabK/pET-21b(+)およびFabK/pET-21b(+)の組み換えプラスミドを大腸菌BL21(DE3) (Novagen社製)に形質転換した。得られた形質転換体を100 μ g/mLのアンピシリンを含むSB培地(1.2% (w/v) Bacto Tryptone、2.4% (w/v) Yeast Extract、0.5% (v/v) グリセロール、0.072Mリン酸水素二カリウム、および0.028Mリン酸二水素カリウム含有) 5L中で600nmにおけるO. D. (吸光度)が0.6-1.0に達するまで増殖させた。最終濃度1mMのイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で三時間誘導後、遠心分離機によって集菌し、菌体をリン酸緩衝食塩水(PBS) 200mLに懸濁した後、再度遠心分離機によって集菌し、-20°Cで凍結保存した。菌体をHis-FabK/pET-21b(+)の組み換え大腸菌の場合には菌体破碎バッファーA(50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)、300mM塩化ナトリウム、5mMイミダゾール、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、1mM β -メルカプトエタノール、および0.1mg/mLリゾチーム含有)、FabK/pET-21b(+)の組み換え大腸菌の場合には菌体破碎バッファーB(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、1mMジチオスレイトール、および0.1mg/mLリゾチーム含有)に懸濁し、氷上で30分培養した。次に一分間の超音波処理を5-7回行い、細胞を破碎した。遠心分離(30分間、15000rpm)とそれに続く0.22 μ mのフィルターによって超音波処理の残渣を除去し、細胞抽出液を得た。

[0036] 実施例3: His-FabKの精製

(1) アフィニティーカラムによる精製

以下の精製操作はすべて4°Cで行った。His-FabK/pET-21b(+)の組み換え大腸菌から実施例2の方法で得られた細胞抽出液をアフィニティークロマトグラフィーで精製した。アフィニティークロマトグラフィーカラムはNi-NTA (QIAGEN社製)を担体として用い、取扱説明書に記載の方法でカラム容量30mLのカラムを作製した。平衡化バッファー(50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)、300mM塩化ナトリウム)

ウム、5mMイミダゾール、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mM β -メルカプトエタノール含有)で平衡化した後、細胞抽出液を流速1mL/minでアプライし、3カラム容量の洗浄バッファー(50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)、300mM塩化ナトリウム、20mMイミダゾール、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mM β -メルカプトエタノール含有)で洗浄した後、溶出バッファー(50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)、300mM塩化ナトリウム、200mMイミダゾール、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mM β -メルカプトエタノール含有)で溶出した。SDS-PAGEにより溶出画分を確認し、His-FabKの主要なフラクションをまとめて回収した。

[0037] (2)陰イオン交換カラムによる精製

前記(1)で得られたHis-FabK溶液を透析バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で二時間透析した後に、陰イオン交換カラムであるPOROS HQ/20(PerSeptive Biosystems社製)を用いて精製した。平衡化バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化したカラムに流速10mL/minでHis-FabK溶液をアプライした。3カラム容量の平衡化バッファーで洗浄した後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール溶液中の0-500mM塩化カリウムの直線勾配(25カラム容量)で溶出した。SDS-PAGEにより溶出画分を確認し、His-FabKの主要な画分をまとめ、以後の精製を実施した。

[0038] (3)疎水性相互作用クロマトグラフィーによる精製

前記(2)で得られたHis-FabK溶液を50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、3.5M硫酸アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール溶液と混合した後、硫酸アンモニウムの終濃度が2Mになるように調製した。調製したHis-FabK溶液を平衡化バッファー(50mMトリス塩

酸緩衝液(pH7.5)、2M硫酸アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化した疎水性相互作用カラムであるRESOURCE PHE 6mL(アマシャムバイオサイエンス社製)に、流速5mL/minでアプライした。3カラム容量の平衡化バッファーで洗浄した後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール溶液中の2-0M硫酸アンモニウムの直線勾配(15カラム容量)で溶出した。SDS-PAGEにより溶出画分を確認し、His-FabKの主要な画分をまとめ、以後の精製を実施した。

[0039] (4)ゲルろ過カラムによる精製

前記(3)で得られたHis-FabK溶液を保持分子量30000以上の限外ろ過膜であるAmicon Ultra-4 30kDa NMWL(ミリポア社製)を用いて1mLまで濃縮し、ゲルろ過バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、150mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化したゲルろ過カラムHiLoad16/60 Superdex75 pre p grade(アマシャムバイオサイエンス社製)に流速1mL/minでアプライした。SDS-PAGEにより主要な画分を各々まとめ、前記記載の限外ろ過膜を用いて濃縮した。その後溶液交換のため、10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM塩化アンモニウム、1mMジチオスレイトール溶液で希釈し、再度濃縮する操作を三度繰り返した後、10mg/mLになるまで濃縮し、最終濃度5mMになるように β -ニコチンアミダデニンジヌクレオチド二ナトリウム(還元型)を添加して、結晶化試料とした。試料は液体窒素中で凍結し、-80℃で保存した。

[0040] 実施例4:FabK(タグなし)の精製

(1)陰イオン交換カラムによる精製

以下の精製操作はすべて4℃で行った。FabK/pET-21b(+)の組み換え大腸菌から実施例2の方法で得られた細胞抽出液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製した。陰イオン交換カラムはQ-Sepharose High Performance(アマシャムバイオサイエンス社製)を担体として用い、取扱説明書に記載の方法でカラム容量114mLのカラムを作製した。平衡化バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7

. 5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化したカラムに、流速5mL/minでFabK溶液をアプライした。3カラム容量の平衡化バッファーで洗浄した後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7. 5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、1mMジチオスレイトール溶液中の0-1M塩化カリウムの直線勾配(5カラム容量)で溶出した。SDS-PAGEにより溶出画分を確認し、FabKの主要な画分をまとめ、以後の精製を実施した。

[0041] (2)疎水性相互作用クロマトグラフィーによる精製

前記(1)で得られたFabK溶液を50mMトリス塩酸緩衝液(pH7. 5)、3. 5M硫酸アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール溶液と混合した後、硫酸アンモニウムの最終濃度が2Mになるように調製した。調製したFabK溶液を平衡化バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7. 5)、2M硫酸アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化した疎水性相互作用カラムであるRESOURCE PHE 6mL(アマシャムバイオサイエンス社製)に、流速5mL/minでアプライした。3カラム容量の平衡化バッファーで洗浄した後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7. 5)、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、1mMジチオスレイトール溶液中の2-0M硫酸アンモニウムの直線勾配(15カラム容量)で溶出した。SDS-PAGEにより溶出画分を確認し、FabKの主要な画分をまとめ、以後の精製を実施した。

[0042] (3)ゲルろ過カラムによる精製

前記(2)で得られたFabK溶液を保持分子量30000以上の限外ろ過膜であるAmicon Ultra-4 30kDa NMWL(ミリポア社製)を用いて1mLまで濃縮し、ゲルろ過バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7. 5)、150mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化したゲルろ過カラムHiLoad 16/60 Superdex75 prep grade(アマシャムバイオサイエンス社製)に流速1mL/minでアプライした。SDS-PAGEにより主要な画分を各々まとめ、以後の精製を実施した。

[0043] (4)陰イオン交換カラムによる精製

前記(3)で得られたFabK溶液を透析バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で二時間透析した後に陰イオン交換カラムクロマトグラフィーであるMonoQ HR10/10(アマシャムバイオサイエンス社製)で精製した。平衡化バッファー(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール含有)で平衡化したカラムに流速3mL/minでFabK溶液をアプライした。3カラム容量の平衡化バッファーで洗浄した後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、50mM塩化アンモニウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1mMベンズアミジン、および1mMジチオスレイトール溶液中の0-1M塩化カリウムの直線勾配(20カラム容量)で溶出した。SDS-PAGEにより溶出画分を確認し、FabKの主要な画分をまとめ、前記記載の限外ろ過膜を用いて濃縮した。その後溶液交換のため10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM塩化アンモニウム、1mMジチオスレイトール溶液で希釈し、再度濃縮する操作を三度繰り返した後、10mg/mLになるまで濃縮し、最終濃度5mMになるように β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド二ナトリウム(還元型)を添加して、結晶化試料とした。試料は液体窒素中で凍結し、-80°Cで保存した。

[0044] 実施例5:セレノメチオニン置換FabK(Se-His-FabKおよびSe-FabK)の発現

MAD法によるX線結晶構造解析に使用する重原子誘導体結晶を作製するために、メチオニンの硫黄原子が重原子であるセレンに置換されたセレノメチオニン(Se-Met)置換His-FabK(Se-His-FabK)およびFabK(Se-FabK)を作製した。Se-His-FabKおよびSe-FabKは実施例1の(2)に記載した各々の組み換えプラスミドをメチオニン要求株である大腸菌B834(DE3)(Novagen社製)に形質転換し、100 μ g/mLのアンピシリンを含むLB agarプレート上にて、37°Cで一晩培養し、アンピシリン耐性コロニーを取得した。得られた形質転換体は100 μ g/mLのアンピシリンを含むLB培地100mLにて、37°Cで一晩培養し、遠心分離機で集菌後、100 μ g/mLのアンピシリンを含む100mLのLeMaster培地(組成は表1に示す。)で

懸濁し、再度遠心分離機によって集菌し、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含むLeMaster培地100mLに再懸濁した。この懸濁液を $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む5 LのLeMaster培地に接種し、600nmにおけるO. D. (吸光度)が0.6–1.0に達するまで増殖させた。最終濃度1mMのイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で三時間誘導後、遠心分離機によって集菌した。その後、その集菌した菌体をリン酸緩衝食塩水(PBS)200mLに懸濁した後、再度遠心分離機によって集菌し、 -20°C で凍結保存した。以下、Se-His-FabKおよびSe-FabKは天然型と同様の方法で精製した。

[0045] [表1]

LeMaster培地の組成 (1000ml 当たり)	
成分	含有量
Se-Met core 培地 (日本製薬社製)	23.6g
25mg/ml L-セレノメチオニン (和光純薬社製)	1ml
10% グルコース	100ml
1 M 硫酸マグネシウム	1ml
15mM 硫化鉄 (II)	1ml
硫酸	$8.3 \mu\text{l}$
KA0 and MICHAYLUK VITAMIN SOLUTION (シグマ社製)	10ml

[0046] 実施例6:A141S変異FabK(A141S His-FabKおよびA141S FabK)の作製

実施例1の(2)で作製した組み換えプラスミドHis-FabK/pET-21b(+)およびFabK/pET-21b(+)を利用して、141番目のアミノ酸残基アラニンをセリンに置換した点変異体(A141S His-FabKおよびA141S FabK)をコードする組み換えプラスミドを作製した。点変異導入にはStratagene社のQuickChange Site-Directed Mutagenesis Kitを利用して1塩基の点変異を導入した。まず、目的とする変異を中央にしてその前後に10–15塩基ずつ付加したプライマー、およびそれに相補的な下記プライマーを用意した。

[0047] FabK-Mutant-F. P. :5'-GGGATAATCGTTATTCCTGTCGTTTCCTA
GTG-3' (配列番号8)

FabK-Mutant-R. P. :5'-CACTAGGAACGACAGGAATAACGATTA
TCCC-3' (配列番号9)

[0048] 前記プライマーを用い、添付の説明書に記載の方法に従ってA141S His-FabKおよびA141S FabK点変異体発現プラスミドを作製した。得られたプラスミドについては目的とした塩基以外に変異が入っていないことをDNA配列解析により確認し、発現ベクターに挿入されているDNAが配列番号3および4をコードすることを確認した。作製した発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3)に形質転換し、天然型と同様の方法で発現および精製した。

[0049] 実施例7:FabKの結晶化

沈殿剤の組み合わせとしては、

(1) 8-15%ポリエチレングリコール1000、8-15%2-メチル-2, 4-ペンタンジオール(MPD)、0.1M塩化アンモニウム、0.2M塩化カルシウム、5mMジチオスレイトール、および0.1M MES(pH5.5-7.0)、

(2) 20-25%ポリエチレングリコール1000、0.1M塩化アンモニウム、0.2M酢酸アンモニウム、5mMジチオスレイトール、および0.1M MES(pH5.5-7.0)、ならびに

(3) 2.5-10%ポリエチレングリコール8000、2.5-10%ポリエチレングリコール1000、0.1M塩化アンモニウム、0.2M酢酸アンモニウム、5mMジチオスレイトール、および0.1M MES(pH5.0-6.5)

の三通りを用いた。

[0050] MAD法によるX線結晶構造解析に利用した結晶は実施例5で精製したSe-His-FabKを用いて作製した。10mg/mLのSe-His-FabK溶液2.0 μ Lと結晶化剤(10%ポリエチレングリコール1000、10%MPD、0.1M塩化アンモニウム、0.2M塩化カルシウム、5mMジチオスレイトール、および0.1M MES(pH6.5)含有)2.0 μ Lをカバーガラス上で混合し結晶化ドロップとした。リザーバー溶液として前記結晶化剤500 μ LをVDXプレート(ハンプトンリサーチ社製)のウェルに分注し、ウェルの淵に高真空グリースを塗り、カバーガラスをドロップが内側になるように被せ密閉した。プレートを4℃の恒温槽内に静置すると数日でクラスター結晶が得られた。得られたクラスター結晶を用いてマイクロシーディング法により、再度結晶化することでX線結晶構造解析可能な結晶が作製可能であった。得られたSe-His-FabK結晶の

顕微鏡写真を図1に示す。この結晶は空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a=50.26\text{ \AA}$ 、 $b=126.69\text{ \AA}$ 、 $c=53.63\text{ \AA}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、および $\beta = 112.46^\circ$ の結晶である。

[0051] また、結晶化条件(1)において実施例3で精製したHis-FabKを使用した場合にも同様の結晶が得られ、空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a=50.61\text{ \AA}$ 、 $b=125.95\text{ \AA}$ 、 $c=53.01\text{ \AA}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、および $\beta = 112.78^\circ$ であった。

[0052] さらに、結晶化条件(1)ではHis-FabKを利用した場合、空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a=58.92\text{ \AA}$ 、 $b=73.89\text{ \AA}$ 、 $c=126.50\text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶も作製可能であった。

[0053] また、A141S His-FabKを使用した場合、結晶化条件(1)においては空間群が $C222_1$ であり、単位格子定数が $a=58.99\text{ \AA}$ 、 $b=84.60\text{ \AA}$ 、 $c=126.17\text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶が得られた。

[0054] さらに、結晶化条件(2)においてSe-FabKを使用した場合、空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a=86.99\text{ \AA}$ 、 $b=160.41\text{ \AA}$ 、 $c=183.25\text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶が得られた。

[0055] また、結晶化条件(3)においてはHis-FabKを使用した場合、空間群が $I222$ であり、単位格子定数が $a=117.20\text{ \AA}$ 、 $b=186.58\text{ \AA}$ 、 $c=214.79\text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶が得られた。

[0056] さらに、Se-His-FabKを使用した場合には、空間群が $I222$ であり、単位格子定数が $a=118.38\text{ \AA}$ 、 $b=190.30\text{ \AA}$ 、 $c=213.04\text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ の結晶が得られた。

[0057] 前記記載のすべての結晶は蒸気拡散法であるハンギングドロップまたはシッティングドロップのいずれの方法で結晶化した場合でも、同様の結晶が得られた。

[0058] 実施例8: Se-His-FabKのX線回折強度データの収集および結晶構造の決定

実施例7の結晶化条件(1)で得られたSe-His-FabK結晶を15%グリセロール含有の安定化母液(12.5%ポリエチレングリコール1000、12.5%MPD、0.1M塩化アンモニウム、0.2M塩化カルシウム、5mMジチオスレイトール、および0.1M MES(pH6.5)含有)に移し、 -170°C の窒素ガス気流にて急速凍結した。これを前

記財団法人高輝度光科学研究センターの大型放射光施設SPring-8の創薬産業ビームラインBL32B2を利用しCCDカメラを検出装置としてX線回折データを振動法にて測定した。この際、セレンの異常散乱効果を用いて構造解析を行うために波長は0.97932、0.97888、および0.90000 Åの三波長、すなわち吸収端のエッジ、ピーク、およびリモートの三カ所でMADデータを収集した。振動角は1° /フレームであった。各データは回折強度データ処理プログラムCrystalClear(リガク社製)を使用して、分解能2.0 Åで処理し、回折強度を数値化し、結晶構造因子を求めた。

- [0059] その結果、空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a=50.26\text{ Å}$ 、 $b=126.69\text{ Å}$ 、 $c=53.63\text{ Å}$ 、 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、および $\beta=112.46^\circ$ の結晶であることがわかった。得られたデータの完全性はエッジ、ピーク、およびリモートの測定波長でそれぞれ97.2%、96.1%、および95.4%であった。さらに、 R_{merge} はそれぞれ6.2%、6.4%、および8.6%であった。結晶の空間群、単位格子定数、およびSe-His-FabKの分子量から結晶の非対称単位にSe-His-FabK分子が二分子存在していることが明らかになった。これらのデータ収集の結果は下記の表2に示される通りであった。

- [0060] [表2]

結晶学的分析の統計量

データ収集

空間群	$P2_1$		
単位格子定数(Å)	a=50.26,	b=126.69,	c=53.63
(deg.)	$\alpha=90.0,$	$\beta=112.46,$	$\gamma=90.00$
波長(Å)	0.90000	0.97888	0.97932
	(リモート)	(ピーク)	(エッジ)
分解能範囲(Å)	39-2.00	40-2.00	32-2.00
	(2.07-2.00)	(2.07-2.00)	(2.07-2.00)
全反射数	140565	139889	148999
ユニークな反射数	78798	79294	79789
平均冗長度	1.78	1.76	1.87
完全性 (%)	95.4(94.0)	96.1(94.9)	97.2(96.2)
R merge	0.086	0.064	0.062
	(0.199)	(0.139)	(0.142)
平均 I/signal	3.9(1.8)	6.6(3.1)	7.6(3.5)

注記:括弧内の値は最終分解能シェルに対するものである。

[0061] 次に、プログラムSOLVE(Terwillinger, T. C. & Berendzen, J. ActaCryst allogr. D 55, 849-861(1999))を用いてセレン原子の位置を決定し初期位相を計算した。位相の改良及び初期モデルの構築はプログラムRESOLVE(Terwilliger, T. C. Acta Crystallogr. D56, 965-972(2000))を用いた。次いで、プログラムTurbo Frodo(AFMB-CNRS製)、プログラムRefmac5(Collaborative Computational Project Number 4(ccp4))によるモデルの構築および修正を繰り返し実施し、Se-His-FabKの結晶構造を決定した。構造精密化は分解能2.2 Åで実施した。決定した結晶構造の正確さの指標であるR因子は0.220であった。さらに、精密化の段階で計算に入れなかった全反射の5%に相当する構造因子から計算される R_{free} 因子は0.282であった。また、決定したFabKの非対称単位中の構造を図2に示した。

[0062] 実施例9:A141S His-FabKのX線回折強度データの収集および結晶構造の決定

実施例7の結晶化条件(1)で得られたA141S His-FabK結晶を15%グリセロ

ール含有の安定化母液(12.5%ポリエチレングリコール1000、12.5%MPD、0.1M塩化アンモニウム、0.2M塩化カルシウム、5mMジチオスレイトール、および0.1M MES(pH6.0)含有)に移し、 -170°C の窒素ガス気流にて急速凍結した。これを前記財団法人高輝度光科学研究センターの大型放射光施設SPring-8の創薬産業ビームラインBL32B2を利用しCCDカメラを検出装置としてX線回折データを振動法にて測定した。X線の波長は $1\text{\AA}$ 、振動角は 1° /フレームであった。次に、回折強度データ処理プログラムCrystalClear(リガク社製)を使用して、A141S His-FabK結晶を分解能 $1.8\text{\AA}$ で処理し、回折強度を数値化し、結晶構造因子を求めた。

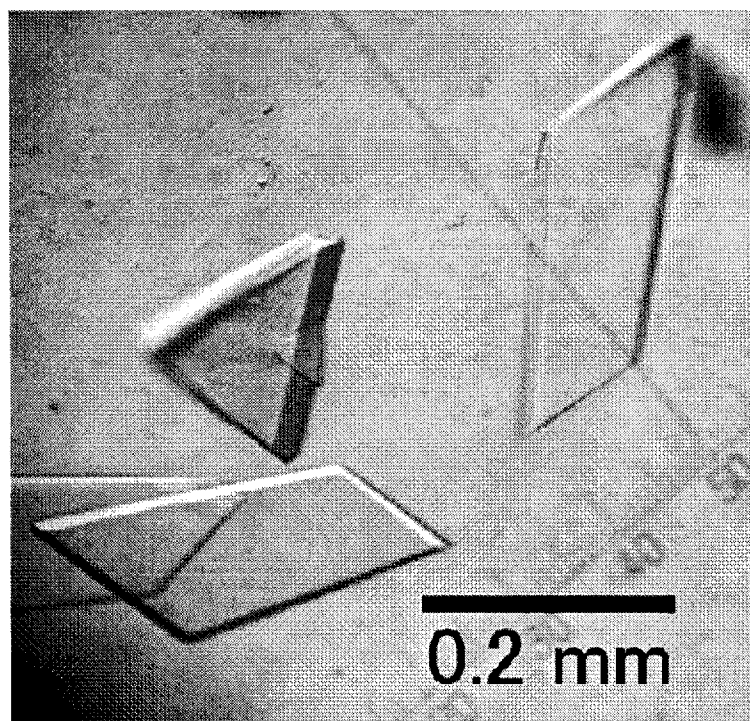
[0063] その結果、A141S His-FabK結晶は空間群が $C222_1$ であり、単位格子定数が $a=58.99\text{\AA}$ 、 $b=84.60\text{\AA}$ 、 $c=126.17\text{\AA}$ 、および $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ であった。得られたデータの完全性は99.8%、 R_{merge} は6.6%であった。プログラムMolrep(CCP4)を用いた分子置換法により位相を決定し、プログラムRefmac5(CCP4)を用いて構造を精密化した結果、R因子は0.244となった。さらに、精密化の段階で計算に入れなかった全反射の5%に相当する構造因子から計算される R_{free} 因子は0.282となり、構造決定に成功した。また、点変異部分の電子密度図とモデルを図3に示した。

請求の範囲

- [1] エノイル—アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶。
- [2] FabKが、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) または肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae) 由来のものである、請求項1に記載の結晶。
- [3] 空間群が $P2_1$ 、 $P2_1 2_1 2_1$ 、 $I222$ 、または $C222_1$ のものである、請求項1に記載の結晶。
- [4] 下記のいずれかで定義される、エノイル—アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶：
- (a) 空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a = 50 \pm 5 \text{ \AA}$ 、 $b = 126 \pm 13 \text{ \AA}$ 、 $c = 53 \pm 5 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、および $\beta = 113 \pm 11^\circ$ であり、
 - (b) 空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a = 59 \pm 6 \text{ \AA}$ 、 $b = 74 \pm 7 \text{ \AA}$ 、 $c = 126 \pm 13 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であり、
 - (c) 空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a = 87 \pm 9 \text{ \AA}$ 、 $b = 160 \pm 16 \text{ \AA}$ 、 $c = 183 \pm 18 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であり、
 - (d) 空間群が $I222$ であり、単位格子定数が $a = 117 \pm 12 \text{ \AA}$ 、 $b = 187 \pm 19 \text{ \AA}$ 、 $c = 215 \pm 22 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であり、
 - (e) 空間群が $C222_1$ であり、単位格子定数が $a = 59 \pm 6 \text{ \AA}$ 、 $b = 85 \pm 9 \text{ \AA}$ 、 $c = 126 \pm 13 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ である。
- [5] (a) 空間群が $P2_1$ であり、単位格子定数が $a = 50 \pm 5 \text{ \AA}$ 、 $b = 126 \pm 13 \text{ \AA}$ 、 $c = 53 \pm 5 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、および $\beta = 113 \pm 11^\circ$ である、請求項4に記載の結晶。
- [6] (b) 空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a = 59 \pm 6 \text{ \AA}$ 、 $b = 74 \pm 7 \text{ \AA}$ 、 $c = 126 \pm 13 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ である、請求項4に記載の結晶。
- [7] (c) 空間群が $P2_1 2_1 2_1$ であり、単位格子定数が $a = 87 \pm 9 \text{ \AA}$ 、 $b = 160 \pm 16 \text{ \AA}$ 、 $c = 183 \pm 18 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ である、請求項4に記載の結晶。
- [8] (d) 空間群が $I222$ であり、単位格子定数が $a = 117 \pm 12 \text{ \AA}$ 、 $b = 187 \pm 19 \text{ \AA}$ 、 $c = 215 \pm 22 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ である、請求項4に記載の結晶。
- [9] (e) 空間群が $C222_1$ であり、単位格子定数が $a = 59 \pm 6 \text{ \AA}$ 、 $b = 85 \pm 9 \text{ \AA}$ 、 $c = 126 \pm 13 \text{ \AA}$ 、および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ である、請求項4に記載の結晶。

- [10] FabKが、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) または肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae) 由来のものである、請求項4～9のいずれか一項に記載の結晶。
- [11] FabKが配列番号1～4のいずれかひとつのアミノ酸配列を有するタンパク質である、請求項4～9に記載の結晶。
- [12] 結晶を構成するタンパク質中の少なくとも一つのメチオニン残基がセレノメチオニンに置換されたものである、請求項1に記載の結晶。
- [13] 少なくとも2. 2 Åの分解能までX線回折する、請求項1に記載の結晶。
- [14] エノイル—アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) 溶液に沈殿剤を添加し、蒸気拡散法により結晶化することを特徴とする、エノイル—アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶の製造方法。
- [15] 前記沈殿剤がアンモニウム塩を含有するものである、請求項14に記載の製造方法。
- [16] 前記アンモニウム塩として、塩化アンモニウムまたは酢酸アンモニウムのいずれか一つまたは両方を含有する、請求項15に記載の製造方法。
- [17] 前記沈殿剤がポリエチレングリコールを含有するものである、請求項14に記載の製造方法。
- [18] 請求項14～17のいずれか一項に記載の製造方法により製造された、エノイル—アシルキャリアプロテインレダクターゼ (FabK) の結晶。
- [19] 結晶構造情報を取得するための、請求項1に記載の結晶の使用。
- [20] 前記結晶構造情報の取得が、分子置換法、重原子同型置換法、または多波長異常分散法により行われる、請求項19に記載の結晶の使用。

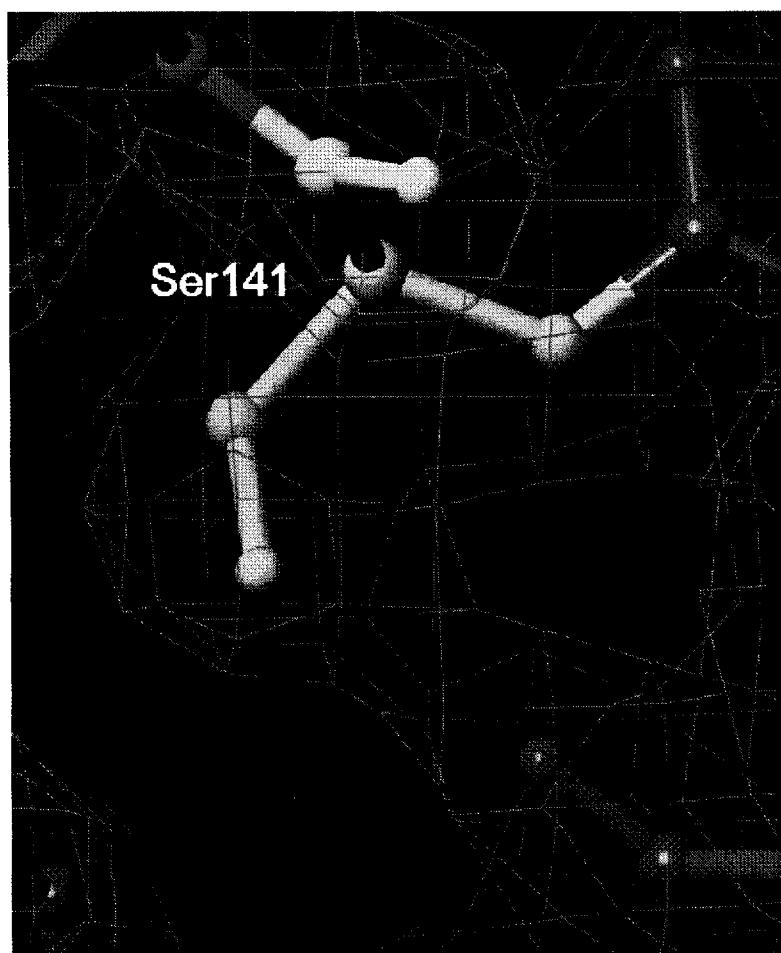
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K1/00(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N23/20(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K1/00, C12N9/02, C12N15/09, G01N23/20

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Marrakchi H et al, Mechanistic diversity and regulation of TypeII fatty acid synthesis., Biochemical Society Transactions, 2002, Vol. 30, No. 6, p.1050-1055	1-20
Y	JP 2005-058223 A (Riken, Japan), 10 March, 2005 (10.03.05), (Family: none)	1-20
Y	WO 2003/066677 A1 (Japan Science and Technology Agency), 14 August, 2003 (14.08.03), & AU 2002/338064 A1 & CA 2476006 A1 & EP 1479693 A1 & US 2007/032637 A1	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April, 2007 (24.04.07)

Date of mailing of the international search report

01 May, 2007 (01.05.07)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051518

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Payne D J et al, Discovery of a novel and potent class of FabI-directed antibacterial agents., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, Vol. 46, No. 10, p. 3118-3124	1-20
A	Stewart M J et al, Structural basis and mechanism of enoylreductase inhibition by triclosan., J Mol Biol, 1999, Vol.290, No.4, p.859-865	1-20
P,X	Oliveira J S et al, Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP (CoA) reductase enzymes from Mycobacterium tuberculosis., J Mol Biol, 2006.06., Vol.359, No.3, p.646-666	1-20
P,X	Saito J et al, Crystal structure of Streptococcus pneumoniae enoyl-acyl carrier protein reductase (FabK)., Seikagaku, 2006.06, Shoroku, CD Page.A12389(4P-B-028)	1-20

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C07K1/00(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N23/20(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C07K1/00, C12N9/02, C12N15/09, G01N23/20			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 7 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 7 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 7 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	Marrakchi H et al, Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis., Biochemical Society Transactions, 2002, Vol. 30, No. 6, p.1050-1055	1-20	
Y	JP 2005-058223 A （独立行政法人理化学研究所）2005.03.10 ファミリーなし	1-20	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 2 4 . 0 4 . 2 0 0 7		国際調査報告の発送日 0 1 . 0 5 . 2 0 0 7	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9 7 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2003/066677 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2003.08.14 & AU 2002/338064 A1 & CA 2476006 A1 & EP 1479693 A1 & US 2007/032637 A1	1-20
A	Payne D J et al, Discovery of a novel and potent class of FabI-directed antibacterial agents. ,Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, Vol. 46, No. 10, p. 3118-3124	1-20
A	Stewart M J et al, Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan., J Mol Biol, 1999 ,Vol.290, No.4, p. 859-865	1-20
P, X	Oliveira J S et al, Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP (CoA) reductase enzymes from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ., J Mol Biol, 2006.06., Vol.359, No. 3, p. 646-666	1-20
P, X	Saito J et al, Crystal structure of <i>Streptococcus pneumoniae</i> enoyl-acyl carrier protein reductase (FabK)., 生化学, 2006.06, 抄録 CD Page. A12389 (4P-B-028)	1-20