

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5558356号  
(P5558356)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月13日(2014.6.13)

(51) Int.Cl.

F 1

|               |           |               |         |
|---------------|-----------|---------------|---------|
| C 12 N 15/09  | (2006.01) | C 12 N 15/00  | Z N A A |
| C 07 K 14/195 | (2006.01) | C 07 K 14/195 |         |
| C 12 N 1/21   | (2006.01) | C 12 N 1/21   |         |
| C 07 K 19/00  | (2006.01) | C 07 K 19/00  |         |

請求項の数 17 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2010-526839 (P2010-526839)  
 (86) (22) 出願日 平成20年9月25日 (2008.9.25)  
 (65) 公表番号 特表2010-539926 (P2010-539926A)  
 (43) 公表日 平成22年12月24日 (2010.12.24)  
 (86) 國際出願番号 PCT/NZ2008/000247  
 (87) 國際公開番号 WO2009/041830  
 (87) 國際公開日 平成21年4月2日 (2009.4.2)  
 審査請求日 平成23年9月21日 (2011.9.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/975,104  
 (32) 優先日 平成19年9月25日 (2007.9.25)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/989,840  
 (32) 優先日 平成19年11月22日 (2007.11.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 510082949  
 パストラル グリーンハウス ガス リサ  
 チ リミテッド  
 ニュージーランド 6011 ウエリント  
 ン ザ テラス 113-119 レベル  
 13  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100126505  
 弁理士 佐貫 伸一  
 (74) 代理人 100131392  
 弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】微生物細胞のための細胞透過性ペプチドおよびポリペプチド

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下のa)を含む、単離されたポリペプチドまたはペプチド：

a) 配列番号117、118または119のアミノ酸配列。

## 【請求項2】

以下のa)~c)のいずれかを含み、メタノブレビバクター・ルミナンチウム(*Methanobrevibacter ruminantium*)のM1<sup>T</sup>株(DSM1093)を透過性にする、単離されたポリペプチドまたはペプチド：

a) 配列番号117と少なくとも90%の同一性を共有するアミノ酸配列、

b) 配列番号118と少なくとも95%の同一性を共有するアミノ酸配列、

c) 配列番号119と少なくとも90%の同一性を共有するアミノ酸配列。

10

## 【請求項3】

以下のa)~b)のいずれかを含み、M.ルミナンチウムのM1<sup>T</sup>株(DSM1093)を透過性にする、単離されたポリペプチドまたはペプチド：

a) 配列番号117または118の少なくとも15個連続するアミノ酸、

b) 配列番号119の少なくとも15個連続するアミノ酸。

## 【請求項4】

以下のa)~e)のいずれかを含む、単離されたポリヌクレオチド：

a) 配列番号117、118、および119から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列、

20

b ) 配列番号 117 と少なくとも 90 % の同一性を共有するアミノ酸配列からなり、M. ルミナンチウムの M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) を透過性にするポリペプチドをコードする核酸配列、

c ) 配列番号 118 と少なくとも 95 % の同一性を共有するアミノ酸配列からなり、M. ルミナンチウムの M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) を透過性にするポリペプチドをコードする核酸配列、

d ) 配列番号 119 と少なくとも 90 % の同一性を共有するアミノ酸配列からなり、M. ルミナンチウムの M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) を透過性にするポリペプチドをコードする核酸配列、

e ) 前記 a ) ~ d ) のいずれかと相補的な核酸配列。 10

【請求項 5】

以下の a ) ~ c ) のいずれかを含む、単離されたポリヌクレオチド：

a ) 配列番号 117 または 118 の少なくとも 15 個連続するアミノ酸からなり、M. ルミナンチウムの M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) を透過性にするポリペプチドをコードする核酸配列、

b ) 配列番号 119 の少なくとも 15 個連続するアミノ酸からなり、M. ルミナンチウムの M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) を透過性にするポリペプチドをコードする核酸配列、

c ) 前記 a ) ~ b ) のいずれかと相補的な核酸配列。

【請求項 6】

以下の a ) を含む、単離されたポリヌクレオチド： 20

a ) 配列番号 511、512 および 513 から選択される核酸配列、又はこれに相補的な核酸配列。

【請求項 7】

請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8】

以下の a ) ~ c ) のいずれかのホスト細胞：

a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸配列を含むように遺伝的に改変されたホスト細胞、

b ) 請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むように遺伝的に改変されたホスト細胞。 30

c ) 請求項 7 に記載のベクターを含むホスト細胞。

【請求項 9】

原核生物またはメタン生成菌である、請求項 8 に記載のホスト細胞。

【請求項 10】

大腸菌 (Escherichia coli) 、またはメタノブレビバクター・ルミナンチウム (Methanobrevibacter ruminantium) の M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) を含むメタノブレビバクター・ルミナンチウム (Methanobrevibacter ruminantium) である、請求項 9 に記載のホスト細胞。

【請求項 11】

以下の a ) または b ) を含む、抱合体分子または融合体分子： 40

a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたはペプチド、

b ) 請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたはペプチドを含む抱合体分子または融合体分子であって、メタン生成化合物、抗体もしくは抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、または抗生剤をさらに含む、抱合体分子または融合体分子。

【請求項 13】

微生物細胞を透過処理する方法であって、

a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたはペプチドを提供すること、および

b ) 該細胞を該ポリペプチドまたはペプチドに接触させることを含む方法。

【請求項 14】

微生物細胞を透過処理する方法であって、

a ) 請求項 11 または 12 に記載の抱合体分子または融合体分子を提供すること、および  
b ) 該細胞を該抱合体分子または融合体分子に接触させることを含む方法。

【請求項 15】

前記細胞がメタン生成菌である、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記細胞がメタノブレビバクター・ルミナンチウム (*Methanobrevibacter ruminantium*)  
である、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記細胞がメタノブレビバクター・ルミナンチウム (*Methanobrevibacter ruminantium*)  
の M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) である、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2007年9月25日に提出した米国特許出願第 60/975,104 号、  
2007年11月22日に提出した米国特許出願第 60/989,840 号、および 20  
07年11月22日に提出した米国特許出願第 60/989,841 号の利益を主張する  
ものであり、これら全ての出願内容はその全体が参照によりここに取り込まれる。

20

【0002】

本発明は、抑制性分子を微生物細胞、特にメタン生成菌細胞へ送達するための組成物  
および方法に関する。特に本発明は、これらのペプチドを含むシグナルペプチドおよびポリ  
ペプチド、同様にこれらのペプチドおよびポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに  
に関する。本発明はまた、これらのペプチドまたはポリペプチドを産生するための発現ベク  
ターおよびホスト細胞にも関する。本発明はさらに、開示されるペプチドまたはポリペ  
プチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、およびホスト細胞を用いて、微生物細胞、特に  
メタン生成菌細胞を検出、標的化、透過処理、および抑制するための方法に関する。

【背景技術】

30

【0003】

ニュージーランドにおいては、農業活動が温室効果ガス排出の大部分を占める。従って  
農業による温室効果ガス排出を減少させることは、京都議定書によるニュージーランドの  
義務に応じるため重要である。この議定書は、最初の公約期間 (2008~2012) の  
終了までに温室効果ガスを 1990 年のレベルにまで減少させることを要求している。こ  
のため農業部門集団およびニュージーランド政府は、ニュージーランドの農業温室効果ガ  
ス排出を減少させる方法を同定するため、牧畜温室効果ガス研究コンソーシアム (PGG  
RC) を設立した。

【0004】

PGGRC 活動の重要な部分は、ニュージーランドで放牧される反すう動物からのメタ  
ン排出減少に対して研究を進めてきた。反すう動物からのメタン排出を軽減することにつ  
いては、二つの理由から商業的に関心を持たれている。第一は、京都議定書による確約に  
応じないことは、政府にカーボン・クレジットの購入を強制することであり、現在のところ  
これは 3 億 5 千万ドルになると推定される。第二は、メタン生成は反すう胃において産  
生される総エネルギーの 8~12% の損失をもたらすことである。反すう動物の生産性を  
改善する代わりにこのエネルギーを使用することが可能であるかもしれない。

40

【0005】

メタンは、古細菌 (Euryarchaeota) 界のユリ古細菌 (Archaea) 門の一部である、メタ  
ン生成菌と呼ばれる微生物により反すう胃において産生される。ほとんどのメタン生成菌  
は CO<sub>2</sub> および H<sub>2</sub> を唯一のエネルギー源として生育するが、あるものは生育のために酢酸

50

またはメチル化合物を使用できる。反すう胃には、メタン生成古細菌の幾つかの異なる属が存在するが、メタノブレビバクター (*Methanobrevibacter*) 属の種、特に *M. ruminantium* 、および *M. smithii* は、ニュージーランドの反すう動物における主なメタン生成菌であると考えられている。現在のところ *M. ruminantium* が、PGRCより助成金を得ているゲノム配列決定プロジェクトの課題である。このプロジェクトは反すう胃のメタン生成菌の最初のゲノム配列決定であり、メタン形成抑制の標的を発見するためのメタノブレビバクター生物学のより良い理解の確立を目的とする。

## 【0006】

反すう胃におけるメタン生成の減少には、メタン生成菌の抑制またはそれらのメタン生成経路の不活性化が要求される。メタン産生の抑制方法は、特定の抑制性分子をメタン生成菌細胞へ送達することである。これは例えば、抑制性分子を細胞透過性ペプチドへ共役することにより達成されてよい。微生物細胞内では、シグナルペプチドが細胞の内部から外部への細胞外タンパク質の移動を仲介しており、抑制性分子の輸送に適している。従って、メタン生成菌細胞を透過処理して抑制剤を送達できるシグナルペプチドの同定が有用であろう。

## 【0007】

シグナルペプチドまたはシグナル配列は、原核細胞および真核細胞から分泌される前駆体タンパク質に典型的に含まれる。シグナルペプチドは、前駆体の N - 末端における細胞透過処理のための伸張の一部である。シグナルペプチドの一次アミノ酸配列は、シグナルペプチダーゼの切断部位から離れて保存されてはいない (von Heijne, 1985)。しかしシグナルペプチドは構造類似性を共有している。シグナルペプチドは典型的に、1ないし5の陽性荷電 N - 末端アミノ酸残基 (n - 領域) とそれに続く 10ないし 15 の疎水性アミノ酸残基 (h - 領域) を含む。グリシンもしくはプロリン残基は通常疎水性ドメインの内部に位置し、スレオニンおよび / またはセリン残基は切断部位の近くに極性ドメイン (c - 領域) を形成する (Inouye and Halagoua, 1980; Vlasuk et al., 1983, von Heijne, 1985)。

## 【0008】

シグナルペプチド移動のループモデルが提案されており (Inouye et al., 1977; Inouye and Halagoua, 1980)、これによりシグナルペプチドの陽性に荷電した N - 末端は、陰性に荷電した細胞膜内部表面と相互作用する。疎水性ドメインは次に、ループ形成によって膜の疎水性脂質二重層内へ引き込まれる。このループは、最終的にシグナルペプチドの除去のためのシグナルペプチダーゼへ曝露される切断部位を含む。メタン形成を抑制または限定するバリアの一つは、抑制性化合物のメタン生成菌細胞内への送達能である。従って、細胞抑制剤の有用な担体として、細胞膜に付着かつ脂質二重層を横断して分子を輸送できるシグナルペプチドの同定が必要とされている。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0009】

【非特許文献 1】 Altermann E, Klaenhammer TR (2005) PathwayVoyager: pathway mapping using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. *BMC Genomics* 6:60-66.

【非特許文献 2】 Altermann, E., and T. R. Klaenhammer. 2003. GAMOLA: a new local solution for sequence annotation and analyzing draft and finished prokaryotic genomes. *Omics* 7:161-169.

【非特許文献 3】 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

【非特許文献 4】 Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43, 260-2

10

20

30

40

50

96.

- 【非特許文献 5】Baresi, L. and Bertani, G. 1984. Isolation of a bacteriophage for a methanogenic bacterium. In Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 133.
- 【非特許文献 6】Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.* 16(4):783-95.
- 【非特許文献 7】Bickle, T. A. and D. H. Kruger. 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* 57:434-450.
- 【非特許文献 8】Bult CJ, et al. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073. 10
- 【非特許文献 9】Coutinho PM1 Henrissat B (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In 'Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering' (Eds HJ Gilbert, G Davies, B Henrissat and B Svensson) pp. 3-12 (The Royal Society of Chemistry, Cambridge) (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>).
- 【非特許文献 10】Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Research* 27, 463-4641.
- 【非特許文献 11】Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. 20 07. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc.* 2(4):953-71.
- 【非特許文献 12】Fleischmann et al., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.
- 【非特許文献 13】Fricke WF, Seedorf H, Henne A, Kruer M, Liesegang H, Hedderich R, Gottschalk G, Thauer RK (2006) The genome sequence of *Methanospaera stadtmae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis. *Journal of Bacteriology* 188, 642-658.
- 【非特許文献 14】Galagan et al. 2002. The genome of *Methanospaera acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* 12:532-542. 30
- 【非特許文献 15】Godde JS, Bickerton A (2006) The repetitive DNA called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 62, 718-729.
- 【非特許文献 16】Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology* 1 :474-483
- 【非特許文献 17】Hamilton, P. T. and J. N. Reeve. 1985. Sequence divergence of an archaeabacterial gene cloned from a mesophilic and a thermophilic methanogen. *J. Mol. Evol.* 22:351-360.
- 【非特許文献 18】Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43, 1565-1575. 40
- 【非特許文献 19】Jansen R, van Embden JD1 Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS: A journal of integrative biology* 6, 23-33.
- 【非特許文献 20】Jensen, L. J., Friis, C. and Ussery, D. W. 1999 Three views of microbial genomes. *Res. Microbiol.* 150, 773-777.
- 【非特許文献 21】Joblin KN, Naylor GE, Williams AG (1990) Effect of *Methanobrevibacter smithii* on xylanolytic activity of anaerobic ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2287-2295. 50

- 【非特許文献 2 2】Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research* 32, D277-D280.
- 【非特許文献 2 3】Kiener, A., Konig, H., Winter, J. and Leisinger, T. 1987. Purification and use of *Methanobacterium wolfei* pseudomurein endopeptidase for lysis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* 169, 1010-1016.
- 【非特許文献 2 4】Knox, M. R. and Harris, J. E. 1986. Isolation and characterisation of a bacteriophage of *Methanobrevibacter smithii*. In Abstracts of the XIV International Congress on Microbiology. Manchester: International Union of Microbiological Societies.
- 【非特許文献 2 5】Kurtz S, Schleiermacher C (1999) REPuter: fast computation of maximal repeats in complete genomes. *Bioinformatics* 15, 426-427. 10
- 【非特許文献 2 7】Larkin, MA, Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGgettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilim, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-8.
- 【非特許文献 2 8】Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* 25, 955-964.
- 【非特許文献 2 9】Loenen, W. and N. Murray. 1986. Modification enhancement by restriction alleviation protein (Ra1) of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 190:1 20 1-22.
- 【非特許文献 3 0】Lucchini, S., F. Desiere, and H. Brussow. 1999. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *J. Virol.* 73:8647-8656.
- 【非特許文献 3 1】Luo, Y. N., Pfister, P., Leisinger, T. and Wasserfallen, A. 2002. Pseudomurein endopeptidases PeiW and PeiP, two moderately related members of a novel family of proteases produced in *Methanothermobacter* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 47-51.
- 【非特許文献 3 2】Makarova, K. S., Aravind, L. and Koonin, E. V. 1999. A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci.* 8, 1714-1719. 30
- 【非特許文献 3 3】Makarova KS, Grishin NV, Shabalina, SA, Wolf YI, Koonin EV (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct* 1:7-32.
- 【非特許文献 3 4】New Zealand Statistics 2005 ([www.stats.govt.nz](http://www.stats.govt.nz))
- 【非特許文献 3 5】New Zealand's Greenhouse Gas Inventory 1990 - 2004. The National Inventory Report and Common Reporting Format. (2006) Ministry for the Environment, hypertext transfer protocol://[www.mfe.govt.nz/publications/climate/nir-apr06/nir-apr06.pdf](http://www.mfe.govt.nz/publications/climate/nir-apr06/nir-apr06.pdf) 40
- 【非特許文献 3 6】Nielsen, H. Engelbrecht, J. Brunak S. and von Heijne, G. 1997 Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Eng.*, 10:1-6.
- 【非特許文献 3 7】Ono, M., Wada, Y., Wu, Y., Nemori, R., Jinbo, Y., Wang, H., Lo, K. M., Yamaguchi, N., Brunkhorst, B., Otomo, H. et al. (1997) FP-21399 blocks HIV envelope protein mediated membrane fusion and concentrates in lymph nodes. *Nat. Biotechnol.* 15, 343-348.
- 【非特許文献 3 8】Perez-Bercoff, A., Koch, J. and Burglin, T.R. 2006. LogoBar: bar graph visualization of protein logos with gaps. *Bioinformatics* 22(1):112-4.
- 【非特許文献 3 9】Rawlings, N. D., Morton, F. R. and Barrett, A. J. 2006. MEROPS 50

: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 34, D270-D272.

【非特許文献 4 0】 Reeve JN, Nolling J, Morgan RM, Smith DR (1997) Methanogenesis: genes, genomes and who's on first? *Journal of Bacteriology* 179, 5975-5986.

【非特許文献 4 1】 Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JI (2007) Genomic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 10643-10648.

【非特許文献 4 2】 Salzberg et al., 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* 26:544-8.

【非特許文献 4 3】 Smith et al., 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* m deltaH: functional analysis and comparative genomics *J. Bacteriol.* 179:7135-7155.

【非特許文献 4 4】 Smith PH, Hungate RE (1958) Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* n. sp. *Journal of Bacteriology* 75, 713-718.

【非特許文献 4 5】 Staden R, Beal KF, Bonfield JK (1998) The Staden Package. *Methods in Molecular Biology: Bioinformatics Methods and Protocols* 132, 115-130.

【非特許文献 4 6】 Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes *Nucleic Acids Research* 29, 22-28.

【非特許文献 4 7】 von Heijne, G. 1985. Signal sequences: The limits of variation *J. Mol. Biol.* 184, 99-105.

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は配列番号 1 ~ 172 から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む、単離されたシグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドを特徴とする。特定の態様によれば該ペプチドまたはポリペプチドは、配列番号 117 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列 K K L I I I L L L I L L L S I 、または配列番号 119 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列 K K I I I I L L L I L L L I S I を含む。別の態様によれば、該ペプチドまたはポリペプチドは、例えば配列番号 117 のアミノ酸 3 ~ 14、3 ~ 16、もしくは 2 ~ 16 を含む少なくとも 1 つのアミノ酸配列、または配列番号 119 のアミノ酸 3 ~ 15、3 ~ 17、もしくは 2 ~ 17 を含む少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む断片、を含む。さらなる態様によれば、該ペプチドまたはポリペプチドは、ここに開示される配列番号 1 ~ 172 の保存されたコア配列の少なくとも 1 つを含む断片、を含む。さらなる態様によれば、該ペプチドまたはポリペプチドは、配列番号 173 ~ 341 または配列番号 342 ~ 533 から成る群より選択されるポリヌクレオチドの少なくとも 1 つの断片によりコードされる。

#### 【0011】

本発明はまた、少なくとも 1 つのシグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドのコード配列を含む単離されたポリヌクレオチドも特徴とする。一態様によれば該ポリヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 172 から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列のコード配列を含む。特定の態様によれば該ポリヌクレオチドは、配列番号 117 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列 K K L I I I L L L I L L L S I のコード配列、または配列番号 119 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列 K K I I I I L L L I L L L I S I のコード配列を含む。別の態様によれば該ポリヌクレオチドはコード配列、例えば配列番号 117 のアミノ酸 3 ~ 14、3 ~ 16、もしくは 2 ~ 16 を含む少なくとも 1 つのアミノ酸配列のコード配列、または配列番号 119 のアミノ酸 3 ~ 15、3 ~ 17、もしくは 2 ~ 17 を含む少なくとも 1 つのアミノ酸配列のコード配列を含む断片、を含む。さらなる態様によれば該ポリヌクレオチドはコード配列、例えばここに開示される配列番号 1

10

20

30

40

50

~ 1 7 2 の保存されたコア配列の少なくとも 1 つをコードするヌクレオチド配列の断片を含む。

【 0 0 1 2 】

さらなる態様によれば本発明は、配列番号 1 7 3 ~ 3 4 1、または配列番号 3 4 2 ~ 5 3 3 から成る群より選択される核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを特徴とする。特定の態様によれば、該ポリヌクレオチドは、配列番号 5 3 1, 5 3 2、または 5 3 3 の核酸配列を含む。別の態様によれば該ポリヌクレオチドは、例えば配列番号 5 3 1, 5 3 2、または 5 3 3 のヌクレオチド 7 ~ 4 2、7 ~ 4 8、もしくは 4 ~ 4 8 から伸長する核酸配列を含む断片またはオリゴヌクレオチドである。さらに本発明は、配列番号 1 7 3 ~ 3 4 1、または配列番号 3 4 2 ~ 5 3 3 のいずれか 1 つの核酸配列とハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチドまたはその断片を包含する。本発明はさらに、シグナルペプチドもしくはこのペプチドを含むポリペプチドをコードするいずれか 1 つの核酸配列の相補体、逆相補体、逆配列、またはその断片を含む単離されたポリヌクレオチドを包含する。

【 0 0 1 3 】

本発明は、少なくとも 1 つのシグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドのコード配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターを特徴とする。一態様によれば、該発現ベクターは、配列番号 1 ~ 1 7 2 から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列のコード配列を含む。特定の態様によれば、該発現ベクターは、配列番号 1 1 7 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列 K K L I I I L L L I L L L S I のコード配列、または配列番号 1 1 9 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列 K K I I I I L L L I L L L I S I のコード配列を含む。別の態様によれば該発現ベクターは、配列番号 1 1 7 のアミノ酸 3 ~ 1 4、3 ~ 1 6、もしくは 2 ~ 1 6 から伸張する少なくとも 1 つのアミノ酸配列のコード配列、または配列番号 1 1 9 のアミノ酸 3 ~ 1 5、3 ~ 1 7、もしくは 2 ~ 1 7 を含む少なくとも 1 つのアミノ酸配列のコード配列を含む。さらに別の態様によれば、本発明はホスト細胞、例えば少なくとも 1 つの発現ベクターを含む微生物ホスト細胞を特徴とする。

【 0 0 1 4 】

本発明は特に、ここに開示されるペプチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドに向けた抗体を特徴とする。特定の態様によれば、該抗体は配列番号 1 ~ 1 7 2 から成る群より選択される少なくとも 1 つのシグナルペプチド配列もしくはその修飾された配列に向けられる。代替の態様によれば、該抗体はシグナルペプチド配列の少なくとも 1 つの断片、例えば配列番号 1 ~ 1 7 2 から成る群より選択される配列の保存されたコア配列に向けられる。さらなる態様によれば、該抗体は配列番号 1 ~ 1 7 2 のいずれか 1 つのシグナルペプチド配列を含むポリペプチドに結合する。代替の態様によれば該抗体は、配列番号 1 7 3 ~ 3 4 1 もしくは配列番号 3 4 2 ~ 5 3 3 から成る群より選択されるポリヌクレオチドの少なくとも 1 つの断片、またはその相補体またはその修飾された配列に向けられる。別の態様によれば、ここに詳述されるように該抗体は、少なくとも 1 種の細胞抑制剤、例えば抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、ならびにその他の抗生素との 1 つ以上の融合体または抱合体を含む。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、ここに述べられる生物学的に活性のある変化、断片、変異体、および誘導体を含む、改変されたシグナルペプチドおよびこれらのペプチドを含むポリペプチド、ならびにこれらのペプチドまたはポリペプチドへ向けられる抗体も特徴とする。これらの改変されたペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、同様に開示されるポリヌクレオチドの変化、断片、変異体、および誘導体、これらの核酸配列を含む発現ベクター、ならびにこれらのベクターを含むホスト細胞もまた特徴とする。特定の態様によれば、本発明の組成物および方法はこれらの改変されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは抗体、または対応する発現ベクターもしくはホスト細胞を用いる。特定の態

様によれば、ここに詳述されるようにペプチドもしくはポリペプチドは、少なくとも1種の細胞抑制剤、例えば抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、ならびにその他の抗生剤との融合体または抱合体として產生される。

#### 【0016】

加えて本発明は、単離されたシグナルペプチド（例えば配列番号1～172の少なくとも1つ、もしくはその修飾された配列）もしくはこのペプチドを含むポリペプチド、またはこのペプチドもしくはポリペプチドに向けられる抗体を含む組成物を特徴とする。単離されたポリヌクレオチド（例えば配列番号173～341もしくは配列番号342～533の少なくとも1つ、またはその相補体またはその修飾された配列）を含む組成物もまた特徴とする。さらに、本発明に従う、発現ベクターまたは発現ベクターを含むホスト細胞を含む組成物も特徴とする。該組成物はここに述べられる生物学的に活性のある変化、断片、変異体、および誘導体のいずれか1を含んでよい。該組成物はさらに少なくとも1種の細胞抑制剤を含んでよく、かつ例えば医薬組成物または食物サプリメント、特に反すう動物の飼料構成成分として処方されてよい。

#### 【0017】

特定の態様によれば本発明は、開示される方法に従い、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞を検出および/または測定、あるいは標的化、透過処理、および/または抑制するためのキットの一部としての本発明の組成物を特徴とする。該キットは、a)ここに提示される組成物の少なくとも1つ；およびb)必要に応じて、例えば細胞の標的化または透過処理、あるいはメタン生成菌もしくはその他の微生物の細胞生育または複製の抑制における使用のための説明書を含む。特定の態様によれば、ペプチドまたはポリペプチドは配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列、またはその修飾された配列を含む。

#### 【0018】

本発明は、シグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドを產生するための方法を特徴とし、該方法は、a)少なくとも1つのシグナルペプチドもしくはこのペプチドを含むポリペプチドのコード配列を含む発現ベクターまたは発現ベクターを含むホスト細胞を、ペプチドもしくはポリペプチドの発現に適切な条件下で培養すること；およびb)該培養からペプチドまたはポリペプチドを回収することを含む。開示される組成物の產生方法もまた特徴とされる。特定の態様によれば該ペプチドまたはポリペプチドは、配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列、またはその改変された配列を含む。

#### 【0019】

ここに詳述されるように本発明はまた、少なくとも1種の細胞抑制剤、例えば抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、ならびにその他の抗生剤との融合体または抱合体を含む、シグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドの產生方法も特徴とする。このような方法は、a)少なくとも1つのペプチドもしくはポリペプチドのコード配列を含む発現ベクターまたは発現ベクターを含むホスト細胞を、ペプチドもしくはポリペプチドの発現に適切な条件下で培養すること；b)融合体または抱合体を形成すること（例えば、融合配列の発現または細胞抑制剤に対する化学的抱合により）；およびc)該融合体または抱合体を回収することを含む。特定の態様によれば、該シグナルペプチドまたはポリペプチドは、配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列、またはその改変された配列を含む。

#### 【0020】

本発明は微生物細胞、特にメタン生成菌細胞の透過処理方法を特徴とし、該方法は、a)必要に応じて、少なくとも1つのシグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドを產生または単離すること；およびb)該細胞を該シグナルペプチドまたはポリペプチドに接触させることを含む。特定の態様によれば、該ペプチドまたはポリペプチドは、

10

20

30

40

50

配列番号 1 ~ 172 から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列、またはその改変配列を含む。さらなる態様によれば、ここに詳述されるように該ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも 1 種の細胞抑制剤、例えば 1 種以上の抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、またはその他の抗生剤との融合体または抱合体を含む。

【 0021 】

本発明はまた、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞の抑制（例えば生育または複製の抑制）方法も特徴とし、該方法は、a) 必要に応じて、少なくとも 1 種の細胞抑制剤をさらに含む、少なくとも 1 つのシグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドを產生または単離すること；および b) 該細胞を該シグナルペプチドまたはポリペプチドに接触させることを含む。特定の態様によれば、該ペプチドまたはポリペプチドは、配列番号 1 ~ 172 から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列、またはその改変配列を含む。さらなる態様によれば、ここに詳述されるように該細胞抑制剤は、抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、ならびにその他の抗生剤から選択される。

【 0022 】

本発明はまた、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞の抑制（例えば生育または複製の抑制）方法も特徴とし、該方法は、a) 必要に応じて、少なくとも 1 種の細胞抑制剤をさらに含む、少なくとも 1 つのシグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドを產生または単離すること；および b) 該細胞を該シグナルペプチドまたはポリペプチドに接触させることを含む。特定の態様によれば、該ペプチドまたはポリペプチドは、配列番号 1 ~ 172 から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列、またはその改変配列を含む。さらなる態様によれば、ここに詳述されるように該細胞抑制剤は、抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、ならびにその他の抗生剤から選択される。

【 0023 】

本発明はまた、シグナルペプチドまたは対応するポリペプチドもしくはポリヌクレオチドのレベルを検出および／または測定するための方法も特徴とし、該方法は、1) 被験体由来のサンプルをシグナルペプチド（例えば、配列番号 1 ~ 172 の少なくとも 1 つ、またはその改変配列）、または対応するポリペプチドもしくはポリヌクレオチドに向けた抗体と接触させること；および 2) サンプル中でシグナルペプチド、または対応するポリペプチドもしくはポリヌクレオチドと形成された免疫複合体の存在またはレベルを決定することを含む。このような方法はまた、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞のレベルを検出および／または測定するためにも使用できる。

【 0024 】

同様に本発明は、シグナル配列ポリヌクレオチド（例えばシグナルペプチドコード配列、または対応するポリペプチドコード配列）のレベルを検出および／または測定する方法も特徴とし、該方法は、1) 被験体由来のサンプルを相補的ポリヌクレオチド（例えば、配列番号 173 ~ 341 のいずれか 1 、またはその改変配列に相補的な配列）と接触させること；および 2) サンプル中でシグナル配列ポリヌクレオチドと形成されたハイブリダイゼーション複合体の存在またはレベルを決定することを含む。このような方法はまた、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞のレベルを検出および／または測定するためにも使用できる。

【 0025 】

特定の態様によれば、本発明の方法は *in vivo* または *in vitro* 発現構成成分を利用する。その他の態様によれば、該方法は、組み換え、合成、もしくは半合成の方法により產生されるペプチドもしくはポリペプチド、または内在性の方法により產生されるペプチドもしくはポリペプチドを用いる。

【 0026 】

本発明のその他の態様および実施形態を以下に述べる。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0027】

本発明をその特定の実施形態への参照および図面への参照と共に記述する。

## 【0028】

【図1A】メタノバクテリウム目 (Methanobacteriales) のゲノムの比較を示した図である。

【図1B】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) のゲノムの統計 (図1B) を示した図である。

【図1C】メタノバクテリウム目の種におけるメタン生成への関与が予測される遺伝子を示した図である。

【図2-1】メタノブレビバクター・ルミナンチウム (Methanobrevibacter ruminantium) シグナルペプチドアラインメントを示した図である。各ペプチドの保存されたコア領域を太字で示す。

【図2-2】メタノブレビバクター・ルミナンチウム (Methanobrevibacter ruminantium) シグナルペプチドアラインメントを示した図である。各ペプチドの保存されたコア領域を太字で示す。

【図2-3】メタノブレビバクター・ルミナンチウム (Methanobrevibacter ruminantium) シグナルペプチドアラインメントを示した図である。各ペプチドの保存されたコア領域を太字で示す。

【図3A】LogoBarを用いて作られた102配列のタンパク質配列ロゴを示した図である。

【図3B】最も保存されたアミノ酸残基を示す、LogoBarを用いて作られた102配列のタンパク質配列ロゴを示した図である。

【図3C】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) のコアコンセンサスシグナルペプチド配列を示した図である。

【図3D】N-末端リジンフルオレセインを付加したM.ルミナンチウム (M. ruminantium) 細胞透過性ペプチドのアミノ酸配列を示した図である。

【図4】フルオレセイン標識ペプチドによるM.ルミナンチウム (M. ruminantium) 細胞の透過性を示した図である。

【図5】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) シグナルM 1 0 9 3 o r f e o m eの三つの異なるモデルを用いた、SignalP 3.0-HMMのシグナルペプチド予測を示すベン図を示した図である。

【図6-1】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドスコアを示した図である。

【図6-2】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドスコアを示した図である。

【図6-3】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドスコアを示した図である。

【図6-4】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドスコアを示した図である。

【図7-1】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドを示した図である。

【図7-2】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドを示した図である。

【図7-3】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドを示した図である。

【図7-4】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドを示した図である。

【図7-5】M.ルミナンチウム (M. ruminantium) 遺伝子および対応するシグナルペプチドを示した図である。

10

20

30

40

50

【図7-6】M.ルミナンチウム(*M. ruminantium*)遺伝子および対応するシグナルペプチドを示した図である。

【図8-1】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-2】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-3】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-4】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-5】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-6】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-7】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図8-8】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を示した図である。

【図9-1】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-2】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-3】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-4】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-5】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-6】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-7】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【図9-8】図7に示すシグナルペプチドのコード配列を、大腸菌(*E. coli*)での発現のために最適化されたコドンと共に示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

定義

ここで用いられる、シグナルペプチドをコードする「変化した」核酸配列は、同じかまたは機能的に同等なペプチドをコードするポリヌクレオチドをもたらす、異なるヌクレオチドの欠失、挿入、または置換による核酸配列を含む。コードされるペプチドもまた「変化」してよく、サイレント変化を生じて機能的に同等なペプチドをもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を含む。意図されたアミノ酸置換が、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性性質の類似性に基づき、生物学的活性(例えば細胞結合もしくは細胞透過処理)またはペプチドの免疫原性活性を保持する限りにおいて行なわれてよい。例えば陰性荷電アミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含んでよく；陽性荷電アミノ酸はリジンおよびアルギニンを含んでよく；類似の親水性値を有する非荷電の極性頭部基をもつアミノ酸はロイシン、イソロイシン、およびバリン、グリシンおよびアラニン、アスパラギンおよびグルタミン、セリンおよびスレオニン、ならびにフェニルアラニンおよびチロシンを含んでよい。

【0030】

ここで用いられる「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列、およびそれらの断片を意味し、かつ天然発生、組み換え、合成、または半合成分子を意味する。本発明の配列(例えば配列番号1~172)は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、15、17、19、または22アミノ酸、好ましくは少なくとも5から10、5から15、10から15、12から15、15から17、17から19、または17から22アミノ酸を含み、かつ好ましくは本来の配列の生物学的活性(例えば細胞結合もしくは細胞透過処理)または免疫学的活性(例えば少なくと

10

20

30

40

50

も1つの抗体結合部位)を保持する。ここに列挙される「アミノ酸配列」が、天然発生ペプチドまたはポリペプチド分子のアミノ酸配列、アミノ酸配列、および類似語を意味するとき、これはアミノ酸配列を完全長分子に付随する完全な天然アミノ酸配列に限定することを意味するものではない。

【0031】

ここで用いられる「増幅」は、核酸配列の追加コピーの產生を意味し、一般には公知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて行われる(Dieffenbach, C. W. and G. S. Dveksler (1995) PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY)。

【0032】

「抗体」という用語は可能な意味の最も広い範囲において理解されなければならず、かつ未変化のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含むことが意図される。抗体の断片および誘導体もまた、それらが望まれる生物学的活性を示す限りにおいて網羅されることが意図される。抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン(Ig)分子の免疫学的活性部位、すなわち抗原に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含む分子を包含する。限定はされないが、これらはポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fc、Fab、Fab'、およびFab<sub>2</sub>断片、ならびにFab発現ライブリーアイを含む。

【0033】

抗体分子は、分子内に存在する重鎖の性質によって互いに異なる、IgG、IgM、IgA、IgE、およびIgDのクラスのいずれかに関連する。同様に、これらはサブクラス、例えばIgG1、IgG2、およびその他を含む。軽鎖はカッパ鎖またはラムダ鎖であってよい。ここでの抗体への参照は、全てのクラス、サブクラス、および型への参照を含む。例えば、1種以上の源、例えばマウス、ヒト、もしくは反する動物の配列のうち1つ以上に対して特異的であるモノクローナル抗体またはその断片であるキメラ抗体もまた含まれる。さらに、ラクダ科の動物の抗体またはナノボディーも含まれる。ここで、「抗体」またはいずれの類似語へのそれぞれの参照は、未変化の抗体、同様に断片、変化、誘導体、またはそれらの変異体のいずれも含むことが理解されるであろう。

【0034】

ここで用いられる「生物学的に活性のある」または「機能的」という用語は、天然発生配列の構造的、免疫的、もしくは生化学的機能(例えば細胞結合もしくは細胞透過処理)の1つ以上を保持するペプチドまたはポリペプチドを意味する。一例として、機能的配列はここに開示される少なくとも1つのコア保存領域を含んでよい。

【0035】

ここで用いられる「細胞抑制剤」または「抑制剤」という用語は、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞の生育もしくは複製を減少または遮断する薬剤を意味する。細胞抑制剤は、例えば細胞分裂を減少または遮断するために作用できる。抑制剤は、例えばDNA合成、RNA合成、タンパク質合成、もしくは翻訳後修飾を減少または遮断できる。抑制剤はまた、メタン生成経路に関与する酵素の活性を減少または遮断することもできる。抑制剤はまた、免疫システム構成成分による認識のために細胞を標的化することもできる。細胞の抑制はまた、例えば溶解、アポトーシス、壞死などによる細胞の死滅(cell killing)および細胞死(cell death)も含む。有用な抑制剤は、ここに詳述されるように抗メタン生成化合物(例えばプロモエタンスルホン酸)、抗体および抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、ならびにその他の抗生剤を含むが、これらに限定されない。

【0036】

ここで用いられる「相補的な」または「相補性」という用語は、許容される塩および温度条件下での塩基対によるポリヌクレオチドの自然結合を意味する。配列A-G-Tに対する相補的配列はT-C-A、逆相補体はA-C-T、および逆配列はT-G-Aである。二つの单鎖分子の間での相補性は、幾つかの核酸のみの結合においては部分的であってよく、また二つの单鎖分子の間に全て相補性が存在するときには完全であってよい。核酸

10

20

30

40

50

鎖の間での相補性の程度は、核酸鎖の間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意な効果をもつ。これは、核酸鎖間の結合に依存する増幅反応ならびにPNA分子の設計および使用において特に重要である。

【0037】

ここで用いられる「誘導体」という用語は、シグナルペプチドをコードする核酸、またはそれらに相補的な核酸の化学的修飾を意味する。このような修飾は例えば、水素のアルキル、アシル、またはアミノ基による置換を含む。好ましい態様によれば核酸誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を保持するペプチドをコードする。誘導体ペプチドはグリコシル化、ペグ化により、あるいはそれが由来する配列の生物学的活性（例えば細胞結合もしくは細胞透過処理）の1つ以上、または免疫原性機能を保持する同様の過程により修飾されたものである。

10

【0038】

ここで用いられる「相同性」という用語は、相補性の程度を意味する。部分的相同性（すなわち100%同一性未満）、または完全相同性（すなわち100%同一性）があつてよい。標的核酸へのハイブリダイズから、同一配列を少なくとも部分的に抑制する部分的相補配列には、機能的用語である「実質的に相同」の使用が適用される。標的配列への完全に相補的な配列のハイブリダイゼーションの抑制は、低ストリンジエンシー条件下でのハイブリダイゼーションアッセイ（例えばサザンもしくはノーザンプロット、溶液ハイブリダイゼーションなど）を用いて試験されてよい。実質的に相同な配列もしくはハイブリダイゼーションプローブは、低ストリンジエンシー条件下における完全相同配列の標的配列への結合に競合、および該結合を抑制し得る。これは低ストリンジエンシー条件が非特異結合を許容するということ；低ストリンジエンシー条件は二つの配列の互いの結合が特異的（すなわち選択的）相互作用であることを要求すると述べるものではない。

20

【0039】

ここで用いられる「ハイブリダイゼーション」という用語は、核酸の鎖が塩基対を通して相補鎖に結合することによるいずれの過程も意味する。

【0040】

ここで用いられる「挿入」または「付加」という用語は、天然発生分子に比較したアミノ酸残基またはヌクレオチドのそれぞれ1つ以上の追加をもたらす、アミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を意味する。

30

【0041】

ここで用いられる「メタン生成菌」は、メタンガスを産生する微生物を意味し、メタノブレビバクター (*Methanobrevibacter*)、メタノサーモバクター (*Methanothermobacter*)、メタノミクロビウム (*Methanomicrobium*)、メタノバクテリウム (*Methanobacterium*)、およびメタノサルシナ (*Methanosarcina*) を含む。特定のメタン生成菌は、メタノブレビバクター・ルミナンチウム (*Methanobrevibacter ruminantium*)、メタノブレビバクター・スミシー (*Methanobrevibacter smithii*)、メタノブレビバクター・アシディデュランス (*Methanobrevibacter acidiurans*)、メタノブレビバクター・サウエリ (*Methanobrevibacter thaueri*)、メタノバクテリウム・ブライアンティイ (*Methanobacterium Bryantii*)、メタノバクテリウム・フォルミシカム (*Methanobacterium formicum*)、メタノサーモバクター・マーブルゲンシス (*Methanothermobacter marburgensis*)、メタノサーモバクター・ウォルフェイイ (*Methanothermobacter wolfeii*)、メタノスphaera・スタッドマナエ (*Methanospaera stadtmanae*)、メタノミクロビウム・モービレ (*Methanomicrobium mobile*)、メタノサルシナ・バーケリ (*Methanosarcina barkeri*)、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*)、メタノコッコイデス・ブルトンイイ (*Methanococcoides burtonii*)、およびメタノロブス・テイロリイ (*Methanolobus taylorii*) を含むがこれらに限定されない。全てのメタン生成菌の属および種はこの用語により包含される。

40

【0042】

ここで用いられる「微生物」細胞は、天然発生または遺伝的に改変された微生物細胞を

50

意味し、メタン生成菌、好塩菌、および好熱好酸菌のような古細菌、ならびにシアノバクテリア、スピロヘータ、プロテオバクテリア、同様にグラム陽性およびグラム陰性菌のような真正細菌を含む。

【0043】

「改変された」という用語は、ここに述べられるような、変化した配列、ならびに配列断片、変異体、および誘導体を意味する。

【0044】

ここで用いられる「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、もしくはそれらの断片の配列、ならびに単鎖もしくは二重鎖であつてよい天然、組み換え、合成、もしくは半合成起源の、センス鎖もしくはアンチセンス鎖および翻訳領域もしくは非翻訳領域を表してよい、DNAまたはRNAを意味する。本発明の配列は、最も好ましくはポリペプチドコード配列（例えば配列番号173～341もしくは配列番号342～533、またはその相補体またはその修飾された配列）を含み、該配列は少なくとも15、18、21、24、27、30、33、36、39、45、51、57、もしくは66ヌクレオチド、好ましくは少なくとも15から30、15から45、30から45、36から45、45から51、51から57、もしくは51から66ヌクレオチド、または少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも1000ヌクレオチドを含む。ここで「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」への各参照は、天然の完全長配列（例えば配列番号173～341または配列番号342～533）、同様にそのいずれの相補体、断片、変化、誘導体、または変異体も含み得ることが理解されるであろう。

10

【0045】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、PCR增幅、配列決定、またはハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用できる、少なくとも6、8、10、12、15、18、21、25、27、30、もしくは36ヌクレオチド、または少なくとも12から36ヌクレオチド、または少なくとも15から30ヌクレオチド（例えば配列番号173～341もしくは342～533の少なくとも1つの断片またはその相補体）を含む核酸配列を意味する。ここで用いられるオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において一般に定義される「アンプライマー」、「プライマー」、「オリゴマー」、「オリゴ」、および「プローブ」の語に実質的に同等である。

20

【0046】

「ポリヌクレオチド」という用語が単数もしくは複数で用いられるとき、一般にいずれの核酸配列、例えば、未改変のRNAもしくはDNAまたは改変RNAもしくはDNAであつてよい、いずれのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをも意味する。これは単鎖および二重鎖DNA、単鎖および二重鎖領域を含むDNA、単鎖および二重鎖RNA、ならびに単鎖および二重鎖領域を含むRNA、単鎖もしくはより典型的には二重鎖でもよく、または単鎖および二重鎖領域を含んでよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含むが、これらに限定されない。RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三重鎖領域もまた含まれる。特にmRNA、cDNA、およびゲノムDNA、ならびにそれらのいずれの断片も含まれる。この用語は1つ以上の改変された塩基、例えばトリチウム標識された塩基、またはイノシンのような独特な塩基を含む、DNAおよびRNAを含む。本発明のポリヌクレオチドはコード配列もしくは非コード配列、またはセンスもしくはアンチセンス配列、またはsiRNAのようなiRNAを包含できる。ここで「ポリヌクレオチド」または類似語への各参照は、完全長配列、同様にそのいずれの相補体、断片、変化、誘導体、もしくは変異体も含み得ることが理解されるであろう。

40

【0047】

ここで用いられる「ペプチド核酸」または「PNA」は、ペプチド骨格を通して連結する塩基を含むアンチセンス分子または抗遺伝子薬剤を意味する。

【0048】

50

ここで用いられる「反すう動物」という用語は、特別な型の消化器官として反すう胃をもつ動物を意味する。反すう動物はウシ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、ヘラジカ、アンテロープ、カリブー、およびシカを含むがこれらに限定されない。

【0049】

ここで用いられる「シグナルペプチド」は、天然、合成、半合成、または組み換えを問わないので、その源由来の、いずれの種、好ましくは微生物から得られた、本発明の単離されたペプチドを意味する。特にシグナルペプチドは、メタン生成菌細胞、例えばメタノブレビバクター (*Methanobrevibacter*) 細胞、特に *M. ruminantium* 、または *M. smithii* 細胞から得ることができる。組み換え産生のために、本発明のシグナルペプチドは微生物または真核細胞、例えばエシェリヒア属 (*Escherichia*) 、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) 、バチルス属 (*Bacillus*) 、サルモネラ属 (*Salmonella*) 、酵母、ショウジョウバエ (*Drosophila*) のような昆虫細胞、COS および CHO 細胞のような動物細胞、または植物細胞から得ることができる。ここで「ペプチド」への各参照は、完全長配列 (例えば配列番号 1 ~ 172) 、同様にそのいずれの変化、断片、誘導体、または変異体も含み得ることが理解されるであろう。

【0050】

ここで用いられる「ストリンジエントな条件」または「ストリンジエンシー」という用語は、核酸、塩、および温度によって規定されるハイブリダイゼーションの条件を意味する。これらの条件は当該技術分野において公知であり、同一または関連ポリヌクレオチド配列を同定または検出するために変更されてよい。例えば、Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, および Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY. を参照のこと。低または高ストリンジエンシーのいずれかを含む多数の同等な条件は、配列 (DNA、RNA、塩基組成物) の長さおよび性質、標的 (DNA、RNA、塩基組成物) の性質、環境 (溶液中または固体基質上での不動化) 、塩およびその他の構成成分 (例えばホルムアミド、硫酸デキストランおよび/またはポリエチレングリコール) の濃度、ならびに反応温度 (例えば、プローブの融解温度より約 5 度低い温度から、融解温度より約 20 度から 25 度低い温度の範囲内) のような因子に依存する。上に列挙した条件とは異なるが同等である、低または高ストリンジエンシーのいずれかの条件を作り出すため、1 つ以上の因子が変化させてよい。

【0051】

「被験体」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は鳥類および哺乳類、例えば反すう動物、ならびに特にマウス、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、牝ウシ、およびウマを含むがこれらに限定されない。

【0052】

ここで用いられる「実質的に精製された」または「単離された」という用語は、細胞、組み換え、もしくは合成環境から取り除かれ、かつ細胞、組み換え、もしくは合成環境において付随していたその他の構成成分を少なくとも 60% 含まない、好ましくは 75% 含まない、最も好ましくは少なくとも 90% 含まないかまたは少なくとも 99% 含まない、核酸またはアミノ酸配列を意味する。

【0053】

ここで定義される「形質転換」は、外来性 DNA が進入してレシピエント細胞を変化させることによる過程を表す。これは当該技術分野において公知の様々な方法を用い、自然もしくは人工的条件下で起こってよい。形質転換は、原核または真核細胞内に外来核酸配列を挿入するため、いずれの公知の方法にも依存してよい。方法は形質転換されるホスト細胞の型に基づいて選択され、ウィルス感染、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、および微粒子銃を含んでよいがこれらに限定されない。このような「形質転換された」細胞は、挿入された DNA が自己複製プラスミドとしてまたはホスト染色体の一部のいずれかとして複製できる、安定的に形質転換された細胞を含む。これらはまた、挿入された DNA または RNA を限られた期間に一過性に発現する細胞も含む。

## 【0054】

ここで用いられるペプチドまたはポリペプチドの「変異体」は、1つ以上のアミノ酸により変化させられたアミノ酸配列を意味する。変異体ポリヌクレオチドは1つ以上のヌクレオチドにより変化させられる。変異体は、例えばロイシンのイソロイシンによる置換のような、置換されたアミノ酸が類似の構造または化学特性を有する「保存的な」変化をもたらしてよい。さらにまれには、変異体は、例えばグリシンのトリプトファンによる置換のような「非保存的な」変化をもたらしてよい。類似の小さな変異体はアミノ酸欠失もしくは挿入、またはその両方もまた含んでよい。生物学的または免疫原性活性を無効にすることなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入、または欠失され得るかを決定するためのガイドンスは、当該技術分野において公知のコンピュータープログラム、例えばLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて見出されてよい。10

## 【0055】

本発明はまた、少なくとも1つの生物学的活性(例えば細胞結合もしくは細胞透過処理)またはペプチドもしくはポリペプチドの機能的活性を保持する変異体も包含する。好ましい変異体は、開示される配列に対して少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有するものである。最も好ましい変異体は、ここに開示される配列に対して少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%の配列同一性を有するものである。パーセンテージ同一性は、以下に述べるように二つの配列を比較するため整列させること、整列された部分における同一な残基の数を決定すること、この数を発明の(クエリー)配列内の全残基数で割ること、およびこの結果に100を掛けることにより決定される。有用なアライメントプログラムはAlignX(Vector NTI)である。20

## 【0056】

## 発明の説明

メタンは反すう動物の前腸内で、反すう胃システムにおける炭素の最終還元作用を行うメタン生成菌により產生される。多段階メタン生成経路は、主に非反すう胃メタン生成菌の研究によって十分に解明されているが、反すう胃においてメタン生成菌の生育および存続を可能にするための適応はよく理解されていない。メタノブレビバクター・ルミナンチウム(*Methanobrevibacter ruminantium*)は、ニュージーランドの反すう動物における有名なメタン生成菌である。ここに述べるように、*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)のドラフトゲノム配列は、約3.0 Mbのサイズおよび33.68%のGC含有量を示す。重要な発見として、*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)のゲノムは細胞の標的化および透過処理における使用のためのシグナルペプチド配列を含むことが見出された。30

本発明は従って、配列番号1~172を含むシグナルペプチド、同様にこれらのペプチドを含むポリペプチド、ならびにそれらの変化、断片、変異体、および誘導体を包含する。

## 【0057】

本発明は、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞を標的化および透過処理するためのこれらのペプチドまたはポリペプチドの使用を包含する。本発明はさらに、これらの細胞の生育または複製を抑制するためのペプチドまたはポリペプチドの使用を包含する。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、その生物学的活性を決定するため発現されてよく、かつ様々なアッセイにおいて使用されてよい。該ペプチドおよびポリペプチドは大量合成および単離手順、例えば商業的產生のために使用されてよい。このようなペプチドおよびポリペプチドは、抗体を產生するため、対応するアミノ酸を単離するため、および該アミノ酸配列のレベルを定量的に決定するために使用されてよい。40

## 【0058】

本発明のポリペプチドはまた、組成物、例えば医薬組成物、および食物サプリメント、例えば反すう動物の飼料構成成分としても使用されてよい。本発明のペプチドおよびポリペプチドはまた、健康上の効用も有する。例えば健康関連の態様によれば、メタン生成菌の抑制剤は、通常はメタンとして失われるエネルギーを被験体へ還元するために使用でき50

る。特定の態様によれば、徐放反すう胃装置が、本発明のペプチド、ポリペプチド、および組成物（例えば医薬組成物および食物サプリメント）と共に使用できる。

【0059】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、（a）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体を含むペプチドまたはポリペプチド；（b）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列の機能的ドメイン（例えばここに開示されるコア保存領域）、またはその変化、断片、変異体もしくは誘導体を含むペプチドまたはポリペプチド；および（c）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列の少なくとも1つの特定された数の近接残基、またはその変化、断片、変異体もしくは誘導体を含むペプチドまたはポリペプチドから成る群より選択される少なくとも1つの配列を含む。これらの配列の全ては、ここに本発明のペプチドおよびポリペプチドとして総称される。一実施形態によれば、本発明は配列番号1～172のうち少なくとも1つのアミノ酸配列を含む単離されたペプチドもしくはポリペプチドを包含する。

【0060】

本発明はまた、配列番号1～172のシグナルペプチドを含む少なくとも1つのシグナルペプチド、同様にこれらのペプチドを含むポリペプチド、およびそれらの変化、断片、変異体、または誘導体をコードするポリヌクレオチドも包含する。

【0061】

本発明は、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞を標的化および透過処理するための発現ベクターおよびホスト細胞の調製のためのこれらのポリヌクレオチドの使用を包含する。本発明はさらに、これらの細胞の生育または複製を抑制するためのポリヌクレオチドの使用を包含する。本発明の単離されたポリヌクレオチドは、多かれ少なかれ関連する細菌の遺伝子のゲノムマッピング、物理的マッピング、およびクローニングにおいても有用である。本発明のポリヌクレオチドを用いて設計されるプローブは、スロットプロット技術またはマイクロアレイ分析のような当該技術分野における公知の技術を用いて、十分に相同意的DNAおよびRNA配列を細胞内に有するいずれの生物の遺伝子の存在を検出、および発現パターンを試験するために用いられてよい。本発明のポリヌクレオチドを用いて設計されるプライマーは、配列決定およびPCR增幅に用いられてよい。

【0062】

本発明のポリヌクレオチドはまた、組成物、例えば医薬組成物、および食物サプリメント、例えば反すう動物の飼料構成成分としても使用されてよい。本発明のポリヌクレオチドはまた、健康上の効用も有する。このような効用のため、該ポリヌクレオチドは発現ベクターまたは発現ベクターを含むホスト細胞として提示できる。特定の態様によれば、徐放反すう胃装置が、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、ホスト細胞、および組成物（例えば医薬組成物および食物サプリメント）と共に使用できる。

【0063】

本発明のポリヌクレオチドは、（a）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列のコード配列を含む配列、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体；（b）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列のコード配列の相補体、逆配列、逆相補体、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体；（c）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列のコード配列に含まれる翻訳領域、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体；（d）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列のコード配列の機能的ドメイン（例えばここに開示されるコア保存領域）、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体；および（e）配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列のコード配列の少なくとも1つの特定された数の近接残基を含む配列、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体から成る群より選択される配列の少なくとも1つを含む。オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマーもまた提供される。これらのポリヌクレオチドプローブならびにオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドおよびプライマーの全ては、ここに本発明のポリヌクレオチドとして総称される。一実施形態によれば、本発明は配列番号1～172から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列のコード配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0064】

当業者は、遺伝コードの縮重の結果として、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列の多数、いずれの既知および天然発生遺伝子のヌクレオチド配列に最小の相同性を有する幾つか、が產生されてよいことが認識されるであろう。従って本発明は、可能なコドン選択に基づく組み合わせの選択によって作り出されてよいヌクレオチド配列の、可能なそれぞれおよび全ての変異体を意図する。これらの組み合わせは、天然発生アミノ酸配列に適用される標準的な三つ組の遺伝コードに従って作られ、かつこれら全ての変異体は具体的に開示されたものとみなされる。

10

#### 【0065】

シグナルペプチドもしくはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはその修飾された配列は、適切に選択されたストリンジエンシーの条件下で天然発生配列のヌクレオチド配列に好ましくハイブリダイズできる。しかしながら、実質的に異なるコドン用法を有する、ペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはその誘導体を產生することは有利であろう。コドンは、ホストによる特定のコドンの使用頻度に従い、特定の原核もしくは真核ホストにおけるペプチドの発現率を増大させるように選択されてよい。例えば、配列番号342～533によって提供されるように、コドンは大腸菌(*E. coli*)における発現のために最適化できる。コードされるアミノ酸配列を変化させることなく、ペプチドをコードするヌクレオチド配列およびその誘導体を実質的に変化させるその他の理由は、より望ましい特性、例えば天然発生配列から產生された転写物よりも長い半減期を有するRNA転写物の產生を含む。

20

#### 【0066】

本発明はまた、ペプチドもしくはポリペプチドまたはその修飾された配列をコードする、DNA配列またはその断片の、完全な合成化学による產生も包含する。產生後、該合成配列は当該技術分野において公知の試薬を用いて、多数の利用可能な発現ベクターおよび細胞システムのいずれにも挿入されてよい。さらに合成化学は、ペプチドもしくはポリペプチドをコードする配列、またはそのいずれの変化、変異体、誘導体、もしくは断片に変異を導入するために使用されてよい。本発明はまた、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987; *Methods Enzymol.* 152:399-407) および Kimmel, A. R. (1987; *Methods Enzymol.* 152:507-511) に説明されるようなストリンジエンシーの様々な条件下において、特許請求されるヌクレオチド配列、特に配列番号173～341もしくは342～533に示されるもの、またはそれらの相補体にハイブリダイズできるポリヌクレオチド配列もまた包含する。

30

#### 【0067】

当該技術分野において公知かつ一般的に入手可能なDNA配列決定法は、本発明の実施形態のいずれの実践にも使用されてよい。該方法は、DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE(U.S. Biochemical Corp、クリーブランド、オハイオ州)、Taqポリメラーゼ(Perkin Elmer)、熱安定型T7ポリメラーゼAmersham Pharmacia Biotech(ピスカタウェイ、ニュージャージー州)のような酵素、またはLife Technologies(ゲイサーズバーグ、メリーランド州)により市販されているELONGASE Amplification Systemに見出されるような、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼの組み合わせを用いてよい。好ましくは、この過程はHamilton Micro Lab 2200(ハミルトン、リノ、ネバダ州)、Peltier Thermal Cycler(PTC200; MJ Research、ウォータータウン、マサチューセッツ州)、ABI Catalyst および 373 および 377 DNA Sequencers(Perkin Elmer)、またはGenome Sequencer 20(商標)(Roche Diagnostics)のような装置を用いて自動化される。

40

#### 【0068】

ペプチドをコードする核酸配列は、部分的ヌクレオチド配列を用いて、かつプロモーターおよび調節性エレメントのような上流の配列を検出するための当該技術分野において公

50

知の様々な方法を用いることにより伸長されてよい。例えば、用いられてよい方法である「制限酵素部位」PCRは、既知の遺伝子座に隣接する未知の配列を取得するために普遍的なプライマーを使用する (Sarkar, G. (1993) PCR Methods Appl. 2:318-322)。特にゲノムDNAは、リンカー配列に対するプライマーおよび既知領域に特異的なプライマーの存在下で最初に増幅される。増幅された配列は、次に同じリンカープライマーおよび最初のプライマーの内部に特異的な別のプライマーによる2回目のPCRに供される。PCRの各回の産物は適切なRNAポリメラーゼによって転写され、逆転写酵素を用いて配列決定される。

【0069】

サイズの解析または配列決定法もしくはPCR産物のヌクレオチド配列の確認のため、市販されているキャピラリー電気泳動システムが使用されてよい。特にキャピラリー配列決定法は、電気泳動による分離のための流動性ポリマー、レーザーにより活性化される4種の異なる蛍光色素（各ヌクレオチドに対して1種）、および放射された波長の電荷結合素子カメラによる検出を用いてよい。出力／光強度は適切なソフトウェア（例えばGENOTYPERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer）を用いて電気的シグナルに変換されてよく、サンプルの負荷からコンピューター解析までの全体の過程および電気的データ表示は、コンピューターにより制御されてよい。キャピラリー電気泳動は、特定のサンプル中に限られた量で存在し得るDNA小片の配列決定に特に好ましい。

【0070】

本発明の別の実施形態によれば、適切なホスト細胞内でペプチド、ポリペプチド、またはその修飾された配列の発現を導く組み換えDNA分子内で、該ペプチドもしくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片が使用されてよい。遺伝子コードに固有の縮重により、実質的に同じかまたは機能的に同等なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列が產生され得り、これらの配列はクローニングおよびシグナルペプチドもしくはポリペプチドの発現のために使用されてよい。本発明のヌクレオチド配列は、遺伝子産物のクローニング、プロセシング、および／または発現を修飾する変化を含むがこれらに限定されない様々な理由によりアミノ酸をコードする配列を変化させるため、当該技術分野において一般に公知の方法を用いて操作することができる。ヌクレオチド配列の操作のため、ランダム断片化および遺伝子断片のPCR再構築によるDNAシャッフリング、ならびに合成オリゴヌクレオチドが使用されてよい。例えば新しい制限酵素部位の挿入、グリコシル化パターンの変化、コドン優先度の変更、変異の導入などのために部位特異的変異誘発が使用されてよい。

【0071】

本発明の別の実施形態によれば、ペプチドもしくはポリペプチドをコードする天然、改変、または組み換え核酸配列が、融合タンパク質をコードするために異種性配列に連結されてよい。これは例えば、市販の抗体により認識できるキメラ配列をコードするために有用であろう。融合タンパク質はまた、本発明のペプチドもしくはポリペプチドと異種性タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作されてもよく、これによりペプチドもしくはポリペプチドは異種性部分から切断され精製され得る。

【0072】

別の実施形態によれば、ペプチドまたはポリペプチドをコードする配列は、当該技術分野において公知の化学的方法を用い、全体または一部が合成されてよい (Caruthers, M. H. et al. (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, Horn, T. et al. (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232を参照)。あるいは、該ペプチドまたはポリペプチドそれ自体は、アミノ酸配列またはその断片を合成する化学的方法を用いて產生されてよい。例えば、ペプチド合成は様々な固相技術を用いて行うことができ (Roberge, J. Y. et al. (1995) Science 269:202-204; Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154)、かつ例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー (Perkin Elmer) を用いた自動合成が達成されてよい。ペプチドまたはポリペプチドの様々な断片は別々に化学合成され、完全長分子を產生するための化学的方法を用いて組み合わせられてよい。

10

20

30

40

50

## 【0073】

新たに合成されたペプチドまたはポリペプチドは調製用の高速液体クロマトグラフィー(例えば、Creighton, T. (1983) *Proteins Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, NY)により単離されてよい。合成ペプチドまたはポリペプチドの組成物は、アミノ酸分析または配列決定により確認されてよい(例えば、エドマン分解法; Creighton、上記)。加えて、ペプチドもしくはポリペプチドのアミノ酸配列またはそのいずれの一部は、修飾された分子を産生するため、直接合成の間に変化させられてよく、かつ/または化学的方法を用いてその他のタンパク質由来の配列またはそのいずれの一部と組み合わせられてよい。

## 【0074】

生物学的に活性のあるペプチドを発現させるため、該ペプチドまたは機能的同等物をコードするスクレオチド配列が、適切な発現ベクター、すなわち挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクターへ挿入されてよい。ペプチドをコードする配列ならびに適切な転写および翻訳制御エレメントを含む発現ベクターを構築するため、当業者に公知の方法が用いられてよい。これらの方法は、*in vitro*組み換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝的組み換えを含む。このような技術は、Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, および Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NYに記載されている。

## 【0075】

本発明のペプチドをコードする配列を含み、かつ発現するために、様々な発現ベクター/ホストシステムが利用されてよい。これらは、組み換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌のような微生物; 酵母発現ベクターにより形質転換された酵母; ウィルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)に感染した昆虫細胞システム; ウィルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウィルス、CaMV; タバコモザイクウィルス、TMV)もしくは細菌発現ベクター(例えばTiもしくはpBR322プラスミド)により形質転換された植物細胞システム; または動物細胞システムを含むがこれらに限定されない。細菌のために有用なプラスミドは、Invitrogenにより市販されているpET、pRSET、pTrcHis2、およびpBADプラスミド、Novagenにより市販されているpETおよびpCDFプラスミド、ならびにSigma-Aldrichにより市販されているDirector(商標)プラスミドを含む。メタン生成菌のために有用なプラスミドは、pME2001、pMV15、およびpMP1を含むがこれらに限定されない。本発明は、用いられる発現ベクターまたはホスト細胞により限定されない。

## 【0076】

「制御エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を実行するためにホスト細胞タンパク質と相互作用するベクターの非翻訳領域-エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域-である。このようなエレメントはその強度および特異性において異なり得る。ベクターシステムおよび利用するホストに依存して、恒常的および誘導的プロモーターを含む、適切な転写および翻訳エレメントが幾つでも使用されてよい。例えば細菌システムにおけるクローニングのとき、BLUESCRIPTファージミド(Stratagene、ラホヤ、カリフォルニア州)のハイブリッドlacZプロモーター、またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)などのような誘導性プロモーターが使用されてよい。昆虫細胞においては、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターが使用されてよい。植物細胞ゲノム由来(例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子)または植物ウィルス由来(例えばウィルス性プロモーターもしくはリーダー配列)のプロモーターまたはエンハンサーがベクター内へクローン化されてよい。

## 【0077】

細菌システムにおいては、幾つかの発現ベクターがペプチドに対する意図された使用に依存して選択されてよい。例えば大量のペプチドが必要なとき、容易に精製される融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質の高レベルの発現を導くベクターが使用されてよい。このようなベクターは、ハイブリッドタンパク質を产生できるように、ペプチドをコードする配列がベクター内で - ガラクトシダーゼのアミノ末端 Met およびそれに続く 7 残基の配列とインフレームで連結し得るBLUESCRIPT (Stratagene) のような多機能大腸菌 (*E. coli*) クローニングおよび発現ベクター ; pINベクター (Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509) などを含むが、これらに限定されない。

【0078】

外来性のペプチドをグルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させるために、pGEXベクター (Promega、マディソン、ウィスコンシン州) もまた使用されてよい。一般にこのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオンアガロースビーズへの吸着とそれに続く遊離グルタチオン存在下での溶出により、溶解した細胞から容易に精製できる。このようなシステムで作られるタンパク質は、クローニングされた目的のペプチドがGST成分から随意に遊離できるよう、ヘパリン、トロンビン、または因子Xaプロテアーゼ切断部位を含むように設計されてよい。酵母、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) では、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHのような恒常的または誘導的プロモーターを含む幾つかのベクターが使用されてよい。概説として、Ausubel et al. (上記) およびGrant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544を参照のこと。

【0079】

本発明のペプチドをコードする配列のさらに効率的な翻訳を達成するため、特定の開始シグナルもまた用いられてよい。このようなシグナルはATG開始コドンおよび隣接配列を含む。ペプチド、その開始コドンおよび上流配列をコードする配列が適切な発現ベクターへ挿入されている場合には、追加の転写または翻訳制御シグナルは必要ではないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみが挿入される場合には、ATG開始コドンを含む外来性の翻訳制御シグナルが供給されなければならない。さらに、挿入物全体の翻訳を確実にするため、開始コドンは正確な読み枠でなければならない。外来性の翻訳エレメントおよび開始コドンは、天然および合成両方による、様々な起源であってよい。発現の効率は、文献 (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162) に記載されているような、使用される特定の細胞システムに適切なエンハンサーを含むことにより増大し得る。

【0080】

加えて、ホスト細胞株が、その挿入配列の発現を調節する能力または発現されるペプチドまたはポリペプチドを望まれる様式で処理する能力について選択されてよい。このような配列の修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化を含むがこれらに限定されない。ペプチドまたはポリペプチドの「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセシングもまた、正確な挿入、フォールディング、および / または機能を促進するために用いられてよい。翻訳後活性に対する特定の細胞機構および特徴的な機序を有する異なるホスト細胞が、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (ATCC ; ベセスダ、メリーランド州) から入手可能であり、配列の正確な修飾およびプロセシングを確実にするために選択されてよい。特定のホスト細胞は、メタノブレビバクター (*Methanobrevibacter*) 細胞、特に *M. ruminantium* または *M. smithii* 細胞のようなメタン生成菌細胞を含むがこれらに限定されない。目的のホスト細胞は、例えばロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、スプロボロミセス属 (*Sporobolomyces*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、エルウィニア属 (*Erwinia*) およびフラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*) ; またはエシェリヒア属 (*Escherichia*)、乳酸桿菌属 (*Lactobacillus*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) のようなその他の生物などを含む。特定のホスト細胞は、本発明の使用に特に適している大腸菌 (*Escherichia coli*) を含み、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、バチルス・チューリングンシス (*Bacillus thuringiensis*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)

10

20

30

40

50

lis)、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) などを含む。

【0081】

in vitro 培養されている真核細胞内へ核酸を導入するための幾つかの方法が存在する。これらは化学的方法 (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:7413 7417 (1987); Bothwell et al., Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes, Eds., Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston, Mass. (1990), Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, NY (1992); およびFarhood, Annal. NY Acad. Sci., 716:23 34 (1994) )、プロトプラスト (Bothwell、上記) または電気的パルス (Vatteroni et al., Mutn. Res., 291:163 169 (1993); Sabelnikov, Prog. Biophys. Mol. Biol., 62: 119 152 (1994); Bothwell et al.、上記; および Ausubel et al.、上記) の使用、弱毒化ウィルスの使用 (Davis et al., J. Virol. 1996, 70(6), 3781 3787; Brinster et al. J. Gen. Virol. 2002, 83(Pt 2), 369 381; Moss, Dev. Biol. Stan., 82:55 63 (1994); および Bothwell et al.、上記) 、同様に物理的方法 (Fynan et al.、上記; Johnston et al., Meth. Cell Biol., 43(Pt A): 353 365 (1994); Bothwell et al.、上記; および Ausubel et al.、上記) を含む。

【0082】

動物組織への核酸の良好な送達は、陽イオン性リポソーム (Watanabe et al., Mol. Reprod. Dev., 38:268 274 (1994) )、動物筋肉組織 (Robinson et al., Vacc., 11:957 960 (1993); Hoffman et al., Vacc. 12:1529 1533; (1994); Xiang et al., Virol., 199: 132 140 (1994); Webster et al., Vacc., 12:1495 1498 (1994); Davis et al., Vacc., 12:1503 1509 (1994); Davis et al., Hum. Molec Gen., 2:1847 1851 (1993); Dalemans et al. Ann NY Acad. Sci. 1995, 772, 255 256. Conry, et al. Cancer Res. 1995, 55(7), 1397-1400) および胚 (Naito et al., Mol. Reprod. Dev., 39:153 161 (1994); およびBurdon et al., Mol. Reprod. Dev., 33:436 442 (1992) ) へのネイキッドDNAもしくはRNAの直接注入、自己複製RNAワクチンの筋肉内注入 (Davis et al., J Virol. 1996, 70(6), 3781 3787; Balasuriya et al. Vaccine 2002, 20(11 12), 1609 1617) 、または「遺伝子銃」技術を用いるDNAの皮内注入 (Johnston et al.、上記) により達成できる。

【0083】

タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを用いて、本発明のペプチドまたはポリペプチドの発現を検出および測定するための様々な手順が当該技術分野において公知である。例として、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) 、放射線免疫測定法 (RIA) 、および蛍光標識細胞分取 (FACS) が含まれる。ペプチドまたはポリペプチド上の2種の非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、2部位のモノクローナルに基づく免疫アッセイが使用できるが、競合的結合アッセイもまた使用できる。これらおよびその他のアッセイは、特にHampton, R. et al. (1990; Serological Methods, a laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN) および Maddox, D. E. et al. (1983; J. Exp. Med. 158:1211-1216) に記載されている。

【0084】

広く様々な標識および抱合技術が当業者に公知であり、様々な核酸およびアミノ酸アッセイに用いられてよい。ポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションもしくはPCRプローブを產生するための方法は、オリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識、または標識ヌクレオチドを用いるPCR增幅を含む。あるいは、ペプチドもしくはこのペプチドを含むいずれのポリペプチドをコードする配列、またはそのいずれの修飾された配列は、mRNAプローブを产生するためのベクター内へクローン化されてよい。このようなベクターは当該技術分野において公知かつ市販されており、T7、T3、もしくはSP6のような適切なRNAポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドの添加によって、in vitro でRNAプローブを合成するために用いられてよい。これらの方法は、Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemicalの

様々な市販キットを用いて行われてよい。検出を容易にするために用いられてよい適切なレポーター分子または標識は、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光、または発色薬剤、同様に基質、補因子、抑制剤、磁性粒子などを含む。

【0085】

発現ベクターまたは発現ベクターにより形質転換されるホスト細胞は、ペプチドまたはポリペプチドの発現および培養からの回収に適した条件下で培養されてよい。培養は *in vitro* または *in vivo* での発現のための構成成分を含んでよい。*in vitro* 発現の構成成分は、ウサギ網状赤血球ライセート、大腸菌 (*E. coli*) ライセート、およびコムギ胚芽抽出物のためのもの、例えば Invitrogen から市販されている Expressway (商標) または RIPS system、iNTRON Biotechnology から市販されている Genelator (商標) system、Novagen から市販されている EcoPro (商標) または STP3 (商標) system、Promega から市販されている TNT (登録商標) Quick Coupled system、および QIAGEN から市販されている EasyXpress system を含む。培養から產生されるペプチドまたはポリペプチドは、配列および / または使用されるベクターに依存して、分泌されるかまたは細胞内に含まれてよい。当業者により理解され得るように、ペプチドまたはポリペプチドをコードする発現ベクターは、好ましくは原核または真核細胞の膜を通してペプチドの分泌を導くシグナル配列を含むように設計される。

【0086】

その他の構成は、ペプチドまたはポリペプチドの精製を促進し得るアミノ酸ドメインを含んでよい。このようなドメインは、固定化された金属における精製を可能にするヒスチジン - トリプトファン (例えば 6X - HIS (配列番号 514)) モジュールのような金属キレート化ペプチド、固定化された免疫グロブリンにおける精製を可能にするプロテイン A ドメイン、および FLAG (登録商標) extension/affinity purification system (Immunex Corp.、シアトル、ワシントン州) において利用されるドメインを含むが、これらに限定されない。有用なエピトープタグは、3XFLAG (登録商標)、H A、V S V - G、V 5、H S V、G S T、G F P、M B P、G A L 4、および - ガラクトシダーゼを含む。有用なプラスミドは、ビオチンタグ (例えば Promega から市販されている PinPoint (商標) プラスミド)、カルモジュリン結合タンパク質 (例えば Stratagene から市販されている pCAL プラスミド)、ストレプトアビシン結合ペプチド (例えば Stratagene から市販されている InterPlay (商標) プラスミド)、c - myc もしくは FLAG (登録商標) タグ (例えば Sigma-Aldrich から市販されている 免疫沈降プラスミド)、またはヒスチジンタグ (例えば QIAGEN から市販されている QIAExpress プラスミド) を含むものを、含む。

【0087】

精製を促進するために、切断可能なリンカー配列、例えば因子 X a またはエンテロキナーゼに特異的であるもの (Invitrogen、サンディエゴ、カリフォルニア州) が使用できる。例えば、ベクターは精製ドメインおよびペプチドまたはポリペプチドの間に 1 つ以上のリンカーを含んでよい。一態様によれば、このような発現ベクターは、本発明のペプチドもしくはポリペプチド、およびチオレドキシンもしくはエンテロキナーゼ切断部位に先立つ 6 ヒスチジン残基をコードする核酸 (配列番号 514) を含む融合タンパク質の発現を提供できる。ヒスチジン残基は I M A C (Porath, J. et al. (1992) *Prot. Exp. Purif.* 3: 263-281 に記載される、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィー) における精製を促進するが、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質からペプチドまたはポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターについての考察は Kroll, D. J. et al. (1993; *DNA Cell Biol.* 12:441-453) により提供される。

【0088】

本発明の抗体は、例えば精製または診断技術における使用のために、当該技術分野において一般に公知の方法を用いて產生されてよい。特に、一般的に公知の手順に従って抗体を產生するため、精製ペプチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドが使用されてよい。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、および単鎖抗体、F ab 断片、ならびに F ab 発現ライブラリーにより產生された断片を含んでよいがこれら

10

20

30

40

50

に限定されない。中和抗体（すなわち機能を抑制するもの）は、本発明との併用に特に好みしい。

【0089】

抗体産生のため、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトおよびその他を含む様々なホストが、免疫原性を有するペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはそれらのいずれの断片の注入により免疫されてよい。免疫反応を増大させるため、様々なアジュバントがホストの種に依存して使用されてよい。このようなアジュバントは、水酸化アルミニウムのようなフロイントミネラルゲル、ならびにリゾレシチン、プロロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールのような表面活性物質を含むがこれらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントのうち、BCG (bacilli Calmette-Guerin) およびコリネバクテリウム・パルバム (Corynebacterium parvum) は特に好みしい。

10

【0090】

抗体を誘導するために使用されるペプチド、ポリペプチド、または断片は、少なくとも5アミノ酸、さらに好みしくは少なくとも10アミノ酸を含むアミノ酸配列を有することが好みしい。これらは天然タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることもまた好みしく、かつ小さな天然発生分子の全体のアミノ酸配列を含んでよい。アミノ酸の短い伸展は、キーホールリンペットヘモシアニンおよびキメラ分子に対して產生された抗体のような別のタンパク質のものと融合されてもよい。

20

【0091】

モノクローナル抗体は、培養における継続的な細胞株による抗体分子の產生を提供するいずれの技術を用いて調製されてもよい。これらは、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBVハイブリドーマ技術 (Kohler, G. et al. (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, D. et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote, R. J. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; Cole, S. P. et al. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120) を含むがこれらに限定されない。抗体はまた、リンパ球集団内でのin vivo產生の誘導、または文献 (Orlandi, R. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) *Nature* 349:293-299) に開示されるような、免疫グロブリンライブラリーもしくは高度に特異的な結合試薬のパネルのスクリーニングにより產生されてもよい。

30

【0092】

加えて「キメラ抗体」を產生するために、例えば適切な抗原特異性および生物学的活性をもつ分子を得るための、抗体遺伝子の組み合わせる技術が使用できる (Morrison, S. L. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855; Neuberger, M.S. et al. (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda, S. et al. (1985) *Nature* 314:452-454)。あるいは、特異的な单鎖抗体を產生するために、单鎖抗体の產生のために記述された技術が当該技術分野において公知の方法を用いて適応されてよい。ランダムコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーからの鎖のシャッフリングにより、関連した特異性を有するが、明確なイディオタイプ構造である抗体が作られてよい (Burton D. R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11120-3)。

40

【0093】

本発明が関連する技術分野の当業者は、「ダイアボディ (diabody)」および「トリアボディ (triabody)」という用語を理解し得る。これらは同鎖上の二つのドメインを対合させるには短すぎる短ペプチドリンクにより、軽鎖可変ドメイン (VL) に結合された重鎖可変ドメイン (VH) を含む分子である。これは1つ以上のその他の鎖の相補的ドメインの対合を促進し、2つ以上の機能的抗原結合部位をもつ二量体または三量体分子の形成を助長する。得られた抗体分子は单一特異性または多特異性であり得る (例えばダイアボディの場合、二特異性)。このような抗体分子は、本発明が関連する技術分野において標準的な方法論を用いて、例えばTodorovska et al. (Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods*. 2001

50

Feb 1;248(1-2):47-66)によって記載されるように、2種以上の抗体から作られる。

【0094】

特異的結合部位を含む抗体断片もまた作られてよい。例えばこのような断片は、抗体分子のペプシン消化により产生できる  $F(ab') 断片、および  $F(ab')_2$  断片のジスルフィド橋を還元することにより作られる  $Fab$  断片を含むがこれらに限定されない。あるいは、望まれる特異性を有するモノクローナル  $Fab$  断片の迅速かつ容易な同定を可能にするために、 $Fab$  発現ライブラリーが構築されてよい (Huse, W. D. et al. (1989) Science 254:1275-1281)。$

【0095】

結合特異性を有する抗体を同定するスクリーニングのために、様々な免疫アッセイが用いられてよい。確立された特異性をもつポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを用いる、競合的結合または免疫放射線測定法のための多数の手順が当該技術分野において公知である。このような免疫アッセイは典型的に、ペプチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドおよびそれに特異的な抗体との間の複合体形成の測定に関与する。2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を利用する、2部位のモノクローナルに基づく免疫アッセイが好ましいが、競合的結合アッセイもまた用いられてよい (Maddox、上記)。

【0096】

ここに述べられるシグナルペプチドは細胞に進入する能力を有し、それ故に抑制分子の微生物細胞への送達の担体分子として有用である。化合物をアミノ酸へ共役させるための化学はよく開発されており、幾つかの異なる分子の型がシグナルペプチドへ連結され得る。最も一般的な共役法は、遊離アミノ (アルファアミノもしくは Lys)、スルフヒドリル (Cys)、またはカルボン酸基 (Asp、Glu、もしくはアルファカルボキシル) の存在に依存する。共役法は、カルボキシまたはアミノ末端残基を通してペプチドを細胞抑制剤へ連結するために使用できる。幾つかの場合、配列は、選択された化学に反応してよい複数の残基を含む。これは、1種を超える細胞抑制剤を含む多量体の产生のために用いることができる。あるいは、ペプチドまたはポリペプチドは、反応残基が配列のアミノまたはカルボキシル末端のいずれかに局在するように短くできるかまたは選択できる。

【0097】

例えば、フルオレセインのようなレポーター分子は、ペプチド合成の間に N - - Fmoc - N - 1 - (4,4-ジメチル-2,6ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン-3-メチルブチル) - L - リジンを用いて、リジン残基に特異的に取り込むことができる (Ono et al., 1997)。合成に続き、ヒドラジン処理によって 4,4-ジメチル-2,6ジオキソシクロヘキサ-1-イリデンが除去された後、5-および6-カルボキシフルオレセインサクシニミジルエステルを共役できる。従って、シグナルペプチドまたはポリペプチドへの抑制分子の共役は、透過性配列へのリジン残基の包含、続いて適切に誘導体化された細胞抑制剤との反応により達成できる。

【0098】

EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) またはカルボジイミド共役法もまた使用できる。カルボジイミドは、アスパラギン酸およびグルタミン酸の側鎖カルボン酸基、同様にカルボキシル末端基を、一级アミンとの共役の反応部位とするために活性化できる。活性化されたペプチドは、最終抱合体を产生するために細胞抑制剤と混合される。細胞抑制剤が最初に活性化される場合には、EDC法は N - 末端アルファアミンを通して、かつそれが配列中に存在する場合にはおそらく Lys の側鎖内のアミンを通して、細胞抑制剤を共役し得る。

【0099】

m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル (MBS) は、システインを通してペプチドを細胞抑制剤へ連結するために使用できる、ヘテロ二機能性試薬である。共役はシステイン残基のチオール基により起こる。選択された配列が Cys を含まない場合、ペプチドの細胞抑制剤への高度に制御された連結を得るため、N - もしくは

10

20

30

40

50

C-末端にCys残基を配置することは一般的である。合成の目的のため、ペプチドのN-末端にシステインが配置されることは役に立つであろう。MBSは本発明の使用に特に適している。

【0100】

グルタルアルデヒドは、二つの化合物をそれらのアミノ基を通して連結する、二機能性の共役試薬として使用できる。グルタルアルデヒドは好ましい提示のため、ペプチドと細胞抑制剤の間に高度に柔軟性のあるスペーサーを提供する。グルタルアルデヒドは非常に反応性のある化合物であり、Cys、Tyr、およびHisとは限られた程度に反応し得る。グルタルアルデヒド共役法は、ペプチドがそのアミノ末端に単一の遊離アミノ基のみを含む時に特に有用である。ペプチドが1を超える遊離アミノ基を含む場合、大きな多量体複合体が形成できる。

【0101】

一様によれば、本発明のペプチドまたはポリペプチドは、抗菌剤のような細胞抑制剤へ融合（例えばインフレームクローニングにより）または連結（例えば化学共役により）できる。これらに含まれるものは抗菌ペプチド、例えば殺菌性/透過性増大タンパク質、陽イオン性抗菌タンパク質、リゾチーム、ラクトフェリン、およびカテリシジンである（例えば好中球由来の；例えば、Hancock and Chapple, 1999, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1317-1323; Ganz and Lehrer, 1997, *Curr. Opin. Hematol.* 4:53-58; Hancock et al., 1995, *Adv. Microb. Physiol.* 37:135-175を参照）。抗菌ペプチドはさらにデフェンシン（例えば上皮細胞または好中球由来の）および血小板殺微生物性タンパク質（例えば、Hancock and Chapple, 1999, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1317-1323を参照）を含む。さらなる抗菌ペプチドはグラミシジンS、バシトラシン、ポリミキシンB、タキプレシン、バクテネシン（例えばウシバクテネシン）、ラナレキシン、セクロピンA、インドリシジン（例えばウシインドリシジン）およびナイシン（例えば細菌性ナイシン）を含むがこれらに限定されない。

【0102】

細胞膜のような脂質バリアを横断して、イオン（例えばナトリウム）の透過を促進するイオノフォアもまた抗菌剤として含まれる。RUMENSIN（商標）（Eli Lilly）およびLasalocid（Hoffman LaRoche）の二つのイオノフォア化合物が、本発明に特に適する。他のイオノフォアは、サリノマイシン、アボバルシン、アリドシン（aridcin）、およびアクタプラニンを含むがこれらに限定されない。他の抗菌剤は、Monensin（商標）およびアジスロマイシン、メトロニダゾール、ストレプトマイシン、カナマイシン、ならびにペニシリン、同様に、一般的に-L-ラクタム、アミノグリコシド、マクロライド、クロラムフェニコール、ノボビオシン、リファンピン、およびフルオロキノロンを含む（例えば、Horn et al., 2003, *Applied Environ. Microbiol.* 69:74-83; Eckburg et al., 2003, *Infection Immunity* 71:591-596; Gijzen et al., 1991, *Applied Environ. Microbiol.* 57:1630-1634; Bonelo et al., 1984, *FEMS Microbiol. Lett.* 21:341-345; Huser et al., 1982, *Arch. Microbiol.* 132:1-9; Hilpert et al., 1981, *Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 1 Abt Orig. C* 2:21-31を参照）。

【0103】

特に有用な抑制剤は、プロモエタンスルホン酸、例えば2-プロモエタンスルホン酸またはその塩、例えばナトリウム塩を含む、メタン生成を遮断または妨げる化合物である。モリブデン酸ナトリウム（Mo）は硫酸還元抑制剤であり、プロモエタンスルホン酸と共に使用できる。他の抗メタン生成化合物は、硝酸、ギ酸、フッ化メチル、クロロホルム、抱水クロラール、亜硫酸ナトリウム、エチレン、およびアセチレンのような不飽和炭化水素、リノール酸およびシスオレイン酸のような脂肪酸、ベヘン酸およびステアリン酸のような飽和脂肪酸、ならびにルマジン（例えば、2,4-ブテリジンジオン）もまた含むがこれらに限定されない。さらなる化合物は、3-プロモプロパンスルホン酸塩（BPS）、プロピン酸および2-ブチン酸エチルを含む。

【0104】

10

20

30

40

50

抗菌剤としてさらに、リゾチーム、エンドリシン、リゾチーム、溶解素、ファージ溶解素、muralysin、ムラミダーゼ、およびビロリシンを含む溶解酵素が含まれる。有用な酵素は、細菌細胞壁の特異的結合の加水分解能を示す。特定の溶解酵素は、ペプチドグリカンのアミノ糖（例えばN-アセチルムラミン酸、およびN-アセチルグルコサミン）間のグリコシド結合を加水分解するグルコサミニダーゼ、グリカン鎖および架橋結合ペプチド間のN-アセチルムラモイル-L-アラニンアミド結合を切断するアミダーゼ、ならびに内部ペプチド結合を加水分解するエンドペプチダーゼ（例えばシステインエンドペプチダーゼ）およびメタノバクテリウム科 (Methanobacteriaceae) ファミリー由来のメタン生成菌のシードムレインを攻撃するエンドイソペプチダーゼを含むがこれらに限定されない。

10

#### 【0105】

加えて、抗菌剤としてPNAが含まれる。PNAは、リン酸骨格がN-(2-アミノエチル)-グリシン単位から作られるアキラルかつ中性の骨格により置換された、ペプチド-核酸ハイブリッドである（例えば、Eurekah Bioscience Collection. PNA and Oligonucleotide Inhibitors of Human Telomerase. G. Gavory and S. Balasubramanian, Landes Bioscience, 2003を参照）。A、G、T、Cの塩基が、骨格上のアミノ窒素にメチレンカルボニル結合を通して付着する（P. E. Nielsen et al., Science 1991. 254: 1497-1500; M. Egholm et al., Nature 1993. 365: 566-568）。PNAは相補配列に、高い特異性、および類似DNAまたはRNAに比較してより高いアフィニティーで結合する（M. Egholm et al.、上記）。PNA/DNAまたはPNA/RNAハイブリッドもまた、対応するDNA/DNAまたはDNA/RNA二本鎖に比較してより高い熱安定性を示す（M. Egholm et al.、上記）。PNAはまた、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼによって認識されない非天然のアミド骨格のために、高い化学的および生物学的安定性も有する（V. Demidov et al., Biochem Pharmacol 1994. 48: 1310-1313）。典型的には、PNAは少なくとも5塩基の長さであり、末端リジンを含む。PNAは、その寿命をさらに延長するためにペグ化されてよい（Nielsen, P. E. et al. (1993) Anticancer Drug Des. 8:53-63）。

20

#### 【0106】

特定の一態様によれば、本発明のペプチドまたはポリペプチドは細胞抑制剤、例えば抗体またはその断片へ融合（例えばインフレームクローニングにより）または連結（例えば化学共役により）できる。抗体または抗体断片は、微生物細胞もしくは特にメタン生成菌細胞、または1つ以上の細胞構成成分へ向けられてよい。例えば、レセプターのような細胞表面タンパク質が標的にされ得る。免疫グロブリン分子および免疫グロブリン（Ig）分子の免疫学的活性部位、すなわち抗原に特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子が含まれる。

30

#### 【0107】

本発明のペプチドまたはポリペプチドには、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞の標的化における特定の使用が見出される。特定の態様によれば、ペプチドおよびポリペプチドは、細胞壁もしくは膜への結合、および/または細胞の透過処理のために使用できる。このように、ペプチドまたはポリペプチドは、細胞への一過性もしくは延長された付着、または細胞壁もしくは膜の透過、および/または細胞内環境における蓄積のために使用できる。本発明のペプチド、ポリペプチド、同様に対応するポリヌクレオチド、発現ベクター、ホスト細胞、および抗体は、様々な微生物、例えば反すう動物における一般的なメタン生成菌であるメタノブレビバクター・ルミナンチウム (Methanobrevibacter ruminantium)、およびヒトにおける一般的なメタン生成菌であるメタノブレビバクター・スミシー (Methanobrevibacter smithii) を標的化するために使用できることが理解される。標的化を達成するため、微生物細胞はここに詳述されるように、1種以上の天然源から単離された、または発現ベクターおよび/もしくはホスト細胞、または合成もしくは半合成化学により產生された、シグナルペプチドまたは該ペプチドを含むポリペプチドに接触させることができる。特定の態様によれば、ペプチドもしくはポリペプチドはここに詳述される組

40

50

成物として、例えば反すう動物のための徐放装置の使用を通して被験体へ送達される。

【0108】

特定の実施形態によればポリペプチドは、細胞抑制剤、例えば抗メタン生成化合物（例えばプロモエタンスルホン酸）、抗体もしくは抗体断片、溶解酵素、ペプチド核酸、抗菌ペプチド、またはその他の抗生素に融合または連結される。ペプチド抑制剤またはポリペプチド抑制剤は、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞の生育または複製を抑制するための組成物として被験体へ送達される。組成物は例えば、a) 単離されたシグナルペプチドもしくはこのペプチドを含むポリペプチド、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体；b) 単離されたポリヌクレオチド、またはその変化、断片、変異体、もしくは誘導体；c) このポリヌクレオチドを含む発現ベクター；またはd) この発現ベクターを含むホスト細胞を含む。本発明の組成物は、開示される方法に従い、微生物細胞、特にメタン生成菌細胞を標的化、透過処理、および/または抑制するためのキットの一部として特に包装できる。該キットは、ここに提示される組成物の少なくとも1種、および細胞の透過処理、またはメタン生成菌もしくはその他の微生物の細胞生育または複製の抑制における使用のための説明書を含む。

10

【0109】

さらなる実施形態として、本発明は上で考察されたいずれの方法の使用のための、薬理学的に許容される担体との組み合わせにおける医薬組成物に関する。このような医薬組成物は、シグナルペプチドまたはこのペプチドを含むポリペプチドを細胞抑制剤と組み合わせて含んでよい。あるいは該医薬組成物は、ここに詳述されるように、発現ベクター、またはホスト細胞を含んでよい。該組成物は単独で投与されてよいか、または生理食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水を含むがこれらに限定されない無菌、生体適合性のいのちの薬理学的担体中で投与されてよい、安定化化合物のような少なくとも1種のその他の薬剤との組み合わせにより投与されてよい。該組成物は被験体へ単独で、またはその他の薬剤、薬物（例えば抗菌薬物）、もしくはホルモンと組み合わせて投与されてよい。

20

【0110】

有効成分に加え、これらの医薬組成物は、薬理学的に使用できる製剤中への有効化合物の加工を促進する賦形剤および助剤を含む、適切な薬理学的に許容される担体を含んでよい。製剤および投与のための技術におけるさらなる詳細は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA)の最新版に見出されるであろう。本発明で利用される医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、延髄内、包膜内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、経腸、外用、舌下、または直腸の手段を含むがこれらに限定されないいのちの数の経路により投与されてよい。

30

【0111】

経口投与のための医薬組成物は、当該技術分野において公知の薬理学的に許容される担体を経口投与に適した用量で用いることにより処方できる。被験体の摂取のため、このような担体は医薬組成物の錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などへの処方を可能にする。経口投与のための医薬製剤は、有効成分と固体賦形剤との混合物を通して得ることができ、得られた混合物は随意に粉碎され、錠剤または糖衣コアを得るために必要な場合には適切な助剤を加えた後、顆粒混合物が加工される。適切な賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤であり、例えば、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖；トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモ、またはその他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；アラビアの、またはトラガントを含むゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。必要な場合には崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロドン、寒天、アルギン酸またはアルギン酸ナトリウムのようなその塩が添加されてよい。

40

【0112】

経口的に使用される医薬製剤は、ゼラチンで作られた押し込み型カプセル、同様にゼラ

50

チン、およびグリセロールまたはソルビトールのようなコーティングにより作られたソフトな密封カプセルを含む。押し込み型カプセルは、ラクトースまたはデンプンのような増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および隨意に安定剤と混合された有効成分を含んでよい。ソフトカプセル内で有効化合物は、安定剤を含むかまたは含まない、脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体中に溶解または懸濁されてよい。糖衣コアが濃縮糖液のような適切なコーティングと組み合わせて使用されてよく、これはまた、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒もしくは溶媒混合物も含んでよい。製品の識別、または有効化合物の量すなわち用量を特徴付けるため、染料または顔料が錠剤または糖衣錠コーティングに添加されてよい。

## 【0113】

非経口投与に適切な医薬製剤は、水性溶液中、好ましくはハンクス液、リングル液、または生理緩衝食塩水のような生理的適合性緩衝液中に処方されてよい。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランのような、懸濁液の粘性を増大させる物質を含んでよい。加えて、有効化合物の懸濁液は適切な油性注射用懸濁液として調製されてよい。適切な親油性の溶媒またはビヒクルは、ゴマ油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを含む。非脂質のポリカチオン性アミノポリマーもまた、送達のために用いられてよい。懸濁液は隨意に、適切な安定剤、または高度に濃縮された溶液の調製を可能にするための化合物の溶解度を増大させる薬剤もまた含んでよい。外用または鼻内投与のため、透過すべき特定のバリアに適した浸透剤が製剤中に使用される。このような浸透剤は一般に当該技術分野において公知である。

## 【0114】

本発明の医薬組成物は当該技術分野において公知の様式において、例えば従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、粉末化、乳化、被包、封入、または凍結乾燥過程の手段によって製造されてよい。該医薬組成物は塩として供給されてよく、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸などを含むがこれらに限定されない多数の酸により形成できる。塩は、相当する遊離塩基型に比較して、水性またはその他のプロトン性溶媒にさらに可溶性となる傾向がある。その他の場合の好ましい製剤は、使用前に緩衝液と組み合わせた4.5ないし5.5のpH範囲において、1~50mMヒスチジン、0.1%~2%ショ糖、および2~7%マンニトールのいずれかまたは全てを含んでよい、凍結乾燥粉末であってよい。医薬組成物の調製後、これらは適切な容器に配置でき、表示される状態の治療のために標識される。本発明の組成物の投与のため、このような標識は投与の量、頻度、および方法を含んでよい。

## 【0115】

本発明における使用に適切な医薬組成物は、意図される目的を達成するため、有効成分が有効量含まれる組成物を含む。いずれの化合物についても、治療的に有効な量は最初に、例えば微生物細胞、もしくは特にメタン生成菌細胞、または通常マウス、ウサギ、イヌ、もしくはブタ等の動物モデル、またはヒツジ、ウシ、シカ、およびヤギのような反すう動物種のいずれかにおける細胞アッセイにおいて推定できる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲および投与経路の決定のためにも用いられてよい。このような情報は次に、被験体における投与のために有用な用量および経路の決定のために使用できる。投与経路に依存して、通常の投与量は0.1ないし100,000マイクログラム、全用量が約1gまでに変動してよい。送達の特定の用量および方法のガイダンスは文献により提供され、当業者に一般的に利用可能である。当業者はポリヌクレオチドに対し、ペプチドまたはポリペプチドとは異なる製剤を用いるであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、状態、部位などに対して特異的であり得る。

## 【0116】

ペプチドおよびポリペプチドに基づく治療学は広く知られており、このような組成物の

10

20

30

40

50

製造法は当該技術分野においてよく確立されている。模範的なペプチドおよびポリペプチドの治療学ならびにその製造は、例えば、デニロイキンジフチトクス、オクトレオチド、バブレオチド、ランレオチド、R C - 3 9 4 0 シリーズペプチド、デカペプチル、リュープロン、ゾラデックス、セトロレリクスについて（例えば、Lu et al., 2006, AAPS J 8: E466-472を参照）、hemocidins、staphopainsについて（例えば、Dubin et al., 2005, Acta Biochimica Polonica, 52:633-638を参照）、同様にインドリシジン、デフェンシン、lantibiotics、microcidin B17、ヒスタチン、およびmaganinについて（例えば、Yeaman and Yount, 2003, Pharmacol Rev 55:27-55を参照）記載されている。ペプチドおよびポリペプチドの治療学の一般的なガイダンスはまた、Degim et al., 2007, Curr Pharm Des 13:99-117 および Shai et al., 2006, Curr Prot Pept Sci, 7:479-486にも見出される。最近承認されたペプチドに基づく薬物は、Hematide（商標）（合成ペプチドに基づく赤血球形成刺激剤、Affymax, Inc.）、エクセナチド（合成エキセンディン-4、Amylin/Eli Lilly）、ナトレコール（ネシリチド、ナトリウム利尿ペプチド、Scios）、プレナキシス（アバレリックス、Praecis Pharmaceuticals）、およびセクレフロー（セクレチン、Repligen）を含む。

#### 【 0 1 1 7 】

正確な用量は、治療を必要とする被験体に関する因子に鑑みて、実行者により決定され得る。用量および投与は、有効薬剤を十分な濃度で供給するため、または望まれる効果を維持するために調整される。考慮され得る因子は、疾病状態の重症度、被験体の一般的健康、被験体の年齢、体重、および性別、食事、時間、および投与頻度、薬物の組み合わせ、反応感受性、ならびに治療に対する耐性/反応性を含む。長時間作用型の医薬組成物は、特定製剤の半減期およびクリアランス率に依存して、3ないし4日毎、週1回、または2週間に1回投与されてよい。

#### 【 0 1 1 8 】

徐放処方または機序は、本発明の組成物（特に医薬組成物）に特に有用である。例えば反すう胃内装置は、国際公開第95/19763号およびニュージーランド特許第278977号に開示される、最初にAg Research Ltd.、ニュージーランドで開発され、Agri-Foods Ltd.、ニュージーランドにより市販されるTime Capsule（商標）Bolus range、ならびにオーストラリア特許第35908178号、国際特許出願PCT/AU81/100082号、およびLaby et al., 1984, Can. J. Anim. Sci. 64 (Suppl.), 337-8に開示される、Nufarm Ltd.、オークランド、ニュージーランドの一部門であるNufarm Health & Sciencesにより市販されるCAPTECを含むがこれらに限定されず、これら全ては参照によりここに取り込まれる。特定の例によれば、該装置は、注射外筒末端の穴へ組成物を推し進めるバネおよびプランジャーを含んでよい。

#### 【 0 1 1 9 】

さらなる実施形態として、本発明は上で考査されたいずれの方法の使用のための、水サプリメント、例えば水薬組成物、または食物サプリメント、例えば反すう動物の飼料構成成分のための組成物に関する。特定の態様によれば、食物サプリメントは少なくとも1種の食用野菜材料、および本発明のペプチドもしくはポリペプチドを含む。あるいは、食物サプリメントは少なくとも1種の食用野菜材料、およびポリペプチドまたはペプチド、または例えば発現ベクターもしくは該発現ベクターを含むホスト細胞として、ここに開示されるペプチドもしくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。特に該組成物は、得られる配列に融合または連結される細胞抑制剤をさらに含む。好ましい野菜材料は、乾草、草、穀粒、もしくは穀粉、例えば豆乾草、草乾草、トウモロコシサイレージ、草サイレージ、豆サイレージ、トウモロコシ粒子、カラスムギ、オオムギ、蒸留かす、ビールかす、大豆穀粉、および綿実穀粉のいずれか1種を含む。特に、反すう動物の食物組成物として草サイレージが有用である。植物材料は、本発明の構成成分の1つ以上、例えばポリペプチドもしくはペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターのうち1つ以上を含むように遺伝的に改変できる。

#### 【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

50

別の実施形態によれば、本発明のペプチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドに特異的に結合する抗体が、微生物、特にメタン生成菌の存在を決定するため、またはこのような微生物のレベルをモニターするアッセイにおいて使用されてよい。診断目的に有用な抗体が、上記に同じ様式で調製されてよい。診断アッセイは、ヒト体液または細胞もしくは組織の抽出液中のペプチドまたはポリペプチドを検出するために抗体および標識を利用する方法を含む。該抗体は改変してまたは改変なしで使用されてよく、かつ共有結合または非共有結合のいずれかによるレポーター分子との結合により標識されてよい。当該技術分野において公知の広く様々なレポーター分子が用いられてよく、その幾つかは上述である。

## 【0121】

10

ペプチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドのレベルを測定するための様々な手順は当該技術分野において公知であり（例えばE L I S A、R I A、F A C S、およびプロット）、微生物、特にメタン生成菌の存在またはレベルを決定するための基礎を提供する。正常または標準レベルは、正常被験体、例えば正常のヒトまたは反する動物から得られた体液または細胞抽出液を複合体形成に適した条件下で抗体と組み合わせることによって確立される。標準的複合体形成の量は様々な方法により定量されてよいが、側光手段によることが好ましい。被験体、コントロール、および処理サンプル（例えば処置された被験体からのサンプル）に発現するペプチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドの量は標準的な値と比較される。標準値と被験体の値との間の偏差は、微生物の存在またはレベルを決定するためのパラメーターを確立する。

20

## 【0122】

本発明の特定の実施形態によれば、ポリヌクレオチドは特定のハイブリダイゼーションおよび／または增幅技術を用いる診断目的で使用されてよい。使用されてよいポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド、相補的RNAおよびDNA分子、ならびにPNAを含む。ポリヌクレオチドは、発現が微生物の存在またはレベルと関連し得る、サンプル中の遺伝子発現を検出または定量するために使用されてよい。診断アッセイは、不在、存在と微生物レベルの変化との間を区別するため、および治療介入中のレベルをモニターするために使用されてよい。

## 【0123】

30

一態様によれば、PCRプローブとのハイブリダイゼーションは、核酸配列、特に本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードするゲノム配列を同定するために用いられてよい。プローブの、それが高度に特異的な領域、例えば5'調節性領域の10の独特なヌクレオチドから作られたか、または特異性のより少ない領域、例えば3'コード領域から作られたかという特異性、およびハイブリダイゼーションもしくは増幅のストリンジエンシー（最大、高、中、もしくは低）は、プローブが天然発生の配列、対立遺伝子のみを同定するか、または関連配列を同定するかを決定し得る。プローブはまた、関連配列の検出にも使用されてよく、好ましくはいずれのコード配列からのヌクレオチドの少なくとも50%を含む必要がある。対象発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAであってよく、配列番号173～341もしくは342～533、または相補体、またはその改変配列のヌクレオチド配列由来、または天然発生配列のプロモーター、エンハンサー、エレメント、およびイントロンを含むゲノム配列由来であってよい。

40

## 【0124】

DNAに対する特異的なハイブリダイゼーションプローブを产生するための手段は、mRNAプローブ产生のためのベクターへの核酸配列のクローニングを含む。このようなベクターは当該技術分野において公知かつ市販されており、適切なRNAポリメラーゼおよび適切な標識ヌクレオチドの添加によるin vitroでのRNAプローブ合成に使用されてよい。ハイブリダイゼーションプローブは様々なレポーター群、例えば<sup>32</sup>Pもしくは<sup>35</sup>Sのような放射性核種、またはアビジン／ビオチン共役システムを通してプローブに共役されたアルカリホスファターゼのような酵素ラベルなどにより標識されてよい。ポリヌクレオチドは、サザンもしくはノーザン分析、ドットプロット、またはその他の膜に基づ

50

く技術；P C R技術；あるいは試験紙、ピン、E L I S A アッセイ、または微生物の存在もしくはレベルを検出するための、被験体由来の液体もしくは組織を利用するマイクロアレイにおいて使用されてよい。このような定性または定量法は当該技術分野において公知である。

【0125】

特定の態様によれば核酸配列は、標準法により標識される様々なアッセイにおいて有用である可能性があり、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅に適した条件下で被験体由来の液体または組織サンプルに加えられる。適切なインキュベーション期間の後、サンプルは洗浄され、シグナルが定量されて標準値と比較される。試験サンプル中のシグナル量が、比較されるコントロールサンプルのそれよりも著しく変化している場合、サンプル中のヌクレオチド配列の変化したレベルの存在は、微生物の存在またはレベルを示す。このようなアッセイはまた、動物実験、臨床試験、または被験体の治療のモニターにおいて特定の処置の有効性を評価するために用いられてよい。

【0126】

微生物の存在またはレベルの診断の基礎を提供するため、発現特性の正常または標準プロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅に適した条件下で、正常被験体由来の体液または細胞抽出物をポリヌクレオチドまたはその断片と組み合わせることにより達成され得る。標準レベルは、正常被験体から得られた値を、実質的に精製されたポリヌクレオチドの既知の量を使用した実験から得られた値と比較することにより定量されてよい。正常サンプルから得られた標準値は、微生物の生育に対して治療された被験体のサンプルから得られた値と比較されてよい。標準値と被験体の値との間の偏差は、微生物の存在またはレベルを確立するために使用される。

【0127】

一旦微生物が同定され、処置手順が開始されると、被験体における発現レベルが正常被験体において観察されるそれに比べて減少し始めるか否かを評価するため、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅アッセイが定期的に反復されてよい。連続的なアッセイから得られた結果は、数日から数ヶ月の範囲の期間にわたって処置の有効性を示すために用いられてよい。

【0128】

核酸配列から設計されたオリゴヌクレオチドの特定の診断的使用は、P C Rの使用に関連してよい。このようなオリゴマーは化学的に合成、酵素的に產生、または*in vitro*で產生されてよい。オリゴマーは好ましくは二つのヌクレオチド配列から成る可能性があり、特定の遺伝子または状態を同定するための最適化された状態の下で用いられる、一つはセンス方向（5' . f w d a r w . 3'）およびもう一つはアンチセンス方向（3' . f w d a r w . 5'）である。同一の二つのオリゴマー、オリゴマーの入れ子状態のセット、またはオリゴマーの縮重プールでさえも、密接に関連するD N AまたはR N A配列の検出および／または定量のための少ないストリングエント状態の下で用いられてよい。

【0129】

発現の定量のために用いてよい方法はまた、放射標識またはビオチン化ヌクレオチド、コントロール核酸の共増幅、および実験結果が補間された検量線も含む（Melby, P. C. et al. (1993) *J. Immunol. Methods*, 159:235-244; Duplaa, C. et al. (1993) *Anal. Biochem.* 229-236）。複数のサンプルを定量する速度は、目的のオリゴマーが様々な希釈で存在し、かつ分光光度的または比色反応が迅速な定量を生ずるE L I S A形式におけるアッセイを行うことによって促進され得る。

【0130】

さらなる実施形態によれば、ここに記載されるいづれかのポリヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドまたは長めの断片は、マイクロアレイにおける標的として使用されてよい。マイクロアレイは多数の遺伝子の発現レベルを同時にモニターし（転写像を作り出すため）、かつ遺伝的変異体、変異および多型性を同定するために使用できる。この情報は、

10

20

30

40

50

遺伝子機能の決定、疾病の遺伝的基礎の理解、疾病の診断、ならびに治療薬活性の開発およびモニターのために使用されてよい。一実施形態によればマイクロアレイは、PCT出願国際公開第95/11995号(Chee et al.)、Lockhart, D. J. et al. (1996; Nat. Biotech. 14: 1675-1680) および Schena, M. et al. (1996; Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614-10619)に記載されるような当該技術分野において公知の方法に従って準備、および使用される。

【0131】

一態様によればオリゴヌクレオチドは、PCT出願国際公開第95/251116号(Baldeschweiler et al.)に記載されるような化学共役手順およびインクジェット適用装置を用い、マイクロアレイの表面で合成されてよい。別の態様によれば、ドットまたはスロットプロットに対する「格子」アレイ類似物(HYBRIDOT器具、Life Technologies)が、真空システム、熱、UV、機械的または化学的結合手順を用いて、基質の表面にcDNA断片またはオリゴヌクレオチドを整列および連結するために用いられてよい。さらに別の態様によれば、アレイは用手で、または利用可能な装置、材料、および機械(マルチチャンネルピッパーまたはロボット機器; Brinkmann、ウェストベリー、ニューヨーク州、を含む)を用いて產生され、かつ8、24、96、384、1536、もしくは6144オリゴヌクレオチド、またはそれ自体が市販の機器使用を効率的にする、その他のいずれの2ないし1,000,000の複数を含んでよい。

10

【0132】

マイクロアレイを用いるサンプル分析を行うため、生物学的サンプルからポリヌクレオチドが抽出される。生物学的サンプルはいずれの体液(血液、尿、唾液、痰、胃液など)、培養細胞、生検、またはその他の組織標本から得られてよい。プローブの產生のため、サンプルから抽出されたポリヌクレオチドを用いてマイクロアレイの核酸に相補的な核酸配列が產生される。マイクロアレイがcDNAから成る場合、適切なプローブはアンチセンスRNAである。従って一態様によれば、次々に蛍光ヌクレオチドの存在下で断片またはアンチセンスRNAプローブを產生するために用いられる、cDNAを產生するためにmRNAが用いられる。これらの蛍光標識されたプローブはマイクロアレイと共にインキュベートされ、プローブ配列はマイクロアレイのcDNAオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。別の態様によれば、プローブとして用いられる核酸配列は、ハイブリダイゼーション技術の分野において公知の制限酵素、PCR技術、およびオリゴ標識キット(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて產生される、ポリヌクレオチド、断片、および相補またはアンチセンス配列を含んでよい。

20

【0133】

本発明の別の実施形態によれば、本発明のペプチドもしくはポリペプチド、またはその機能性もしくは免疫原性断片またはそのオリゴペプチドは、様々な薬物スクリーニング技術のいずれにおいても、化合物ライプラリーのスクリーニングのために使用できる。このようなスクリーニングに用いられる断片は、溶液中で遊離型であるか、固体支持体へ固定されるか、細胞表面上にあるか、または細胞内に位置し得る。ペプチドもしくはポリペプチドと、試験される薬剤の間での結合複合体の形成が測定されてよい。

30

【0134】

使用されてよい薬物スクリーニングの一技術は、公開されたPCT出願国際公開第84/03564号に記載されるように、目的のペプチドまたはポリペプチドへの適切な結合アフィニティーを有する化合物のハイスループットスクリーニングを提供する。この方法によれば、多数の異なる小さな試験化合物が、プラスチックピン、またはその他の幾つかの表面のような固体基質上で合成される。試験化合物は、ペプチドもしくはポリペプチド、またはその断片と反応し、洗浄される。結合したペプチドまたはポリペプチドは、次に当該技術分野において公知の方法により検出される。精製されたペプチドまたはポリペプチドはまた、上述の薬物スクリーニング技術における使用のため、プレート上に直接コートもできる。あるいは非中和抗体が、ペプチドの捕獲および固体支持体上への不動化のために使用できる。

40

50

## 【0135】

別の技術によれば、ペプチドまたはポリペプチドを結合できる中和抗体が、ペプチドまたはポリペプチドへの結合に対して試験化合物と特異的に競合する、競合薬物スクリーニングアッセイが使用されてよい。この様式によれば該抗体は、1つ以上の抗原結合部位を該抗体と共有する試験化合物の存在を検出するために使用できる。

## 【実施例】

## 【0136】

ここに記載される実施例は、本発明の実施形態を例証する目的のためにある。その他の実施形態、方法、および分析の型は分子診断技術における当業者の範囲内であり、ここに詳述する必要はない。当該技術分野の範囲内のその他の実施形態は、本発明の一部とみなされる。

## 【0137】

実施例1：材料および方法

## ゲノムサイズの推定

メタノブレビバクター・ルミナンチウム (*Methanobrevibacter ruminantium*) の M 1<sup>T</sup> 株 (DSM 1093) は、[g / l] NaCl (1)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25)、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.13)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.2)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1)、浄化した反すう胃液 (300 ml) dH<sub>2</sub>O (360 ml)、NaHCO<sub>3</sub> (5)、レザズリン (0.2 ml) L-システイン-HCl (0.5)、酵母抽出物 (2)、ならびに、(g / l) ニトリロ三酢酸 (1.5)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (3)、MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (0.5)、NaCl (1)、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.1)、CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.1)、CaCl<sub>2</sub> (0.1)、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.1)、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0.01)、AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O (0.01)、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.01)、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.01)、NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.03)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.02)、およびNa<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.02) から成るBalch の微量元素溶液 (10 ml) (微量元素の添加；Balch et al., 1979)、から成るBY+ 培地 (基本培地、Joblin et al., 1990) 中で生育した。凍結粉碎法を用いてゲノムDNA を抽出した。細胞を遠心によって回収し、細胞ペレットを予め冷却した乳鉢内に配置し、液体窒素により凍結し、かつ予め冷却した滅菌乳鉢および乳棒を用いて穏やかに粉碎して微粉にした。ゲノムDNA の物理的せん断を減少させるため、細胞ホモジネートをアガロースプラグ上に包埋し、続く操作をプラグ内で行った。制限酵素により消化を行い、DNA断片をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いて分離した。

## 【0138】

## DNAクローニングおよび配列決定

M. ルミナンチウム (*M. ruminantium*) ゲノムのDNAは、Agencourt Biosciences Corporation (マサチューセッツ州、米国) によりランダムショットガンクローニングアプローチ (Fleischmann et al., 1995) を用いて、およびMacrogen Corporation (ロックビル、メリーランド州、米国) によりピロシーケンスを用いて配列決定された。M. ルミナンチウム (*M. ruminantium*) のDNAのライブラリーを、ゲノムDNAのランダムな物理的破壊およびゲル電気泳動による断片の分離により、大腸菌 (*Escherichia coli*) 内へ構築した。40 kb 範囲の大きな断片をゲルから回収し、大インサートのフォスミドライブライバーを作製するために使用した。2ないし4 K b 範囲のDNA断片を回収し、小インサートのプラスミドライバーを作製するために使用した。大および小インサートライブライバーの両方からもたらされたクローンを生育させ、それらのフォスミドまたはプラスミドDNAを回収し、ハイスループット配列決定技術を用いて配列決定した。理論的にM. ルミナンチウム (*M. ruminantium*) ゲノムの8倍のカバー率を生ずるために十分なクローンを配列決定した。10倍の最終理論的なカバー率を得るために、ランダムにせん断されたゲノムDNA断片についてピロシーケンスを行った。

## 【0139】

## 配列構築および解析

10

20

30

40

50

配列の重複を見出すためにDNA配列を整列し、Paracel Genome Assembler (Paracel Inc.、カリフォルニア州、米国) およびStadenパッケージ (Staden et al., 1998) を用い、標準および逆PCRの両方から得られた配列を組み合わせて、近接する(コンティグ)配列へ構築した。コンティグは翻訳領域(ORF)ファインダーGLIMMER (Gene Locator Interpolated Markov Model ER, Sizberg et al., 1998) を用いて分析し、各ORFは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の非重複性ヌクレオチドおよびタンパク質データベースに対するBLAST (Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997)) により分析した。

## 【0140】

10

8倍のドラフト段階の配列からのコンティグを、「偽分子」を産生するために配列の人工連結によってランダムに連結し、自動アノテーションのためThe Institute for Genetic Research (TIGR、ワシントンDC、米国) へ提出した。10倍のピロシーケンスから構築されたコンティグはGLIMMERを用いて再分析し、ORFはGAMOLA (Global Annotation of Multiplexed On-site Blasted DNA sequences; Altermann and Klaenhammer, 2003) を用いて自動アノテートした。自動アノテーションは、次に手動で確認した。ORFはオルソログタンパク質(COG)データベース(閾値1e-02) (Tatusov et al., 2001) のクラスターを用いる関数により分類した。

## 【0141】

20

タンパク質モチーフは、広範囲および局所性のアライメント(hypertext transfer protocol://pfam.wustl.edu) ならびに標準および断片モードTIGRFAM HMMモデル(hypertext transfer protocol://www.tigr.org/TIGRFAMs) それぞれと共に、PFAM HMMおよびTIGRFAMライブラリーを用いたHMMER (hypertext transfer protocol://hmmer.wustl.edu) により決定した(閾値1e-02)。tRNAはTRNASCAN-SE (Lowe and Eddy, 1997) を用いて同定し、ヌクレオチド反復はKODONソフトウェアパッケージ (Applied Maths、オースティン、テキサス州、米国) およびREPUTER (Kurtz and Schleiermacher, 1999) を用いて同定した。ゲノムアトラス描出はGENEWIZ (Jensen et al., 1999) を用いて構築した。予測されるM.ルミナンチウム(M. ruminantium)のORF genomeからの経路再構築は、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisa et al., 2004) オンラインデータベースを併用し、社内開発のソフトウェア(PathwayVoyager; Altermann and Klaenhammer, 2005) を用いて行った。

30

## 【0142】

## シグナルペプチドの同定

現在までに、古細菌のシグナルペプチドモデルは存在しない。単に、特定のモデルを定めるために実験的に検証された古細菌に利用可能な分泌タンパク質は非常に少ない。この理由から翻訳領域(ORF)配列は、グラム陽性、グラム陰性、および真核細胞モデルに対して定められたSignalPバージョン3.0 (Bendtsen et al., 2004) を用い、シグナルペプチドの存在について分析された。Emanuelsson et al., 2007により記載されるように、シグナルペプチドと非シグナルペプチドORFとを識別するためにSignalP-HMM(隠れマルコフモデル)が使用されたが、切断部位の予測のためにSignalP-NN(中立ネットワーク)が利用された。

40

## 【0143】

SignalPは、異なる生物由来のアミノ酸配列中の、シグナルペプチド切断部位の存在および位置を予測する。本方法は幾つかの人工中立ネットワークおよび隠れマルコフモデルの組み合わせに基づき、切断部位の予測およびシグナルペプチド/非シグナルペプチドの予測を組み入れる。Gram +veデータセットから同定されたシグナルペプチド配列は整列され、Vector NTI (バージョン9.1.0, Invitrogen Corporation) のAlignXプログラムを用いてコンセンサス配列が算出された。保存された疎水性コアはアミノ酸疎水性の分析により同定された。

## 【0144】

50

コンセンサスデータセットは三つの全てのSignalPモデルから同定し、対応するシグナルペプチド配列はClustalW (Larkin et al., 2007) を用いて整列し、BioEdit (hypertext transfer protocol://world wide web.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) を用いて編集した。この複数の配列アラインメントに存在する情報を表すために、LogoBar (Perez-Bercoff et al., 2006) を用いてタンパク質配列ロゴ (図3 A) を作成した。この研究においてシグナルペプチドおよび3つ以上の膜貫通ドメインを含むORFは膜タンパク質とみなし、さらなる分析から除外した。各3モデルからの最もよいY-スコアは推定切断部位とみなされた (図6)。大腸菌 (Escherichia coli) K12コドン表に基づく社内パールスクリプトであるopt\_codons.pl (Altermann, E) を用いて、最適化されたコドン使用 (図9) を算出した。

10

#### 【0145】

##### ペプチド合成およびフルオレセイン標識

コアコンセンサスペプチドはInvitrogenのカスタムペプチドサービス (Invitrogen NZ Ltd) を用いて商業的に合成した。ペプチドは少量 (10 ~ 12 mg) でのFmoc化学を用いて合成し、HPLCで > 95 % の純度まで精製した。ペプチドのN-末端リジン (K) をフルオレセインで標識した。

#### 【0146】

##### 細胞透過性アッセイ

標識ペプチドのM.ルミナンチウム (M. ruminantium) 細胞へのエントリーに続いて蛍光アッセイを行った。10 ml のBY + 培地中でM.ルミナンチウム (M. ruminantium) の培養物を生育させ、10,000 × g で、4 ℃において10分間遠心して回収した。細胞を1.5 ml のポリプロピレンエッペンドルフチューブに移し、1 ml のTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1 mM エチレンジアミン四酢酸、pH 8) で洗浄し、13,000 × g で、4 ℃において10分間微量遠心機で遠心して回収した。細胞 (約1 × 10<sup>8</sup>) を全量 200 μl のTE緩衝液に再懸濁し、20 μg のフルオレセイン標識ペプチドを加えた。混合物を37 ℃において30分間インキュベートし、その後 13,000 × g で、4 ℃において10分間遠心した。細胞ペレット上部の液体を保持し、上清分画を構成した。細胞ペレットを200 μl のTE緩衝液で、細胞を緩衝液中に繰り返し再懸濁することによって3回洗浄し、13,000 × g で、4 ℃において10分間遠心した。

20

#### 【0147】

洗浄液をプールして細胞洗浄分画を構成した。三度の洗浄後に残存する細胞ペレットを、1 % ドデシル硫酸ナトリウムを含む200 μl のTE緩衝液に再懸濁した。細胞をペレットにするため、細胞を13,000 × g で、4 ℃において10分間遠心し、細胞ペレット上部の液体を回収して細胞付随分画を構成した。残りの細胞ペレットを液体N<sub>2</sub>中で凍結し、凍結ペレットをガラス棒で粉碎することによって細胞を物理的に破壊した。得られた細胞ホモジネートを20,000 × g で、4 ℃において30分間遠心した。ペレット上部の液体を回収して細胞内分画とする一方、残りのペレット物質をTE緩衝液に再懸濁して細胞壁 / 膜分画とした。これら各分画の蛍光を、各分画からのサンプルをガラスキャビラリーに密封し、Lightcycler (Roche) 蛍光検出機 (チャンネル1) を用いてフルオレセイン標識ペプチド標準に対して 510 ~ 533 nm にて放射蛍光を測定することにより、測定した。

30

#### 【0148】

##### 実施例2：実験結果

ゲノムDNAの制限酵素消化およびPFGEによる断片のサイズ決定によるM.ルミナンチウム (M. ruminantium) ゲノムのサイズ推定は、約2.5 ~ 2.9 Mbの単一染色体を示した。大および小インサートクローン (6倍ドラフトカバー率) の最初の配列決定および配列のコンティグへの構築は、ゲノムの40 kb領域が、特に小インサートライブリーア内で高度に過剰表現 (> 20倍) されていることを示した。この大きな配列バイアスのため、さらなる配列決定 (2倍の理論的ゲノムカバー率) を、サンガー配列決定法により最終の8倍のカバー率をもたらす大インサートクローンのみについて行った。8倍のド

40

50

ラフト段階の配列を、105のスキャフォールドを通して連結した756のコンティグへ構築した。さらなる~10倍のカバー率に対してさらなるピロシーケンスを行い、これらの配列の構築への取り込みはコンティグの数を27に低下させた。これに続く逆および長距離PCR技術を用いるギャップ閉鎖は、コンティグの数を14に減少させた。

#### 【0149】

14コンティグ配列を組み合わせた長さは、ゲノムがPFGEにより推定されたサイズよりもわずかに長く(2,937,347bp)(図1A)、最も近い類縁体である*M. smithii*(1.9Mb)に比べて著しく大きなことを示す。32.64%の%G+Cは、*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)系統について報告されている27.5%ないし31.6%範囲に近い(Balch et al, 1979)。配列解析は2,239のORFを予測し、タンパク質ファミリー(TIGRFamおよびPFam)およびオルソログ群のクラスター(COG)へのヒットの総数は図1Bに報告される。 $H_2$ +CO<sub>2</sub>およびギ酸塩からのメタン生成に関与すると予測される遺伝子の全てが存在する(図1C)。しかしながら、*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)のドラフト配列はメチル補酵素還元酵素II(mcrIIまたはmrt)システムを欠く。その他のメタン生成菌においてmcrIIクラスターは、H<sub>2</sub>の高い分圧における生育の間に発現増加される、メチルCoM還元酵素Iのアイソザイムをコードする(Reeve et al., 1997)。 $H_2$ は反すう胃内で迅速に使用され高レベルで蓄積しないため、*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)はmcrIIシステムのみを通して低レベルのH<sub>2</sub>を使用するように順応すると考えられる。

#### 【0150】

*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)のゲノム内に、ORFを含む全169のシグナルペプチドが同定された(図7)。これらのうち、三つの全てのSignalPモデルによって102のシグナルペプチドが同定され、これらのシグナルペプチドのアミノ酸配列が整列され(図2)、タンパク質配列ロゴが作られた(図3A)。17の疎水性アミノ酸コア配列が同定された(KKIIILLLILLLISI;配列番号119)。配列がシグナルペプチドを含む確立は、SignalP-HMMにより算出した。このシグナルペプチドの確率は0ないし1の値であり、この分析でシグナルペプチドと非シグナルペプチドとを識別するために0.5がカットオフとして定義された。SignalP-NN Y-スコアは、SPが切断されたか否かについて最もよく推定する(図6)。Y-スコアは、SignalP-NNにより作られたC-スコア(生の切断部位スコア)の幾何平均およびS-スコア(シグナルペプチドスコア)の均した勾配として定義される。Y-スコアは0ないし1の値であり、より高いスコアは有効な切断部位の予測を示す。

#### 【0151】

コンセンサスアミノ酸配列(図3C)を合成し、追加のN-末端リジン残基を通して蛍光タグのフルオレセインに抱合し(図3D)、最終的なペプチドの長さは17アミノ酸となった。精製されたFITCペプチドを、*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)細胞の透過性について試験した(図4)。*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)細胞透過性アッセイにおいて、37で30分後、細胞に付着していない上清中に23.5%のペプチドが残存した。さらなる3.4%のペプチドは、細胞から緩衝液で3回洗浄することにより除去され得る。細胞の1%SDS抽出後に約62.9%のペプチドが回収され、大部分のペプチドが細胞に付随することが示された。残りのペプチドについては、5.8%が細胞内分画中に見出され、4.4%が細胞壁/膜分画に付随した。従って、最初のペプチドの5.8%(1.16μgに相当)が*M. ruminantium*(*M. ruminantium*)に結合、かつ細胞膜を横断して細胞質に進入でき、これは一細胞あたり約2.3×10<sup>6</sup>のペプチド分子を表す。

#### 【0152】

##### 実施例3：概観

メタノブレビバクター・ルミナンチウム(*Methanobrevibacter ruminantium*)は、様々な食餌条件下でのその反すう胃内における有病率(培養および分子検出データに基づく)、培養物の有効性、実験室での日常的生育の快適性、ならびにこの生物に対する比較的多

10

20

30

40

50

数の以前の研究および入手可能な背景文献により、ゲノム配列決定のために選択された。M. ルミナンチウム (M. ruminantium) 内の著しく多数の配列が機能を割り当てられ、これによってこの生物の反すう胃内での生活様式の詳細な描写が可能になる。M. ルミナンチウム (M. ruminantium) の単純な基質 (H<sub>2</sub> + C O<sub>2</sub>、ギ酸塩) 依存性、ならびにその表面タンパク質および菌体外多糖を通した反すう胃環境との相互作用は抑制の重要な標的である。配列データはこの生物の代謝およびそれが他の微生物とどのように相互作用するかを明らかにし、かつメタン生成菌の間で保存されたシステム、および反すう胃内におけるメタン生成を阻止または減少させるために不活性化できる構成成分へと向かう。

【図 1 A】

| メタン生成菌   | Mb  | ORF  | %G+C | tRNA | tRNA |
|--|-----|------|------|------|------|
| <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 <sup>a</sup>          | 2.9 | 2239 | 32.6 | 2    | 59   |
| <i>Methanobrevibacter smithii</i> PS <sup>b</sup>              | 1.9 | 1795 | 31.0 | 2    | 34   |
| <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> ΔH <sup>c</sup> | 1.8 | 1873 | 49.5 | 2    | 39   |
| <i>Methanospaera stadtmanae</i> DSM091 <sup>d</sup>            | 1.8 | 1534 | 27.6 | 4    | 40   |

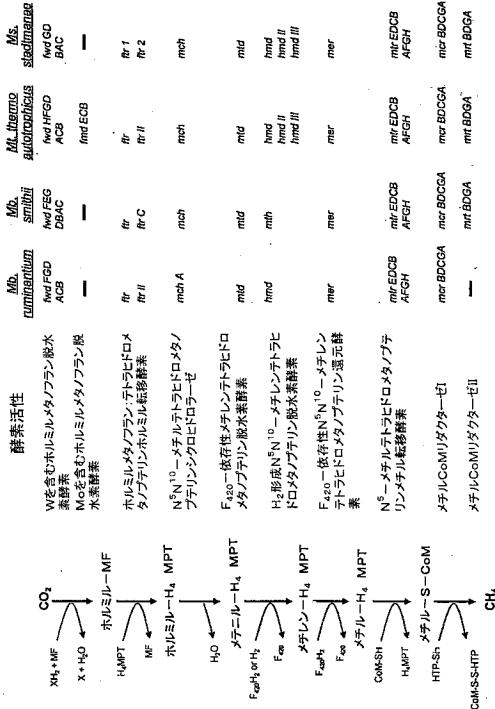
<sup>a</sup>ゲノムサイズおよびORFの数は、M. ruminantiumドラフトゲノム配列の単一コンティグの分析に基づく  
<sup>b</sup>Samuel et al., 2007  
<sup>c</sup>Smith et al., 1997  
<sup>d</sup>Fricke et al., 2006

【図 1 B】

| <i>M. ruminantium</i> ドラフトゲノムの統計 |            |
|----------------------------------|------------|
| ゲノムサイズ (bp)                      | 293747     |
| 翻訳領域                             | 2239       |
| 膜貫通ドメインを持つタンパク質                  | 503 (22.5) |
| 転写終結区の構造                         | 334 (14.9) |
| TIGRFam                          | 2304       |
| PFam                             | 3315       |
| COG                              | 1834       |

<sup>a</sup>括弧内の数は、全ORF数の%としての特徴を示す。

【図1C】

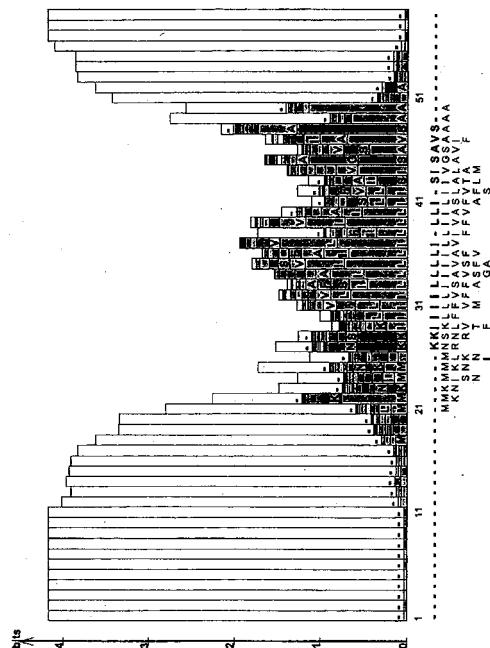


【図2-2】

【図 2 - 3】

### 【図 2 - 1】

### 【図3A】



【図3B】



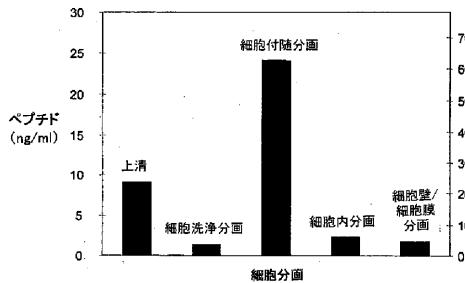
【図3C】

KKLIIIILLLILLLS  
配列番号：117

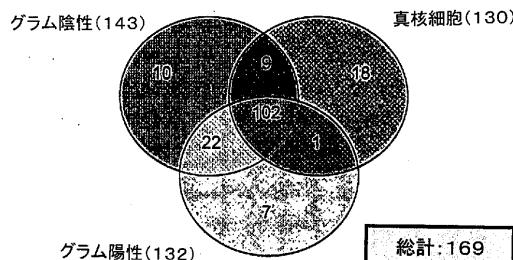
### 【図3-D】

Fluorescein-KKKLIIILLLLILLLS  
配列番号: 118

【 四 4 】



〔 四 5 〕



### 【図 6 - 1】



| 英語版のサンプル        |     | 英語版のサンプル        |
|-----------------|-----|-----------------|
| Lambard (アリラン)の | 34  | Lambard (アリラン)の |
| 35              | 36  | 35              |
| 37              | 38  | 36              |
| 39              | 40  | 37              |
| 41              | 42  | 38              |
| 43              | 44  | 39              |
| 45              | 46  | 40              |
| 47              | 48  | 41              |
| 49              | 50  | 42              |
| 51              | 52  | 43              |
| 53              | 54  | 44              |
| 55              | 56  | 45              |
| 57              | 58  | 46              |
| 59              | 60  | 47              |
| 61              | 62  | 48              |
| 63              | 64  | 49              |
| 65              | 66  | 50              |
| 67              | 68  | 51              |
| 69              | 70  | 52              |
| 71              | 72  | 53              |
| 73              | 74  | 54              |
| 75              | 76  | 55              |
| 77              | 78  | 56              |
| 79              | 80  | 57              |
| 81              | 82  | 58              |
| 83              | 84  | 59              |
| 85              | 86  | 60              |
| 87              | 88  | 61              |
| 89              | 90  | 62              |
| 91              | 92  | 63              |
| 93              | 94  | 64              |
| 95              | 96  | 65              |
| 97              | 98  | 66              |
| 99              | 100 | 67              |
| 101             | 102 | 68              |
| 103             | 104 | 69              |
| 105             | 106 | 70              |
| 107             | 108 | 71              |
| 109             | 110 | 72              |
| 111             | 112 | 73              |
| 113             | 114 | 74              |
| 115             | 116 | 75              |
| 117             | 118 | 76              |
| 119             | 120 | 77              |
| 121             | 122 | 78              |
| 123             | 124 | 79              |
| 125             | 126 | 80              |
| 127             | 128 | 81              |
| 129             | 130 | 82              |
| 131             | 132 | 83              |
| 133             | 134 | 84              |
| 135             | 136 | 85              |
| 137             | 138 | 86              |
| 139             | 140 | 87              |
| 141             | 142 | 88              |
| 143             | 144 | 89              |
| 145             | 146 | 90              |
| 147             | 148 | 91              |
| 149             | 150 | 92              |
| 151             | 152 | 93              |
| 153             | 154 | 94              |
| 155             | 156 | 95              |
| 157             | 158 | 96              |
| 159             | 160 | 97              |
| 161             | 162 | 98              |
| 163             | 164 | 99              |
| 165             | 166 | 100             |
| 167             | 168 | 101             |
| 169             | 170 | 102             |
| 171             | 172 | 103             |
| 173             | 174 | 104             |
| 175             | 176 | 105             |
| 177             | 178 | 106             |
| 179             | 180 | 107             |
| 181             | 182 | 108             |
| 183             | 184 | 109             |
| 185             | 186 | 110             |
| 187             | 188 | 111             |
| 189             | 190 | 112             |
| 191             | 192 | 113             |
| 193             | 194 | 114             |
| 195             | 196 | 115             |
| 197             | 198 | 116             |
| 199             | 200 | 117             |
| 201             | 202 | 118             |
| 203             | 204 | 119             |
| 205             | 206 | 120             |
| 207             | 208 | 121             |
| 209             | 210 | 122             |
| 211             | 212 | 123             |
| 213             | 214 | 124             |
| 215             | 216 | 125             |
| 217             | 218 | 126             |
| 219             | 220 | 127             |
| 221             | 222 | 128             |
| 223             | 224 | 129             |
| 225             | 226 | 130             |
| 227             | 228 | 131             |
| 229             | 230 | 132             |
| 231             | 232 | 133             |
| 233             | 234 | 134             |
| 235             | 236 | 135             |
| 237             | 238 | 136             |
| 239             | 240 | 137             |
| 241             | 242 | 138             |
| 243             | 244 | 139             |
| 245             | 246 | 140             |
| 247             | 248 | 141             |
| 249             | 250 | 142             |
| 251             | 252 | 143             |
| 253             | 254 | 144             |
| 255             | 256 | 145             |
| 257             | 258 | 146             |
| 259             | 260 | 147             |
| 261             | 262 | 148             |
| 263             | 264 | 149             |
| 265             | 266 | 150             |
| 267             | 268 | 151             |
| 269             | 270 | 152             |
| 271             | 272 | 153             |
| 273             | 274 | 154             |
| 275             | 276 | 155             |
| 277             | 278 | 156             |
| 279             | 280 | 157             |
| 281             | 282 | 158             |
| 283             | 284 | 159             |
| 285             | 286 | 160             |
| 287             | 288 | 161             |
| 289             | 290 | 162             |
| 291             | 292 | 163             |
| 293             | 294 | 164             |
| 295             | 296 | 165             |
| 297             | 298 | 166             |
| 299             | 300 | 167             |
| 301             | 302 | 168             |
| 303             | 304 | 169             |
| 305             | 306 | 170             |
| 307             | 308 | 171             |
| 309             | 310 | 172             |
| 311             | 312 | 173             |
| 313             | 314 | 174             |
| 315             | 316 | 175             |
| 317             | 318 | 176             |
| 319             | 320 | 177             |
| 321             | 322 | 178             |
| 323             | 324 | 179             |
| 325             | 326 | 180             |
| 327             | 328 | 181             |
| 329             | 330 | 182             |
| 331             | 332 | 183             |
| 333             | 334 | 184             |
| 335             | 336 | 185             |
| 337             | 338 | 186             |
| 339             | 340 | 187             |
| 341             | 342 | 188             |
| 343             | 344 | 189             |
| 345             | 346 | 190             |
| 347             | 348 | 191             |
| 349             | 350 | 192             |
| 351             | 352 | 193             |
| 353             | 354 | 194             |
| 355             | 356 | 195             |
| 357             | 358 | 196             |
| 359             | 360 | 197             |
| 361             | 362 | 198             |
| 363             | 364 | 199             |
| 365             | 366 | 200             |
| 367             | 368 | 201             |
| 369             | 370 | 202             |
| 371             | 372 | 203             |
| 373             | 374 | 204             |
| 375             | 376 | 205             |
| 377             | 378 | 206             |
| 379             | 380 | 207             |
| 381             | 382 | 208             |
| 383             | 384 | 209             |
| 385             | 386 | 210             |
| 387             | 388 | 211             |
| 389             | 390 | 212             |
| 391             | 392 | 213             |
| 393             | 394 | 214             |
| 395             | 396 | 215             |
| 397             | 398 | 216             |
| 399             | 400 | 217             |
| 401             | 402 | 218             |
| 403             | 404 | 219             |
| 405             | 406 | 220             |
| 407             | 408 | 221             |
| 409             | 410 | 222             |
| 411             | 412 | 223             |
| 413             | 414 | 224             |
| 415             | 416 | 225             |
| 417             | 418 | 226             |
| 419             | 420 | 227             |
| 421             | 422 | 228             |
| 423             | 424 | 229             |
| 425             | 426 | 230             |
| 427             | 428 | 231             |
| 429             | 430 | 232             |
| 431             | 432 | 233             |
| 433             | 434 | 234             |
| 435             | 436 | 235             |
| 437             | 438 | 236             |
| 439             | 440 | 237             |
| 441             | 442 | 238             |
| 443             | 444 | 239             |
| 445             | 446 | 240             |
| 447             | 448 | 241             |
| 449             | 450 | 242             |
| 451             | 452 | 243             |
| 453             | 454 | 244             |
| 455             | 456 | 245             |
| 457             | 458 | 246             |
| 459             | 460 | 247             |
| 461             | 462 | 248             |
| 463             | 464 | 249             |
| 465             | 466 | 250             |
| 467             | 468 | 251             |
| 469             | 470 | 252             |
| 471             | 472 | 253             |
| 473             | 474 | 254             |
| 475             | 476 | 255             |
| 477             | 478 | 256             |
| 479             | 480 | 257             |
| 481             | 482 | 258             |
| 483             | 484 | 259             |
| 485             | 486 | 260             |
| 487             | 488 | 261             |
| 489             | 490 | 262             |
| 491             | 492 | 263             |
| 493             | 494 | 264             |
| 495             | 496 | 265             |
| 497             | 498 | 266             |
| 499             | 500 | 267             |
| 501             | 502 | 268             |
| 503             | 504 | 269             |
| 505             | 506 | 270             |
| 507             | 508 | 271             |
| 509             | 510 | 272             |
| 511             | 512 | 273             |
| 513             | 514 | 274             |
| 515             | 516 | 275             |
| 517             | 518 | 276             |
| 519             | 520 | 277             |
| 521             | 522 | 278             |
| 523             | 524 | 279             |
| 525             | 526 | 280             |
| 527             | 528 | 281             |
| 529             | 530 | 282             |
| 531             | 532 | 283             |
| 533             | 534 | 284             |
| 535             | 536 | 285             |
| 537             | 538 | 286             |
| 539             | 540 | 287             |
| 541             | 542 | 288             |
| 543             | 544 | 289             |
| 545             | 546 | 290             |
| 547             | 548 | 291             |
| 549             | 550 | 292             |
| 551             | 552 | 293             |
| 553             | 554 | 294             |
| 555             | 556 | 295             |
| 557             | 558 | 296             |
| 559             | 560 | 297             |
| 561             | 562 | 298             |
| 563             | 564 | 299             |
| 565             | 566 | 300             |
| 567             | 568 | 301             |
| 569             | 570 | 302             |
| 571             | 572 | 303             |
| 573             | 574 | 304             |
| 575             | 576 | 305             |
| 577             | 578 | 306             |
| 579             | 580 | 307             |
| 581             | 582 | 308             |
| 583             | 584 | 309             |
| 585             | 586 | 310             |
| 587             | 588 | 311             |
| 589             | 590 | 312             |
| 591             | 592 | 313             |
| 593             | 594 | 314             |
| 595             | 596 | 315             |
| 597             | 598 | 316             |
| 599             | 600 | 317             |
| 601             | 602 | 318             |
| 603             | 604 | 319             |
| 605             | 606 | 320             |
| 607             | 608 | 321             |
| 609             | 610 | 322             |
| 611             | 612 | 323             |
| 613             | 614 | 324             |
| 615             | 616 | 325             |
| 617             | 618 | 326             |
| 619             | 620 | 327             |
| 621             | 622 | 328             |
| 623             | 624 | 329             |
| 625             | 626 | 330             |
| 627             | 628 | 331             |
| 629             | 630 | 332             |
| 631             | 632 | 333             |
| 633             | 634 | 334             |
| 635             | 636 | 335             |
| 637             | 638 | 336             |
| 639             | 640 | 337             |
| 641             | 642 | 338             |
| 643             | 644 | 339             |
| 645             | 646 | 340             |
| 647             | 648 | 341             |
| 649             | 650 | 342             |
| 651             | 652 | 343             |
| 653             | 654 | 344             |
| 655             | 656 | 345             |
| 657             | 658 | 346             |
| 659             | 660 | 347             |
| 661             | 662 | 348             |
| 663             | 664 | 349             |
| 665             | 666 | 350             |
| 667             | 668 | 351             |
| 669             | 670 | 352             |
| 671             | 672 | 353             |
| 673             | 674 | 354             |
| 675             | 676 | 355             |
| 677             | 678 | 356             |
| 679             | 680 | 357             |
| 681             | 682 | 358             |
| 683             | 684 | 359             |
| 685             | 686 | 360             |
| 687             | 688 | 361             |
| 689             | 690 | 362             |
| 691             | 692 | 363             |
| 693             | 694 | 364             |
| 695             | 696 | 365             |
| 697             | 698 | 366             |
| 699             | 700 | 367             |
| 701             | 702 | 368             |
| 703             | 704 | 369             |
| 705             | 706 | 370             |
| 707             | 708 | 371             |
| 709             | 710 | 372             |
| 711             | 712 | 373             |
| 713             | 714 | 374             |
| 715             | 716 | 375             |
| 717             | 718 | 376             |
| 719             | 720 | 377             |
| 721             | 722 | 378             |
| 723             | 724 | 379             |
| 725             | 726 | 380             |
| 727             | 728 | 381             |
| 729             | 730 | 382             |
| 731             | 732 | 383             |
| 733             | 734 | 384             |
| 735             | 736 | 385             |
| 737             | 738 | 386             |
| 739             | 740 | 387             |
| 741             | 742 | 388             |
| 743             | 744 | 389             |
| 745             | 746 | 390             |
| 747             | 748 | 391             |
| 749             | 750 | 392             |
| 751             | 752 | 393             |
| 753             | 754 | 394             |
| 755             | 756 | 395             |
| 757             | 758 | 396             |
| 759             | 760 | 397             |
| 761             | 762 | 398             |
| 763             | 764 | 399             |
| 765             | 766 | 400             |
| 767             | 768 | 401             |
| 769             | 770 | 402             |
| 771             | 772 | 403             |
| 773             | 774 | 404             |
| 775             | 776 | 405             |
| 777             | 778 | 406             |
| 779             | 780 | 407             |
| 781             | 782 | 408             |
| 783             | 784 | 409             |
| 785             | 786 | 410             |
| 787             | 788 | 411             |
| 789             | 790 | 412             |
| 791             | 792 | 413             |
| 793             | 794 | 414             |
| 795             | 796 | 415             |
| 797             | 798 | 416             |
| 799             | 800 | 417             |
| 801             | 802 | 418             |
| 803             | 804 | 419             |
| 805             | 806 | 420             |
| 807             | 808 | 421             |
| 809             | 810 | 422             |
| 811             | 812 | 423             |
| 813             | 814 | 424             |
| 815             | 816 | 425             |
| 817             | 818 | 426             |
| 819             | 820 | 427             |
| 821             | 822 | 428             |
| 823             | 824 | 429             |
| 825             | 826 | 430             |
| 827             | 828 | 431             |
| 829             | 830 | 432             |
| 831             | 832 | 433             |
| 833             | 834 | 434             |
| 835             | 836 | 435             |
| 837             | 838 | 436             |
| 839             | 840 | 437             |
| 841             | 842 | 438             |
| 843             | 844 | 439             |
| 845             | 846 | 440             |
| 847             | 848 | 441             |
| 849             | 850 | 442             |
| 851             | 852 | 443             |
| 853             | 854 | 444             |
| 855             | 856 | 445             |
| 857             | 858 | 446             |
| 859             | 860 | 447             |
| 861             | 862 | 448             |
| 863             | 864 | 449             |
| 865             | 866 | 450             |
| 867             | 868 | 451             |
| 869             | 870 | 452             |
| 871             | 872 | 453             |
| 873             | 874 | 454             |
| 875             | 876 | 455             |
| 877             | 878 | 456             |
| 879             | 880 | 457             |
| 881             | 882 | 458             |
| 883             | 884 | 459             |
| 885             | 886 | 460             |
| 887             | 888 | 461             |
| 889             | 890 | 462             |
| 891             | 892 | 463             |
| 893             | 894 | 464             |
| 895             | 896 | 465             |
| 897             | 898 | 466             |
| 899             | 900 | 467             |
| 901             | 902 | 468             |
| 903             | 904 | 469             |

### 【 図 6 - 2 】

### 【図 6 - 3】

### 【図 7 - 2】

|                   |                                  |    |
|-------------------|----------------------------------|----|
| Contig 9 gene 291 | MRKKEKRRRLILLI                   | 31 |
| Contig 9 gene 306 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 32 |
| Contig 9 gene 317 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 33 |
| Contig 9 gene 346 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 34 |
| Contig 9 gene 349 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 35 |
| Contig 9 gene 352 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 36 |
| Contig 9 gene 411 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 37 |
| Contig 9 gene 431 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 38 |
| Contig 9 gene 448 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 39 |
| Contig 9 gene 466 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 40 |
| Contig 9 gene 493 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 41 |
| Contig 9 gene 501 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 42 |
| Contig 9 gene 503 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 43 |
| Contig 9 gene 532 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 44 |
| Contig 9 gene 636 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 45 |
| Contig 9 gene 721 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 46 |
| Contig 9 gene 730 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 47 |
| Contig 9 gene 733 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 48 |
| Contig 9 gene 735 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 49 |
| Contig 9 gene 737 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 50 |
| Contig 9 gene 739 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 51 |
| Contig 9 gene 750 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 52 |
| Contig 9 gene 766 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 53 |
| Contig 9 gene 769 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 54 |
| Contig 9 gene 817 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 55 |
| Contig 9 gene 824 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 56 |
| Contig 9 gene 828 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 57 |
| Contig 9 gene 834 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 58 |
| Contig 9 gene 835 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 59 |
| Contig 9 gene 836 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 60 |
| Contig 9 gene 837 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 61 |
| Contig 9 gene 841 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 62 |
| Contig 9 gene 843 | MRKKEKRRRLILLIITMMPPPPPPPPPPPPQQ | 63 |

### 【図 7 - 3】

【 义 7 - 4 】

|                    |                          |     |
|--------------------|--------------------------|-----|
| Conti449 gene 1347 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 95  |
| Conti449 gene 1354 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 96  |
| Conti449 gene 1370 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 97  |
| Conti449 gene 1374 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 98  |
| Conti449 gene 1375 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 99  |
| Conti449 gene 1381 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 100 |
| Conti449 gene 1384 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 101 |
| Conti449 gene 1385 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 102 |
| Conti449 gene 1386 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 103 |
| Conti449 gene 1387 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 104 |
| Conti449 gene 1388 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 105 |
| Conti449 gene 1389 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 106 |
| Conti449 gene 1390 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 107 |
| Conti449 gene 1391 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 108 |
| Conti449 gene 1392 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 109 |
| Conti449 gene 1393 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 110 |
| Conti449 gene 1394 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 111 |
| Conti449 gene 1395 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 112 |
| Conti449 gene 1396 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 113 |
| Conti449 gene 1397 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 114 |
| Conti449 gene 1398 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 115 |
| Conti449 gene 1399 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 116 |
| Conti449 gene 1400 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 120 |
| Conti449 gene 1401 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 121 |
| Conti449 gene 1402 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 122 |
| Conti449 gene 1403 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 123 |
| Conti449 gene 1404 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 124 |
| Conti449 gene 1405 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 125 |
| Conti449 gene 1406 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 126 |
| Conti449 gene 1407 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 127 |
| Conti449 gene 1408 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 128 |
| Conti449 gene 1409 | WKNKGRKGLLWVMMVMASTOCCAA | 129 |

### 【 図 7 - 5 】

|          |          |                             |     |
|----------|----------|-----------------------------|-----|
| Contig47 | gene 125 | MEKONIUSVIRALLILAVULVUSSESS | 130 |
| Contig47 | gene 110 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 131 |
| Contig47 | gene 116 | MEKONIUSVIRALLILAVULVUSSESS | 132 |
| Contig47 | gene 160 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 133 |
| Contig47 | gene 197 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 134 |
| Contig47 | gene 208 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 135 |
| Contig47 | gene 253 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 136 |
| Contig47 | gene 269 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 137 |
| Contig47 | gene 304 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 138 |
| Contig47 | gene 304 | LSTVULFAGVAVHAGTINF         | 139 |
| Contig47 | gene 306 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 140 |
| Contig47 | gene 306 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 141 |
| Contig47 | gene 319 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 142 |
| Contig47 | gene 333 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 143 |
| Contig47 | gene 336 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 144 |
| Contig47 | gene 364 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 145 |
| Contig47 | gene 381 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 146 |
| Contig47 | gene 391 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 147 |
| Contig47 | gene 3   | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 148 |
| Contig47 | gene 4   | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 149 |
| Contig47 | gene 25  | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 150 |
| Contig47 | gene 43  | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 151 |
| Contig47 | gene 43  | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 152 |
| Contig47 | gene 44  | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 153 |
| Contig47 | gene 96  | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 154 |
| Contig47 | gene 96  | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 155 |
| Contig47 | gene 152 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 156 |
| Contig47 | gene 152 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 157 |
| Contig47 | gene 172 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 158 |
| Contig47 | gene 172 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 159 |
| Contig47 | gene 175 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 160 |
| Contig47 | gene 180 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 161 |
| Contig47 | gene 183 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 162 |
| Contig47 | gene 184 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 163 |
| Contig47 | gene 184 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 164 |
| Contig47 | gene 194 | MELIUSVIRALLILAVULVUSSESS   | 165 |

【 図 7 - 6 】

【図 8 - 1】

| 品種名               | 株高(センチメートル) | 花色 | 花期   |
|-------------------|-------------|----|------|
| スリーパーフィニ          | 173         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_34  | 34          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_35  | 35          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_39  | 39          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_40  | 40          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_41  | 41          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_51  | 51          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_54  | 54          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_53  | 53          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_70  | 70          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_72  | 72          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_75  | 75          | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_105 | 105         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_119 | 119         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_161 | 161         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_163 | 163         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_164 | 164         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_165 | 165         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_169 | 169         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_179 | 179         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_187 | 187         | 白  | 6月上旬 |
| Contig10_gene_203 | 203         | 白  | 6月上旬 |

### 【 図 8 - 2 】

【図 8 - 3】

【図 8 - 4】

【図 8 - 5】

【 8 - 6 】

【図 8 - 7】

【 図 8 - 8 】

【図 9 - 1】

### 【 図 9 - 2 】

【図 9 - 3】

【図9-4】

【図9-5】

【 図 9 - 6 】

【図9-7】

【 図 9 - 8 】

## 【配列表】

0005558356000001.app

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/989,841

(32)優先日 平成19年11月22日(2007.11.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 アトウッド, グレアム トレバー

ニュージーランド アッシュハースト アールディー 14 ポハンギナ バレー イースト ロード 136

(72)発明者 ケリー, ウィリアム ジョン

ニュージーランド アッシュハースト ケンブリッジ アベニュー 208

(72)発明者 オルターマン, エリック ハインツ

ニュージーランド パーマストン ノース アカロア アベニュー 26

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 特開平07-163379 (JP, A)

Journal of Microbiological Methods, 2004年, Vol. 57, pp.123-133

Journal of Bacteriology, 1958年, Vol. 75, No. 6, pp.713-718

Journal of Bacteriology, 1997年, Vol. 179, No. 22, pp.7135-7155

Environmental Microbiology, 2007年 8月, Vol. 9, No. 8, pp.1869-1877

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

P u b M e d

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q