

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4423542号
(P4423542)

(45) 発行日 平成22年3月3日 (2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日 (2009.12.18)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 N 63/00 (2006.01)

A O 1 N 63/00 A

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

C O 7 K 7/06 (2006.01)

C O 7 K 7/06

C O 7 K 7/08 (2006.01)

C O 7 K 7/08

請求項の数 10 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-587962 (P2003-587962)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月24日 (2003.4.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2003/005225
 (87) 国際公開番号 W02003/091429
 (87) 国際公開日 平成15年11月6日 (2003.11.6)
 審査請求日 平成18年4月18日 (2006.4.18)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-124830 (P2002-124830)
 (32) 優先日 平成14年4月25日 (2002.4.25)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000003034
 東亜合成株式会社
 東京都港区西新橋1丁目14番1号
 (74) 代理人 100117606
 弁理士 安部 誠
 (74) 代理人 100115510
 弁理士 手島 勝
 (74) 代理人 100136423
 弁理士 大井 道子
 (72) 発明者 吉田 徹彦
 日本国愛知県名古屋市港区船見町1番地の
 1 東亜合成株式会社 新製品開発研究所
 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌性ポリペプチド及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

天然に存在しない人為的に合成された抗菌性ポリペプチドであって、そのペプチド鎖中に配列番号1～80のうちから選択された1種類又は2種類以上の核移行性配列 (N L S) 及び／又は該選択されたN L Sに1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変配列を1単位又は2単位以上含んでおり、該1単位又は2単位以上のN L S及び／又はN L Sの改変配列に含まれるアミノ酸残基の総数は少なくとも5であり且つペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の30%以上であり、更に該ペプチド鎖中に前記N L S又はN L Sの改変配列のN末端側又はC末端側に近接して配列番号81～82のうちから選択された少なくとも1単位の核外移行性配列 (N E S) 若しくは該選択されたN E Sに1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変配列を含み、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が30以下である抗菌性ポリペプチドと、

薬学的に許容され得る担体と、
 を含む、抗菌剤。

【請求項2】

前記抗菌性ポリペプチドは、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90及び配列番号91から成る群から選択されるいずれかの配列番号で示される少なくとも1種類のアミノ酸配列又は該配列において1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変アミノ酸配列

から実質的に構成される抗菌性ポリペプチドである、請求項 1 に記載の抗菌剤。

【請求項 3】

前記ポリペプチドのペプチド鎖の C 末端アミノ酸残基がアミド化されている、請求項 1 又は 2 に記載の抗菌剤。

【請求項 4】

抗菌性ポリペプチドを主成分とする抗菌剤の調製方法であって、

核移行性配列 (N L S) として知られている 5 アミノ酸残基以上から成るアミノ酸配列を配列番号 1 ～ 8 0 のうちから少なくとも 1 種類選択し且つ核外移行性配列 (N E S) として知られているアミノ酸配列を配列番号 8 1 ～ 8 2 のうちから少なくとも 1 種類選択すること、

該選択した N L S 及び／又は該選択した N L S に 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変配列を 1 単位又は 2 単位以上含み、該 1 単位又は 2 単位以上の N L S 及び／又は N L S の改変配列に含まれるアミノ酸残基の総数がペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の 3 0 % 以上であり、更に前記 N L S 又は N L S の改変配列の N 末端側又は C 末端側に近接して少なくとも 1 単位の前記選択した N E S 若しくは該選択した N E S に 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変配列を含み、全アミノ酸残基数が 3 0 以下であるペプチド鎖を設計すること、

該設計したペプチド鎖を有する抗菌性ポリペプチドを合成すること、および

該合成したポリペプチドと少なくとも一種の薬学的に許容され得る担体とを混合すること、
を包含する、方法。

【請求項 5】

前記 N L S の改変配列の形成は、以下の (a) ～ (c) :

(a) ネイティブな N L S の非塩基性アミノ酸残基を少なくとも一つ欠失させること；

(b) ネイティブな N L S に少なくとも一つの塩基性アミノ酸残基を付加させること；
および

(c) ネイティブな N L S に含まれる少なくとも一つの非塩基性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸残基に置換すること；

のうちの少なくとも一つの処置を包含する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記設計されたペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 0 及び配列番号 9 1 から成る群から選択されるいずれかの配列番号で示されるアミノ酸配列である、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

化学合成法によって前記ペプチド鎖を有する抗菌性ポリペプチドを製造する、請求項 4 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

天然に存在しない人為的に合成された抗菌性ポリペプチドであって、

そのペプチド鎖中に配列番号 1 ～ 8 0 のうちから選択された 1 種類又は 2 種類以上の核移行性配列 (N L S) 及び／又は該選択された N L S に 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変配列を 1 単位又は 2 単位以上含んでおり、該 1 単位又は 2 単位以上の N L S 及び／又は N L S の改変配列に含まれるアミノ酸残基の総数は少なくとも 5 であり且つペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の 3 0 % 以上であり、更に該ペプチド鎖中に前記 N L S 又は N L S の改変配列の N 末端側又は C 末端側に近接して配列番号 8 1 ～ 8 2 のうちから選択された少なくとも 1 単位の核外移行性配列 (N E S) 若しくは該選択された N E S に 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変配列を含み、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が 3 0 以下である、ポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、または配列番号 91 に示すアミノ酸配列又は該配列の 1、2 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変アミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 に記載の抗菌性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む、天然に存在しない人為的に合成されたポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、天然には存在しない形態の独立したペプチド鎖から成る抗菌性ポリペプチド及び該ポリペプチドを主成分とする抗菌剤（薬学上の組成物）に関する。

背景技術

抗菌性ポリペプチドは幅広い抗菌スペクトルを有し、薬剤耐性菌が出現し難いと考えられていることから、ヒト及び動物の細菌感染性疾患の予防や治療、或いは、食材等の物品に抗菌性を付与する目的に抗菌性ポリペプチドの利用が期待されている。これまでに多くの抗菌性ポリペプチドが動植物から単離されている。

例えば、特開 2000-63400 号公報には、タイワンカブトムシ由来の抗菌性ポリペプチド及び当該抗菌性ポリペプチドを有効成分とする抗菌剤が記載されている。また、特開 2001-186887 号公報には、サソリ毒由来の抗菌性ポリペプチド及び当該抗菌性ポリペプチドを有効成分とする抗菌剤が記載されている。また、国際公開第 WO98/51794 号には、デフェンシンスーパーファミリーの一つであるヒト由来の抗菌性ポリペプチド及び当該抗菌性ポリペプチドを有効成分とする抗菌剤が記載されている。また、国際公開第 WO99/26971 号には、カゼイン由来の抗菌性ポリペプチド及び当該抗菌性ポリペプチドを有効成分とする抗菌剤（具体的には歯磨剤、口内洗浄液等の口用組成物）が記載されている。また、国際公開第 WO00/09553 号には、アカガエル由来の抗菌性ポリペプチドが記載されている。また、国際公開第 WO01/009175 号には、植物デフェンシン由来の修飾システイン含有抗菌性ポリペプチドが記載されている。上記の各公報に記載の抗菌性ポリペプチドは、何れも自然界において元々抗菌性ポリペプチドとして存在していたものを発見し単離したもの（或いは天然型抗菌性ポリペプチドのアミノ酸配列を一部改変したポリペプチド）である。従って、本来的に抗菌性ポリペプチドとして存在するペプチドを主成分とする限り、自然界において元来そのペプチドが奏していた抗菌活性や抗菌スペクトルを上回る抗菌性能を有する抗菌剤を開発することは困難である。

発明の開示

ここに開示される抗菌性ポリペプチドは、従前知られている抗菌性ポリペプチドとは異なるアプローチにより開発されたポリペプチドである。すなわち、本発明は、自然界において抗菌性ポリペプチドとして存在するペプチドとは異なるペプチドに含まれるアミノ酸配列を利用して創出された、天然に存在しない人為的に合成された抗菌性ポリペプチドを提供する。また、本発明は、ここに開示される抗菌性ポリペプチドの製造方法を提供する。さらに本発明は、ここに開示される抗菌性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び該配列を含む（典型的にはそれら配列により実質的に構成される）天然に存在しない人為的に合成されたポリヌクレオチドを提供する。さらには、そのような抗菌性ポリペプチド又は該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを主成分とする抗菌剤（薬学上の組成物）を提供する。

ここで開示される抗菌性ポリペプチドは、そのペプチド鎖中に、1 種類又は 2 種類以上の核移行性配列（nuclear localization signal sequence：以下、NLS という）及び／又は該 NLS に部分的な改変が施された配列を 1 単位又は 2 単位以上含んでいる。典型的には、上記 1 単位又は 2 単位以上の NLS 及び／又は NLS の改変配列に包含されるアミノ酸残基（即ち当該配列を構成するアミノ酸残基）

10

20

30

40

50

の総数は少なくとも5であり、且つ、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の30%以上（好ましくは40%以上）に相当する。

NLSは種々の生物種やウイルスから単離された核移行性配列であり、本来は細胞内で核に移行する種々のポリペプチド中に存在する部分的な配列である。しかし、本発明者は、独立した形態のNLSそれ自体が細菌等に対して抗菌性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明の抗菌性ポリペプチドは、主要構成要素としてNLSを有することによって、高い抗菌活性を発揮し得る。特にグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有し得る。

本発明の抗菌性ポリペプチドは、好ましくは、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が5以上100以下である。この程度の長さのポリペプチドであると、高い抗菌活性を安定して発揮させることができる。またペプチド鎖が比較的短いために合成が容易であり、経済的でもある。また、上記NLS及び／又はNLSの改変配列に包含されるアミノ酸残基数の総数がペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の90%以上（例えば100%）であるペプチドが特に好ましい。かかるNLS主体のペプチドは、特に高い抗菌活性を有し得る。

また、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の40%以上が塩基性アミノ酸残基（典型的にはアルギニン及びリジン）であることが好ましい。塩基性アミノ酸残基数の存在比率が高いと、より高い抗菌活性が得られ得る。

また、好ましい一つの抗菌性ポリペプチドは、上記NLS及び／又はNLSの改変配列が2単位以上相互に近接して配置されていることを特徴とする。一つのペプチド鎖にNLSが2単位以上存在すると、抗菌活性が向上する。相互に隣接してタンデムに存在するものが特に好ましい。

本発明によって提供される他の好ましい抗菌性ポリペプチドは、NLSの抗菌活性を高め得る他の配列を含む。このことに関し、本発明者は核外移行性配列（nuclear export signal sequence：以下、NESという）として従来より知られていた配列が、ペプチドの抗菌活性を増大させることに寄与し得ることを見出した。従って、NLS及び／又はNLSの改変配列に加えて、ペプチド鎖中に更にNES若しくは該NESに部分的な改変が施された配列を少なくとも1単位含む抗菌性ポリペプチドが本発明によって提供される。

この態様の抗菌性ポリペプチドとして好ましいものは、NES又はNESの改変配列の少なくとも1単位が、NLS又はNLSの改変配列のN末端側又はC末端側に近接して配置されていることを特徴とする。NES（又はその改変配列）とNLS（又はその改変配列）とが相互に隣接するポリペプチド（ペプチド鎖）は、バクテリア、特に黄色ブドウ球菌のようなグラム陽性細菌に対して高い抗菌活性を発揮し得る。

また、本発明は、ここで開示される抗菌性ポリペプチドを主成分とする抗菌剤（即ち薬学上の組成物）を提供する。典型的には、抗菌剤は、用途に応じて、主成分たる本発明の抗菌性ポリペプチドの他に、薬学的に許容され得る種々の担体（副成分）を含有し得る。

また、本発明は、ここで開示される抗菌性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及び該配列と相補的なヌクレオチド配列を提供する。さらに、それらヌクレオチド配列を含むか或いはそれら配列により実質的に構成される、天然に存在しない人為的に合成されたポリヌクレオチド（DNAセグメント又はRNAセグメントの形態であり得る）を提供する。

さらに本発明は、ここで開示される抗菌性ポリペプチドを好適に製造する方法を提供する。典型的には、ここで開示される方法は、核移行性配列（NLS）として知られている5アミノ酸残基以上から成るアミノ酸配列を少なくとも1種類選択すること、該選択したNLS及び／又は該NLSに部分的な改変が施された配列を1単位又は2単位以上含み、該1単位又は2単位以上のNLS及び／又はNLSの改変配列に含まれるアミノ酸残基数の総数が全アミノ酸残基数の30%以上（好ましくは40%以上）となるようなペプチド鎖を設計すること、ならびに、該設計したペプチド鎖を有する抗菌性ポリペプチドを合成する

10

20

30

40

50

ことを包含する。

好ましいNLSの部分的な改変方法として、(a) ネイティブなNLSの非塩基性アミノ酸残基を少なくとも一つ欠失させること、(b) ネイティブなNLSに少なくとも一つの塩基性アミノ酸残基を付加させること、および、(c) ネイティブなNLSに含まれる少なくとも一つの非塩基性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸残基に置換すること、等が挙げられる。

配列表フリーテキスト

配列番号 8 3	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 8 4	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 8 5	設計された抗菌性ポリペプチド。	10
配列番号 8 6	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 8 7	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 8 8	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 8 9	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 0	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 1	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 2	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 3	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 4	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 5	設計された抗菌性ポリペプチド。	20
配列番号 9 6	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 7	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 8	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 9 9	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 0	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 1	末端にアミド基を含む、設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 2	末端にアミド基を含む、設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 3	末端にアミド基を含む、設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 4	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 5	設計された抗菌性ポリペプチド。	30
配列番号 1 0 6	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 7	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 8	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 0 9	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 1 0	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 1 1	設計された抗菌性ポリペプチドの配列をコードする合成DNA。	
配列番号 1 1 2	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 1 3	設計された抗菌性ポリペプチドの配列をコードする合成DNA。	
配列番号 1 1 4	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 1 5	設計された抗菌性ポリペプチドの配列をコードする合成DNA。	40
配列番号 1 1 6	設計された抗菌性ポリペプチド。	
配列番号 1 1 7	プライマーとして使用される合成DNA。	
配列番号 1 1 8	プライマーとして使用される合成DNA。	
配列番号 1 1 9	プライマーとして使用される合成DNA。	
配列番号 1 2 0	プライマーとして使用される合成DNA。	
配列番号 1 2 1	設計された抗菌性ポリペプチドの配列をコードする合成DNA。	
配列番号 1 2 2	設計されたポリペプチド。	
配列番号 1 2 3	合成DNA。	
発明を実施するための最良の形態		
本明細書において「天然に存在しない人為的に合成された抗菌性ポリペプチド又はポリヌ		50

クレオチド」とは、そのペプチド鎖又はヌクレオチド鎖（全長）がそれ単独で自然界に存在するものではなく、人為的に化学合成或いは生合成（即ち遺伝子工学に基づく生産）された抗菌性ポリペプチド又はポリヌクレオチドをいう。

「ポリペプチド」とは、複数のペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーを指す用語であり、ペプチド鎖に含まれるアミノ酸残基の数によって限定されない。アミノ酸残基数が10未満（例えば全アミノ酸残基数が5～7）の所謂オリゴペプチドも本明細書におけるポリペプチドに包含される。

「ポリヌクレオチド」とは、複数のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で結ばれたポリマー（核酸）を指す一般的な用語であり、ヌクレオチドの数によって限定されない。種々の長さのDNAフラグメント及びRNAフラグメントがポリヌクレオチドに包含される。

「アミノ酸残基」は、特に言及する場合を除いて、ペプチド鎖のN末端アミノ酸及びC末端アミノ酸を包含する用語とする。

また、本明細書において「NLS」または「核移行性配列」というときは、特に言及している場合を除き、特定のアミノ酸配列に限定されず、核移行性（核局在性）配列として知られているアミノ酸配列全般を指す。特に限定することを意図したものではないが、NLSとして知られるアミノ酸配列の典型例を本明細書の配列表（配列番号1～80）の欄に列記してある。

また、本明細書において「NES」または「核外移行性配列」というときは、特に言及している場合を除き、特定のアミノ酸配列に限定されず、核外移行性配列として知られているアミノ酸配列全般を指す。特に限定することを意図したものではないが、NESの典型例が本明細書の配列表（配列番号81，82）に列記してある。

NLS又はNESを含む抗菌性ポリペプチドについて、「NLS（又はNES）に部分的な改変が施された配列を含む抗菌性ポリペプチド」とは、所定のNLS（又はNES）を含むポリペプチドが奏する抗菌性と実質的に同等又はそれ以上の抗菌性を奏するように、当該NLS（又はNES）の1～数個のアミノ酸残基が修飾された配列（例えばC末端アミノ酸のカルボキシル基がアミド化された配列）、或いは当該NLS（又はNES）について1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変NLS（又はNES）を含む抗菌性ポリペプチドをいう。例えば、（i）所定のNLSのうちの1～5個程度のアミノ酸残基が保守的に置換したいわゆる同類アミノ酸置換（conservative amino acid substitutions）によって生じた改変配列（例えば1個又は2，3個の塩基性アミノ酸残基がそれぞれ別の塩基性アミノ酸残基に置換した配列）、（ii）所定のNLSに1～3程度のアミノ酸残基（好ましくは塩基性アミノ酸残基）が付加された改変配列、（iii）所定のNLSから1～3程度のアミノ酸残基（好ましくは非塩基性アミノ酸残基）が欠失した改変配列、（iv）ネイティブなNLSのアミノ末端にメチオニン残基（アミノ基がホルミル化された場合を含む）が付加された改変配列等は、本明細書でいう「部分的な改変が施された配列を含む抗菌性ポリペプチド」に包含される典型例である。

また、NLS及びNESについて1単位（unit）とは、NLS又はNESを構成する一つの配列を指す。従って、あるペプチド鎖にNLSが2単位含まれるというときは、それらが同種であるか異種であるかを問わず相互に独立してNLS（又はNES）と認められる配列が当該ペプチド鎖中に二つ存在することを意味する。

以下、本発明の好適な実施形態を説明する。なお、本明細書において特に言及している事項（例えば抗菌性ポリペプチドの一次構造や鎖長）以外の事柄であって本発明の実施に必要な事柄（例えばペプチド合成、ポリヌクレオチド合成、ペプチドを成分とする薬剤の調製に関するような一般的事項）は、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、薬学、医学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。本発明は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。本明細書中に引用された特許文献、特許出願書類及び他の刊行物の全内容は参考として本明細書中に組み入れられている。

なお、以下の説明では、ペプチド鎖を構成するアミノ酸残基をIUPAC-IUBガイド

10

20

30

40

50

ラインで示されたアミノ酸に関する命名法に準拠した1文字表記（但し配列表では3文字表記）で表す。また、特に断らない限り、NLSと記す場合は、上記の定義に基づく「部分的な改変が施された配列」（即ち改変NLS配列）が包含されるものとする。NESについても同様である。

本発明によって提供される抗菌性ポリペプチドは、天然に存在しない人為的に合成されたポリペプチドであり、NLSが組み込まれた又はNLSのみから成る一次構造を有する。すなわち、NLSが一部分に含まれている天然の核移行性ポリペプチド（ペプチド鎖）と比較して、全体のアミノ酸配列に対するNLSの占める割合が著しく大きくなっている。典型的には、NLSに包含されるアミノ酸残基の総数は少なくとも5アミノ酸（7アミノ酸以上が好ましい）であり、それらアミノ酸残基の数はペプチド鎖全長を構成するアミノ酸残基の総数の実に30%以上（好ましくは40%以上）である。さらには、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の70%以上がNLS部分に含まれるものが好ましく、全アミノ酸残基数の90%以上がNLS部分に含まれるものが特に好ましい。

本発明の抗菌性ペプチドは、全てのアミノ酸残基がL型アミノ酸であるものが好ましいが、抗菌活性を失わない限りにおいて、アミノ酸残基の一部又は全部がD型アミノ酸に置換されているものであってもよい。例えばここで開示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドを化学合成する場合において、その一部又は全部をD型アミノ酸残基で構成することができる。ポリペプチドの鎖長（換言すればアミノ酸残基数）は、含有するNLSやNESの長さに応じて異なり得るので特に限定されないが、5～100個程度のアミノ酸残基で構成されるものが好ましく、7～50個程度のアミノ酸残基で構成されるものがさらに好ましく、9～30個程度のアミノ酸残基で構成されるもの（表1参照）が特に好ましい。

ポリペプチドのコンホメーション（立体構造）については、使用する環境下で抗菌性を発揮する限りにおいて、特に限定されるものではないが、免疫原（抗原）になり難いという観点から直鎖状又はヘリックス状のものが好ましい。このような形状のポリペプチドはエピトープを構成し難い。かかる観点から、抗菌剤に適用するポリペプチドとしては、直鎖状であり比較的分子量（典型的には全アミノ酸残基数：5～30、好ましくは全アミノ酸残基数：5～20）のものが好適である。システイン残基を含まないか或いはその存在割合の小さいアミノ酸配列が好ましい。

本発明のポリペプチドを構成するためのNLSとしては、従来、各種の生物やウイルスから発見されたネイティブなNLSの何れかを選択し、その配列のまま利用することができる。具体例として配列番号1～配列番号80にそれぞれ示されるNLSが挙げられる。塩基性アミノ酸残基の含有率が高いものが好ましい。例えば、40%以上（更に好ましくは50%以上）のアミノ酸残基が塩基性アミノ酸残基（リジン及び／又はアルギニン）であるものが好適である。それらのうちの1種類又は2種類以上のNLSを含むポリペプチドが好ましい。

但し、ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数の40%以上に相当し且つ少なくとも5個のアミノ酸残基がNLS部分に属するようにする。5～25個程度のアミノ酸残基で1単位を構成するNLSが好適である。例えば、RRMKWK（配列番号1）、RVHPYQR（配列番号2）、PKKKRK（配列番号4）GKKRSKA（配列番号5）、RGRRRRQR（配列番号7）、RKKRRRQR（配列番号20）及びPRRRRK（配列番号26）のような5アミノ酸残基以上で構成されるNLSを1単位又は2単位以上含むポリペプチド（典型的にはアミノ酸残基の総数が5～100）が好ましい。斯かるNLS1単位のみから成るポリペプチドであってもよい。

一方、RKKR（配列番号27）のような、1単位が4アミノ酸残基以下のNLSは、それ1単位のみでは本発明のポリペプチドを構成しない。この場合には、同種又は異なるNLSと組み合わせ、全体で5アミノ酸残基以上となるアミノ酸配列を設計する。すなわち、1単位が4アミノ酸残基以下のNLSを2単位以上（典型的には2単位、3単位又は4単位）含むアミノ酸配列を設計するとよい。例えばNLSとしてRKKR（配列番号27）を選択した場合、その配列を二単位タンデムに繋いだ8アミノ酸残基から成る配列（R

10

20

30

40

50

K R R R K R R) を設計することができる。

また、利用可能なデータベース等の情報源から抗菌性ポリペプチドを構築する為の N L S を選択するにあたっては、塩基性アミノ酸残基に富む N L S を選択することが好ましい。例えば、全アミノ酸残基数の 40% 以上、好ましくは 50% 以上、特に好ましくは 70% 以上がアルギニン残基及び／又はリジン残基である N L S が好適な候補であり得る。

また、2 単位又は 3 単位以上の N L S を含むようにアミノ酸配列を設計する場合、好ましくは、これら N L S がペプチド鎖中で隣接して配置されるように設計する。この場合、隣接する一方の N L S の C 末端アミノ酸と他方の N L S の N 末端アミノ酸とが直接結合した形態（後述する実施例参照）が好ましい。しかし、隣接する二つの N L S の間にリンカーとして 1 ～数個のアミノ酸残基が介在してもよい。

10

本発明の抗菌性ポリペプチドは、1 種又は 2 種以上の N L S のみで全体のアミノ酸配列が構成されているものであってもよいが、抗菌性を失わない限りにおいて、N L S に含まれないアミノ酸残基（アミノ酸配列）を含み得る。特に限定するものではないが、N L S 以外の部分配列としてはペプチド鎖の直鎖形状を維持し得る配列が好ましい。

また、内在する N L S の抗菌活性を高める作用効果を奏する別の配列を含むようにアミノ酸配列を設計することが好ましい。上述のとおり、この目的に好適な配列の候補として N E S が挙げられる。

典型的な N E S の配列として L P P L E R L T L（配列番号 81）、L A L K L A G L D I（配列番号 82）が挙げられる。アミノ酸配列が既に知られている種々の N E S を N L S と組み合わせることにより、抗菌活性の高いポリペプチドを構築することができる。好ましくは、N E S が N L S の N 末端側又は C 末端側に隣接するようにしてペプチド鎖を構築する。この形態のポリペプチドとしては、例えば、N 末端側から N L S、N E S の順にタンデムに配置されたポリペプチド、或いは、N 末端側から N E S、N L S の順にタンデムに配置されたポリペプチド、或いは、N 末端側から N L S、N E S、N L S の順にタンデムに配置されたポリペプチド（この場合、N E S を挟んで N 末端側 N L S と C 末端側 N L S とは同種でも異種でもよい。）が挙げられる。

20

本発明の抗菌性ポリペプチドを構成する N L S や N E S として、天然タイプ（native type）の配列のみならず、抗菌性を損なわない限りにおいて、種々の部分的な改変が施された配列を用い得る。換言すれば、ネイティブな N L S に好適な改変を施した配列を含むアミノ酸配列（ペプチド鎖）を設計することによって、より高い抗菌活性を発揮し得るポリペプチドを得ることができる。

30

この種の改変として、典型的なものに、配列中の 1 ～ 3 アミノ酸残基を同類置換すること、および、ペプチド鎖（N L S）の N 末端にメチオニン残基を付加させること（設計したペプチド鎖を組換え DNA 技術を用いて生合成する場合に好適である。）が挙げられる。これらの他、抗菌活性を高めるために行う好適な改変としては、ネイティブな N L S の非塩基性アミノ酸残基（中性若しくは酸性アミノ酸残基）を少なくとも一つ欠失させること、ネイティブな N L S に少なくとも一つの塩基性アミノ酸（典型的にはアルギニン又はリジン）を付加させること、および、ネイティブな N L S に含まれる少なくとも一つの非塩基性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸残基と置換すること、が挙げられる。また、ペプチド鎖の C 末端アミノ酸のカルボキシル基をアミド化すること、或いは N 末端のアミノ基をアシル化（典型的にはアセチル化）することも好ましい改変である。

40

例えば、7 アミノ酸残基から成る典型的な N L S である P K K K R K V（配列番号 4）のプロリンを、塩基性アミノ酸残基に置換した配列 R K K K R K V（配列番号 83）を 1 単位又は 2 単位以上有するポリペプチドは、本発明によって提供される新規な抗菌性ポリペプチドの一つである。

このような改変配列から構成されたポリペプチドであって、さらにその C 末端のカルボキシル基をアミド化した修飾ポリペプチド、例えば R K K K R K V - C O N H₂（配列番号 102）や R K K K R K V R K K K R K V - C O N H₂（配列番号 103）は、本発明によって提供される好適な新規の抗菌性ポリペプチドである。

本発明によって提供される新規なアミノ酸配列（設計されたペプチド鎖）の具体例として

50

、配列番号 83、配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 96、配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 107、配列番号 108、配列番号 109、配列番号 110、配列番号 112、配列番号 114 及び配列番号 116 に示されるアミノ酸配列（又は該配列の 1、2 又は数個のアミノ酸残基が置換（同類置換等）、欠失及び／又は付加されたような改変配列）が挙げられる。これらアミノ酸配列から実質的に構成されるポリペプチドは、グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌に対して高い抗菌活性を有する（後述する実施例参照）。

10

これらポリペプチドは、何れも 30 アミノ酸残基以下（具体的には 5～28 アミノ酸残基）で構成されており、直鎖形状を維持するのに好適である。また、免疫原性も低いために抗菌剤の主成分（抗菌成分）として好適である。

さらに、配列番号 83、配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 96、配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 107、配列番号 108、配列番号 109、配列番号 110、配列番号 112、配列番号 114 及び配列番号 116 の各々に示されるアミノ酸配列のうちの 1 種又は 2 種以上のアミノ酸配列（又は該配列の 1、2 又は数個のアミノ酸残基が置換（同類置換等）、欠失及び／又は付加されたような改変配列）を含む天然に存在しない人為的に合成されたポリペプチド（但し、全体で 100 アミノ酸残基を越えない、好ましくは全体で 50 アミノ酸残基を越えない）が本発明によって提供される。

20

上述のようにしてひとたびアミノ酸配列を設計しさえすれば、そのアミノ酸配列に従い、従来公知の種々の方法でペプチド鎖（即ち本発明の抗菌性ポリペプチド）を合成することができる。例えば、一般的な化学合成法に準じて容易に抗菌性ポリペプチドを製造することができる。従来公知の固相合成法又は液相合成法のいずれを採用してもよい。アミノ基の保護基として Boc (t-butyl oxycarbonyl)、或いは Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) を適用した固相合成法が好適である。

30

本発明の抗菌性ポリペプチドは、市販のペプチド合成機（PerSeptive Biosystems 社、Applied Biosystems 社等から入手可能である。）を用いた固相合成法により、所望するアミノ酸配列、修飾（C 末端アミド化等）部分を有するペプチド鎖を容易に合成することができる。

或いは、遺伝子工学的手法に基づいて本発明の抗菌性ペプチドを生合成してもよい。このアプローチは、比較的鎖長の長いポリペプチドを製造する場合に好適である。すなわち、所望する抗菌性ポリペプチド（NLS をベースに設計したアミノ酸配列）をコードするように決定されたヌクレオチド配列（典型的には ATG 開始コドンを含む）を含むようにして DNA（構造遺伝子）を合成する。この DNA と該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント（プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメントを包含する）とから成る発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを、宿主細胞に応じて構築する。

40

一般的な技法によって、この組換えベクターを所定の宿主細胞（例えばイースト、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類細胞）に導入し、所定の条件で当該宿主細胞又は該細胞を含む組織や個体を培養する。このことにより、目的とするポリペプチドを細胞内で発現、生産させることができる。そして、宿主細胞（分泌された場合は培地中）からポリペプチドを単離し、精製することによって、目的の抗菌性ポリペプチドを得ることができる。例えば、宿主細胞内で効率よく大量に生産させるために融合タンパク質発現システムを利用することができる。すなわち、目的のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子（DNA）

50

を化学合成し、該合成遺伝子を適当な融合タンパク質発現用ベクター（例えばノバジェン社から提供されているpETシリーズおよびアマシャムバイオサイエンス社から提供されているpGEXシリーズのようなGST（Glutathione S-transferase）融合タンパク質発現用ベクター）の好適なサイトに導入する。そして該ベクターにより宿主細胞（典型的には大腸菌）を形質転換する。得られた形質転換体を培養して目的の融合タンパク質を調製する。次いで、該タンパク質を抽出及び精製する。次いで、得られた精製融合タンパク質を所定の酵素（プロテアーゼ）で切断し、遊離した目的のペプチド断片（設計した抗菌性ポリペプチド）をアフィニティークロマトグラフィー等の方法によって回収する。このような従来公知の融合タンパク質発現システム（例えばアマシャムバイオサイエンス社により提供されるGST/Hisシステムを利用し得る。）を用いることによって、本発明の抗菌性ポリペプチドを製造することができる。

10

或いは、無細胞タンパク質合成システム用の鋳型DNA（即ち抗菌性ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む合成遺伝子断片、後述する実施例参照）を構築し、ペプチド合成に必要な種々の化合物（ATP、RNAポリメラーゼ、アミノ酸類等）を使用し、いわゆる無細胞タンパク質合成システムを採用して目的のポリペプチドをインビトロ合成することができる。無細胞タンパク質合成システムについては、例えばShimizuらの論文（Shimizu et al., Nature Biotechnology, 19, 751-755 (2001)）、Madinらの論文（Madin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (2), 559-564 (2000)）が参考になる。これら論文に記載された技術に基づいて、本願出願時点において既に多くの企業がタンパク質（ポリペプチド）の受託生産を行っており、また、無細胞タンパク質合成用キット（例えば、日本の東洋紡績（株）から入手可能なPROTEIOS（商標）Wheat germ cell-free protein synthesis kit）が市販されている。

20

従って、上述のようにしてひとたび抗菌性ポリペプチドのアミノ酸配列を決定・設計しさえすれば、そのアミノ酸配列に従って無細胞タンパク質合成システムによって目的のポリペプチドを容易に生産することができる。例えば、日本の（株）ポストゲノム研究所のピュアシステム（登録商標）に基づいて本発明のポリペプチドを容易に生産することができる。

本発明の抗菌性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列から実質的に構成される一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドは、従来公知の方法によって容易に製造（合成）することができる。すなわち、設計したアミノ酸配列を構成する各アミノ酸残基に対応するコドンを選択することによって、抗菌性ポリペプチドのアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列が容易に決定され、提供される。そして、ひとたびヌクレオチド配列が決定されれば、DNA合成機等を利用して、所望するヌクレオチド配列に対応するポリヌクレオチド（一本鎖）を容易に得ることができる。さらに得られた一本鎖DNAを鋳型として用い、種々の酵素的合成手段（典型的にはPCR）を採用して目的の二本鎖DNAを得ることができる。

30

本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもよく、RNA（mRNA等）の形態であってもよい。DNAは、二本鎖又は一本鎖で提供され得る。一本鎖で提供される場合は、コード鎖（センス鎖）であってもよく、それと相補的な配列の非コード鎖（アンチセンス鎖）であってもよい。

40

本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、種々の宿主細胞中で又は無細胞タンパク質合成システムにて、ポリペプチドを発現させるための組換え遺伝子（発現カセット）を構築するための材料として使用することができる。

例えば、本発明に係る抗菌性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと、該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント（プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメント等を包含する。）とを用いて外来ペプチド発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを構築することができる。ベクターの構成やその構築に使用され

50

る調節エレメントの種類は、目的とする宿主細胞のタイプに依存して異なり得る。組換えベクターの構築には、遺伝子工学分野でよく理解されている種々の制限酵素によるポリヌクレオチド切断技法 (restriction) やポリヌクレオチド断片連結技法 (ligation) が採用される。これら技法は、市販されている種々の装置類を利用することによって容易に行うことができる。

なお、組換えベクターの構築方法及び構築した組換えベクターの宿主細胞への導入方法等は、当該分野で従来から行われている方法をそのまま採用すればよく、かかる方法自体は特に本発明を特徴付けるものではないため、詳細な説明は省略する。

本発明によって提供されるポリヌクレオチドのいくつかは、新規なアミノ酸配列の抗菌性ポリペプチドをコードする。

10

例えば、以下の (a) 及び (b) の要件を備えた抗菌性ポリペプチド：

(a) ペプチド鎖を構成する全アミノ酸残基数が5以上100以下である；

(b) 配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号112、配列番号114及び配列番号116から成る群から選択されるいずれかの配列番号で示される少なくとも1種類のアミノ酸配列又は該配列において1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変アミノ酸配列を含む；

20

をコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む（又はそれら配列から実質的に構成された）、天然に存在しない人為的に合成されたポリヌクレオチドが提供される。

また、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号112、配列番号114及び配列番号116から成る群から選択されるいずれかの配列番号で示される少なくとも1種類のアミノ酸配列又は該配列において1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されて形成された改変アミノ酸配列から実質的に構成される抗菌性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む（又はそれら配列から実質的に構成された）、天然に存在しない人為的に合成されたポリヌクレオチドが提供される。

30

本発明の抗菌性ポリペプチドは、比較的広い抗菌スペクトルを有しており、抗菌剤（薬上の組成物）の主成分として好適に用いられる。例えば、細菌感染症の治療、創傷面の消毒、眼病予防、口腔内洗浄（うがい）、食品の防腐や鮮度保持、脱臭、家具や衛生機器表面の殺菌又は静菌等の目的に用いられ得る。

抗菌性ポリペプチドの他、抗菌剤に含まれる担体すなわち副次的成分（典型的には製薬上許容されるもの）としては、抗菌剤の用途や形態に応じて適宜異なり得るが、種々の充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、賦形剤、色素、香料等が挙げられる。

40

抗菌剤の形態に関して特に限定はない。例えば、内用剤若しくは外用剤の典型的な形態として、軟膏、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセルが挙げられる。また、注射等に用いるため、使用直前に生理食塩水等に溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物、造粒物とすることもできる。

なお、抗菌性ポリペプチド（主成分）及び種々の担体（副成分）を材料にして種々の形態の薬剤を調製するプロセス自体は従来公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本発明を特徴付けるものでもないため詳細な説明は省略する。

処方に関する詳細な情報源として、例えば Comprehensive Medicin

50

al Chemistry, Corwin Hansch監修, Pergamon Press刊(1990)が挙げられる。

本発明によって提供される抗菌剤は、その形態及び目的に応じた方法や用量で 사용할ことができる。例えば、液剤は、静脈内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内への注射或いは浣腸によって患者に投与することができる。また、錠剤等の固体形態のものは経口投与することができる。また、衛生陶器表面の消毒(殺菌)や食品の防腐目的に使用する場合は、比較的多量(例えば1~100mg/ml)のペプチドを含有する液剤を対象物の表面に直接スプレーするか、或いは、当該液剤で濡れた布や紙で対象物の表面を拭くとよい。これらは例示にすぎず、従来のペプチド系抗生物質やペプチドを構成成分とする農薬、医薬部外品等と同じ形態、使用方法を適用することができる。

10

例えば、放射線治療を受けているガン患者やエイズ患者にとって、細菌感染症の予防及び治療は重大な関心事である。本発明によって提供される抗菌性ポリペプチドは、細菌に選択的に抗菌作用を示し得る。このため、本発明に係る抗菌性ポリペプチドは、抗菌剤の主成分として有用である。

また、本発明の抗菌性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、いわゆる遺伝子治療に使用する素材として用い得る。例えば、抗菌性ポリペプチドをコードする遺伝子(典型的にはDNAセグメント、或いはRNAセグメント)を適当なベクターに組み込み、目的とする部位に導入することにより、常時生体(細胞)内で本発明に係る抗菌性ポリペプチドを発現させることが可能である。従って、本発明によって提供される本発明の抗菌性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAセグメント、RNAセグメント等)

20

は、上述した患者等に対し、細菌感染を予防し又は治療する薬剤として有用である。再生医療の分野において、皮膚、骨、各種の臓器の培養時の細菌感染を防止することは重要である。本発明によって提供される抗菌性ポリペプチドは、哺乳動物細胞及び組織に対する毒性が極めて低く(後述する実施例参照)、細菌に選択的に抗菌作用を示す。このため、培養臓器等の細菌感染を防止する薬剤として極めて有用である。例えば、後述する実施例に示すように、適当な濃度で本発明の抗菌性ポリペプチド単独又は当該ポリペプチドを主成分の一つとする抗菌剤を培養液中に添加することにより、培養中の臓器等の細菌感染を防止することができる。

また、培養細胞や培養組織に対して、本発明の抗菌性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを遺伝子治療に使用する素材として用いることができる。例えば、本発明の抗菌性ポリペプチドをコードする遺伝子(典型的にはDNAセグメント又はRNAセグメント)を適当なベクターに組み込み、目的とする培養組織に導入することにより、常時或いは所望する時期に培養組織(細胞)内で本発明に係る抗菌性ポリペプチドを発現させることが可能である。従って、本発明によって提供される本発明の抗菌性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAセグメント、RNAセグメント等)は、培養組織の細菌感染を防止する薬剤として有用である。

30

以下、本発明に関するいくつかの実施例を説明するが、本発明をかかる実施例に示すものに限定することを意図したものではない。

<実施例1：抗菌性ポリペプチドの化学合成>

計36種類のポリペプチド(サンプル1~33、比較サンプル1~3)を後述するペプチド合成機を用いて製造した。表1には、これらポリペプチドのアミノ酸配列を列挙している。

40

表 1

試料 No.	アミノ酸配列	総アミノ酸残基数
サンプル 1	PKKKRKV (配列番号 4)	7
サンプル 2	RQARRNRRRRWR (配列番号 2 1)	12
サンプル 3	RIRKKLR (配列番号 4 3)	7
サンプル 4	PPRKKRTVV (配列番号 2 8)	9
サンプル 5	RKKRRQRRR (配列番号 2 0)	9
サンプル 6	PRRRK (配列番号 2 6)	5
サンプル 7	RKKKRKV (配列番号 8 3)	7
サンプル 8	PKKKRKVLPLERLTL (配列番号 8 4)	16
サンプル 9	LPPLERLTLPKKKRKV (配列番号 8 5)	16
サンプル 10	RQARRNRRRRWRPLPLERLTLD (配列番号 8 6)	22
サンプル 11	PKKKRKVLPLERLTLPKKKRKV (配列番号 8 7)	23
サンプル 12	RKKKRKVLPPLERLTL (配列番号 8 8)	16
サンプル 13	LPPLERLTLRKKKKRKV (配列番号 8 9)	16
サンプル 14	RKKKRKVLALKLAGLDI (配列番号 9 0)	17
サンプル 15	LALKLAGLDIRKKKKRKV (配列番号 9 1)	17
サンプル 16	PKKKRKVPKKKKRKV (配列番号 9 2)	14
サンプル 17	RIRKKLRRIRKKLR (配列番号 9 3)	14
サンプル 18	PRRRKPRRRK (配列番号 9 5)	10
サンプル 19	PKKKRKVPPRKKRTVV (配列番号 9 7)	16
サンプル 20	RKKKKRVRKKKKRKV (配列番号 9 8)	14
サンプル 21	RKKKKRVRKKKKRVRKKKKRKV (配列番号 9 9)	21
サンプル 22	RKKKKRVRKKKKRVRKKKKRVRKKKKRKV (配列番号 100)	28
サンプル 23	PRRRK (配列番号 101)	5
サンプル 24	RKKKKRKV (配列番号 102)	7
サンプル 25	RKKKKRVRKKKKRKV (配列番号 103)	14
サンプル 26	PKKKRRV (配列番号 104)	7
サンプル 27	LKRKLQR (配列番号 50)	7
サンプル 28	RKKKKRKVVKKKKR (配列番号 105)	14
サンプル 29	RKKKKRKVRKKKKR (配列番号 106)	13
サンプル 30	LKRKLQRLKRKLQR (配列番号 107)	14
サンプル 31	PKKKRKVALGKLALGKL (配列番号 108)	17
サンプル 32	RQARRNRRRRWRRIAGKI (配列番号 109)	17
サンプル 33	MRKKKKRVRKKKKRKV (配列番号 110)	15
比較サンプル 1	RKRR (配列番号 27)	4
比較サンプル 2	LPPLERLTL (配列番号 81)	9
比較サンプル 3	LALKLAGLDI (配列番号 82)	10

表 1 に記すサンプル 1 ～ 6 及び 27 は、各々異なるネイティブタイプの NLS1 単位のみから成るポリペプチドである。

サンプル 7 は、サンプル 1 のアミノ酸配列 (PKKKRKV: 配列番号 4) における N 末端アミノ酸のプロリンをアルギニンに置換した改変配列 (RKKKKRKV: 配列番号 83) から成るポリペプチドである。

サンプル 8 ～ 11 は、NLS と一般的な NES とをタンデムに連結した配列から成るポリペプチドである。すなわち、サンプル 8 では、NLS (PKKKRKV: 配列番号 4) の

10

20

30

40

50

C末端側にNES (LPPLERLT L: 配列番号81) が隣接している。逆にサンプル9では、NES (LPPLERLT L: 配列番号81) のC末端側にNLS (PKKKRK V: 配列番号4) が隣接している。サンプル10では、NLS (RQARRNR RRRWR: 配列番号21) のC末端側にNES (LPPLERLT L: 配列番号81) が隣接しており、更にそのC末端にはアスパラギン酸が一つ付加している。サンプル11では、NLS (PKKKRK V: 配列番号4) のC末端側にNES (LPPLERLT L: 配列番号81) が隣接し、さらにそのC末端側にNLS (PKKKRK V: 配列番号4) が隣接している。

サンプル12～15は、サンプル7の改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) と一般的なNES とを連結した配列から成るポリペプチドである。すなわち、サンプル12では、改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) のC末端側にNES (LPPLERLT L: 配列番号81) が隣接している。逆にサンプル13では、NES (LPPLERLT L: 配列番号81) のC末端側に改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) が隣接している。サンプル14では、改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) のC末端側に別のNES (LALKLAGLDI: 配列番号82) が隣接している。逆にサンプル15では、NES (LALKLAGLDI: 配列番号82) のC末端側に改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) が隣接している。

サンプル16～22及び30は、NLS又は改変NLSを2単位以上連結した配列から成るポリペプチドである。すなわち、サンプル16では、NLS (PKKKRK V: 配列番号4) が2単位連結している。サンプル17では、NLS (RI RKKLR: 配列番号43) が2単位連結している。サンプル18では、5アミノ酸残基から成るNLS (PRRRK: 配列番号26) が2単位連結している。サンプル30では、NLS (LKRKLQ R: 配列番号50) が2単位連結している。サンプル19では、二つの異なるNLS (PKKKRK V: 配列番号4及びPPRRKKRTVV: 配列番号28) が1単位ずつタンデムに連結している。

また、サンプル20、21及び22は、各々、上記改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) が2単位、3単位及び4単位連結したものである。

サンプル23は、NLS (PRRRK: 配列番号26) のC末端アミノ酸のカルボキシル基がアミド化されたものである。

サンプル24は、上記改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) のC末端アミノ酸のカルボキシル基がアミド化されたものである。

サンプル25は、上記改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) を2単位連結した配列 (RKKKRKV RKKKRKV: 配列番号98) のC末端アミノ酸のカルボキシル基がアミド化されたものである。

サンプル26は、サンプル1のアミノ酸配列 (PKKKRK V: 配列番号4) のN末端側から第6番目のアミノ酸残基「リジン」を「アルギニン」に同類置換した配列 (PKKKRRV: 配列番号104) から成るポリペプチドである。

サンプル28は、サンプル7の改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) のC末端側に塩基性アミノ酸に富む7アミノ酸残基を付加したポリペプチドである。具体的には、改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) を反転させた配列 (VKRRKKR) を付加した。

サンプル29は、サンプル7の改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) のC末端側に全て塩基性アミノ酸である6アミノ酸残基 (KRKKKR) を付加したポリペプチドである。

サンプル31は、サンプル1のNLS (PKKKRK V: 配列番号4) のC末端側に10アミノ酸残基 (ALGKLALGKL) を付加したポリペプチドである。

サンプル32は、サンプル2のNLS (RQARRNR RRRWR: 配列番号21) のC末端側に5アミノ酸残基 (IAGKI) を付加したポリペプチドである。

サンプル33は、サンプル7の改変NLS (RKKKRKV: 配列番号83) を2単位連結し、さらにそのN末端側にメチオニン残基を付加したポリペプチドである。

10

20

30

40

50

本実施例では、後述する抗菌活性に関して上記各サンプルのポリペプチドの比較対照とするため、本発明の範疇に属しないポリペプチドを3種類合成した。

すなわち、比較サンプル1は、4アミノ酸残基から成る短いNLS（RKRR：配列番号27）1単位のみから成るポリペプチドである。

また、比較サンプル2及び3は各々異なるNES（LPPLERLTLL：配列番号81、LALKLAGLDI：配列番号82）1単位のみから成るポリペプチドであり、NLSを含まない。

上述した各ポリペプチド（個々のアミノ酸配列は表1及び配列表を参照）は、市販のペプチド合成機（PEPTIDE SYNTHESIZER 9050、PerSeptive Biosystems社製品）を用いて固相合成法（Fmoc法）により合成した。10
なお、縮合剤としてHATU（Applied Biosystems社製品）を使用し、固相合成法に用いた樹脂及びアミノ酸はNOVA biochem社から購入した。アミノ酸配列のC末端をアミド化する場合には、固相担体として「Rink Amide resin（100～200mesh）」を使用した。

而して、上記ペプチド合成機の合成プログラムに準じて脱保護基反応及び縮合反応を反復して樹脂に結合するFmoc-アミノ酸からペプチド鎖を伸長していき、目的の鎖長の合成ペプチドを得た。具体的には、20%ピペリジン/ジメチルホルムアミド（DMF）（ペプチド合成用グレード、関東化学（株）製品）によって、アミノ酸のアミノ保護基であるFmocを切断除去し、DMFで洗浄し、Fmoc-アミノ酸（-OH）各4eqを反応させ、DMFで洗浄する操作を反復した。そして、ペプチド鎖の伸長反応が全て終了した20
後、20%ピペリジン/DMFによりFmoc基を切断し、DMF、メタノールの順で上記反応物を洗浄した。

固相合成後、合成したペプチド鎖を樹脂と共に遠沈管に移し、エタンジオール1.8mL、m-クレゾール0.6mL、チオアニソール3.6mL及びトリフルオロ酢酸2.4mLを加え、室温で2時間攪拌した。その後、ペプチド鎖に結合していた樹脂を濾過して除去した。

次いで、濾液に冷却エタノールを加え、氷冷水で冷却してペプチド沈殿物を得た。その後、遠心分離（2500rpmで5分間）によって上澄みを廃棄した。沈殿物に冷ジエチルエーテルを新たに加えて十分に攪拌した後、上記と同じ条件で遠心分離を行った。この攪拌と遠心分離の処理を計3回反復して行った。30

得られたペプチド沈殿物を真空乾燥し、高速液体クロマトグラフ（Waters600：Waters社製品）を用いて精製を行った。

具体的には、プレカラム（日本Waters（株）製品、Guard-Pak Deltapak C18A300）及びC18逆相カラム（和光純薬工業（株）製品、Wakopak WS-DHA 4.6×150mm ODS-C18）を使用し、0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液との混合液を溶離液に用いた。すなわち、溶離液に含まれる上記トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液の分量を経時的に増大させつつ（容積比で10%から80%への濃度勾配を設ける）、1.5mL/分の流速で上記カラムを用いて30～40分間の分離精製を行った。なお、逆相カラムから溶離したペプチドは紫外線検出器（490E Detector：Waters社製品）を用いて波長：220nmで検出され、記録チャート上にピークとして示される。40

また、溶離した各ポリペプチドの分子量をPerSeptive Biosystems社製のVoyager DE RP（商標）を用いてMALDI-TOF MS（Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry：マトリックス支援レーザーイオン化－飛行時間型－質量分析）に基づいて決定した。その結果、目的のポリペプチドが合成・精製されていることが確認された。

<実施例2：合成ポリペプチドの抗菌活性>

本発明に係る抗菌性ポリペプチド（サンプル1～33）及び比較サンプル1～3のポリペ 50

プチドについて、グラム陰性細菌（大腸菌：E. coli）及びグラム陽性細菌（黄色ブドウ球菌：S. aureus）に対する抗菌活性（最小阻止濃度：MIC）を96穴（well）マイクロプレートを用いた液体培地希釈法により求めた。

すなわち、ポリペプチド濃度が500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9、1.9、1.0及び0.5 μ Mとなる液体肉汁培地（DIFCO社製品「NUTRIENT BROTH Dehydrated」）をそれぞれ作成し、96穴マイクロプレートに充填した。一方、LB Broth, Lennox（DIFCO社製品）で18時間、37℃にて静置培養した菌液（約 2×10^6 cells/mL）を、薬剤溶液（上記ポリペプチド含有肉汁培地）と等量、96穴マイクロプレートの各ウェル（well）に接種した。接種後、37℃の恒温器内で培養を開始し、24時間後及び48時間後の濁度により菌発生の有無を調べた。その計測時における菌による濁度の増加が認められない最小ポリペプチド濃度を本実施例におけるMICと定めた。

かかる抗菌試験に基づく各サンプル及び比較サンプルの抗菌活性（MIC）を表2に示す。なお、表2のMICの単位は μ Mである。

表 2

試料 No.	抗菌活性 (μ M)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24 時間後	48 時間後	24 時間後	48 時間後
サンプル 1	62.5	>500	62.5	125.0
サンプル 2	3.9	3.9	3.9	3.9
サンプル 3	62.5	62.5	62.5	62.5
サンプル 4	250.0	>500	125.0	125.0
サンプル 5	1.9	3.9	15.6	15.6
サンプル 6	>500	>500	250.0	500.0
サンプル 7	62.5	500.0	15.6	31.3
サンプル 8	31.3	31.3	3.9	3.9
サンプル 9	31.3	31.3	3.9	3.9
サンプル 10	3.9	3.9	1.9	3.9
サンプル 11	3.9	3.9	1.9	1.9
サンプル 12	15.6	15.6	3.9	3.9
サンプル 13	15.6	15.6	3.9	3.9
サンプル 14	3.9	3.9	1.0	1.9
サンプル 15	3.9	3.9	1.9	3.9
サンプル 16	1.9	1.9	7.8	15.6
サンプル 17	1.9	3.9	3.9	3.9
サンプル 18	3.9	3.9	7.8	7.8
サンプル 19	3.9	3.9	7.8	7.8
サンプル 20	1.9	1.9	1.9	1.9
サンプル 21	1.9	1.9	0.5	0.5
サンプル 22	1.9	1.9	1.0	1.0
サンプル 23	31.3	31.3	7.8	15.6
サンプル 24	3.9	15.6	1.0	1.0
サンプル 25	3.9	3.9	1.9	1.9
サンプル 26	62.5	500.0	125.0	125.0
サンプル 27	500.0	>500	125.0	125.0
サンプル 28	1.0	1.0	3.9	7.8
サンプル 29	1.0	1.0	3.9	7.8
サンプル 30	3.9	3.9	3.9	3.9
サンプル 31	7.8	7.8	3.9	7.8
サンプル 32	3.9	3.9	1.9	1.9
サンプル 33	3.9	3.9	1.9	1.9
比較サンプル 1	>500	>500	>500	>500
比較サンプル 2	>500	>500	>500	>500
比較サンプル 3	>500	>500	>500	>500

表 2 に示す結果から明らかなように、本発明に係るポリペプチド（サンプル 1～33）は、比較対照のポリペプチド（比較サンプル 1～3）と比べ、いずれも高い抗菌活性を示した。

NLS と NES とが近接して配置されているポリペプチド（サンプル 10, 14, 15 等）ではグラム陽性細菌及びグラム陰性細菌のいずれに対しても高い抗菌活性が認められた。そして、NLS が 2 単位又はそれ以上タンデムに配置されているポリペプチド（例えば

10

20

30

40

50

サンプル16～22)において、特に高い抗菌活性が認められた。

また、NLS又は改変NLSを1単位以上含み、且つ、塩基性アミノ酸残基に富む(好ましくは8以上有する)ポリペプチド(例えばサンプル2, 5, 16～22, 28, 29)が、特に高い抗菌活性を示した。また、C末端がアミド化されたポリペプチド(サンプル24)は、C末端がアミド化されていない同配列のポリペプチド(サンプル7)よりも高い抗菌活性を示すことが確かめられた。

表2に示す結果より、本発明に係る抗菌性ポリペプチドが優れた抗菌活性と広い抗菌スペクトルとを有することが確かめられた。

<実施例3：抗菌スペクトル>

次に、サンプル16, 17, 10, 14及び20のポリペプチドについて実施例2と同様の抗菌試験(MIC測定試験)を種々の細菌(表3参照)を対象に行い、これらポリペプチドの抗菌スペクトルを評価した。その結果、表3に示すように、本発明の抗菌性ポリペプチドは、広範囲のグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して抗菌活性を有することが確かめられた。

表 3

供試菌	24時間後の抗菌活性: MIC(μ M)				
	サンプル16	サンプル17	サンプル10	サンプル14	サンプル20
<i>Bacillus cereus</i> IFO3001	>286.0	>260.3	21.4	32.0	>267.9
<i>Bacillus cereus</i> IFO15305	>286.0	>260.3	42.9	64.1	133.9
<i>Bacillus pumilus</i> IFO3813	143.0	16.3	5.4	4.0	16.7
<i>Bacillus brevis</i> IFO15304	>286.0	>260.3	21.4	128.2	133.9
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	2.2	1.0	0.7	1.0	2.1
<i>Bacillus subtilis</i> IFO3134	8.9	0.5	0.7	1.0	4.2
<i>Micrococcus luteus</i> IFO12708	8.9	4.1	5.4	4.0	8.4
<i>Staphylococcus aureus</i> COL(MRSA)	>286.0	16.3	10.7	16.0	33.5
<i>Staphylococcus aureus</i> RN450(*MSSA)	71.5	32.5	10.7	16.0	33.5
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO12732	71.5	2.0	1.3	**	4.2
<i>Staphylococcus aureus</i> IID1677(MRSA)	35.7	8.1	10.7	**	8.4
<i>Escherichia coli</i> IFO12713	8.9	8.1	10.7	8.0	8.4
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 sakai	17.9	8.1	10.7	8.0	8.4
<i>Escherichia coli</i> Q26:H11	17.9	8.1	10.7	16.0	8.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352	8.9	8.1	10.7	32.0	4.2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315	8.9	8.1	10.7	64.1	8.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	4.5	8.1	10.7	32.0	4.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3080	8.9	8.1	10.7	16.0	4.2
<i>Salmonella enteritidis</i> IFO3313	2.2	4.1	10.7	32.0	4.2
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO1324	35.7	4.1	10.7	>256.3	8.4

<実施例4：哺乳動物に対する安全性試験>

哺乳動物細胞に対する毒性試験を以下のように行った。

すなわち、A172(ヒト神経膠腫)細胞を前日に96穴プレートの1ウェル当たり 8×10^3 個ずつまき、37℃で5%CO₂の条件下、静置培養した。次の日、培地を除去し、PBSで1回洗浄後、ポリペプチド(サンプル1～26のいずれか)を0, 0.5, 5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mlの濃度で含む無血清培地(血清無添加のGIBCO BRL社製培地「RPMI 1640」)をウェル当たり100 μ lずつ添加した(1試料当たりウェル数(n)=1又は2)。その後、上記と同様の条件で24時間静置培養した。

培養終了後、培地を除去し、PBSで1回洗浄した。次いで、5%WST-8(細胞増殖測定用試薬: キンダ化学(株)製品)を含むGIBCO BRL社製DMEM培地(10%FBS含有)をウェル当たり100 μ lずつ添加し、上記と同様の条件で1時間静置培養した。その後、プレートリーダーを用い、主波長450nm、参照波長600nmとして吸光度を測定した。ポリペプチド0 μ g/ml(即ち無添加)の試料の吸光度値を100%とし、各ポリペプチド濃度における相対的細胞生存率を求めた。ここで、ポリペプチド濃度100 μ g/mlにおける相対的細胞生存率が80%以上のものを「毒性なし」、

80%未満のものを「毒性あり」とした。その結果、いずれのポリペプチド（サンプル1～26）についても「毒性なし」であった。

また、サンプル10, 12, 13, 14, 15及び20を各々含む計6種類のペプチド含有注射液（溶媒：生理食塩水）を調製した。これらをそれぞれマウスに腹腔内注射し、LD₅₀値を求めた。

その結果、ここで試験した抗菌性ポリペプチドのLD₅₀は、いずれも150mg/kgより大きかった。すなわち、本発明に係る抗菌性ポリペプチドの哺乳動物に対する毒性が極めて低いことが確かめられた。

<実施例5：顆粒剤の調製>

サンプル20のポリペプチド50mgと結晶化セルロース50mg及び乳糖400mgとを混合した後、エタノールと水の混合液1mLを加え混練した。この混練物を常法に従って造粒し、抗菌性ポリペプチドを主成分とする顆粒剤を得た。

<実施例6：抗菌性ポリペプチドの遺伝子工学的合成（1）>

市販の核酸合成機（Applied Biosystems社製品「ABI3900」）を使用マニュアルに準じて使用して、配列表の配列番号111、113及び115に示すヌクレオチド配列から成る一本鎖DNAを合成した。また、それらDNAに基づいて二本鎖DNAを形成するためのプライマーとして、1種類のフォワードプライマー（配列番号117）及び3種類のリバースプライマー（配列番号118、119及び120）を化学合成した。なお、配列番号118、119及び120の各リバースプライマーは、それぞれ、配列番号111、113及び115に示す配列の二本鎖DNAを合成するために使用される。

そして、これらプライマーを使用した一般的なポリメラーゼ連鎖反応（例えば「PCR Protocols: Current Methods and Applications, White編, Humana Press刊（1993）の記述が参考になる。）により、配列表の配列番号111、113及び115に示すヌクレオチド配列を含む二本鎖DNAを合成した。

これら配列番号111、113及び115に示す二本鎖DNAは、それぞれ、配列番号112、114及び116に示すアミノ酸配列の抗菌性ポリペプチドをコードしており、そのコード領域の上流側（5'末端側）にプロモータ配列を有し、下流側（3'末端側）に終止コドンを含んでいる。

次に、Shimizuらの論文（Shimizu et al., Nature Biotechnology, 19, 751-755（2001））に記載されるプロトコルに準じて、配列番号115に示すヌクレオチド配列のDNAを鋳型にして無細胞タンパク質合成システム（無細胞発現システム）によって、アミノ酸配列がMPKKKRKVLPPLERLTLPPKKKRKV（配列番号116）のポリペプチドを合成した。

すなわち、以下の成分：9mM酢酸マグネシウム、5mMリン酸カリウム、95mMグルタミン酸カリウム、5mM塩化アンモニウム、0.5mM塩化カルシウム、1mMスペルミジン、8mMプトレッシン、1mMジチオトレイトール（DTT）、2mMのATP、2mMのGTP、1mMのCTP、1mMのUTP、10mMリン酸クレアチン、2.8ユニット（A₂₆₀）のtRNA混合物（Roche社製品）、0.5μgの10-ホルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸、0.1mMの各アミノ酸、12ピコモルのリボソーム、及びHis-tag付きの各種酵素及びファクター類（即ち、1μgの開始因子1（IF1）、2μgのIF2、0.75μgのIF3、1μgの伸長因子-G（EF-G）、2μgのEF-Tu、1μgのEF-Ts、0.5μgの終結因子1（RF1）、0.5μgのRF3、0.5μgのRRF、それぞれ30～300ユニットのアミノアシル-tRNAシンテターゼ（計20種類）及びメチオニル-tRNAトランスフォーミラーゼ、0.2μgのクレアチンキナーゼ（Roche社製品）、0.15μgのミオキナーゼ（Sigma社製品）、0.054μgのヌクレオシド-γ-ホスファートキナーゼ、0.1ユニットのピロホスファターゼ（Sigma社製品）及び0.5μgのT7 RNAポリメラーゼ）；

10

20

30

40

50

を含む反応液 50 μ l (pH 7.3) を調製した。この反応液を 37℃で 5 分間インキュベートした。その後、上記鋳型 DNA をこの反応液に添加し、37℃で 1 時間インキュベートした。その後、反応液を水中に移すことにより、ペプチドの合成反応を停止させた。次いで、反応液を限外濾過用デバイス (Amicon (登録商標) Centricon (登録商標) YM-100 デバイス、ミリポア社製品) に装填して遠心分離し、溶出液を回収した。次いで、回収液を Ni-NTA アガロース (Qiagen 社製品) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。そして、この精製液を SDS-PAGE に供することにより、目的のポリペプチドが合成されていることを確認した。

すなわち、回収した精製液 (目的のペプチドを含む。) の一部を 15~25% のアクリルアミド濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲルに載せ、300V で 50 分間の電気泳動を行った。尚、このゲルには、最終的な精製液の他に、上述したペプチド合成反応直後即ち上記 37℃ 1 時間インキュベーション直後の反応液の一部、および、上記限外濾過後の溶出液の一部も同時に載せた。また、ネガティブコントロールとして、上記鋳型 DNA (配列番号 115) を添加しないことを除いて同様のプロセスを実施して得た上記 37℃ 1 時間インキュベーション直後の反応液、上記限外濾過の溶出液および上記精製液を同じゲルに載せた。さらに、別途ペプチド合成機 (上述の PEPTIDE SYNTHESIZER 9050) で合成した配列番号 116 のポリペプチド (MPKKKRKVLPPLERLTLPPKKKRKV) を同じゲルに載せた。

電気泳動後、蛍光染色剤 (アマシャムバイオサイエンス (株) 製品: SYPRO (商標) Orange) を含む染色液 (7.5% 酢酸) にゲルを 40 分間浸漬し、ゲル中に含まれるペプチドのバンドを染色した。その後、7.5% 酢酸中にゲルを漬けて余剰の染色剤を除去した。そして、アマシャムファルマシア (株) 製品のイメージアナライザー (商品名「Typhoon」) を使用して解析した (励起波長: 532nm、蛍光フィルター: 580BP30)。結果 (染色後のイメージ) を図 1 に示す。図 1 に示すレーン 1 は、アマシャムバイオサイエンス (株) 製品の LMW マーカー (製品名: LMW Marker Kit、製品コード: 17-0446-01) の泳動パターンを示しており、レーン下流側から約 14.4kDa、20.1kDa、30kDa、45kDa、66kDa、97kDa のバンドがみられる。レーン 2 は、アマシャムバイオサイエンス (株) 製品のペプチドマーカーキット (製品名: Peptide Marker Kit、製品コード: 80-1129-83) の泳動パターンを示しており、レーン下流側から約 6.2kDa、8.2kDa 及び 10.7kDa、14.4kDa、16.9kDa のバンドがみられる。レーン 3 及びレーン 4 は、それぞれ、鋳型 DNA を含む場合と含まない場合の上記ペプチド合成反応直後の反応液の泳動パターンを示している。また、レーン 5 及びレーン 6 は、それぞれ、鋳型 DNA を含む場合と含まない場合の上記限外濾過の溶出液の泳動パターンを示している。また、レーン 7 は、鋳型 DNA を含む場合の Ni-NTA アガロースを流通した上記精製液の泳動パターンを示している。レーン 8 は、ペプチド合成機によって合成した目的配列のポリペプチド (配列番号 116) の泳動パターン (70ng/3.4 μ l) を示している。レーン 9 は、鋳型 DNA を含まない場合の Ni-NTA アガロースを流通した上記精製液の泳動パターンを示している。なお、レーン 10 は、同様の無細胞タンパク質合成システム (上記 Shimizu らの論文参照) によって合成し、同様のプロセスで精製した後のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の泳動パターンを示している。図 1 から明らかなように、レーン 3、5 及び 7 (矢印参照) には、レーン 8 (矢印参照) と同じ位置に明確なバンドが存在している。このバンドは、鋳型 DNA を添加していないレーン 4、6 及び 9 には認められない。

次に、上記ゲルを乾燥後、レーン 7 の目的のバンド (図 1 において矢印で示したバンド) を切り出し、アマシャムバイオサイエンス社製のマトリックス支援イオン化-飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS: 商品名「Voyager RPde」) を用いて、ポリペプチドの PMF 分析 (Peptide Mass Fingerprinting analysis) を行った。その結果、図 2 に示すような分子イオンのピークが認められた。観察されたピークの質量数 ($[M+H]^+ = 2939.94$ 、 $[M+2$

10

20

30

40

50

$[H]^{2+} = 1470.49$) は、計算上の質量数 ($[M+H]^+ = 2939.89$ 、 $[M+2H]^{2+} = 1470.45$) とほぼ一致していた。また、N末端及び／又はC末端が分解されたペプチド或いは側鎖に修飾を受けたアミノ酸残基を有するペプチドの存在を示すピークは認められなかった(但しN末端のメチオニンのアミノ基は正常にホルミル化されている。)

次に、上記MALDI-TOF MSをPSDモードで運転してPSD (post-source decay) 解析(即ちTOF MS内を飛行中にフラグメント化した励起分子イオンを検出する方法)を行った。その結果、図3に示すようなフラグメントイオンのピークを得た。かかる解析により、レーン7の目的のポリペプチドのアミノ酸配列は、N末端から順にM-P-(K/Q)-(K/Q)-(K/Q)-R-(K/Q)-V-(L/I)と同定された。この結果は、配列番号116のポリペプチドのアミノ酸配列MPKKKRKVLと一致する。

以上の結果から、鋳型DNAを用いると、上述の無細胞タンパク質合成システムによって、本発明の抗菌性ペプチドが容易に合成・製造し得ることが確かめられた。

<実施例7：抗菌性ポリペプチドの遺伝子工学的合成(2)>

組換えDNA技法を用いて目的のポリペプチド(上述のサンプル17)の配列を含むGST融合タンパク質(Glutathione S-transferase/His-Tag融合タンパク質)を大腸菌内で発現させ、回収したGST融合タンパク質を酵素で消化して目的のポリペプチド(断片)を分離・精製した。

先ず、市販の核酸合成機(Applied Biosystems社製品「ABI3900」)を使用マニュアルに準じて使用して、配列番号121及び123に示す互いに相補するヌクレオチド配列から成る一本鎖DNAをそれぞれ合成した。次いでこれらDNAをアニーリングして二本鎖DNAを得た。配列番号121が本実施例に係るポリペプチドのアミノ酸配列をコードする配列であり、配列番号123がその相補配列である。この合成ポリヌクレオチドにコードされているポリペプチドのアミノ酸配列を、配列番号121及び配列番号122に示している。このアミノ酸配列は、上述のサンプル17(配列番号93)のアミノ酸配列と、そのN末端側に配置された1つのメチオニン残基、6つの連続するヒスチジン残基及び1つのグルタミン酸残基とから構成されている。メチオニン残基は後述する融合タンパク質が不溶性として発現した場合に融合GST部分から目的のアミノ酸配列部分を臭化シアン切断できるようにするために挿入されている。また、6個のヒスチジン配列は、融合GSTを切断後に目的のポリペプチド(断片)をアフィニティ回収するためのタグ部分である。さらにヒスチジンに隣接するグルタミン酸残基は、目的のポリペプチドからタグ部分を切り取るために挿入されている。

配列番号121に示す配列から明らかなように、この合成ポリヌクレオチドの両端(即ちメチオニンに対応するコドンの上流及び終始コドンの下流)にはそれぞれ制限酵素EcoRI及びPstIの認識サイトが含まれている。この二本鎖DNAを制限酵素EcoRI及びPstIで切断した。制限酵素消化物をアガロースゲル電気泳動に供し、両端にEcoRI切断サイト及びPstI切断サイトを有するDNA断片を精製した。

次に、図4に示すように、ノバジェン(Novagen)社から購入したGST融合タンパク質発現ベクター(pET-41a(+))DNA:カタログNo. 70556-3)を制限酵素EcoRI及びPstIで切断し、EcoRI及びPstIサイトに上記二本鎖DNA(配列番号121)をライゲーション(挿入)した。なお、使用したGST融合タンパク質発現ベクター「pET-41a(+)」(全ヌクレオチド配列:5933bp)のクローニング/発現領域の詳細なマップはノバジェン(Novagen)社のカタログに詳細に記載してある。

ライゲーション処理したプラスミドを用いてコンピテントセル(E. coli JM109)を形質転換した。得られた形質転換体をカナマイシンを含むLB培地(Km⁺)を用いて37℃で培養し、その培養物から上記二本鎖DNAが挿入されたプラスミドで形質転換されたクローンを単離した。このクローンを培養し、その培養物から上記二本鎖DNAが挿入されたプラスミドを単離・回収した。次に、回収した組換えプラスミドを使用し、

10

20

30

40

50

融合タンパク質高発現用大腸菌 (E. coli BL21 (DE3)) を形質転換した。得られた形質転換体をLB培地 (Km⁺) を用いて37℃で培養し、その培養物から上記二本鎖DNAが挿入されたプラスミドで形質転換されたクローンを単離した。

次に、上記単離したクローンをLB培地 (Km⁺) 3リットルを用いて30℃で培養した。OD₆₀₀が0.9のときにIPTGを終濃度0.5mMとなるように添加し、融合タンパクの産生を誘導した。そして6時間後に培養液を遠心分離し、約11.6gの菌体 (ウェット状態) を回収し、凍結保存した。

後日、凍結保存菌体を約100mlのPBSに懸濁し、20%のTriton X-100を最終濃度1%となるように添加した。この懸濁液に超音波処理を施して菌体を破碎した後、遠心分離を行って上清約110mlを回収した。この上清を1ml容量のグルタチオンセファロース (Glutathione Sepharose) 4Bカラムにアプライし、1%Triton X-100を含むPBSでカラム内を洗浄し、更にPBSで洗浄した。次いで、10mM還元型グルタチオンを含む50mMTri s-HCl (pH8.0) をカラムに流し、目的の融合タンパク質をカラムから溶出した。これにより、約60mgの融合タンパク質を得た。

次に、回収した融合タンパク質溶液をトロンビンで処理した。すなわち、融合タンパク質溶液に所定力価のトロンビン (即ち融合タンパク質20μgあたり約0.01U) を添加し、20で一晩放置した。この反応により、融合タンパク質をGST部分と目的のアミノ酸配列を含むペプチド部分とに分断した。

このタンパク質分解酵素処理溶液を次いでグルタチオンセファロース4Bカラムにアプライし、そのパス画分を回収した。更にカラムを1%Triton X-100を含むPBSで洗浄し、その一部 (初期の溶出画分) も回収した。そして、この回収液をSDS-PAGEに供することにより、目的のポリペプチドが回収されていることを確認した。すなわち、回収した精製液 (目的のペプチドを含む。) の一部を15~25%のアクリルアミド濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル (マルチゲル15/25: 第一化学 (株) 製品) に載せ、30mAで約2時間の電気泳動を行った。その結果を図5に示す。ゲルのレーンMはペプチドマーカ (BenchMark Protein Ladder、Invitrogen社製品) の泳動パターンであり、レーン1は上記トロンビン処理前の融合タンパク質溶液の泳動パターンであり、レーン2はトロンビン処理後のタンパク質溶液の泳動パターンであり、レーン3は上記カラムからのパス画分の泳動パターンであり、レーン4及び5は上記カラムを洗浄した洗浄液を回収した画分の泳動パターンである。なお、レーン6~11は、上記カラムから分取した溶出画分の泳動パターンである。図示されるように、レーン2~5において、GSTと分離した目的のアミノ酸配列 (配列番号122) を含むペプチドフラグメントのバンドが認められた。

次に、これら回収物を透析用パックに入れ、0.1M炭酸水素アンモニウム (pH8.0) で透析した。その後、パック内の液を回収し、エンドプロテアーゼGl u-Cを適量添加した炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH7.8) 中で37℃、18時間の酵素処理 (切断処理) を行った。その後、酵素処理液を回収し、逆相高速液体クロマトグラフィーに供した。即ち、サイズが4.6×250mmの逆相カラム (Wakosil-II 5C18 HG: 和光純薬工業 (株) 製品) に酵素処理液をアプライし、日本分光 (株) のRP-HPLC (JASCO Pump System、ポンプ: PU-980、UV検出器: UV-970) を用いて、A溶液: 0.05vol% TFA含有蒸留水、B液: 0.05vol% TFA含有90vol% アセトニトリル溶液、グラジエント: 100%A液→100%B液、40分)、フローレート: 1ml/分の条件で逆相クロマトグラフィーを行った。その結果、溶出開始から概ね20分経過した時期にカラムから溶出してきた画分に目的のペプチドフラグメントとみられるピークを検出した (図8A)。すなわち、このピークの位置 (溶出時期) は化学合成品 (サンプル17) のポリペプチド (0.1mg/mlのサンプル100μl) を同カラムにアプライして同じ条件で溶出した場合と同じであった (図8B)。

次いで、当該ピーク画分を分取し、さらに逆相クロマトグラフィーに供した。即ち、サイ

10

20

30

40

50

ズが4. 6×150mmの逆相カラム (Lichrospher RP-18: Agilent Technologies社製品) に上記分取した酵素処理液をアプライし、日本分光 (株) のRP-HPLC (JASCO Pump System、ポンプ: PU-980、UV検出器: UV-970) を用いて、A溶液: 0.15 vol % TFA含有蒸留水、B液: 0.1 vol % TFA含有アセトニトリル、グラジエント: 100% A液→50% A液/50% B液、40分)、フローレート: 1 ml/分の条件で、逆相クロマトグラフィーを行った。その結果、図6に示すように、溶出開始から概ね20分経過した時期にカラムから溶出してきた画分に目的のペプチドフラグメントとみられるシングルピークを検出した。さらに、このピーク画分に含まれるペプチドの分子量をPerSeptive Biosystems社製のVoyager DE RP (商標) を用いてMALDI-TOFMSに基づいて決定した (図7)。その結果、決定された分子量 (1920.78) はアミノ酸配列に基づく理論上の分子量 (1920.51) と同等であった。次に、上述した実施例2と同様の方法により、上記逆相クロマトグラフィーによって精製されたポリペプチドの抗菌活性 (MIC) を調べた。結果を表4に示す。

表4

試料	抗菌活性 (μM)			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24 時間後	48 時間後	24 時間後	48 時間後
精製ポリペプチド	3.9	3.9	3.9	7.8
サンプル17 (化学合成品)	3.9	3.9	3.9	3.9
比較サンプル1	>500	>500	>500	>500
比較サンプル2	>500	>500	>500	>500

表4に示す結果から明らかなように、組換え大腸菌から分離精製したポリペプチドは、比較対照のポリペプチド (上記実施例2における比較サンプル1及び2) と比べ、高い抗菌活性を示し、そのMIC値は化学合成によって製造した同じアミノ酸配列のポリペプチド (上述のサンプル17) と同程度であった。

以上、本発明の具体例を詳細に説明したが、これらは例示にすぎず、請求の範囲を限定するものではない。請求の範囲に記載の技術には、以上に例示した具体例を様々に変形、変更したものが含まれる。

また、本明細書に説明した技術要素は、単独であるいは各種の組み合わせによって技術的有用性を発揮するものであり、出願時請求項記載の組み合わせに限定されるものではない。また、本明細書に例示した技術は複数目的を同時に達成するものであり、そのうちの一つの目的を達成すること自体で技術的有用性を持つものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TOAGOSEI CO., LTD

<120> ANTIMICROBIAL POLYPEPTIDE AND USE THEREOF

<130> WK02-012-PCT

10

<140>

<141>

<150> JP 2002-124830

<151> 2002-04-25

<160> 123

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

30

<301> Moede, T

<303> FEBS Lett.

<304> 461

<305> 3

<306> 229-234

<307> 1999

<400> 1

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

40

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<300>

<301> Wu, J

<303> J. Biol. Chem.

<304> 274

<305> 41

<306> 29202-29210

<307> 1999

10

<400> 2

Arg Val His Pro Tyr Gln Arg

1

5

20

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Somasokaram, A

<303> J. Biol. Chem.

<304> 274

<305> 40

<306> 28405-28412

<307> 1999

30

<400> 3

Lys Arg Pro Ala Cys Thr Leu Lys Pro Glu Cys Val Gln Gln Leu Leu

1

5

10

15

40

Val Cys Ser Gln Glu Ala Lys Lys

20

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<300>

<301> Kalderon, D

<303> Cell

<305> 39

<306> 499-509

<307> 1984

10

<400> 4

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

20

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<300>

<301> Moreland, RB

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 7

<306> 4048-4057

<307> 1987

30

<400> 5

Gly Lys Lys Arg Ser Lys Ala

1

5

40

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> avian reticuloendotheliosis virus

<300>

<301> Gilmore, TD

<303> J. Virol.

<305> 62

<306> 703-714

<307> 1988

<400> 6

Lys Ala Lys Arg Gln Arg

1

5

10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Rattus sp.

20

<300>

<301> Irie, Y

<303> J. Biol. Chem.

<305> 275

<306> 2647-2653

<307> 2000

<400> 7

Arg Gly Arg Arg Arg Arg Gln Arg

1

5

30

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus sp.

40

<300>

<301> Irie, Y

<303> J. Biol. Chem.

<305> 275

<306> 2647-2653

<307> 2000

<400> 8

Arg Lys Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Welch, K

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 19

<306> 8400-8411

<307> 1999

20

<400> 9

Pro Pro Val Lys Arg Glu Arg Thr Ser

1

5

30

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<300>

<301> Welch, K

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 19

<306> 8400-8411

<307> 1999

40

<400> 10

Pro Tyr Leu Asn Lys Arg Lys Gly Lys Pro

1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Prieve, MG

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 18

<306> 4819-4832

<307> 1998

20

<400> 11

Cys Tyr Gly Ser Lys Asn Thr Gly Ala Lys Lys Arg Lys Ile Asp Asp

1 5 10 15

Ala

30

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Drosophila sp.

<300>

<301> Miyamoto, Y

<303> J. Biol. Chem.

40

<305> 272

<306> 26375-26381

<307> 1997

<400> 12

Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Glu Lys

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> *Drosophila* sp.

10

<300>

<301> Prieve, MG

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 18

<306> 4819-4832

<307> 1998

20

<400> 13

Lys Lys Lys Arg Arg Ser Arg Glu Lys

1

5

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<300>

<301> Koike, M

<303> Exp. Cell Res.

<305> 250

<306> 401-413

<307> 1999

40

<400> 14

Lys Val Thr Lys Arg Lys His Asp Asn Glu Gly Ser Gly Ser Lys Arg

1

5

10

15

Pro Lys

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<300>
<301> Blauer, M
<303> Biol. Repr
<305> 60
<306> 588-593
<307> 1999

10

<400> 15
Lys Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Gly Glu Gly Lys Lys Lys
1 5 10

20

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Borna disease virus

<300>
<301> Shoya, Y
<303> J. Virol.
<305> 72
<306> 9755-9762
<307> 1998

30

<400> 16
Pro Arg Pro Arg Lys Ile Pro Arg
1 5

40

<210> 17

<211> 13
<212> PRT
<213> Borna disease virus

<300>

<301> Shoya, Y

<303> J. Virol.

<305> 72

10

<306> 9755-9762

<307> 1998

<400> 17

Pro Pro Arg Ile Tyr Pro Gln Leu Pro Ser Ala Pro Thr

1

5

10

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<300>

<301> Yu, Z

<303> J. Endocrinol.

30

<305> 159

<306> 53-60

<307> 1998

<400> 18

Lys Asp Cys Val Ile Asn Lys His His Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys

1

5

10

15

40

Arg Leu Gln Arg

20

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Polyomavirus sp.

<300>

<301> Chag, D

<303> Virology

<305> 189

<306> 821-827

10

<307> 1992

<400> 19

Ala Pro Lys Arg Lys Ser Gly Val Ser Lys Cys

1

5

10

<210> 20

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<300>

<301> Truant, R

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 19

<306> 1210-1217

30

<307> 1999

<400> 20

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

<210> 21

40

<211> 12

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<300>

<301> Truant, R

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 19

<306> 1210-1217

<307> 1999

<400> 21

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg

1

5

10

10

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<300>

<301> Palmeri, D

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 19

<306> 1218-1225

<307> 1999

<400> 22

Met Pro Lys Thr Arg Arg Arg Pro Arg Arg Ser Gln Arg Lys Arg Pro

1

5

10

15

30

Pro Thr

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<300>

<301> Sudbeck, P

<303> J. Biol. Chem.

<305> 272

<306> 27848-27852

<307> 1997

<400> 23

Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe Ile Val Trp Ser Arg Asp Gln Arg Arg

1

5

10

15

10

Lys

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Sudbeck, P

<303> J. Biol. Chem.

<305> 272

<306> 27848-27852

<307> 1997

30

<400> 24

Arg Pro Arg Arg Lys

1

5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Sudbeck, P

<303> J. Biol. Chem.

<305> 272

<306> 27848-27852

<307> 1997

<400> 25

Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe Ile Val Trp Ala Gln Ala Ala Arg Arg

1

5

10

15

10

Lys

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<300>

<301> Sudbeck, P

<303> J. Biol. Chem.

<305> 272

<306> 27848-27852

<307> 1997

30

<400> 26

Pro Arg Arg Arg Lys

1

5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Arabidopsis sp.

40

<300>

<301> Nover, L

<303> Cell Stress Chaperones

<305> 6

<306> 177-189

<307> 2001

<400> 27

Arg Lys Arg Arg

1

10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<300>

<301> Ide, Y

<303> Gene

20

<305> 182

<306> 203-211

<307> 1996

<400> 28

Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val

1

5

30

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> epstein-barr virus

<300>

<301> Liu, MT

<303> Virology

40

<305> 247

<306> 62-73

<307> 1998

<400> 29

Tyr Lys Arg Pro Cys Lys Arg Ser Phe Ile Arg Phe Ile

1

5

10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> epstein-barr virus

10

<300>

<301> Liu, MT

<303> Virology

<305> 247

<306> 62-73

<307> 1998

20

<400> 30

Leu Lys Asp Val Arg Lys Arg Lys Leu Gly Pro Gly His

1

5

10

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> adenovirus

30

<300>

<301> Rosenberg, M

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 7

<306> 2451-2456

<307> 1987

40

<400> 31

Lys Arg Pro Arg Pro

1

5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<300>
<301> Bouvier, D
<303> Mol. Cell. Biol.
<305> 6
<306> 1697-1705
<307> 1995

10

<400> 32
Arg Lys Arg Lys Lys
1 5

20

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<300>
<301> Hsieh, JC
<303> J. Cell. Biochem.
<305> 70
<306> 94-109
<307> 1998

30

<400> 33
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys
1 5

40

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> *canine parvovirus*

<300>

<301> Vihinen-Ranta, M

<303> Eur. J. Biochem.

<305> 250

<306> 389-394

<307> 1997

<400> 34

10

Pro Ala Lys Arg Ala Arg Arg Gly Tyr Lys

1

5

10

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<300>

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

<306> 348-353

<307> 1997

<400> 35

30

Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys

1

5

10

15

Lys

<210> 36

40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

<306> 348-353

<307> 1997

<400> 36

10

Arg Arg Glu Arg Asn Lys Met Ala Ala Ala Lys Cys Arg Asn Arg Arg

1

5

10

15

Arg

<210> 37

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

<306> 348-353

<307> 1997

30

<400> 37

Lys Arg Met Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ser Lys Cys Arg Lys Arg Lys

1

5

10

15

Leu

40

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

<306> 348-353

<307> 1997

10

<400> 38

Lys Lys Ser Lys Lys Gly Arg Gln Glu Ala Leu Glu Arg Leu Lys Lys

1

5

10

15

Ala

20

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

<306> 348-353

<307> 1997

30

<400> 39

Arg Lys Glu Trp Leu Thr Asn Phe Met Glu Asp Arg Arg Gln Arg Lys

1

5

10

15

Leu

40

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

10

<306> 348-353

<307> 1997

<400> 40

Lys Lys Gln Thr Thr Leu Ala Phe Lys Pro Ile Lys Lys Gly Lys Lys

1

5

10

15

Arg

20

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

30

<301> Kaneko, H

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 240

<306> 348-353

<307> 1997

<400> 41

Arg Lys Arg Lys Lys Met Pro Ala Ser Gln Arg Ser Lys Arg Arg Lys

40

1

5

10

15

Thr

<210> 42
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<301> Eguchi, H
<303> J. Biol. Chem.
<305> 272
<306> 17640-17647
<307> 1997

10

<400> 42
Arg Ala Ile Lys Arg Arg Pro Gly Leu Asp Phe Asp Asp Asp Gly Glu
1 5 10 15

Gly Asn Ser Lys Phe Leu Arg
20

20

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

30

<300>
<301> Mizuni, Y
<303> J. Cell Sci. Suppl.
<305> 109
<306> 2627-2636
<307> 1996

<400> 43
Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg
1 5

40

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<301> Rubstov, YT
<303> FEBS Lett.
<305> 413
<306> 135-141
<307> 1997

10

<400> 44
Lys Arg Ala Ala Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Val Asp Thr Lys Lys
1 5 10 15

Gln Lys

20

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<300>
<301> Sock, E
<303> J. Biol. Chem.
<305> 271
<306> 17512-17518
<307> 1996

<400> 45
Gly Arg Lys Arg Lys Lys Arg Thr
1 5

40

<210> 46

<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<301> Nederlof, PM
<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
<305> 26
<306> 12060-12064
<307> 1995

10

<400> 46
Arg Glu Lys Lys Glu Lys Glu Gln Lys Glu Lys Cys Ala
1 5 10

20

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<301> Nederlof, PM
<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
<305> 26
<306> 12060-12064
<307> 1995

30

<400> 47
Leu Glu Lys Lys Val Lys Lys Lys Phe Asp Trp Cys Ala
1 5 10

40

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Arabidopsis sp.

<300>	
<301> Nover, L	
<303> Cell Stress Chaperones	
<305> 6	
<306> 177-189	
<307> 2001	
<400> 48	10
Arg Lys Arg Arg Thr Lys Lys	
1 5	
<210> 49	
<211> 13	
<212> PRT	
<213> Thermoplasma acidophilum	20
<300>	
<301> Nederlof, PM	
<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	
<305> 26	
<306> 12060-12064	
<307> 1995	
<400> 49	30
Ser Asp Lys Lys Val Arg Ser Arg Leu Ile Glu Cys Ala	
1 5 10	
<210> 50	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> avian neuroretina	40
<300>	
<301> Carriere, C	
<303> Cell Gr Diff	
<305> 6	

<306> 1531-1540

<307> 1995

<400> 50

Leu Lys Arg Lys Leu Gln Arg

1

5

10

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Bessert, DA

<303> BraResMolBraRes

20

<305> 33

<306> 165-173

<307> 1995

<400> 51

Arg Arg Lys Gly Lys Glu Lys

1

5

30

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Vandromme, M

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

40

<305> 10

<306> 4646-4650

<307> 1995

<400> 52

Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<300>

<301> Vandromme, M

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

<305> 10

<306> 4646-4650

<307> 1995

20

<400> 53

Val Asn Glu Ala Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys

1 5 10

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> Zea mays

30

<300>

<301> Hicks, GR

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

<305> 92

<306> 734-738

<307> 1995

40

<400> 54

Met Pro Thr Glu Glu Arg Val Arg Lys Arg Lys Glu Ser Asn Arg Glu

1 5 10 15

Ser Ala Arg Arg Ser Arg Tyr Arg Lys Ala Ala His Leu Lys

20

25

30

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> Rattus sp.

10

<300>

<301> Wang, Y

<303> J. Biol. Chem.

<305> 270

<306> 354-360

<307> 1995

<400> 55

20

Lys Val Asn Ser Arg Lys Arg Arg Lys Glu Val Pro Gly Pro Asn Gly

1

5

10

15

Ala Thr Glu Glu Asp

20

<210> 56

30

<211> 6

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<300>

<301> Chang, SC

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<305> 205

<306> 1284-1290

40

<307> 1994

<400> 56

Pro Arg Arg Gly Pro Arg

1

5

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<300>

<301> Chang, SC

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

10

<305> 205

<306> 1284-1290

<307> 1994

<400> 57

Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro

1

5

10

20

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Zacksenhaus, E

30

<303> Mol. Cell. Biol.

<305> 13

<306> 4588-4599

<307> 1993

<400> 58

Lys Arg Ser Ala Glu Gly Gly Asn Pro Pro Lys Pro Leu Lys Lys Leu

1

5

10

15

40

Arg

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<300>

<301> Tinland, B

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

10

<305> 16

<306> 7442-7446

<307> 1992

<400> 59

Glu Tyr Leu Ser Arg Lys Gly Lys Leu Glu Leu

1

5

10

20

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<300>

<301> Tinland, B

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

30

<305> 16

<306> 7442-7446

<307> 1992

<400> 60

Pro Lys Arg Pro Arg Asp Arg His Asp Gly Glu Leu Gly Gly Arg Lys

1

5

10

15

40

Arg Ala Arg Gly

20

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> *Xenopus* sp.

<300>

<301> Dingwall, C

<303> Cell

10

<305> 64

<306> 615-623

<307> 1991

<400> 61

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1

5

10

15

20

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<300>

<301> Nigg, EA

<303> J. Cell Sci. Suppl.

30

<305> 105

<306> 799-806

<307> 1993

<400> 62

Lys Arg Lys Lys Glu Met Ala Asn Lys Ser Ala Pro Glu Ala Lys Lys

1

5

10

15

40

Lys Lys

<210> 63

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>

<301> Blobel, G
<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
<305> 94
<306> 5055-5060
<307> 1997

10

<400> 63

Tyr Asn Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn
1 5 10 15

20

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>

<301> Welch, K
<303> Mol. Cell. Biol.
<305> 19
<306> 8400-8411
<307> 1999

30

<400> 64

Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
1 5

40

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>

<301> Dreyfuss, G

<303> EMBO J.

<305> 12

<306> 3587-

<307> 1997

<400> 65

10

Lys Arg Pro Ala Glu Asp Met Glu Glu Glu Gln Ala Phe Lys Arg Ser

1

5

10

15

Arg

<210> 66

20

<211> 13

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<300>

<301> Herskowitz, I

<303> Cell

<305> 36

30

<306> 1057-

<307> 1984

<400> 66

Met Asn Lys Ile Pro Ile Lys Asp Leu Leu Asn Pro Gly

1

5

10

<210> 67

40

<211> 7

<212> PRT

<213> *Polyomavirus* sp.

<300>

<301> Richardson, W

<303> Cell

<305> 44

<306> 77-

<307> 1986

<400> 67

Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp

1

5

10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Polyomavirus sp.

20

<300>

<301> Richardson, W

<303> Cell

<305> 44

<306> 77-

<307> 1986

<400> 68

Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg

1

5

30

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Simian virus 40

40

<300>

<301> Wychowski, C

<303> EMBO J.

<305> 5

<306> 2569-

<307> 1986

<400> 69

Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Ser

1 5

<210> 70

10

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<300>

<301> Wychowski, C

<303> J. Virol.

<305> 61

20

<306> 3862-

<307> 1987

<400> 70

Pro Asn Lys Lys Lys Arg Lys

1 5

<210> 71

30

<211> 12

<212> PRT

<213> Polyomavirus sp.

<300>

<301> Chang, D

<303> Virology

<305> 191

40

<306> 978-

<307> 1992

<400> 71

Glu Glu Asp Gly Pro Gln Lys Lys Lys Arg Arg Leu

1

5

10

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<300>

<301> Dang,

Lee,

<303> J. Biol. Chem.

<305> 264

<306> 18019-

<307> 1989

20

<400> 72

Pro Leu Leu Lys Lys Ile Lys Gln

1

5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<300>

<301> Dang,

Lee,

<303> J. Biol. Chem.

<305> 264

<306> 18019-

<307> 1989

40

<400> 73

Pro Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser

1

5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Dang,

Lee,

<303> J. Biol. Chem.

<305> 264

<306> 18019-

<307> 1989

10

<400> 74

Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro

1

5

20

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Dang,

Lee,

<303> J. Biol. Chem.

<305> 264

<306> 18019-

<307> 1989

30

<400> 75

Ser Lys Arg Val Ala Lys Arg Lys Leu

1

5

40

<210> 76

<211> 10
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<300>

<301> Rhee, S

<303> Yeast

<305> 5

10

<306> 149~

<307> 1989

<400> 76

Ile Lys Tyr Phe Lys Lys Phe Pro Lys Asp

1

5

10

20

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<300>

<301> Underwood, M

<303> EMBO J.

<305> 9

30

<306> 91-

<307> 1990

<400> 77

Lys Thr Arg Lys His Arg Gly

1

5

40

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<300>

<301> Underwood, M

<303> EMBO J.

<305> 9

<306> 91-

<307> 1990

<400> 78

Lys His Arg Lys His Pro Gly

1

5

10

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<300>

<301> Kato, G

<303> Genes Dev.

<305> 6

<306> 81-

<307> 1992

<400> 79

Pro Gln Ser Arg Lys Lys Leu Arg

1

5

30

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<300>

<301> Youssoifan, H

<303> BloodCellMolDis

<305> 25

<306> 305-

<307> 1999

<400> 80

Lys Lys Glu Lys Lys Lys Ser Lys Lys

1

5

10

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 81

Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

1

5

20

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Leu Ala Leu Lys Leu Ala Gly Leu Asp Ile

1

5

10

30

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 83

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 84

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 84

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

1 5 10 15

20

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

30

<400> 85

Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5 10 15

<210> 86

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 86

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Leu Pro Pro Leu

1 5 10 15

Glu Arg Leu Thr Leu Asp

20

10

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 87

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

1 5 10 15

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

30

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 88

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

1

5

10

15

<210> 89

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 89

Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

10

15

20

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

30

<400> 90

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu Ala Leu Lys Leu Ala Gly Leu Asp

1

5

10

15

Ile

40

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 91

Leu	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys		10
1				5						10				15			

Val

<210> 92

<211> 14 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 92

Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val		30
1				5						10					

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 93

Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg

1 5 10

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 94

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg

1 5 10 15

20

Arg Arg

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 95

Pro Arg Arg Arg Lys Pro Arg Arg Arg Lys

1 5 10

40

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 96

Pro	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr	Val	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr	
1				5					10					15		10

Val Val

<210> 97

<211> 16 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 97

Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr	Val	Val	
1				5					10					15		30

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 98

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5 10

<210> 99

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 99

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys

1 5 10 15

20

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 100

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 100

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys

1 5 10 15

40

Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

25

<210> 101

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide containing a terminal
amide group

10

<400> 101

Pro Arg Arg Arg Lys

1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide containing a terminal
amide group

30

<400> 102

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 103

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide containing a terminal

amide group

<400> 103

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

10

<210> 104

10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

20

<400> 104

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1

5

<210> 105

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 105

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Val Lys Arg Lys Lys Lys Arg

1

5

10

40

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 106

Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Lys Arg Lys Lys Lys Arg
1 5 10

10

<210> 107

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 107

Leu Lys Arg Lys Leu Gln Arg Leu Lys Arg Lys Leu Gln Arg
1 5 10

30

<210> 108

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

40

<400> 108

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Leu Gly Lys Leu Ala Leu Gly Lys
1 5 10 15

Leu

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 109

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Ile Ala Gly Lys

1

5

10

15

20

Ile

<210> 110

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
antimicrobial polypeptide

<400> 110

Met Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

10

15

40

<210> 111

<211> 139

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
encoding a designed antimicrobial polypeptide
sequence

<220>

10

<221> CDS

<222> (86)..(130)

<400> 111

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaacggttt ccctctagaa ataattttgt 60

ttaactttaa gaaggagata tacat atg cgc att cgc aaa aaa ctc cgc cgt 112

Met Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg Arg

20

1

5

atc cgt aag aaa ctc cgc taatgaata

139

Ile Arg Lys Lys Leu Arg

10

15

<210> 112

30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed antimicrobial polypeptide

<400> 112

Met Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg

1

5

10

15

40

<210> 113

<211> 160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
encoding a designed antimicrobial polypeptide
sequence

<220>

10

<221> CDS

<222> (86)..(151)

<400> 113

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaacggttt ccctctagaa ataattttgt 60

ttaactttaa gaaggagata tacat atg cgc caa gct cgt cgt aat cgt cgc 112

Met Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg

20

1

5

cgt cgc tgg cgt ctg cca ccg etc gaa cgc ttg acc ttg taatgaata 160

Arg Arg Trp Arg Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu

10

15

20

<210> 114

30

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed antimicrobial polypeptide

<400> 114

Met Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Leu Pro Pro

1

5

10

15

40

Leu Glu Arg Leu Thr Leu

20

<210> 115

<211> 166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
 encoding a designed antimicrobial polypeptide
 sequence

10

<220>

<221> CDS

<222> (86)..(157)

<400> 115

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaacggttt ccctctagaa ataattttgt 60

20

ttaactttaa gaaggagata tacat atg cct aag aag aaa cgt aag gtc tta 112

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu

1

5

ccg cca tta gaa cgt ctg act tta ccg aaa aag aag cgc aaa gtt 157

Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr Leu Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

10

15

20

30

taatgaata

166

<210> 116

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed antimicrobial polypeptide

40

<400> 116

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu Thr

1

5

10

15

Leu Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 117

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
used as a primer

<400> 117

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaacgggtt ccctctagaa ataattttgt 60
ttaaactttaa gaaggagata tacat 85

20

<210> 118

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
used as a primer

<400> 118

tattcattag cggagtttct tacgg 25

<210> 119

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
used as a primer

<400> 119

tattcattac aaggtcaagc gtteg

25

<210> 120

10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
used as a primer

20

<400> 120

tattcattaa actttgcgct tcttt

25

<210> 121

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<221> CDS

<222> (7)..(72)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
encoding a designed antimicrobial polypeptide
sequence

40

<400> 121

gaattc atg cat cac cat cac cat cac gaa cgt ata cgt aaa aag ctg

48

Met His His His His His His Glu Arg Ile Arg Lys Lys Leu

1

5

10

cgt cgc atc cgt aaa aag ctg cgt taactgcag

81

Arg Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg

15

20

<210> 122

<211> 22

<212> PRT

10

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed polypeptide

<400> 122

Met His His His His His His Glu Arg Ile Arg Lys Lys Leu Arg Arg

1

5

10

15

Ile Arg Lys Lys Leu Arg

20

20

<210> 123

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 123

ctgcaggttaa cgcagctttt tacggatgcg acgcagcttt ttacgtatac gttcgtgatg 60

gtgatgggtga tgcataaatt c

81

【図面の簡単な説明】

40

図1 (FIG. 1) は、無細胞タンパク質合成システムにより合成したポリペプチドを含む試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画した結果を示す写真である。

図2 (FIG. 2) は、無細胞タンパク質合成システムにより合成したポリペプチドをMALDI-TOF MSを用いて解析した際に得られた分子イオンのピークを示すマススペクトルである。横軸は質量電荷比 (m/z)、縦軸は相対強度である。

図3 (FIG. 3) は、無細胞タンパク質合成システムにより合成したポリペプチドをMALDI-TOF MSを用いて解析した際に得られたフラグメントイオンのピークを示すマススペクトルである。横軸は質量電荷比 (m/z)、縦軸は相対強度である。

図4 (FIG. 4) は、ここで開示された合成ポリヌクレオチドを市販の発現ベクター (pET-41a (+)) に挿入した状態を示す模式図である。

50

図5 (FIG. 5) は、組換え大腸菌由来の融合タンパク質をいくつかのプロセスによって精製した試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画した結果を示す写真である。

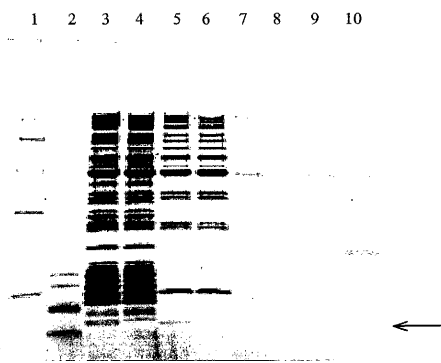
図6 (FIG. 6) は、組換え大腸菌由来の融合タンパク質をいくつかのプロセスによって処理し、精製した試料を逆相クロマトグラフで分析した結果を示すクロマトグラムである。横軸はリテンションタイム (分)、縦軸はピーク強度 (μV) である。

図7 (FIG. 7) は、組換え大腸菌由来の融合タンパク質をいくつかのプロセスによって精製したポリペプチドをMALDI-TOF MSを用いて解析した際に得られた分子イオンのピークを示すマススペクトルである。横軸は質量電荷比 (m/z)、縦軸は相対強度である。

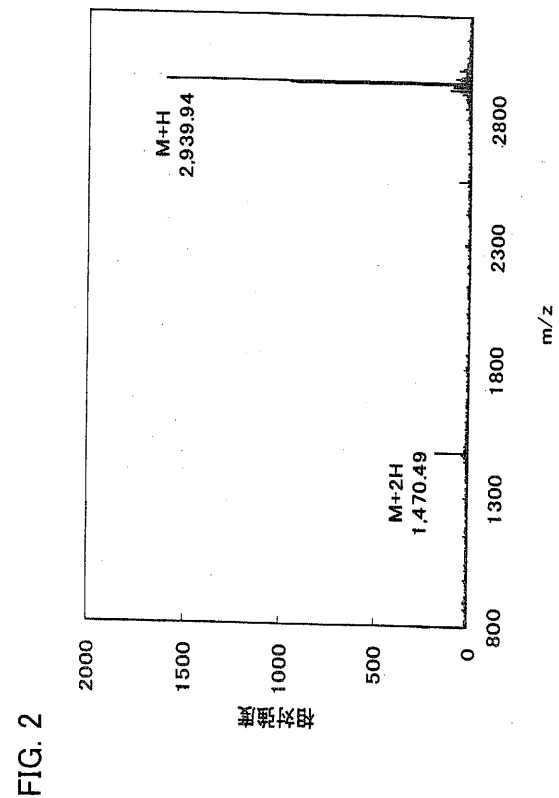
10

図8A (FIG. 8A) は、組換え大腸菌由来の融合タンパク質をいくつかのプロセスによって処理した試料を逆相クロマトグラフで分析した結果を示すクロマトグラムである。横軸はリテンションタイム (分)、縦軸はピーク強度 (μV) である。図8B (FIG. 8B) は、化学合成したポリペプチド試料を逆相クロマトグラフで分析した結果を示すクロマトグラムである。横軸はリテンションタイム (分)、縦軸はピーク強度 (μV) である。

【図1】
FIG. 1



【図2】



【図 3】

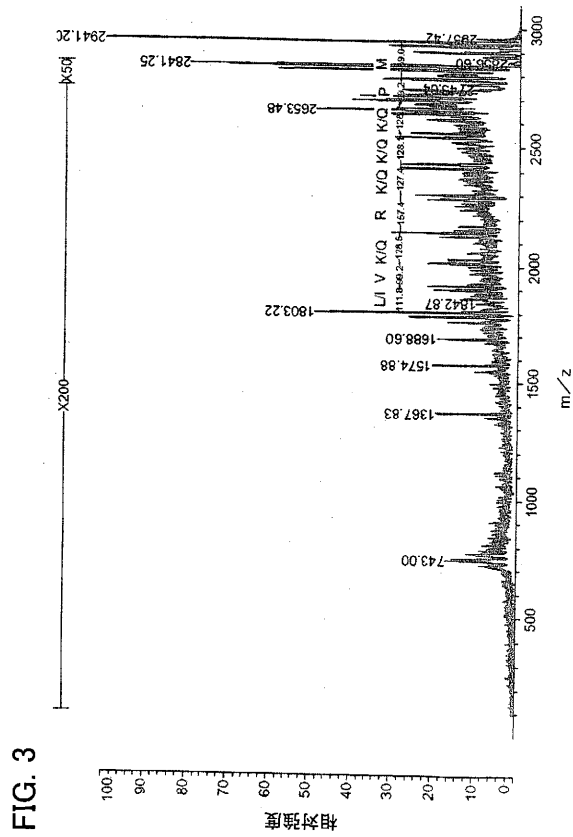
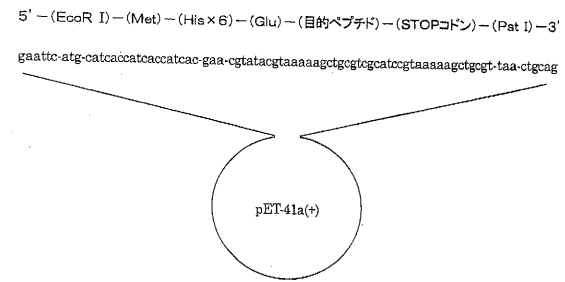
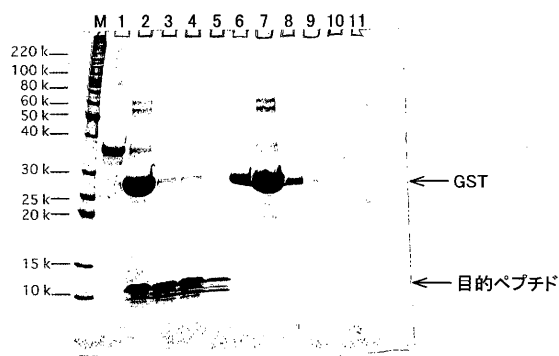
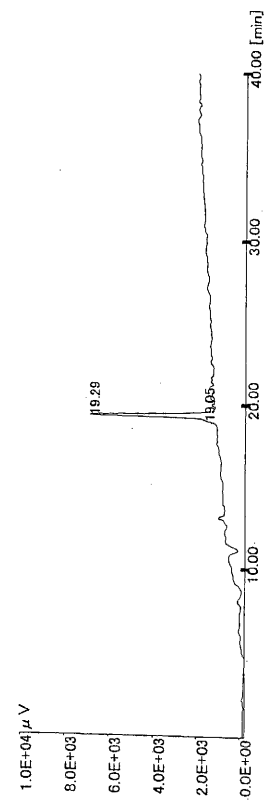


FIG. 3

【図 4】
FIG. 4【図 5】
FIG. 5

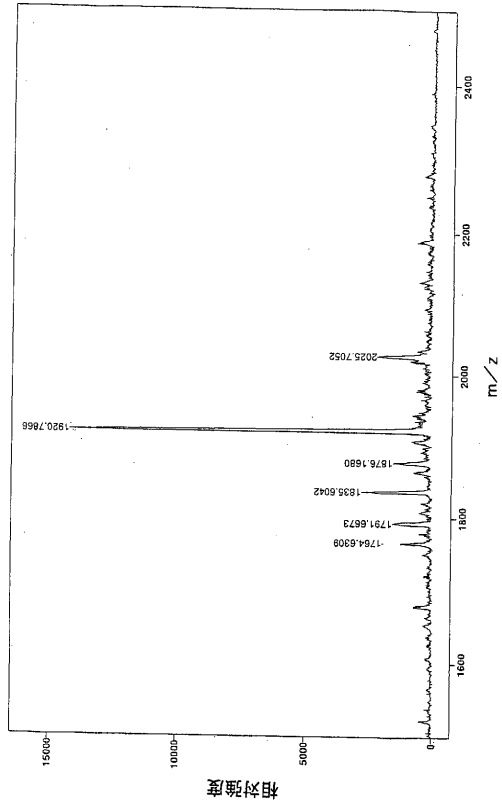
【図 6】

FIG. 6



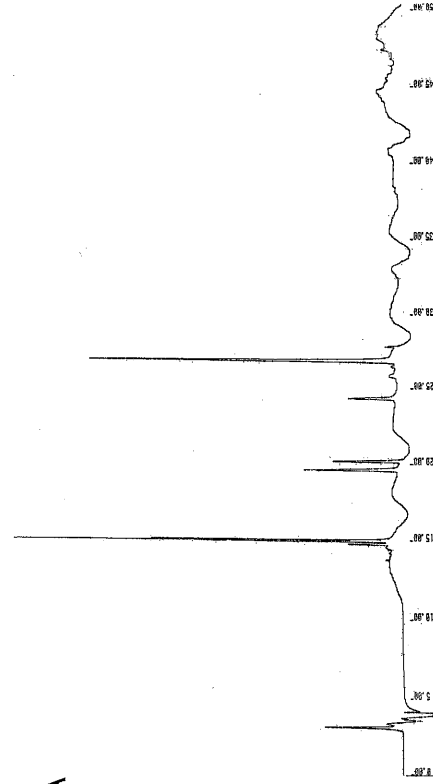
【図 7】

FIG. 7



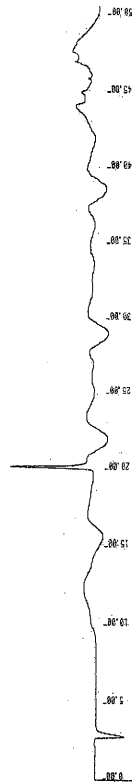
【図 8 A】

FIG. 8A



【図 8 B】

FIG. 8B



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/00 (2006.01) C 0 7 K 14/00
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(72)発明者 久米 勝嘉
日本国愛知県名古屋市港区船見町1番地の1 東亜合成株式会社 新製品開発研究所内
(72)発明者 山田 喜直
日本国愛知県名古屋市港区船見町1番地の1 東亜合成株式会社 新製品開発研究所内
(72)発明者 松田 陽子
日本国茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社 新製品開発研究所内
(72)発明者 高麗 寛紀
日本国徳島県徳島市川内町富吉230-2

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第01/038547 (WO, A1)
Biochim.Biophys.Acta, vol.1375, pp.52-60 (1998)
Biochim.Biophys.Acta, vol.1329, pp.357-369 (1997)