



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/31, C07K 14/21, 14/245, 14/25, 14/31, 14/315, 16/12, C12N 1/21, C12P 21/02, A61K 48/00 // (C12N 15/31, C12R 1:01) (C12N 15/31, C12R 1:07) (C12N 15/31, C12R 1:185) (C12N 15/31, C12R 1:38) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO98/20134</b></p> <p>(43) 国際公開日 1998年5月14日(14.05.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04019</p> <p>(22) 国際出願日 1997年11月5日(05.11.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/293522 1996年11月6日(06.11.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 田辺製薬株式会社(TANABE SEIYAKU CO., LTD.)(JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中西 啓(NAKANISHI, Akira)(JP/JP] 〒115 東京都北区浮間3丁目13番13号-404号 Tokyo, (JP) 押田忠弘(OSHIDA, Tadahiro)(JP/JP] 〒157 東京都世田谷区砧1丁目34番11号 Tokyo, (JP) 松下忠弘(MATSUSHITA, Tadahiro)(JP/JP] 〒270 千葉県松戸市小金原1丁目27番6号 Chiba, (JP) 大貫哲男(ONUKI, Tetsuo)(JP/JP] 〒340-01 埼玉県幸手市香日向3丁目8番3号 Saitama, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 津国 肇(TSUKUNI, Hajime) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号 SVAX TSビル Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: <b>DNA GYRASE INHIBITOR PROTEIN</b></p> <p>(54)発明の名称 DNAジャイレース阻害蛋白質</p> <p>(57) Abstract A protein capable of inhibiting the DNA gyrase activity of bacteria (DNA gyrase inhibitor protein DGI); host cells transformed by a replicable expression vector containing a DNA encoding DGI; a process for producing DGI which comprises culturing these host cells; a method for identifying medicinal compounds which comprises assaying the effect of altering the DNA gyrase inhibitory activity of DGI; and a method for identifying medicinal compounds characterized by assaying the effect of altering the expression of the gene encoding DGI.</p>		

(57) 要約

本発明は、細菌のDNAジャイレース活性を阻害する能力を有する蛋白質（DNAジャイレース阻害蛋白質；DGI）；DGIをコードするDNAを含む複製可能な発現ベクターで形質転換された宿主細胞；及びこれを培養することからなるDGIの製造方法；DGIの有するDNAジャイレース阻害活性を変調させる作用を検定することからなる、医薬化合物の同定方法；及び、DGIをコードする遺伝子の発現を変調させる作用を検定することを特徴とする、医薬化合物の同定方法を開示する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボーン	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア	TR	トルコ
BE	ベルギー	GM	ギニア・ビサウ		ラヴィア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BH	バーレーン	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CA	カナダ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CC	中央アフリカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CF	中央アフリカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CG	コンゴ共和国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CI	コートジボワール	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CN	中国	KR	韓国	RU	ロシア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SK	スロヴァキア		
EE	エストニア	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ		
ES	スペイン						

## 明 細 書

## DNA ジャイレース阻害蛋白質

## 5 技術分野

本発明は、細菌のDNA ジャイレース活性を阻害する蛋白質（DGI）及びその製造方法に関する。さらに、DGIの活性もしくは発現に対する化合物の作用を決定することにより抗菌薬等をスクリーニングし同定する方法に関する。また、DGIをコードする遺伝子のアンチセンスDNA（もしくはRNA）およびDGIに対する抗体に関する。

## 背景技術

ペニシリンの発見以来、種々の抗生物質が細菌感染症の治療に用いられ、医療上大きな貢献をしてきた。現在臨床で使用されている主な抗生物質は、β-ラクタム系抗生物質とニューキノロン系抗生物質である。ニューキノロン系抗生物質の作用機作は、細菌のDNA ジャイレースの阻害であることが知られている。

細菌のDNA ジャイレースは、染色体DNAに負の超らせん構造を導入したり、複製終了直後の絡まりあった娘DNAをほどいて分離させるなど、細菌の複製及び増殖に必須な酵素であり、2つのサブユニット（A及びB）から構成されている。

DNA ジャイレース阻害剤には、ニューキノロン系抗生物質以外にノボピオシンやサイクロチアジンなどの化合物が知られているが、蛋白質性の阻害物質は知られていない。

DNA ジャイレースの活性制御に関して、堀内（Horiuchi）らは、大腸菌のプラスミドであるF因子上にコードされるLetD蛋白質はDNA ジャイレ-

5 スの不活性化に、Let A蛋白質は不活性型ジャイレースの再活性化に、各々関与していると報告している（Journal of Biological Chemistry、第267巻、12244-12251頁、1992年）。しかし、Let D蛋白質による不活性化は全菌体を用いた実験でのみ認められ、イン・ビト  
5 口（in vitro）での再構成実験では不活性化作用は認められていない。また、細菌の染色体上にコードされるDNAジャイレース阻害蛋白質に関する報告はない。

最近、従来の $\beta$ -ラクタム系やニューキノロン系抗生物質に対する耐性菌の出現  
10 が重大な問題となっており、それら耐性菌に対して効力を有する新しい作用機作の抗生物質が望まれている。

本発明の課題は、新しい作用機作の抗生物質の創製に有用な、DNAジャイレース阻害蛋白質（DGI）及びその製造方法を提供することにある。さらには、DGIもしくはその遺伝子を利用して、DGIの活性やその発現を変調させるという新しい作用機作の抗菌薬等をスクリーニングし同定する方法を提供することにある。

15 本発明者らは、ノボビオシン-アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いた大腸菌（*Escherichia coli*）DNAジャイレースの精製を実施する過程で、各画分のスーパーコイリング活性を測定するとともにSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による解析を行なったところ、DNAジャイレースのホロ酵素を含むにもかかわらずスーパーコイリング活性を示さないフラクションが存在し、  
20 これらフラクションには共通して約18kDaの蛋白質が含まれていることを見出した。発明者らは、この約18kDaの蛋白質が、DNAジャイレースの活性（スーパーコイリング活性）を阻害する作用を有するという全く新しい知見を見出し、この18kDa蛋白質をDNAジャイレース阻害蛋白質（DGI）（GyrIとも称する）と名付けた。発明者らは、さらに、この蛋白質をコードする遺伝子（dg

i 遺伝子) (gyrI 遺伝子とも称する) を大腸菌の染色体からクローニングし、  
DGI の製造方法を確立した。また、精製したDGI を用いてDGI 活性の測定系  
を、dgi 遺伝子のプロモータ領域を用いて、DGI の発現を測定する系を構築し  
た。さらに、DGI の活性または発現を変調させることにより、細菌の成長を抑制  
5 することができることを見出して、本発明を完成するに至った。

### 発明の開示

すなわち、本発明は、細菌のDNAジャイレース活性を阻害する蛋白質 (DNA  
ジャイレース阻害蛋白質; DGI) である。

10 また、DGI をコードするDNAを含む複製可能な発現ベクターで形質転換され  
た宿主細胞、及びこの宿主細胞を培養することからなるDGI の製造方法である。

さらには、DGI の有するDNAジャイレース阻害活性を変調させる作用を検定  
することからなる、医薬化合物の同定方法、及び、DGI をコードする遺伝子の発  
現を変調させる作用を検定することを特徴とする、医薬化合物の同定方法である。

15 また、DGI をコードする遺伝子のアンチセンスDNAもしくはアンチセンスR  
NA、およびDGI を認識する抗体である。

### 図面の簡単な説明

図1は、ノボビオシン-セファロースカラムクロマトグラフィーによるDNAジ  
20 ャイレースの溶出パターンを示した図である。

図2は、ノボビオシン-セファロースカラムクロマトグラフィーで得られた画分  
のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の図である。

図3は、フラクションNo. 32によるDNAジャイレース活性の消失を示すア  
ガロースゲル電気泳動の図である。

図4は、大腸菌でのDGIの大量発現を示すSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の図である。

図5は、精製した18kD蛋白質による、DNAジャイレーススーパーコILING活性に対する阻害作用を示したアガロースゲル電気泳動の図である。

5 図6は、大腸菌の増殖段階におけるdgiプロモーター活性の変化を示した図である。

図7は、dgi遺伝子のアンチセンスRNA発現が大腸菌の増殖に及ぼす影響を示した図である。

10 図8は、抗DGI抗体を用いたウェスタンブロッティングによる大腸菌DGIの検出を示した電気泳動の図である。

発明を実施するための最良の形態

後記配列表の配列番号1には大腸菌由来DGIのN末端(16残基)のアミノ酸配列を、配列番号2及び配列番号3には大腸菌DGIをコードするdgi遺伝子のクローニングに用いた合成プライマーDNAの塩基配列を、配列番号4及び配列番号5には大腸菌DGI発現用ベクター作製に用いた合成プライマーDNAの塩基配列を、配列番号6には大腸菌dgi遺伝子を含むDNA断片の塩基配列及びその中にコードされるDGIのアミノ酸配列を、配列番号7には、大腸菌DGIのアミノ酸配列をそれぞれ示した。配列番号8にはシゲラ属微生物由来のdgi遺伝子を含むDNA断片の塩基配列及びその中にコードされるDGIのアミノ酸配列を、配列番号9には、シゲラ属微生物由来のDGIのアミノ酸配列をそれぞれ示した。

本発明のDGIを産生する細菌としては、大腸菌(*Escherichia coli*)を好適に用いることができる。具体的な菌株としては、エシェリシア・コリ(*Escherichia coli*) KL16株(国立遺伝学研究所、遺

伝実験生物保存研究センター Accession No. ME8002)、同  
K-12株 (Genetics 第38巻、第51~64頁、1953年)、同  
ML1410 (Microbiology and Immunology 第2  
2巻、第367~375頁、1978年)、同 ATCC25922、同 NIH  
5 J JC-2、同 JM109株 (ATCC 53323)、同 GI724 (I  
nvitrogen社、米国) 等があげられる。

また、本発明のDGIは、大腸菌等のエシェリシア (*Escherichia*)  
属微生物以外でも、種々の細菌に広く普遍的に存在しており、このような細菌とし  
ては、例えば、シゲラ属、シトロバクター属、シュードモナス属、バシラス属、エ  
10 ンテロコッカス属、スタフィロコッカス属に属する微生物などが挙げられる。具体  
的な菌株の例としては、シゲラ ボイディー (*Shigella boydii*)  
IID627 (NIHJ 1130 Type 7) (日本細菌学雑誌第50巻、第  
1019-1031頁、1995年、表1-1)、同 ATCC35964、同 ATCC  
49348、シゲラ ディセンテリエ (*Shigella dysenteria*  
15 e) IID633 (NIHJ 177249 Type 3) (日本細菌学雑誌第  
50巻、第1019-1031頁、1995年、表1-1)、同 ATCC13313、同  
ATCC23351、同 ATCC49345、シゲラ ソネイ (*Shigella*  
*sonnei*) TRRL10805、同 ATCC11060、同 ATCC  
29930、シトロバクター フロインディー (*Citrobacter fre*  
20 *undii*) IID976 (NIH 17)、シュードモナス アエルギノーザ  
(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、バシラ  
ス サチルス (*Bacillus subtilis*) ATCC6633、エンテ  
ロコッカス フェーカリス (*Enterococcus faecalis*) AT  
CC29212、スタフィロコッカス オーレウス (*Staphylococcu*

s aureus) RN450 (Journal of Bacteriology 第174巻、第4952~4959頁、1992年)などが挙げられる。

DGIの精製は、細菌の培養物から、硫酸沈殿、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの精製方法  
5 法を種々組合わせ、その生理活性（DNAジャイレースのスーパーコイリング活性を阻害する作用）を指標として、例えば、以下のように実施できる。

DGIがDNAジャイレースと結合して存在するという性質を利用する場合、例えば対数増殖期の菌体抽出液を用い、DNAジャイレースの精製方法（Aoyama  
10 ara, Antimicrobial Agents and Chemotherapy、第32巻、104-109頁、1988年）に準じて、核酸除去、硫酸沈殿およびノボピオシン-アフィニティークラムを用いた分画を行う。ノボピオシンはDNAジャイレースと結合するため、ノボピオシン-アフィニティークロマトグラフィーはDNAジャイレースの分画精製に用いられる。各画分について、DNA  
15 ジャイレースのスーパーコイリング活性を測定すると共に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でDNAジャイレースホロ酵素に相当する蛋白の存在が確認できるにもかかわらず、スーパーコイリング活性を示さない画分、すなわちDNAジャイレースとともにDGIが混在する画分を採取する。この画分についてセファデックスG-75を用いるゲル濾過等を行ってDGIを単離精製することができる。

20 あるいは、対数増殖期の菌体抽出液を用い、硫酸沈殿、Q-セファロースファーストフローカラム（ファルマシア社）を用いる強陰イオン交換クロマトグラフィー、TSKゲルトヨパールHW-55カラム（東ソー社）を用いるゲル濾過およびSDSポリアクリルアミド電気泳動により、DGIを精製することもできる。

DNAジャイレースのスーパーコイル活性は、例えばアンチマイクロビアル・エージェント・アンド・ケモセラピー (Antimicrobial Agents and Chemotherapy)、第32巻、第104-109頁、1988年記載の方法に準じて測定することができる。DGI活性、すなわち、DNAジャイレースのスーパーコイル活性を阻害する作用は、スーパーコイル活性測定系を利用して測定できる。

大腸菌由来の精製DGIは、分子量約18kDaの蛋白質であった。また、そのN末端アミノ酸配列は、後記配列番号1に示したものである。

核酸配列データベース (EMBL/Genbank/DDBJ) を用いてホモロジー検索を行ったところ、DGIのN末端配列は、大腸菌K-12株染色体DNAのsbcB領域 (EMBL登録番号U00009) 中の仮想産物 (hypothetical protein) YeeBのN末端アミノ酸配列と一致していた。また、DGIの分子量も、仮想産物YeeBのものと同じであった。これらのことから、発明者らは、YeeBがDGIであり、DGIをコードする遺伝子 (dgi遺伝子) はYeeBの翻訳領域を含む部分にあると考え、yeeB遺伝子の翻訳領域前後の塩基配列をもとに、大腸菌dgi遺伝子をクローニングした。

なお、EMBL登録番号U00009には、大腸菌K-12株染色体DNAのsbcB領域の塩基配列が記載されており、その配列から登録者らが仮想した構造遺伝子産物のアミノ酸一次配列が記載されている。しかしながら、そのような仮想産物 (YeeBなど) については、最も重要な情報である生理活性や機能について一切知られておらず示唆するものもなかったし、実際に細胞内で発現しているか否かさえ知られていなかった。また、sbcB領域中であってyeeBと同じ配列を有するsbmC遺伝子 (遺伝子産物SbmC) が報告されている (EMBL登録番号X84885、及びモレキュラー・マイクロバイオロジー (Molecular Micro-

biology) 第18巻、第301-311頁、1995年)。しかし、sbmC遺伝子に関しては、ペプチド性抗生物質 Microcin B17 に対する耐性との関連、及び SOS 遺伝子の一つと推定されること、等の記載はあるものの、その遺伝子産物がどのような生理活性や機能を有するのかは、やはり明らかにされていなかった。

- 5 大腸菌 d g i 遺伝子のクローニングは、前記 s b c B 領域 (EMBL 登録番号 U 0 0 0 0 9) の y e e B 翻訳領域前後の塩基配列をもとに設計して合成したプライマーを用い、大腸菌染色体 DNA をテンプレートとしてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR ; polymerase chain reaction) を実施することにより、クローニングできる。PCR 産物は、必要に応じて適当な制限酵素で切断した後、大腸菌宿主内で複製可能なベクタープラスミドに連結すればよい。
- 10

また、大腸菌又は大腸菌以外の細菌由来の d g i 遺伝子は、例えば、目的とする細菌の染色体 DNA ライブラリーを調製し、大腸菌 d g i 遺伝子の一部もしくは全部を含む DNA 断片を標識したものをプローブとして用いてスクリーニングすることにより、容易にクローニングすることができる。例えば、配列番号 6 又は配列番号 8 で示される塩基配列からなる d g i 遺伝子の DNA 断片をプローブとし、この断片とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子を選択すればよい。得られた陽性クローンの DNA 塩基配列を決定することにより、d g i 遺伝子の DNA 配列を決定でき、その翻訳領域から D G I のアミノ酸配列を得ることができる。

15

このような大腸菌以外の細菌由来の d g i 遺伝子は、一般に、大腸菌の d g i 遺伝子との塩基配列上の相同性が 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上のものである。

20

DNA ライブラリーは、例えば、「モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F. 及び Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) に記載の方

法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを用いてもよい。

d g i 遺伝子など、D G I をコードするDNAを用いて、遺伝子組換え技術により、D G I を宿主細胞内で発現させることができる。D G I をコードするDNAを、  
5 適当なプロモーター（例えば大腸菌を宿主とする場合、 $\lambda$  p L プロモーター、t r p  
プロモーター、l a c プロモーター、T 7 プロモーター等）の下流に接続し、宿  
主とする微生物中で機能するベクター（例えば大腸菌を宿主とする場合、p B R 3  
2 2、p U C 1 8、p U C 1 9 等）に挿入して発現プラスミドを構築する。あるい  
10 は、適当なプロモーターを含む発現用ベクターに、D G I をコードするDNAを連  
結してもよい。D G I を大量に発現させた場合、宿主細胞の正常な生育が阻害され  
るため、D G I の大量発現を目的とする場合には、発現誘導を制御することができ  
るプロモータを含むベクターを利用することが好ましく、このような発現用ベクタ  
ーとしては、例えば大腸菌を宿主とする場合、p L E X（インビトロジェン社製）、  
p E T（ノバジェン社製）等が挙げられる。

15 得られた発現プラスミド（すなわち、D G I をコードするDNAを含む複製可能な  
発現ベクター）で形質転換された宿主細胞を培養すれば、得られた培養液あるい  
は菌体から、目的とするD G I を得ることができる。

D G I をコードするDNAとしては、微生物の自然に存在する遺伝子を用いても  
よいが、これに限定されるものではない。例えば、大腸菌D G I の場合、配列番号  
20 7 で示されるアミノ酸配列をコードするDNAであればよく、シゲラ属微生物のD  
G I の場合、配列番号9で示されるアミノ酸配列をコードするDNAであればよい。  
アミノ酸に対応するコドンは公知であるので、ネイティブなd g i 遺伝子に限定さ  
れることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードす  
るDNAとして用いることができる。ひとつのアミノ酸をコードするコドンは各々

1～6種類知られており、コドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列をもつDNAは、化学合成や自然に存在する遺伝子の部分的改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変を

5 コードする合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして利用し、公知の部位特異的変異導入法（Mark, D. F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences, 第81巻、第5662～5666頁（1984年））等によって実施できる。

DGIを大量発現させた大腸菌では、細胞分裂に異常が観察される。また、dgi遺伝子のアンチセンスRNAを発現させてDGIの発現を抑制した場合にも、菌

10 の伸長化が観察され、このような形態異常は、ジャイレース阻害剤であるニューキノロン剤で大腸菌を処理した場合にも観察される（西野武志ら、Chemotherapy, 41(s-5)、50-66、1993）。これらのことから、DGIの活性を変調させる（増強又は阻害する）か、あるいはdgi遺伝子の発現を変調させる（増強又は抑制する）医薬化合物は、抗菌剤として有用であると考えられ

15 る。

本発明のDGIを用いることにより、被験化合物が、DGIの活性（DNAジャイレース阻害活性）を変調させる作用を有するかどうかを検定することができる。また、本発明のdgi遺伝子のプロモータを用いることにより、被験化合物が、dgi遺伝子の発現を変調させる作用を有するかどうかを検定することができる。こ

20 のような検定により、例えば抗菌剤として有用な医薬化合物をスクリーニングするとともに、同定することができる。

本発明のdgi遺伝子のプロモータを用いて、被験化合物が、DGIの活性を変調させる作用を有するかどうかを効率よく検定する方法としては、例えばdgi遺伝子中のプロモーター領域の下流に、インジケータ遺伝子を連結して、dgi遺伝

子のプロモータの制御下に、インジケータ遺伝子が発現するように設計した組換え  
プラスミドを用いる方法が挙げられる。得られた組換えプラスミドで宿主細胞を形  
質転換し、形質転換された宿主細胞中におけるインジケータ蛋白の発現を指標とし  
てプロモータ活性を効率よく測定することができる。異種間ではプロモータの発現  
5 効率が異なるという問題があるので、宿主として用いる微生物と、d g i プロモー  
タの由来とはできれば同種であることが望ましい。また、インジケータ蛋白（イン  
ジケータ遺伝子）としては、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ（l a c Z 遺伝子）、  
ルシフェラーゼ（l u c 遺伝子）、アルカリホスファターゼ（p h o A 遺伝子）等  
が挙げられる。

10 d g i 遺伝子の発現を変調させる物質としては、例えば、d g i 遺伝子のアンチ  
センスDNA又はRNAが挙げられる。このようなDNA又はRNAは例えば化学  
合成等により取得できる。また、アンチセンスRNAは、遺伝子の一部を含む断片  
を発現ベクターに逆向きに（アンチセンス方向に）挿入したプラスミドを宿主内で  
発現させて取得できる。

15 また、精製したD G Iを用いて、D G Iを特異的に認識する抗体（モノクローナ  
ルまたはポリクローナル抗体）を取得することができる。例えばポリクローナル抗  
体は、適当な宿主動物（例えば、ウサギやマウス等）に精製したD G I、その断片、  
またはその部分配列を有する合成ペプチド等を接種し、抗血清を回収する等の、通  
常の方法により製造できる。モノクローナル抗体は、精製したD G I、その断片、  
20 またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用い、通常のハイブリド  
ーマ法などの技術により製造できる。得られた抗体は、D G Iの検出、定量、精製  
などに利用できる。

なお、本発明のD G Iとしては、その断片もしくはそれらのホモログも含まれ  
る。このような断片もしくはホモログは、D G Iと同様（実質的に同種・同効）

の生物活性を有するものであるか、或いは、免疫学的同等性を有するものであればよい。具体的には例えば、DGIとしては、配列番号7又は9で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば配列番号7又は9で示されたアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、DNAジャイレース活性を阻害する能力が失われない程度であればよく、通常1～約30個、好ましくは1～約15個、より好ましくは1～約7個である。このようなタンパク質は、配列番号7又は9で示されたアミノ酸配列と通常、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上のアミノ酸配列のホモロジーを有する。

10 また、本発明のDGIをコードする遺伝子としては、配列番号6又は8で示された塩基配列を有するDNAのほか、配列番号6又は8で示された塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNAが挙げられる。このようにハイブリダイズし得るDNAは、そのDNAにコードされるタンパク質がDNAジャイレース活性を阻害する能力を有するものであればよい。このようなDNAは、配列番号6又は8で示された塩基配列と、通常、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の塩基配列のホモロジーを有する。このようにDNAとしては、自然界で発見される変異型遺伝子、人為的に改変した変異型遺伝子、異種生物由来の相同遺伝子等が含まれる。

20 本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常、ハイブリダイゼーションを、5×SSPE（5倍濃度のSSPE）又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、37～42℃の温度条件下、約12～18時間行い、5×SSPE又はこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、1×SSPE又はこれと同等の塩濃度の溶液中、50～65℃の温度条件下で洗浄を行うことにより実施できる。また、より高いストリンジ

エンシーを得るためには、より低い塩濃度の溶液中、例えば、 $0.1 \times \text{SSPE}$ 又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行えばよい。

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

- 5     なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F.及び Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

10

#### 実施例

##### 実施例 1 大腸菌 DNA ジャイレース阻害蛋白質 (DGI) の単離と同定

###### (1) 菌の培養

- 15     菌株としてエシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) KL16 株を使用し、培養を以下の通り実施した。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.25g、クエン酸ナトリウム二水和物 0.57g、 $\text{MgSO}_4$  0.12g を 1000ml の純水に溶解して滅菌後、別滅菌したカゼイン加水分解物とグルコースを 1% になるように添加して培地を調製した。この培地 (150ml) を 500ml 容三角フラスコに入れ、10ml の培養菌液 (一夜培養したもの) を加え 37°C で回転振盪 (160rpm) を行った。対数増殖後期 (OD<sub>600</sub> 約 1.0) 培養液を急冷後、4°C で遠心 (5000rpm x 10min) して集菌した。これを TED 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、1mM ジチオスレイトール) にて 2 回洗浄し、湿重量を秤量した後、等量の TED 緩衝液に懸濁し、約 20ml ずつ分注して -8

0℃で保存した。

## (2) 大腸菌DNAジャイレースの精製

DNAジャイレースの精製は、青山 (Aoyama) らの方法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy、第32巻、104-109頁、1989年) に準じ以下のように行なった。

すなわち、-80℃で保存した菌体を室温にて解凍し、20ml当たり0.5M ジチオスレイトール 0.5ml、0.5M EDTA 2ml、0.5M KCl 4ml、30mg/mlのリゾチーム溶液2mlを順次添加し、室温で15分間ゆっくり振盪した。その後、ブリッジ58 (シグマ社製) を0.5%になるように添加し、氷中で30分間攪拌した。反応液は4℃で、超遠心分離 (35,000 rpm x 1hr) を行い、上清を分取した。この上清液に20%ストレプトマイシンを最終濃度2%になるように添加し、除核酸を行った。その後、氷中で30分間攪拌し、4℃で遠心分離 (12,000 rpm x 15min) して上清を得た。上清1mlにつき0.39gの硫酸アンモニウムを添加し、遠心分離 (12,000 rpm x 20min) で沈殿物を得た。沈殿物を20mlのTED緩衝液に懸濁後、4℃で4000mlのTED緩衝液にて透析し粗抽出液 (50ml) を得た。粗抽出液は、あらかじめTED緩衝液で平衡化させたノボビオシン-セファロースカラム (ベッドポリューム30ml) に負荷した。ノボビオシン-セファロースカラムは、スタウデンバウアーとオール (Staudenbauer & Orr) らの方法 (Nucleic Acids Research、第9巻、3589-3603頁、1989年) に従って、エポキシ活性化セファロース6B (ファルマシア社製) にノボビオシン (シグマ社製) をカップリングさせたものを使用した。カラムを6倍量のTED緩衝液にて洗浄後、0.2M KCl、2M KCl、5M 尿素、2M KCl-5M 尿素、2M KCl-5M 尿素 (pH4.

0) を各々含むTED緩衝液で順次溶出し、分画した。溶出液の画分各3mlをTED緩衝液-50%グリセリンで4℃のもと一晚透析した後、各画分のスーパーコイリング活性を、後記参考例記載の方法で測定した。

5 活性の認められた画分を、DNAジャイレースのホロ酵素（サブユニットAとBの複合体）を含むものとして分取した。活性画分以外のフラクションの一部を採って、希釈した活性画分をこれに添加し、スーパーコイリング活性が回復するかどうかを検定した。スーパーコイリング活性が回復した画分を、粗精製サブユニットA画分として分取した。次に、このサブユニットA画分の一部を他の画分に加え、スーパーコイリング活性が回復するかどうかを検定した。スーパーコイリング活性が  
10 回復した画分を、粗精製サブユニットB画分として分取した。ノボビオシン-セファロースカラムからの蛋白質の溶出パターンを図1に示した。DNAジャイレースのホロ酵素（サブユニットAとBの複合体）、サブユニットA、及びサブユニットBは各々、5M尿素で溶出した画分、2M KClで溶出した画分、及び2M KCl + 5M尿素で溶出した画分中に得られた。

### 15 (3) 大腸菌DNAジャイレースのサブユニットAおよびBの精製

サブユニットAおよびBの精製は以下のとおりに行った。前記(2)で得られた粗精製サブユニットA画分（TED緩衝液にて5倍希釈したもの）85mlを、10%グリセリン含有TED緩衝液で平衡化したヘパリン-セファロースCL-6B（ファルマシア社製）カラム（ベッドボリューム15ml）に負荷した。これを同  
20 緩衝液にて洗浄後、0.05M KCl、0.2M KCl、2M KCl、2M KCl-5M尿素、2M KCl-5M尿素（pH4.0）を各々含む10%グリセリン含有TED緩衝液にて溶出し分画した。各画分（約5 $\mu$ l）は、前記(2)で得られたホロ酵素画分（約2.5 $\mu$ l）を添加してスーパーコイリング活性を測定し、精製サブユニットAを含む画分を決定した。

前記(2)で得られたサブユニットB画分(TED緩衝液にて5倍希釈したものの)35mlを、10%グリセリン含有TED緩衝液で平衡化したノボピオシナーセファロースカラム(ベッドボリューム10ml)に負荷した。同緩衝液にて洗浄後、2M KCl、2.5M 尿素、5M 尿素、2M KCl-5M 尿素、2.5M KCl-5M 尿素(pH4.0)を各々含む10%グリセリン含有TED緩衝液にて溶出し分画した。各画分に、精製サブユニットA画分を加え、スーパーコイリング活性を測定し、精製サブユニットB画分を決定した。各精製サブユニット画分は、50%グリセリン含有TED緩衝液を用いて透析し-20℃にて保存した。

#### (4) 大腸菌DNAジャイレース阻害蛋白質の単離

10 前記(2)のノボピオシナーセファロースカラムクロマトグラフィーで得られた全画分についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、活性を示した画分と活性を示さなかった画分の泳動パターンを比較した。その結果、No. 32と33の画分は、ホロ酵素に相当する蛋白質の泳動像を示したにもかかわらず、スーパーコイリング活性を示さず、これらの画分には、共通して  
15 18kDaの蛋白バンドが認められた(図2)。

画分No. 32(0.4ml)を、10%グリセロール含有TED緩衝液で平衡化したセファデックスG-75(カラム容積3.5ml)に負荷し、ゲル濾過を行った。TED緩衝液で溶出して分画した後、各画分の一部を採ってSDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって18kDaの蛋白バンドを確認しつつ、18kDa  
20 a蛋白質、すなわちDNAジャイレース阻害蛋白質(DGI)が単一バンドになった画分を精製DGIとして分取した。以上の結果、26.5gの湿菌体から約1.5μgの精製DGIが得られた。

#### (5) DGIのDNAジャイレース阻害活性

後記参考例記載のDNAジャイレースのスーパーコイル活性測定系、すなわち弛緩型pBR322 DNA (0.1  $\mu$ g)、サブユニットA (1 U) 及びサブユニットB (1 U) を含む反応液 (15  $\mu$ l) に、No. 32画分 (5  $\mu$ l) を添加して反応させたところ、弛緩型プラスミドDNAはスーパーコイル型に変換されなかつた (図3)。このことからNo. 32画分にはDNAジャイレースのスーパーコイル活性を阻害する物質が含まれていることが確認された。また、前記 (4) で得られた精製DGIは、反応液濃度8  $\mu$ g/mlにおいてDNAジャイレースのスーパーコイル活性を完全に阻害することを確認した。

#### (6) 大腸菌由来DGIのN末端アミノ酸配列の決定

10 前記 (4) で得られた精製DGIのN末端アミノ酸配列を、ペプチドシーケンサーLF3400 (ベックマン社製) を用いて決定した。その結果得られたN末端側16残基のアミノ酸配列を、後記配列表の配列番号1に示した。

#### 実施例2 大腸菌dgi遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

15 核酸配列データベース (EMBL/Genbank/DDBJ) を用いて、前記実施例1の (6) 項で決定した大腸菌DGIのN末端アミノ酸配列について、ホモロジー検索を行った結果、DGIのN末端配列は、大腸菌K-12株染色体DNAのsbcB領域 (EMBL登録番号U00009) の中に想定される産物YeeBのN末端アミノ酸配列と一致した。また、配列から算出されるYeeBの分子量は  
20 18,081ダルトンであり、DGIの分子量と一致していた。これらのことから、想定されたYeeBはDGIであり、DGIをコードする遺伝子 (dgi遺伝子) はyeeB遺伝子の翻訳領域を含む部分にあると考えられた。

そこで、E. coli KL16株染色体DNAから、前記sbcB領域 (EMBL登録番号U00009) の5'側189~1370番目の塩基に相当する領域

を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR；polymerase chain reaction）によって以下のようにクローニングした。目的とする配列の両端にBamHI認識部位を組み込んだオリゴヌクレオチドプライマー（センスプライマーの配列は後記配列表の配列番号2に、アンチセンスプライマーの配列は配列番号3に各々示した。）を設計し、DNA合成機で合成した。PCRは、0.5mg/ml E. coli KL16染色体DNA、800μM dNTP混合物（mixture）、0.66μM センスプライマー、1μM アンチセンスプライマー、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.025U/μl Taqポリメラーゼを添加したPCR緩衝液（組成：50mM KCl、10mM Tris-HCl（pH9.0）、1%トリトン（Triton）X-100）中にて反応を行い（94℃で2分、51℃2分、72℃3分で30サイクル）、DNAを増幅させた。PCRで得られた1.2kbpのDNA断片を、適当な制限酵素で切断してベクタープラスミドpUC19（宝酒造製）に連結し、得られた組換えプラスミドをE. coli JM109株に導入した。これら組換えプラスミドを用いて、蛍光式DNAシーケンサ（日立製）によりダイデオキシ法で、1.2kbp DNA断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列及びこの中のオープンリーディングフレームにコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号6に示した。この配列は既にDNA塩基配列のデータベースに登録されているE. coli K-12のsbcB領域（EMBL登録番号U00009）中の配列（yeeB遺伝子）と一致した。また、そのオープンリーディングフレームにコードされる蛋白質のN末端アミノ酸配列はDGIのN末端配列と一致しており、配列番号6に示されたDNA及びアミノ酸配列は、E. coliのdgi遺伝子のDNA配列及びDGIのアミノ酸配列であると考えられた。

## 実施例3 種々の細菌染色体のd g i 遺伝子

D G I は細菌の生育に重要であり、普遍的に存在することが予想された。そこで、前記実施例2で得られたd g i 遺伝子のDNA断片を用いて、さまざまな細菌の染色体DNAとサザンハイブリダイゼーションを行った。

- 5 サザンハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング (M o l e c u l a r C l o n i n g) (第2巻、6. 2-6. 19、9. 31-9. 46、1989年) 記載の方法に準じて行った。種々の細菌由来の染色体は、常法により調製後、E c o R I で消化したものを用了。また、プローブとしては、上記実施例2の(6)でクローニングしたE. c o l i 由来の遺伝子の中のN d e I 切断断片
- 10 を  $^{32}$ Pで標識して用了。ハイブリダイゼーションは、通常のスリンジェントな条件下で行った。すなわち、S S P E (180mM NaCl、1mM EDTA、10mM リン酸ナトリウム (pH7. 7)) を含むプレハイブリダイゼーション溶液 (5 x S S P E, 5 x デンハルト溶液、0. 5% SDS、50%ホルムアミド) で42°C、4時間振とう後、標識プローブを加えて42°Cで14時間ハイブ
- 15 リダイゼーションを行ない、洗浄は、以下の3種類の条件で行なった。

洗浄条件1 : 0. 1% SDS、0. 1% S S P E 65°C

洗浄条件2 : 0. 1% SDS、0. 1% S S P E 52°C

洗浄条件3 : 0. 1% SDS、1 x S S P E 52°C

ハイブリダイゼーションの強さは、以下のように判定した。

- 20 +++ ; 洗浄条件1で洗浄後オートラジオグラフィーを行い、  
ハイブリダイズのバンドが明瞭なもの
- ++ ; 洗浄条件2で洗浄後オートラジオグラフィーを行い、  
ハイブリダイズのバンドが明瞭なもの

+ ; 洗浄条件 3 で洗浄後オートラジオグラフィを行い、

ハイブリダイズのバンドが明瞭なもの

その結果を下記表 1 に示した。

表 1

5

菌 株 名	ハイブリダイズの強さ
エシェリシア・コリ (Escherichia coli) K-12	+++
エシェリシア・コリ (Escherichia coli) ML1410	+++
エシェリシア・コリ (Escherichia coli) ATCC25922	+++
エシェリシア・コリ (Escherichia coli) NIHJ JC-2	+++
シゲラ・ボイディー (Shigella boydii) IID627	+++
シゲラ・ディセンテリエ (Shigella dysenteriae) IID633	+++
シゲラ・ソネイ (Shigella sonnei) TRRL10805	+++
シトロバクター・フロンディー (Citrobacter freundii) IID976	++
シュードモナス・アエルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) ATCC27853	+
バシラス・サチルス (Bacillus subtilis) ATCC6633	+
エンテロコッカス・フェーカリス (Enterococcus faecalis) ATCC29212	+
スタフィロコッカス・オーレウス (Staphylococcus aureus) RN450	+

+++ ; 強いハイブリダイズ、 ++ ; 中程度のハイブリダイズ、

+ ; やや弱いハイブリダイズ

10 表 1 に示した通り、シゲラ (Shigera) 属、シトロバクター (Citrobacter) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、バシラス (B

acillus) 属、エンテロコッカス (Enterococcus) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属微生物では、エシェリシア・コリ (Escherichia coli) 由来の dgi 遺伝子断片 (配列番号 6 の第 255 番目～815 番目に相当する Nde I 断片と、ストリンジェントな条件下  
5 でハイブリダイズする断片が認められた。

すなわち、これら微生物では、相同性のある dgi 遺伝子が存在すると考えられ、特にシゲラ (Shigera) 属及びシトロバクター (Citrobacter) 属由来の遺伝子はエシェリシア (Escherichia) 属由来のものと相同性がきわめて高いものと考えられた。また、このように dgi 遺伝子と相同な遺伝子  
10 が多くの菌種に分布していることから、DGI が細菌の生育に重要であることが示唆される。

#### 実施例 4 遺伝子組換えによる大腸菌 DGI の大量発現と精製

##### (1) DGI 発現用ベクターの作製

15 大量の DGI 蛋白質を調製するために、蛋白発現用ベクタープラスミド pLEX (インビトロジェン社製) を用いて、以下のように DGI 発現系を構築した。発現用ベクター pLEX のシステムは、トリプトファンをインデューサーとする転写調節によって目的遺伝子の発現を制御するものである。すなわち、トリプトファンがない場合、trp プロモーターのもと  $\lambda$  I 遺伝子から cI リプレッサー蛋白が発現  
20 され、cI リプレッサー蛋白は、ベクター上の PL プロモーターのオペレーター領域と結合し、PL プロモーター下流に連結された目的遺伝子の転写を抑制する。一方トリプトファンが存在すると、トリプトファン-リプレッサー複合体が形成され、この複合体が trp オペレーターと強く結合して cI リプレッサー蛋白の発現を阻止し、cI リプレッサーが PL プロモーターから解離して、目的遺伝子の転写が起

こる。

プラスミド pLEX に組み込む断片として、前記実施例 2 で塩基配列を決定した dgi 遺伝子領域（配列番号 6 の第 255～815 番目の塩基に相当する断片）の両端に制限酵素 Nde I 認識部位を付加した断片を PCR にて調製した。PCR の

5 テンプレート DNA としては、E. coli KL16 株染色体 DNA を用い、プライマー（センスプライマーの配列は配列番号 4 に、アンチセンスプライマーの配列は配列番号 5 に各々示した）は DNA 合成機で合成した。得られた PCR 産物をベクタープラスミド pT7BlueT（ノバジェン社製）に連結し、E. coli JM109 に導入して組換えプラスミドを調製した。得られた組換えプラスミドを

10 Nde I で切断し、アガロース電気泳動で分離後、ゲルから 473 bp の Nde I 断片を精製し、これを pLEX に連結した。これを、エレクトロポレーション法により E. coli G1724（Invitrogen 社、米国）に導入して組換えプラスミドを調製し、挿入断片の挿入方向を、EcoRV の切断パターンによって判定して、dgi 遺伝子を含む挿入断片が正しい方向（センス方向）に挿入され

15 た組換えプラスミド pCA17 を取得した。エレクトロポレーションは、エレクトロセルマニユプレーター 600（ビーエム機器株式会社製）を用い、電位差 2.25 kV、電気抵抗 129 Ω の条件下で行なった。ベクタープラスミド pLEX に dgi 遺伝子を含む挿入断片が正方向に挿入された組換えプラスミド pCA17 で形質転換された G1724 株、すなわち E. coli G1724 (pCA17) 株

20 は、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、受託番号 FERM BP-6133 として 1997 年 10 月 6 日に寄託されている。

## (2) 大腸菌 DGI の大量発現

前項(1)で得られた*E. coli* G1724 (pCA17)株を、アンピシリン100 $\mu$ g/mlを含むRM培地(42mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.5mM NaCl、18mM NH<sub>4</sub>Cl (pH7.4)、2%カザミノ酸、1%グリセロール、1mM MgCl<sub>2</sub>)中で振とう培養した。OD6

5 00値が約0.5に達した時点で、最終濃度100 $\mu$ g/mlになるようトリプトファンを添加して、DGI蛋白質の発現を誘導した。その後、37 $^{\circ}$ Cで振とう培養を5時間続けた。培養液1mlを採取し、遠心して集菌した。得られた菌体を100 $\mu$ lのSDS緩衝液(50mM Tris-HCl (pH6.8)、138mM SDS、1.5M グリセリン、280mM 2-メルカプトエタノール)に溶解

10 して95 $^{\circ}$ Cで5分間加温して溶菌させた後、氷中保存した。その上清20 $\mu$ lについて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、蛋白発現を調べた。その結果(図4)、pCA17による形質転換株にはDGIに相当する約18キログルトンの蛋白質の大量発現が認められた。一方、dgi遺伝子を含む挿入断片が逆方向(アンチセンス方向)に挿入された組換えプラスミドpC

15 A18あるいはベクターpLEXで形質転換した株では、大量発現は認められなかった。また、DGIを大量発現している菌株を顕微鏡観察すると、細長く伸長しており、細胞分裂に異常をきたしていると考えられた。このことから、DGIの活性及び/または発現を増強する薬剤は、抗菌剤として有用であると考えられる。

### (3) 大腸菌DGIの精製

20 *E. coli* G1724 (pCA17)株を前記(2)と同様にして、培養とトリプトファンによる発現誘導を行なった。遠心分離して得られた菌体を、A溶液(30mM Tris-HCl (pH7.5)、30mM NaCl)10mlに懸濁し、氷中で超音波破碎した。破碎後、遠心分離(4 $^{\circ}$ C、8000rpm、20分)し、得られた上清について、60%飽和の硫酸沈殿を行い、17000 $\times$ G、

20分間遠心分離した。得られたペレットを30mlのTED溶液(10mM Tris-HCl pH(7.5)、1mM EDTA、1mM DTT)に溶解し同溶液で透析した。透析後、あらかじめTED溶液で平衡化したQ-セファロースファーストフローカラム(0.55cm<sup>2</sup> x 9cm)(ファルマシア社製)に負荷し、NaClの直線的濃度勾配(0.025Mから0.8Mまで)をかけてTED溶液140mlで蛋白の溶出と分画を行なった(線速度150cm/hr)。各画分についてSDS-PAGEを行ない、18kDaの蛋白質バンドが確認された画分を採取した。この画分について、TED溶液で平衡化したTSKゲルトヨパールHW-55(2.25cm<sup>2</sup> x 32cm)(東ソー社製)を用いてゲル濾過で分画し、18kDaの蛋白質バンドが確認された画分を200μlに遠心濃縮した。濃縮液をSDS-PAGE後、ゲルから目的のDGI蛋白を抽出し、再度、TSKゲルトヨパールHW-55でゲル濾過を行い、精製DGI(600μg)を得た。蛋白量は、蛋白質定量用クマシーブリリアントブルー色素液を用い、595nmの吸光度測定によって算出した。

15

#### 実施例5 DGI活性測定

前記実施例4で得られた精製DGIを用いてDGI活性、すなわちDNAジャイレース活性(スーパーコイリング活性)に対する阻害活性を測定した。活性測定反応液(20mM Tris-HCl(pH 7.5)、20mM KCl、4mM MgCl<sub>2</sub>、4mM スペルミジン、1.5mM ATP、1mM DTT、30μg/ml t-RNA、15μg/ml BSA、0.1μg 弛緩型pBR322DNA)に、DNAジャイレースサブユニットA(1U)、サブユニットB(1U)各々5μlを加え、これにDGI(蛋白濃度25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78又は0.39μg/ml)を添加して37℃で1時

間反応させた。プロテイナーゼK (1 mg/ml) 3  $\mu$  l を加えさらに 37°C で 30 分保温して反応を停止させた後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動にて泳動後、0.5  $\mu$  g/ml エチジウムブロマイド溶液で染色し、紫外線照射下で写真撮影した。超らせん型の DNA 量をデンストメータ (島津-波長フライングスポットスキャナ CS-9000、島津製作所製) で測定した。DGI 蛋白添加時の超らせん型 DNA 量を、無添加時の超らせん型 DNA 量と比較することによって DNA ジャイレース阻害活性の有無を検定した。その結果を図 5 に示した。DGI を 6  $\mu$  g/ml 以上の濃度で添加した場合に、DNA ジャイレースのスーパーコイルング活性を完全に阻害した。これより低濃度では、スーパーコイル型 DNA 変換が不完全な状態で終結して、リラックス型 DNA から薄く尾を引いたようなバンドが検出された。

以上のように、DGI 活性測定系を構築できた。本測定系において、薬物溶液 (もしくは懸濁液) を添加及び無添加で反応を実施して、DGI 活性を比較すれば、薬物の DGI 活性を変調させる作用 (活性増強作用もしくは、活性阻害作用) を検出することができ、従って、DGI 活性を変調させる薬剤のスクリーニング又は同定を行なうことができる。

#### 実施例 6 大腸菌 dgi 遺伝子のプロモーター活性測定

##### (1) プロモーター活性測定用プラスミドの作製

E. coli の dgi 遺伝子の 5' 上流域には、sbcB 領域 (EMBL 登録番号 U00009) 中の仮想産物 YeeC をコードする領域 (yeeC 遺伝子) が存在する。両遺伝子は約 122 bp 離れているが、この両遺伝子の間には、yeeC の  $\rho$  因子依存性ターミネーターと考えられるパリンδροーム構造と、dgi 遺伝子のプロモーターと推定される -10、-35 領域の典型的な配列が認められる。そ

ここで以下のように、d g i 遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片をl a c 遺伝子と連結したプラスミドを作製し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標としてd g i プロモーター活性を測定できる系を構築した。

d g i 遺伝子のプロモーター領域、転写開始領域及び翻訳領域の5'側を含む1.2 k b pのDNA断片（配列番号6の第3～1184番目の塩基に相当する断片）の両端にB a m H I 認識部位を付加したDNA断片を、P C Rにより調製した。プライマーとしては、目的領域の両端の配列各々にB a m H I 認識配列を付加した2種のオリゴヌクレオチドを合成して用いた。また鋳型としては、大腸菌K L 1 6株の染色体DNAを用いた。P C Rで得られた断片をB a m H I とR s a Iで二重切断して、推定プロモーター領域、転写開始領域及び翻訳領域の5'側33 b pからなる283 b pのDNA断片を調製した。ベクタープラスミドp L G l a c Z 7（P l a s m i d 第32巻、第233～237頁、1994年）をB a m H Iで切断した後、先に得られた283 b pのDNA断片とともに末端の平滑化を行い、両者を連結して組換えプラスミドを作製した。かくして、d g i プロモータを含む断片がl a c Z 遺伝子の上流に、同方向で連結された組換えプラスミド、すなわちD G I 蛋白のN末端側11アミノ酸残基と $\beta$ -ガラクトシダーゼの融合蛋白を発現するプラスミドp C A 1 5を得た。また、d g i プロモータを含む断片が逆方向に挿入された組換えプラスミドp C A 1 6も得た。

## (2) d g i プロモータ活性の測定

E. c o l i J M 1 0 9株に、前記(1)で得られた組換えプラスミドp C A 1 5をE. c o l i J M 1 0 9に導入した形質転換株を用いて以下のように測定した。前記菌株を一晩培養した液を、50  $\mu$  g / m l カナマイシンを含むL B培地10 m l に、O D 6 0 0 値が0.1になるように接種して、37℃で振とう培養を実施した。1時間毎に600 n mの濁度を測定するとともに、培養液を約0.3～

0. 5 ml 採取した。採取した培養液は、OD 600 値が 0. 1 になるように希釈した後、1 ml を採って遠心 (14000 rpm、1 分間) し、得られた菌体を 1 ml の Z 緩衝液 (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM  $\text{KCl}$ 、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 、50 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール) に懸濁した。
- 5 これを超音波破碎した後、遠心して、上清液 600  $\mu$  l を採取してサンプル溶液とし、各サンプル溶液の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を以下のように測定した。サンプル溶液 600  $\mu$  l を 5 分間 28°C で保温したのち、これに反応基質 ONPG (オニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) の溶液 (4 mg/ml) 200  $\mu$  l を加え、さらに 5 分間保温して反応させた後、1 M 炭酸ナトリウムを 500  $\mu$  l
- 10 加えて反応を停止した。反応終了後、420 nm と 550 nm の吸光度を測定し、サムブルック (Sambrook) らの方法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview, New York、1989 年) に準じて  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性及び蛋白量 1  $\mu$  g あた
- 15 りの比活性を算出した。サンプル溶液中の蛋白量は蛋白質定量用 CBB 色素液を用いて測定した。

増殖に伴う *dgi* プロモーター活性 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を指標とする) の継時的変化を測定した結果を図 6 に示した。菌体蛋白量 1  $\mu$  g 当たりの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、培養 2 時間後の対数増殖期 (OD 600 : 0. 5) には最も低い値を示し、以後静止期 (OD 600 : 1. 2) に達する 6 時間後まで上昇することがわかった。

プラスミド pCA15、pCA16 及び pLGlacZ7 を各々導入した *E. coli* JM109 株について前記と同様にして、*dgi* プロモーター活性を測定した。その結果、培養 18 時間後の菌体蛋白量 1  $\mu$  g 当たりの  $\beta$ -ガラクトシダー

ゼ活性は、各々216、14及び0 units/ $\mu$ gであった。このように、pCA15を保有する大腸菌では、対照プラスミド（pCA16及びpLGlaCZ7）と比較して強い $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が認められ、このことから、プラスミドpCA15を用いることにより $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として容易にdgiプロモーター活性を測定できることが確認できた。

以上のように、dgiプロモーター活性測定系を構築できた。本測定系において、薬物溶液（もしくは懸濁液）を添加及び無添加で培養を実施し、dgiプロモーター活性を比較すれば、薬物のdgi遺伝子発現を変調させる作用（発現増強作用もしくは、発現阻害作用）を検出することができ、従って、DGIの発現を変調させる薬剤のスクリーニング又は同定を行なうことができる。

#### 実施例7 アンチセンスRNAによる大腸菌dgi遺伝子の発現制御

##### (1) アンチセンスRNA発現プラスミドの導入によるdgi遺伝子の発現制御

dgi遺伝子の翻訳領域を含む断片（配列番号6の第255～728番目の塩基に相当する断片）を、ベクタープラスミドpLEX（インビトロジェン社製）のトリプトファン（trp）プロモーター下流に挿入して、アンチセンス発現ベクターを作製した。

これをE. coli G1724株に導入した。得られたアンチセンスRNA発現株を、トリプトファン添加又は無添加の条件下で培養し、生菌数および濁度（OD600）の継時的推移を測定した。その結果を、図7に示した。トリプトファン添加による発現誘導を実施しなかった場合、24時間後の菌数は $1 \times 10^9$  cfu/ml、濁度は1.0まで増加した。一方、トリプトファンを添加してdgi遺伝子アンチセンスRNAの発現を誘導した場合、生菌数は、添加8時間後まで、 $4 \times 10^7$  cfu/mlから $1 \times 10^8$  cfu/mlとわずかに増加傾向が見られたが、

24時間後には、 $5 \times 10^6$  cfu/mlに減少した。また、OD600値は、添加8時間後に0.4まで増加したが、24時間後でも0.5とほぼ一定の値を示した。また、アンチセンスRNA発現株では、菌の伸長化が観察された。このような形態異常は、大腸菌をニューキノロン系ジャイレース阻害剤で処理した場合にも観察されることが報告されている（西野武志ら、Chemotherapy、第41巻（s-5）、第50-66頁、1993年）。以上の結果から、dgiのアンチセンスRNA発現を誘導した大腸菌では、dgi遺伝子発現が抑制されて、菌の正常な生育が阻害されたと考えられる。すなわち、dgi遺伝子発現を抑制する薬剤は抗菌剤として有用であると考えられる。

10

#### 実施例8 大腸菌DGI蛋白質に対するポリクローナル抗体

##### (1) 抗DGI抗血清の調製

前記実施例3の(4)項で得られた精製DGIの溶液200 $\mu$ l(100 $\mu$ g相当)に、ゲルブアジュバント(ナカライテスク社製)25 $\mu$ gを加え、5分間室温にて振とうして完全に混合した後、ウサギの背中皮下に投与して、初回免疫を行なった。初回免疫から1週間後及び3週間後に、同様に投与してブースター免疫を行なった。免疫後、耳静脈より少量採血を行い、抗体価を確認した。血清抗体価の上昇が確認できた時点で、耳動脈より約50ml採血した。得られた血液を37 $^{\circ}$ C1時間、続いて4 $^{\circ}$ C1夜静置後、遠心分離して血清を得た。得られた抗血清は、フィルター濾過(ポア径0.45 $\mu$ m)後、分注して-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。

15

20

##### (2) 抗DGI抗体(IgG)の精製とドットプロットアッセイ

E-Z-SEP(商品名、ファルマシア社製、抗体精製用キット)を用いて、抗血清からIgG画分の精製を行った。精製した抗体のIgG濃度を、希釈ドットプロット法(抗ペプチド抗体実験プロトコール、秀潤社、大海忍、その他著、第73

～74頁)により測定したところ、300mg/mlであった。

また、ドットプロットアッセイにより、この抗体を用いて認識できる最小の抗原蛋白量を検定した。すなわち、ニトロセルロース膜に20、10、5、2.5、1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の精製DGIを0.5  $\mu\text{l}$ スポットし、これを乾燥させた後、  
5 20mg/ml BSA含有TBS (0.15M NaCl、20mM Tris-HCl (pH7.5)) 中でブロッキングした。この膜を、BSA含有TBSで希釈した抗DGI抗体 (1000倍希釈) に浸し、37℃にて1時間インキュベートした。この膜を洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗ウサギIgG抗体 (Gibco, BRL社製) とともに37℃にて0.5時間インキュ  
10 ベートした後、ジアミノベンジジン (DAB) を基質として用いたペルオキシダーゼ染色で、抗体の結合を検出した。その結果、この抗体が認識できる最小の抗原 (DGI) 蛋白量は約5ngであった。

### (3) 大腸菌DGIのウエスタンブロッティングによる検出

DGIを高発現させた大腸菌 (前記実施例4で得られたE. coli G172  
15 4 (pCA17) 株) を、超音波破碎後遠心分離して得られた上清液を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。泳動後のゲルから、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (ミリポア社製) に転写した。転写したPVDF膜をクーマシーブリリアントブルーで染色し、蛋白質の泳動パターンを確認した後、メタノールで脱色し、20mg/ml BSA含有TBS中でブロッキングした。  
20 この膜をBSA含有TBSで希釈した抗DGI抗体 (1000倍希釈) に浸して反応させた後、前記(2)のドットプロットアッセイと同様に、HRP標識抗ウサギIgG抗体及び基質DABを用いてペルオキシダーゼ染色を行なった。その結果、図8に示したように、DGIに相当する分子量18kDaの蛋白質が特異的に検出できた。このことから、得られた抗DGI抗体 (IgG) を用いてはDGIの検

出・定量が可能であると考えられた。

参考例 DNAジャイレースのスーパーコイリング活性測定法

アンチマイクロビアル・エージェンツ・アンド・ケモセラピー (Antimicrobial Agents and Chemotherapy) 第32巻、第  
5 104~109頁、1988年記載の方法に準じて以下の通り実施した。

pBR322 DNA (超らせん型、宝酒造社製) 0.5  $\mu$ g 及びトポイソメラー  
ゼI (宝酒造社製) (6 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l を、反応液 (35 mM Tris-HCl  
1 (pH 8.0)、72 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM DTT、5  
10 mM スペルミジン、0.01% ウシ血清アルブミン) 20  $\mu$ l に加え、37°Cで  
2時間反応させて、弛緩型 pBR322 DNA を調製した。この弛緩型 pBR32  
2 DNA 0.1  $\mu$ g を含むスーパーコイリング活性測定用反応液 (20 mM T  
r i s - H C l (pH 7.5)、20 mM K C l、4 mM M g C l<sub>2</sub>、4 mM  
スペルミジン、1.5 mM ATP、1 mM ジチオスレイトール、30  $\mu$ g/m  
15 l t - R N A (酵母由来)、15  $\mu$ g/ml ウシ血清アルブミン) 5  $\mu$ l に、  
検体溶液 5  $\mu$ l、DNAジャイレースサブユニットA (1 U/1.25  $\mu$ l) 5  $\mu$   
l およびサブユニットB (1 U/1.25  $\mu$ l) 5  $\mu$ l を加え、37°Cで1時間反  
応させた。これにプロテイナーゼK (1 mg/ml) 3  $\mu$ l を加え、さらに37°C  
で30分保温して反応を停止した。反応終了液を、0.8%アガロースゲル電気泳  
20 動 (泳動緩衝液 TAE; 40 mM T r i s - a c e t a t e, 1 mM E D T  
A) にて泳動後、ゲルを0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド溶液で染色した後、  
紫外線照射下で写真撮影した。検体添加時と無添加時の超らせん型 DNA 量を比較  
することにより、DNAジャイレース阻害の有無を検定した。酵素活性としては、  
弛緩型プラスミド DNA 量の50%を超らせん型 DNA に変換させるのに必要な酵

素量を1単位(U)とした。

#### 実施例9 シゲラ属微生物のdgi遺伝子のクローニング

前記実施例3で示した通り、シゲラ属(*Shigella*属)染色体には、E. coli由来のdgi遺伝子と強くハイブリダイズするEcoRI断片が認められ、その断片の大きさは約7kbであることがわかった。そこでシゲラ ディセンテリエ(*Shigella dysenteriae*) IID633の染色体をEcoRI切断しアガロース電気泳動を行い、約7kbのDNA断片を回収した。得られたDNA断片をpUC19のEcoRI切断部位に連結し得られた組換えプラスミドをE. coli JM109株に導入した。大腸菌由来dgi遺伝子を含むDNA断片をプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、陽性コロニー10株を解析した結果、6株がpUC19上に7.5kbのEcoRI DNA断片を保持していた。この挿入断片について種々の制限酵素で切断し、大腸菌dgi遺伝子を含むDNA断片とのハイブリダイゼーションにより解析した結果、1.5kbのAvaI断片上にシゲラ属dgiの遺伝子が存在すると考えられた。

塩基配列決定のため、このDNA断片を含むプラスミドから種々の欠失プラスミドを調製し、これらのプラスミドを用いて、蛍光式DNAシーケンサー(日立製、SQ5500)により、ダイデオキシ法で塩基配列を決定した。1444bpの配列が決定された。シゲラ ディセンテリエの1444bpのDNA塩基配列について、大腸菌のdgi遺伝子周辺の配列と比較したところ、全域にわたって98.3%という高い相同性が認められ、その第699番目の塩基から1169番目の塩基までの領域に相当するオープンリーディングフレーム(ORF)がdgi遺伝子のORFであると判明した。ORFの上流にプロモーターおよびリボゾーム結合領域と考えられる配列が認められORFに続いてロー非依存性ターミネーターと推測

される配列が認められた。シゲラ ディセンテリエ由来の d g i 遺伝子を含む 1 4 4 4 b p の断片の DNA 配列、及びこの中にコードされる D G I のアミノ酸配列を配列番号 8 に示した。また、同アミノ酸配列を配列番号 9 に示した。シゲラ ディセンテリエの D G I は、大腸菌の D G I と同じく 1 5 7 アミノ酸残基よりなるポリペプチドで、分子量は約 1 8 キロダルトンと推定された。両 D G I のアミノ酸配列は 9 6 . 8 % という高い相同性を示した。

#### 産業上の利用可能性

本発明の DNA ジャイレース阻害蛋白質 (D G I) は、その活性またはその発現を変調させることにより細菌の正常な生育を阻害することができる。本発明の DNA ジャイレース阻害蛋白質 (D G I) 及びその遺伝子 (d g i 遺伝子) を用いることにより、D G I 活性又は d g i 遺伝子プロモータ活性を測定することができ、これら測定方法は、D G I 活性や d g i 遺伝子の発現を変調させる薬剤のスクリーニング方法及び同定方法として有用である。これらスクリーニング方法及び同定方法は、新しい作用機作に基づく抗菌剤や農薬の開発に有用である。さらに、d g i 遺伝子に対するアンチセンス RNA もしくは DNA は、D G I 発現を抑制する薬剤として有用であり、抗 D G I 抗体は、D G I の検出・定量に利用できる。



配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

5 GTGGATCCCA GACTAACATC AGCGGTAACG 30

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACATATGAA CTACGAGATT AAGC 24

15 配列番号：5

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

20 配列

CACATATGAG CGAAAAAATT GAAAGGCG 28

配列番号：6

配列の長さ：1224



37

	ACG CTT CCC GAA AAC AGT GAG GGC GTC ATT CTG ACA GAA ATT ACA	524
	Thr Leu Pro Glu Asn Ser Glu Gly Val Ile Leu Thr Glu Ile Thr	
	80 85 90	
	GGT GGT CAG TAT GCG GTG GCG GTA GCT CGT GTA GTC GGT GAT GAT	569
5	Gly Gly Gln Tyr Ala Val Ala Val Ala Arg Val Val Gly Asp Asp	
	95 100 105	
	TTT GCT AAA CCC TGG TAT CAG TTC TTT AAT AGT CTC TTG CAG GAC	614
	Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Gln Phe Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asp	
	110 115 120	
10	AGT GCT TAT GAA ATG TTA CCA AAG CCC TGC TTC GAG GTT TAT TTG	659
	Ser Ala Tyr Glu Met Leu Pro Lys Pro Cys Phe Glu Val Tyr Leu	
	125 130 140	
	AAC AAT GGC GCG GAA GAT GGG TAC TGG GAT ATC GAA ATG TAT GTT	704
	Asn Asn Gly Ala Glu Asp Gly Tyr Trp Asp Ile Glu Met Tyr Val	
15	140 145 150	
	GCG GTG CAG CCA AAA CAT CAC	725
	Ala Val Gln Pro Lys His His	
	155 157	
	TAATTCATCT CAGGGCGGTG TGTTAACGCG ATGACCACTC TTTTTTTTGA AAGCGAAAAG	785
20	AGTAAGATGC GCCTTTCAAT TTTTTCGCTC CTGCCGGGAA ATTACACTGT TCCCGGTTTG	845
	TCCGTCCGAT AATTCAGAGG CGCGCCTTCT GGCCGACAGA TGAGTTATGA GCGCTTTTAA	905
	TCTCATTACG GAGTTTCTGC GTGCGTGCCG ATAAGTCATT AAGCCCGTTT GAAATCCGGG	965
	TATACCGCCA TTACCGCATT GTGCATGGTA CTCGGGTCCG GCTGGCATTTC CTGCTCACTT	1025
	TTCTCATTAT CCGCCTGTTT ACTATCCCGG AAAGCACCTG GCCGCTGGTC ACCATGGTGG	1085
25	TGATTATGGG GCCAATCTCG TTCTGGGGTA ACGTTGTCCC TCGCGCCTTT GAGCGIATTG	1145
	GCGGTACGGT GTTGGGTTCG ATTTTAGGTC TTATCGCTCT GCAACTGGAG TTAATCTCGT	1205
	TACCGCTGAT GTTAGICTG	1224

配列番号 : 7

30 配列の長さ : 1 5 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：エシェリシア コリ (Escherichia coli)

株名：KL16

5 配列

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

配列番号：8

30 配列の長さ：1444

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

5 起源

生物名：シゲラ ディセンテリエ (*Shigella dysenteriae*)

株名：I I D 6 3 3

配列

```

CCGAGTTTFA TCATATGTAC AGTGAGAAAA GTCTCACCTG GAACGGTATC ACCCAGCAAA 60
10 ACCGTAACGG GTTATTGTGG GATAAAACCA TGAATGTTGA CGGCCTGAAA ACGGGTCATA 120
CTTCTGGTGC CGGGTTTAAT CTCATTGCTT CGGCTGTGCA TGGGCAGCGT CGTCTCATTTG 180
CAGTGGTAAT GGGGGCTGAC AGTGCAAAAG GTCGTGAGGA AGAGGCAAGA AAATTACTGC 240
GTTGGGGGCA ACAAACCTTT ACTACGGTGC AAATTTTGCA CCGTGGGAAA AAGGTCCGTA 300
CGGAACGCAT CTGGTATGGC GATAAAGAAA ATATCGACCT GGAACGGAA CAAGAGTTCT 360
15 GGATGGTGCT ACCGAAAGCC GAAATTCAC ATATCAAAGC CAAATATACC CTTGATGGTA 420
AAGAGCTCAC CGCGCCAATT AGCGCCCATC AGCGGGTAGG GGAAATTGAA CTTTACGACC 480
GTGATAACA GGTGGCGCAC TGGCCGCTGG TTACCCTGGA ATCTGTCGGG GAAGGCAGCA 540
TGTTTTCTCG CCTGAGTGAT TATTTCCACC ATAAGGCCTG ACCTTTCTTT TGCAGCAGAC 600
TGGCAGGAGT GCGAGTCTGC TCGCATAATC AACACTCATT CCTTGTTGTT TTAATATCGC 660
20 AATTATACTG TATATAAAAA CAGTGTGAT GGAGCGTC 698
ATG AAC TAC GAG ATT AAG CAG GAA GAT AAA CGT ACC GTT GCA GGT 743
Met Asn Tyr Glu Ile Lys Gln Glu Asp Lys Arg Thr Val Ala Gly
  1           5           10           15
TTC CAT CTC GTT GGC CCG TGG GAA CAG ACG GTA AAG AAA GGC TTT 788
25 Phe His Leu Val Gly Pro Trp Glu Gln Thr Val Lys Lys Gly Phe
           20           25           30
GAG CAG TTG ATG ATG TGG GTA GAT AGC AAA AAT ATT GTG CCG AAG 833
Glu Gln Leu Met Met Trp Val Asp Ser Lys Asn Ile Val Pro Lys
           35           40           45

```

	GAG TGG GTT GCT GTC TTT TAC GAC AAT CCA GAT GAA ACA CCC GCC	878
	Glu Trp Val Ala Val Phe Tyr Asp Asn Pro Asp Glu Thr Pro Ala	
	50 55 60	
	GAA AAA TTA CGC TGC GAC ACC GTC GTG ACG GTG CCG AAT AAC TTT	923
5	Glu Lys Leu Arg Cys Asp Thr Val Val Thr Val Pro Asn Asn Phe	
	65 70 75	
	ACG CTC CCC GAA AAC AGT GAG GGC GTC ATT CTG ACA GAA ATT TCA	968
	Thr Leu Pro Glu Asn Ser Glu Gly Val Ile Leu Thr Glu Ile Ser	
	80 85 90	
10	GGT GGT CAG TAT GCG GTT GCG GTG GCT CGT GTA GTC GGT GAT GAT	1013
	Gly Gly Gln Tyr Ala Val Ala Val Ala Arg Val Val Gly Asp Asp	
	95 100 105	
	TTT GCT AAA CCC TGG TAT CAG TTC TTT AAT AGC CTC TTG CAG GAC	1058
	Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Gln Phe Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asp	
15	110 115 120	
	AGT GCT TAT GAA ATG TTA CCA AAG CCC TGC TTC GAG GTT TAT TTG	1103
	Ser Ala Tyr Glu Met Leu Pro Lys Pro Cys Phe Glu Val Tyr Leu	
	125 130 135	
	AAC AAT GGC GCG GAA GAT GGG TAC TGG GAT ATC GAA ATG TAT GTT	1148
20	Asn Asn Gly Ala Glu Asp Gly Tyr Trp Asp Ile Glu Met Tyr Val	
	140 145 150	
	GCG GTG CAG CCA AAA CAT CAC	1169
	Ala Val Gln Pro Lys His His	
	155 157	
25	TAATTCATCT CAGGGCGGTG TGTTAACGCG ATGACCACTC TTTTTTTGAA AGCGAAAAGA	1229
	GTAAGATGCG CCTTTCAATT TTTTCGCTCC TGCCGGGAAA TTACACTGTT CCCGGITTGT	1289
	CCGTCCGATA ATTCAGAGGC GGGCCTTCTG GCCGACAGAT GAGTTATGAG CGCTTTTAAT	1349
	CTTCATTACG GAGTTTCTGC GTGCGTGCCG ATAAGTCATT AAGCCCGTTT GAAATCCGGG	1409
	TATACCGCCA TTACCGCATT GTGCATGGTA CTCGG	1444

30

配列番号 : 9

配列の長さ : 1 5 7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

5 生物名：シゲラ ディセンテリエ (*Shigella dysenteriae*)

株名：I I D 6 3 3

配列

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

30

## 請求の範囲

1. 細菌のDNAジャイレース活性を阻害する蛋白質。
2. 細菌の染色体上の遺伝子にコードされる請求の範囲第1項記載の蛋白質。
- 5 3. 分子量が約18キロダルトンである請求の範囲第1項記載の蛋白質。
4. 配列番号1で示されるN末端側アミノ酸配列を有する請求の範囲第3項記載の蛋白質。
5. エシェリシア属に属する微生物由来である請求の範囲第1項記載の蛋白質。
6. シゲラ属に属する微生物由来である請求の範囲第1項記載の蛋白質。
- 10 7. シトロバクター属、シュードモナス属、バシラス属、エンテロコッカス属又はスタフィロコッカス属に属する微生物由来である請求の範囲第1項記載の蛋白質。
8. 配列番号6又は配列番号8で示される塩基配列からなるDNA断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子でコードされるものである請求の範囲第1項記載の蛋白質。
- 15 9. (1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号7で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列からなり、かつ、細菌のDNAジャイレース活性を阻害する能力を有する蛋白質。
10. (1) 配列番号9で示されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号9で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列からなり、かつ、細菌のDNAジャイレース活性を阻害する能力を有する蛋白質。
- 20 11. 配列番号6または配列番号8で示される塩基配列からなるDNA断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細菌のDNAジャイレース活性

を阻害する能力を有する蛋白質をコードするDNAからなる、請求の範囲第1項記載の蛋白質の遺伝子。

12. 請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNAを含む複製可能な発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

5 13. 請求の範囲第12項記載の宿主細胞を培養することからなる、請求の範囲第1項記載の蛋白質の製造方法。

14. 配列番号7または9で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを含む複製可能な発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

10 15. 請求の範囲第14項記載の宿主細胞を培養することからなる、請求の範囲第1項記載の蛋白質の製造方法。

16. 請求の範囲第1項記載の蛋白質の有するDNAジャイレース阻害活性を変調させる作用を検定することからなる、医薬化合物の同定方法。

17. 請求の範囲第1項記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を変調させる作用を検定することを特徴とする、医薬化合物の同定方法。

15 18. 請求の範囲第1項記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター活性に対する医薬化合物の作用を測定することにより、遺伝子の発現を変調させる作用を検定するものである請求の範囲第17項記載の方法。

19. 医薬化合物が抗菌作用薬である請求の範囲第16項又は第17項記載の方法。

20 20. 請求の範囲第16項又は第17項記載の方法により選択され、同定された抗菌作用薬。

21. 請求の範囲第1項記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター、及び該プロモーターの制御下に発現するように連結されたインジケータ遺伝子を含むベクターで形質転換された宿主細胞を用い、該形質転換された宿主細胞中におけるインジケータ蛋白の発現を指標としてプロモーター活性を測定することからなる、請求の

範囲第 1 項記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター活性の測定方法。

2 2. 請求の範囲第 1 項記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーターが、配列番号 6 または配列番号 8 で示される遺伝子のプロモータである、請求の範囲第 2 1 項記載の測定方法。

5 2 3. 請求の範囲第 1 項記載の蛋白質をコードする遺伝子のアンチセンス DNA もしくはアンチセンス RNA。

2 4. 請求の範囲第 1 項記載の蛋白質をコードする遺伝子のアンチセンス DNA もしくはアンチセンス RNA を発現する複製可能な発現ベクター。

2 5. 請求の範囲第 1 項記載の蛋白質をコードする遺伝子のアンチセンス DNA もしくはアンチセンス RNA を発現する複製可能な発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

2 6. 細菌の DNA ジャイレース活性を阻害する蛋白質を認識する抗体。

図 1

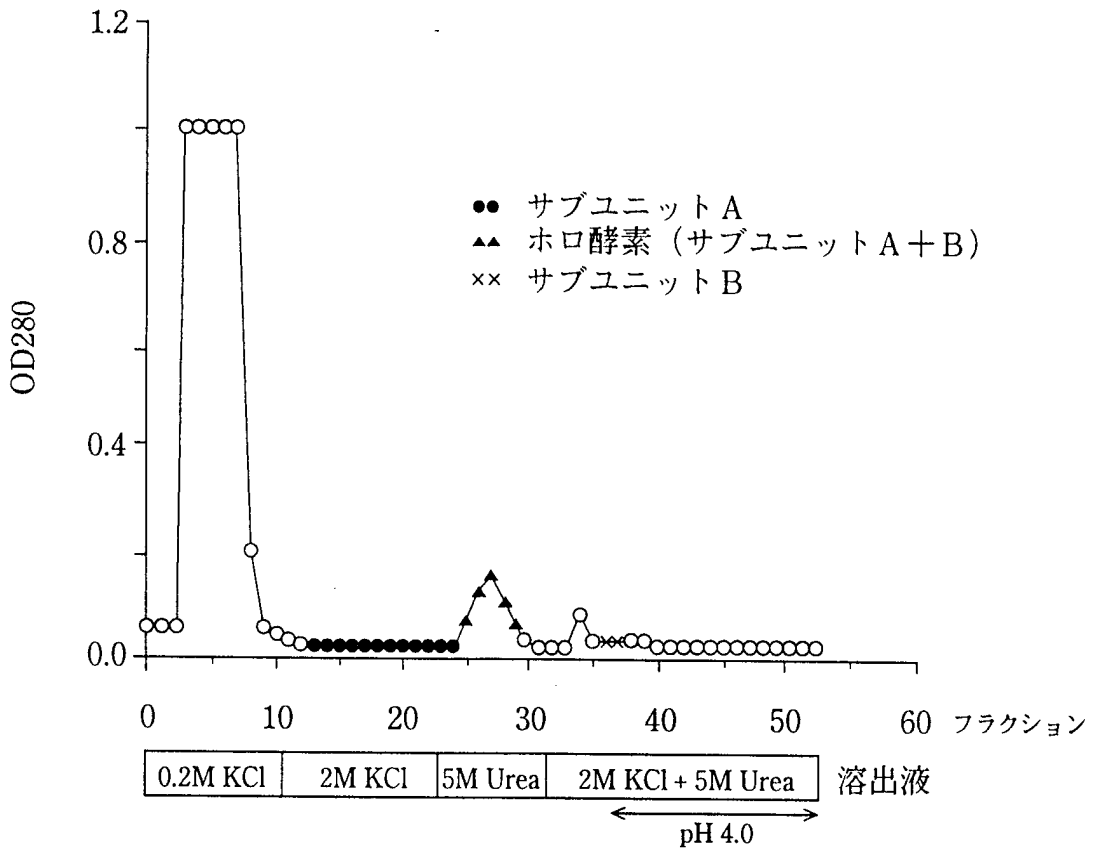


図 2

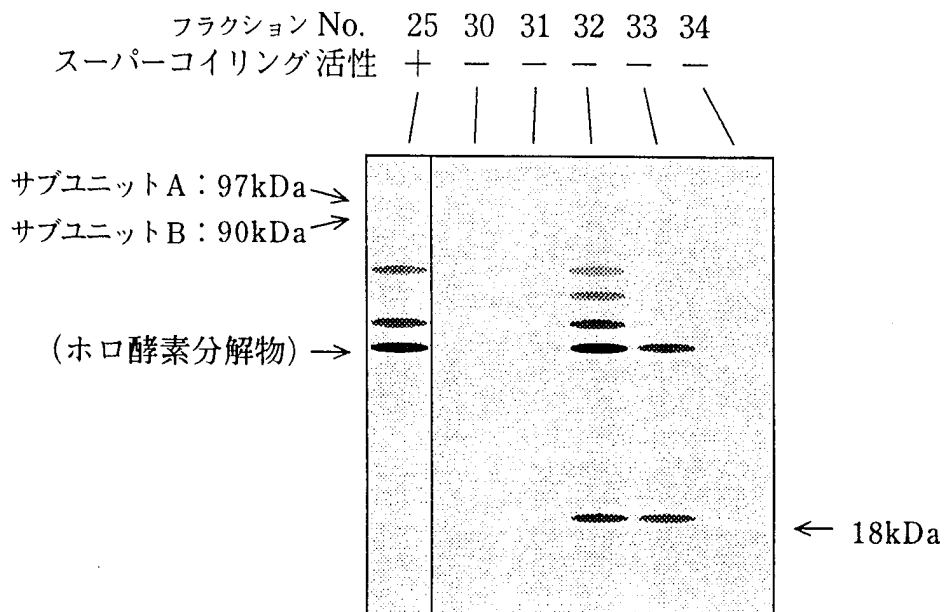
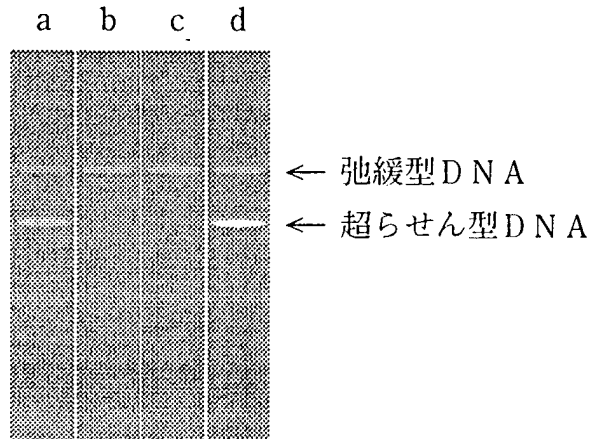
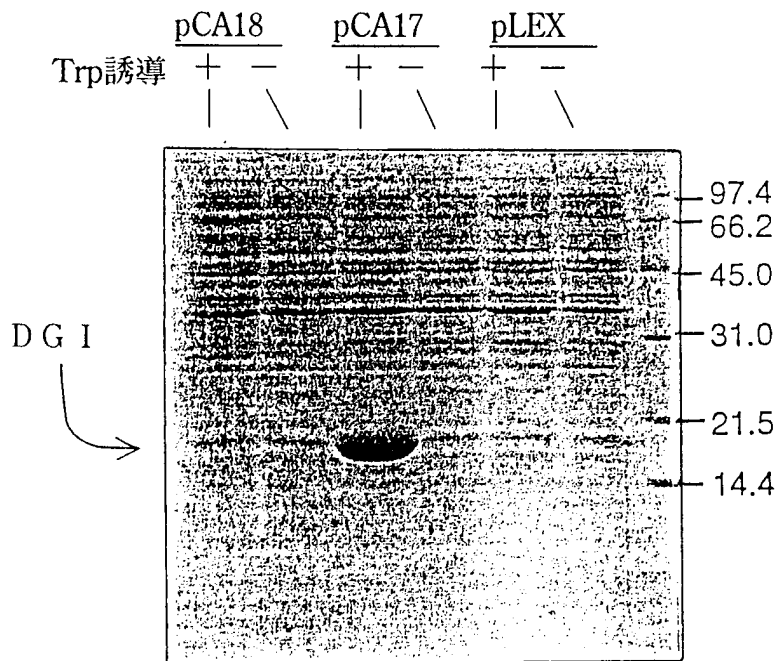


図 3



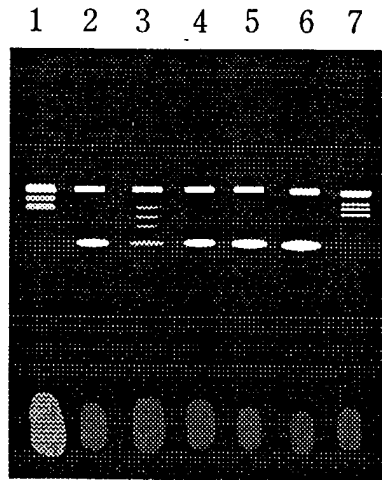
- a : フラクシオン No. 32 無添加
- b : フラクシオン No. 32 添加
- c : 弛緩型 DNA
- d : 超らせん型 DNA

図 4



- レーン 1, 2 : E. coli (pCA18)
- レーン 3, 4 : E. coli (pCA17)
- レーン 5, 6 : E. coli (pLEX)
- (レーン 1, 3, 5はトリプトファンで誘導した)
- レーン M : 分子量マーカー (kDa)

図 5



- レーン 1 : DG I 6µg/ml 添加
- レーン 2 : 対照 DG I 添加なし
- レーン 3 : DG I 3µg/ml 添加
- レーン 4 : DG I 1.5µg/ml 添加
- レーン 5 : 対照 DG I 添加なし
- レーン 6 : スーパーコイル型 DNA
- レーン 7 : リラックス型 DNA

図 6

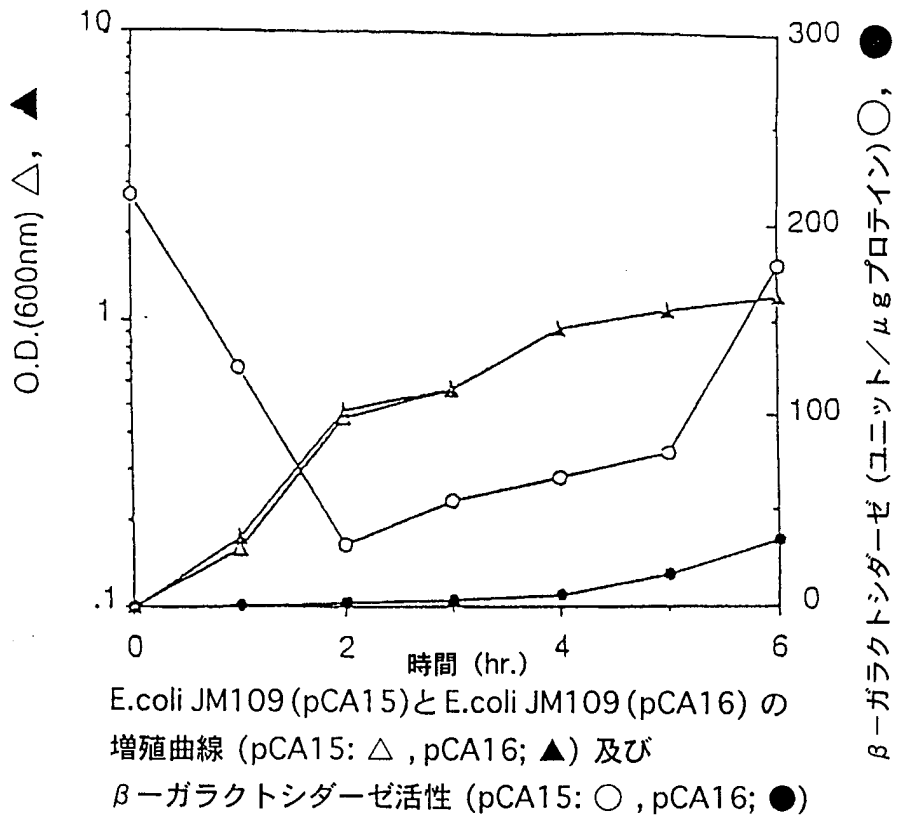
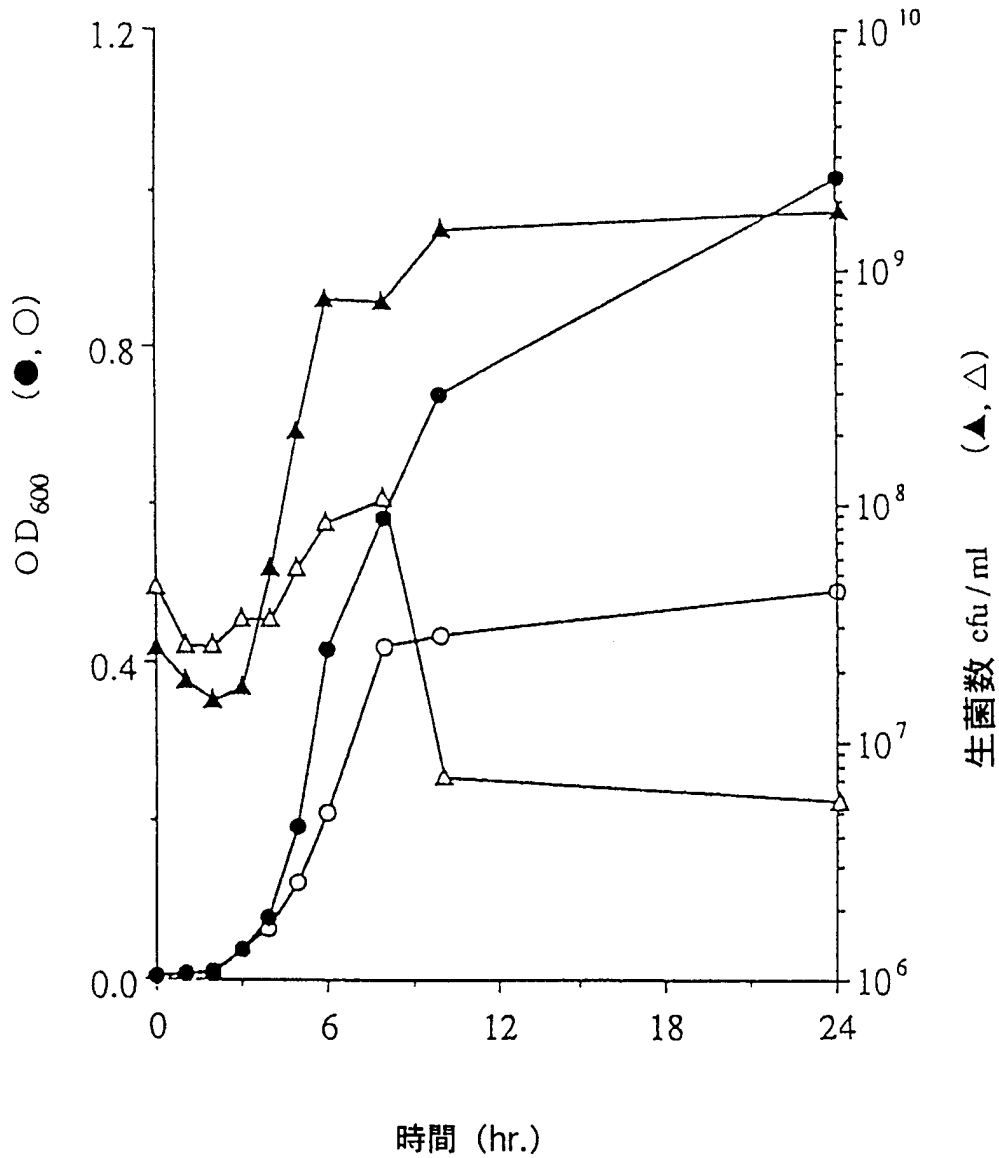
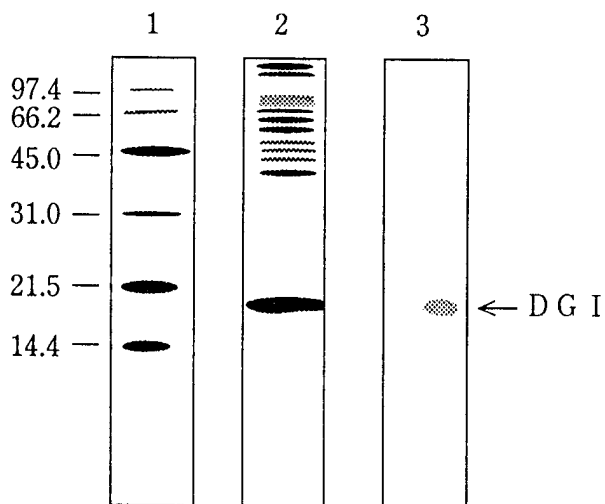


図 7



● ▲ トリプトファン無添加  
 ○ △ 時間 =0 にトリプトファン添加

図 8



- レーン 1 : 分子量マーカー (k D a)
- レーン 2 : 菌体抽出液 C B B 染色
- レーン 3 : 菌体抽出液 抗 D G I 抗体ペルオキシダーゼ染色

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/31, C07K14/21, C07K14/245, C07K14/25, C07K14/31, C07K14/315, C07K16/12, C12N1/21, C12P21/02, A61K48/00 // (C12N15/31, C12R1:01) (C12N15/31, C12R1:07) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/31, C07K14/21, C07K14/245, C07K14/25, C07K14/31, C07K14/315, C07K16/12, C12N1/21, C12P21/02, A61K48/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG) GenBank (GENETYX)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Mol. Microbiol. 18 (1995) M.R. Baquero et al. "sbmC, a stationary-phase induced SOS Escherichia coli gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microncin B17" p. 301-311	1-15, 21-26 16 - 20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search February 3, 1998 (03. 02. 98)	Date of mailing of the international search report February 17, 1998 (17. 02. 98)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04019

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(C12N15/31, C12R1:185) (C12N15/31, C12R1:38) (C12N1/21, C12R1:19)  
(C12P21/02, C12R1:19)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  C12N15/31, C07K14/21, C07K14/245, C07K14/25, C07K14/31, C07K14/315, C07K16/12, C12N1/21, C12P21/02, A61K48/00 //                  (C12N15/31, C12R1:01) (C12N15/31, C12R1:07) (C12N15/31, C12R1:185) (C12N15/31, C12R1:38) (C12N1/21, C12R1:19)                  (C12P21/02, C12R1:19)</p>		
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  C12N15/31, C07K14/21, C07K14/245, C07K14/25, C07K14/31, C07K14/315, C07K16/12, C12N1/21, C12P21/02, A61K48/00</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                  BIOSIS (DIALOG)                  WPI (DIALOG)                  GenBank (GENETYX)</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
<p>引用文献の                  カテゴリー*</p>	<p>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</p>	<p>関連する                  請求の範囲の番号</p>
<p>X                  A</p>	<p>Mol. Microbiol. 18 (1995) M. R. Baquero et al 「sbmC, a stationary-phase induced SOS Escherichia coli gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microncin B17」 p. 301-311</p>	<p>1-15, 21-26                  16-20</p>
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p>		
<p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>	
<p>国際調査を完了した日                  03.02.98</p>	<p>国際調査報告の発送日                  17.02.98</p>	
<p>国際調査機関の名称及びあて先                  日本国特許庁 (ISA/JP)                  郵便番号100-8915                  東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)                  田中 美奈子</p>	<p>4 B 9548</p>
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3449</p>		