

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4500991号
(P4500991)

(45) 発行日 平成22年7月14日(2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P	3/14	(2006.01)	A 6 1 P 3/14
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 10 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-578567 (P2003-578567)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月18日(2002.6.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2002/006063
 (87) 国際公開番号 W02003/080841
 (87) 国際公開日 平成15年10月2日(2003.10.2)
 審査請求日 平成16年9月10日(2004.9.10)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-81415 (P2002-81415)
 (32) 優先日 平成14年3月22日(2002.3.22)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

特許法第30条第1項適用 2002年3月5日社団法人日本農芸化学会発行の「2002年度大会講演要旨集」に発表

(73) 特許権者 501167644
 独立行政法人農業生物資源研究所
 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (72) 発明者 北本 宏子
 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内
 (72) 発明者 宮川 都吉
 広島県東広島市鏡山1-3-1 広島大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルシニューリン活性化剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

クリユイペロミセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)キラータンパク質(KLK P)を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤。

【請求項2】

以下のタンパク質を有効成分とする、請求項1記載の真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるサブユニット、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるサブユニットおよび配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるサブユニットの3つのサブユニットからなるクリユイペロミセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)キラータンパク質(KLK P)、または

(b) (a)のタンパク質において3つのサブユニットの少なくとも一つが配列番号2、3または4で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるサブユニットであり、かつクリユイペロミセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)キラータンパク質(KLK P)活性を有するタンパク質。

【請求項3】

カルシウムイオンと請求項1または2記載のカルシニューリン活性化剤を含む、酵母を

除く真核細胞の増殖阻害剤。

【請求項 4】

カルシウムイオンと請求項 1 または 2 記載のカルシニューリン活性化剤を含み、細胞周期における G 2 期阻害剤。

【請求項 5】

K L K P 感受性酵母株にクリュイベロミセス・ラクティス (*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s*) キラータンパク質 (K L K P) を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤と被験物質を作用させ、被験物質の K L K P 感受性酵母の感受性を解除させる能力を指標にカルシニューリン阻害に關与する化合物をスクリーニングする方法

10

【請求項 6】

クリュイベロミセス・ラクティス (*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s*) キラータンパク質 (K L K P) とヒト細胞を除く真核細胞とを接触させ、カルシウムイオンの該真核細胞内への流入により細胞内カルシウムイオン濃度を増加させることを含む、ヒト細胞を除く真核細胞のカルシニューリンを活性化する方法。

【請求項 7】

クリュイベロミセス・ラクティス (*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s*) キラータンパク質 (K L K P) が以下の 3 つのサブユニットからなる、請求項 6 記載の方法。
(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるサブユニット、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるサブユニットおよび配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるサブユニットの 3 つのサブユニットからなるクリュイベロミセス・ラクティス (*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s*) キラータンパク質 (K L K P) 、または
(b) (a) のタンパク質において 3 つのサブユニットの少なくとも一つが配列番号 2 、3 または 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるサブユニットであり、かつクリュイベロミセス・ラクティス (*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s*) キラータンパク質 (K L K P) 活性を有するタンパク質。

20

【請求項 8】

請求項 6 または 7 記載の方法によりヒト細胞を除く真核細胞のカルシニューリンを活性化させることによる、ヒト細胞を除く真核細胞の増殖を阻害する方法。

30

【請求項 9】

請求項 6 または 7 記載の方法によりヒト細胞を除く真核細胞のカルシニューリンを活性化させることによる、ヒト細胞を除く真核細胞の細胞周期を阻害する方法。

【請求項 10】

カルシウムイオンを添加することをさらに含む、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティス (*K l u y v e r o m y c e s l a c t i s*) が生産するキラータンパク質 (K L K P) の利用に関する。具体的には、キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤に関する。さらに、該カルシニューリン活性化剤を含有する真核細胞の増殖阻害剤および真核細胞周期阻害剤に関する。

40

背景技術

近年酵母 (*S . c e r e v i s i a e*) のキラーシステムに関する種々の研究がされている。K 1 キラータンパク質は T O K 1 過剰活性化し細胞膜機能を破壊する (A h m e d , A . e t a l . , C e l l 9 9 , 2 8 3 - 2 9 1 (1 9 9 9)) 。また、キチンシンターゼ I I I の破壊および非局在化は酵母に *K . l a c t i s* キラータンパク質 (K L K

50

P) に対する耐性を付与する (Jablonski, D., et al., Yeast 18 p. 1285 (2001)). K L K P はプラスミド p G K L 1 上の遺伝子でコードされ、サブユニット、サブユニットおよびサブユニットの3つのサブユニットからなることが報告されている (Stark M J et al., EMBO J., Aug, 5 (8), p. 1995 - (1986)).

また、本発明者らは、先に K L K P の作用が Ca^{2+} で活性化されることを報告した。しかし、そのキラー活性のメカニズムの解明はなされておらず、また、酵母キラータンパク質は、酵母のみに対してキラー活性を有するとされており、その産業への応用も醸造分野等に限られていた。

カルシニューリン (CaN) は Ca^{2+} / カルモジュリン複合体で制御される真核生物唯一の脱リン酸化酵素で、細胞増殖・分化や転写制御の調節機構など Ca^{2+} が介する情報伝達系の中心的役割を果たしている。酵母で明らかにされた CaN の作用機構は、高等真核生物における CaN の機能を解析する上で重要な情報となっている。CaN 阻害剤は免疫抑制剤として実用化されているが、CaN は様々な機能を持っており、さらに医療や農業への応用が期待されている。既に明らかにされた CaN の機能と、産業に応用されているものを表 1 に示した。

表 1. CaN の作用と産業上への応用

酵母で明らかにされた作用	高等真核生物での作用
免疫抑制剤の作用点 = CaN 阻害	免疫抑制 (免疫抑制剤の実用化 → 移植医療)
イオンホメオスターシス * 1	CaN 阻害 → 免疫抑制剤の副作用 腎障害 高脂血症 高血圧
細胞周期抑制 * 2 イノシトールリン脂質代謝 細胞壁合成	CaN 活性化 T 細胞の活性化 がん細胞の分化誘導 アポトーシス 筋原繊維の再構築 植物 温度・塩ストレス耐性

* 共同研究者により報告されたもの (1. EMBO Journal, 12, p. 4063 (1993) 2. NATURE, 392, p. 303 (1998))

出芽酵母を用いて Ca^{2+} で活性化された CaN が細胞周期エンジンの負の調節因子を活性化し、細胞周期を遅らせることが報告されている (NATURE, 392, p. 303 (1998)).

このように、カルシニューリンの活性化、阻害作用を有する物質は、真核細胞の増殖阻害剤、医薬等広く産業への応用が期待されているが、従来容易に入手可能なカルシニューリン活性化剤は多くなかった。

発明の開示

本発明は、キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K

10

20

30

40

50

L K P)を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤の提供を目的とする。さらに、本発明は、該カルシニューリン活性化剤を含有する真核細胞の増殖阻害剤および真核細胞周期阻害剤の提供を目的とする。カルシニューリン活性化剤を含む組成物は、真核細胞の増殖阻害剤、抗がん剤等に広く応用が可能であり、本発明はこのような真核細胞の増殖阻害剤、抗がん剤、免疫抑制剤、免疫活性化剤、記憶に関する疾患の治療剤、循環器の疾患の治療剤の提供をも目的とする。

本発明者らは、キラータンパク質(Calnexin)が産生するキラータンパク質(KLK P)が出芽酵母細胞内カルシウム(Ca^{2+})の細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、カルシニューリン(CaN)を活性化させて細胞周期G2期遅延を引き起こすことを見出した。さらに、KLK Pは植物培養細胞の増殖抑制も引き起こすことを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、キラータンパク質(Calnexin)が産生するキラータンパク質(KLK P)を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤である。

本発明は、また以下のタンパク質を有効成分とする、上記真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤である。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるサブユニット、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるサブユニットおよび配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるサブユニットの3つのサブユニットからなるキラータンパク質(KLK P)、または

(b) (a)のタンパク質において3つのサブユニットの少なくとも一つが配列番号2、3または4で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるサブユニットであり、かつキラータンパク質(KLK P)活性を有するタンパク質。

本発明は、さらにカルシウムイオンと上記カルシニューリン活性化剤を含む真核細胞の増殖阻害剤である。

本発明は、さらにカルシウムイオンと上記カルシニューリン活性化剤を含む真核細胞周期阻害剤である。

本発明は、さらにチーズホエーもしくはチーズホエー由来のカルシウムを高濃度で含む調製物と上記カルシニューリン活性化剤を含む真核細胞周期阻害剤である。

本発明は、さらにカルシウムイオンおよび上記カルシニューリン活性化剤を同時にまたは別々にサイレージに添加する工程を含む、サイレージの好気的変敗を防止する方法である。

本発明は、さらにカルシウムイオンの添加がチーズホエーもしくはチーズホエー由来のカルシウムを高濃度で含む調製物の添加により行われる、上記方法である。

本発明は、さらに上記カルシニューリン活性化剤を含む医薬組成物であって、抗がん剤、免疫抑制剤、免疫活性化剤、記憶に関する障害の治療剤、循環器の疾患の治療剤からなる群から選択される医薬組成物である。

本発明は、さらにKLK P感受性酵母株にキラータンパク質(KLK P)を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤と被験物質を作用させ、被験物質のKLK P感受性細胞の感受性を解除させる能力を指標にカルシニューリン阻害に關与する化合物をスクリーニングする方法である。

本発明は、さらにKLK P感受性酵母株にキラータンパク質(KLK P)を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤と被験物質を作用させ、被験物質のKLK P感受性酵母の感受性を解除させる能力を指標にカルシニューリンが關与する疾患の治療薬をスクリーニングする方法である。

10

20

30

40

50

本発明は、さらにカルシニューリンが関与する疾患の治療薬が、抗がん剤、免疫抑制剤、免疫活性化剤、記憶に関する障害の治療剤、循環器の疾患の治療剤からなる群から選択される上記方法である。

以下、本発明について詳細に説明する。

1. キラー酵母クリユイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (KLKP) の取得

キラー酵母とは、他の酵母の生育を選択的に抑制するタンパク性のキラー毒素を生産する酵母をいう。本発明に用いるキラー酵母が生産するキラータンパク質KLKPは、クリユイベロミセス・ラクティスから得ることができる (Kitamoto, H. K. et al., (1995) 7th European Congress on Biotechnology, Abstract Book, 62)。クリユイベロミセス・ラクティスの生産するキラータンパク質KLKPは、3つのサブユニット、およびからなり、これらをコードするDNAは線状プラスミドpGKL1上に存在する。クリユイベロミセス・ラクティスとしては例えば、IF01267株が挙げられる。クリユイベロミセス・ラクティスIF01267株は、財団法人 発酵研究所 (大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号) から入手することができる。前記キラー酵母を培養し、培養物からKLKPを単離・精製することができる。ここで、培養物とは培養上清および培養菌体をいう。酵母の培養は、公知の方法により行うことができる。また、培養物からのKLKPの単離・精製も公知の生化学的手法を用いて行うことができ、例えばヒドロキシアパタイトカラムを用いて行うことができる。精製タンパク質がKLKPであることは、酵母キラー活性を有するかどうかを測定することにより決定することができる。

また、クリユイベロミセス・ラクティスからKLKPをコードする遺伝子を単離して、遺伝子工学的手法により組換えKLKPを得ることができる。

組換えKLKPの取得に必要なmRNAの調製、cDNAの作製、RT-PCR法、RACE法、DNAの塩基配列の決定、ノーザンブロットによる発現の検討などの実験は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。例えば、Sambrookらの編集したMolecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001, Eds., Sambrook, J. & Russell, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory Pressを挙げることができる。

配列番号1にKLKPが存在する線状プラスミドpGKL1のDNA配列を示した。該DNAはアクセッション番号X00762でGenBankに登録されている。このうち、第3229位から6669位がキラータンパク質のラージサブユニットをコードしている。ラージサブユニットのアミノ酸配列のうち、第30位から892位のアミノ酸配列がサブユニットであり、第895位から第1146位がサブユニットである。配列番号1の第7939位から第8688位がKLKPのsmallサブユニットすなわちサブユニットをコードしている。配列番号2、3および4にそれぞれKLKPのサブユニット、サブユニットおよびサブユニットのアミノ酸配列を示した。

配列番号2、3および4で表されるサブユニット、サブユニットおよびサブユニットからなるタンパク質であって、3つのサブユニットのうちの少なくとも1つのサブユニットのアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個 (例えば1~10個、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1又は数個 (例えば1~10個、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個 (例えば1~10個、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してアミノ酸配列を有し、かつキラー酵母活性またはカルシニューリン活性化作用を有するタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。

このような配列番号2、3または4で表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として、配列番号2、3または4のアミノ酸配列と、BLAST等を用いて計算したときに (例えば、デフォルトすなわち初期設定の条件で計算した場合)、少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに

10

20

30

40

50

好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するものが挙げられ、このような相同性を有する3つのサブユニットからなるタンパク質であって、キラー酵母活性またはカルシニューリン活性化作用を有するタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。

ここで、キラー酵母活性とは、野生酵母類の増殖を抑制する活性をいい、酵母に本発明のタンパク質を添加して培養した場合の酵母の増殖の抑制を指標に測定することができる。例えば、酵母を本発明のタンパク質を含むペーパーディスクを乗せた培地で培養し、阻止円の面積を測定する方法により、キラー酵母活性を測定することができる。

また、カルシニューリン活性化作用とは、細胞内のカルシウムイオンを増加させ、カルシウム情報伝達経路であるカルシニューリンを活性化作用をいい、該活性化作用は、後述の方法により測定することができる。

該遺伝子を適当なベクターに組み込み、該ベクターで適当な宿主を形質転換し、組換えK L K Pを発現させ取得することができる。

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。

ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明の遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、イントロンの5'末端側に存在するスプライス供与部位およびイントロンの3'末端側に存在するスプライス受容部位からなるスプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列(SD配列)などを含有するものを連結することができる。

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属に属する細菌が挙げられ、クリユイペロミセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母が挙げられ、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞が挙げられ、あるいはS121等の昆虫細胞が挙げられる。

細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S. N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110 (1972)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより本発明のタンパク質を得ることができる。「形質転換体の培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することによりK L K Pを抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせるにより、前記培

10

20

30

40

50

養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスからの精製と同様に、ハイドロキシアパタイトゲルを用いたクロマトグラフィーにより精製するのが望ましい。

2. キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) のカルシニューリン活性化剤としての使用

上述のキラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスの培養物から精製した K L K P または遺伝子工学的的手法により得られた K L K P を本発明のカルシニューリン (C a N) 活性化剤として用いることができる。

キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスの生産するキラータンパク質は、カルシウムイオンの細胞内への流入による真核細胞内カルシウム濃度を上昇させ、カルシニューリンを活性化させて細胞周期 G 2 期遅延を引き起こす。

ここで、細胞内へのカルシウムイオンの流入とは、細胞外に存在するカルシウムイオンの細胞内部への流入だけでなく、細胞内のオルガネラ中に存在するカルシウムイオンの細胞質内への流入をも含む。従って、細胞内カルシウムイオン濃度の増加とは、細胞質中のカルシウムイオン濃度を増加をいう。

本発明の K L K P を有効成分とするカルシニューリン活性化剤は、真核生物の細胞増殖・分化や転写制御の調節機構などの $C a^{2+}$ が介する情報伝達系の研究用試薬として用いることができる。また、カルシニューリンの活性化は細胞周期 G 2 期遅延を引き起こすので、本発明のカルシニューリン活性化剤は、酵母、植物、動物細胞等の真核細胞の細胞周期阻害剤として用いることができ、さらに細胞周期を阻害することから細胞増殖阻害剤としても使用することができる。さらに、カルシニューリンの活性化は、T細胞の増殖、がん細胞の分化誘導、アポトーシス、筋原繊維の再構築をもたらすので、免疫系の活性化、抗がん剤等としても使用することが可能である。

K L K P のカルシニューリン活性化作用は、以下のようにして確認することができる。

カルシウム情報伝達経路が S w e 1 を活性化することにもとづき、カルシウム情報伝達経路を遮断した場合のキラー感受性の変化により確認できる。

また、 z d s 1 (Z d s 1 破壊株) においてカルシウム存在下、K L K P を共存させた場合に細胞の細胞周期が G 2 期で遅れることを指標にしてもカルシウム情報伝達経路であるカルシニューリンが活性化していることを確認することができる。G 2 期での遅延は F A C S 解析により確認することができる。

3. キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) の細胞増殖阻害剤としての使用

本発明のキラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) は、細胞の増殖阻害剤として用いることができる。

K L K P を細胞と接触させること、または細胞内で発現させることにより細胞増殖阻害剤として用いることができる。

例えば、K L K P を抗かび剤等として真菌類の増殖抑制に使用し得るし、また細胞増殖を阻害することから植物体等の生物体そのものの増殖阻害剤としても用い得る。細胞または生物体と接触させる K L K P は増殖を阻害させようとする生物種、量により適宜決定することができる。例えば、培養タバコ細胞の場合、生重量で 1 / 4 0 量の細胞を添加した培養液に、K L K P を最終濃度 1 / 1 0 0 ~ 1 / 1 0 0 0 となるように添加すればよい。

4. キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) を用いたサイレージ (牛の飼料) の変敗防止

サイレージとは、草を乳酸発酵させ保存性を高めた反芻家畜の飼料である。サイレージが好氣的条件に曝されると、酵母の乳酸代謝により好氣的変敗が進む。このような好氣的変敗を防止するためには、変敗の原因となる乳酸資化性の野生酵母類の増殖を抑制することが必要である。

キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) はカルシウムイオン存在下に酵母等の真菌細胞の増殖を抑制することから、K L K P をサイレージの変敗防止に使用することができる。サイレージ 1 k g 当たり、カルシウムイオン

10

20

30

40

50

0.1 ~ 0.5 g、K L K Pを0.1 ~ 0.5 g添加すればよい。また、カルシウムイオンの供給源として、例えばチーズホエーを用いることができる。カルシウムイオンとK L K Pは同時にサイレージに添加してもよいし、別々に添加してもよい。

カルシウムイオンもしくはカルシウムイオン供給源とK L K Pを含むサイレージ変敗防止用の組成物も本発明の範囲に含まれる。

5. キラー酵母クリュイペロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) の医薬としての使用

K L K Pを有効成分とするカルシニューリン活性化剤を医薬として用いることもできる。カルシニューリンは、種々の機能を有することからカルシニューリンを活性化させることにより種々の疾患の予防・治療に用いることが可能である。

本発明のK L K Pを有効成分とするカルシニューリン活性化剤は、例えば抗がん剤として利用することができる。さらに、本発明のK L K Pを有効成分とするカルシニューリン活性化剤は、免疫抑制剤、免疫活性化剤、記憶に関する障害の治療剤、循環器の疾患の治療剤としても利用することができる。K L K Pを有効成分とするカルシニューリン活性化剤を含む医薬組成物も本発明の範囲に包含される。ここで、記憶に関する障害として、例えば記憶減退 (h y p o m n e s i a)、記憶消失 (a m n e s i a)、前向健忘症、情動健忘症が挙げられる。循環器の疾患として、例えば虚血性神経細胞障害が挙げられる。

本発明のK L K Pを有効成分とするカルシニューリン活性化剤を患者に投与してがん、記憶に関する障害を治療する方法、循環器の疾患を治療する方法、免疫を抑制または活性化する方法も本発明の範囲に包含される。また、本発明のK L K Pを有効成分とするカルシニューリン活性化剤の抗がん剤、免疫抑制剤、免疫活性化剤、記憶に関する障害の治療剤、循環器の疾患の治療剤の製造への使用も本発明の範囲に包含される。

本発明の医薬は、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、K L K Pまたはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常経口投与では、1日約0.001 mg ~ 100 mgであり、1回または数回に分けて投与される。また、非経口投与では、1回あたり、0.001 mg ~ 100 mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与される。

さらに、本発明のクリュイペロミセス・ラクティスキラータンパク質 (K L K P) を有効成分とする、真核細胞のカルシウムイオンの細胞内への流入による細胞内カルシウムイオン濃度増加作用を有するカルシニューリン活性化剤をカルシニューリンが関与する疾患の治療薬のスクリーニングに用いることができる。例えば、以下のようにして行うことができる。

z d s 1 (Z d s 1破壊株) 等のK L K P感受性株をマイクロプレートに培地およびカルシウムとともに入れ、K L K Pを添加、または組換えK L K Pを発現させると通常は増殖阻害が起こる。各種の薬剤を添加したときに、増殖阻害がおきなかった場合、その薬剤はカルシニューリン阻害剤と判断できる。

このスクリーニングは酵母だけではなく、動物細胞を用いても行うことができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

10

20

30

40

50

実施例1 キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) の精製

酵母クリュイベロミセス・ラクティス I F O 1 2 6 7 株を植菌した 1 0 0 m l の Y P D 培地 (酵母エキス 1 %、ペプトン 2 %、グルコース 2 %) を 5 0 0 m l 容フラスコにいれ、2 8 °C、2 2 0 回転で一夜回転振とう培養した。1 . 3 L の培養液を遠心した上清を 0 . 2 μ m フィルター濾過後、限外濾過装置 (旭化成 A C P - 1 0 1 0 および S L P - 0 0 5 3) で 1 0 m l まで濃縮した。1 0 m M リン酸カリウムバッファー pH 6 . 8 で置換後、同バッファーで平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (ナカラitekus 1 8 7 - 3 7、1 0 0 - 2 0 0 m e s h) に吸着させた。1 0 m M リン酸カリウムバッファー pH 6 . 8 で洗浄後、4 0 0 m M のリン酸カリウムバッファー pH 6 . 8 でキラータンパク質を遊離させた。キラー活性を持つフラクションを集め、5 0 m M クエン酸リン酸バッファー pH 6 . 0 で透析後、0 . 2 μ m フィルターを用いて濾過滅菌し、最終濃度が 1 0 % になるようにグリセロールを加えて 1 0 m l とし、- 8 0 °C で保存した。

10

実施例2 キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) による細胞内 $C a^{2+}$ の上昇およびカルシニューリン活性化

9 種のキラー酵母培養濾液を $C a^{2+}$ 存在下出芽酵母に作用させ、生育阻害を調べた。9 種のキラー酵母は *Saccharomyces cerevisiae* N C Y C 2 3 5 株 (キラータイプの名称は K 1、以下同様)、*Saccharomyces cerevisiae* N C Y C 7 3 8 株 (K 2)、*Saccharomyces cerevisiae* N C Y C 7 6 1 株 (K 3)、*Candida glabrata* N C Y C 3 8 8 株 (K 4)、*Pichia anomala* N C Y C 4 3 4 株 (K 5)、*Kluyveromyces marxianus* N C Y C 5 8 7 株 (K 6)、*Candida valida* N C Y C 3 2 7 株 (K 7)、*Kluyveromyces lactis* N C Y C 5 7 5 株 (K 1 0) および *Williopsis saturnus* var . *saturnus* I F O 0 1 1 7 株であった。さらに、キラー酵母培養濾液からヒドロキシアパタイトカラムを用いて精製した K L K P を用いて各種金属塩存在下での細胞周期関連遺伝子変異株の増殖を 9 6 穴マイクロプレート上で調べた。同様に 5 0 m M $C a^{2+}$ 、1 / 1 0 0 K L K P 存在下フラスコ内で振とう培養後、経時的に生菌数を調べた。さらに固定した細胞の細胞周期をフローサイトメトリー装置 (F A C S) で調べ、形態、核、アクチンとキチンを蛍光顕微鏡観察で解析した。その結果以下のことが判明した。

20

30

供試したキラー酵母の内 4 株 (*Saccharomyces cerevisiae* N C Y C 7 3 8 株 (K 2)、*Saccharomyces cerevisiae* N C Y C 7 6 1 株 (K 3)、*Candida valida* N C Y C 3 2 7 株 (K 7) および *Kluyveromyces lactis* N C Y C 5 7 5 株 (K 1 0)) が $C a^{2+}$ 共存下出芽酵母の増殖を阻害したが、本研究で用いたクリュイベロミセス・ラクティス培養液は他のキラー酵母が活性を示さない 1 0 倍希釈でも強い増殖阻害活性を示した (図 1)。図 1 中、白いバーはカルシウムありの場合であり、黒いバーがカルシウムなしの場合である。横軸は、増殖の程度を示す。

また、出芽酵母 W 3 0 3 株は高い $C a^{2+}$ 濃度で K L K P によって増殖阻害されたが、 $Z n^{2+}$ 、 $M n^{2+}$ 、 $N a^{+}$ 、 K^{+} 、 $M g^{2+}$ の影響は受けなかった (図 2 (a)、(b))。W 3 0 3 株から分離された高濃度 $C a^{2+}$ に感受性を示す *zds1* 株 (*Zds1* 破壊株) は、W 3 0 3 株より低濃度の K L K P に感受性を示しただけでなく、 $C a^{2+}$ キレート剤 E G T A 添加により K L K P による生育阻害が抑えられた (図 3 (b))。*Zds1* は細胞周期エンジンの負の調節因子である *Swe1* の転写抑制を行う。*zds1* では *Swe1* が転写され、*Cdc28* - *C1b* 細胞周期エンジンがリン酸化されるために細胞周期 G 2 期で遅れる。また、 $C a^{2+}$ 情報伝達系カルシニューリンと *Mpk1* M A P キナーゼは各々 $C a^{2+}$ 存在下 *Swe1* の転写と活性化をして、細胞周期エンジンを負に制御する (図 4)。図 4 のメカニズムは *Mizunuma* らにより報告された (N A T U R E, 3 9 2, p. 3 0 3 (1 9 9 8))。そこで *zds1* では $C a^{2+}$ の細胞周期への

40

50

影響を見ることができる。 $zds1$ と Ca^{2+} 情報伝達系の2重遺伝子破壊株 $zds1\ sw e1$, $zds1\ c n b1$ (カルシニューリンサブユニット) , $zds1\ m p k1$ は、 $0.1 \sim 300\text{mM}$ Ca^{2+} において $zds1$ に比べて $KLKP$ 感受性が低くなった (図3 (c) , (d) , (e)) 。

FACS解析の結果、 $KLKP$ 添加により $zds1$ 株ではG2期の細胞が多くなった (図5) 。一方、 $zds1\ c n b1$, $zds1\ sw e1$ は $KLKP$ 添加でG1期の細胞が増え、 $zds1\ m p k1$ では $KLKP$ 無添加と変わらず、いずれもG2期の細胞は増えない (図6) 。図5および図6中のFACS解析図中2本のピークのうち第1番目のピークがG1期の細胞の増加を、第2番目のピークがG2期の細胞の増加を示す。

このことから、 $KLKP$ 添加で出芽酵母の細胞周期G2期で遅れ、この作用は Ca^{2+} で活性化されることが明らかになった。この機構には、 Ca^{2+} 情報伝達経路による $Sw e1$ キナーゼの活性化が関わる。 $KLKP$ は出芽酵母細胞周期G1期で停止させることが知られているが、高濃度では他の細胞周期で止まる場合もあると報告されている。そこで、 $KLKP$ の細胞周期抑制はG1期とG2期2箇所あり、 Ca^{2+} により活性化される機構はG2期を遅延すると結論した。 Ca^{2+} 情報伝達経路が遮断されると、図6で見られたようにもう一方のG1期での細胞周期抑制が観察される。

この培養条件で、 $W303$ 株の生菌数にはほとんど影響が出ないが、 $zds1$ 株は $KLKP$ 添加で急速に死滅し、 $KLKP$ 超感受性を示した (図7 (a) , (b)) 。図7中灰色線は総菌体数を示す。また、図7 (a) は親株 $W303$ 株の結果を、図7 (b) は $zds1$ 株の結果を示す。

この培養条件で、 $W303$ 株の生菌数にはほとんど影響が出ないが、 $zds1$ 株は $KLKP$ 添加で急速に死滅し、 $KLKP$ 超感受性を示した (図7) 。

$KLKP$ はキチンを認識することが知られている。通常キチンは出芽痕に局在するが、 $W303$ 株、 $zds1$ 株ともに Ca^{2+} , $KLKP$ 添加でキチンの塊が細胞表層に点在した (図8 (a)) 。また、アクチンは通常出芽の方向にケーブルが走り、出芽位置にパッチが局在するが、 Ca^{2+} はアクチン局在に影響を与えることが知られている。 $W303$ 株、 $zds1$ 株ともに $KLKP$ 添加によってアクチン局在が欠損した。 $KLKP$ によるキチン、アクチン局在欠損は Ca^{2+} 共存で強められ、 $W303$ 株よりも $zds1$ 株が深刻だった (図8 (b)) 。このように $KLKP$ は通常静菌の効果を示し、アクチンの局在欠損を引き起こす。さらに、 $KLKP$ 超感受性株や、 Ca^{2+} による $KLKP$ 活性化によってキチン局在欠損も引き起こす。また、細胞を殺すことが観察された。

さらに、 $KLKP$ による細胞内カルシウム濃度上昇を測定した。

発光タンパク質エクオリン前駆体を発現させた酵母であってカルシウムイオンを含まない培地で培養した酵母に基質 (セレンタジン) を吸収させた後 Ca^{2+} と $KLKP$ を作用させ、フォトンカウンターで発光量を測定した。また、 Ca^{2+} 流入のコントロールとしてカルシウムイオノフォア (A23187) を用いた。

また、 Ca^{2+} で誘導されるタンパク質のプロモーターの下流に - ガラクトシダーゼ遺伝子を接続したプラスミドを形質転換した酵母に $KLKP$ を作用させ、5分後に細胞を水で洗浄した。その後液体培地を加えて4時間振とうして、細胞内 Ca^{2+} 濃度に対応して

- ガラクトシダーゼを発現させた。細胞をエーテル処理したのち、基質 (ONPG) を加えて細胞の - ガラクトシダーゼ活性を調べた。結果を図9 (a) a ~ f に示し (エクオリオン測定法) 、 - ガラクトシダーゼ活性を図9 (b) に示した (レポーターアッセイ法) 。図9 (a) 中、 (a) a は野生型の結果を、 (a) b から (a) f はエクオリン前駆体発現細胞での結果を示す。

その結果、エクオリン前駆体を発現させた細胞 (図9 (a) b ~ f) は Ca^{2+} 添加でわずかに発光し (図9 (a) c) 、 Ca^{2+} , カルシウムイオノフォア添加で発光量が2.4倍になった (図9 (a) d) 。一方、カルシウムイオノフォア同様 $KLKP$ 単独では発光を誘導しない (図9 (a) e) が、 Ca^{2+} 、 $KLKP$ 添加により Ca^{2+} 添加の発光に比べて2.4倍の発光を生じ (図9 (a) f) 、 $KLKP$ 添加後ただちにカルシウムイオノフォアと同等の Ca^{2+} が細胞内で増加したことが確認された。

10

20

30

40

50

続いて、レポーターアッセイを行った。K L K P 処理をした細胞は、 β -ガラクトシダーゼ活性が増えたため、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したと考えられる (図 9 (b))。

以上の 2 つの方法により、K L K P 処理により、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが確認された。

さらに、 ^{45}Ca を用いて K L K P の作用解析を行った。カルシウム欠乏培地で培養した酵母細胞に ^{45}Ca を添加した。9 分後にカルシウム吸収量が平坦域に達してから、K L K P を添加した。 ^{45}Ca 添加後 2 分ごとに細胞を取り、細胞中の ^{45}Ca の量を測定した。その結果、K L K P 添加後の細胞中のカルシウムの量が K L K P 無添加の場合に比べて 1.5 倍から 2 倍に上昇した (図 11)。

図 9 および図 11 に示すように、K L K P によって細胞外からカルシウムイオンが流入することが確認された。

K L K P によるカルシニューリンの活性化は以下の方法で確認した。

カルシウム情報伝達経路は、Sw e 1 を活性化する (図 4) ことに基づき、 Ca^{2+} 情報伝達による Sw e 1 活性化が観察できるように *z d s 1* 株を用いた。

カルシウム情報伝達経路を遮断した場合、キラー感受性が低下した。特に、C n b 1 との 2 重破壊では、親株に比べても耐性となっており、カルシニューリンがないと、キラー感受性にならない。

z d s 1 株は、カルシウムを添加すると G 2 期で遅れることが知られているが、F A C S 解析の結果、カルシウム存在下に K L K P を共存させると、さらに G 2 期で遅れることから (図 5)、図 4 のカルシウム情報伝達系が活性化していることが確認された。

以上の結果から、K L K P によって細胞内カルシウム濃度が上昇し、カルシウム情報伝達経路カルシニューリンが活性化され、細胞周期 G 2 期で遅れる機構があることがわかった。

実施例 3 キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) による植物培養細胞増殖抑制

タバコ培養細胞 (B Y 細胞) 28 7 日間増殖させたもの 1 m l を、3% しょ糖を含むムラシゲ・スクーグ培地 20 m l に添加した。K L K P を最終濃度 1 / 100 ~ 1 / 10000 に加え、28 115 回転で 5 日間培養した。培養液ごと細胞をメモリ付き試験管に移し、静置後、沈殿した細胞の量を測定した。また、K L K P 無添加と 1 / 100 添加した細胞を蛍光試薬 D A P I で染色し、細胞と核の形態を観察した。

その結果、1 / 100 濃度の K L K P 存在下では培養細胞の増殖は無添加の半分程度であった、1 / 1000 濃度でも無添加の 8 割程度の細胞量となり、K L K P によって細胞の増殖が阻害されることが示された。さらに K L K P 添加により細胞が通常よりも大きくなっており、このことから分裂阻害が示された (図 11)。図 11 中、図 11 (a) は細胞の増加を、図 11 (b) は細胞の形態の変化を示す。また、K L K P は酵母以外の真核生物にも作用することが明らかになった。

産業上の利用性

実施例 2 に示すように、キラー酵母クリュイベロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (K L K P) は真核細胞において、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、カルシニューリンを活性化させるので、真核細胞におけるカルシニューリン活性化剤として利用することができる。また、カルシウムイオンの存在下で真核細胞の細胞周期を G 2 期で止めることができ、細胞周期阻害剤として利用することができる。特に、実施例 3 に示すように酵母以外の真核細胞の細胞増殖を抑制することが可能であり、広く細胞増殖阻害剤として用いることができる。特に本発明の K L K P を有効成分とするカルシニューリン活性化剤をカルシウムイオン供給源とともにサイレージに添加することによりサイレージの変敗を防止することができる。

また、本発明の K L K P を有効成分とするカルシニューリン活性化剤を抗がん剤等の医薬として用いることが可能である。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内

10

20

30

40

50

で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Science

<120> Calcineurin activator

<130> PH-1537PCT

10

<140>

<141>

<150> JP2002/081415

<151> 2002-03-22

20

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

30

<211> 8874

<212> DNA

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 1

acacataaca taggggagag tactaaaagt gagattattg gaagattagt acgtctccat 60
 ttttttctgt ttttttgttt ttatatatta ggftatitit tttcagtttt atatcaactc 120
 tgtataacaa gtctatitit ttatatitit agtctatitit acactititga cctataagtc 180
 atititattat acacatititc caactataat atatgaatta cattattaat ttaaaaatgg 240
 attacaaaga taaggctitit aatgatctaa gaaatgtata tgccgactitit gattcactitc 300
 ctttagatitit tagacaaata ttaataaaaag atagagccac actitcttcaa aaagaagatg 360

40

tagaaaaaaa aatattggaa agacaagaag atgcaaagaa atatgcagaa tatttaaaac 420
aatcagaaat accagaacga atacttttgc ctaacaitaa aagacataaa ggtgttttcta 480
tatcttttga agaaacatca gaagataatgg ttttggaaacc aagacctttt atttttgatg 540
gattaaatat tagatgtttt agacgagaga caattttctc tctcaaaaat aaaatattaa 600
acatggtaaa agaaagtctt tcttttaaaa atgtttctag acaatcagtt tctttcatgt 660
attttaaaat ttttaataaa gggaaagtta tagcttctac aaaaagtgt aatatttatg 720
aagataaaaat agatgagaga ttagaagatt tgtgtaataa ttttgacgat gtattaaaga 780
aaattataga tgtaacttat ggttatgaaa gtttatttgt ttcagaaaca tattcttatg 840
ttatatttta tgctaaatct atataattcc ctcaacctag atgtgtgaat aattggggta 900
ataatattcc taatattctt actttcgata gttttaagct tttcacagct aataaaaata 960
atgtttcttg tattaacag tgctctcgtt ttctgtggca aaaagatttt aatacattag 1020
aagaaatgat agaataaaa aatggtaata tttgtatagt tactcctcaa ttacatataa 1080
atgaigtaag agacataaaa tcatttaacg acatacgttt atattcagaa agtcctatta 1140
aacattcag tgttatagat aatactataa catatttgtt ttattttaaa gaacatttag 1200
gagttatatt taatattact aaatccagac atgatagaag agtcactaaa tttagtcctt 1260
tgtcaaaatt ttctgatgtt aaaaataata cagtatgttt tgatatagaa tcttattttg 1320
atccagaaaa agaactaat caagtaata taccctttat atgttgtgca tctataatat 1380
ataataaagt cataggaaat atgttagatt ttgaaggaag agattgtgta gctcaaatga 1440
tagaatatgt ttagatata tgggagagc ttaatatatc ttcagtggaa ctaattgcac 1500
ataatggtgg aggttatgat tttcattata ttttaagtag tatgtataat cctgcagcta 1560
ttaaaaatat attaattaga aataactcat ttataagttt taattttgct cacgatggag 1620
tcaaattttc tgtaaaagat tctatagtt tcttgttatg tagtttagca aatgcttcaa 1680
aagcattttt aaacgaagaa accttaaga aaacagattt tccccatcat gatttaaaaa 1740
cagcagatga tttatataaa gtatataaag aatggtcac tgtaaacact gaaataaatc 1800
atgtagtgga aaaagaaaaa ctcttataa catcagaaca tatagttaat ttcactaaaa 1860
atgataaatc taaaactcta atagaatggt cttaaagatta ttgtagaaat gatgttttgg 1920
ttttatctaa ggtatggta gaatttaaaa atgctglaga agatattttt aattgtgaat 1980
tagtagatca aactatgaca ttagcaggac taagttataa attatttcaa gcaaatatgc 2040
cttttgatgt tgaattaaga catccaaata aagaagatta ttttaacatg agagaggctt 2100
taataggagg gagatgtatt agtgtcaatg gaatatataa agatgtttta tgittagatg 2160

10

20

30

40

taaaatcatt ataiccagca tctatggcat tttatgacca gccatatgga tctttcaaaa 2220
 gagtatctag tagacctaaa gatgaattag gtatttatta tgtcagagta actcctaata 2280
 gaaataataa atccaacttt tttcctataa gaagtcacaa taaaattact tataataatt 2340
 ttgaagaaag tacatatata gcatgggtata caaatgtaga tatagatata ggtttgtctg 2400
 aaggtcataa tatagaatat atccccittg attcctatgg aaatataggt tattccttgg 2460
 ctaaaaaagg taaaatattc gaaaaatata taaaagacgt gctgtacaaa ttaaaaaata 2520
 agtatgaaaa acaaaacaat aaagttaaaa gaaatgttat caaaattatt atgaacagtt 2580
 tatggggcaa attcgcacaa aaatgggtaa atttigagta ttttataaaa tcagaagatg 2640
 atatagatit tgagtcagaa gaggcataa agatatggga cactgatttt atgctgataa 2700
 agaaaaataa agaacttact tattcatcta aacctataca aaatggagta ttacattaa 2760
 gttgggcaag ataccacatg aaaagtatat gggatgcagg ggctaaagaa ggagcagaat 2820
 giatctattc ggacacagat agtatttttg tacataaaga acatittaaa aagaatgcta 2880
 aatttatgtt aaatggttta aaagttccta ttataggatc agaagtagga caattagaat 2940
 tagaatgtga gtttgataaa ttgttatgtg caggtaaaaa gcaatacatg ggattttata 3000
 cttattttca agatggaaaa ccatgtataa aagaaaagaa aagatttaag ggtattccta 3060
 gtaattatat aataacctgaa ttatatgctc atttactttc aggtgcagac aaagaagcta 3120
 aaatacaatt ttigaaattt agaagagaat ggggatcagt taaaggatat atagaaaata 3180
 agaccgtgaa agctacttaa tatatgaaag tttttataat aattataaaa tgaatatatt 3240
 ttacatattt ttgtttttgc tgtcattcgt tcaaggtttg gagcatactc atcgaagagg 3300
 ctcttagtc aaaagagcag tatgttatga cactgatcaa gttccactta atattttctt 3360
 tggttataat agagcagata agactgattc taataagaat atggctctaa acatctttaa 3420
 tgtttttaga ggttttctag ctggagaagg tggagagtct ttttacaatt ctaatggtaa 3480
 tgtttatgga tttatgtggg taggtagtat ggltcataat agaggtttta aagataatat 3540
 tttacctata atggaaaatg aagttaagaa ttatggattt cctaaaacct tgtattttaga 3600
 atatgacgga ggtggagatc ctatgaaatc ttttggattt atttagata caacaagtag 3660
 agatactgta gttaaagctg caaaattatg gagtcaaggt aaaaaataa atagttatga 3720
 aggatctaaa aattatcaag ctactgcatt ctatttatct tatgcatata gaaagcccat 3780
 tgttaatgat aattttgtag gaacttgca ctatttcact ttagaaagtg gtaaacacc 3840
 agcagaccaa tctggtatia atggagagtc tctacaaggt tataatccta atttagattt 3900
 ctctaaatta tcagcaggac aacctatttg taaaaccata ggtaatctc ctaattttaa 3960

10

20

30

40

accitctaag aattcagacg gticttghtaa aacatacaag gtaicacitg gagagtcttg 4020
 ticttctata gcagttaaat attatccatt aagtttaaag gatatagaaa attataataa 4080
 aggtaattat ggatggaaag gatgttctag tcttcaaaaa gattataact tatgtgtgag 4140
 tgatggtagt gctcctagac cagtttcaaa tcctatagca gaatgiggte cattagctcc 4200
 aggagagaaa tataatgcta aatgtccttt aaatgcttgt thtagtgaat ttggtttctg 4260
 tggtttaact aaagattatt gtgacaaaaa gagtagtact actggtgctc ctggtagaga 4320
 tggctgtttt tctaattgtg gttatggttc tacttctaag gtaaaatcat ctacttttaa 4380
 aaagattgct tattggtag atgctaaaga taaattagct atggatccga agaatttcc 4440
 taatggctct tatgatattt tacattatgc ttttghtaat ataaattcag acttttagtat 4500
 tgatgattct gcattttcaa aatctgcctt tttaaaagtt acttcttcca aaaagatacc 4560
 tagtttggg ggttgggatt tiagtacatc tcctagtagt tacactatat ttagaaatgc 4620
 igttaaaaca gatcaaaaata gaaatacgtt tgctaacaat ttaatcaatt ttatgaataa 4680
 atataatctt gatggtag attagattg ggaatatcca ggtgctcctg atattccaga 4740
 tattcctgct gatgattcaa gtagtggatc taattatcta actttcctta agttatataa 4800
 gggtaaaatg ccttctggta aaacctatc tatagccatt ccttcttctt attggatttt 4860
 aaaaaattc cctatttctg atattcaaaa cactgtagat tataiggtt acatgacgta 4920
 tgatatacat ggtataiggg aatacggtaa agccaatagt tatataaact gccatactcc 4980
 tcgtaaagaa attgaagatg ctataaaaat gttagataaa gctggagtta aatttaataa 5040
 agtatttggg ggtgtggcaa attacgtag atcctacaaa atggtaata caaattgtta 5100
 taattatgga tgcggttttc aaagagaggg aggaaattct agagatatga ctaatacacc 5160
 aggtgttctt tctgattcag aaattattga tattgatagt tcagataaaa agaattgatag 5220
 atgggtagat actaacacag attgtatttt tatgaaatat gacggaaatt ctgttgttct 5280
 atggcctaaa agtagatagc atttagaaga tatgtttaaa aattatggat ttgctggtag 5340
 ttctttatgg gccgctaatt atttcaaca tgatgaatgg aagaacgatg aagatgataa 5400
 taatgatgat acagaagatc ctitcgatga agagaatgta tatttcgatg tttatgattg 5460
 caaaaacaaa gctggttatg atctggacaa tccagtttat ggggttagat tagaaacagc 5520
 tataaatatt attatatgga atggtagaga atctgttaat acagttttta atatattaaa 5580
 tgattacgat aattatatta aatattatga agctctaact agagcacatt atgattcagt 5640
 catggaaaaa tacgaaaaat ggctgtttga agaagatgga tattacacat attatactga 5700
 thtagacgga gatgatataa ttataactcc tccagataag aagaaaagag attacataca 5760

10

20

30

40

agagaaatat tcttttgaaa aagaatttat gatgtctcaa aatatgacag aattaacaga 5820
 aattaaagtt aataaaacta ttaattttat gttaaagga acatctctag ctgtaaaaga 5880
 atataacaac gaaaaagttt tatataaaag aggagatata cctcctcctg gttctaataa 5940
 tagattaatt agaaacagta ttattttaga taaagataaa gaagcagcta ttgcgtcttt 6000
 caacaatat tctggaatag aattatctaa agattctttt gtacaaagag ataaagataa 6060
 aaagtttgat ctaaagtgta aacattatac atttatgcat agtactatic tgaatgctat 6120
 tgttttatic cctaagttt taacaaatat tgattctgac tatattcatic atatttcaga 6180
 ttaattgaa caagctcata acagtttagg taatgaaagt cctgataata tttatgaggt 6240
 cttagaaagt gtggttgttt itatgtctgt atcagaaata gctgattata catatacaga 6300
 aggtaaaaag ataaaagaaa aatagataa gatgaagaaa aciatgatig ttggtattat 6360
 attgggtatc atagggtggt tgtctctatt tttaggacct ataggatag ctacatctgt 6420
 tcttgcagat ttgctctat taggagcaga tgccgctata aacggagagt taaatccatic 6480
 agacctagca ttgcttttag caggtttatt cttaccagta tttgcttctt taggaaaaac 6540
 atttaaatit gctgaagctt tacaaaaaat taatattaat aaatctaaaa actttgataa 6600
 tttaaatgaa ttgagaaaa taagatitit cagatctaaa ttagggaag ttaagatgtg 6660
 tggctcttaa aagtaatgga tgaccattat tcttgtgtaa attgtcaaaa tctacatctt 6720
 catatttatg atatttaaat atatatitit cgttttcaaa atctaaatgt tgacacatac 6780
 ctccttctit ttttgcctta ttcataataa tattataaaa ttcaatacta ccagaagcat 6840
 aagctattct tattaaatct atatctggac tataatttct taaatctca gttatattca 6900
 taatagcata atttactaat attgcatatc tttggcgigg aaaatcgata agtagtittt 6960
 gaaccatata tttattitaa gttttataag tgtaaaaaata aaaaggccta taaagagaca 7020
 caaagtttga atcataaata tcattcacta ataaattitaa tactgctttt ttacacaaat 7080
 catctggata ttctttatga tgittiaagta cataagctga atttaaaaaa ttaaattcaa 7140
 ctgtatttat atttataict aaataagggt tataagagac catattatag tacacacttt 7200
 tatctacaga aacacaatcc ataggaccaa attctgtatt ttgactataa tctatatatg 7260
 tatataacat atcatctata atttgttcta tattactttg tttagaagta taattatatt 7320
 taaaaaatat ttctaaagtt gtgtctttat tcttgagtat agtttcagga agtaaatati 7380
 tgccttttct tactttttct aaaatattit tattttcatg tattttataa ttatatatag 7440
 tatcttcttc gcaaaaagat cttctattaa aaattataga taatctaaaa caaactctg 7500
 tacatattit atcacattta tcacaaacat catcccaacc taataaaaca catattgttt 7560

10

20

30

40

taataactaa actatatitaa ggatcttttt ctaataaata tatacaagtt tcttttagtag 7620
 gaacattagg ataccaaatt cctgaaggca aatattitaa attaaaatca caaaccttgt 7680
 tactcataat atatctagca gatatactgg aaagtattcc agatgttaat tttaaacctg 7740
 aattttccat titaactgca aaattataac tatttcttat tctatacat aaatgaaagt 7800
 ttaaateate tteatcaaaa agctcttcat tateataata tttataaaaa ttttcataat 7860
 ctgaataata agcataagta catgctttta aataatctga aagattatta tetaatteta 7920
 aacacatttt taattaaaat gaagatata catatattta gtgtttgta tetaataaca 7980
 ttatgtgctg ctgcagctac tactgagaga gaggagtttt tcttatgta tgatttaatt 8040
 agatatttaa aacaatatga aaaaacagga gagagtaaat tagtagaaca aacatttttt 8100
 aatagtatta aaaacttaga cataaactct agagagtata tggaaacttgt atataacaaa 8160
 atagcaggta tttccaatga aagaaataaa ttgaaaata tatataaaga tggagattct 8220
 ataagtcaag ttgtagaaag agctgtaagc gaaaagaaac tiacatttgg attaaacggt 8280
 aaaggattat atgttcaga aaacggagaa ccccgactaa aaggttatgc tictattata 8340
 gaaagaataa ctctggattt aatggaaata tattctatta aaggacttaa tgatataact 8400
 agagatataa aatttaatat ggaaaaata agacaagaaa gatacaacca aatgaaagaa 8460
 gctctaaata gtgtgaagg ttataaagga aaaattgtag cctcagactc agattgggtg 8520
 ttcaagatc ctcaaggcaa tagaataaca gatittgata gtattaataa agaattaggt 8580
 cttggtagaa gagatgtaa attagataaa ggcatgatg atttaattaa attatgtact 8640
 gaaaaaatag atagtatgaa taatctacag aatggaaaat gtgtataata aaatgactta 8700
 taggtcaaaa gtgtaaata gacttaaaat ataaaaaat agacttgta tacagagttg 8760
 atataaaact gaaaaaaat aacctaata ataaaaaca aaaaacagaa aaaaatggag 8820
 acgtactaat ctccaataa tctactttt agtactctcc cctatgttat gigt 8874

10

20

30

<210> 2

<211> 863

<212> PRT

<213> *Kluyveromyces lactis*

<400> 2

40

Val Gly Thr Cys Asp Tyr Phe Thr Leu Glu Ser Gly Lys Thr Pro Ala	
165	170
Asp Gln Ser Gly Ile Asn Gly Glu Ser Leu Gln Gly Tyr Asn Pro Asn	
180	185
Leu Asp Phe Ser Lys Leu Ser Ala Gly Gln Pro Ile Cys Lys Thr Ile	10
195	200
Gly Asn Pro Pro Asn Phe Lys Pro Ser Lys Asn Ser Asp Gly Ser Cys	
210	215
Lys Thr Tyr Lys Val Ser Ser Gly Glu Ser Cys Ser Ser Ile Ala Val	20
225	230
Lys Tyr Tyr Pro Leu Ser Leu Asn Asp Ile Glu Asn Tyr Asn Lys Gly	
245	250
Asn Tyr Gly Trp Lys Gly Cys Ser Ser Leu Gln Lys Asp Tyr Asn Leu	30
260	265
Cys Val Ser Asp Gly Ser Ala Pro Arg Pro Val Ser Asn Pro Ile Ala	
275	280
Glu Cys Gly Pro Leu Ala Pro Gly Glu Lys Tyr Asn Ala Lys Cys Pro	40
290	295
Leu Asn Ala Cys Cys Ser Glu Phe Gly Phe Cys Gly Leu Thr Lys Asp	
305	310
	315
	320

Tyr Cys Asp Lys Lys Ser Ser Thr Thr Gly Ala Pro Gly Thr Asp Gly		
	325	330
		335
Cys Phe Ser Asn Cys Gly Tyr Gly Ser Thr Ser Asn Val Lys Ser Ser		
	340	345
		350
Thr Phe Lys Lys Ile Ala Tyr Trp Leu Asp Ala Lys Asp Lys Leu Ala		
	355	360
		365
Met Asp Pro Lys Asn Ile Pro Asn Gly Pro Tyr Asp Ile Leu His Tyr		
	370	375
		380
Ala Phe Val Asn Ile Asn Ser Asp Phe Ser Ile Asp Asp Ser Ala Phe		
	385	390
		395
		400
Ser Lys Ser Ala Phe Leu Lys Val Thr Ser Ser Lys Lys Ile Pro Ser		
	405	410
		415
Phe Gly Gly Trp Asp Phe Ser Thr Ser Pro Ser Thr Tyr Thr Ile Phe		
	420	425
		430
Arg Asn Ala Val Lys Thr Asp Gln Asn Arg Asn Thr Phe Ala Asn Asn		
	435	440
		445
Leu Ile Asn Phe Met Asn Lys Tyr Asn Leu Asp Gly Ile Asp Leu Asp		
	450	455
		460
Trp Glu Tyr Pro Gly Ala Pro Asp Ile Pro Asp Ile Pro Ala Asp Asp		
	465	470
		475
		480

10

20

30

40

Ser Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Leu Thr Phe Leu Lys Leu Leu Lys Gly	
485	490
Lys Met Pro Ser Gly Lys Thr Leu Ser Ile Ala Ile Pro Ser Ser Tyr	
500	505
Trp Tyr Leu Lys Asn Phe Pro Ile Ser Asp Ile Gln Asn Thr Val Asp	10
515	520
Tyr Met Val Tyr Met Thr Tyr Asp Ile His Gly Ile Trp Glu Tyr Gly	
530	535
Lys Ala Asn Ser Tyr Ile Asn Cys His Thr Pro Arg Lys Glu Ile Glu	20
545	550
Asp Ala Ile Lys Met Leu Asp Lys Ala Gly Val Lys Phe Asn Lys Val	
565	570
Phe Gly Gly Val Ala Asn Tyr Gly Arg Ser Tyr Lys Met Val Asn Thr	30
580	585
Asn Cys Tyr Asn Tyr Gly Cys Gly Phe Gln Arg Glu Gly Gly Asn Ser	
595	600
Arg Asp Met Thr Asn Thr Pro Gly Val Leu Ser Asp Ser Glu Ile Ile	40
610	615
Asp Ile Asp Ser Ser Asp Lys Lys Asn Asp Arg Trp Val Asp Thr Asn	
625	630
	635
	640

Thr Asp Cys Ile Phe Met Lys Tyr Asp Gly Asn Ser Val Val Ser Trp	
645	650
	655
Pro Lys Ser Arg Tyr Asp Leu Glu Asp Met Phe Lys Asn Tyr Gly Phe	
660	665
	670
Ala Gly Thr Ser Leu Trp Ala Ala Asn Tyr Phe Lys His Asp Glu Trp	10
675	680
	685
Lys Asn Asp Glu Asp Asp Asn Asn Asp Asp Thr Glu Asp Pro Phe Asp	
690	695
	700
Glu Glu Asn Val Tyr Phe Asp Val Tyr Asp Cys Lys Asn Lys Ala Gly	20
705	710
	715
	720
Tyr Asp Leu Asp Asn Pro Val Tyr Gly Cys Arg Leu Glu Thr Ala Ile	
	725
	730
	735
Asn Ile Ile Ile Trp Asn Gly Thr Glu Ser Val Asn Thr Val Leu Asn	30
740	745
	750
Ile Leu Asn Asp Tyr Asp Asn Tyr Ile Lys Tyr Tyr Glu Ala Leu Thr	
755	760
	765
Arg Ala His Tyr Asp Ser Val Met Glu Lys Tyr Glu Lys Trp Leu Phe	40
770	775
	780
Glu Glu Asp Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Val Asp Gly Asp Asp	
785	790
	795
	800

Thr Ile Leu Asn Ala Ile Val Leu Phe Pro Asn Val Leu Thr Asn Ile	
65	70
75	80
Asp Ser Asp Tyr Ile His His Ile Ser Asp Leu Ile Glu Gln Ala His	
85	90
95	
Asn Ser Leu Gly Asn Glu Ser Pro Asp Asn Ile Tyr Glu Val Leu Glu	10
100	105
110	
Ser Val Val Val Phe Met Ser Val Ser Glu Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr	
115	120
125	
Thr Glu Gly Lys Lys Ile Lys Glu Lys Tyr Asp Lys Met Lys Lys Thr	20
130	135
140	
Met Ile Val Gly Ile Ile Leu Gly Ile Ile Gly Gly Leu Ser Leu Phe	
145	150
155	160
Leu Gly Pro Ile Gly Ile Ala Thr Ser Val Leu Ala Asp Phe Ala Leu	30
165	170
175	
Leu Gly Ala Asp Ala Ala Ile Asn Gly Glu Leu Asn Pro Ser Asp Leu	
180	185
190	
Ala Phe Ala Leu Ala Gly Leu Phe Leu Pro Val Phe Ala Ser Leu Gly	40
195	200
205	
Lys Thr Phe Lys Phe Ala Glu Ala Leu Gln Lys Ile Asn Ile Asn Lys	
210	215
220	

85

90

95

Gln Val Val Glu Arg Ala Val Ser Glu Lys Lys Leu Thr Phe Gly Leu

100

105

110

Asn Gly Lys Gly Leu Tyr Val Pro Glu Asn Gly Glu Pro Arg Leu Lys

115

120

125

10

Gly Tyr Ala Ser Ile Ile Glu Arg Ile Thr Leu Asp Leu Met Glu Ile

130

135

140

Tyr Ser Ile Lys Gly Leu Asn Asp Ile Pro Arg Asp Ile Lys Phe Asn

145

150

155

160

20

Met Glu Lys Ile Arg Gln Glu Arg Tyr Asn Gln Met Lys Glu Ala Leu

165

170

175

Asn Ser Val Glu Gly Tyr Lys Gly Lys Ile Val Ala Ser Asp Ser Asp

180

185

190

30

Trp Cys Phe Lys Asp Pro Gln Gly Asn Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ser

195

200

205

Ile Asn Lys Glu Leu Gly Leu Gly Arg Arg Asp Val Lys Leu Asp Lys

210

215

220

40

Gly His Asp Asp Leu Ile Lys Leu Cys Thr Glu Lys Ile Asp Ser Met

225

230

235

240

Asn Asn Leu Gln Asn Gly Lys Cys Val

245

50

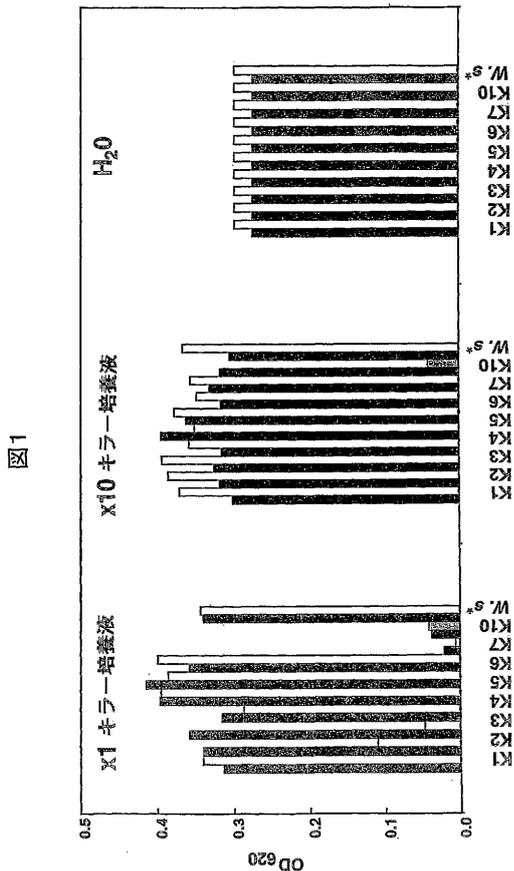
【図面の簡単な説明】

図1は、カルシウムで活性化されるキラータンパク質の検索の結果を示す図である。
 図2は、W303株に対するKLKPのキラー効果を示す図である。(a)はCa²⁺共存下の結果、(b)はその他のイオン共存下の結果を示す。
 図3は、Ca²⁺情報伝達系変異株に対するキラー効果を示す図である。図3Aは(a)親株W303株および(b)そのzds1遺伝子破壊株(zds1)の結果を示し、図3Bはzds1との二重遺伝子破壊株の結果を示す。(c)がzds1 swe1、(d)がzds1 cnb1および(e)がzds1 mpk1の結果を示す。
 図4は、出芽酵母Ca²⁺情報伝達系に関わる細胞周期G2/M期モデルを示す図である。
 図5は、KLKPを作用させたzds1株(Zds1破壊株)のFACS解析の結果を示す図である。
 図6は、KLKPを作用させたzds1とCa²⁺情報伝達系の二重変異株のFACS解析の結果を示す図である。(a)がzds1 cnb1、(b)がzds1 swe1および(c)がzds1 mpk1の結果を示す。
 図7は、KLKPの生菌数への影響を示す図である。(a)が親株W303株について、(b)がzds1についての結果を示す。
 図8は、KLKPを作用させた細胞の(a)キチン(9時間後)、(b)アクチン(6時間後)の様子を示す写真である。
 図9は、野生型およびエクオリンを発現させた細胞における発光量(図9(a))およびKLKPによる細胞内カルシウムの増加(レポーターアッセイ法)(図9(b))を示す図である。
 図10は、⁴⁵Caを用いたKLKPの作用解析の結果を示す図である。
 図11は、KLKPを作用させたタバコ培養細胞の生育を示す写真である。

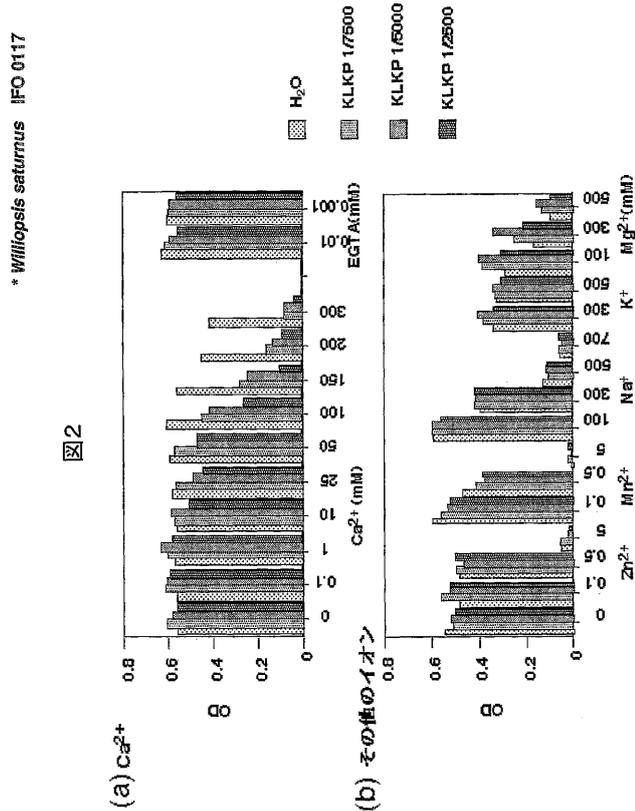
10

20

【図1】

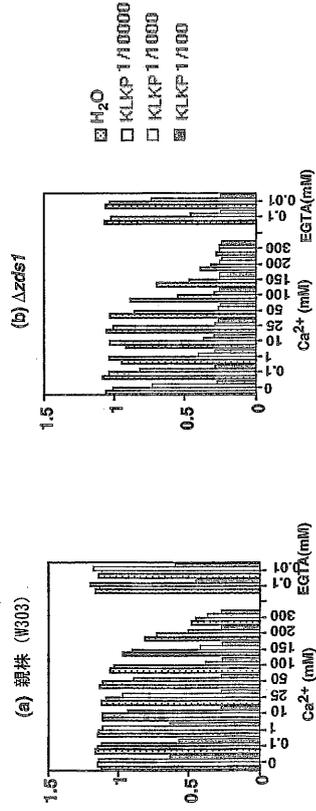


【図2】



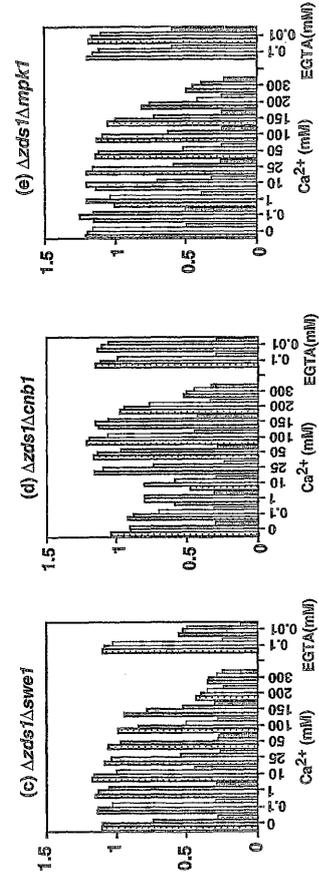
【 図 3 A 】

図3A



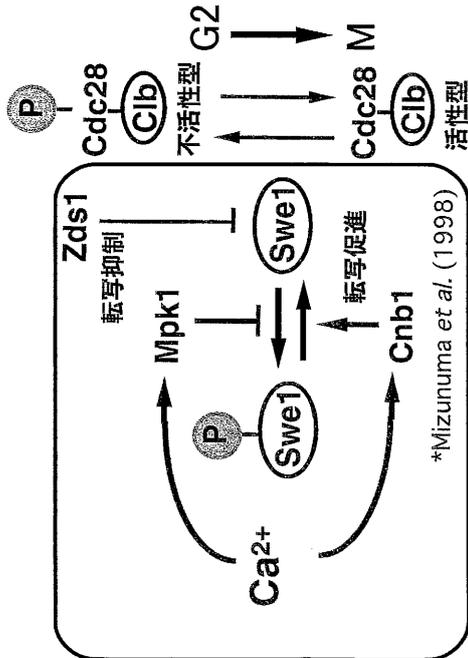
【 図 3 B 】

図3B



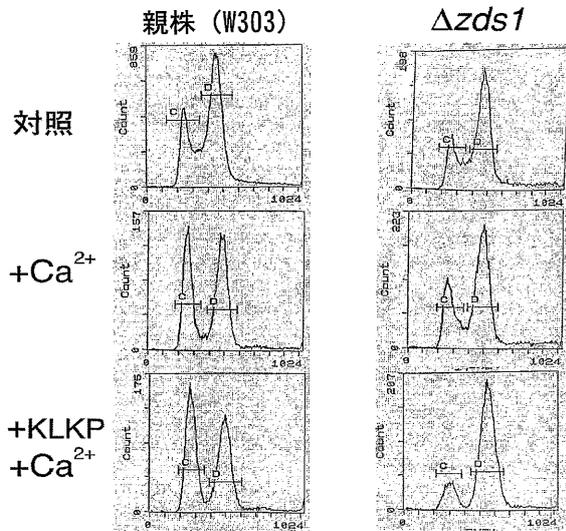
【 図 4 】

図4



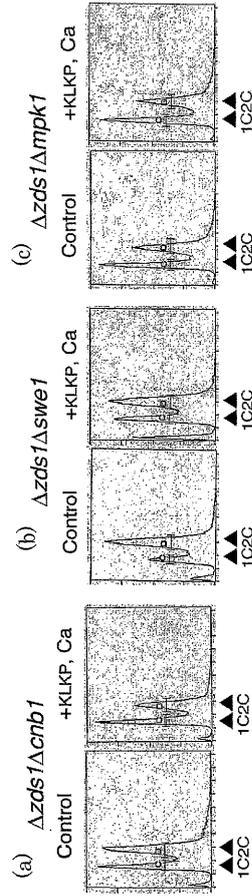
【 図 5 】

図5



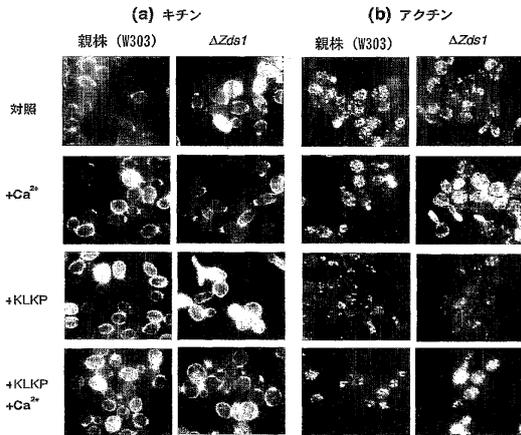
【 図 6 】

図6



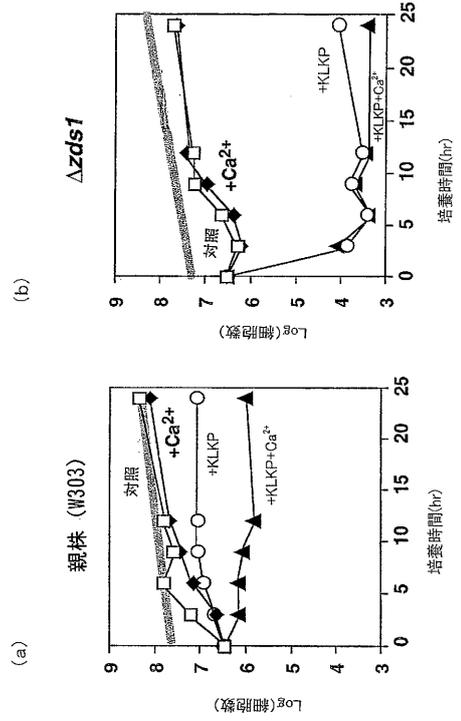
【 図 8 】

図8



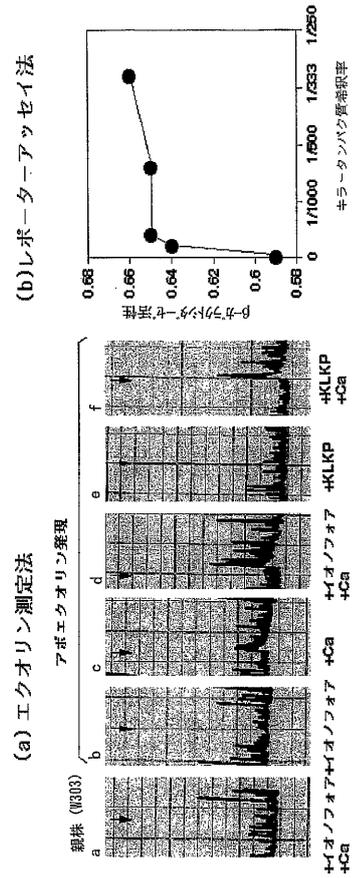
【 図 7 】

図7



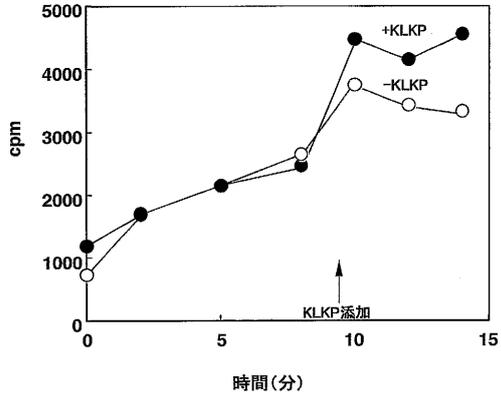
【 図 9 】

図9



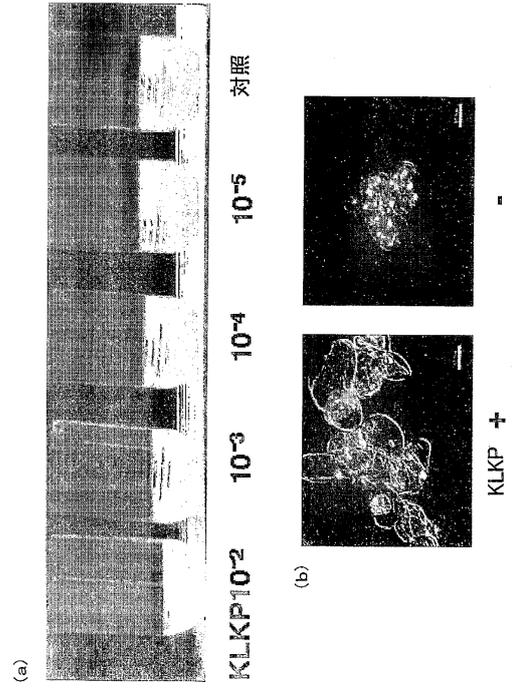
【 図 1 0 】

図10



【 図 1 1 】

図11



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z
C 0 7 K 14/39	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z
		C 0 7 K 14/39 Z N A

審査官 中尾 忍

- (56)参考文献 Magliani,W. et al. , Yeast killer systems , Clin. Microbiol. Rev. , 1 9 9 7年 7月 , Vol .10, No.3 , P.369-400
 Stark,M.J.R. et al. , Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA pl asmid associated with the killer character of the yeast Kluyveromyces lactis , Nucleic Acids Res. , 1 9 8 4年 8月 1 0日 , Vol.12, No.15 , P.6011-6030
 日本生物工学会大会講演要旨集 , 2 0 0 1年 , Vol.2001 , p.228
 Clin. Microbiol. Rev. , 1 9 9 7年 7月 , Vol.10, No.3 , p.369-400

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

A61K 38/00
 PubMed
 Science Direct
 Wiley InterScience
 CiNii
 医学・薬学予稿集全文データベース