

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/080841

発行日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(43) 国際公開日 平成15年10月2日(2003.10.2)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 P 3/14  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 25/28  
 A 6 1 P 35/00

F I

A 6 1 K 37/02  
 A 6 1 P 3/14  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 25/28  
 A 6 1 P 35/00

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-578567 (P2003-578567)	(71) 出願人	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
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/006063	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(22) 国際出願日	平成14年6月18日(2002.6.18)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	特願2002-81415 (P2002-81415)	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(32) 優先日	平成14年3月22日(2002.3.22)	(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
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(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
(81) 指定国	CA, JP, US		
特許法第30条第1項適用申請有り 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」にて発表			

(54) 【発明の名称】 カルシニューリン活性化剤

## (57) 【要約】

以下の(a)又は(b)のタンパク質を有効成分とする、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。

(a) 各配列番号2~4で表されるアミノ酸配列からなる3つのサブユニットで構成される、キラ酵母クリュイベロミセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)が生産するキラータンパク質(KLK P)

(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又は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・ラクティスのキラータンパク質(KLK P)活性を有するタンパク質

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

クリュイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) 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。

## 【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ュイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) 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、かつクリュイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) キラータンパク質 (K L K P) 活性を有するタンパク質

10

## 【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真核細胞の増殖阻害剤。

20

## 【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む真核細胞周期阻害剤。

## 【請求項5】

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真核細胞周期阻害剤。

## 【請求項6】

カルシウムイオンおよび請求項1または2記載の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。

30

## 【請求項7】

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、請求項6記載の方法。

## 【請求項8】

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。

## 【請求項9】

K L K P 感受性酵母株にクリュイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) 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関与する化合物をスクリーニングする方法。

40

## 【請求項10】

K L K P 感受性酵母株にクリュイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) 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が関与する疾患の治療薬をスクリーニングする方法。

50

## 【請求項 11】

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請求項 10 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 技術分野

本発明は、キラ酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産するキラータンパク質 (KLKP) の利用に関する。具体的には、キラ酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産するキラータンパク質 (KLKP) 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。

10

## 背景技術

近年酵母 (*S. cerevisiae*) のキラーシステムに関する種々の研究がされている。KLキラータンパク質は TOK1 過剰活性化し細胞膜機能を破壊する (Ahmed, A. et al., Cell 99, 283-291 (1999))。また、キチンシンターゼ III の破壊および非局在化は酵母に *K. lactis* キラータンパク質 (KLKP) に対する耐性を付与する (Jablonski, D., et al., Yeast 18 p. 1285 (2001))。KLKP はプラスミド pGKL1 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 MJ et al., EMBO J., Aug, 5 (8), p. 1995 - (1986))。

20

また、本発明者らは、先に KLKP 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。

30

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

10

20

\* 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))。 30

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ペロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質 (KLKP) 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。 40

本発明者らは、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 (KLKP) 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、KLKP 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、クリュイペロミセス・ラクティスキラータンパク質 (KLKP) 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 50

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)、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、かつクリュイペロミセス・ラクティス キラータンパク質(K L K 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K L K P感受性酵母株に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と被験物質を作用させ、被験物質のK L K 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K L K P感受性酵母株に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。

本発明は、さらにカルシニューリンが關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トキシン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K L K Pは、クリュイペロミセス・ラクティスから得ることができる(K i t a m o t o , H . K . e t a l . , ( 1 9 9 5 ) 7<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, Abstract Book, 62)。クリュイペロミセス・ラクティスの生産するキラータンパク質K L K P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。クリュイペロミセス・ラクティスとしては例えば、IF01267株が挙げられる。クリュイペロミ

10

20

30

40

50

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、例えばハイ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、クリユイペロミセス・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ド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する作用をいい、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込み、該ベクターで適当な宿主を形質転換し、組換えKLKP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KLKP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。キラー酵母クリユイペロミセス・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. キラー酵母クリユイペロミセス・ラクティスが生産するキラータンパク質(KLKP)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ユイペロミセス・ラクティスの培養物から精製したKLKPまたは遺伝子工学的的手法により得られたKLKPを本発明のカルシニューリン(CaN)活性化剤として用いることができる。

キラー酵母クリユイペロミセス・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G2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

10

20

30

40

50

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 $Ca^{2+}$ 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

10

20

30

40

50



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 (hypomnesia)、記憶消失 (amnesia)、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KLKP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KLKP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、KLKP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0.001mg~100mg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、0.001mg~100mg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 (KLKP) 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。

zds1 (Zds1破壊株) 等のKLKP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、KLKPを添加、または組換えKLKP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。

実施例1 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 (KLKP) の精製

酵母クリュイペロミセス・ラクティスIFO1267株を植菌した100mlのYPD培地 (酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%) を500ml容フラスコにいれ、28℃、220回転で一夜回転振とう培養した。1.3Lの培養液を遠心した上清を0.2μmフィルター濾過後、限外濾過装置 (旭化成ACP-1010およびSLP-0053) で10mlまで濃縮した。10mMリン酸カリウムバッファーpH6.8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 (ナカライテクス187-37、100-200mesh) に吸着させた。10mMリン酸カリウムバッファーpH6.8で洗浄後、400mMのリン酸カリウムバッファー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、50mMクエン酸リン酸バッファーpH6.0で透析後、0.2μmフィルターを用いて濾過滅菌し、最終濃度が10%になるようにグリセロールを加えて10mlとし、-80℃で保存した。

実施例2 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 (KLKP) の精製

L K P ) による細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇およびカルシニューリン活性化

9 種のキラ酵母培養濾液を  $Ca^{2+}$  存在下出芽酵母に作用させ、生育阻害を調べた。9 種のキラ酵母は *Saccharomyces cerevisiae* NCYC235 株 (キラタイプの名称は K1、以下同様)、*Saccharomyces cerevisiae* NCYC738 株 (K2)、*Saccharomyces cerevisiae* NCYC761 株 (K3)、*Candida glabrata* NCYC388 株 (K4)、*Pichia anomala* NCYC434 株 (K5)、*Kluyveromyces marxianus* NCYC587 株 (K6)、*Candida valida* NCYC327 株 (K7)、*Kluyveromyces lactis* NCYC575 株 (K10) および *Williopsis saturnus var. saturnus* IFO0117 株であった。さらに、キラ酵母培養濾液からハイ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 96 穴マイクロプレート上で調べた。同様に 50 mM  $Ca^{2+}$ , 1/100 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 (FACS) 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。

供試したキラ酵母の内 4 株 (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC738 株 (K2)、*Saccharomyces cerevisiae* NCYC761 株 (K3)、*Candida valida* NCYC327 株 (K7) および *Kluyveromyces lactis* NCYC575 株 (K10)) が  $Ca^{2+}$  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ペロミセス・ラクティス培養液は他のキラ酵母が活性を示さない 10 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 W303 株は高い  $Ca^{2+}$  濃度で K L K P によって増殖阻害されたが、 $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  の影響は受けなかった (図 2 (a), (b))。W303 株から分離された高濃度  $Ca^{2+}$  に感受性を示す *zds1* 株 (*Zds1* 破壊株) は、W303 株より低濃度の K L K P に感受性を示しただけでなく、 $Ca^{2+}$  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 G2 期で遅れる。また、 $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$  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 (NATURE, 392, p. 303 (1998))。そこで *zds1* では  $Ca^{2+}$  の細胞周期への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 swe1*, *zds1 cnb1* (カルシニューリンサブユニット), *zds1 mpk1* は、0.1 ~ 300 mM  $Ca^{2+}$  において *zds1* に比べて K L K P 感受性が低くなった (図 3 (c), (d), (e))。

FACS 解析の結果、K L K P 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 cnb1*, *zds1 swe1* は K L K P 添加で G1 期の細胞が増え、*zds1 mpk1* では K L K P 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、K L K P 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 *Swe1* キナーゼの活性化が関わる。K L K P 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、K L K P 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G 2期を遅延すると結論した。Ca<sup>2+</sup> 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G 1期での細胞周期抑制が観察される。

この培養条件で、W 3 0 3株の生菌数にはほとんど影響が出ないが、z d s 1株はK L K P添加で急速に死滅し、K L K P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W 3 0 3株の結果を、図7(b)はz d s株の結果を示す。

この培養条件で、W 3 0 3株の生菌数にはほとんど影響が出ないが、z d s 1株はK L K P添加で急速に死滅し、K L K P超感受性を示した(図7)。

K L K P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、W 3 0 3株、z d s 1株ともにCa<sup>2+</sup> , K L K P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<sup>2+</sup> はアクチン局在に影響を与えることが知られている。W 3 0 3株、z d s 1株ともにK L K P添加によってアクチン局在が欠損した。K L K Pによるキチン、アクチン局在欠損はCa<sup>2+</sup> 共存で強められ、W 3 0 3株よりもz d s 1株が深刻だった(図8(b))。このようにK L K Pは通常静菌的效果を示し、アクチンの局在欠損を引き起こす。さらに、K L K P超感受性株や、Ca<sup>2+</sup> によるK L K P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、K L K P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<sup>2+</sup> とK L K P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<sup>2+</sup> 流入のコントロールとしてカルシウムイオノフォア(A 2 3 1 8 7)を用いた。

また、Ca<sup>2+</sup> 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K L K P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<sup>2+</sup> 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(エクエリオン測定法)、 - 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<sup>2+</sup> 添加でわずかに発光し(図9(a) c)、Ca<sup>2+</sup> , 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K L K P単独では発光を誘導しない(図9(a) e)が、Ca<sup>2+</sup> 、K L K P添加によりCa<sup>2+</sup> 添加の発光に比べて2 . 4倍の発光を生じ(図9(a) f)、K L K P添加後ただちにカルシウムイオノフォアと同等のCa<sup>2+</sup> が細胞内で増加したことが確認された。

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、 - ガラクトシダーゼ活性が増えたため、細胞内Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 濃度が上昇することが確認された。

さらに、<sup>45</sup>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<sup>45</sup>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。<sup>45</sup>Ca添加後2分ごとに細胞を取り、細胞中の<sup>45</sup>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、S w e 1を活性化する(図4)ことに基づき、Ca<sup>2+</sup> 情報伝達によるS w 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)による植物培養細胞増殖抑制 10

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 / 1000000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。 20

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)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。 30

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 gggtattttt tttcagtttt atatcaactc 120  
 tgtataacaa gtctattttt ttatatatta agtctatttt acacttttga cctataagtc 180  
 attttattat acacattttc caactataat atatgaatta cattattaat ttaaaaaatgg 240  
 attacaaaga taaggettta aatgatctaa gaaatgiata tgccgacttt gattcacttc 300  
 ctttagattt tagacaaata ttaataaaaag atagagccac acttcttcaa aaagaagatg 360

40

tagaaaagaa aatattggaa agacaagaag atgcaaagaa atatgcagaa tatttaaaac 420  
aatcagaaat accagaacga atatctttgc ctaacattaa aagacataaa ggtgtttcta 480  
tatcttttga agaaacatca gaagatatgg ttttggacc aagacctttt atttttgatg 540  
gattaaatat tagatgtttt agacgagaga caattttctc tctcaaaaat aaaatattaa 600  
acatggtaaa agaaagtctt tcttttaaaa atgtttctag acaatcagtt tctttcatgt 660  
attttaaaat ttttaataaa gggaaagtta tagcttctac aaaaagtgta aatatttatg 720  
aagataaaat agatgagaga ttagaagatt tgtgtaataa ttttgacgat gtattaaaga 780 10  
aaattataga tgtaacttat ggttatgaaa gtttatttgt ttcagaaaca tattcttatg 840  
ttatatttta tgctaaatct atatatttcc ctcaacctag atgtgtgaat aattggggta 900  
ataatattcc taatattctt actttcgata gttttaagct tttcacagct aataaaaata 960  
atgtttcttg tattaacag tgctctcgtt ttctgtggca aaaagatttt aatacattag 1020  
aagaaatgat agaataaaa aatggtaata ttigtatagt tactcctcaa tiacatataa 1080  
atgatgtaag agacataaaa tcatttaacg acatacgttt atattcagaa agtcctatta 1140 20  
aaacattcag tgttatagat aatactataa catatttgtt ttattttaa gaacatttag 1200  
gagttatatt taatattact aaatccagac atgatagaag agtcactaaa tttagtcctt 1260  
tgtcaaaatt tictgatggt aaaaatataa cagtatgttt tgatatagaa tcttattttg 1320  
atccagaaaa agaactaat caagttaata taccctttat atgttgtgca tctataatat 1380  
ataataaagt cataggaaat attgtagatt ttgaaggaag agattgtgta gctcaaatga 1440  
tagaatatgt thtagatata tgtggagagc ttaatatac ttcagtgga ctaattgcac 1500 30  
ataatgggtg aggttatgat tttcattata ttttaagtag tatgtataat cctgcagcta 1560  
ttaaaaatat attaattaga aataactcat ttataagttt taattttgct cacgatggag 1620  
tcaaattttc tgtaaaagat tectatagtt tcttgttatg tagtttagca aatgcttcaa 1680  
aagcattttt aaacgaagaa acctttaaga aaacagattt tcccacatcat gatttaaaaa 1740  
cagcagatga tttatataaa giatataaag aatggtcac tgtaaacact gaaataaatc 1800  
atgtagtggg aaaagaaaaa cttcttataa catcagaaca tatagttaat ttcactaaaa 1860  
atgataaatc taaaactcta atagaatggt ctaaagatta ttgtagaaat gatgttttgg 1920 40  
ttttatctaa ggtaggtta gaatttaaaa atgctgtaga agatattttt aattgtgaat 1980  
tagtagatca aactatgaca tttagcaggac taagttataa attatttcaa gcaaatatgc 2040  
cttttgatgt tgaattaaga catccaaata aagaagatta ttttaacatg agagaggctt 2100  
taataggagg gagatgtatt agtgtcaatg gaatatataa agatgtttta tgttttagatg 2160

taaaatcatt ataccagca tctatggcat tttatgacca gccatagga tcittcaaaa 2220  
 gagtatctag tagacctaaa gatgaattag gtatttatta tgcagagta actcctaata 2280  
 gaaataataa atccaacttt tttectataa gaagtcacaa taaaattact tataataatt 2340  
 ttgaagaaag tacatatata gcatggata caaatgtaga tatagatata ggtttgtctg 2400  
 aaggtcataa tatagaatat atcccctttg attcctatgg aaatataggt tattcttggg 2460  
 ctaaaaaagg taaaatattc gaaaaatata taaaagacgt gctgtacaaa ttaaaaaata 2520  
 agtaigaaaa acaaaacaat aaagttaaaa gaaatgttat caaaattati atgaacagtt 2580  
 tatggggcaa attcgcacaa aaatgggtaa atttigagta tttataaaa tcagaagatg 2640  
 atatagattt tgagtcagaa gaggcataa agatatggga cactgatttt atgctgataa 2700  
 agaaaattaa agaattctact tattcatcta aacctataca aaatggagta ttacattaa 2760  
 gttgggcaag ataccacatg aaaagtatat gggatgcagg ggctaaagaa ggagcagaat 2820  
 gtatctattc ggacacagat agtatttttg tacataaaga acattttaaa aagaatgcta 2880  
 aatttatgtt aaatggttta aaagttccta ttataggatc agaagtagga caattagaat 2940  
 tagaatgtga gtttgataaa ttgittatgtg caggtaaaaa gcaatacatg ggattttata 3000  
 cttattttca agatggaaaa ccatgtataa aagaaaagaa aagatttaag ggtattccta 3060  
 gtaattatat aaiacctgaa ttatagctc atttactttc aggtgcagac aaagaagcta 3120  
 aaatacaatt ttigaaatth agaagagaat ggggatcagt taaaggatat atagaaaata 3180  
 agaccgtgaa agctacttaa tatatgaaag tttttataat aattataaaa tgaatatatt 3240  
 ttacatattt ttgtttttgc tgcattcgt tcaaggtttg gagcatactc atcgaagagg 3300  
 ctccttagtc aaaagagcag tatgittatga cactgatcaa gttccactta atattttctt 3360  
 tggttataat agagcagata agactgattc taataagaat atggctctaa acatcttaa 3420  
 tgtttttaga ggttttctag ctggagaagg tggagagtct ttttacaatt ctaatggtaa 3480  
 tgtttatgga tttatgtgg taggtagtat ggttcataat agaggtttta aagataatat 3540  
 tttacctata atggaaaatg aagttaagaa ttatggtatt cctaaaacct tgtattttaga 3600  
 atatgacgga ggtggagatc ctatgaaatc ttttggatatt attttagata caacaagtag 3660  
 agatactgta gttaaagctg caaaattatg gagtcaagggt aaaaaattaa atagttatga 3720  
 aggatctaaa aattatcaag ctactgcatg ctatttatct tatgcatata gaaagcccat 3780  
 tgttaatgat aattttgtag gaacttgoga ctatttcact tttagaaagt gtaaacacc 3840  
 agcagaccaa tctggtatta atggagagtc tctacaaggt tataatccta atttagattt 3900  
 ctetaaatta tcagcaggac aacctatttg taaaaccata ggtaatectc ctaattttaa 3960

10

20

30

40

accitctaag aattcagacg gttcttgtaa aacatacaag gtatcatctg gagagtcttg 4020  
 tttctctata gcagttaaat attatccatt aagtttaaatt gatatagaaa attataataa 4080  
 aggtaattat ggatggaaag gatgttctag tcttcaaaaa gattataact tatgtgtgag 4140  
 tgatggtagt gctcctagac cagtttcaaa tcctatagca gaatgiggtc cattagctcc 4200  
 aggagagaaa tataatgcta aatgtccttt aaatgcttgt tgtagtgaat ttggtttctg 4260  
 tggtttaact aaagattatt gtgacaaaaa gagtagtact actggtgctc ctggtacaga 4320  
 tggctgtttt tctaatgtg gttatggttc tacttctaatt gtaaaatcat ctacttttaa 4380  
 aaagattgct tattggttag atgctaaaga taaattagct atggatccga agaatttcc 4440  
 taatggctct tatgatattt tacattatgc ttttgttaat ataaattcag actttagtat 4500  
 tgatgattct gcattttcaa aatctgcctt tttaaaagtt acttcttcca aaaagatacc 4560  
 tagttttggg ggttgggatt tiagtacatc tcctagtact tacactatat ttagaaatgc 4620  
 tgttaaaaca gatcaaaata gaaatacgtt tgctaacaat ttaatcaatt ttatgaataa 4680  
 atataatctt gatggtatag atttagattg ggaatatcca ggtgctcctg atattccaga 4740  
 tattcctgct gatgattcaa gtagtggatc taattatcta actttcctta agttattaa 4800  
 gggtaaaatg ccttctggta aaaccttacc tatagccatt ccttcttctt attggtattt 4860  
 aaaaaatttc cctatttctg atattcaaaa cactgtagat tataatggttt acatgacgta 4920  
 tgatatacat ggtatatggg aatacggtaa agccaatagt tatataaact gccatactcc 4980  
 tcgtaaagaa attgaagatg ctataaaaaat gttagataaa gctggagtta aatttaataa 5040  
 agtatttggg ggtgtggcaa attacggtag atcctacaaa atggttaata caaattgtta 5100  
 taattatgga tgcggtttcc aaagagaggg aggaaattct agagatatga ctaatacacc 5160  
 aggtgttctt tctgattcag aaattattga tattgatagt tcagataaaa agaattgatag 5220  
 atgggtagat actaacacag attgtatttt tatgaaatat gacggaaatt ctgttgttcc 5280  
 atggcctaaa agtagatacg attitagaaga tatgtttaaa aattatggat ttgctggtag 5340  
 ttctttatgg gccgctaatt atttcaaaca tgatgaatgg aagaacgatg aagatgataa 5400  
 taatgatgat acagaagatc ctitegatga agagaatgta tatttcgatg tttatgattg 5460  
 caaaaacaaa gctggttatg atctggacaa tccagtttat ggggttagat tagaaacagc 5520  
 tataaatatt attatattga atggtacaga atctgttaat acagttttta atataattaa 5580  
 tgattacgat aattatatta aatattatga agctetaact agagcacatt atgattcagt 5640  
 catggaaaaa tacgaaaaat ggctgtttga agaagatgga tattacacat attatactga 5700  
 tglagacgga gatgatataa ttataactcc tccagataag aagaaaagag attacataca 5760

10

20

30

40



agagaaatat tcttttgaaa aagaatttat gatgtctcaa aatatgacag aattaacaga 5820  
aattaaagtt aataaaacta ttaattttat gttaaattga acatctctag ctgtaaaaga 5880  
atataacaac gaaaaagttt tatataaaag aggagatata cctcctcctg gttctaataa 5940  
tagattaatt agaaacagta ttattttaga taaagataaa gaagcagcta ttgcgtcttt 6000  
caaacaatat tctggaatag aattatctaa agattctttt gtacaaagag ataaagataa 6060  
aaagtttgat ctaaattgga aacattatac atttatgcat agtactattc tgaatgctat 6120  
tgttttattc cctaattggtt taacaaatat tgattctgac tataattcacc atatttcaga 6180  
tttaattgaa caagctcata acagtttagg taatgaaagt cctgataata tttatgaggt 6240  
cttagaaaagt gtggttggtt ttatgtctgt atcagaaata gctgattata catatacaga 6300  
aggtaaaaag ataaaagaaa aatacagataa gatgaagaaa actatgattg ttggtattat 6360  
attgggtatc ataggtggtt tgcctctatt tttaggacct ataggtatag ctacatctgt 6420  
tcttgcagat ttgctctat taggagcaga tgccgctata aacggagagt taaatccatc 6480  
agacctagca ttgcctttag caggtttatt cttaccagta ttgcttctt taggaaaaac 6540  
atltaaatlt gctgaagctt tacaanaaat taatattaat aaatctaaa actttgataa 6600  
tttaaatgaa ttgagaaaa taagatlttt cagatctaaa ttagggaag ttaagatgtg 6660  
tggtctttaa aagtaattga tgaccattat tcttgtgtaa attgtcaaaa tctacatctt 6720  
catatttatg atatttaaat atatatlttt cgttttcaaa atctaaatgt tgacacatac 6780  
ctccttcttt ttttgcttta ttcactataa tattataaaa ttcaatacta ccagaagcat 6840  
aagctattct taitaaatct atacttgac tataattttc taaatctca gttatattca 6900  
taatagcata atttactaat attgcatatc tttggcgigg aaaatcgata agtagttttt 6960  
gaaccatata tttatttaaa gttttataag tgtaaaaata aaaaggccta taaagagaca 7020  
caaagtttga atcataaata tcattcacta ataaatttaa tactgctttt ttacacaaat 7080  
catctggata ttctttatga tgtttaagta cataagctga atttaaaaaa ttaaattcaa 7140  
ctgtatttat atttatact aataagggtt tataagagac catattatag tacacacttt 7200  
tatctacaga aacacaatcc ataggacca atctgtatt ttgactataa tctatataatg 7260  
tatataacat atcatctata attgtttcta taitactttg tttagaagta taattatatt 7320  
taaaaaatat ttctaaagtt gigtctttat tctgagat agtttcagga agtaaatatt 7380  
tgctttttc tactttttc aaaaatlttt tattttcatg tattttataa ttatatatag 7440  
tatcttctc gcaaaaagat cttctatkaa aaattataga taatctaaaa caaacttctg 7500  
tacatatttt atcacattta tcacaaacat catccaacc taataaaaca catattgttt 7560

10

20

30

40

taataactaa actatatita ggatcttttt ctaataaata tatacaagtt tcttttagtag 7620  
 gaacattagg ataccaaatt cctgaaggca aatattttaaa attaaaatca caaaccttgt 7680  
 tactcataat atatctagca gatatactgg aaagtattcc agatgttaat tttaaacctg 7740  
 aattttccat ttttaactgca aaattataac tatttcttat tcctatacat aaatgaaagt 7800  
 ttaaatcadc ttcacaaaa agctcttcat tatcataata ttttaataaaa ttttcataat 7860  
 ctgaataata agcataagta catgctttta aataatctga aagattatta tctaattcta 7920  
 aacacatttt taattaaaat gaagatata catatattta gtgtttgtta tctaataaca 7980  
 ttatgtgctg ctgcagctac tactgcgaga gaggagtttt tcttatgtta tgatttaatt 8040  
 agatattttaa aacaatatga aaaaacagga gagagtaaat tagtagaaca aacatttttt 8100  
 aatagtatta aaaacttaga cataaactct agagagtata tggaacttgt atataacaaa 8160  
 atagcaggta tttccaatga aagaaataaa tttgaaaata tatataaaga tggagattct 8220  
 ataagtcaag ttgtagaaag agctgtaagc gaaaagaaac ttacatttgg attaaacggt 8280  
 aaaggattat atgttccaga aaacggagaa ccccgactaa aaggttatgc ttctattata 8340  
 gaaagaataa ctctggattt aatggaaata tattctatta aaggacttaa tgatatacct 8400  
 agagatataa aatttaatat ggaaaaaata agacaagaaa gatacaacca aatgaaagaa 8460  
 gctctaaata gtgttgaagg ttataaagga aaaattgtag cctcagactc agattggtgt 8520  
 ttcaaagadc ctcaaggcaa tagaataaca gattttgata gtattaataa agaattaggt 8580  
 cttggtagaa gagatgtaaa attagataaa ggtcatgatg atttaattaa attatgtact 8640  
 gaaaaaatag atagtatgaa taatctacag aatggaaaat gtgtataata aaatgactta 8700  
 taggtcaaaa gtgtaaaata gacttaaaat ataaaaaaat agacttgtta tacagagttg 8760  
 atataaaact gaaaaaaaat aacctaatat ataaaaacaa aaaaacagaa aaaaatggag 8820  
 acgtactaat ctccaataa tctcactttt agtactctcc cctatgttat gtgt 8874

10

20

30

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 863

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;400&gt; 2

40

Ala Val Cys Tyr Asp Thr Asp Gln Val Pro Leu Asn Ile Phe Phe Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Arg Ala Asp Lys Thr Asp Ser Asn Lys Asn Met Ala Leu Asn

20 25 30

Ile Phe Asn Val Phe Arg Gly Phe Leu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ser

35 40 45

10

Phe Tyr Asn Ser Asn Gly Asn Val Tyr Gly Phe Met Trp Val Gly Ser

50 55 60

Met Val His Asn Arg Gly Phe Lys Asp Asn Ile Leu Pro Ile Met Glu

65 70 75 80

20

Asn Glu Val Lys Asn Tyr Gly Ile Pro Lys Thr Leu Tyr Leu Glu Tyr

85 90 95

Asp Gly Gly Gly Asp Pro Met Lys Ser Phe Gly Ile Ile Leu Asp Thr

100 105 110

30

Thr Ser Arg Asp Thr Val Val Lys Ala Ala Lys Leu Trp Ser Gln Gly

115 120 125

Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Glu Gly Ser Lys Asn Tyr Gln Ala Thr Ala

130 135 140

40

Cys Tyr Leu Ser Tyr Ala Tyr Arg Lys Pro Ile Val Asn Asp Asn Phe

145 150 155 160



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

10

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

20

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

30

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

40

Trp Glu Tyr Pro Gly Ala Pro Asp Ile Pro Asp Ile Pro Ala Asp Asp

465

470

475

480

Ser Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Leu Thr Phe Leu Lys Leu Leu Lys Gly

485

490

495

Lys Met Pro Ser Gly Lys Thr Leu Ser Ile Ala Ile Pro Ser Ser Tyr

500

505

510

Trp Tyr Leu Lys Asn Phe Pro Ile Ser Asp Ile Gln Asn Thr Val Asp

515

520

525

10

Tyr Met Val Tyr Met Thr Tyr Asp Ile His Gly Ile Trp Glu Tyr Gly

530

535

540

Lys Ala Asn Ser Tyr Ile Asn Cys His Thr Pro Arg Lys Glu Ile Glu

545

550

555

560

20

Asp Ala Ile Lys Met Leu Asp Lys Ala Gly Val Lys Phe Asn Lys Val

565

570

575

Phe Gly Gly Val Ala Asn Tyr Gly Arg Ser Tyr Lys Met Val Asn Thr

580

585

590

30

Asn Cys Tyr Asn Tyr Gly Cys Gly Phe Gln Arg Glu Gly Gly Asn Ser

595

600

605

Arg Asp Met Thr Asn Thr Pro Gly Val Leu Ser Asp Ser Glu Ile Ile

610

615

620

40

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

675

680

685

10

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

705

710

715

720

20

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

740

745

750

30

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

770

775

780

40

Glu Glu Asp Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Val Asp Gly Asp Asp

785

790

795

800

Ile Ile Ile Thr Pro Pro Asp Lys Lys Lys Arg Asp Tyr Ile Gln Glu  
 805 810 815

Lys Tyr Ser Phe Glu Lys Glu Phe Met Met Ser Gln Asn Met Thr Glu  
 820 825 830

Leu Thr Glu Ile Lys Val Asn Lys Thr Ile Asn Phe Met Leu Asn Gly  
 835 840 845

Thr Ser Leu Ala Val Lys Glu Tyr Asn Asn Glu Lys Val Leu Tyr  
 850 855 860

10

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 252

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kluyveromyces lactis

&lt;400&gt; 3

30

Gly Asp Ile Pro Pro Pro Gly Ser Asn Asn Arg Leu Ile Arg Asn Ser  
 1 5 10 15

Ile Ile Leu Asp Lys Asp Lys Glu Ala Ala Ile Ala Ser Phe Lys Gln  
 20 25 30

Tyr Ser Gly Ile Glu Leu Ser Lys Asp Ser Phe Val Gln Arg Asp Lys  
 35 40 45

40

Asp Lys Lys Phe Asp Leu Asn Gly Lys His Tyr Thr Phe Met His Ser  
 50 55 60







	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				10
	115	120	125	
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				20
	145	150	155	
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				30
	180	185	190	
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				40
	210	215	220	
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 K L K P のキラー効果を示す図である。( a ) は  $Ca^{2+}$  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、 $Ca^{2+}$  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 3 A 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 3 B 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  $Ca^{2+}$  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、K L K P を作用させた *zds1* 株 ( *Zds1* 破壊株 ) の F A C S 解析の結果を示す図である。

図 6 は、K L K P を作用させた *zds1* と  $Ca^{2+}$  情報伝達系の二重変異株の F A C S 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、K L K P 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、K L K P 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 K L K P による細胞内カルシウム増加 ( レポーターアッセイ法 ) ( 図 9 ( b ) ) を示す図である。

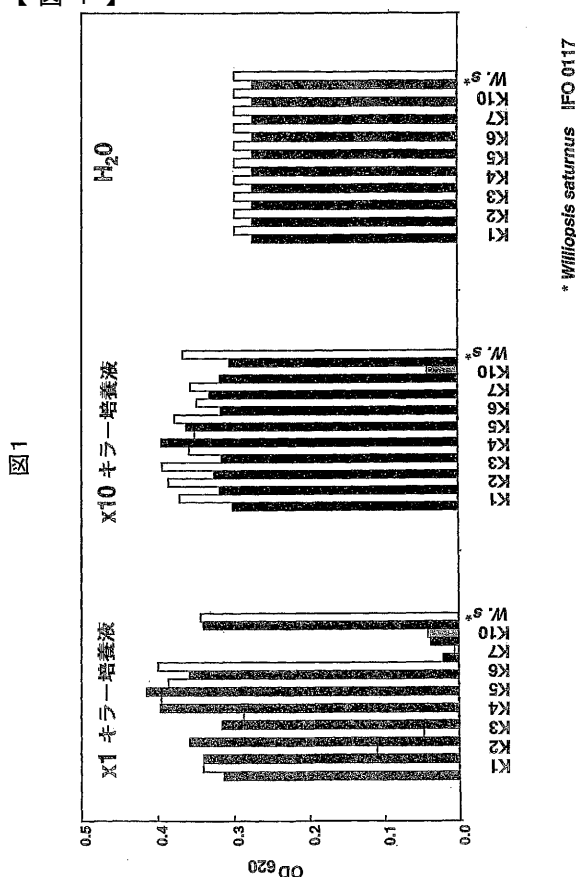
図 10 は、 $^{45}Ca$  を用いた K L K P の作用解析の結果を示す図である。

図 11 は、K L K P 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 】

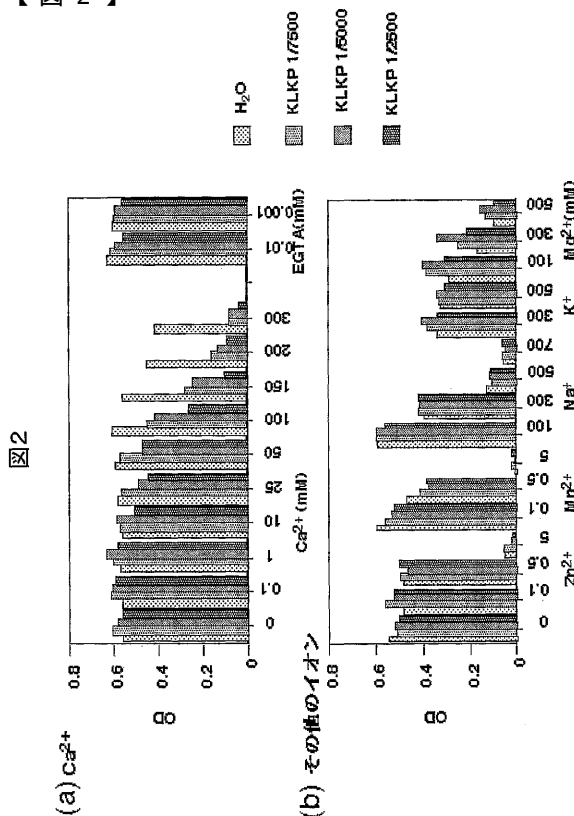
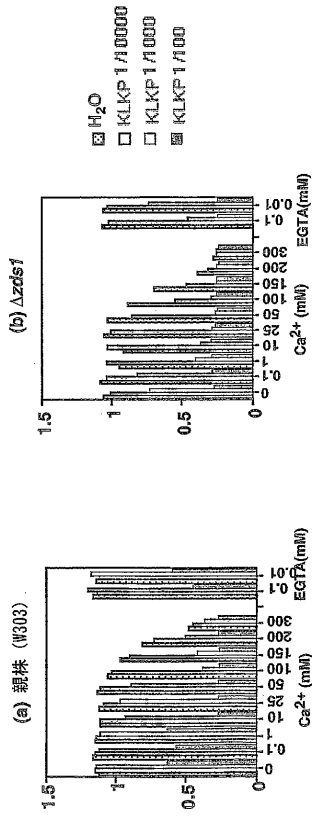


図 1

図 2

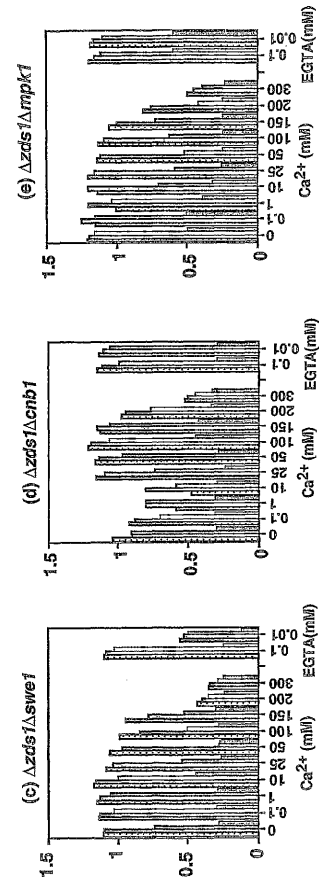
【 図 3 A 】

図3A



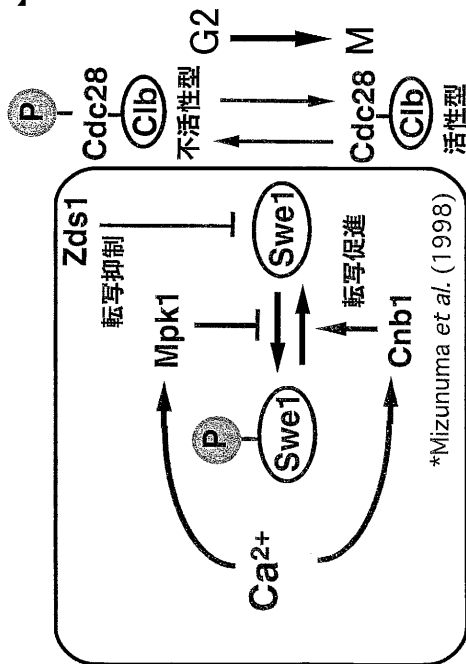
【 図 3 B 】

図3B



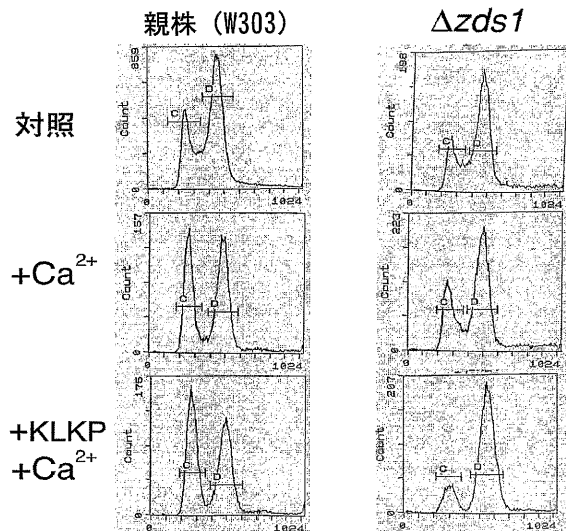
【 図 4 】

図4



【 図 5 】

図5



【 図 6 】

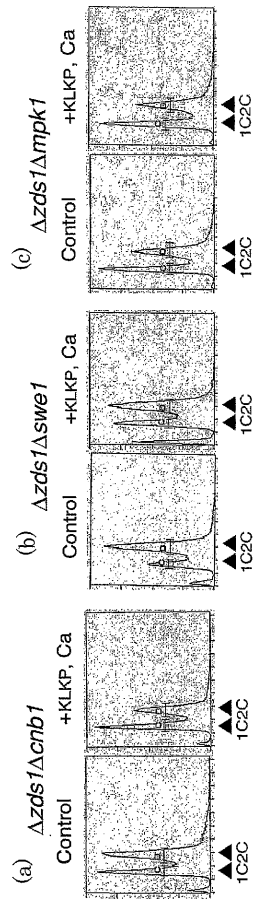


図6

【 図 8 】

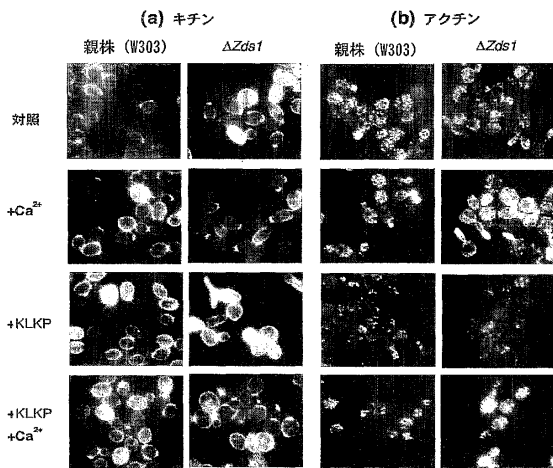


図8

【 図 7 】

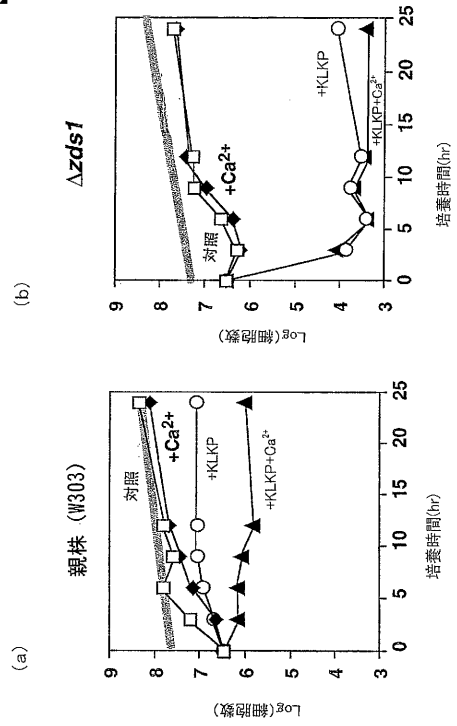


図7

【 図 9 】

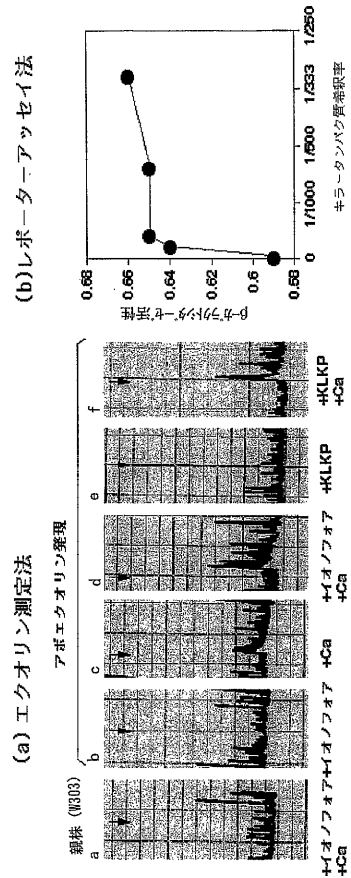
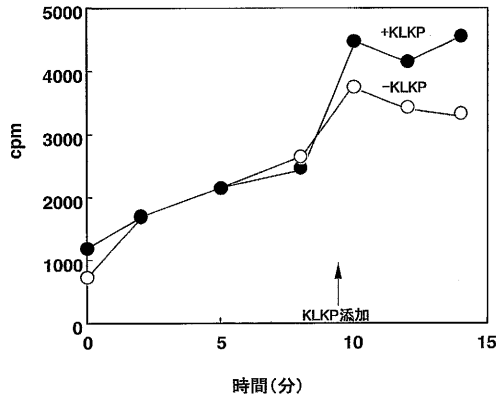


図9

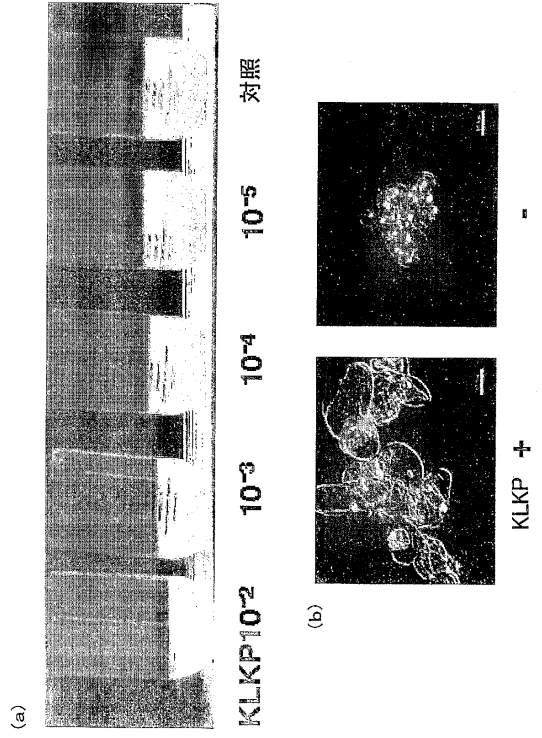
【 図 1 0 】

図10



【 図 1 1 】

図11



## 【 国際調査報告 】

		International application No. PCT/JP02/06063
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/31, C07K14/39, A61K38/00, A61K45/00, A61P43/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P25/28, A61P9/00  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>7</sup> C12N15/31, C07K14/39, A61K38/00, A61K45/00, A61P43/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P25/28, A61P9/00  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) CA (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq/Genbank/EMBL/DDBJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> <u>A</u>	Hiroko KITAMOTO et al., "Shutsuga Kobo Calcium Joho Dentatsukei ni taisuru Kluyveromyces Lactis Killer Protein no Eikyo", 2002nendo (Heisei 14nendo) Taikai Koen Yoshishu, published on 05 March, 2002 (05.03.02), page 52, 2-5Ca06	<u>3-5</u> <u>6,7</u> 1,2,8-11
<u>Y</u> <u>A</u>	KITAMOTO KH. et al., Selection of killer yeasts (Kluyveromyces lactis) to prevent aerobic deterioration in silage making. J.Daily Sci. 1993, Vol.76, No.3, 803-811	<u>6,7</u> 1-5,8-11
<u>Y</u> <u>A</u>	KITAMOTO KH. et al., Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, Kluyveromyces lactis, defective in the ability to grow on lactic acid. Appl.Environ. Microbiol. 1999, Vol.65, No.10, pages 4697 to 4700	<u>6,7</u> 1-5,8-11
<input checked="" 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 26 August, 2002 (26.08.02)	Date of mailing of the international search report 10 September, 2002 (10.09.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.	



International application No.

PCT/JP02/06063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STARK M.J.R. et al., Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast <i>Kluyveromyces lactis</i> . <i>Nucleic Acids Res.</i> 1984, Vol.12, pages 6011 to 6030	1-11
A	STARK M.J.R. et al., The plasmid-encoded killer system of <i>Kluyveromyces lactis</i> : A review. <i>YEAST</i> 1990, Vol.6, pages 1 to 29	1-11
A	BUTLER A.R. et al., <i>Kluyveromyces lactis</i> toxin has an essential chitinase activity. <i>Eur.J.Biochem.</i> 1991, Vol.199, pages 483 to 488	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/06063	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/31, C07K14/39, A61K38/00, A61K45/00, A61P43/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P25/28, A61P9/00			
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)) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/31, C07K14/39, A61K38/00, A61K45/00, A61P43/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P25/28, A61P9/00			
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			
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) CA (STN) SwissProt/PIR/GeneSeq/Genbank/EMBL/DDBJ			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	北本宏子他、出芽酵母カルシウム情報伝達系に対する	3-5	
Y	Kluyveromyces lactisキラータンパク質の影響、2002年度 (平成14年度)	6, 7	
A	大会講演要旨集 2002.03.05発行、第52頁、2-5Ca06	1, 2, 8-11	
Y	KITAMOTO KH. et al. Selection of killer yeasts	6, 7	
A	(Kluyveromyces lactis) to prevent aerobic deterioration in silage making. J. Daily Sci. 1993, Vol. 76, No. 3, 803-811	1-5, 8-11	
<input checked="" 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。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		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 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 26.08.02		国際調査報告の発送日 10.09.02	
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		特許庁審査官 (権限のある職員) 坂崎 恵美子	4B 3037
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/06063
C (続き)、 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	KITAMOTO KH. et al. Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, <i>Kluyveromyces lactis</i> , defective in the ability to grow on lactic acid. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 1999, Vol.65, No.10, pages 4697-4700	6, 7 1-5, 8-11
A	STARK M. J. R. et al. Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast <i>Kluyveromyces lactis</i> . <i>Nucleic Acids Res.</i> 1984, Vol.12, pages 6011-6030	1-11
A	STARK M. J. R. et al. The plasmid-encoded killer system of <i>Kluyveromyces lactis</i> : A review. <i>YEAST</i> 1990, Vol.6, pages 1-29	1-11
A	BUTLER A. R. et al. <i>Kluyveromyces lactis</i> toxin has an essential chitinase activity. <i>Eur. J. Biochem.</i> 1991, Vol.199, pages 483-488	1-11

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/15	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
// C 0 7 K 14/39	G 0 1 N 33/50	Z
	C 0 7 K 14/39	Z N A

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。