

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 504030

(P2003 - 504030A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 H 1/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/00		A 2 3 K 1/16	304 B 2 B 1 5 0
A 2 3 K 1/16	304	A 2 3 L 3/3571	4 B 0 2 1
A 2 3 L 3/3571		A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		39/395	B 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 71数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 508359(P2001 - 508359)

(86)(22)出願日 平成12年5月31日(2000.5.31)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月7日(2002.1.7)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/04972

(87)国際公開番号 W001/002587

(87)国際公開日 平成13年1月11日(2001.1.11)

(31)優先権主張番号 199 30 959.0

(32)優先日 平成11年7月5日(1999.7.5)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 アヴェンティス・リサーチ・ウント・テクノロジーズ・ゲーエムベーハー・ウント・コー・カーゲー  
ドイツ連邦共和国デー - 65926 フランクフルト・アム・マイン

(72)発明者 レーフェルト, クラウオズ  
ドイツ連邦共和国デー - 76139 カルルスルーエ, コールベルガー・シュトラッセ 16ア

(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規抗真菌剤および殺菌剤、その製造および使用法

(57)【要約】

本発明はヒトおよび植物に対して病原性である酵母および/または真菌を制御するための酵母 - いわゆるキラー酵母 - からの蛋白質毒素の組換え体供給に関しており、酵母および/または真菌は選択的に殺される。高選択性は該蛋白質毒素の抗真菌剤および/または殺菌剤としての使用を可能にする。さらに、そのような蛋白質毒素は作物保護にも用いることができる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ウィリオプシス カリフォルニカ (Williopsis californica) および/または チゴサッカロミセス バイリ (Zygosaccharomyces bailii) から得ることができる蛋白質毒素。

【請求項2】 DSM12864 および/または DSM12865 から得ることができる、請求項1に記載の蛋白質毒素。

【請求項3】 抗真菌および/または殺菌作用を持つ請求項1および2に記載の蛋白質毒素。

【請求項4】 グルカナーゼ活性を持つ、請求項1から3の任意の項に記載の蛋白質毒素。

【請求項5】 -1,6-D-グルカンへ結合し、並びに -1,3-D-グルカナーゼおよび/または -1,3-グルカノシルトランスフェラーゼ活性を持つ、請求項4に記載の蛋白質毒素。

【請求項6】 配列ID番号：1または配列ID番号：2に従ったアミノ酸配列またはその機能性変異体、および少なくとも8ヌクレオチドを持つその断片を持っている、請求項1-5の任意の項に記載のグルカナーゼおよび/または蛋白質毒素をコード化している核酸（ここで配列ID番号：1または配列ID番号：2は本請求項の一部である）。

【請求項7】 核酸がDNAまたはRNA、好適には二本鎖DNAである、請求項6に記載の核酸。

【請求項8】 配列ID番号：1の塩基位置1から951または配列ID番号：2の塩基位置1から717に従った核酸配列を持つDNAである、請求項6または7に記載の核酸（ここで配列ID番号：1または配列ID番号：2は本請求項の一部である）。

【請求項9】 一つまたはそれ以上の制御領域（プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）および/または3'-末端ポリ-A配列および/または細胞内プロ毒素プロセッシングのために必要であるKex2pエンドペプチダーゼ切断部位および/または一つまたはそれ以上のN-グリコシル化可能部位を含む

、請求項8に記載の核酸。

【請求項10】 DSM12864および/またはDSM12865から得ることができる、請求項8-9の任意の項に記載の核酸。

【請求項11】 ベクター、好適には発現ベクターまたは遺伝子治療に有効であるベクター内に含まれている、請求項6-10の任意の項に記載の核酸。

【請求項12】 核酸が化学的に合成されるかまたはプローブにより遺伝子ライブラリーから単離される請求項6-10の任意の項に記載の核酸の製造法。

【請求項13】 配列ID番号：1または配列ID番号：2に従ったアミノ酸配列またはその機能性変異体、および少なくとも6個のアミノ酸を持つその断片を持っているポリペプチド。

【請求項14】 請求項6-11の任意の項に記載の核酸が適切な宿主細胞で発現される、請求項1-5および13に記載のポリペプチドの製造法。

【請求項15】 請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項16】 哺乳動物が請求項7に記載したポリペプチドで免疫されおよび、もし適切であれば、形成された抗体が単離される請求項15に記載の抗体の製造法。

【請求項17】 請求項6-10の任意の項に記載の核酸、請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドまたは請求項15に記載の抗体および、もし適切ならば医薬として受容可能な添加物および/または補助剤から成る薬剤製品。

【請求項18】 表皮、皮膚および皮下皮膚糸状菌症、粘膜の真菌症および全身性真菌症、特に好適にはカンジダ真菌症のような真菌症処置のための薬剤製品の製造法、ここで請求項6-10の任意の項に記載の核酸または請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドまたは請求項15に記載の抗体は医薬として受容可能な添加物および/または補助剤と一緒に処方される。

【請求項19】 請求項6-10の任意の項に記載の核酸または請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドまたは請求項15に記載の抗体、および、もし適切ならば、適切な添加物および/または補助剤を含んでいる診断

薬。

【請求項20】 請求項6-10の任意の項に記載の核酸または請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドまたは請求項15に記載の抗体は医薬として受容可能な担体と組み合わせられる、表皮、皮膚および皮下皮膚系真菌症、粘膜の真菌症および全身性真菌症、特に好適にはカンジダ真菌症のような真菌症を診断するための診断薬の製造法。

【請求項21】 請求項6-10の任意の項に記載の核酸または請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドまたは請求項15に記載の抗体、および、もし適切ならば、適切な添加物および/または補助剤を含んでいる機能的相互作用剤を同定するためのアッセイ。

【請求項22】 機能的相互作用剤を同定するための、請求項6-10の任意の項に記載の核酸または請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項23】 変異体を発見するための、請求項6-10の任意の項に記載の核酸の使用であって、上記の核酸で遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、および発見された変異体を単離することから成る使用。

【請求項24】 食品および動物飼料中の有害な酵母および真菌を制御するための、請求項1-5および13の任意の項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項25】 DSM12864およびDSM12865を増殖させるための方法であって、それらを合成Bおよび/またはB A V C培地中で増殖させることを含む方法。

【請求項26】 トランスジェニック植物および植物細胞の発生のための、請求項6-11の任意の項に記載の核酸の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は酵母から得ることができる抗真菌剤 (antimycotics) および殺菌剤 (fungicides)、その製造および使用方法に関する。

## 【0002】

ヒトにおける真菌および/または酵母感染が最近非常に増加しており、また食品および動物飼料の望まれない汚染が続いているので、選択的抗真菌剤はきわめて重要である。細胞性および体液性防御系が完全には機能的ではないレベルに保たれていなければならない免疫抑制患者において、抗真菌剤は特に重要である [Anaissie, 1992; Meunier et al., 1992; Wingard, 1995]。真菌症 (mycoses) により非常に危険にさらされているのは HIV-1 (AIDS) に感染した患者であり、患者は疾患の後の段階で、ヒトに病原性である真菌および/または酵母による日和見感染により非常に頻繁に死亡する [Levy, 1993]。そのような感染の治療に現在用いられている抗真菌剤 (例えば、アンフォテリシン B、フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール) は、真核生物の細胞質膜の構造完全性を破壊し、従って、感染宿主生物体に損傷を与えるのでかなりの副作用を起こす [Hector, 1993]。さらに、通常の抗真菌剤の適用は、非常に短時間内にフルコナゾール耐性を導き、それはヒトに病原性である微生物間に急速に拡がるので、問題をさらに大きくする [Cameron et al., 1993; Chavenet et al., 1994; Maenza et al., 1996; Pfaller et al., 1994; Rex et al., 1995; Troillet et al., 1993]。従って、細菌抗生物質のように、高度に選択的に認識され、可能であれば、ヒトに対して病原性である真菌および酵母のみを攻撃する抗真菌剤を開発することが強く望まれている。しかしながら、高等生物の細胞過程のほとんどすべては、真核生物で高度に機能相同性を示す遺伝子産物により支配されているので、"特異的抗菌抗生物質 (specifically antifungal antibiotics)" の開発は現在に至るまで成功していない [Kurz, 1998; Komiyama et a

l. , 1998 ]。

【0003】

選択的抗真菌剤の標的は、細胞の機械的および浸透圧安定性に絶対必要であるが、より高等な真核生物では存在しない唯一の弱点である、酵母細胞壁の  $\beta$ -1,3-グルカンであり、病原性酵母を制御することが開発されるかも知れない [Roemer et al. , 1994]。酵母および真菌の細胞壁構造に選択的に携わる物質には非常に興味を惹かれるが、真菌症を制御するための抗生物質様阻害剤は未だに用いられていない。細菌性抗生物質産物は本世紀の初めには発見されているが、酵母での類似の効果は60年代の初めに、いわゆるキラ-酵母を同定することにより観察されている [Bevan & Makower , 1963] : 醸造酵母 サッカロミセス セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) の毒素産生 (toxin-producing) キラ株は、感受性酵母をレセプター依存性過程で破壊する "キラ-毒素 (killer toxins) の能力は、真核生物宿主細胞を目立って損傷させることなく酵母細胞質中で安定におよび高コピー数で生き残る、レトロウイルス様二本鎖RNAウイルスの感染に基づいている [Tipper & Schmitt , 1991]。現在知られている酵母 S. セレビジエ の三つのキラ-毒素 (K1、K2、K28) はグリコシル化されていない / -ヘテロダイマーであり、それは高分子プレプロ毒素として感染細胞により翻訳され、複雑な修飾による細胞内分泌経路の間に処理されて生物活性キラ-蛋白質を与える [Hanes et al. , 1986 ; Dignard et al. , 1991 ; Schmitt & Tipper , 1995]。 S. セレビジエ 毒素の毒性効果は、膜完全性 (membrane integrity) の破壊 (毒素K1、K2) かまたは (キラ-毒素K28の場合のような) DNA合成の直接阻害による細胞周期の停止に基づいている [Bussey , 1991 ; Schmitt & Compain , 1995 ; Schmitt et al. , 1996]。K1、K2およびK28の部類のキラ-毒素は、その作用様式およびその物理化学的特性ではお互いに異なっているが、それらは狭い作用スペクトルを持ち、および主として密接に関連した種の感受性酵母を破壊するという特性を共有している。この制限され

た作用スペクトルは、これまで特徴付けられている醸造用酵母キラー毒素が、感受性標的細胞を破壊できるためには酵母細胞壁および細胞質膜レベルで異なったレセプター集団と相互作用しなければならないという事実に基づいている。酵母細胞壁の主たる毒素レセプターは高度に分岐した  $\alpha$  - 1, 6 - D - グルカンかまたは細胞壁マンノプロテイン (cell wall mannoprotein) の外側マンノトリオース側鎖 (outer mannotriose side chains) である [Bussey, 1991; Schmitt & Radler 1987, 1988]。

#### 【0004】

酵母 S. セレビジエ、ハンセニアスポラ ウバルム (Hanseniaspora uvarum)、チゴサッカロミセス バイリ (Zygosaccharomyces bailii) および ウスチラゴ マイディス (Ustilago maydis) のウイルス蛋白質毒素の他に、デバリオミセス (Debaromyces)、ハンゼヌラ (Hansenula)、クリプトコッカス (Cryptococcus)、ロドトルラ (Rhodotorula)、トリコスポロン (Trichosporon)、ピチア (Pichia)、クルイベロミセス (Kluyveromyces)、トルロプシス (Torulopsis) および ウィリオプシス (Williopsis) 属でもキラー株が報告されている [McCracken et al., 1994; Park et al., 1996; Schmitt & Neuhausen, 1994; Walker et al., 1995]。しかしながらこれらの酵母においては、キラー現象の遺伝子的基礎はウイルスゲノムではなく、線状 dsDNA プラスミドかまたは染色体酵母遺伝子である [Schrunder et al., 1994]。

#### 【0005】

種々の毒素産生 "キラー酵母" の分子生物学に対する集中的な研究は、毒性蛋白質 ("キラー毒素") の分泌は酵母で広範囲にわたっており、選択的抗真菌剤開発の可能性が存在していることを過小評価すべきではないことを示しているが [Walker et al., 1995; Hodgson et al., 1995; Polonelli et al., 1986; Schmitt &

Neuhausen, 1994; Neuhausen & Schmitt, 1996; Schmitt et al., 1997]、これまでそのような蛋白質毒素を提供することは不可能であった。

#### 【0006】

従って、本発明の目的はヒトおよび植物に病原性である酵母および/または真菌を制御するために適した抗真菌または殺菌蛋白質毒素を提供することである。

驚くべきことに、野生型酵母ウィリオプシス カリフォルニカ (*Williopsis californica*) 株3/57 (DSM12865)からのキラー毒素ウィカルチン (WICALTIN) (蛋白質毒素)、それは高度に効率的な様式で産生および分泌される、および酵母チゴサッカロミセス バイリ (DSM12864)からのウイルス-コード化チゴシン (ZYGOCIN) (蛋白質毒素)がヒトおよび植物に病原性である酵母および/または真菌を制御するために特に適していることが証明された。さらに、食品および動物飼料分野で危険である真菌および有害酵母も破壊できる。従って、両方の蛋白質毒素は酵母および/または真菌感染、特に真菌症を制御するための抗真菌剤および/または殺菌剤として用いられる可能性を持っている。これらの指摘は作用様式の研究により本発明で証明される。本発明のために適した方法で毒素遺伝子はクローン化されおよび配列決定され、培養におけるウィカルチンおよびチゴシンの組換え産生および過剰発現のための方法が確立された。

#### 【0007】

従って、本発明の主題は、ウィリオプシス カリフォルニカ (特に好適にはDSM12865株)およびチゴサッカロミセス バイリ (特に好適にはDSM12864株)から得ることができる蛋白質毒素に関する。両方の株はブタペスト条約 ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de))の規定に従ってDSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, 38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1bに1999年6月9日に寄託された。

#### 【0008】

本発明のためには、株は特にDSM12864およびDSM12865であり

、それは生物学的に強力な蛋白質毒素を分泌し、その広い作用スペクトルのため（実施例4および7を参照されたい）、ヒトおよび植物に対して病原性である多数の酵母および真菌を破壊する。それ故本発明は蛋白質毒素の意味において選択的な抗真菌剤または殺菌剤 - および本発明に従った下記のポリペプチドおよび本発明に従ったそのコード化核酸（特に毒素遺伝子の機能性単位中の） - その特異的、レセプター仲介産生のため酵母および/または真菌のみを破壊しおよびより高等な真核生物 - およびそれ故ヒトおよび哺乳類細胞 - および植物、好適には作物植物（crop plants）には完全に無害である生物医薬として可能性がある - に関する [Pfeiffer et al., 1988 参照]。

#### 【0009】

ヒトおよび植物に非病原性または病原性である以下の酵母および/または真菌が選択的に破壊できる：

チゴシン感受性酵母種：サッカロミセス セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae)、カンジダ アルビカンス (Candida albicans)、カンジダ クルセイ (Candida krusei)、カンジダ グラブラータ (Candida glabrata)、カンジダ ビニ (Candida vini)、ハンセニアスポラ ウバルム (Hanseniaspora uvarum)、クルイベロミセス マルキシアヌス (Kluyveromyces marxianus)、メツキニコウシア プルチェルリマ (Methschnikowia pulcherrima)、ウスチラゴ マイジス (Ustilago maydis)、デバリオミセス ハンセニ (Debaryomyces hansenii)、ピチア アノマラ (Pichia anomala)、ピチア ジャディニイ (Pichia jadinii)、ピチア メンブラネファシエンス (Pichia membranefaciens)、ヤロウシア リポリチカ (Yarrowia lipolytica) および チゴサッカロミセス ルーキシ (Zygosaccharomyces rouxii)。

ウィカルチン感受性酵母種：カンジダ アルビカンス、カンジダ グラブラータ、カンジダ トロピカリス (Candida tropicalis)、デバリ

オミセス ハンセニ、クイベロミセス ラクチス、メツキニコウシア プルチ  
ェルリマ、ピチア アノマラ、ピチア ジャディニイ、サッカロミセス セレビ  
ジエ、スポロトリクス(Sporothrix)種、トルロスポラ デルブルエキ  
(Torulaspora delbrueckii)、トルロスポラ プレト  
リエンス(Torulaspora pretoriensis)、ヤロウイ  
ア リポリチカおよびチゴサッカロミセス バイリ。

【0010】

ウィカルチン産生酵母株DSM12865の特に高い活性は多分、その著しい分泌効率に基づいており、それは同じ酵母種の他の株と比較すると著しくより明白である。チゴシン産生酵母株DSM12864の'キラ'特性は、毒素コード化二本鎖RNAウイルス(Mzb-dsRNA)による感染に基づいており、それは細胞質中に高コピー数(high copy number)で安定に存続し、問題の酵母(株DSM12864)がチゴシンを産生および分泌することを可能にする[Schmitt & Neuhausen, 1994参照]。同じ種の他の株は細胞質中に毒素コード化dsRNAウイルスをとどめないで毒素産生を示さず、表現型的に'非キラ'と分類される。

【0011】

本発明の別の主題は従って蛋白質毒素をコード化している核酸-配列ID番号: 1および2のアミノ酸配列およびグルカナーゼ活性を持つ-またはその機能性変異体、および少なくとも8ヌクレオチド、好適には少なくとも15または20ヌクレオチド、特に少なくとも100ヌクレオチド、とりわけ少なくとも300ヌクレオチドを持つその断片である(以後"本発明による核酸"と称される)。

【0012】

細胞内プロセッシングおよび分泌後、蛋白質毒素をコード化している完全核酸は309アミノ酸および34kDaの分子量(配列ID番号: 1)または99アミノ酸および10kDaの分子量(配列ID番号: 2)のサイズを持っている。酵母S.セレビジエにおける配列ID番号: 1に従った核酸の発現は組換え体ウィカルチンを生じ、それは著しい-1,3-D-グルカナーゼ活性を持つグリコシル化蛋白質として酵母の培養上清内へ分泌される[実施例10参照]。本発

明に従ったさらなる実験から、本発明による核酸は、配列ID番号：1の場合はグルカナーゼ活性を持つ蛋白質毒素をコード化し、配列ID番号：2の場合は多分インビボでO-グリコシル化されおよびチゴシンと称される蛋白質毒素をコード化している核酸であることが確認された。本発明による核酸はDSM12865（配列ID番号：1）およびDSM12864（配列ID番号：2）から得ることができる。

#### 【0013】

好適な態様において、本発明による核酸はDNAまたはRNA、好適には二本鎖DNA、特に配列ID番号：1の1位から947位と一致した、および配列ID番号：2の1位から713位と一致した核酸配列を持つDNAである。本発明に従うと、二つの位置がコード化領域の開始および終結、即ち、各々の場合において問題とする読み取り枠の最初および最後のアミノ酸を決定する。

#### 【0014】

用語”機能的変異体 (functional variant)”とは本発明による核酸と機能的に関連する核酸であることを意味することを理解されたい。関連核酸の例は、異なった酵母細胞または株および培養物または対立変異体 (allelic variants) 由来の核酸である。本発明はまた、種々の酵母/酵母株または皮膚糸状菌および糸状菌のような他の病原体から誘導できる核酸の変異体も包含している。

#### 【0015】

本発明に従った用語”変異体”は、相同性、特に約60%、好適には約75%、特には約90%、およびとりわけ約95%の配列同一性 (sequence identity) を示す核酸を意味していることをさらに理解されたい。

#### 【0016】

本発明による核酸の断片は、例えば、さらなる変異体を同定するためのプローブとして、またはアンチセンス核酸として個々のエピトープを発生するために使用できる。例えば、少なくとも約8ヌクレオチドの核酸はアンチセンス核酸として、少なくとも約15ヌクレオチドの核酸はPCR法におけるプライマーとして、少なくとも約20ヌクレオチドの核酸はさらなる変異体の同定のために、およ

び少なくとも約100ヌクレオチドの核酸はプローブとして適している。

【0017】

さらに好適な態様において、本発明による核酸は一つまたはそれ以上の非コード配列および/またはポリ(A)配列、一つまたはそれ以上のKex2pエンドペプチダーゼ認識配列(細胞内プレ蛋白質プロセッシングに必要とされる)、および一つまたはそれ以上のN-グリコシル化可能部位を含んでいる。非コード配列は、本発明による核酸を含んでいるコード化毒素遺伝子の制御された発現のためのプロモーター配列またはエンハンサー(enhancer)配列のような調節配列である。

【0018】

さらなる態様において、本発明による核酸はベクター、好適には発現ベクターまたは遺伝子治療に有効であるベクターに含まれている。

発現ベクターの例は、配列ID番号:2に従った核酸の場合、原核生物および/または真核生物発現ベクターであろうし、配列ID番号:1に従った核酸の場合、排他的に真核生物発現ベクターであろう。大腸菌における配列ID番号:1に従った毒素-コード化核酸の発現は、それぞれの異種的に発現された蛋白質毒素が細菌細胞に有毒であるので不可能である。大腸菌における配列ID番号:1に従ったウィカルチン-コード化核酸のクローニングはプロモーターを運んでいないプラスミドでのみ可能である(例えば、プラスミドpBR322誘導体の助けにより)。配列ID番号:2に一致するチゴシン-コード化核酸の異種発現を可能にする原核生物ベクターの例は市販品として入手可能なベクターpGEX-4T-1であり、それはグルタチオンSトランスフェラーゼ/チゴシン融合蛋白質が大腸菌において発現されることを可能にする。大腸菌でのチゴシン発現のための別のベクターは、例えば、発現された蛋白質のNi<sup>2+</sup>-NTAカラムを通じた有利な精製を可能にするN末端Met-Ala-His6タグをコード化しているT7発現ベクターpGM10(Martin, 1996)である。サッカロミセス セレビジエでの発現のために適切な真核生物発現ベクターの例は、ベクターp426Met25またはp426GAL1(Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767)であり、

昆虫細胞中での発現のためにはEP - B1 - 0127839またはEP - B1 - 0549721に開示されているようなバキュロウイルスベクター、および哺乳類細胞での発現のためにはSV40ベクター（自由に手に入る）である。

【0019】

一般に、発現ベクターはまた、例えば、大腸菌中での発現のためのtrpプロモーター（例えば、EP - B1 - 0154133を参照されたい）、酵母中での発現のためのADH - 2プロモーター（Russell et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674）、昆虫細胞中での発現のためのバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター（baculovirus polyhedrin promoter）（例えば、EP - B1 - 0127839を参照されたい）、または初期SV40プロモーターまたはLTRプロモーター、例えば、MMTVのプロモーター（マウス乳腺腫瘍ウイルス；Lee et al. (1981) Nature, 214, 228）のような宿主細胞に適している調節配列を含んでいる。

【0020】

遺伝子治療に有効であるベクターの例は、ウイルスベクター、好適にはアデノウイルスベクター、特に、例えば、二つの挿入された末端反復的配列（ITR）のみから成るアデノ関連ウイルスベクターのようなアデノ関連ウイルスベクターである。

【0021】

適切なアデノウイルスベクターは、例えば、McGrory, W. J. et al. (1988) Virol. 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) "真核生物ウイルスベクター" (Gluzman, Y. 編) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) EMBO J., 5, 2377またはWO95/00655、に記載されている。

【0022】

適切なアデノ関連ウイルスベクターの例は、Muzyczka, N. (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158, 97; WO95/23867; Samulski, R. J. (1989) *J. Virol.* 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J. A. et al. (1995) *Human Gene Therapy* 6, 1531またはKotrin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5, 793、に記載されている。

#### 【0023】

遺伝子治療に有効であるベクターはまた、本発明による核酸をリポソームと複合体形成させることによって得ることができる。この目的のために適した脂質混合物はFeigner, P. L. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 84, 7413; Behr, J. P. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982; Felgner, J. H. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2550またはGao, X. & Huang, L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 195、に記載されているようなものである。リポソーム製造の場合、DNAは陽性の正味の電荷が残り、およびDNAがリポソームにより完全に複合体形成されるような比で、リポソーム表面上にイオンの結合される。

#### 【0024】

さらに別の態様において、本発明による核酸はベクター中に、好適にはトランスジェニック植物発生のための発現ベクター中に含まれている。上記のキラ毒素ウィカルチンおよびチゴシンは広い作用スペクトルを持ち、および植物に対して病原性である酵母および真菌も破壊するので、例えば、トウモロコシに対して病原性である病原体、ウスチラゴ マイジスの感染に耐性様式 (resistant fashion) で振る舞うトランスジェニック植物を提供することが可能である。同様の実験がすでにタバコ植物で実施されており、それは、天然にはウイルスによりコード化されているU. マイジス キラー毒素KP4の異種発現により、問題とする蛋白質毒素を分泌することができ、ある種の病原性U. マイ

ジス株から特異的に保護されている ( Park et al. , 1996 ; K i n a l et al. , 1995 ; B e v a n , 1984 ) 。天然のアグロバクテリウム ツメファシエンス ( Agrobacterium tumefaciens ) T i プラスミドの修飾誘導体に基づいている市販品として入手可能な形質転換系から出発し、毒素遺伝子 W C T および Z B T としても示されている本発明の核酸はいわゆる二方向性 p B 1 ベクター ( C L O N T E C H ) 内へクローン化でき、トランスジェニック植物の発生に用いられる。この目的のためには、各々の毒素遺伝子 W C T および Z B T は強力なカリフラワーモザイクウイルスプロモーター ( C a M V - P ) の転写調節下に置かれる。構築されるべきベクターのより詳細な構築は実施例 9 で概要が示されている。

#### 【 0 0 2 5 】

例えば、本発明による核酸は、配列 I D 番号 : 1 および 2 に開示された配列を参照して、または遺伝子コードを考慮しながら ( 例えば、U h l m a n , E . & P e y m a n , A . ( 1990 ) C h e m i c a l R e v i e w s , 90 , 543 , N o . 4 を参照されたい ) 配列 I D 番号 : 1 および 2 に開示したペプチド配列を参照して、例えば、ホスホトリエステル法に従って化学的に合成できる。本発明による核酸を得るための別の可能性は、適切なプローブによる適切な遺伝子バンクの単離である ( 例えば、S a m b r o o k , J . e t a l . ( 1989 ) M o l e c u l a r C l o n i n g . A l a b o r a t o r y m a n u a l . 第 2 版 , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k を参照されたい ) 。例えば、適切なプローブは約 100 から 1000 ヌクレオチドの長さ、好適には約 200 から 500 ヌクレオチドの長さ、特には約 300 から 400 ヌクレオチドの長さを持ち、その配列が配列 I D 番号 : 1 および 2 に一致する核酸配列から推論できる一本鎖 DNA 断片である。

#### 【 0 0 2 6 】

本発明の別の主題は、配列 I D 番号 : 1 および 2 に一致するアミノ酸配列、その機能性変異体、および少なくとも 6 アミノ酸、好適には少なくとも 12 アミノ酸、特に少なくとも 65 アミノ酸、とりわけ 309 アミノ酸 ( 配列 I D 番号 : 1 ) および 99 アミノ酸 ( 配列 I D 番号 : 99 ) の部分であるようなポリペプチド

である（以後、“本発明に従ったポリペプチド”）。例えば、約6-12、好適には約8アミノ酸の長さであるポリペプチドがエピトープを含んでおり、それは支持体へ結合後、特異的ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の製造に役に立つであろう（この前後関係については例えば、US5,656,435を参照されたい）。少なくとも約65のアミノ酸の長さを持つポリペプチドは支持体なしで、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の製造に直接役立つことができる。

#### 【0027】

本発明の目的のための用語“機能性変異体”とは、本発明に従ったペプチドに機能的に関連している、即ち、グルカナーゼ活性を示すポリペプチドを意味していると理解されるべきである。変異体はまた、種々の酵母/酵母株または皮膚糸状菌、糸状菌のような他の感染性因子から誘導されるであろう（DHS系に従って）対立変異体またはポリペプチドも意味していると理解される。

#### 【0028】

より広い意味において、それらは図2に示したようなアミノ酸配列を持つポリペプチドと配列相同性、特に約70%の、好適には約80%、特に約90%、とりわけ約95%の配列同一性を持つポリペプチドを意味していると理解されるべきである。この用語はまた、約1-60、好適には約1-30、特に約1-15、とりわけ約1-5アミノ酸の領域でのポリペプチドの欠損も含んでいる。例えば、最初のアミノ酸メチオニンは、これなしでもポリペプチドの機能はあまり変化しないので存在しなくてもよい。加えて、本発明に従った上記ポリペプチドを含む融合蛋白質もまた含まれ、融合蛋白質それ自身がグルカナーゼ機能を持つかまたは融合部分が分離した後にのみ特異的機能を獲得することが可能である。特に、これらには約1-200、好適には約1-150、特に約1-100、とりわけ約1-50アミノ酸の特に非ヒト配列を含んでいる融合蛋白質が含まれる。非ヒトペプチド配列の例は、原核生物ペプチド配列（例えば、大腸菌ガラクトシダーゼから）、またはいわゆるヒスチジントグ（例えば、Met-Ala-His6タグ）である。いわゆるヒスチジントグを持つ融合蛋白質は金属イオン含有カラムを通した（例えば、Ni<sup>2+</sup>-NTAカラムを通した）発現蛋白質の

精製に特に都合よく適している。"NTA"はキレーター ニトリロ三酢酸(Qiagen GmbH, Hilden)を示している。これに関して、本発明はまた、プロ蛋白質の意味で、またはより広い意味において、プレドラッグとしてマスクされている本発明に従ったポリペプチドも包含している。

#### 【0029】

本発明に従ったポリペプチドの一部は、例えば、抗体により特異的に認識できるエピトープに相当している。

本発明に従ったポリペプチドは当業者には一般的に知られている方法、例えば、すでに上で記載したような適切な発現系における、本発明による核酸の発現により製造される。正しく処理される、およびそれ故に生物学的に活性である蛋白質毒素の製造に適した宿主細胞は、排他的に真核生物生物体、好適には発芽酵母サッカロミセス セレビジエおよび分裂酵母シゾサッカロミセス ポムベ(Schizosaccharomyces pombe)である。

#### 【0030】

特に、上記のポリペプチドの一部は伝統的ペプチド合成(メリーフィールド技術)によっても合成できる。これらは抗血清を得るために特に適しており、本発明に従ったポリペプチドのさらに別の機能性変異体にたどり着くため、適切な遺伝子発現ライブラリーがそれでスクリーニングできる。

#### 【0031】

本発明のさらに別の主題は従って、本発明に従ったポリペプチドの製造法に関しており、ここで本発明による核酸は適切な宿主細胞中で発現され、必要なら単離される。

#### 【0032】

非常に特別に好適であるのは分裂酵母シゾサッカロミセス ポムベであり、なぜならこの酵素は本来ウィカルチンおよびチゴシン耐性であり、外来蛋白質の異種発現に繰り返して用いられて成功している[Giga-Hama & Kumagai (1997), "分裂酵母:シゾサッカロミセス ポムベにおける外来遺伝子発現", Springer Verlag]。実施例11に例示されているように、配列ID番号:1および2に従った毒素-コード化核酸は、例えば、

S. ポムベベクター pREPI [Maundrell (1990), J. Biol. Chem. 265: 10857 - 10864] 内へクローン化でき、そこでそれらは分裂酵母のチアミン制御 nmt1 プロモーターの転写調節下に存在している [ nmt = 'チアミンについてメッセージなし' ]。そのようなベクターで形質転換されている酵母は問題とする外来遺伝子を、酵母の培養培地中の各々のチアミン濃度の関数として発現する。もし望むなら、このことは、酵母に対して有毒である蛋白質を発現することが原則として可能になるように、外来蛋白質が産生される段階と酵母増殖段階が時間で分離されることを可能にする。 S. ポムベで異種として発現される毒素ウィカルチンおよびチゴシンの同時分泌およびかなりのより容易な精製を可能にするため、発現/分泌ベクター [ベクター pTZ / ; 実施例 11 参照] がすでに合成されており、それはウイルス K28 プレプロ毒素遺伝子の分泌およびプロセッシングシグナル [Schmitt & Tipper, 1995] を含んでいるため、読み枠内の下流に配置されている各々の外来蛋白質の有効な分泌を可能にしている。

#### 【0033】

本発明の別の主題は、本発明に従ったポリペプチドと特異的に反応する抗体に関しており、それは上記のポリペプチドの一部で可能であり、それ自身が免疫原性であるかまたは免疫原性であるように作製されるか、または例えば、ウシ血清アルブミンのような適切な担体へ結合させることによりその免疫原性が改良されている。

#### 【0034】

抗体はポリクローナルかまたはモノクローナルである。本発明の主題をまた構成するその製造は、例えば、哺乳動物（例えば、ウサギ）を本発明に従ったポリペプチドまたは上記のその一部で免疫することによる（もし適切であれば例えば、フロイントアジュバントおよび/または水酸化アルミニウムゲル存在下で）一般的に通例の方法により実施される（例えば、Diamond, B. A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344 を参照されたい）。免疫学的反応により動物に形成されたポリクローナル抗体は、続いて一般的に通例の方法により血液から容易に

単離でき、例えば、カラムクロマトグラフィーにより精製される。抗体をアフィニティ精製にかけるのが好適であり、ここでは例えば、問題とする抗原（チゴシンまたはウィカルチン）は自由に入手可能なCnBr-活性化セファロースマトリックスに共有結合で結合されており、それは各々の場合で毒素特異的である抗体を精製するために用いられる。

【0035】

モノクローナル抗体は例えば、Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) の既知の方法により製造できる。

【0036】

本発明の別の主題は、本発明による核酸または本発明に従ったポリペプチド（個々にまたは組み合わせて）および必要に応じ、適切な添加物または補助剤を含む薬剤製品（drug product）、および表皮、皮膚および皮下皮膚糸状菌症、粘膜の真菌症および全身性真菌症、特に好適にはカンジダ真菌症のような真菌症を処置するための薬剤製品の製造法であり、ここで本発明による核酸または本発明に従ったポリペプチドは医薬として受容可能な添加物および/または補助剤と一緒に処方される。

【0037】

実施例12は、株DSM12865により産生されおよび精製された毒素ウィカルチンは、比較のために試験されおよび真菌症の治療でしばしば用いられている局所抗真菌剤クロトリマゾールおよびミコナゾールよりも著しく強力な酵母に対する毒性を持っていることを例示している。

【0038】

本発明はまた、上記の意味において、DSM12864および/またはDSM12865から得ることができる抗真菌剤または蛋白質毒素および/または抗真菌的に活性な本発明に従ったポリペプチドを含んでいる薬剤製品にも関する。

【0039】

ヒト遺伝子治療での使用に適しているのは、特に、そのままの形の本発明による核酸または遺伝子治療で有効である上記ベクターの一つの形またはリポソーム

との複合体の形を含む薬剤製品である。

【0040】

適切な添加剤および/または補助剤の例は生理学的食塩水、安定化剤、プロテイナーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤などである。

本発明の別の主題は本発明による核酸、本発明に従ったポリペプチドまたは本発明に従った抗体、および、もし適切であれば、適切な添加物または補助剤を含む診断薬、および表皮、皮膚および皮下皮膚糸状菌症、粘膜の真菌症および全身性真菌症、特に好適にはカンジダ真菌症のような真菌症を診断するための診断薬の製造法であり、ここで本発明による核酸、本発明に従ったポリペプチドまたは本発明に従った抗体は適切な添加物および/または補助剤 ( a d j u v a n t s ) と混合される。

【0041】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応に基づいた ( 例えば、E P - 0 2 0 0 3 6 2 に従ったP C R 診断薬 ) または実施例 1 3 に非常に詳細に記載されているような、ノーザンおよび/またはサザンブロットに基づいた診断薬は、本発明の核酸により本発明に従って製造できる。これらの試験は本発明による核酸と相補的鎖、通常は対応するm R N A との特異的ハイブリダイゼーションに基づいている。本発明による核酸は、例えば、E P 0 0 6 3 8 7 9 に記載されているように修飾できる。好適には、本発明に従ったD N A 断片は適切な試薬、例えば、放射性標識 - P 3 2 - d A T P により、一般的に知られている方法で標識されるか、または非放射性ビオチン標識して提供され、好適には適切な膜 ( 例えば、セルロースまたはナイロン ) へ結合されている単離R N A とインキュベートされる。加えて、ハイブリダイゼーションおよび膜への結合に先立って、単離されたR N A を例えば、アガロースゲル電気泳動によりサイズに従って分離するのが都合がよい。もし各々の組織試料からの試験R N A 量が同一であれば、プローブにより特異的に標識されていたm R N A の量が決定できる。

【0042】

別の診断薬は本発明に従ったポリペプチドまたは前に非常に詳細に説明されているその免疫原性部分を含んでいる。好適には固体相、例えば、ニトロセルロー

すまたはナイロンへ結合されているポリペプチドまたはその一部は、インビトロで例えば抗体と反応できるようにするため、例えば血液のような試験されるべき体液と接触させることができる。抗体/ペプチド複合体は続いて例えば、標識抗-ヒト-IgGまたは抗-ヒト-IgM抗体により検出される。標識は、例えば、呈色反応を触媒するペルオキシダーゼのような酵素である。自己免疫抗体の存在および量は呈色反応により容易におよび迅速に決定できる。

【0043】

別の診断薬は本発明に従った抗体それ自身から成っている。これらの抗体は例えば、ヒト組織試料の問題とするポリペプチドの存在を容易におよび迅速に試験するのを可能にする。この場合、本発明に従った抗体は、例えば、上にすでに説明したような酵素で標識される。特異的抗体/ペプチド複合体はそれ故酵素的呈色反応により容易におよび迅速に検出できる。

【0044】

本発明の別の主題は、本発明による核酸および/または本発明に従ったポリペプチド、単独または組み合わせて、およびもし適切であれば適切な添加物または補助剤を含む殺菌剤、および有害な酵母および有害な真菌を抑制するための殺菌剤の製造法に関してあり、ここで本発明による核酸または本発明に従ったポリペプチドは農業的に受容可能な添加物および/または補助剤と一緒に処方される。

【0045】

すでに説明したように、本発明に従った蛋白質毒素を発現するトランスジェニック植物が好適な態様において発生される。従って本発明はまた、本発明に従ったポリペプチドおよび/または蛋白質毒素を含んでいるような植物細胞および本質的にトランスジェニック植物にも関する。

【0046】

本発明の別の主題はまた、本発明による核酸、本発明に従ったポリペプチドまたは本発明に従った抗体、および、もし適切であれば、適切な添加物または補助剤を含んでいる、例えば、阻害剤または促進剤のような機能性相互作用剤を同定するためのアッセイにも関する。

【0047】

機能性相互作用剤、特に感受性酵母細胞中で配列ID番号：2に従った蛋白質毒素チゴシンと相互作用するものを同定するために適したアッセイは、例えば、二-ハイブリッド系 (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286) である。このアッセイにおいて細胞 (例えば、酵母細胞) は、本発明に従ったポリペプチドおよび既知の蛋白質DNA結合ドメイン (例えば、大腸菌からのGal4またはLexA) を含んでいる融合蛋白質を発現する、および/または未知のポリペプチドおよび転写活性化ドメイン (例えば、Gal4、ヘルペスウイルスVP16またはB42) を含んでいる融合蛋白質を発現する一つまたはそれ以上の発現ベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクトされる。加えて、細胞はレポーター遺伝子 (例えば、大腸菌LacZ遺伝子、緑色蛍光蛋白質または酵母アミノ酸合成遺伝子His3またはLeu2) を含んでおり、そのレポーター遺伝子は、例えば、LexAプロモーター/オペレーターのような調節配列 (regulatory sequence) により、または酵母上流活性化配列 (UAS) により調節されている。未知のポリペプチドは、例えば、遺伝子ライブラリー (例えば、ヒト遺伝子ライブラリー) を起源とするDNA断片によりコード化されている。通常、cDNA遺伝子ライブラリーは最初説明した発現ベクターにより酵母中で生成され、そのためその後すぐにアッセイが実施できる。

#### 【0048】

酵母発現ベクターにおいて、例えば、本発明に従ったポリペプチドおよびLexA DNA結合ドメインが形質転換酵母中で発現されるように、本発明に従ったポリペプチドはLexA DNA結合ドメインをコード化している核酸上の機能性単位中にクローン化される。別の酵母発現ベクターにおいて、未知のポリペプチドおよびGal4転写活性化ドメインの融合蛋白質が形質転換酵母中で発現されるように、cDNA遺伝子ライブラリーのcDNA断片はGal4転写活性化ドメインをコード化している核酸上の機能性単位中にクローン化される。両方の発現ベクターで形質転換された酵母、例えばLeu2-、はさらにLeu2をコード化する核酸を含んでおり、それはLexAプロモーター/オペレーターにより調節されている。本発明に従ったポリペプチドおよび未知のポリペプチド間

で機能性相互作用が起こった場合、Gal4転写活性化ドメインはLexA DNA結合ドメインを通してLexAプロモーター/オペレーターへ結合し、LexAプロモーター/オペレーターを活性化してLeu2遺伝子を発現する。その結果、Leu2-酵母はロイシンを含んでいない最少培地上で増殖できる。

【0049】

アミノ酸生合成遺伝子の代わりにLacZまたは緑色蛍光蛋白質レポーター遺伝子を使用する場合、転写活性化は青または緑の蛍光を発するコロニーの形成により検出できる。しかしながら、青または緑の蛍光染色はまた分光光度計で、例えば、青色染色の場合は585nmで容易に定量もできる。

【0050】

この様式で、発現遺伝子ライブラリーは、本発明に従ったポリペプチドと相互作用するポリペプチドを容易におよび迅速にスクリーニングできる。発見された新規ポリペプチドは続いて単離でき、さらに特徴付けされる。

【0051】

2-ハイブリッド系の別の可能な使用は、本発明に従ったポリペプチドおよび既知または未知のポリペプチド間の相互作用に対して、例えば、化学物質のような他の物質により影響及ぼすことを含んでいる。このことはまた新規の有用性が高い活性成分を発見することを可能にし、それは化学的に合成できおよび治療薬として用いることができるかも知れない。本発明は従って、ポリペプチド様相互作用剤を発見するための方法を意図しているのみでなく、上記蛋白質/蛋白質複合体と相互作用できる物質を発見する方法にも拡大解釈される。そのようなペプチド様、および化学物質相互作用剤は本発明の目的には機能性相互作用剤と称され、それは阻害または促進作用を持つことができる。

【0052】

本発明の別の主題は、分泌された毒素のクロマトグラフィー的精製、例えば、限外濾過およびカチオン交換クロマトグラフィーおよび/またはラミネリン-セファロースおよび/またはマンノプロテイン-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィーを非常に容易にする合成培養培地(BAVC培地)から構成される培地での培養および培地内への蛋白質毒素の分泌による蛋白質毒素の製

造法に関する[実施例1および実施例の付録参照]。株DSM12865により産生および分泌されるウィカルチンの場合、1%の最終濃度で、植物由来(および容易に入手可能な) - 1, 3 - D - グルカン ラミナリンを培地に補給することにより毒素産生をさらに増加させることができる。実施例14に例示したように、培養培地へのラミナリンの添加はウィカルチン産生の誘導を導き、これは転写誘導が寄与していることがノーザン分析から認められた。

#### 【0053】

合成B培地が、DSM12864により分泌される毒素チゴシンを産生させるために使用できる[Radler et al., 1993参照]。

以下の実施例は本発明を例示することが意図されており、これらの実施例に本発明が制限されるものではない。

#### 【0054】

##### 実施例

#### 【0055】

##### 実施例1:

キラ酵母W・カリフォルニカ株3/57(DSM12865)の培養上清からの抗カンジダ毒素ウィカルチンの単離、濃縮および精製

感受性酵母に対するメチレンブルー寒天上の寒天拡散試験において、キラ酵母W・カリフォルニカ3/57により分泌されたキラ毒素ウィカルチンはpH 4.7および20で最適阻害作用を示した。合成液体培地において、キラ酵母W・カリフォルニカ株3/57はBAVC培地(pH 4.7)中で増殖させた場合に最大毒素産生を示した。毒素濃度を達成するため、キラ酵母は最初に5mlのYEPD培地中、30で振盪しながら24時間インキュベートし、次にそのすべてを200mlのBAVC培地に移し、再び20で48時間、振盪機(140rpm)上で培養した。各々2.5lのBAVC培地(5lのエrlenマイアーフラスコ中、pH 4.7)の4つの主培養物は第二の前培養液に植え付け(1%接種物)、穏やかに振盪しながら(60rpm)20で5日間インキュベートした。分泌されたキラ毒素を濃縮するため、細胞を含まない培養上清は、4および1バールの圧力でポリスルホン酸膜('EasyFlow'[F

a. Sartorius] ; 排除限界 10 kDa ) により 200 倍に濃縮して 50 ml の容量とした。そのようにして得られた濃縮物の低分子量化合物を除くためおよび脱塩するため、毒素は透析チューブ ( 排除限界 10 - 20 kDa ) 中、+ 4 で一夜、5 mMクエン酸/リン酸緩衝液 ( pH 4 . 7 ) に対して透析した。毒素濃縮液を保存するため、透析生成物は 0 . 2 μm の膜を通して濾過滅菌し、1 ml づつ - 20 で凍結した。

#### 【0056】

毒素活性は感受性指標酵母 サッカロミセス セレビジエ 192 . 2 d に対するメチレンブルー寒天 ( MBA ; pH 4 . 7 ) 上の寒天拡散試験で検出および標準化した。このためには、対数希釈した毒素濃縮液を 0 . 1 Mクエン酸/リン酸緩衝液 ( pH 4 . 7 ) で調製し、その 100 μl を、感受性指標酵母が接種されている (  $2 \times 10^5$  細胞 / ml ) MBA プレートに前もって開けられたくぼみ ( くぼみ直径 9 mm ) 中へピペティングした。プレートを 20 で 3 日間インキュベートした後、あきらかに認識できる阻害ゾーンを測定した。阻害ゾーン直径および毒素濃度の対数間の直線関係が存在することが明らかになった。  $1 \times 10^4$  単位 / ml の任意の毒素活性が 20 mm ( くぼみ直径で補正 ) の阻害ゾーン直径に割り当てられた。

#### 【0057】

濃縮ウィカルチンは Bioscale - S ( FPLC ) でのカチオン交換クロマトグラフィーかまたは植物由来 - 1 , 6 - D - グルカン プスツランが前もって結合されているエポキシ活性化 Sepharose - 6 B マトリックス ( Pharmacia ) でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製された。その比活性が 625 倍に濃縮されている毒素調製試料 ( 表 1 ) はゲル電気泳動的に純粋であり、SDS - PAGE ( 10 - 22 % 濃度勾配ゲル ) 後に約 37 kDa に単一バンドのみを示し、それはクーマシーブルー ( 蛋白質染色 ) および過ヨウ素酸 - シッフ染色 ( PAS ; 炭化水素染色 ) の両方で検出可能であった。陽性 PAS 染色は抗カンジダ毒素ウィカルチンの N - グリコシル化の可能性を示唆している。精製毒素のエンドグリコシダーゼ - H による処理により、ウィカルチンは約 3 kDa の N - グリコシドで結合された炭化水素残基を持っており、そのサ

イズはまた、酵母における蛋白質毒素中の単一グリコシル化部位を示唆している。脱グリコシル化ウィカルチンは著しく制限された毒性を示すので、ウィカルチンの炭化水素部分は感受性標的細胞への結合に多分必要とされ、毒素の生物活性に間接的に影響していることが推論できる。

表1：キラ酵母ウィリオプシス カリフォルニカの培養上清からのウィカルチン濃度〔UF、限外濾過〕

【0058】

【表1】

試料	容量 [ml]	総 蛋白質 [mg]	総毒素 活性 [E]	毒素 比活性 [E/mg]	活性 収率 [%]	精製 係数
培養 上清	10,000	24,600	$7.9 \times 10^5$	$3.2 \times 10^1$	100	1
UF 保持物	50	162	$6.3 \times 10^5$	$3.9 \times 10^3$	80	122
透析 凍結物	25	45.8	$3.1 \times 10^5$	$6.8 \times 10^3$	39	213
Bio-Scale S (カチオン 交換)	64	1.28	$2.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	3.2	625

【0059】

実施例2：

ウィカルチンのNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列の決定および酵素的 - 1, 3 - グルカナーゼ活性の検出

精製キラ毒素のN-末端アミノ酸の配列決定により最初の10のアミノ酸が決定された。図1に見られるように、ウィカルチンのN-末端は酵母サッカロミセス セレビジエのBGL2遺伝子によりコード化されているエンド - - 1,

3 - D - グルカナーゼのアミノ末端への著しい相同性を示した。

【0060】

ウィカルチンおよび B.g.1.2 の相同性が決定されたので、未精製毒素濃縮物および精製毒素試料中にグルカナーゼ活性が検出できるかいないかが調べられた。ウィカルチン試料において、基質として - 1 , 3 - D - グルカン ラミナリンを用いた酵素アッセイおよび基質として 4 - メチル - ウンベリフェリル - - D - グルコシド ( MUC ) を用いる蛍光アッセイの両方で明白な - 1 , 3 - D - グルカナーゼ活性が検出された ; また試験された - 1 , 6 - D - グルカン プスツランはウィカルチンにより加水分解されなかった。

【0061】

実施例 3 :

細胞壁グルカンの存在下および不存在下におけるウィカルチン処理酵母細胞の生存率 : 競合分析

YEPD液体培地 ( pH 4 . 7 ) 中、20 で  $1 \times 10^5$  U / ml の精製ウィカルチン存在下に増殖させた株 S . セレビジエ 192 . 2 d の感受性酵母細胞は図 2 に示された殺細胞速度論を示した。植物由来 - 1 , 6 - D - グルカン プスツランは毒素処理酵母細胞の生存率を著しく増加させることを可能にし、10 mg / ml の濃度で加えた場合にはウィカルチン毒性を完全になくした。プスツランと反対に、- 1 , 3 - D - グルカン ラミナリンは毒素処理酵母の生存率を増加できなかった ( 図 2 ) 。

【0062】

示された結果は、ウィカルチンの作用が酵母細胞壁の初期ドッキング部位 ( 毒素レセプター ) として働く - 1 , 6 - D - グルカンへの結合を必要とするという結論を可能にする。この結果に一致して、染色体 KRE 1 遺伝子座位の欠失を持つ酵母は毒素耐性を示すが、KRE 1 を運ぶエピソームベクターで形質転換した場合には毒素感受性を再び取り戻すことが示されている ( 図 3 ) 。 k r e 1 変異体における毒素耐性は著しく減少した - 1 , 6 - D - グルカン含量に基づいており、従って、致死的作用に必要とされる酵母細胞表面への毒素結合を減少させる。

## 【0063】

## 実施例4：

作用のスペクトルおよびウィカルチンの殺菌スペクトル

寒天拡散試験において、精製W.カリフォルニカ毒素ウィカルチンは表2に示した酵母に対して明白な毒性を示した。酵母カンジダ クルセイの3つの株を除いて、試験された22の臨床患者単離物のすべて、およびヒトに病原性である、カンジダ種のすべての他の対照株が高度に効率のいい様式でウィカルチンにより破壊された。総計で10の異なった属からの14の毒素感受性酵母種について、ウィカルチンは作用スペクトルを示し、それはキラー毒素としては異常に広範囲である。

表2：異なった属の病原性および非病原性酵母に対するウィカルチンの作用スペクトル。すべての株は精製ウィカルチンに対する寒天拡散試験(MBA; pH 4.7)で試験された。適用された毒素活性は $1 \times 10^6$  U/mlであった。株C.トロピカリス(患者番号541965)はホスピタルマインツ大学の医微生物学および衛生学部から入手した。

## 【0064】

## 【表2】

酵母株	表現型	阻害ゾーン 直径 [mm]
カンジダ アルビカンスATCC10231	S	11
C. グラブラータNCYC388	S	12
C. クルセイ185	R	0
C. トロピカリス患者番号541965	S	11
デバリオミセス ハンセニ223	S	16
ハンセニアスポラ ウバルムATCC64295	R	0
ハセガワエア ジャポニカ変種ベルサチリス191	R	0
クルイベロミセス ラクチスCBS2359/152	S	22
K. マルキシアヌスC8, 1	R	0
メツキニコウシア プルチエルリマK/31B6	S	8
ピチア アノマラ245	S	17
P. ファリノーサ258	R	0
P. ジャディニイ251	S	6
P. クルイベリATCC64301	R	0
P. メンブラネファシエンスNCYC333	R	0
サッカロミセス セレビジエ		
192. 2d	S	30
381	S	23
ATCC42017 (K1スーパーキラ)	S	19
NCYC738 (K2キラ)	S	14
452 (=NCYC1006)	S	16
サッカロミコデス ルドウィギイ240	R	0
シゾサッカロミセス ポンベCBS1042	R	0
スポロトリクス種1129	S	11
トルロスポラ デルブルエキ208	S	18
T. プレトリエンシス186	S	10
ヤロウシア リポリチカ271	S	8
チゴサッカロミセス バイリ412	S	23

## 【0065】

## 実施例5:

酵母W. カリフォルニカ株3/57 (DMS12865) のウィカルチンコード  
化WCT遺伝子のクローニング、配列決定および分子の特徴付け

ウィカルチンのN末端アミノ酸から出発し、同定およびクローニング、および

染色体に位置している毒素遺伝子WCTの分子生物学の特徴付けを導く特異的DNAオリゴヌクレオチドを発生させた。WCTのDNA配列（配列ID番号：1）は潜在的に309アミノ酸および34,017Daの計算分子量のN-グリコシル化蛋白質をコード化している単一の読み取り枠を示した。WCTコード化キラー毒素の作用の研究から、ウィカルチンは酵母に非常に有毒であり、その主たる標的は酵母に観察される細胞壁 - 1,3-D-グルカンである糖蛋白質であることが示された。その酵母および真菌に対する選択的毒性は、ウィカルチンが感受性標的細胞の細胞壁構造および/または完全性を破壊することに基づいており、このように最も敏感であるところで酵母を攻撃して最終的にそれらを殺す。

#### 【0066】

##### 実施例6：

##### キラー酵母Z . バイリ株412 (DSM12864) の培養上清からのウイルス毒素チゴシンの濃縮および精製

酵母Z . バイリ株412のウイルス - コード化キラー毒素チゴシンはRadler et . al . (1993) に記載されている方法によりキラー酵母の培養上清から単離され、限外濾過により濃縮され、最終的にアフィニティークロマトグラフィーにより精製された。本研究で開発されたチゴシンの一工程精製は、感受性酵母の細胞壁マンノプロテインへの毒素の天然の親和性を利用する。S . セレビジエ株192 . 2dから、Schmitt & Radler (1997) により記載されている方法により単離および部分精製されたマンノプロテインはエポキシ - 活性化セファロース - 6Bマトリックス (Pharmacia) へ共有結合で結合され、カラムクロマトグラフィーによる毒素精製のためのFPLCで用いられた。SDS - PAGE後、この様式で精製されている高度に生物活性なチゴシンは約10kDaの見かけの分子量を持つ単一の蛋白質バンドを示した（図4）。

#### 【0067】

##### 実施例7：

##### チゴシンの作用スペクトルおよび殺菌スペクトル

寒天拡散試験で決定された酵母Z . バイリ株412 (DSM12864) のウ

イルスチゴシン作用スペクトルは、病原性および非病原性酵母属を含んでおり、その中で、カンジダ アルビカンスおよびスポロトリクス シェンキはヒトおよび動物で重要な病原体であり、およびウスチラゴ マイジスおよびデバリオミセス ハンセニは農業および食品部門で重要な有害酵母である（表3）。

表3：異なった属の病原性および非病原性酵母へのチゴシンの作用スペクトル。  
すべての株は $1 \times 10^4$  U/mlの活性を持つチゴシン試料に対して、寒天拡散試験（MBA；pH4.5）で試験された。

【0068】

【表3】

チゴシン-感受性酵母	感度の相対的程度
サッカロミセス セレビジエ	++
カンジダ アルビカンス	+
カンジダ クルセイ	++
カンジダ グラブラータ	++
カンジダ ビニ	+
ハンセニアスポラ ウバルム	++
クルイベロミセス マルキシアヌス	+
メツキニコウエア プルチェルリマ	+
ウスチラゴ マイジス	++
デバリオミセス ハンセニ	++
ピチア アノマラ	++
ピチア ジャディニイ	+
ピチア メンブラネファシエンス	+
ヤロウエア リポリチカ	+
チゴサッカロミセス ルーキシ	++

【0069】

実施例8：

酵母Z：バイリ株412（DSM12864）のチゴシン-コード化ZBT遺伝子（ZBT）のクローニングおよび配列決定

キラー酵母Z：バイリ株412の毒素-コード化二本鎖RNAゲノムのcDN

Aは水酸化メチル水銀で変性された精製M-dsRNAを鋳型としておよび種々のヘキサヌクレオチドをプライマーとして使用し、Schmitt(1995)により記載されている方法と類似の方法により合成された。EcoRI-制限ベクターpUC18への結合、大腸菌での形質転換および同定された組換え体プラスミドの単離後、いくつかのcDNAクローンが単離され、配列決定された。チゴシン-コード化読み取り枠のcDNA配列(配列ID番号:2)は238アミノ酸の前駆体蛋白質(プロ毒素)の遺伝子情報を含んでおり、アミノ酸位置RR139に潜在的Kex2-エンドペプチダーゼ切断部位を運んでいる。生物活性チゴシン、その分子量(10kDa;99アミノ酸)およびN末端アミノ酸配列は精製されたチゴシンで決定されたデータと正確に一致した、はインビボで後期ゴルジ段階で起こるKex2-仲介プロ-チゴシン-プロセッシングにより形成される。

#### 【0070】

チゴシンの毒性のため、酵母S.セレビジエでのZBT-cDNAの異種発現は形質転換した酵母それ自身を自身の毒素により殺すことになる。ウイルスK28毒素の例で示されているように、分裂酵母は外来蛋白質の発現または分泌に特に適しているので、将来の目的は毒素耐性分裂酵母シゾサッカロミセス ポムベ 中での異種チゴシン発現であろう。

#### 【0071】

##### 実施例9:

##### トランスジェニック植物での毒素遺伝子WCTおよびZBTの発現

上記のキラ-毒素ウィカルチンおよびチゴシンは広い作用スペクトルを持っており、および植物病原性酵母および真菌を破壊するので、例えば、トウモロコシ病原体ウスチラゴ マイジスの感染に抵抗性を示すトランスジェニック植物を構築することが可能であろう。類似の実験はすでにタバコ植物で実施されており、それは、天然にはウイルスによりコード化されているU.マイジス キラ-毒素 KP4の異種発現により、問題とする蛋白質毒素を分泌することができ、ある種の病原性U.マイジス株から特異的に保護されている(Park et al., 1996; Kinal et al., 1995; Bevan, 1984)。

天然のアグロバクテリウム ツメファシエンストi プラスミドの修飾誘導体に基づいている、市販品として入手可能な形質転換系から出発し、我々がクローン化した毒素遺伝子 WCT および ZBT はいわゆる二方向性 pBI ベクター (CLONTECH) 内へクローン化でき、それらはトランスジェニック植物の発生に用いられる。この目的のためには、問題とする毒素遺伝子、WCT および ZBT、は強力なカリフラワーモザイクウイルスプロモーター (CaMV - P) の転写調節下に置かれる。構築されるべきベクターの構築は図5に示されている。

#### 【0072】

実施例10:

S. セレビジエにおける酵母W. カリフォルニカ3/57 (DSM12865) のウィカルチン - コード化WCT遺伝子の異種発現

酵母 S. セレビジエ において WCT 遺伝子を異種的に発現させるため、ウィカルチン - コード化 WCT 遺伝子は 930 bp EcoRI / SmaI 断片として 2 μベクター pYX242 (一般的に入手可能である) 内へクローン化された。得られたベクター pSTH2 (図6) は酵母トリオースリン酸異性化酵素プロモーター (TPI) の転写調節下にある毒素遺伝子を含んでおり、酵母 (S. セレビジエ) 内への形質転換後にウィカルチンの構成的発現を可能にしている。この様式で得られた酵母形質転換体の培養上清のゲル電気泳動による分析は、組換え体ウィカルチンが外部培地内へ分泌され、同種ウィカルチン (野生株 DSM12865) の -1, 3 - D - グルカナーゼ活性に相当する活性を持っていることを示した (図6)。

#### 【0073】

実施例11:

分裂酵母シゾサッカロミセス ポムベにおけるウィカルチンおよびチゴシンの異種発現実験

分裂酵母はウィカルチンおよびチゴシンへの耐性を示したので、両方とも無傷の細胞としておよび無細胞壁スフェロプラストとして、問題とする毒素の異種発現のための宿主として適している。組換え体毒素が分裂酵母により発現されるばかりでなく、同時に細胞内分泌経路に送り込まれて外部培地内へ分泌されること

を確実にするため、S. ポムベで機能的でありおよび酵母S. セレビジエのウイルスK28ブレプロ毒素遺伝子のcDNAから誘導された、分泌およびプロセッシングシグナル(S/P)を運ぶベクター(pTZ / ; 図7)が構築された [Schmitt, 1995; Schmitt & Tipper, 1995 参照]。分泌およびプロセッシングシグナルは下流読み枠に配置された異種蛋白質が分裂酵母中で小胞体内腔内へ持ち込まれ、酵母の分泌経路に送り込まれることを確実にする。S/P-領域のC-末端上に存在するKex2p切断部位は、酵母Kex2p-エンドペプチダーゼによる、後期ゴルジ区画中のその細胞内輸送担体からの所望の外来蛋白質の切断を受け、それは最終的に生物活性蛋白質(チゴシンおよび/またはウィカルチン)として外部培地内へ分泌されるであろう。

【0074】

実施例12:

精製ウィカルチンおよび局所抗真菌剤クロトリマゾールおよびミコナゾールの比較生物活性

精製ウィカルチンは広い作用スペクトルを持ち、またヒトに病原性である酵母および/または真菌を効果的に殺すので、抗真菌剤の候補として重要である。従って、ウィカルチンと現在広範囲に用いられている局所抗真菌剤クロトリマゾールおよびミコナゾールとの比較研究が実施された。第一に、酵母指標としてスポロトリックス(sporothrix)種に対するクロトリマゾールおよびミコナゾールの毒性効果がMBA寒天拡散試験が試された。この目的には、クロトリマゾールを10mg/mlの濃度でエタノール(96%)に溶解し;この保存溶液をddH<sub>2</sub>Oで希釈し、0.1から10mg/mlの濃度で100μlをMBA試験で使用した。10-50μg量のクロトリマゾールが用いられた場合、阻害ゾーンは12から32mmの間であった。ミコナゾールは100μg/mlのDMSO(100%)保存溶液を調製して使用され、スポロトリックス種に対する生物活性がMBA試験においてクロトリマゾールと同一の様式で試験された。バイオアッセイにおいて、0.08-0.3μgのミコナゾール使用は22から36mmの阻害ゾーンを生じた。10μgのクロトリマゾールおよび0.08μgのミコナゾールの生物活性が2μgの精製ウィカルチンの毒性に相当した。三

つの試験化合物の分子量に基づいた比較は、0.07ピコモルのみのウィカルチンが0.2ピコモルのミコナゾールおよび29ピコモルのクロトリマゾールと同一の活性であることを示している；従ってウィカルチンは非常に強力な抗真菌剤である（図8）。

#### 【0075】

##### 実施例13：

##### 遺伝子特異的DNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによる酵母W.カリフォルニカ3/57(DSM12865)のウィカルチン-コード化WCT遺伝子の検出

配列ID番号：1に従った核酸が続いてのサザンハイブリダイゼーションのためのウィカルチン特異的DNAプローブを発生させるのに使用できることを証明するため、DIG-標識930bpDNAプローブがベクターpSTH1内へクローン化されているWCT遺伝子の検出に用いられた。構築されたベクターpSTH1は、一般的に入手可能な原核生物クローニングベクターpBR322の誘導体を代表している。

#### 【0076】

図9に示されたアガロースゲル電気泳動および対応するサザンプロットは疑いなく核酸プローブがウィカルチン-コード化WCT遺伝子を検出するために使用できることを示している。

##### 実施例14：

##### -1,3-D-グルカンによる酵母ウィリオプシス カリフォルニカ3/57(DSM12865)ウィカルチン-コード化WCT遺伝子の転写誘導を検出するためのノーザンプロット分析

-1,3-D-グルカン-誘導WCT転写を検出するため、酵母株DSM12865を300mlのBAVC培地または0.03%の植物由来-1,3-D-グルカン ラミナリンを補給したBAVC培地中、穏やかに振盪しながら(60rpm)20で48時間増殖させ、異なった時間間隔後、総RNAを調製するために使用した。RNA単離の前に、すべての試料(10ml)は $1 \times 10^8$ 細胞/mlの同一細胞密度とし、変性アガロースホルムアルデヒドゲルでの電

気泳動により分離した。図10から観察されるように、非誘導条件下（補給なしのBAVC培地）およびラミナリン補給BAVC培地中の両方でWCT転写体の1100塩基サイズが検出された。グルカン添加なしでは、最大WCT発現は対数増殖期の終わりに達成された（19時間後）；増殖静止期では著しく弱いハイブリダイゼーションシグナルは減少した転写を示唆している。誘導培養条件下（ラミナリン存在下）、WCT転写体は10時間後に非誘導培養よりもより高い強度を示し、-1,3-D-グルカン添加によりウィカルチン-コード化WCT遺伝子の転写が誘導できるという結論が認められる。

実施例付表：

実施例で使用された培地および溶液：

a) B A V C 培地

グルコース	50 g / l
D, L - リンゴ酸	20 g / l
クエン酸三ナトリウム	0.5 g / l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5 g / l
MgSO <sub>4</sub>	1.0 g / l
CaCl <sub>2</sub>	0.5 g / l
ミオ - イノシトール	0.04 g / l
アミノ酸保存溶液 (10x)	200 ml / l
微量元素保存溶液 (100x)	10 ml / l
ビタミン保存溶液 (100x)	20 ml / l :

b) アミノ酸保存溶液 (10x)

アラニン	0.75 g / l
アルギニン-塩酸塩	3.5 g / l
アスパラギン酸	0.5 g / l
グルタミン酸	3 g / l
ヒスチジン-塩化物	0.2 g / l
メチオニン	0.4 g / l
セリン	0.5 g / l

スレオニン	2 g / l
トリプトファン	0.4 g / l
c) 微量元素保存溶液 (100x)	
ホウ酸	200 mg / l
FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O	200 mg / l
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	200 mg / l
AlCl <sub>3</sub>	200 mg / l
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	100 mg / l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	100 mg / l
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	100 mg / l
KI	100 mg / l
酒石酸水素カリウム	2 g / l
d) ビタミン保存溶液 (100x)	
4 - アミノ安息香酸	20 mg / l
ビオチン	2 mg / l
葉酸	2 mg / l
ニコチン酸	100 mg / l
塩酸ピリドキシン	100 mg / l
リボフラビン	50 mg / l
チアミン二塩酸塩	50 mg / l
D - パントテン酸カルシウム	100 mg / l

ビオチン：5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 50 ml 蒸留水に溶解

葉酸：50 ml の蒸留水に溶解し、数滴の希NaOHを添加

リボフラビン：加熱しながら500 ml の蒸留水および数滴のHClに溶解

残りのビタミンは少量の水に溶解できる。

BAVC培地のpHはKOHの添加によりpH4.7に調節した。

グルコースおよび保存溶液は別々に滅菌した。アミノ酸、ビタミンおよび微量元素保存溶液はバルブを解放して100 で20分滅菌し、続いてオートクレーブしたBAVC培地に加えられた。

本文で使用された略号：

【0077】

【表4】

WCT	ウィリオプシス カリフォルニカ毒素
ZBT	チゴサッカロミセス バイリ毒素
チゴシン	固有名；DSM12864からの分泌毒素
ウィカルチン	固有名；DSM12865からの分泌毒素

【0078】

寄託

本発明のために使用された以下の微生物は、特許手続きのための微生物寄託の国際承認についてのブダペスト条約の規定に応じた国際寄託所として承認されているDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) - Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Federal Republic of Germany、に寄託された。

(寄託番号；寄託日)：

ウィリオプシス カリフォルニカ株3/57 (DSM12865)；(09.06.1999)

チゴサッカロミセス バイリ株412 (DSM12864)；(09.06.1999)

【0079】

参考文献

Anaissie, E. (1992). 免疫無防備状態宿主における日和見真菌症：癌センターでの経験および総説. Clin. Infect. Dis. 14: 43-51.

Bevan, E. A. & M. Makower (1963). 酵母中のキラ-特性の生理学的基礎. Proc. Int. Congr. Genet. XI: 1202-1203.

- Bevan, M. (1984). 植物形質転換のための二成分アグロバクテリウムベクター. Nucl. Acids Res. 12: 8711 - 8720.
- Bussey, H. (1991). K1キラー毒素、酵母からの孔形成蛋白質. Mol. Microbiol. 5: 2339 - 2343.
- Cameron, M. L., Schell, W. A., Bruch, S., Bartlett, J. A., Waskin, H. A. & J. R. Perfect (1993). ヒト免疫不全ウイルスタイプIに対して血清陽性個体の治療および徴候に関連したカンジダ単離物のインビトロフルコナゾール耐性の相関. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 2449 - 2453.
- Chavenet, P., Lopez, J., Grappin, M., Bannin, A., Duomg, M., Waldner, A., Buisson, M., Camerlynck, P. & H. Portier (1994). 抗真菌薬に対するカンジダ単離物の感受性の横断的研究およびHIV - 感染患者におけるインビトロ - インビボ相関. AIDS 8: 945 - 950.
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D. & D. Y. Thomas (1991). K2キラー毒素遺伝子のcDNAの酵母における発現. Mol. Gen. Genet. 227: 127 - 136.
- Hanes, S. D., Burn, V. E., Strley, S. L., Tipper, D. J. & D. Y. Thomas (1986). 酵母キラープレプロ毒素遺伝子から誘導されたcDNAの発現: プロセッシングおよび免疫性の意味. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1675 - 1679.
- Hector, R. F. (1993). 医学的に重要な真菌の細胞壁に対して活性化化合物. Clin. Microbiol. Rev. 6: 1 - 21.
- Hodgson, V. J., Button, D. & G. M. Walker (1995). 酵母ウィリオプシス ムラキからの新規キラー毒素の抗 - カンジダ活性. Microbiol. 141: 2003 - 2012.

- Kinal, H., Park, C.M., Berry, J., Koltin, Y. & J.A. Bruenn (1995). トランスジェニックタバコ植物中のウイルス的にコード化された抗真菌毒素のプロセッシングおよび分泌：植物におけるKex2p経路の証拠. Plant Cell 7: 677 - 688.
- Klebl, F. & W. Tanner (1989). サッカロミセス セレビジエからの細胞壁エキソ - b - 1, 3 - グルカナーゼの分子クローニング. J. Bacteriol. 171: 6259 - 6264.
- Komijama, T., Shirai, T., Ohta, T., Urakami, H., Furuichi, Y. & Y. Ohta (1998). ウィリオプシス サツルムス変種サツルムスからのHYIキラー毒素、および抗生物質アクレアシンAおよびパウラカンジンBの作用特性. Biol. Pharm. Bull. 21: 1013 - 1019.
- Kurz, M.B. (1998). 新規抗真菌剤標的：将来の展望. ASM News 64: 31 - 39.
- Levy, J.A. (1993). ヒト免疫不全ウイルス感染の病因. Microbiol. Rev. 57: 183 - 289.
- Maenza, J.R., Keruly, J.C., Moore, R.D., Chaisson, R.E., Merz, W.G. & J.E. Gallant (1996). ヒト免疫不全ウイルス感染患者におけるフルコナゾール耐性カンジダ症の危険因子. J. Infect. Dis. 173: 219 - 225.
- McCracken, D.A., Martin, V.J., Stark, M.J.R. & P.L. Bolen (1994). 酵母ピチア アカシエにより産生される線状 - プラスミド - コード化毒素：特徴付けおよびクイベロミセス ラクチス毒素との比較. Microbiol. 140: 425 - 431.
- Meunier, F., Aoun, M. & N. Bitar (1992). 免疫無防備状態におけるカンジダ血症. Clin. Infect. Dis. 14: 120 - 125.
- Mrsa, V., Klebl, F. & W. Tanner (1993). サッカロミセス セレビジエBGL2遺伝子産物、細胞壁エンド - - 1, 3 - グルカ

ナーゼの精製および特徴付け. J. Bacteriol. 175: 2102 - 2106.

Neuhausen, F. & M. J. Schmitt (1996). サッカロミセス セレビジエにおける酵母チゴサッカロミセス バイリ毒素 - コード化キラーウイルスのトランスジェニック発現: 宿主の進化における " 潜在 " マイコウイルスの可能な機能についての遺伝子的証拠. : トランスジェニック生物および生物安全性: 水平的遺伝子導入、DNAの安定性および導入遺伝子の発現, Schmidt, E. R. & Th. Hankeln (編), 117 - 124, Springer-Verlag.

Park, C. M., Banerjee, N., Koltin, Y. & J. A. Bruenn (1996). ウスチラゴ マイジスはウイルス的にKP1キラー毒素をコード化している. Mol. Microbiol. 20: 957 - 963.

Park, C. M., Berry, J. O. & J. A. Bruenn (1996). トランスジェニックタバコ植物におけるウイルス的にコード化された抗真菌毒素の高レベル発現. Plant Mol. Biol. 30: 359 - 366.

Pfaller, M. A., Chalberg, J. R., Redding, S. W., Smith, J., Farinacci, G., Fothergill, A. W. & M. G. Rinaldi (1994). AIDSおよび口腔カンジダ症の患者からのカンジダ アルビカンスの口腔単離物間のフルコナゾール感受性および電気泳動的核型の変異. J. Clin. Microbiol. 32: 59 - 64.

Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G. & H. Hanel (1988). 真核生物系に対する酵母キラー毒素の影響. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1068 - 1069.

Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F. & G. Morace (1986). 酵母キラー毒素の潜在的治療効果. Mycopathology 96: 103 - 107.

- Radler, F., Herzberger, S., Schonig, I. & P. Schwarz (1993). チゴサッカロミセス バイリのキラーク株調査. J. Gen. Microbiol. 139: 495 - 500.
- Rex, J. H., Rinaldi, M. G. & M. A. Pfaller (1995). フルコナゾールに対するカンジダ種の耐性. Antimicrob. Agents Chemoth. 39: 1 - 8.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payion, M. A. & H. Bussey (1994). 酵母(1-6) - -グルカン生合成成分、Kre6pおよびSkn1pの特徴付け、およびPKC1経路および細胞外マトリックス集合間の遺伝子相互作用. J. Cell. Biol. 127: 567 - 579.
- Schmitt, M. J. & D. J. Tipper (1990). K28、サッカロミセス セレビジエの新規二本鎖RNAキラークウイルス. Mol. Cell Biol. 10: 4807 - 4815.
- Schmitt, M. J. & D. J. Tipper (1992). 酵母キラークウイルスK28からのLおよびM二本鎖RNAの維持および発現の遺伝子分析. Yeast 8: 373 - 384.
- Schmitt, M. J. & D. J. Tipper (1995). M28 dsRNAの配列: プレプロ毒素は / ヘテロダイマー蛋白質毒素へ加工される. Virology 213: 341 - 351.
- Schmitt, M. J. & F. Neuhausen (1994). 酵母チゴサッカロミセス バイリおよびハンセニアスポラ ウバルムにおけるキラーク毒素分泌二本鎖RNAマイコウイルス. J. Virol. 68: 1765 - 1772.
- Schmitt, M. J. & F. Radler (1987). サッカロミセス セレビジエ株28のキラーク毒素のための主レセプターとしての酵母細胞壁のマノプロテイン. J. Gen. Microbiol. 133: 3347 - 3354.
- Schmitt, M. J. & F. Radler (1988). サッカロミセス

- セレビジエにおけるキラ毒素K28のための細胞壁レセプターの分子構造 .  
J. Bacteriol. 170: 2192 - 2196 .
- Schmitt, M. J. & F. Radler (1995) . マイコウイルス  
および酵母 - キラ毒素は細胞生物学への洞察を可能にする . Forschun  
gsmagazin der Johannes Gutenberg - Uni  
versitat Mainz 2: 86 - 96 .
- Schmitt, M. J. & F. Radler (1996) . dsRNA - ウ  
イルスは酵母サッカロミセス中でキラ毒素をコード化している . BioEng  
ineering 2: 30 - 34 .
- Schmitt, M. J. & G. Schernikau (1997) . サッカ  
ロミセス セレビジエのcDNAに基づいたK1 / K2 / K28三重キラ株の  
構築 . Food Technol. Biotechnol. 35: 281 - 28  
5 .
- Schmitt, M. J. & P. Compain (1995) . サッカロミセ  
ス セレビジエのキラ毒素耐性kre12変異体: 二次K1膜レセプターの遺  
伝子的および生化学的証拠 . Arch. Microbiol. 164: 435 -  
443 .
- Schmitt, M. J. (1995) . 酵母におけるウイルスK28キラ毒  
素遺伝子cDNAコピーのクローニングおよび発現 . Mol. Gen. Gene  
t. 246: 236 - 246 .
- Schmitt, M. J. , Brendel, M. , Schwarz, R. &  
F. Radler (1989) . 酵母キラ毒素K28によるサッカロミセス  
セレビジエにおけるDNA合成阻害 . J. Gen. Microbiol. 135  
: 1529 - 1535 .
- Schmitt, M. J. , Klavehn, P. , Wang, J. , Scho  
nig, I. & D. J. Tipper (1996) . 酵母K28キラ毒素の  
作用様式についての細胞周期研究 . Microbiol. 142: 2655 - 2  
662 .
- Schmitt, M. J. , Poravou, O. , Trenz, K. & K.

- Rehfeldt (1997). 酵母ハンセニアスポラ ウバルムの抗カンジダ活性に關与する独特な二本鎖RNA. J. Virol. 71: 8852 - 8855.
- Schmitt, M. J., Poravou, O., Trenz, K. & K. Rehfeldt (1997). 酵母ハンセニアスポラ ウバルムの抗カンジダ活性に關与する独特な二本鎖RNA. J. Virol. 71: 8852 - 8855.
- Schruender, J., Meinhardt, F., Rohe, M. & J. Kamper (1994). 微生物における線状プラスミド - 遺伝原理および応用可能性. BioEngineering 10: 29 - 39.
- Tipper, D. J. & M. J. Schmitt (1991). 酵母dsRNAウイルス: 複製およびキラー表現型. Mol. Microbiol. 5: 2331 - 2338.
- Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glauser, M. P. & J. P. Chave (1993). HIV - 感染患者におけるカンジダ アルビカンスのインビトロ感受性とフルコナゾール耐性口咽頭カンジダ症間の相関. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 911 - 915.
- Walker, G. M., McLeod, A. H. & V. J. Hodgson (1995). キラー酵母および病原性真菌間の相互作用. FEMS Microbiol. Lett. 127: 213 - 222.
- Wickner, R. B. (1993). 二本鎖RNAウイルス複製およびパッケージング. J. Biol. Chem. 268: 3797 - 3800.
- Wingard, J. R. (1995). 腫瘍学患者における病原体としてのC. アルビカンス以外のカンジダ種の重要性. Clin. Infect. Dis. 20: 115 - 125.

【0080】

【最も重要な配列の簡単な説明】

配列ID番号: 1: 酵母ウィリオプシス カリフォルニカ株3/57のW

C T - コード化蛋白質毒素ウィカルチンのDNA配列および演繹されるアミノ酸配列。

配列ID番号：2：酵母Z.バイリのZBTコード化蛋白質毒素チゴシンのcDNA配列および演繹されるアミノ酸配列。

【配列表】

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

<120> Neue Antimycotika und Fungizide, Verfahren zu deren  
Herstellung und Verwendung

<130> 99F028

<140> 19930959.0

<141> 1999-07-05

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 930

<212> DNA

<213> *Williopsis californica*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(930)

<400> 1

atg cgt ttc act aca ctc gtt gcc ctc gca ggt gcc att tcc tca gtc	48
Met Arg Phe Thr Thr Leu Val Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ser Ser Val	
1 5 10 15	
cag gcc atc ggc caa cta gct ttt aac ttg ggt gtc aag gat aac tca	96
Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Phe Asn Leu Gly Val Lys Asp Asn Ser	
20 25 30	
ggt cag tgc aag act gcc tca gag tac aag gat gac ttg tct acc ctt	144
Gly Gln Cys Lys Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Asp Asp Leu Ser Thr Leu	
35 40 45	
tca ggc tac aca tct aag gtt aga gtc tac gct gcc tca gac tgt aac	192
Ser Gly Tyr Thr Ser Lys Val Arg Val Tyr Ala Ala Ser Asp Cys Asn	
50 55 60	
act ttg cag act ttg ggt cca gtt gtc gaa gag gct ggc ttc tca ttt	240
Thr Leu Gln Thr Leu Gly Pro Val Val Glu Glu Ala Gly Phe Ser Phe	
65 70 75 80	
ttc gtt ggt att tgg cca aac gat gat gct cac ttc cag gaa gag caa	288
Phe Val Gly Ile Trp Pro Asn Asp Asp Ala His Phe Gln Glu Glu Gln	

	85	90	95	
gac gct ttg aaa act tat ttg cca aag att aag aga tcc aca gtg gag				336
Asp Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Arg Ser Thr Val Glu				
	100	105	110	
gcc ttc act gtt ggt tct gag gcc ttg tat aga gat gat atg act gct				384
Ala Phe Thr Val Gly Ser Glu Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Met Thr Ala				
	115	120	125	
caa gag ttg gct gac aga atc aaa act att aga gag ttg gtt gcc act				432
Gln Glu Leu Ala Asp Arg Ile Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Ala Thr				
	130	135	140	
att gac gac tcc gaa ggt aac tca tat gct ggt att cca gtt ggt ttc				480
Ile Asp Asp Ser Glu Gly Asn Ser Tyr Ala Gly Ile Pro Val Gly Phe				
	145	150	155	160
gtt gac tcc tgg aac gtt ttg gtt gat ggt gct tct cac cca gct att				528
Val Asp Ser Trp Asn Val Leu Val Asp Gly Ala Ser His Pro Ala Ile				
	165	170	175	
gtt gag gct gat gtt gtg ttc gcc aat gct ttc tct tac tgg caa ggt				576
Val Glu Ala Asp Val Val Phe Ala Asn Ala Phe Ser Tyr Trp Gln Gly				
	180	185	190	
cag act cag cag aac tcg tca tac tct ttc ttt gac gac att atg caa				624
Gln Thr Gln Gln Asn Ser Ser Tyr Ser Phe Phe Asp Asp Ile Met Gln				
	195	200	205	
gct ttg caa acc att caa act gct aag ggt gag aca gat atc act ttc				672
Ala Leu Gln Thr Ile Gln Thr Ala Lys Gly Glu Thr Asp Ile Thr Phe				
	210	215	220	
tgg gtt ggt gag acc ggc tgg cca acc gat ggt act cac ttt gaa gac				720
Trp Val Gly Glu Thr Gly Trp Pro Thr Asp Gly Thr His Phe Glu Asp				
	225	230	235	240
tct gtc cca tct gtt gag aat gct cag acc ttc tgg aaa gat gcc gtc				768
Ser Val Pro Ser Val Glu Asn Ala Gln Thr Phe Trp Lys Asp Ala Val				
	245	250	255	
tgt gcc att aga ggt tgg ggt atc aat gtt att gcc ttt gag gcc ttt				816
Cys Ala Ile Arg Gly Trp Gly Ile Asn Val Ile Ala Phe Glu Ala Phe				
	260	265	270	
gac gaa gct tgg aag cca gat acc tct ggt acc tct gat gtg gaa aag				864
Asp Glu Ala Trp Lys Pro Asp Thr Ser Gly Thr Ser Asp Val Glu Lys				

275	280	285	
tac tgg ggt gtt tgg gac tct aac agc aag ttg aag tat gat ttg tcc			912
Tyr Trp Gly Val Trp Asp Ser Asn Ser Lys Leu Lys Tyr Asp Leu Ser			
290	295	300	
tgt gac ttt acc tct tag			930
Cys Asp Phe Thr Ser			
305	310		
<210> 2			
<211> 309			
<212> PRT			
<213> Williopsis californica			
<400> 2			
Met Arg Phe Thr Thr Leu Val Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ser Ser Val			
1	5	10	15
Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Phe Asn Leu Gly Val Lys Asp Asn Ser			
20	25	30	
Gly Gln Cys Lys Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Asp Asp Leu Ser Thr Leu			
35	40	45	
Ser Gly Tyr Thr Ser Lys Val Arg Val Tyr Ala Ala Ser Asp Cys Asn			
50	55	60	
Thr Leu Gln Thr Leu Gly Pro Val Val Glu Glu Ala Gly Phe Ser Phe			
65	70	75	80
Phe Val Gly Ile Trp Pro Asn Asp Asp Ala His Phe Gln Glu Glu Gln			
85	90	95	
Asp Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Arg Ser Thr Val Glu			
100	105	110	
Ala Phe Thr Val Gly Ser Glu Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Met Thr Ala			
115	120	125	
Gln Glu Leu Ala Asp Arg Ile Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Ala Thr			
130	135	140	
Ile Asp Asp Ser Glu Gly Asn Ser Tyr Ala Gly Ile Pro Val Gly Phe			
145	150	155	160
Val Asp Ser Trp Asn Val Leu Val Asp Gly Ala Ser His Pro Ala Ile			



gaa tta aaa act gct ttt gga gat gaa gaa att ttt aca gat ttg acg	144
Glu Leu Lys Thr Ala Phe Gly Asp Glu Glu Ile Phe Thr Asp Leu Thr	
35 40 45	
tat cac att cac gtt aac gtc agt ggc gaa att gac tct tac tat cat	192
Tyr His Ile His Val Asn Val Ser Gly Glu Ile Asp Ser Tyr Tyr His	
50 55 60	
aat tta gtc aat ttt gtc gat aac gct cta gca aac aaa gat att aat	240
Asn Leu Val Asn Phe Val Asp Asn Ala Leu Ala Asn Lys Asp Ile Asn	
65 70 75 80	
aga tat ata tac gct ata ttt aca cag cag aca aac tat aca gag gat	288
Arg Tyr Ile Tyr Ala Ile Phe Thr Gln Gln Thr Asn Tyr Thr Glu Asp	
85 90 95	
ggg ctc att gag tac tta aat cat tac gat tca gag act tgc aaa gat	336
Gly Leu Ile Glu Tyr Leu Asn His Tyr Asp Ser Glu Thr Cys Lys Asp	
100 105 110	
atc att act cag tat aat gtt aac gta gac act agt aac tgt ata agc	384
Ile Ile Thr Gln Tyr Asn Val Asn Val Asp Thr Ser Asn Cys Ile Ser	
115 120 125	
aat act aca gat caa gct aga ctc caa cgt cgc gga ggg tgg gtg aac	432
Asn Thr Thr Asp Gln Ala Arg Leu Gln Arg Arg Gly Gly Trp Val Asn	
130 135 140	
cca cat tgt agt ggt gat aac tta gcc gat act agc gat tgt tgt aac	480
Pro His Cys Ser Gly Asp Asn Leu Ala Asp Thr Ser Asp Cys Cys Asn	
145 150 155 160	
ttg gct tat aac aag att aac ccc tct tca aac tta cag tca tgg aat	528
Leu Ala Tyr Asn Lys Ile Asn Pro Ser Ser Asn Leu Gln Ser Trp Asn	
165 170 175	
tat gtt gtc ggg cag tgt cac tat att tct cac gct aat gga aag gta	576
Tyr Val Val Gly Gln Cys His Tyr Ile Ser His Ala Asn Gly Lys Val	
180 185 190	
tgt agt ggt gct gac agg caa cag tta gct gaa aat gta tgt aac tgg	624
Cys Ser Gly Ala Asp Arg Gln Gln Leu Ala Glu Asn Val Cys Asn Trp	
195 200 205	
tgt cag gtt aac ggt ggt gtt agc gct ttt gct agc agt agt tct gca	672
Cys Gln Val Asn Gly Gly Val Ser Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ala	
210 215 220	

cat cca ggt gct tgc atg agt gat gta ggg ttc tgc tat gct tag 717  
 His Pro Gly Ala Cys Met Ser Asp Val Gly Phe Cys Tyr Ala  
 225 230 235

<210> 4  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> *Zygosaccharomyces bailii*

<400> 4  
 Met Lys Ala Ala Gln Ile Leu Thr Ala Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro  
 1 5 10 15

Ile Tyr Thr Ser Ala Arg Asn Ile Leu Asp Arg Glu Tyr Thr Ala Asn  
 20 25 30

Glu Leu Lys Thr Ala Phe Gly Asp Glu Glu Ile Phe Thr Asp Leu Thr  
 35 40 45

Tyr His Ile His Val Asn Val Ser Gly Glu Ile Asp Ser Tyr Tyr His  
 50 55 60

Asn Leu Val Asn Phe Val Asp Asn Ala Leu Ala Asn Lys Asp Ile Asn  
 65 70 75 80

Arg Tyr Ile Tyr Ala Ile Phe Thr Gln Gln Thr Asn Tyr Thr Glu Asp  
 85 90 95

Gly Leu Ile Glu Tyr Leu Asn His Tyr Asp Ser Glu Thr Cys Lys Asp  
 100 105 110

Ile Ile Thr Gln Tyr Asn Val Asn Val Asp Thr Ser Asn Cys Ile Ser  
 115 120 125

Asn Thr Thr Asp Gln Ala Arg Leu Gln Arg Arg Gly Gly Trp Val Asn  
 130 135 140

Pro His Cys Ser Gly Asp Asn Leu Ala Asp Thr Ser Asp Cys Cys Asn  
 145 150 155 160

Leu Ala Tyr Asn Lys Ile Asn Pro Ser Ser Asn Leu Gln Ser Trp Asn  
 165 170 175

Tyr Val Val Gly Gln Cys His Tyr Ile Ser His Ala Asn Gly Lys Val  
 180 185 190

Cys Ser Gly Ala Asp Arg Gln Gln Leu Ala Glu Asn Val Cys Asn Trp  
 195 200 205

Cys Gln Val Asn Gly Gly Val Ser Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala  
 210 215 220

His Pro Gly Ala Cys Met Ser Asp Val Gly Phe Cys Tyr Ala  
 225 230 235

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 W. カリフォルニカ毒素ウィカルチンおよび酵母 S. セレビジエ のエンド - 1, 3 - グルカナーゼ Bgl2 の N - 末端アミノ酸配列。亜配列の唯一の変位（そのほかは同一である）がボールドで示されている（Bgl2 は Klebl & Tanner, 1989 による）。

【図2】 - D - グルカン ラミナリン（L）およびプスツラン（P）存在下（2a）および不在下（2b）の、感受性酵母 S. セレビジエ 192.2d のウィカルチン - 処理細胞の殺菌速度論。用いられた毒素は  $4.2 \times 10^5$  U / mg の比活性、 $4.0 \times 10^5$  U / ml の総活性（total activity）を持っていた。

【図3】（a、b、c、d）酵母 S. セレビジエ の Kre+ および Kre- 株においてウィカルチン感受性 / 耐性を検出するための寒天拡散試験。KRE1 - 運搬ベクター pPGK [KRE1] によるウィカルチン - 耐性 kre1 ゼロ変異体 S. セレビジエ SEY6210 [kre1] の形質転換は完全にウィカルチン感受性を回復させる。

【図4】（A）マンノプロテイン - セファロースによるアフィニティークロマトグラフィー後、Z. バイリ 株 412（DSM12864）により産生および分泌されたチゴシンのゲル電気泳動（SDS - PAGE）による分析。（B）精製キラー毒素チゴシンの生物活性を検出するための寒天拡散試験。

【図5】 トランスジェニック植物発生のための ZBT - または WCT - 運搬発現ベクターの構築図。

[ 記号：RB、LB：アグロバクテリウム ツメファシエンス 天然 Ti - プラスミドの右および左境界配列；CaMV - P：カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター；NOS - P、NOS - T：ノパリンシンターゼ転写プロモーターおよびターミネーター；kanR：大腸菌での選択のためのストレプトコッカスカナマイシン耐性遺伝子；NPT - II：植物での選択のためのトランスポゾン Tn5 からのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 ]

【図6】（A）酵母 サッカロミセス セレビジエ 中のウィカルチン - コード化毒素遺伝子 WCT の異種発現のためのエピソームベクター pSTH2 の部分

制限地図。ベクター pSTH2 は、市販品として入手可能な 2  $\mu$  多コピーベクター pYX242 に基づいて構築され、その中へ株 DSM12865 からの WCT 遺伝子が 930 bp EcoRI / SmaI 断片としてクローン化されている。問題とする毒素遺伝子は酵母 TPI プロモーター転写調節下にあり、従って、S. セレビジエ 内へ形質転換後、ウィカルチンの強いおよび構成的な発現が可能である。

(B) 構築されたウィカルチン発現ベクター pSTH2 (レーン1) および基本ベクター pYX242 (レーン2) で形質転換後、S. セレビジエ の濃縮培養上清のゲル電気泳動による分析。S. セレビジエ で異種的に発現されたウィカルチンは矢印で示されている。

(C) ウィカルチン - 発現酵母ベクター pSTH2 で形質転換後の酵母 S. セレビジエ の細胞外 - 1, 3 - グルカナーゼ活性の検出。エキソ - 1, 3 - グルカナーゼ活性を決定するため、ロイシンを含まない SC 寒天上で増殖させた酵母コロニーに 0.04% の 4 - メチルウムベリフェリル - D - グルコシド (MUG) を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) を噴霧した。37  $^{\circ}$ C で 30 分インキュベーション後、寒天プレートを UV 光 (波長 254 nm) を照射した。グルカナーゼ活性は MUG 加水分解による蛍光で検出した。

[記号: 1 および 4、自身のプロモーター下でウィカルチン - コード化 WCT 遺伝子を発現するベクター (pEP - WCT) で形質転換した S. セレビジエ; 2、野生型酵母 W. カリフォルニカ 3 / 57 (DSM12865); 3、野生型酵母 W. カリフォルニカ 3 / 111; 基本ベクター pYX242 (毒素遺伝子を含んでいない) で形質転換した S. セレビジエ]

【図7】 分裂酵母 シゾサッカロミセス ポムベ における外来蛋白質 (特にウィカルチンおよびチゴシン) の異種発現および分泌のためのベクター pTZ / の構造図。

[記号: Pnmt1、Tnmt1、分裂酵母 S. ポムベ のチアミン制御 nmt1 遺伝子の転写プロモーターおよび転写ターミネーター; S/P、発芽酵母 S. セレビジエ のウイルス K28 プレプロ毒素の分泌およびプロセッシング配列; ars1、分裂酵母の染色体 1 からの自律性複製配列; leu2、ロイシン - 原栄養

性S. ポムベ形質転換体の選択のためのロイシン - 2 マーカー遺伝子]

【図8】 精製ウィカルチン、クロトリマゾールおよびミコナゾールの生物活性の比較；感受性指標酵母スポロトリクス種に対するバイオアッセイ（寒天拡散試験）において、示されているモル量は12mmの阻害ゾーン直径を生み出す。

【図9】 アガロースゲル電気泳動（A）およびDIG - 標識WCTプローブによるサザンハイブリダイゼーション（B）による、pSTH1（pBR322誘導体）内にクローン化した酵母W. カリフォルニカ3 / 57（DSM12865）のウィカルチン - コード化WCT遺伝子の検出。

[記号：M、DIG - 標識DNAサイズ標品II；レーン1、EcoRIおよびSaIで制限されたpSTH1；レーン2、“スマートラダー”DNAマーカー]

【図10】 BAVC培地中での非誘導培養条件下（A）および0.03%ラミナリンを補給したBAVC培地中での誘導条件下における、酵母W. カリフォルニカ3 / 57（DSM12865）のウィカルチン - コード化WCT遺伝子転写誘導のノーザン分析。株DSM12865から単離された全RNAは変性アガロース/ホルムアルデヒドゲル中、一定電圧（7V/cm）での電気泳動により分離された。RNAはウィカルチン - 特異的、DIG - 標識DNAプローブ（630bp）に対してナイロン膜上でハイブリダイズされ、化学発光で検出された。

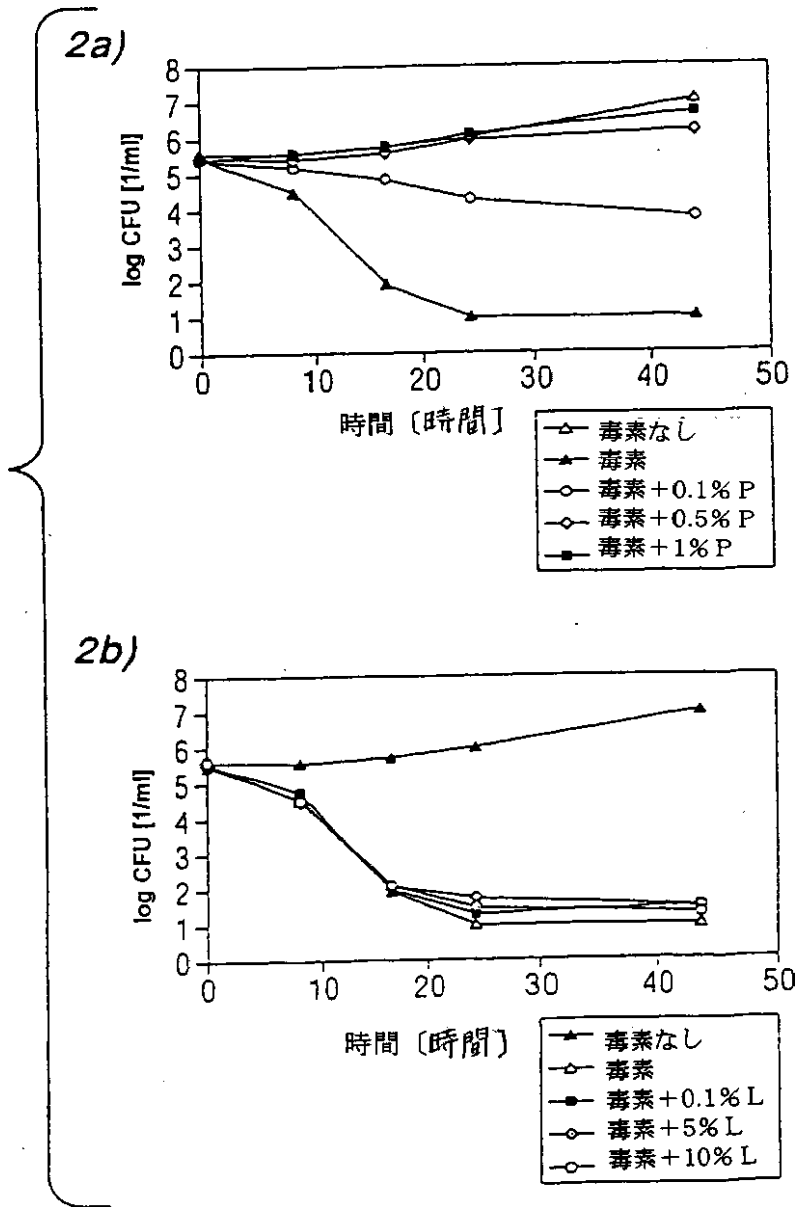
[記号：M、DIG - 標識RNAサイズ標品I；レーン1 - 8は単離された全RNAの試料採取時間に対応している：レーン1、10時間；レーン2、15時間；レーン3、19時間；レーン4、24時間；レーン5、33時間；レーン6、38時間；レーン7、43時間；レーン8、48時間]

【図1】

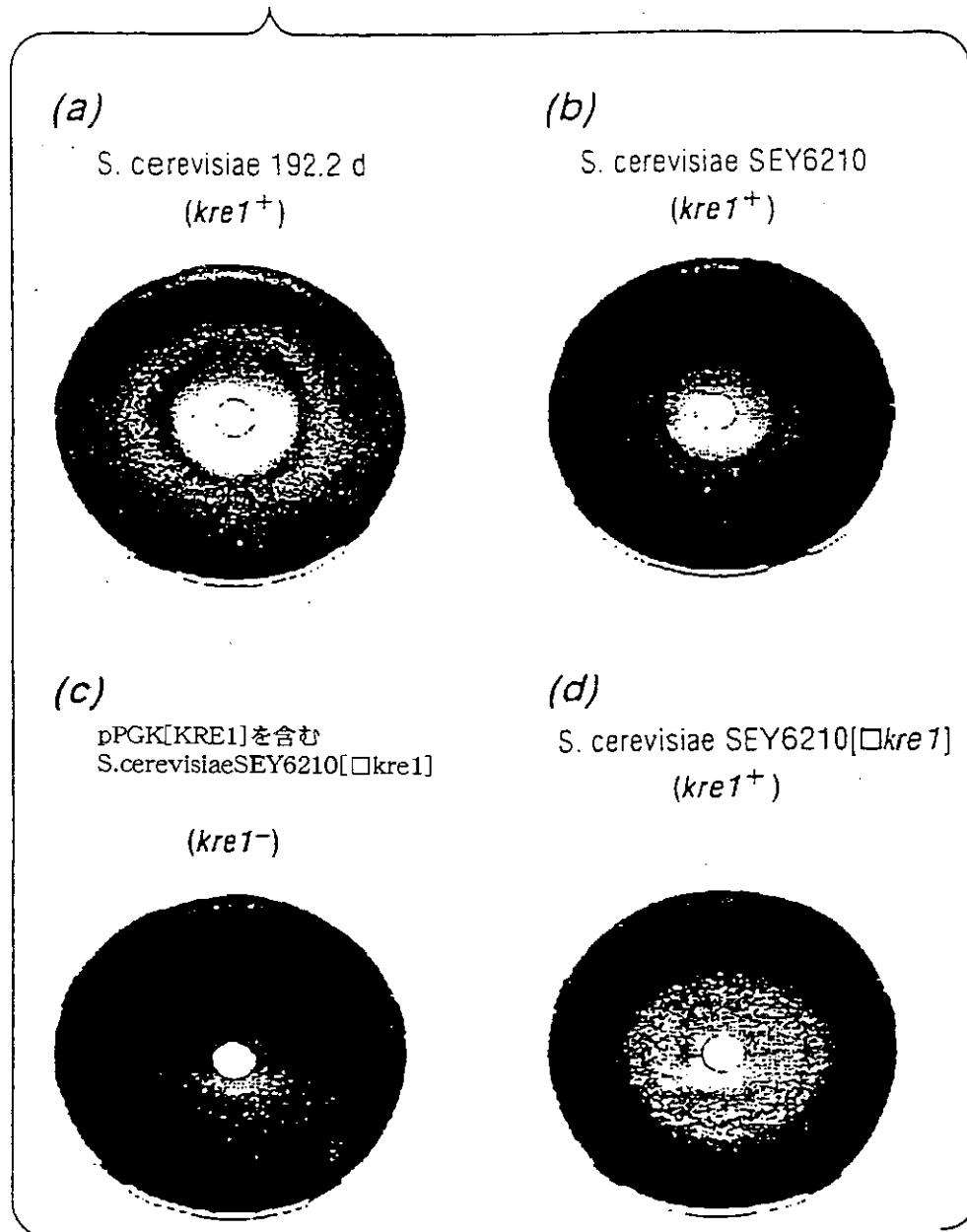
ウィカルチン: NH<sub>2</sub>-Ile-Gly-Gln-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....

Bgl2: NH<sub>2</sub>-Ile-Gly-Glu-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....

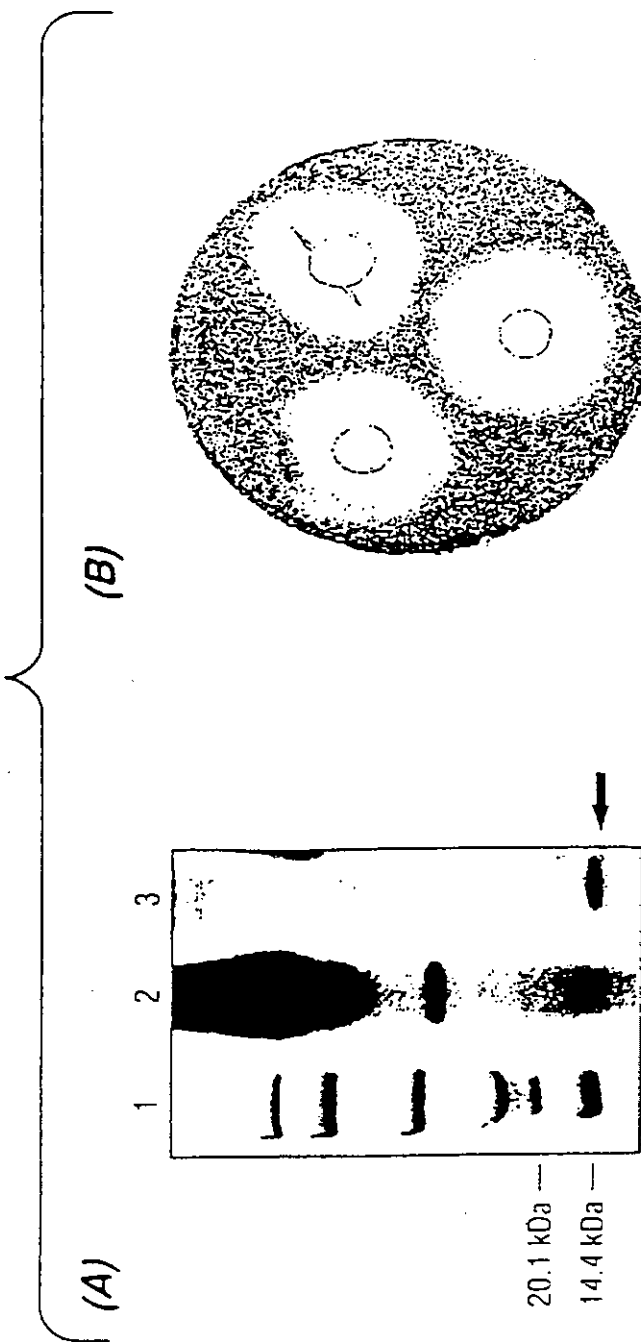
【図2】



【図3】



【図4】



(A)

マンノプロテイン-セファロースでのアフィニティークロマトグラフィー前および後のチゴシンのSDS-PAGE。チゴシンはマンノプロテインマトリックスで精製された。

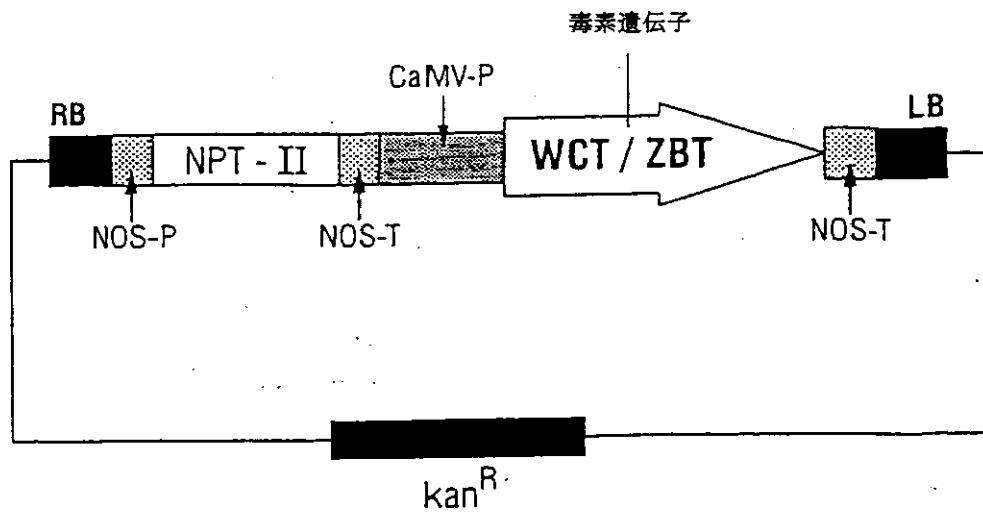
(1: LMWマーカー (Bio-Rad) ; 2: 溶出物 (蛋白質はマトリックスに結合されていない) ; 3: 溶出毒素

(B)

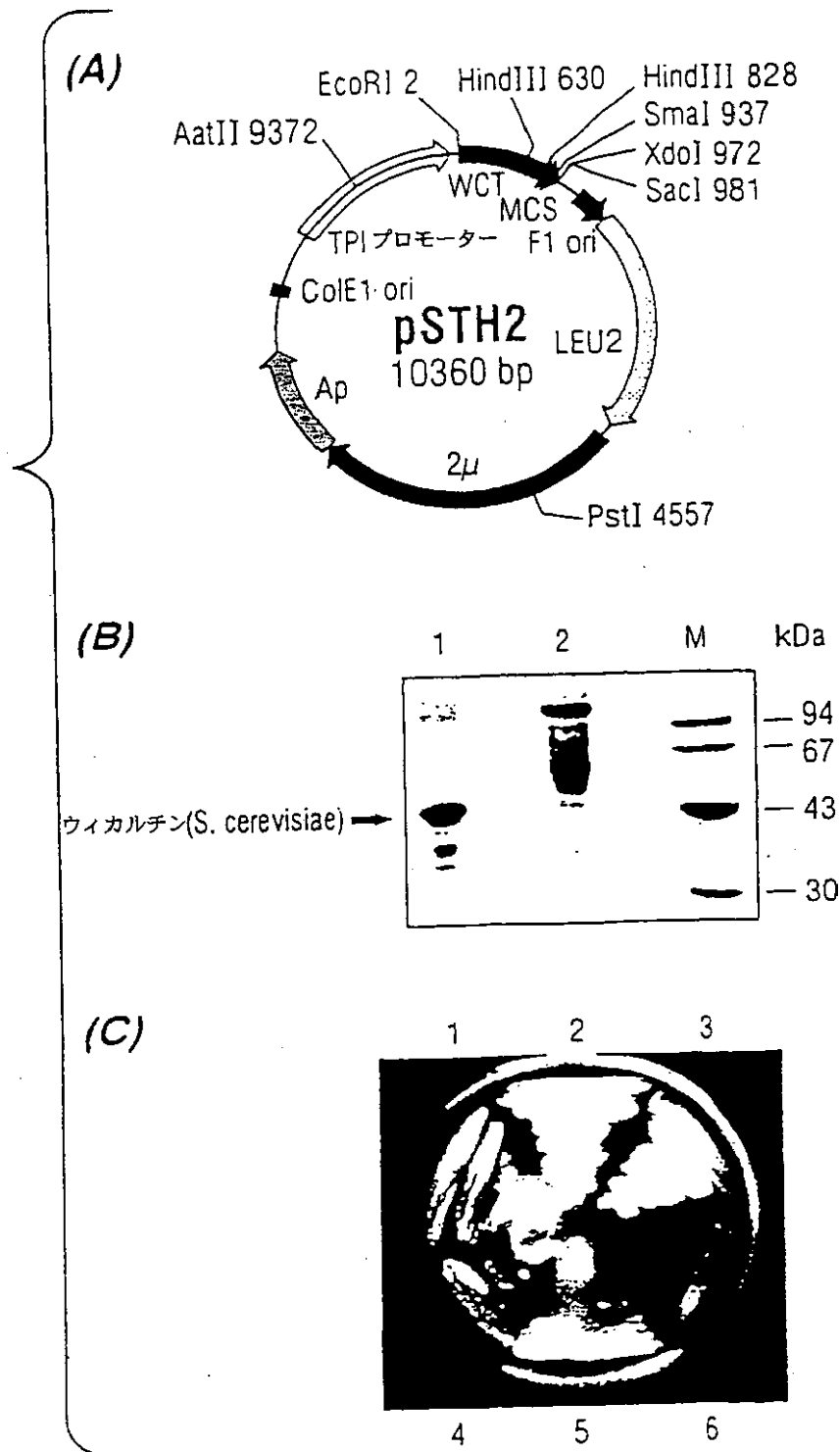
アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたチゴシンでのMBA試験、S. セレピジエ192. 2 dが感受性生物体として使用された。

A: 溶出物, 15倍濃縮; B: 溶出物, 透析したもの; C: 溶出物, 溶出緩衝液中

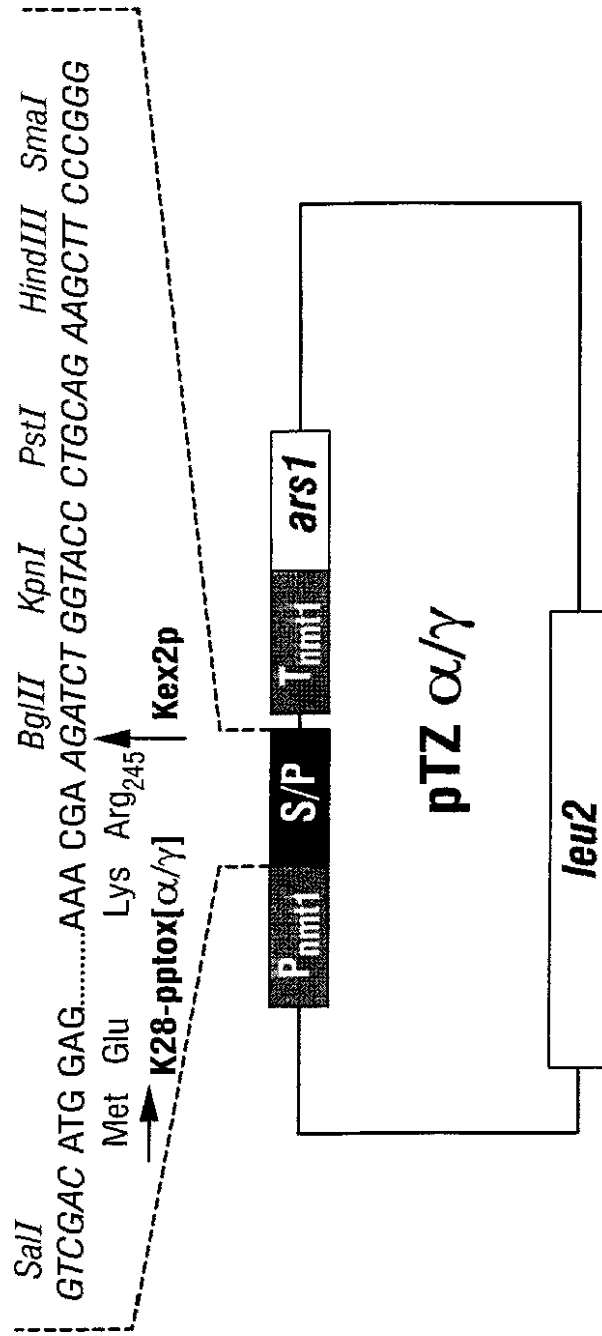
【図5】



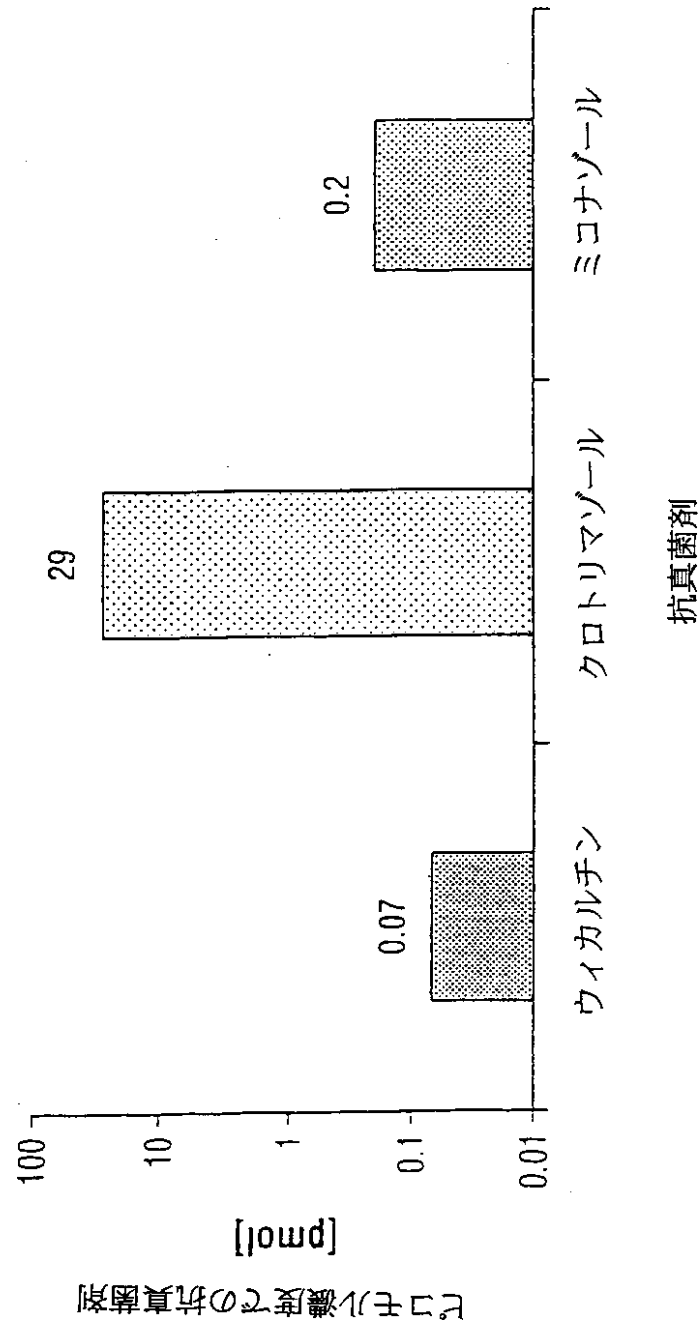
【図6】



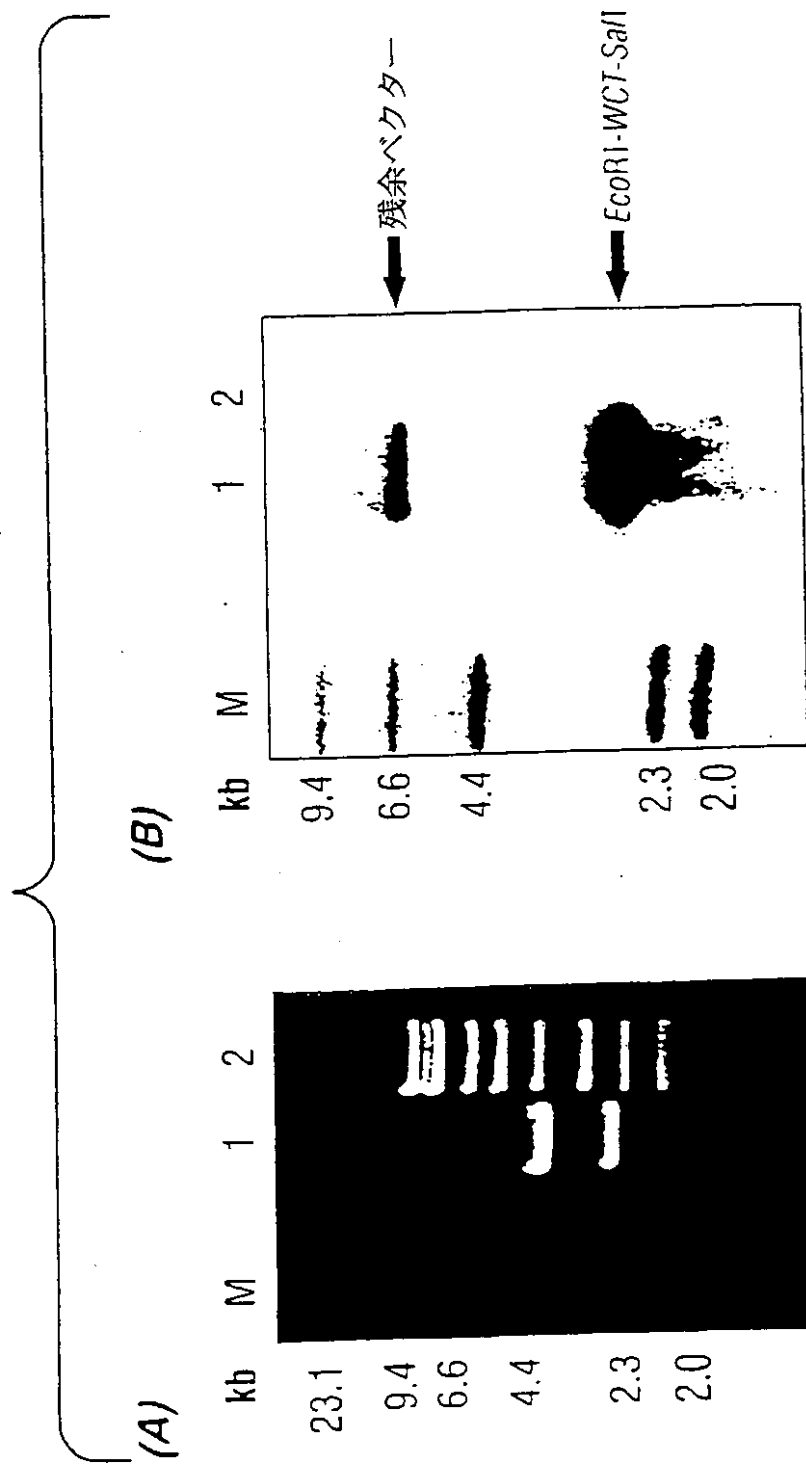
**Fig. 7**



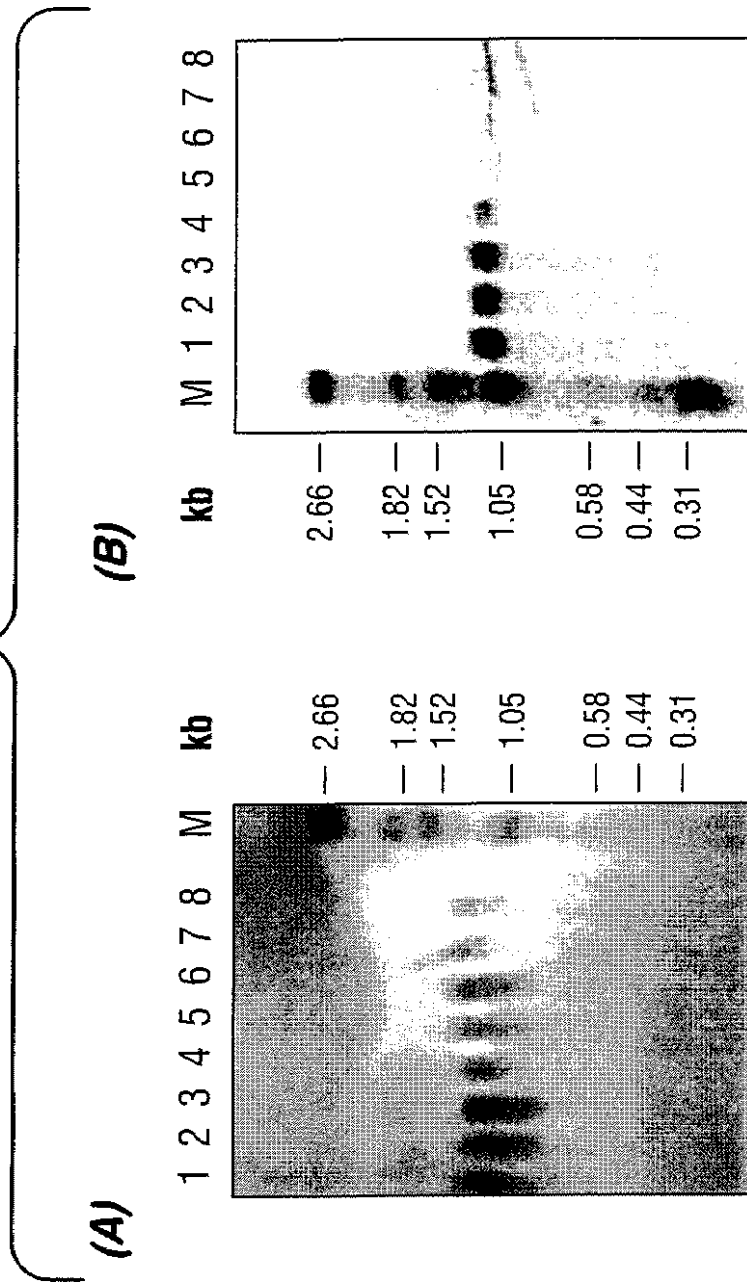
【図8】



【図9】



**Fig. 10**



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 00/04972
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7: C12N 15/56, C12N 9/24, C07K 16/40, C12N 1/16, C12Q 1/68, G01N 33/68, G01N 33/573, A61K 31/70, A61K 38/45, A61K 39/395, A01H 5/00 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) IPC 7: C12N, C07K, C12Q, G01N, A61K, A01H		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RADLER F. ET AL.: "Investigation of a killer strain of <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ." JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Vol. 139, Nr. 3, 1993, Pages 495-500, XP000952904 ISSN: 0022-1287 In the cited application	1-16, 19-23, 25
Y	The whole document	17, 18, 24, 26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2001 (12.01.01)	Date of mailing of the international search report 29 January 2001 (29.01.01)	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office	Authorized officer  Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/04972

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHMITT M. J. AND NEUHAUSEN F.: "Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeast <i>Hanseniaspora uvarum</i> and <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ." JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 68, Nr. 3, 1994, Pages 1765-1772, XP002157056 ISSN: 0022-538X in the cited application the whole document	1-16, 19-23, 25
Y	WALKER G. M. ET AL.: "INTERACTION BETWEEN KILLER YEASTS AND PATHOGENIC FUNGI" FEBS LETTERS, Vol. 127, Nr. 3, 01 April 1995 (01.04.95), Pages 213-222, XP000946950 ISSN: 0014-5793 the whole document	17, 18, 24
Y	EP 0 525 508 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 03 February 1993 (03.02.93) the whole document	26
A	MRSA V. ET AL.: "Purification and characterization of the <i>saccharomyces cerevisiae</i> BGL2 gene product, a cell wall endo-beta-1, 3-glucanase" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 175, Nr. 7, 01 April 1993 (01.04.93), Pages 2102-2106, XP002091793 ISSN: 0021-9193 In the cited application The whole document	1-24, 26
A	DATABASE EMBL 'Online' ACCESSION NUMBER AF091241, 29 September 1998 (29.09.98) LAURJNAVICHUTE D. K. ET AL.: "Candida utilis beta-1, 3 glucan transferase Bgl2p (BGL2) gene." XP002150657 Abstract	1-24, 26
A	SHAH D. M. ET AL.: "Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Vol. 13, Nr. 9, September 1995 (09.95), Pages 362-368, XP004207202 ISSN: 0167-7799 Page 365, right column, Paragraph 3	1-24, 26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/04972

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 670 706 A (CORNELISSEN BERNARDUS J C ET AL) 23 September 1997 (23.09.97) The whole document	26
A	US 5 783 183 A (LANGEVELD PIETER CORNELIS ET AL) 21 July 1998 (21.07.98) The whole document	1-24, 26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/04972

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/04972

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-26 (in part)

Protein toxins extracted from *Williopsis californica* characterized by SEQ ID 2; nucleic acid that codes therefor and characterized by SEQ ID 1, method for producing this nucleic acid and this protein toxin; antibody directed against this protein toxin and method for the production thereof; medicament containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; diagnostic reagent containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; test for identifying functional interactors containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin; use of this nucleic acid for identifying functional interactors and for discovering variants; use of this protein toxin for controlling harmful yeasts and fungi in foodstuffs and feedstuffs; method for cultivating DSM12864, and; use of this nucleic acid for producing transgenic plants and plant cells.

2. Claims Nos. 1-26 (in part)

Protein toxins extracted from *Zygosaccharomyces bailii* characterized by SEQ ID 4; nucleic acid that codes therefor and characterized by SEQ ID 3, method for producing this nucleic acid and this protein toxin; antibody directed against this protein toxin and method for the production thereof; medicament containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; diagnostic reagent containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; test for identifying functional interactors containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin; use of this nucleic acid for identifying functional interactors and for discovering variants; use of this protein toxin for controlling harmful yeasts and fungi in foodstuffs and feedstuffs; method for cultivating DSM12865, and; use of this nucleic acid for producing transgenic plants and plant cells.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/04972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0525508 A	03-02-1993	AU 2037892 A	21-01-1993
		BR 9202728 A	23-03-1993
		CA 2074113 A	20-01-1993
		HU 65851 A	28-07-1994
		JP 6092993 A	05-04-1994
		MX 9204211 A	01-04-1993
		ZA 9205382 A	17-01-1994
		US 5670706 A	23-09-1997
		AU 7003491 A	01-08-1991
		CA 2035134 A	31-07-1991
		EP 0440304 A	07-08-1991
		JP 8280283 A	29-10-1996
		US 6087560 A	11-07-2000
		AT 197815 T	15-12-2000
		DE 69132479 D	04-01-2001
		IE 910298 A	31-07-1991
		PT 96599 A, B	15-10-1991
		US 6066491 A	23-05-2000
US 5783183 A	21-07-1998	WO 9420620 A	15-09-1994
		EP 0643771 A	22-03-1995
		FI 945114 A	31-10-1994
		JP 7506729 T	27-07-1995

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	38/00 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 4
		48/00	R 4 B 0 6 5
	48/00	A 6 1 P 31/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P	31/10	C 0 7 K 14/39	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/39 16/14		4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/16 5/10	C 1 2 N 1/16	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P 21/02	A
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q 1/68	C
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N 33/53	A
			D
	33/566		M
//(C 1 2 P	21/02	C 1 2 R 1:865	
C 1 2 R	1:865)	1:645	
(C 1 2 P	21/02	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R	1:645)	5/00	C
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, BR, BY, CA, CN, CZ, HU, IL, IN, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, SG, SK, TR, UA, US, YU, ZA	A 6 1 K 37/02	
(72)発明者	テイセン, ズィモネ ドイツ連邦共和国デー - 70794 フィルダーストラドト - ボンランデン, クロイゼツカーシュトラーセ 29		
(72)発明者	ヴァイラー, フランク ドイツ連邦共和国デー - 66111 ザールブリュッケン, バイアーンシュトラーセ 18		
(72)発明者	シュミット, マンフレッド デンマーク国デー - 66386 ザイント・イングベルト, イン・デン・カストラー・レーデー 14		

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA17 CB03  
2B150 AC15 AC24 AC37 AD02 AD22  
DD12  
4B021 MC01 MC02 MK06 MK23  
4B024 AA01 AA05 AA08 AA10 AA11  
BA10 BA12 BA38 BA67 CA04  
DA01 DA12 EA04 FA02 FA06  
FA07 FA20 GA11 HA12  
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ53 QR32  
QR56 QS16 QS25 QS34  
4B064 AG30 CA05 CC24 DA02 DA10  
DA11 DA13  
4B065 AA72X AA72Y AA80X AA89X  
AB01 AC14 BA02 BB01 CA24  
CA29 CA31 CA41 CA43 CA44  
CA53  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01  
BA20 BA22 CA53 ZB32  
4C085 AA13 AA14 BB31 CC24 EE01  
4C087 AA01 BC83 ZB32  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA15  
DA75 DA83 EA29 EA52 FA73  
FA74

专利名称(译)	新型抗真菌剂和杀真菌剂，其生产和用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003504030A</a>	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2001508359	申请日	2000-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	阿温提斯研究技术两合公司		
申请(专利权)人(译)	安万特公司的研究UND技术有限公司UND岛卡格		
[标]发明人	レーフェルトクラウオズ テイセンズイモネ ヴァイラーフランク シュミットマンフレッド		
发明人	レーフェルト,クラウオズ テイセン,ズイモネ ヴァイラー,フランク シュミット,マンフレッド		
IPC分类号	A01H1/00 A23K1/16 A23L3/3571 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/10 C07K14/39 C07K16/14 C12N1/16 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/54 C12N15/56 C12P21/02 C12Q1/68 C12R1/865 G01N33/53 G01N33/566 C12R1/645		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/505 C07K14/39		
FI分类号	A01H1/00.A A23K1/16.304.B A23L3/3571 A61K35/76 A61K39/395.B A61K39/395.D A61K39/395.R A61K48/00 A61P31/10 C07K14/39 C07K16/14 C12N1/16.A C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12R1/865 C12R1/645 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.C A61K37/02		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AB03 2B030/AD08 2B030/CA17 2B030/CB03 2B150/AC15 2B150/AC24 2B150/AC37 2B150/AD02 2B150/AD22 2B150/DD12 4B021/MC01 4B021/MC02 4B021/MK06 4B021/MK23 4B024/AA01 4B024/AA05 4B024/AA08 4B024/AA10 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA12 4B024/BA38 4B024/BA67 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA07 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG30 4B064/CA05 4B064/CC24 4B064/DA02 4B064/DA10 4B064/DA11 4B064/DA13 4B065/AA72X 4B065/AA72Y 4B065/AA80X 4B065/AA89X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/CA24 4B065/CA29 4B065/CA31 4B065/CA41 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA53 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/ZB32 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC24 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/BC83 4C087/ZB32 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA15 4H045/DA75 4H045/DA83 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	19930959 1999-07-05 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及来自酵母的重组蛋白毒素的供应，即所谓的杀手酵母，其用于控制对人和植物致病的酵母和/或真菌，所述酵母和/或真菌是选择性的被杀死。高选择性使蛋白质毒素可用作抗真菌剂和/或杀菌剂。此外，此类蛋白毒素可用于作物保护。

試料	容量	総 蛋白質	総毒素 活性	毒素 比活性	活性 収率	精製 係数
	[ml]	[mg]	[E]	[E/mg]	[%]	
培養 上清	10,000	24,600	$7.9 \times 10^5$	$3.2 \times 10^1$	100	1
UF 保持物	50	162	$6.3 \times 10^5$	$3.9 \times 10^3$	80	122
透析 凍結物	25	45.8	$3.1 \times 10^5$	$6.8 \times 10^3$	39	213
Bio-Scale S (カチオン 交換)	64	1.28	$2.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	3.2	625