

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 11/00	4 B 0 2 4
45/00		27/02	4 B 0 5 0
A 6 1 P 11/00		27/16	4 B 0 6 5
27/02		31/04	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求（全 80数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000 - 616217(P2000 - 616217)	(71)出願人	スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ ション SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406 - 0 939、キング・オブ・プルシア、スウェード ランド・ロード709番
(86)(22)出願日	平成12年5月4日(2000.5.4)	(72)発明者	ジェイムズ・アール・ブラウン アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州バー ウィン、ロビンズ・レイン9番
(85)翻訳文提出日	平成13年11月2日(2001.11.2)	(74)代理人	弁理士 青山 葆 （外1名）
(86)国際出願番号	PCT/US00/12251		
(87)国際公開番号	W000/68243		
(87)国際公開日	平成12年11月16日(2000.11.16)		
(31)優先権主張番号	60/133,070		
(32)優先日	平成11年5月7日(1999.5.7)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , J P , U S		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 a r o Aの作用機構を用いる方法

(57)【要約】

本発明はa r o Aポリヌクレオチドおよびa r o Aポリ
ペプチドをコードするDNA（RNA）ならびに組換え
技法によりかかるポリペプチドを製造するための方法を
提供する。さらに、抗菌化合物をスクリーニングするの
に、a r o Aを利用する方法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(b) 寄託株のストレプトコッカス・ニューモニアエ中に含まれるaroA遺伝子により発現されるのと同じ成熟ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

(d) (a)、(b)または(c)のポリヌクレオチドに対して相捕的であるポリヌクレオチド；および

(e) (a)、(b)、(c)または(d)のポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続した塩基を含むポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項2】 ポリヌクレオチドがDNAである請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 ポリヌクレオチドがRNAである請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号：1に示す核酸配列を含む請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 配列番号：1に示すヌクレオチド1から1281までを含む請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 配列番号：2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項1のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項8】 請求項7のベクターを含む宿主細胞。

【請求項9】 請求項8の宿主細胞から上記DNAによりコードされているポリペプチドを発現させることを含む、ポリペプチドの製造方法。

【請求項10】 aroAポリペプチドまたはフラグメントの製造方法であ

って、該ポリペプチドまたはフラグメントの生成に十分な条件下で請求項8の宿主を培養することを含む方法。

【請求項11】 配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項12】 配列番号：2に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項13】 請求項11のポリペプチドに対する抗体。

【請求項14】 請求項11のポリペプチドの活性または発現を阻害するアンタゴニスト。

【請求項15】 治療上有効量の請求項11のポリペプチドを個体に投与することを含む、aroAポリペプチドを必要とする個体の治療方法。

【請求項16】 治療上有効量の請求項14のアンタゴニストを個体に投与することを含む、aroAポリペプチドの阻害を必要とする個体の治療方法。

【請求項17】 個体における請求項11のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断方法であって、

(a) 該ポリペプチドをコードしている核酸配列を決定すること、および／または

(b) 個体由来の試料中の該ポリペプチドの存在または量について分析することを含む方法。

【請求項18】 請求項11のポリペプチドと相互作用して、その活性を阻害または活性化する化合物の同定方法であって、

化合物とポリペプチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドを含む組成物とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供しうる第2の成分に関連したものである）、

次いで、化合物とポリペプチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在を検出することにより、化合物がポリペプチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法。

【請求項19】 哺乳動物における免疫学的応答を誘発する方法であって、抗体および/またはT細胞免疫応答を生じさせて動物を疾病から防御するのに十分な請求項11のa r o Aポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変種を哺乳動物に接種することを含む方法。

【請求項20】 哺乳動物における免疫学的応答を誘発する方法であって、抗体および/またはT細胞免疫応答を生じさせる免疫学的応答を誘発して該動物を疾病から防御するようにa r o Aポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変種をインビボで発現させるために、核酸ベクターを送達し、請求項11のa r o Aポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変種の発現を指令することを含む方法。

【請求項21】 配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストまたは活性化するアゴニストであって、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、

A r o Aとホスホ（エノール）ピルベートの結合、

A r o Aのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

A r o Aとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

A r o Aとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

A r o Aの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる拮抗阻害からなる群より選択される、アンタゴニストまたはアゴニスト。

【請求項22】 AroAポリペプチドの阻害または活性化を必要とする個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストまたは活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、

AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、

AroAのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、
AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、
AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不拮抗阻害、
AroAの順方向反応のEPSP対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、
AroAの順方向反応のEPSP対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対EPSPによる不拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPSPによる拮抗阻害、および
AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される、治療方法。

【請求項23】 細菌感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストまたは活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、
ユビキノンの合成、
ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPSPおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、
EPSPおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、
AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、
AroAのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結

合、

AroAとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる不拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される、治療方法。

【請求項24】 細菌がスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニューモニアエからなる群より選択される、請求項23記載の方法。

【請求項25】 AroAポリペプチドの阻害または活性化を必要とする個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、

AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、
AroAのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、
AroAとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、
AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、
AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、
AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不拮抗阻害、
AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、
AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる不拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、および
AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される、AroAの活性を阻害するアンタゴニスト、またはその活性を活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む、治療方法。

【請求項26】 細菌感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、

p - アミノベンゾエートの合成、
ユビキノンの合成、
ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、
EPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、

AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、
AroAのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、
AroAとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、
AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、
AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、
AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不拮抗阻害、
AroAの順方向反応のEPSP対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、
AroAの順方向反応のEPSP対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対EPSPによる不拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPSPによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される、AroAの活性を阻害するアンタゴニスト、またはその活性を活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む、治療方法。

【請求項27】 細菌がスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニューモニアエからなる群より選択される、請求項26記載の方法。

【請求項28】 細菌感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、AroAによるシキメート3 - ホスフェート基質利用の拮抗阻害剤である化合物を該個体に投与することを含む、治療方法。

【請求項29】 細菌がスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニュー

ーモニアエからなる群より選択される、請求項28記載の方法。

【請求項30】 化合物がAroAの活性部位に結合するかまたは相互作用し、またはシキメート3 - ホスフェートと相互作用するか、あるいはシキメート3 - ホスフェートの結合を妨げる、請求項28記載の方法。

【請求項31】 ストレプトコッカス・ニューモニアエ感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート3 - ホスフェート (S3P) のEPS Pおよび無機ホスフェート (Pi) への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート (Pi) のホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート3 - ホスフェート (S3P) への形質転換、

AroAとホスホ (エノール) ピルベートの結合、

AroAのホスホ (エノール) ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ (エノール) ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ (エノール) ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ (エノール) ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる不拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻

害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる拮抗阻害からなる群より選択される、ストレプトコッカス・ニューモニアエAroAの活性を阻害するアンタゴニスト、またはその活性を活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む、治療方法。

【請求項32】 配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストであって、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、

AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、

AroAのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPSPによる拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、
AroAの逆方向反応のシキメート3-ホスフェート対EPSPによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3-ホスフェート対Piによる拮抗阻害からなる群より選択される、アンタゴニスト。

【請求項33】 AroAポリペプチドの阻害を必要とする個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストを該個体に投与することを含む、ここでその活性が、

p-アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ(エノール)ピルベート(PEP)およびシキメート3-ホスフェート(S3P)のEPSPおよび無機ホスフェート(Pi)への形質転換、

EPSPおよび無機ホスフェート(Pi)のホスホ(エノール)ピルベート(PEP)およびシキメート3-ホスフェート(S3P)への形質転換、

AroAとホスホ(エノール)ピルベートの結合、

AroAのホスホ(エノール)ピルベート-ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ(エノール)ピルベート-ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3-ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ(エノール)ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3-ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPSP対ホスホ(エノール)ピルベートによる拮抗

阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる拮抗阻害からなる群より選択される、治療方法。

【請求項34】 AroAポリペプチドの活性を阻害する方法であって、該ポリペプチドを含む組成物を、AroAの活性を阻害する有効量のアンタゴニストと接触させることを含む、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート3 - ホスフェート (S3P) のEPS Pおよび無機ホスフェート (Pi) への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート (Pi) のホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート3 - ホスフェート (S3P) への形質転換、

AroAとホスホ (エノール) ピルベートの結合、

AroAのホスホ (エノール) ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ (エノール) ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ (エノール) ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ (エノール) ピルベートによる拮抗

阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる拮抗阻害からなる群より選択される、阻害方法。

【請求項35】 AroAの活性を阻害する方法であって、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート3 - ホスフェート (S3P) のEPS Pおよび無機ホスフェート (Pi) への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート (Pi) のホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート3 - ホスフェート (S3P) への形質転換、

AroAとホスホ (エノール) ピルベートの結合、

AroAのホスホ (エノール) ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ (エノール) ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ (エノール) ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ (エノール) ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる拮抗阻害からなる群より選択される、阻害方法。

【請求項36】 細菌がスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニューモニアエからなる群より選択される、請求項35記載の方法。

【請求項37】 細菌の増殖を阻害する方法であって、細菌を含む組成物を、AroAの活性を阻害する抗菌的に有効な量のアンタゴニストと接触させることを含む、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ(エノール)ピルベート(PEP)およびシキメート3 - ホスフェート(S3P)のEPS Pおよび無機ホスフェート(Pi)への形質転換、

EPS Pおよび無機ホスフェート(Pi)のホスホ(エノール)ピルベート(PEP)およびシキメート3 - ホスフェート(S3P)への形質転換、

AroAとホスホ(エノール)ピルベートの結合、

AroAのホスホ(エノール)ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ(エノール)ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ(エノール)ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不

拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPS対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPSによる不拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPSによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される、阻害方法。

【請求項38】 細菌がスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニューモニアエからなる群より選択される、請求項37記載の方法。

【請求項39】 AroAポリペプチドを阻害する方法であって、細菌を含む組成物を、AroAの活性を阻害する抗菌的に有効な量のアンタゴニストと接触させることを含む、ここでその活性が、

p - アミノベンゾエートの合成、

ユビキノンの合成、

ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）のEPSおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、

EPSおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3 - ホスフェート（S3P）への形質転換、

AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、

AroAのホスホ（エノール）ピルベート - ピルベートキナーゼ複合体への結合、

AroAとホスホ（エノール）ピルベート - ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、

AroAとシキメート3 - ホスフェートとの結合、

AroAの順方向反応のグリホサート対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3 - ホスフェートによる不拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPSP対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、

AroAの順方向反応のEPSP対シキメート3 - ホスフェートによる拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対EPSPによる不拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対EPSPによる拮抗阻害、および

AroAの逆方向反応のシキメート3 - ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される、阻害方法。

【請求項40】 細菌がスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニューモニアエからなる群より選択される、請求項39記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチドおよびポリペプチド、ならびにそれらの製造および使用、ならびにそれらの変種、アゴニストおよびアンタゴニスト、そしてそれらの使用に関する。詳細には、これらの点および他の点に関して、本発明は、aro(5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ)ファミリー(以下、「aroA」という)の新規ポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関する。

【0002】

(従来技術)

ストレプトコッカス属(Streptococci)は医学的に重要な微生物属を形成しており、ヒトにおいて、例えば中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、静脈洞炎、膿胸および心内膜炎、最も詳細には例えば脳脊髄液の感染のごとき髄膜炎を包含する、いくつかの型の疾患を引き起こすことが知られている。ストレプトコッカス属の単離から100年以上も経過しているため、ストレプトコッカス・ニューモニアエ(Streptococcus pneumoniae)は、より詳細な研究がなされた微生物の一つである。例えば、事実、DNAが遺伝物質であるという初期の見解の大部分は、この微生物を用いたグリフィスならびに、アベリー、マクレオドおよびマッカシーの研究において述べられた。ストレプトコッカス・ニューモニアエに関する研究は膨大であるにも関わらず、この微生物の毒性に関しては多くの疑問が残されている。抗生物質の開発のための標的としてストレプトコッカス属の遺伝子および遺伝子産物を用いるのはとりわけ好ましいことである。

ストレプトコッカス・ニューモニアエ感染の頻度は過去20年間に劇的に上昇している。これは多重抗生物質耐性株の出現、および免疫系が低下した人の集団の増加に起因している。いくつかのまたは全ての標準的な抗生物質に対して耐性を有するストレプトコッカス・ニューモニアエ株を単離することはもはやめずらしいことではない。この現象がこの生物に対する新しい抗菌剤、ワクチンおよび診断試験についての必要性を形成した。

明らかに、抗生物質活性について化合物をスクリーニングするのに有用であるという利益を有する、本発明の新規化合物などの因子に対する要求がある。かかる因子は、感染、機能不全および疾病の発生におけるそれらの役割を調べるのにも有用である。感染、機能不全または疾病の予防、改善または修正において役割を果たしうる、かかる因子ならびにそれらのアンタゴニストおよびアゴニストに対する要求もある。

本発明のポリペプチドは、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) の 5 - エノールピルボイルシキメート - 3 - ホスフェートシンターゼ (*aroA*) 蛋白に対するアミノ酸配列相同性を有する。

【0003】

(発明の開示)

表1 (配列番号: 2) に示すアミノ酸配列および既知アミノ酸配列またはラクトコッカス・ラクチスの 5 - エノールピルボイルシキメート - 3 - ホスフェートシンターゼ (*aroA*) 蛋白などの他の蛋白の配列の間の相同性により、新規 *aroA* ポリペプチドであると同定されたポリペプチドを提供することが本発明の目的である。

aroA ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、詳細には本明細書で *aroA* と命名されたポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを提供することが本発明のさらなる目的である。

本発明の特に好ましい具体例において、ポリヌクレオチドは、表1 (配列番号: 1) に示す配列を含む *aroA* ポリペプチドをコードする領域を含み、全長遺伝子またはその変種が包含される。

本発明のもう1つの特に好ましい具体例において、表1 (配列番号: 2) のアミノ酸配列を含むストレプトコッカス・ニューモニアエ由来の新規 *aroA* 蛋白、またはその変種がある。

本発明のもう1つの態様によれば、寄託株に含まれるストレプトコッカス・ニューモニアエ 0100993 株により発現可能な成熟ポリペプチドをコードしている単離核酸分子が提供される。

【0004】

本発明のさらなる態様は、a r o A、詳細にはストレプトコッカス・ニューモニアエのa r o Aをコードしている単離核酸分子を提供し、それにはm R N A、c D N A、ゲノムD N Aが包含される。本発明のさらなる具体例は、生物学的、診断学的、予防的、臨床的もしくは治療的に有用なその変種、およびそれらを含む組成物を包含する。

本発明のもう1つの態様によれば、治療または予防を目的とした、特に遺伝学的免疫を目的とした、本発明のポリヌクレオチドの使用が提供される。本発明の特に好ましい具体例には、a r o Aの天然に存在する対立遺伝子変種およびそれによりコードされるポリペプチドがある。

【0005】

本発明のもう1つの態様において、本明細書においてa r o Aと称されるストレプトコッカス・ニューモニアエの新規ポリペプチド、ならびに生物学的、診断学的、予防的、臨床的もしくは治療的に有用なそのフラグメント、変種および誘導体、および前記したフラグメントおよびアナログの変種および誘導体、およびそれらを含む組成物が提供される。

本発明の特に好ましい具体例には、a r o A遺伝子の天然に存在する対立遺伝子によりコードされるa r o Aポリペプチドの変種がある。

本発明の好ましい具体例において、上記のa r o Aポリペプチドの製造方法がある。

本発明のさらに別の態様によれば、例えば、抗体を含め、抗菌剤として有用なかかるポリペプチドの阻害剤が提供される。

【0006】

本発明の特定の好ましい具体例によれば、a r o A発現の評価、疾病の治療、例えば中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、静脈洞炎、膿胸および心内膜炎、最も詳細には例えば脳脊髄液の感染のごとき髄膜炎の治療、遺伝学的変異のアッセイ、ならびに細菌、特にストレプトコッカス・ニューモニアエ細菌に対する免疫学的応答を惹起するための生物へのa r o Aポリペプチドまたはポリヌクレオチドの投与のための、製品、組成物および方法が提供される。

本発明のこのおよび他の態様の特定の好ましい具体例によれば、特に、ストリ

ンジェントな条件下でa r o Aポリペプチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

本発明の特定の好ましい具体例において、a r o Aポリペプチドに対する抗体が提供される。

【0007】

本発明の他の具体例において、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合し、あるいは相互作用して、それらの活性を阻害または活性化する化合物の同定方法が提供される。該方法は、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の結合あるいは他の相互作用を可能にする条件下で、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドをスクリーニングすべき化合物と接触させて、化合物との結合あるいは他の相互作用を評価し（かかる結合または相互作用は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと化合物との結合あるいは相互作用に応答して検出可能なシグナルを提供することのできる第2の化合物に関連している）、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの結合または相互作用から生じるシグナルの存在または不存在を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドと結合し、あるいは相互作用して、それらの活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む。

【0008】

本発明のさらにもう1つの態様によれば、a r o Aのアゴニストおよびアンタゴニスト、好ましくは静菌性または殺菌性アゴニストおよびアンタゴニストが提供される。

本発明のさらなる態様において、単細胞または多細胞生物に投与するための、a r o Aポリヌクレオチドまたはa r o Aポリペプチドを含む組成物が提供される。

本発明は、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストまたは活性化するアゴニストを提供する。

【0009】

本明細書中、AroAまたは本発明のポリペプチドの活性を用いる、またはその活性に言及する方法において、該活性は、p-アミノベンゾエートの合成、ユビキノンの合成、ホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3-ホスフェート（S3P）のEPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）への形質転換、EPS Pおよび無機ホスフェート（Pi）のホスホ（エノール）ピルベート（PEP）およびシキメート3-ホスフェート（S3P）への形質転換、AroAとホスホ（エノール）ピルベートの結合、AroAとホスホ（エノール）ピルベート-ピルベートキナーゼ複合体との結合、AroAとホスホ（エノール）ピルベート-ラクテートデヒドロゲナーゼ複合体との結合、AroAとシキメート3-ホスフェートとの結合、AroAの順方向反応のグリホサート（「GLP」ともいう）対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、AroAの順方向反応のグリホサート対シキメート3-ホスフェートによる不拮抗阻害、AroAの順方向反応のEPS P対ホスホ（エノール）ピルベートによる拮抗阻害、AroAの順方向反応のEPS P対シキメート3-ホスフェートによる拮抗阻害、AroAの逆方向反応のグリホサート対EPS Pによる不拮抗阻害、AroAの逆方向反応のグリホサート対Piによる非拮抗阻害、AroAの逆方向反応のシキメート3-ホスフェート対EPS Pによる拮抗阻害、およびAroAの逆方向反応のシキメート3-ホスフェート対Piによる不拮抗阻害からなる群より選択される。

【0010】

さらには、本発明によれば、AroAポリペプチドの阻害または活性化を必要とする個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストまたは活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む方法が提供される。

また、細菌感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含

むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストまたは活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む方法が提供される。

【0011】

本発明のいずれの方法においても、細菌はスタフィロコッカス属の細菌、スタフィロコッカス・アウレウス、ストレプトコッカス属の細菌、およびストレプトコッカス・ニューモニアエからなる群より選択されることが好ましい。

さらに、本発明によれば、AroAポリペプチドの阻害または活性化を必要とする個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、AroAの活性を阻害するアンタゴニスト、またはその活性を活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む方法が提供される。

本発明はまた、細菌感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、AroAの活性を阻害するアンタゴニスト、またはその活性を活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む方法を提供する。

該方法はまた、細菌感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、AroAによるシキメート3-ホスフェート基質利用の拮抗阻害剤である化合物を該個体に投与することを含む方法を提供する。好ましい具体例において、アンタゴニストまたはアゴニストなどの本発明の化合物は、AroAの活性部位に結合するかまたは相互作用し、またはシキメート3-ホスフェートと相互作用するか、あるいはシキメート3-ホスフェートの結合を妨げる。

【0012】

ストレプトコッカス・ニューモニアエ感染した個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、ストレプトコッカス・ニューモニアエのAroAの活性を阻害するアンタゴニスト、またはその活性を活性化するアゴニストを該個体に投与することを含む方法も本発明によって提供される。

さらには、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストも提供される。

AroAポリペプチドの阻害を必要とする個体の治療方法であって、抗菌的に有効な量の、配列番号：2または4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、および配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニストを該個体に投与することを含む方法もまた、本発明によって提供される。

【0013】

その上さらに、AroAポリペプチドの活性を阻害する方法であって、該ポリペプチドを含む組成物を、AroAの活性を阻害する有効量のアンタゴニストと接触させることを含む方法も提供される。

本発明のもう一つ別の具体例は、細菌の増殖を阻害する方法であって、細菌を含む組成物を、AroAの活性を阻害する抗菌的に有効な量のアンタゴニストと接触させることを含む。

本発明のその上さらなる具体例は、AroAポリペプチドを阻害する方法であって、細菌を含む組成物を、AroAの活性を阻害する抗菌的に有効な量のアンタゴニストと接触させることを含む。

開示した本発明の精神および範囲内での種々の変更および修飾は、以下の記載を読むこと、および本明細書のその他の部分を読むことにより、当業者に容易に明らかとなろう。

【0014】

用語

以下の説明は、本明細書、とりわけ実施例において汎用される特定の用語の理解を容易にするために示すものである。

「身体的物質（複数でも可）」とは、個体から由来の、または生物感染、寄生または宿住個体から由来の、限定されるものではないが、細胞、組織および廃物、例えば、骨、血液、血清、脳脊髄液、精液、唾液、筋肉、軟骨、器官組織、皮膚、尿、糞または剖検物質を含む、いずれの物質をも意味する。

「疾患（複数でも可）」は、上気道感染（例えば、中耳炎、細菌性気管炎、急性咽頭蓋炎、甲状腺炎）、下気道感染（例えば、蓄膿症、肺膿瘍）、心臓感染（

例えば、感染性心内膜炎）、胃腸感染（例えば、分泌性下痢、脾臓膿瘍、腹膜後膿瘍）、CNS感染（例えば、大脳膿瘍）、眼感染（例えば、眼瞼炎、結膜炎、角膜炎、眼内炎、前中隔および眼窩蜂巣炎、涙嚢炎）、腎および尿管感染（例えば、副睾丸炎、腎内および腎周囲膿瘍、トキシックショック症候群）、皮膚感染（例えば、膿疱疹、毛囊炎、皮膚膿瘍、蜂巣炎、創傷感染、細菌性筋炎）、ならびに骨および関節感染（例えば、敗血症性関節炎、骨髄炎）などの疾患を含め、細菌による感染により引き起こされる、または該感染に関連する疾患をも意味する。

「宿主細胞」とは、外来性ポリヌクレオチド配列により、導入された（例えば、形質転換もしくはトランスフェクションされた）、または導入することのできる（例えば、形質転換またはトランスフェクションすることのできる）細胞である。

【0015】

当該分野にて周知であるように「同一性」は、配列を比較して測定されるような、二つまたはそれ以上のポリペプチド配列間または二つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列の間の関係である。当該分野において、「同一性」とはまた、時には、かかる配列の2つの鎖の間の合致により決定されるような2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の関連性の程度をも意味する。「同一性」は、以下に記載される既知方法により容易に算出できる（Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編、オックスフォード・ユニバーシティー・プレス、ニューヨーク、1988年；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1993年；Computer Analysis of Sequence Data, パートI, Griffin, A.M. および Griffin, H.G. 編、ヒューマナ・プレス、ニュージャージー、1994年；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., アカデミック・プレス、1987年；および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編、Mストックトン・プレス、ニューヨーク、1991年；および Carillo, H., および Lipman, D., SIAM J., Applied Math., 48: 1073 (1988) があるが、これらに限定されない）。同一性を決定するための好ましい方法は、試験する2つの配列間で最も良く

適合するように設計される。その上、同一性を測定する方法は、公に利用できるコンピュータプログラムに集成されている。二つの配列間の同一性を測定する好ましいコンピュータプログラム法は、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J.ら、Nucleic Acids Research 12 (1) : 387 (1984)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA (Atschul, S.F.ら、J.Molec.Biol. 215 : 403 (1990)) を包含するが、これらに限定されるものではない。BLAST XプログラムはNCBIおよび他の源 (BLAST Manual, Altschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD20894; Altschul, S.ら, J. Mol. Biol., 215 : 403 - 410 (1990)) から公に入手できる。また、周知のスミス・ウォーターマン (Smith Waterman) アルゴリズムを用いて同一性を測定することもできる。

【0016】

ポリペプチド配列を比較するためのパラメータは、以下のパラメータを包含する：アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch、J. Mol Biol. 48 : 443 - 453 (1970)

比較マトリックス：HentikoffおよびHentikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 - 10919 (1992) のBLOSSUM 62

ギャップ・ペナルティ：12

ギャップ・レングス・ペナルティ：4

これらのパラメータで有用なプログラムは、ウィスコンシン州、マジソン、Genetics Computer Groupより「gap」プログラムとして公に利用できる。前記したパラメータはペプチドを比較するための省略時 (default) パラメータ (エンドギャップにペナルティのない) である。

【0017】

ポリヌクレオチドを比較するためのパラメータは、以下のパラメータを包含する：アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch、J. Mol Biol. 48 : 443 - 453 (1970)

比較マトリックス：マッチ = +10、ミスマッチ = 0

ギャップ・ペナルティ：50

ギャップ・レングス・ペナルティ：3

ウィスコシン州、マジソン、Genetics Computer Groupより「gap」プログラムとして利用できる。これらは核酸を比較するための省略時パラメータである。

【0018】

場合によっては、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを「同定」するための好ましい手段は、以下の(1)および(2)で得られる。

(1) ポリヌクレオチドの具体例は、さらに、配列番号：1または3の対照配列と少なくとも95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を有してなる単離ポリヌクレオチドを包含する。ここで、該ポリヌクレオチド配列は配列番号：1または3の対照配列と同一であってもよく、あるいはその対照配列と比較した場合にある整数までの数のヌクレオチドが変わっていてもよく、その変形は、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、転位および転換を含む置換または挿入からなる群より選択され、かつその変形は、対照ヌクレオチド配列の5'または3'末端位置で、またはそれら末端位置の間のどこで起こってもよく、対照配列中のヌクレオチド間に個々に、または対照配列内の一またはそれ以上の隣接する基において点在してもよく、そのヌクレオチド変形の数、配列番号：1または3のヌクレオチドの総数に同一性のパーセントを100で割って定めた数を掛け、ついで配列番号：1または3のヌクレオチドの総数からこの積を減じることにより、あるいは、式：

【0019】

$$n_n - X_n - (X_n \cdot y)$$

[式中、 n_n はヌクレオチド変形の数であり、 X_n は配列番号：1または3のヌクレオチドの総数であり、 y は95%で0.95、97%で0.97または100%で1.00であり、 $\cdot$ は乗算オペレーターの記号であり、 X_n と y の積が整数でない場合、それを X_n から減ずる前に端数を切り捨て、最も近い整数にする]

により決定される。配列番号：2または4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の変形は、このコード配列にてノンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を形成し、それによりそのように変形したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが変化する。

【0020】

(2) ポリヌクレオチドの具体例は、さらに、配列番号：2または4のポリペプチドの対照配列と少なくとも95、97または100%の同一性を有するポリペプチドを有してなる単離ポリペプチドを包含する。ここで、該ポリペプチド配列は配列番号：2または4の対照配列と同一であってもよく、あるいはその対照配列と比較した場合にある整数までの数のアミノ酸が変わっていてもよく、その変形は、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、同類および非同類置換を含む置換または挿入からなる郡より選択され、かつその変形は、対照ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシ末端位置で、またはそれら末端位置の間のどこで起こってもよく、対照配列中のアミノ酸間に個々に、または対照配列内の一またはそれ以上の隣接する基において点在してもよく、そのアミノ酸変形の数、配列番号：2または4のアミノ酸の総数に同一性のパーセントを100で割って定めた数を掛け、ついで配列番号2のアミノ酸の総数からこの積を減じることにより、あるいは、式：

【0021】

$$n_a = X_a - (X_a \cdot y)$$

[式中、 n_a はアミノ酸変形の数であり、 X_a は配列番号：2または4のアミノ酸の総数であり、 y は95%で0.95、97%で0.97または100%で1.00であり、 $\cdot$ は乗算オペレーターの記号であり、 X_a と y の積が整数でない場合、それを X_a から減ずる前に端数を切り捨て、最も近い整数にする]
により決定される。

【0022】

「個体」とは、後生動物、哺乳動物、ウシ、サル、霊長類、ヒトを含むが、これに限定されない、多細胞真核生物を意味する。

「単離」とは、「人の手によって」天然の状態から変化させられた、すなわち、天然物の場合、その本来の環境から変化または除去あるいはその両方が行われたことを意味する。例えば、天然において生体に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離」されていないが、その天然状態で共存する物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書に用いる用語

としての「単離」がなされている。その上、形質転換、遺伝的操作により、あるいは他の組換え方法により生物中に導入されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、たとえ、それがその生物中にあり、その生物が生存あるいは死亡しているとしても、「単離」されている。

【0023】

「生物（複数でも可）」は、（i）*Streptococcus*、*Staphylococcus*、*Bordetella*、*Corynebacterium*、*Mycobacterium*、*Neisseria*、*Haemophilus*、*Actinomyces*、*Streptomyces*、*Nocardia*、*Enterobacter*、*Yersinia*、*Francisella*、*Pasteurella*、*Moraxella*、*Acinetobacter*、*Erysipelothrix*、*Branhamella*、*Actinobacillus*、*Streptobacillus*、*Listeria*、*Calymatobacterium*、*Brucella*、*Bacillus*、*Clostridium*、*Treponema*、*Escherichia*、*Salmonella*、*Klebsiella*、*Vibrio*、*Proteus*、*Erwinia*、*Borrelia*、*Leptospira*、*Spirillum*、*Campylobacter*、*Shigella*、*Legionella*、*Pseudomonas*、*Aeromonas*、*Rickettsia*、*Chlamydia*、*Borrelia*および*Mycoplasma*である属（これらに限らない）のメンバー、ならびにグループAの*Streptococcus*、グループBの*Streptococcus*、グループCの*Streptococcus*、グループDの*Streptococcus*、グループGの*Streptococcus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus faecium*、*Streptococcus durans*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Gardnerella vaginalis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium ulcerans*、*Mycobacterium leprae*、*Actinomyces israelii*、*Listeria monocytogenes*、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis*、*Bordetella bronchiseptica*、*Escherichia coli*、*Shigella dysenteriae*、*Haemophilus influenzae*、*Haemophilus aegyptius*、*Haemophilus parainfluenzae*、*Haemophilus ducreyi*、*Bordetella*、*Salmonella typhi*、*Citrobacter freundii*、*Proteus mirabilis*、*Proteus vulgaris*、*Yersinia pestis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia marcescens*、*Serratia liquefaciens*、*Vibrio cholerae*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Francisella tularensis*、*Brucella abortus*、*Bacillus anthracis*、*Ba*

cillus cereus、Clostridium perfringens、Clostridium tetani、Clostridium butulinum、Treponema pallidum、Rickettsia rickettsiiおよびChlamydia trachomatisである種またはグループ（これらに限らない）のメンバーを包含する原核生物、（ i i ）Archaeobacter（これに限らない）を包含する古細菌、および（ i i i ）原生動物、真菌類、Saccharomyces、KluveromycesまたはCandida属（これらに限らない）のメンバー、およびSaccharomyces cerevisiae、Kluveromyces lactisまたはCandida albicans種のメンバー（これらに限らない）を包含する単細胞または糸状真核生物を意味する。

【 0 0 2 4 】

細菌（複数でも可）」は、（ i ）Streptococcus、Staphylococcus、Bordetella、Corynebacterium、Mycobacterium、Neisseria、Haemophilus、Actinomyces、Streptomyces、Nocardia、Enterobacter、Yersinia、Fancisella、Pasteurella、Moraxella、Acinetobacter、Erysipelothrix、Branhamella、Actinobacillus、Streptobacillus、Listeria、Calymmatobacterium、Brucella、Bacillus、Clostridium、Treponema、Escherichia、Salmonella、Klebsiella、Vibrio、Proteus、Erwinia、Borrelia、Leptospira、Spirillum、Campylobacter、Shigella、Legionella、Pseudomonas、Aeromonas、Rickettsia、Chlamydia、BorreliaおよびMycoplasmaである属（これらに限らない）のメンバー、ならびにグループAのStreptococcus、グループBのStreptococcus、グループCのStreptococcus、グループDのStreptococcus、グループGのStreptococcus、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus pyogenes、Streptococcus agalactiae、Streptococcus faecalis、Streptococcus faecium、Streptococcus durans、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Corynebacterium diphtheriae、Gardnerella vaginalis、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium bovis、Mycobacterium ulcerans、Mycobacterium leprae、Actinomyces israelii、Listeria monocytogenes、Bordetella pertussis、Bordetella parapertussis、Bordetella bronchiseptica、Escherichia coli、Shigella dysenteriae、Haemophilus influenzae、Haemophilus aegyptius、Haemophilus parainfluenzae、Haemophilus ducreyi、Bordetella、Salmonella typhi、Ci

trobacter freundii、*Proteus mirabilis*、*Proteus vulgaris*、*Yersinia pestis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia marcescens*、*Serratia liquefaciens*、*Vibrio cholera*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Francisella tularensis*、*Brucella abortus*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Clostridium botulinum*、*Treponema pallidum*、*Rickettsia rickettsii*および*Chlamydia trachomatis*である種またはグループ（これらに限らない）のメンバーを包含する原核生物、および（ii）*Archaeobacter*（これに限らない）を包含する古細菌を意味する。

【0025】

「ポリヌクレオチド（複数でも可）」は、一般に、修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであってよい、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをも意味する。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物または一本鎖、二本鎖および三本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくはより典型的には二本鎖もしくは三本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であってもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を包含するがこれらに限らない。加えて、本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域を意味する。かかる領域における鎖は同一の分子または異なる分子由来のものでよい。この領域はこれらの分子の一つまたはそれ以上の全てを含んでいてもよいが、より典型的にはいくつかの分子の一領域のみを含む。三重らせん領域の分子の一つは、オリゴヌクレオチドであることが多い。本明細書で用いる場合、「ポリヌクレオチド」なる語は、一つまたはそれ以上の修飾した塩基を含有する、前記したDNAまたはRNAを包含する。このように、安定性または他の理由で修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも、本明細書が意図するところの「ポリヌクレオチド」である。さらに、イノシン等の普通でない塩基、またはトリチル化塩基等の修飾塩基を含むDNAまたはRNA（二つの例だけを示す）も、本明細書での用語ポリ

ペプチドである。当業者に既知の多くの有用な目的を提供するDNAおよびRNAに、非常に多くの修飾がなされていることは、明らかであろう。「ポリヌクレオチド」なる語は、本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチドのこのような化学的、酵素的または代謝的に修飾した形態、ならびにウイルス、とりわけ単純型細胞および複雑型細胞を含む、細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」は、しばしば、オリゴヌクレオチド（複数でも可）と称される短鎖ポリヌクレオチドを包含する。

【0026】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドまたは蛋白をいう。「ポリペプチド」は、当該分野で通常例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖、および多くの型があり、当該分野で一般的に蛋白と称する長鎖の両方を意味する。ポリペプチドは、遺伝子によりコードされる20種のアミノ酸以外のアミノ酸を含んでいてもよい。「ポリペプチド」は、プロセッシングおよび他の翻訳後修飾のような自然の工程により、ならびに化学修飾によるものを包含する。かかる修飾は基礎的なテキストおよびさらに詳細な論文ならびに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。同じタイプの修飾が所定のポリペプチドのいくつかの部位に同程度または種々の程度で存在してもよいことが理解されるであろう。また、所定のポリペプチドが多くの型の修飾を含んでいてもよい。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノもしくはカルボキシ末端を包含するポリペプチドのいずれの場所にあってもよい。修飾としては、例えば、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジリンシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋形成、シスチン形成、ピログルタミン酸塩形成、ホルミル化、ガンマー-カルボキシル化、糖鎖形成、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白加水分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などの転移

RNA媒介の蛋白へのアミノ酸付加、およびユビキチネーションがある。例えば、Proteins-Structure and Molecular Properties、第2版、T.E.Creighton、W. H.Freeman and Company、ニューヨーク(1993)に記載されている。例えば、Posttranslational Covalent Modification of Proteins、B.C.Johnson編、アカデミック・プレス、ニューヨーク(1983)のWold,F., Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects、1~12頁; Seifterら、Meth.Enzymol. 182: 626-646(1990)およびRattanら、Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62(1992)参照。ポリペプチドは分枝状あるいは分枝ありまたはなしの環状であってもよい。環状、分枝状、および分枝状かつ環状のポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスから生じるものであってもよく、同様に全く合成的な方法により製造されるものであってもよい。

【0027】

「組み換え発現系(複数でも可)」は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製造のために宿主細胞または宿主細胞溶解物中に導入または形質転換された発現系またはその部分または本発明のポリヌクレオチドをいう。

本明細書で用いる「変種」なる用語は、対照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは各々異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドであるが、本質的な特性は保持している。典型的なポリヌクレオチドの変種は、別の対照ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列の変化は、対照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させるものであってもよく、変化させないものであってもよい。以下に論じるように、ヌクレオチドの変化は結果的に、対照配列によりコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠失、融合および末端切断をもたらす。典型的なポリペプチドの変種は、別の対照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般に、差異は、対照ポリペプチドおよび変種の配列が、全体的に非常に類似しており、多くの領域で同一なものに限られる。変種および対照ポリペプチドは、1またはそれ以上の置換、付加、欠失が任意の組み合わせで起こることにより、アミノ酸配列が変化し得る。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝学的コードにより

コードされたものであってもなくてもよい。また本発明は、本発明の各ポリペプチドの変種、すなわち保存的アミノ酸置換により対象標準とは異なっており、そのことにより残基が同様の特性を有する別の残基に置換されているものを包含する。典型的なかかる置換は、A l a、V a l、L e uおよびI l e間；S e rおよびT h r間；酸性残基A s pおよびG l u間；A s nおよびG l n間；塩基性残基L y sおよびA r g間；あるいは芳香族残基P h eおよびT y r間のものである。数個、5～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸がいずれかの組み合わせで置換、欠失、または付加されている変種が特に好ましい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、対立遺伝子変種のような天然に存在するものであってもよく、または天然に存在することが知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変種は、変異誘発法または直接合成あるいは当業者に公知の他の組換え法によって作られてもよい。

【0028】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明は、とりわけ、次に極めて詳細に説明する、新規a r o Aポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。特に、本発明は、ラクトコッカス・ラクチスの5 - エノールピルボイルシキメート - 3 - ホスフェートシンターゼ (a r o A) ポリペプチドに対するアミノ酸配列相同性 (類似性79.673%、同一性68.224%) により関連付けられる、ストレプトコッカス・ニューモニアエの新規a r o Aのポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。本発明は、特に、それぞれ表1 (配列番号：1) および表1 (配列番号：2) に示すヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を有するa r o Aに関し、寄託株中のDNAのa r o Aヌクレオチド配列およびそれによりコードされるアミノ酸配列に関する。

【0029】

表1

a r o Aポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列

(A) ストレプトコッカス・ニューモニアエのa r o Aポリヌクレオチド配列由来の配列 [配列番号：1]

【0030】

【表1】

5'-ATGAACTAA AAACAAACAT TCGCCATTTA CATGGTATTA TCCGCGTCCCAGGTGACAAG
TCTATCAGCC ACCGTTCCAT TATCTTTGGA AGTTTGGCTG AGGGTGAGAC CAAGGTTTAT
GATATTCTGC GAGGTGAAGA CGTTCTTTTCGACCATGCAGG TTTTTCGTGA CCTTGGTGT
GAAATTGAGG ATAAAGATGG GGTATTACC GTTCAAGGTG TAGGCATGGC TGGCTTAAAA
GCGCCGCAA ATGCCCTTAA TATGGGAAAT TCTGGCACCT CGATTGCGCT GATTTTCAGGT
GTCCTTGCTG GTGCAGATTT CGAAGTAGAG ATGTTTGGAG ATGATAGTCT TTCCAAACGT
CCTATGGACC GTGTGACCT TCCACTGAAA AAAATGGGCG TCAGCATCTC AGGGCAAAC
GAACGAGACT TGCCTCCCT TCGCTTAAAA
GGGACGAAAA ACCTAAGACC TATTCATTAT GAGTTGCCAA TTGCCTCTGC CCAAGTCAAG
TCAGCCTTGA TGTTTGCAGC CTTACAAGCT AAGGGGGAGTCAGTTATTAT CGAAAAAGAG
TACACCCGTA ATCATACTGA AGATATGTTG CAACAATTTG GTGGTCATTT AAGTGTGGAT
GGTAAGAAAA TCACAGTCCA AGGGCCACAA AAATTGACAG GACAGAAGGT GGTGCTACCA
GGAGATATTT CCAGTGCAGC CTTTGGTTA GTCGCAGGTT TGATTGCTCC AAATTCTCGT
CTAGTGCTGC AGAATGTGGG GATAAACGAA ACTCGCACCG GTATTATTGATGTCATTCGT
GCCATGGGTG GAAAATTGGA AATAACTGAA ATCGATCCAG TCGCTAAATC TGCAACCTTG
ATTGTTGAGT CTTCTGACTT GAAAGGAACA GAGATTTGTG GCGCTTTGAT TCCACGTTTG
ATTGATGAAT TGCCTATTAT TGCCCTACTT GCGACCCAAG CCCAAGGTGT AACAGTTATC
AAGGATGCTG AGGAGCTCAA GGTCAAGGAA ACAGACCGTA TTCAGGTTGT GGCAGACGCC
TTAAATAGTA TGGGAGCAGA TATTACTCCT ACGGCAGATG GGATGATTAT CAAAGGAAAA
TCAGCTCTTC ACGGTGCTAG AGTCAATACG TTTGGTGACC ACCGTATCGG CATGATGACA
GCTATCGCAG CCTATTGGT TGCAGATGGAGAGGTGGAGC TTGACCGTGC AGAAGCCATC
AATACCAGCT ATCCTAGTTT CTTTGATGAT TTGGAGAGCT TGATTCATGG CTAA-3'

(B) この表中のポリヌクレオチド配列から推定される a r o A ポリペプチド配
列 [配列番号 : 2]

【表2】

NH₂-MKLKTNIRHL HGIIRVPGDK SISHRSIIFG SLAEGETKVY DILRGEDVLSTMQVFRDLGV
EIEDKDGvit VQGVGMAGLK APQNALNMGN SGTsIRLISGVLGADFEVE MFGDDSLSKR
PMDRVTLPLK KMGVSISGQT ERDLPLRLK GTKNLRPIHY ELPIASAQVK SALMFAALQA
KGESVIEKE YTRNHTEDMLQQFGGHLSD GKKITVQGPQ KLTGQKVVP GDISSAAFWL
VAGLIAPNSRLVLQNVGINE TRTGIIDVIR AMGGKLEITE IDPVAKSATL IVESSDLKGT
EICGALIPRL IDELPILALL ATQAQGVTVI KDAEELKVKE TDRIQVVADA LNSMGADITP
TADGMIKKGK SALHGARVNT FGDHRIGMMT AIAALLVADGEVELDRAEI NTSYPSFFDD
LESling-COOH

【0031】

(C) ポリヌクレオチド配列の具体例 [配列番号 : 1]

【表3】

$X-(R_1)_n$ -ATGAACTAA AAACAAACAT TCGCCATTTA CATGGTATTA
 TCCGCGTCCCAGGTGACAAG TCTATCAGCC ACCGTTCCAT TATCTTTGGA AGTTTGGCTG
 AGGGTGAGAC CAAGGTTTAT GATATTCTGC GAGGTGAAGA CGTTCTTTCGACCATGCAGG
 TTTTTCGTGA CCTTGGTGTG GAAATTGAGG ATAAAGATGG GGTTATTACC GTTCAAGGTG
 TAGGCATGGC TGGCTTAAAA GCGCCGCAA ATGCCCTTAA TATGGGAAAT TCTGGCACCT
 CGATTGCGCT GATTTGAGGT GTCCTTGCTG GTGCAGATTT CGAAGTAGAG ATGTTTGGAG
 ATGATAGTCT TTCCAAACGT CCTATGGACC GTGTGACCCT TCCACTGAAA AAAATGGGCG
 TCAGCATCTC AGGGCAAAC GAACGAGACT TGCCTCCCCCT TCGCTTAAAA
 GGGACGAAAA ACCTAAGACC TATTCATTAT GAGTTGCCAA TTGCCCTCTGC CCAAGTCAAG
 TCAGCCTTGA TGTTTGCAGC CTTACAAGCT AAGGGGGAGTCAGTTATTAT CGAAAAAGAG
 TACACCCGTA ATCATACTGA AGATATGTTG CAACAATTTG GTGGTCATTT AAGTGTGGAT
 GGTAAGAAAA TCACAGTCCA AGGGCCACAA AAATTGACAG GACAGAAGGT GGTCGTACCA
 GGAGATATTT CCAGTGCAGC CTTTTGGTTA GTCGCAGGTT TGATTGCTCC AAATTCTCGT
 CTAGTGCTGC AGAATGTGGG GATAAACGAA ACTCGCACCG GTATTATTGATGTCATTCTG
 GCCATGGGTG GAAAATTGGA AATAACTGAA ATCGATCCAG TCGCTAAATC TGCAACCTTG
 ATTGTTGAGT CTTCTGACTT GAAAGGAACA GAGATTTGTG GCGCTTTGAT T
 CCACGTTTG ATTGATGAAT TGCCTATTAT TGCCCTACTT GCGACCCAAG CCAAGGTGT
 AACAGTTATC AAGGATGCTG AGGAGCTCAA GGTCAAGGAA ACAGACCGTA TTCAGGTTGT
 GGCAGACGCC TTAAATAGTA TGGGAGCAGA TATTACTCCT ACGGCAGATG GGATGATTAT
 CAAAGGAAAA TCAGCTCTTC ACGGTGCTAG AGTCAATACG TTTGGTGACC ACCGTATCGG
 CATGATGACA GCTATCGCAG CCCTATTGGT TGCAGATGGAGAGGTGGAGC TTGACCGTGC
 AGAAGCCATC AATACCAGCT ATCCTAGTTT CTTTGATGAT TTGGAGAGCT TGATTCATGG
 CTAA- $(R_2)_n$ -Y

【0032】

(D) ポリペプチド配列の具体例 [配列番号 : 2]

【表4】

$X-(R_1)_n$ -MKLKTNIRHL HGIIRVPGDK SISHRSIIFG SLAEGETKVY
 DILRGEDVLSTMQVFRDLGV EIEDKDGvit VQGVGMAGLK APQNALNMGn
 SGTSIRLISGVLGADFEVE MFGDDSLSKR PMDRVTLPLK KMGVSISGQT ERDLPLRLK
 GTKNLRPIHY ELPIASAQVK SALMFAALQA KGESVIEKE YTRNHTEDMLQQFGGHLSD
 GKKITVQGPQ KLTGQKVVP GDISSAAFVL VAGLIAPNSRLVLQNVGINE TRTGIIDVIR
 AMGGKLEITE IDPVAKSATL IVESDLKGT EICGALIPRL IDELPPIALL ATQAQGVTVI
 KDAEELKVKE TDRIQVVADA LNSMGADITP TADGMIKKGK SALHGARVNT FGDHRIGMMT
 AIAALLVADGEVELDRAEI NTSYPSFFDD LESLIHG
 - $(R_2)_n$ -Y

【0033】

(E) ストレプトコッカス・ニューモニアエのaroAポリヌクレオチドORF
 配列由来の配列 [配列番号 : 3]

【表5】

5'-AGCTTGATCG TCCCAGGTGA CAAGTCTATC AGCCACCGTT CCATTATCTT
 TGGAAAGTTTG GCTGAGGGTG AGACCAAGGT TTATGATATT CTGCGAGGTG AACACGTTCT
 TTCGACCATG CAGGTTTTTC GTGACCTTGG TGTGAAATT GAGGATAAAG ATGGGGTTAT
 TACCGTTCAA GGTGTAGGCA TGGCTGGCTT AAAAGCGCCG CAAAATGCCC TTAATATGGG
 AAATTCCTGGC ACCTCGATTC
 GCCTGATTTT AGGTGTCCTT GCTGGTGCAG ATTTTGAAGT AGAGATGTTT GGAGATGATA
 GTCTTTCCAA ACGTCCTATG GACCGTGTGA CCCTTCCACT
 GAAAAAATG GCGTCAGCA TCTCAGGGCA AACTGAACGA GACTTGCCTC
 CCCTTCGCTT TAAAAGGGAC GAAAAACCTA AGACCTATtc attatgagtt gccaatgccc
 tctgcccag tcaagtcagc cnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn CTAAGGGG GAGTCAGTTA
 TTATCGAAAA AGAGTACACC CGTAATCATA CTGAAGATAT GTTGCAACAA TTTGGTGGTC
 ATTTAAGTGT GGATGGTAAGAAAATCACAG TCCAAGGGCC AAAAAATTG ACAGGACAGA
 AGGTGGTCGT ACCAGGAGAT ATTTCCAGTG CAGCCTTTTG GTTAGTCGCA GGTMTGATTG
 CTCCAAATTC TCGTCTAGTG CTGCAGAATG TGGGGATAAA CGAAACTCGC ACCGGTATTA
 TTGATGTCAT TCGTGCCATG GGTGGAAAAT TGGAAATAACTGAAATCGAT CCAGTCGCTA
 AATCTGCAAC CTTGATTGTT GAGTCTTCTGACTTGAAAGG AACAGAGATT TGTGGCGCTT
 TGATTCCACG TTTGATTGAT
 GAATTGCCTA TTATTGCCCT ACTTGCGACC CAAGCCCAAG GTGTAACAGT TATCAAGGAT
 GCTGAGGAGC TCAAGGTCAA GGAAACAGAC CGTATTCAGG TTGTGGCAGA CGCCTTAAAT
 AGTATGGGAG CAGATATTAC TCCTACGGCA GATGGGATGA TTATCAAAGG AAAATCAGCT
 CTTACGGTG CTAGAGTCAATACGTTTGGT GACCACCGTA TCGGCATGAT GACAGCTATC
 GCAGCCCTAT TGGTTGCAGA TGGAGAGGTG GAGCTTGACC GTGCAGAAGC CATCAATACC
 AGCTATCCTA GTTTCCTTGA TGATTGGAG AGCTTGATTC ATGGCTAA
 -3'

【0034】

(F) この表中のポリヌクレオチドORF配列から推定されるaroAポリペプチド配列 [配列番号：4]

【表6】

NH₂-SLIVPGDKSI SHRSIIFGSL AEGETKVYDI LRGEHVLSTM QVFRDLGVEIEDKDGVITVQ
 GVGMAGLKAP QNALNMGNSG TSIRLISGVL AGADFEVEMF GDDSLSKRPM DRVTLPLKKM
 GVSISGQTER DLPPLRFKRD EKPITYSLXV
 ANCLCPSQVS XXXXXXXXKG ESIIIEKEYT RNHTEDMLQQ FGGHLSVDGK KITVQGPQKL
 TGQKVVPD ISSAIFWLVA GLIAPNSRLV LQNVGINETR TGIIDVIRAM GKGLEITEID
 PVAKSATLIV ESSDLKGTEI CGALIPRLID ELPIALLAT QAQGVTVIKD AEELKVKETD
 RIQVVADALN SMGADITPTA DGMIIKGSAL LHGARVNTFG DHRIGMMTAI AALLVADGEV
 ELDRAEAINTSYPSFFDDLE SLIHG-COOH

【0035】

寄託材料

ストレプトコッカス・ニューモニアエ 0100993株を含有する寄託物は

、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア・リミテッド(NCIMBという)、23ストリート、マッカードライブ、アベルディーンAB21RY、スコットランドに1996年4月11日に寄託され、NCIMB受託番号40794が付与された。寄託したことにより、寄託株をストレプトコッカス・ニューモニアエ 0100993株という。1996年4月17日に、イー・コリ(E.coli)中のストレプトコッカス・ニューモニアエ0100993DNAライブラリーをNCIMBに同様に寄託し、受託番号40800を得た。ストレプトコッカス・ニューモニアエ株寄託物を、本明細書では「寄託株」または「寄託株のDNA」という。

寄託株は全長のaroA遺伝子を含んでいる。寄託株中に含まれるポリヌクレオチド配列ならびにそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書の配列に関する任意の記載に矛盾する事象において支配的である。

寄託株の寄託は、特許手続き上の微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約の条件下でなされている。特許が発行されると何の制限または条件もなく、最終的に株は分譲される。寄託は当業者の便宜のためにのみ提供され、35 U.S.C. 112条のもとに要求されるような、寄託が実施可能要件であることを承認するものではない。

寄託物を製造、使用または販売するためにはライセンスが必要であるが、そのようなライセンスはここでは賦与されていない。

【0036】

ポリペプチド

本発明のポリペプチドは表1 [配列番号：2]のポリペプチド(詳細には、成熟ポリペプチド)ならびにポリペプチドおよびフラグメント、特にaroAの生物学的活性を有するものを包含し、さらに表1 [配列番号：2および4]のポリペプチドまたはその重要部分に対して少なくとも70%、好ましくは表1 [配列番号：2および4]のポリペプチドに対して少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドおよびフラグメント、より好ましくは表1 [配列番号：2および4]のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性を有し(より好ましくは、少なくとも90%の同一性を有し)、さらにより好ましくは表1 [配列番号：2

および4]のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性を有する(さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有する)ポリペプチドおよびフラグメント、さらには、一般に、少なくとも30個、より好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を含む、ポリペプチドのかかる部分を包含する。

【0037】

また本発明は表1(D)(配列番号:2)に示す式のポリペプチドを包含し、式中のアミノ末端においてXは水素であり、カルボキシル末端においてYは水素または金属であり、 R_1 および R_2 はアミノ酸残基、nは1ないし1000の整数である。いずれかのR基(Rは1個よりも多い)により示されるアミノ酸残基の鎖部分はヘテロポリマーであってもホモポリマーであってもよく、好ましくはヘテロポリマーである。

フラグメントは、前述のポリペプチドのアミノ酸配列のすべてではなく一部に対して全く同一であるアミノ酸配列を有する変種ポリペプチドである。a r o Aポリペプチドについては、フラグメントは「独立して存在(free standing)」しているか、または一部分もしくは領域を形成することにより、より大きなポリペプチド内に含まれていてもよく、最も好ましくは単一の連続した領域、すなわち大型の単一ポリペプチドとして含まれる。

【0038】

好ましいフラグメントは、表1[配列番号:2および4]のアミノ酸配列の一部を有する末端切断されたポリペプチド、またはそれらの変種、例えば、アミノ末端を含む一連の残基を切断、またはカルボキシル末端を含む一連の残基を切断したものを包含する。宿主、とりわけストレプトコッカス・ニューモニアエにおける、本発明のポリペプチドの分解形態もまた好ましい。また、構造的または機能的属性により特徴づけられたフラグメント、例えばアルファヘリックスおよびアルファヘリックス形成領域、ベータシートおよびベータシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可変領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原性指標領域を含むフラグメントなども好ましい。

【0039】

a r o A活性を媒介し、あるいは同様の活性を有しまたは活性を改善し、望ましくない活性を減じられたフラグメントである生物学的に活性のあるフラグメントも好ましい。動物、とりわけヒトにおいて抗原的または免疫原的なフラグメントもまた含まれる。個体、特にヒトにおけるストレプトコッカス・ニューモニアエの生存に必須の機能、あるいは疾病を開始または維持する能力を付与する酵素の受容体またはドメインを含むフラグメントが特に好ましい。

本発明の特定のポリペプチドを記載するのに「X」または「X a a」を用いることもできる。「X」および「X a a」は20種の天然に存在するいずれかのアミノ酸をいい、ポリペプチド配列中の所定の位置に配置することができる。

本発明のポリペプチドのフラグメントである変種を、ペプチド合成による対応の全長ポリペプチドの製造に使用してもよく、それゆえ、これらの変種を全長のポリペプチド製造のための中間体として用いてもよい。

【0040】

ポリヌクレオチド

本発明の別の態様は、表1 [配列番号：2および4] の推定アミノ酸配列を有するa r o Aポリペプチドをコードする全長遺伝子およびそれに密接に関連するポリヌクレオチドおよびそれらの変種を含む、単離ポリヌクレオチドに関する。

本明細書に示される表1 [配列番号：1および3] に示すポリヌクレオチド配列のような情報を用い、標準的なクローニングおよびスクリーニング方法、例えば、出発物質としてストレプトコッカス・ニューモニアエ0100993細胞を用いて細菌の染色体DNAフラグメントをクローニングおよび配列決定する方法を用いて、a r o Aポリペプチドをコードしている本発明のポリヌクレオチドを得、ついで、全長のクローンを得てもよい。例えば、本発明のポリヌクレオチド配列、例えば表1 [配列番号：1および3] に示す配列を得るために、イー・コリ (E.coli) またはいくつかの他の適切な宿主におけるストレプトコッカス・ニューモニアエ0100993の染色体DNAのクローンの典型的なライブラリーを、部分的配列に由来する、好ましくは17量体またはそれ以上の長さの放射性標識化オリゴヌクレオチドにてプローブする。プローブのDNAに同一であるD

N Aを担持するクローンはストリンジェントな条件を用いて区別できる。原始配列から設計した配列決定プライマーを用いてこのように同定した個々のクローンを配列決定することにより、両方向で配列が伸長できるようになり、全遺伝子配列を決定できる。このような配列決定は便宜的にプラスミドクローンから調製した変性二本鎖DNAを用いて実施する。適切な技法については、Maniatis,T.、Fitsch,F.F.およびSambrookら、Molecular Cloning , A Laboratory Manual、第2版；コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク（1989）に記載されている（Screening By Hybridization 1.90およびSequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70を参照のこと）。本発明の典型例である、表1〔配列番号：1〕に示すポリヌクレオチドが、ストレプトコッカス・ニューモニアエ0100993由来のDNAライブラリー中に見いだされた。

【0041】

表1〔配列番号：1〕に示すDNA配列は、推定分子量を有する表1〔配列番号：2〕に示すアミノ酸残基数とほぼ同数のアミノ酸からなる蛋白をコードしている読み枠を含んでおり、その推定分子量は当該分野でよく知られたアミノ酸の分子量を用いて算出できる。ヌクレオチド番号1から1281の間の配列番号：1のポリヌクレオチドは配列番号：2のポリペプチドをコードする。停止コдонは配列番号：1（1 - 1281）のヌクレオチド番号1284から開始する。

本発明a r o A蛋白は、寄託株のa r o AをコードしているDNAの配列決定結果により示されるように、a r o（5 - エノールピルビルシキメート - 3 - ホスフェートシンターゼ）ファミリーの他の蛋白に構造的に関連している。当該蛋白は、既知の蛋白の中でもラクトコッカス・ラクチスの5 - エノールピルボイルシキメート - 3 - ホスフェートシンターゼ（a r o A）蛋白に対して最大の相同性を示す（類似性79.7%、同一性68.2%）。他の関連配列は下記のとおりである：

【0042】

受託番号 種

X 7 8 4 1 3 L.Lactis aroA

M 8 0 2 4 5	B.subtilis aroA
Z 2 9 3 3 9	D.nodosus aroA
I 1 9 9 8 2	米国特許第5512466号の配列14
L 0 5 0 0 4	Staphylococcus aureus aroA
X 7 5 3 2 5	Synechocystis sp aroA
X 7 7 0 1 9	P.pseudomallei aroA
D 9 0 9 1 4	Synechocystis sp aroA
X 8 9 3 7 1	C.jejuni aroA
L 4 6 3 7 2	Yersinia pestis aroA

【0043】

関連配列は、Sharps, Analytical Biochem 140:183-189、1984; Majumderら、Eur.J.Biochem. 229:99-106、1995; O'Connellら、J.Gen.Microbiol. 139:1449-1460、1993; Oystonら、"Immunization with live recombinant Salmonella typhimurium aroA producing F1 antigen protects against plaque" 1995; およびRogersら、"Amplification of the aroA gene from Escherichia coli results in tolerance to the herbicide glyphosphate" 1983において説明されている。

【0044】

本発明は、表1 [配列番号: 1または配列番号: 2] のコーディング配列に対して全長にわたり同一であるポリヌクレオチド配列を提供する。成熟ポリペプチドのコーディング配列またはそれらのフラグメント、ならびにその他のコーディング配列を有する読み枠中の成熟ポリペプチドのコーディング配列またはそのフラグメント、例えばリーダーまたは分泌配列、プレ、プロ、プレプロ蛋白配列をコードする配列も本発明により提供される。ポリヌクレオチドは、例えば、転写された非翻訳配列、終止シグナル、リボソーム結合部位、mRNAを安定化する配列、イントロン、ポリアデニル化シグナル等の転写非翻訳配列、および付加アミノ酸をコードする付加コーディング配列等の非コーディング5'および3'配列等の非コーディング配列をも含有しうるが、これらに限定するのではない。例えば、融合ポリペプチドの精製を促すマーカー配列をコードすることもできる。本

発明の特定の具体例において、マーカー配列は、pQEベクター（Qiagen, Inc.）中に提供されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド（Gentzら、Proc.Natl.Acad.Sci., USA、86:821-824（1989）に記載される）またはHAタグ（Wilsonら、Cell 37:767（1984））である。本発明のポリヌクレオチドはまた、構造遺伝子および遺伝子発現を調節する天然の配列をも含むが、これらに限定するものではない。

【0045】

本発明の好ましい具体例は、aroAポリペプチドをコードしている、表1の配列番号：1に示すヌクレオチド1から1281または1284までを含むポリヌクレオチドである。

また本発明は、表1（C）[配列番号：1]に示す式のポリヌクレオチドを包含し、式中の5'末端においてXは水素であり、この分子の3'末端においてYは水素または金属であり、R₁およびR₂はアミノ酸残基、nは1ないし1000の整数である。いずれかのR基（Rは1個よりも多い）により示される核酸残基の鎖部分はヘテロポリマーまたはホモポリマーのいずれであってもよく、好ましくはヘテロポリマーである。

【0046】

本明細書で用いる「ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド」なる語は、本発明のポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含し、詳細には、細菌のポリペプチド、より詳細には表1[配列番号：2]に示すアミノ酸配列を有するストレプトコッカス・ニューモニアエのaroAのポリペプチドを包含する。該用語は、コーディング配列および/または非コーディング配列を含んでいてもよい、さらなる領域を伴った、ポリペプチドをコードしている単一の連続領域または不連続領域（例えば、組み込まれたファージまたは配列の挿入または配列の編集により分断されたもの）を含むポリヌクレオチドを包含する。

さらに本発明は、表1[配列番号：2]の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変種をコードする上記ポリヌクレオチドの変種にも関する。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントである変種を用いて本発明の全長ポリヌクレオチド

を合成してもよい。

【0047】

さらに特に好ましい具体例は、表1 [配列番号：2] のa r o Aポリペプチドのアミノ酸配列を有する、a r o A変種をコードするポリヌクレオチドであり、その中には、いくつか、少しの、5ないし10、1ないし5、1ないし3、2、1または0個のアミノ酸残基を置換、欠失または付加を任意の組み合わせで施したアミノ酸配列を有する。中でもとりわけ好ましいものは、a r o Aの特性および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。

【0048】

本発明のさらに好ましい具体例は、表1 [配列番号：2および4] に示すアミノ酸配列を有するa r o Aポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに対して、その全長にわたり少なくとも70%の同一性があるポリヌクレオチド、およびかかるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドである。また、寄託株のa r o Aポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに対してその全長にわたり少なくとも80%同一である領域を含むポリヌクレオチド、およびそれに対して相補的なポリヌクレオチドが最も極めて好ましい。この点に関して、全長で少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドがとりわけ好ましく、中でも少なくとも95%の同一性を有するものが特に好ましく、さらに少なくとも95%の同一性を有するものの中でも少なくとも97%であるのがより好ましく、中でも少なくとも98%および少なくとも99%であるのが特に好ましく、さらに少なくとも99%であるのがより好ましい。

好ましい具体例は、表1 [配列番号：1] のDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドである。

【0049】

本発明はさらに本明細書上述の配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関して、本発明は特にストリンジェントな条件で本明細書に示すポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書で用いる「ストリンジェントな条件」および「ストリンジェントなハイブリダイ

ゼーション条件」なる語は、配列間の同一性が少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%である場合のみに起こるハイブリダイゼーションを意味する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例として、50%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハーツ溶液、10%硫酸デキストランおよび20μg/mlの変性し、剪断されたサケ精子DNAを含有する溶液中、42℃で一夜インキュベートし、つづいて約65℃、0.1×SSC中でハイブリダイゼーションサポートを洗浄することが挙げられる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は周知であり、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版；コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1989)、とりわけその第11章に具体的に示されている。

【0050】

本発明はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件で、配列番号：1または配列番号：3に示すポリヌクレオチド配列に関する完全遺伝子を含む適当なライブラリーを、配列番号：1に示す上記ポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントの配列を有するプローブでスクリーニングし、DNA配列を単離することにより得ることのできるポリヌクレオチド配列を本質的に含むポリヌクレオチドをも提供する。かかるポリヌクレオチドを得るために有用なフラグメントには、例えば本明細書の別の箇所において説明するプローブおよびプライマー等がある。

【0051】

本発明のポリヌクレオチドアッセイに関してここでさらに論じるが、例えば上述の本発明のポリヌクレオチドを、aroAをコードするcDNA全長およびゲノムクローンを単離するための、およびaroA遺伝子に高度な配列類似性を有するその他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離するための、RNA、cDNAおよびゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。このようなプローブは、一般に、少なくとも15塩基を含む。好ましくはこのようなプローブは少なくとも30塩基を有し、少なくとも50塩基を有していてもよい。とりわけ好ましいプローブは少なくとも30塩基を有

し、50塩基またはそれ以下である。

例えば、*aroA*遺伝子のコーディング領域は、配列番号：1に示すDNA配列を用いてオリゴヌクレオチドプローブを合成してスクリーニングすることにより単離できる。次いで、本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドを、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーのスクリーニングに用い、プローブがライブラリーのいずれのメンバーにハイブリダイゼーションするのかを決定する。

【0052】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、例えば、疾病とりわけヒトの疾病の治療法および診断法の発見のための研究試薬および材料として使用でき、さらにポリヌクレオチドアッセイに関連して本明細書でさらに論じる。

配列番号：1および/または2の配列由来のオリゴヌクレオチドである本発明のポリヌクレオチドを本明細書に記載の方法に使用してもよいが、好ましくはPCRに使用して、本明細書で同定したポリヌクレオチドの全体または一部が細菌中の感染した組織に転写されるかどうかを決定する。かかる配列が、病原体が達成した感染段階および感染型の診断にも有用であることが理解される。

【0053】

また本発明は、さらなるアミノもしくはカルボキシル末端アミノ酸、または成熟ポリペプチドに内在するアミノ酸を加えた成熟蛋白であるポリペプチドをコードできるポリヌクレオチドも提供する（例えば成熟形態が一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合）。このような配列は、前駆体から成熟形態への蛋白のプロセッシングに役割を担い、蛋白の輸送を可能にし、蛋白の半減期を延長もしくは短縮し、またはとりわけアッセイもしくは製造のための蛋白の操作を容易にすることができる。一般的にインビボの場合、付加アミノ酸は、細胞性酵素によりプロセッシングされ、成熟蛋白から取り除かれる。

1またはそれ以上のプロ配列と融合した成熟形態のポリペプチドを有する前駆蛋白は、ポリペプチドの不活性形態でありうる。プロ配列が除去されると、一般に、このような不活性前駆体が活性化される。プロ配列のいくつかまたはすべてを活性化の前に除去できる。一般に、このような前駆体はプロ蛋白と称される。

【0054】

ヌクレオチドに関する標準記号A、G、C、T/Uに加えて、また「N」なる語を、本発明の特定のポリヌクレオチドを記載するのに用いることができる。「N」は、隣接するヌクレオチド位置と一緒に作用する場合、正確な読み枠を読み取る場合で、Nがそのような読み枠にて成熟前末端コドンを形成する効果を有する核酸でないことが好ましい場合を除き、4種のDNAまたはRNAヌクレオチドのいずれかがそのDNAまたはRNA配列のかかる指定位置にあることを意味する。

要するに、本発明のポリヌクレオチドは成熟蛋白、リーダー配列を加えた成熟蛋白（プレ蛋白と称することができる）、プレ蛋白のリーダー配列ではない1またはそれ以上のプロ配列を有する成熟蛋白の前駆体、またはリーダー配列および1またはそれ以上のプロ配列を有するプロ蛋白の前駆体であるプレプロ蛋白をコードしていてもよく、プロ配列は通常ポリペプチドの活性および成熟形態を生成するプロセッシング段階で除去される。

【0055】

ベクター、宿主細胞、発現

本発明はまた、ポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明ベクターで遺伝子操作される宿主細胞および組換え技法による本発明のポリペプチドの製造にも関する。本発明のDNA構築物に由来するRNAを用い、無細胞翻訳系を用いてこのような蛋白を製造できる。

組換え体を製造するために、宿主細胞を遺伝子操作して、発現系もしくはそれらの一部、または本発明のポリヌクレオチドを組み込むことができる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、例えば、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (1986) ; Sambrookら、Molecular Cloning ; A Laboratory Manual、第2版 ; コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (1989) のように、多くの標準的な実験マニュアルに記載される方法により行うことができ、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランス

フェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレープ負荷、バリスティック導入および感染等がある。

【0056】

適当な宿主の代表的なものには、細菌細胞、例えばストレプトコッカス属 (Streptococci)、スタフィロコッカス属 (Staphylococci)、エンテロコッカス属 (Enterococci)、イー・コリ (E.coli)、ストレプトミセス (Streptomyces) およびバチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) 細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞；昆虫細胞、例えばドロソフィラ S2 (Drosophila S2) およびスポドプテラ Sf9 (Spodoptera Sf9) 細胞；動物細胞、例えば CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293 およびボウス (Bovine) 黒色腫細胞；ならびに植物細胞等がある。

【0057】

本発明のポリペプチドを製造するために非常に多くの発現系を使用できる。このようなベクターには、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えば SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、ならびにそれらを組み合わせたものに由来するベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等がある。発現系の構築物は発現を制御および引き起こす調節領域を含有していてもよい。この点に関して、一般に、宿主中にポリヌクレオチドを保持、伸長または発現するのに、および/またはポリペプチドを発現するのに適した任意の系またはベクターを発現に使用できる。周知のおよび慣用的な種々の任意の技術により、適当な DNA 配列を発現系に挿入してもよく、例えば Sambrook ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (前掲) に記載されている。

【0058】

翻訳蛋白を、小胞体内腔、周辺腔または細胞外環境へ分泌させるために、適当

な分泌シグナルを発現するポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルはポリペプチドに本来的なものであってもく、あるいは異種性のシグナルでもよい。

本発明のポリペプチドは周知の方法により、組換え細胞培養物から回収および精製でき、その方法には、例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー等がある。高性能液体クロマトグラフィーを精製に用いるのが最も好ましい。ポリペプチドが単離および/または精製中に変性した場合、再び活性なコンホメーションにするために、蛋白再生のための周知の技法を用いることができる。

【0059】

診断アッセイ

本発明はまた診断試薬として使用するための本発明のa r o Aポリヌクレオチドの使用にも関する。真核生物とりわけ哺乳動物、特にヒトにおけるa r o Aの検出は、疾患の診断のための診断法を提供する。a r o A遺伝子を含む生物に感染した真核生物（本明細書において「個体」とも称する）とりわけ哺乳動物、特にヒトを種々の方法により核酸レベルで検出できる。

診断用の核酸は、感染した個体の細胞および組織、例えば骨、血液、筋肉、軟骨および皮膚より得ることができる。ゲノムDNAを直接検出に使用してもよく、あるいは分析の前にPCRもしくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅できる。RNAまたはcDNAもまた同じ方法で用いることができる。増幅法を用いると、真核生物とりわけ哺乳動物、特にヒトに存在する原核生物株を、原核生物遺伝子の遺伝子型の分析により特徴づけすることができる。対照配列の遺伝子型と比較した場合の増幅産物の大きさの変化により、欠失および挿入を検出できる。点突然変異は、増幅DNAを標識化a r o Aポリヌクレオチド配列にハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に対合した配列はRNアーゼ消化により、または融解温度の差により、誤対合二重らせんから区別できる。変性剤含有または不含ゲル中のDNAフラグメントの電気泳動の移動度の変化を

検出することにより、または直接的なDNAの配列決定により、DNA配列の差を検出してもよい。例えば、Meyersら、Science, 230:1242(1985)を参照のこと。また、特異的な位置での配列の変化を、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNAアーゼおよびS1保護または化学的切断法によって明らかにしてもよい。例えば、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:4397-4401(1988)を参照のこと。

【0060】

本発明の遺伝子の突然変異または多型性を担持する細胞を、種々の技術により、DNAレベルで、例えばセロタイピングすることにより検出してもよい。例えば、RT-PCRを用いて突然変異を検出することができる。RT-PCRは自動検出系、例えばGeneScan等と組み合わせて用いるのがとりわけ好ましい。RNAまたはcDNAを同じ目的でPCRまたはRT-PCRに用いてもよい。一例として、aroAをコードする核酸に相補的なPCRプライマーは、変異を同定および分析するのに用いることができる。

【0061】

本発明はまた、5'および/または3'末端から1、2、3または4個のヌクレオチドを除去したこれらのプライマーを提供する。これらプライマーを用いて、個体から由来の試料より単離されたaroAのDNAを増幅してもよい。該プライマーを用いて、感染個体から単離した遺伝子を増幅してもよく、次いで、該遺伝子をDNA配列を調べるための種々の技法に供してもよい。このように、DNA配列における変異を検出し、感染の診断および感染性物質のセロタイピングおよび/または分類に使用することができる。

【0062】

本発明はまた、疾患、好ましくは細菌感染、より好ましくはストレプトコッカス・ニューモニアエによる感染、および最も好ましくは、中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、静脈洞炎、膿胸および心内膜炎、最も詳細には例えば脳脊髄液の感染のごとき髄膜炎のような疾病の診断方法を提供し、該方法は、表1[配列番号:1]の配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルの上昇を個体由来の試料から検出することを特徴とする。aroAポリヌクレオチドの発現の増加ま

たは低下は、ポリヌクレオチドの定量法として当該分野でよく知られたいずれかの方法、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロットイングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて測定できる。

【0063】

加えて、正常対照組織試料と比較して、aroA蛋白の過剰発現を検出するための本発明診断アッセイを用いて、例えば感染の存在を検出してもよい。宿主由来のサンプル中のaroA蛋白のレベルを決定するために用いることができるアッセイ技法は、当業者に周知である。かかるアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等がある。

【0064】

抗体

本発明のポリペプチドもしくはそれらの変種、またはそれらを発現する細胞を免疫源として用いて、かかるポリペプチドに免疫特異的な抗体を得ることができる。本明細書で用いる「抗体」には、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラ、一本鎖、サル化抗体およびヒト化抗体、ならびにFabフラグメントが包含され、さらに免疫グロブリン発現ライブラリーの産物等のFabフラグメントも包含される。

本発明のポリペプチドに対して生じる抗体は、ポリペプチドまたはエピトープが付いたフラグメント、アナログまたは細胞を、好ましくはヒト以外の動物に通常の実験法を用いて投与することにより得ることができる。連続的細胞系培養により産生される抗体を提供する、当業者周知の技術を用いて、モノクローナル抗体を調製することができる。例えば、Kohler,G.およびMilstein,C., Nature, 256:495-497(1975); Kozborら、Immunology Today, 4:72(1983); Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc., 77-96頁(1985)に記載されるような種々の技法がある。

【0065】

一本鎖抗体の産生のために記載された技術(米国特許第4946778号)を適用して、本発明ポリペプチドに対する一本鎖抗体を得ることができる。また、

トランスジェニックマウスまたはその他の生物、例えばその他の哺乳動物を用いてヒト化抗体等の抗体を発現させてもよい。

別法として、ファージディスプレイ技法を用いて、抗 - a r o A の所有についてスクリーニングされたヒト由来のリンパ球の P C R 増幅された v 遺伝子のレパートリーから、あるいは無処理のライブラリーから、ポリペプチドに対する結合活性を有する抗体遺伝子を選別することもできる (McCafferty, J. ら、Nature 348 : 552 - 554 (1990) ; Marks, J. ら、Biotechnology 10 : 779 - 783 (1992))。これらの抗体の親和性はチェーンシャフリング (chain shuffling) により改善することもできる (Clackson, T. ら、Nature 352 : 624 - 628 (1991))。

【0066】

二つの抗原結合ドメインがある場合、各ドメインは異なるエピトープに指向し、「二特異性」抗体と称される。

上記抗体を用いてポリペプチドを発現するクローンを単離または同定してもよく、上記抗体を親和性クロマトグラフィーにより精製することができる。

従って、とりわけ a r o A に対する抗体を、感染、とりわけ細菌感染、特に中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、静脈洞炎、膿胸および心内膜炎、最も詳細には例えば脳脊髄液の感染のごとき髄膜炎のような疾病の治療に用いてもよい。

【0067】

ポリペプチド変種には抗原的、エピトープ的または免疫学的に等価な変種等があり、本発明の特定の態様である。本明細書で用いる「抗原的に等価な誘導体」なる語は、本発明により蛋白またはポリペプチドに対して生成した場合、病原および哺乳動物宿主間での即時的な物理的相互作用を妨害する特定の抗体により特異的に認識されるポリペプチドまたはその同等物を包含する。本明細書で用いる「免疫学的に等価な誘導体」なる語は、脊椎動物において抗体を産生させるのに適した処方を用いた場合、抗体が病原および哺乳動物宿主間での即時的な物理的相互作用を妨害するように作用するペプチドまたはその等価物を包含する。

【0068】

ポリペプチド、例えば抗原的、免疫学的に等価な誘導体、またはそれらの融合蛋白は、マウスまたはその他の動物例えばラットもしくはニワトリを免疫するための抗原として使用できる。融合蛋白はポリペプチドに安定性を付与できる。抗原は、例えば抱合することにより、免疫原性キャリア蛋白、例えばウシ血清アルブミン (BSA) またはキーホール・リンペット・ヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin: KLH) に結合することができる。別法として、蛋白もしくはポリペプチド、またはそれらに抗原的もしくは免疫学的に等価なポリペプチドの多重コピーを含む多重抗原ペプチドは、免疫原性を改良するための十分な抗原性を有しているので、キャリアーを使用しなくてすむ。

【0069】

好ましくは、抗体またはそれらの変種を、個体における免疫原性を減じるために修飾する。例えば、個体がヒトである場合、最も好ましくは、抗体は「ヒト化」されており；この場合、ハイブリドーマ由来の抗体の相補性決定領域がヒト・モノクローナル抗体に移植されており、例えば、Jones, P. ら、Nature 321: 522 - 525 (1986) または Tempest ら、Biotechnology 9: 266 - 273 (1991) に記載されている。

本発明のポリヌクレオチドの遺伝学的免疫における使用は、プラスミドDNAの筋肉への直接注射 (Wolff ら、Hum. Mol. Genet. 1: 363 (1992) ; Mant horpe ら、Hum. Gene Ther. 4: 419 (1993))、特異的蛋白キャリアーとDNAとの複合体の送達 (Wu ら、J. Biol. Chem. 264: 16985 (1989))、リン酸カルシウムとのDNA共沈 (Benvenisty & Reshef、PNAS 83: 9551 (1986))、種々の形態のリポソーム中へのDNA封入 (Kaneda ら、Science 243: 375 (1989))、微粒子爆撃 (Tang ら、Nature 356: 152 (1992) ; Eisenbraun ら、DNA Cell Biol. 12: 791 (1993)) およびクローン化レトロウイルスベクターを用いたインビボ感染 (Seeger ら、PNAS 81: 5849 (1984)) のような適当な送達方法を用いるのが好ましい。

【0070】

作用機序および使用方法

本発明ポリペプチドを用いて、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリー、および天然産物混合物中における小型分子基質およびリガンドの結合を評価してもよい。これらの基質およびリガンドは天然基質およびリガンドであってもよく、構造上または機能上の模倣物であってもよい。例えば、Coliganら、Current Protocols in Immunology 1 (2) : 第5章 (1991) を参照のこと。

【0071】

また本発明は、aroAポリペプチドまたはポリヌクレオチドの作用を増強（アゴニスト）または遮断（アンタゴニスト）する化合物、詳細には、静菌性および/または殺菌性化合物を同定するための、化合物のスクリーニング方法をも提供する。該スクリーニング方法はハイスループット方法を包含する。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために、aroAポリペプチドおよびかかるポリペプチドの標識基質もしくはリガンドを含む、合成反応混合物、膜、細胞エンベロープもしくは細胞壁のごとき細胞コンパートメント、またはそれらの調製物を、aroAアゴニストまたはアンタゴニストである可能性のある候補分子の不存在下または存在下でインキュベーションする。候補分子のaroAポリペプチドにアゴナイズまたはアンタゴナイズする能力は、標識化リガンドの結合の低下またはこのような基質からの生成物の産生の低下に反映される。結合しても影響を及ぼさない分子、すなわちaroAの効果を誘発しない分子は、良好なアンタゴニストである可能性が高い。結合性が良好で、基質からの生成物の生成速度を高める分子はアゴニストである。基質からの生成物の生成速度またはレベルの検出は、リポーターシステムを用いることにより強調できる。この点に関して有用なリポーターシステムには、生成物に転換される比色測定用標識化基質、aroAポリヌクレオチドまたはポリペプチド活性の変化に応答するリポーター遺伝子、および当該分野で周知の結合アッセイ等があるが、これらに限定するものではない。

【0072】

aroAアンタゴニストのアッセイのもう1つの例は、競争アッセイであり、競争阻害アッセイに適した条件下で、aroAおよび潜在的アンタゴニストを、aroA結合分子、組換えaroA結合分子、天然基質もしくはリガンド、または

基質もしくはリガンド模倣物と混合する。例えば放射活性または比色測定用化合物により a r o A を標識し、結合分子に結合した、または生成物に変換された a r o A 分子の数を正確に決定して、潜在的なアンタゴニストの効果を評価できる。

本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは、ホスホ（エノール）ピルベート（P E P）およびシキメート3 - ホスフェート（S 3 P）のE P S Pおよび無機ホスフェート（P i）への可逆的形質転換を改変することによって作用することが好ましい。

【0073】

潜在的アンタゴニストは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに結合し、そのことによりその活性を阻害し消失させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体を包含する。また、潜在的アンタゴニストは、a r o A 誘発の活性を誘発せず、それゆえ a r o A を結合から排除することにより a r o A の作用を妨害する結合分子のような、結合分子と同じ部位に結合する密接に関連した蛋白または抗体などの小型有機分子、ペプチド、ポリペプチドであってもよい。

本発明の小型有機分子は、2000ダルトンより小さな分子量を有することが好ましく、より好ましくは300と1000ダルトンの間の分子量、最も好ましくは400と700ダルトンの間の分子量を有する。一の実例として、本願の出願日前に公開されていない化合物を挙げる。もう一つ別の具体例として、グリホサート（N - ホスホノメチルグリシン、G L P）および/または遷移状態阻害剤または遷移状態模倣剤を除く化合物を挙げる。

【0074】

潜在的アンタゴニストには、ポリペプチドの結合部位に結合し、およびそれを占領し、それにより細胞性結合分子への結合を妨害して、正常の生物学的活性を妨害する小型分子等がある。小型分子の例としては、小型有機分子、ペプチド、ペプチド様分子等があるが、これらに限定するものではない。その他の潜在的アンタゴニストにはアンチセンス分子等がある（これらの分子についての記載に関しては、Okano, J., Neurochem. 56 : 560 (1991) ; Oligodeoxy-nucleo

tides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRCプレス、ボッカレートン、フロリダ州(1988)を参照のこと)。好ましい潜在的アンタゴニストには、aroA関連化合物およびaroA変種等がある。

【0075】

本明細書に示す各DNA配列を、抗菌化合物の発見および開発に使用してもよい。コードされている蛋白は、発現した場合、抗菌剤のスクリーニングのための標的として使用することができる。また、コードされている蛋白のアミノ末端領域または各mRNAのシャイン-ダルガノ配列または他の翻訳容易化配列をコードしているDNA配列を用いてアンチセンス配列を構築し、目的とするコーディング配列の発現を制御することもできる。

【0076】

本発明は、感染の続発症に関与する病因および哺乳動物宿主間の最初の物理的相互作用を妨害するための本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは阻害物質の使用を提供する。とりわけ本発明の分子を、内在デバイス上の哺乳動物細胞外マトリックス蛋白または傷における細胞外マトリックス蛋白への細菌の付着、詳細にはグラム陽性細菌の付着の防止；例えば、哺乳動物チロシンキナーゼのホスホリレーションを開始することによる、aroA蛋白により媒介される哺乳動物細胞への侵入の遮断(Rosenshineら、Infect.Immunol. 60:2211(1992))；哺乳動物細胞外マトリックス蛋白と細菌aroA蛋白との間の、組織ダメージを媒介する細菌付着の遮断；内在デバイスの移植または他の外科的方法以外により開始される、感染における通常の病状の進行の遮断に使用することができる。

本発明アンタゴニストおよびアゴニストを、例えば、中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、静脈洞炎、膿胸および心内膜炎、最も詳細には例えば脳脊髄液の感染のごとき髄膜炎の阻害および治療に用いてもよい。

【0077】

ワクチン

本発明の別の態様は、個体とりわけ哺乳動物における免疫学的反応を誘発する方法であって、感染、詳細には細菌感染、最も詳細にはストレプトコッカス・ニ

ユーモニアエ感染から該個体を防御するための抗体および/またはT細胞免疫応答を生じさせるに十分な *aroA* またはそのフラグメントもしくは変種を個体に接種することからなる方法に関する。かかる免疫学的応答が細菌の複製を遅らせる方法も提供される。本発明のさらにもう1つの態様は、個体における免疫学的応答の誘発方法であって、疾病が個体内で既に確立されているか否かにかかわらず、インビボで *aroA*、またはそのフラグメントもしくは変種を発現させるために *aroA* またはそのフラグメントもしくは変種の発現を指令する核酸ベクターをかかる個体に送達して、例えば、抗体および/またはT細胞免疫応答（例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞毒性T細胞を誘発させる）を生じさせる免疫学的応答を誘導して、該個体を疾病から防御する抗体を産生させることからなる方法に関する。遺伝子の所望の細胞中への投与を早める方法としては、粒子上にコーディングすること等がある。

かかる核酸ベクターはDNA、RNA、修飾核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含んでいてもよい。

【0078】

本発明のさらなる態様は、免疫学的反応を個体内に誘発する能力を有する、または誘発されている個体内に導入された場合、*aroA* またはそれによりコードされている蛋白に対する免疫学的反応をかかる個体に誘発する免疫学的組成物であって、*aroA* またはそれによりコードされている蛋白に対する抗原をコードして発現するDNAを含む組換え *aroA* またはそれによりコードされている蛋白を含む組成物に関する。免疫学的応答を治療的または予防的に用いてもよく、また免疫学的応答はCTLまたはCD4⁺T細胞から生じるような抗体免疫または細胞性免疫の形態であってもよい。

【0079】

aroA ポリペプチドまたはそれらのフラグメントを、それ自身は抗体を産生しないが、第1の蛋白を安定化し、免疫原的および保護特性を有する融合蛋白を産生する能力のある共存蛋白 (co-protein) と融合させてもよい。好ましくは、かかる融合組換え蛋白は、抗原補蛋白、例えばヘモフィルス・インフルエンザエ (*Hemophilus influenzae*) 由来のリポ蛋白D、グルタチオン-S-トランスフ

ェラーゼ (G S T) またはベーターガラクトシダーゼのごとき共存蛋白、蛋白を可溶化してそれらの産生および精製を促進する比較的大きな共存蛋白等を含む。さらに、共存蛋白は免疫系において普遍的な刺激を提供するという意味で、アジュバントとして作用することができる。共存蛋白は第1の蛋白のアミノまたはカルボキシ末端のいずれに結合していてもよい。

本発明は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激DNA配列、例えば、Sato, Y.ら、Science 273: 352 (1966) に記載されている配列を含む組成物、とりわけワクチン組成物、および方法を提供する。

【0080】

また、本発明は、上記したポリヌクレオチドまたはその特定のフラグメントを用いて、ストレプトコッカス・ニューモニアエに感染した動物モデルにおいて、かかる遺伝的免疫化実験に用られるDNA構築物中の細菌細胞表面蛋白の不変領域をコードすることが明らかにされている方法であって、とりわけ予防的または治療的免疫反応を刺激することができる蛋白エピトープを同定するのに有用である方法を提供する。この研究は、哺乳動物、とりわけヒトにおける細菌感染とりわけストレプトコッカス・ニューモニアエ感染の予防薬または治療的処置の開発のために、感染に抵抗しこれを一掃するのに成功した動物の必須器官から特に価値あるモノクローナル抗体をうまく調製することを可能にすると思われる。

【0081】

ポリペプチドを宿主接種用抗原として用いて、例えば損傷組織への細菌の付着を阻害することにより細菌の侵入に対して防御する特異的抗体を得てもよい。組織損傷の例としては、例えば機械的、化学的もしくは熱的ダメージにより、または内在デバイスの埋め込みにより引き起こされた皮膚または結合組織の創傷、または粘膜、例えば口、乳腺、尿道または膣の創傷等がある。

【0082】

本発明はまた、本発明の免疫原性組換え蛋白と、適当な担体を一緒に含むワクチン処方を包含する。蛋白は胃で分解されうるので、非経口的に、例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮膚内等に投与するのが好ましい。非経口投与に適した処方には、抗酸化剤、緩衝液、静細菌剤、および処方を個体の体液（好ましくは血

液)と等張にする溶質を含有していてもよい水性または非水性滅菌注射液、および懸濁化剤または増粘剤を含有していてもよい水性または非水性滅菌懸濁液等がある。処方は1回投与または複数回投与用容器、例えばシールしたアンプルおよびバイアルに入れてよく、使用直前に滅菌液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態として保存してもよい。ワクチン処方処方は処方の免疫原性を高めるアジュバント系を含んでいてもよく、例えば水中油系または当該分野で周知のその他の系等がある。投与量はワクチンの特異的活性に依存し、通常の実験法により容易に決定できる。

本発明を特定のa r o A蛋白に関して説明したが、本発明は天然に存在する蛋白および、実質的に組換え蛋白の免疫原特性に影響しない付加、欠失または置換を施した類似の蛋白のフラグメントを包含することが理解されよう。

【0083】

組成物、キットおよび投与

本発明はまた上述のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを含む組成物にも関する。本発明のポリペプチドを、細胞、組織もしくは生物に用いられる未滅菌もしくは滅菌済み担体と組み合わせ、例えば対象への投与に適した医薬的担体と組み合わせ用いることができる。このような組成物は、例えば溶媒添加物または治療上有効量の本発明のポリペプチド、および医薬上許容される担体または賦形剤を含む。このような担体には生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせ等があるが、これらに限定するものではない。処方は投与法に適したものにすべきである。さらに本発明は、1またはそれ以上の上記した本発明の組成物成分を充填した1またはそれ以上の容器を含む診断用および医薬用パックおよびキットにも関する。

【0084】

本発明のポリペプチドおよびその他の化合物を、単独で、あるいは治療用化合物等のその他の化合物と組み合わせ用いてもよい。

医薬組成物は、いずれかの効果的かつ利便的な方法、例えば、とりわけ局所、経口、経膺、静脈内、腹膜腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内、または皮膚内の経路で

投与してもよい。

治療において、または予防薬として、活性物質を注射用組成物として、例えば好ましくは等張の滅菌水性分散物として個体に投与できる。

別法として、組成物を局所塗布用、例えば軟膏、クリーム、ローション、眼軟膏、点眼液、点耳液、洗口剤、含浸包帯および縫合用糸、ならびにエアロゾール等の形態に処方してもよく、適当な慣用的添加物、例えば保存剤、薬物の浸透を補助する溶媒、ならびに軟膏およびクリームには軟化剤を含有していてもよい。かかる局所用処方、混和性の慣用的な担体、例えばクリームまたは軟膏基剤、およびローションにはエタノールまたはオレイルアルコールを含有していてもよい。このような担体は重量で処方の約1%から約98%であってよく、より通常には重量で処方の約80%までとする。

哺乳動物とりわけヒトに投与するために、活性物質の1日あたりの投与量は、 0.01 mg/kg から 10 mg/kg であり、典型的には約 1 mg/kg である。医者はあらゆる場合、個体に最も適した実際の投与量を決定し、年齢、体重および特に個体の反応性に応じて変化させる。上述の投与量は、平均的なケースの典型例である。もちろん、高用量および低用量の範囲が適合する個々の例もあり、かかる例は本発明の範囲内である。

【0085】

内在デバイスには外科的インプラント、補綴物およびカテーテル等があり、即ち個体の体に導入し、長時間その位置に存在するものである。このようなデバイスには、例えば人工関節、心臓弁、ペースメーカー、血管移植片、血管カテーテル、脳脊髄液シャント、尿カテーテル、継続的歩行可能腹膜透析用 (continuous ambulatory peritoneal dialysis: CAPD) カテーテル等がある。

本発明の組成物を注射により投与し、内在デバイスの挿入の直前に、関連細菌に対する全身的な効果を得てもよい。手術後、デバイスが体内に存在する期間中、処置を続けてもよい。さらに、外科的手技中に広げるカバーに用いて、細菌性創傷感染、とりわけストレプトコッカス・ニューモニアエの創傷感染を防御することもできる。

【0086】

多くの整形外科医は、補綴関節を有するヒトについては、菌血症を生じうる歯科的処置の前に抗生物質予防法を考慮すべきであると考えている。遅延性の重篤な感染は、時に補綴関節を失うに至る深刻な合併症であり、有意な罹病率および死亡率を伴う。それゆえ、この状況において、予防的な抗生物質に代わるものとして、活性物質の使用を拡張することも可能である。

上述の治療に加え、一般的には本発明組成物を創傷の治療薬として使用して、創傷組織において曝露されたマトリックス蛋白に細菌が付着するのを防いでもよく、歯科治療においては抗生物質による予防法に代えて、またはそれと組み合わせで予防的に使用してもよい。

【0087】

別法として、本発明の組成物を用いて挿入直前の内在デバイスを浸してもよい。創傷または内在デバイスを浸すためには、活性物質は $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ から 10 mg/ml の濃度であるのが好ましい。

ワクチン組成物を便宜的に注射可能な形態にする。慣用的なアジュバントを用いて免疫反応を高めてもよい。ワクチン化に適した単位投与量は、 $0.5\sim 5\text{ }\mu\text{g/kg}$ の抗原であり、このような投与量は1～3週間隔で1～3回投与するのが好ましい。本発明化合物については、指示した投与量範囲では、適当な個体への投与を妨げるような不利な毒性効果は観察されない。

本明細書に開示した各文献は、出典を明示することでその内容を本明細書の一部とする。本願が優先権を主張しているいずれの特許出願も、その内容を本明細書の一部とする。

【0088】

(実施例)

以下の実施例は、詳細に説明したこと以外は、当業者に周知で通常的な標準的な技法を用いて実施する。実施例は説明のためにのみ示すもので、本発明を限定するものではない。

【0089】

実施例1：菌株の選択、ライブラリーの製造および配列決定

配列番号：1に示すDNA配列を有するポリヌクレオチドを、イー・コリ中の

ストレプトコッカス・ニューモニアエの染色体DNAのクローンのライブラリーから得た。重複するストレプトコッカス・ニューモニアエのDNAを含有する2個またはそれ以上のクローンからの配列決定データを用いて配列番号：1の連続したDNA配列を構築した。ライブラリーは、慣用的方法、例えば、以下の方法1および2により製造できる。

全細胞DNAをストレプトコッカス・ニューモニアエ0100993から標準法に準じて単離し、二つの方法のどちらかによりサイズ分画する。

【0090】

方法1

標準法に準じてサイズ分画化するために、全細胞DNAを注射針に通して機械的に剪断する。11kbpまでの大きさのフラグメントを、エクソヌクレアーゼおよびDNAポリメラーゼで処理することにより、平滑末端化し、EcoRIリンカーを加える。フラグメントを、EcoRIで切断されているベクターラムダZapIIにライゲートし、標準法によりライブラリーをパッケージングし、次いでパッケージングしたライブラリーでイー・コリを感染させる。ライブラリーは標準法により増幅する。

【0091】

方法2

全細胞DNAは、ライブラリーベクター（例えば、RsaI、PaiI、AluI、Bsh1235I）にクローニングするための一連のフラグメントを生成するのに適当な1の制限酵素または制限酵素の組み合わせで部分的加水分解に付し、かかるフラグメントを標準法に準じてサイズ分画化する。EcoRIリンカーをDNAおよびフラグメントにライゲートし、次いでEcoRIで切断されているベクターラムダZapIIにライゲートし、標準法によりライブラリーをパッケージングし、次いでパッケージングしたライブラリーでイー・コリを感染させる。ライブラリーを標準法により増幅する。

【0092】

実施例2 aroAの特徴付け：ストレプトコッカス・ニューモニアエから由来の5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼの定常速度実験

5 - エノールピルビルシキメート - 3 - ホスフェート (EPSP) シンターゼ (EC 2.5.1.19) は芳香族アミノ酸生合成経路 (「シキメート経路」) (1) における重要な酵素である。この酵素はホスホ (エノール) ピルベート (PEP) およびシキメート 3 - ホスフェート (S3P) の EPSP および無機ホスフェート (Pi) への一般的でない可逆的形質転換に触媒作用を及ぼす (スキーム 1)。広域スペクトルの発芽後除草薬、グリホサート (N - ホスホノメチルグリシン、GLP) が、遷移状態阻害剤として機能することで (3) この単一酵素 (2) を阻害する (スキーム 2) という知見によりこの酵素に対して強い興味が生じた。

【0093】

本明細書において、ストレプトコッカス・ニューモニアエにおける EPSP シンターゼの同定、および該酵素の同質性までの精製を提供する (4)。さらに、本明細書において、速度論的機構の仮定を目的とする、特に順方向および逆方向反応の両方における基質結合の次元を仮定することを目的とする、この酵素の包括的定常状態速度実験の結果を提供する。該酵素の GLP による阻害のパターンおよび各酵素反応生成物を記載する。

EPSP シンターゼ反応は自由な可逆的反応であるため、該酵素は順方向および逆方向のいずれにおいてもアッセイすることができる。順方向反応においては、ヌクレオシドホスホリラーゼおよび 7 - メチルグアノシンにカップリングさせた場合の、Pi の生成を蛍光変化を用いてモニター観察し (5)；逆方向反応においては、PEP をピルベートキナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼとカップリングさせて、340 nm での吸光度 (NADH) の変化を検出した (6)。

【0094】

順方向反応においては、GLP は PEP についての拮抗阻害剤であるが、S3P に対する不拮抗阻害剤である (図 1)。

EPSP による順方向反応における生成物阻害は、EPSP が PEP および S3P の両方に対する拮抗阻害剤であることを示す (図 2)。

逆方向反応においては、GLP は EPSP に対して不拮抗阻害をもたらすが、Pi に対して非拮抗阻害をもたらす。

S 3 P による逆方向反応における生成物阻害は、S 3 P が E P S P に対して酵素を拮抗的に阻害することを示すが、P i に対しては不拮抗阻害剤であるのは明らかである（図4）。

【0095】

エス・ニューモニアエ E P S P シンターゼの阻害のパターンおよび対応する速度定数を表Iに要約する。

これらの結果に基づいて、本発明者らは、エス・ニューモニアエ E P S P シンターゼの順方向反応についてのランダムな逐次機構を提案する（スキーム3）；しかしながら、今回のデータは逆方向反応の機構を正確に指摘できるほど十分ではない。

除草剤のグリホサートは、エス・ニューモニアエ E P S P シンターゼの阻害剤である。順および逆方向反応の両方におけるグリホサートによる E P S P シンターゼの阻害は、定常状態の速度により特徴付けられる。

【0096】

両方向における酵素の生成物阻害もまた特徴付けられた。該結果は順方向反応におけるランダムな逐次機構を支持するが、逆方向反応における機構を仮定するにはさらなる実験を要する。

E P S P シンターゼに拮抗する多くの化合物をインビトロにてスクリーニングし、酵素の阻害を比較して示す。エス・ニューモニアエおよびイー・コリに対する M I C もまた、これらの化合物が活性な抗菌化合物であることを示した。これらの化合物の分析は該化合物が部位特異的に活性であり、ある化合物がシキメート - 3 - ホスフェート基質と拮抗することが明らかにされた。

【0097】

エス・ニューモニアエ E P S P シンターゼの阻害パターンおよび速度定数

反応方向	阻害剤対基質	阻害方法 ^a	K i (μ M)
順方向	G L P 対 P E P	拮抗阻害	2 . 8 ± 0 . 3
	G L P 対 S 3 P	不拮抗阻害	6 5 . 6 ± 2 . 7
	E P S P 対 P E P	拮抗阻害	3 2 9 ± 2 6
	E P S P 対 S 3 P	拮抗阻害	4 4 . 0 ± 2 . 4

逆方向	GLP対EPSP	拮抗阻害	625 ± 23
	GLP対Pi	非拮抗阻害	1136 ± 60
	S3P対EPSP	拮抗阻害	12.8 ± 2.1
	S3P対Pi	拮抗阻害	4936 ± 158

a: データをGraFitの式 (v 4 . 0 6、Erithacus Software Ltd.) に適合させて誤差などを修正して阻害方法を決定した。阻害パターンは各モデルについて該データに最も適合するものを示す。

【0098】

実施例2中の文献

- 1 . Haslam, E. (1 9 9 3) Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites, John Wiley, Chichester
- 2 . Amrhein, N. and Steinrucken, H. C. (1 9 8 0) Biochem. Biophys. Resm., Commun. 94、1207 - 1212
- 3 . Steinrucken, H. C. and Amrhein, N. (1 9 8 4) Eur. J. Biochem. 14, 351 - 357
- 4 . Du, W., Wallis, N. G., Mazzulla, M. J., Chalker, A. F., Zhang, L., Liu, W.-S., Kallender, H., and Payne, D. J. (1 9 9 9) manuscript submitted
- 5 . Webb, M. R. (1 9 9 2) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4884 - 4887
- 6 . Boocock, M. R. and Coggins, J. R. (1 9 8 3) FEBS Lett. 154, 127 - 133

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION
SMITHKLINE BEECHAM plc

<120> METHODS USING MECHANISMS OF ACTION OF
AroA

<130> GM50053

<140> TO BE ASSIGNED

<141> 2000-05-04

<150> US 60/133,070

<151> 1999-05-07

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1284

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

atgaaactaa aaacaaacat tcgccattta catggtatta tccgcgtccc aggtgacaag	60
tctatcagcc accgttccat tatcttttga agtttggtg aggggtgagac caaggtttat	120
gatattctgc gaggtgaaga cgttctttcg accatgcagg tttttcgtga ccttggtggt	180
gaaattgagg ataaagatgg ggttattacc gttcaagggt taggcatggc tggcttaaaa	240
gcgccgcaaa atgcccttaa tatgggaaat tctggcacct cgattcgcct gatttcaggt	300
gtccttgctg gtgcagatgt cgaagtagag atgtttggag atgatagtct ttccaaacgt	360
cctatggacc gtgtgaccct tccactgaaa aaaatgggag tcagcatctc agggcaaaact	420
gaacgagact tgcctcccct tcgcttaaaa gggacgaaaa acctaagacc tattcattat	480
gagttgccaa ttgcctctgc ccaagtcaag tcagccttga tgtttgcagc cttacaagct	540
aagggggagt cagttattat cgaaaaagag tacaccgta atcatactga agatatgttg	600
caacaatttg gtggtcattt aagtgtggat ggtaagaaaa tcacagtcca agggccacaa	660

```

aaattgacag gacagaaggt ggtcgtacca ggagatattt ccagtgcagc cttttggtta 720
gtcgcaggtt tgattgctcc aaattctcgt ctagtgctgc agaattgtgg gataaacgaa 780
actcgcaccg gtattattga tgtcattcgt gccatgggtg gaaaattgga aataactgaa 840
atcgatccag tcgctaaatc tgcaaccttg attgttgagt cttctgactt gaaaggaaca 900
gagatttggt gcgctttgat tccacgtttg attgatgaat tgcctattat tgccctactt 960
gcgacccaag cccaaggtgt aacagttatc aaggatgctg aggagctcaa ggtcaaggaa 1020
acagaccgta ttcaggttgt ggcagacgcc ttaaatagta tgggagcaga tattactcct 1080
acggcagatg ggatgattat caaaggaaaa tcagctcttc acggtgctag agtcaatacg 1140
tttggtgacc accgtatcgg catgatgaca gctatcgag ccctattggt tgcagatgga 1200
gaggtggagc ttgacctgc agaagccatc aataccagct atcctagttt ctttgatgat 1260
ttggagagct tgattcatgg ctaa 1284

```

<210> 2

<211> 427

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

```

Met Lys Leu Lys Thr Asn Ile Arg His Leu His Gly Ile Ile Arg Val
 1           5           10          15
Pro Gly Asp Lys Ser Ile Ser His Arg Ser Ile Ile Phe Gly Ser Leu
          20          25          30
Ala Glu Gly Glu Thr Lys Val Tyr Asp Ile Leu Arg Gly Glu Asp Val
          35          40          45
Leu Ser Thr Met Gln Val Phe Arg Asp Leu Gly Val Glu Ile Glu Asp
          50          55          60
Lys Asp Gly Val Ile Thr Val Gln Gly Val Gly Met Ala Gly Leu Lys
          65          70          75          80
Ala Pro Gln Asn Ala Leu Asn Met Gly Asn Ser Gly Thr Ser Ile Arg
          85          90          95
Leu Ile Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala Asp Phe Glu Val Glu Met Phe
          100         105         110
Gly Asp Asp Ser Leu Ser Lys Arg Pro Met Asp Arg Val Thr Leu Pro
          115         120         125
Leu Lys Lys Met Gly Val Ser Ile Ser Gly Gln Thr Glu Arg Asp Leu
          130         135         140
Pro Pro Leu Arg Leu Lys Gly Thr Lys Asn Leu Arg Pro Ile His Tyr
          145         150         155         160

```

Glu Leu Pro Ile Ala Ser Ala Gln Val Lys Ser Ala Leu Met Phe Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ala Lys Gly Glu Ser Val Ile Ile Glu Lys Glu Tyr Thr
 180 185 190
 Arg Asn His Thr Glu Asp Met Leu Gln Gln Phe Gly Gly His Leu Ser
 195 200 205
 Val Asp Gly Lys Lys Ile Thr Val Gln Gly Pro Gln Lys Leu Thr Gly
 210 215 220
 Gln Lys Val Val Val Pro Gly Asp Ile Ser Ser Ala Ala Phe Trp Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Leu Ile Ala Pro Asn Ser Arg Leu Val Leu Gln Asn Val
 245 250 255
 Gly Ile Asn Glu Thr Arg Thr Gly Ile Ile Asp Val Ile Arg Ala Met
 260 265 270
 Gly Gly Lys Leu Glu Ile Thr Glu Ile Asp Pro Val Ala Lys Ser Ala
 275 280 285
 Thr Leu Ile Val Glu Ser Ser Asp Leu Lys Gly Thr Glu Ile Cys Gly
 290 295 300
 Ala Leu Ile Pro Arg Leu Ile Asp Glu Leu Pro Ile Ile Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Ala Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Val Ile Lys Asp Ala Glu Glu Leu
 325 330 335
 Lys Val Lys Glu Thr Asp Arg Ile Gln Val Val Ala Asp Ala Leu Asn
 340 345 350
 Ser Met Gly Ala Asp Ile Thr Pro Thr Ala Asp Gly Met Ile Ile Lys
 355 360 365
 Gly Lys Ser Ala Leu His Gly Ala Arg Val Asn Thr Phe Gly Asp His
 370 375 380
 Arg Ile Gly Met Met Thr Ala Ile Ala Ala Leu Leu Val Ala Asp Gly
 385 390 395 400
 Glu Val Glu Leu Asp Arg Ala Glu Ala Ile Asn Thr Ser Tyr Pro Ser
 405 410 415
 Phe Phe Asp Asp Leu Glu Ser Leu Ile His Gly
 420 425

<210> 3

<211> 1245

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<220>

<221> unsure

<222> (482) (483) (484) (485) (486) (487) (488) (489) (490) (491) (492)
 (493) (494) (495) (496) (497) (498) (499)

<400> 3

```

agcttgatcg tcccagggtga caagtctatc agccaccgtt ccattatctt tggaagtttg      60
gctgaggggtg agaccaaggt ttatgatatt ctgcgaggtg aacacgttct ttcgaccatg      120
caggtttttc gtgaccttgg tgttgaaatt gaggataaag atggggttat taccgttcaa      180
ggtgtaggca tggctggctt aaaagcgcgc caaatgccc ttaatatggg aaattctggc      240
acctcgattc gcctgatttc aggtgtcctt gctggtgcag atttcgaagt agagatgttt      300
ggagatgata gtctttccaa acgtcctatg gaccgtgtga cccttccact gaaaaaaatg      360
ggcgtcagca tctcagggca aactgaacga gacttgccct cccttcgctt taaaaggagc      420
gaaaaacctt agacctattc attatgagtt gccaatggcc tctgcccagg tcaagtcagc      480
cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn taagggggag tcagttatta tcgaaaaaga gtacaccogt      540
aatcactactg aagatatgtt gcaacaattt ggtgggtcatt taagtgtgga tggtaagaaa      600
atcacagtcc aagggccaca aaaattgaca ggacagaagg tggctgtacc aggagatatt      660
tccagtgcag ccttttggtt agtcgcaggt ttgattgctc caaattctcg tctagtgtcg      720
cagaatgtgg ggataaacga aactcgcacc ggtattattg atgtcatteg tgccatgggt      780
ggaaaattgg aaataactga aatcgatcca gtcgctaaat ctgcaacctt gattgtgag      840
tcttctgact tgaaaggaac agagatttgt ggcgctttga ttccacgttt gattgatgaa      900
ttgcctatta ttgcctact tgcgacccaa gcccaagggt taacagttat caaggatgct      960
gaggagctca aggtcaagga aacagaccgt attcagggtg tggcagacgc cttaaatagt      1020
atgggagcag atattactcc tacggcagat gggatgatta tcaaaggaaa atcagctctt      1080
cacggtgcta gagtcaatac gtttggtgac caccgtatcg gcatgatgac agctatcgca      1140
gcctatttgg ttgcagatgg agaggtggag cttgaccgtg cagaagccat caataccagc      1200
taccctagtt tctttgatga tttggagagc ttgattcatg gctaa      1245

```

<210> 4

<211> 415

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<220>

<221> unsure

<222> (149) (161) (162) (163) (164) (165) (166) (167) (168)

<400> 4

Ser	Leu	Ile	Val	Pro	Gly	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	His	Arg	Ser	Ile	Ile
1				5				10					15		
Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Gly	Glu	Thr	Lys	Val	Tyr	Asp	Ile	Leu	Arg
			20					25					30		
Gly	Glu	His	Val	Leu	Ser	Thr	Met	Gln	Val	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Val
		35					40					45			
Glu	Ile	Glu	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Ile	Thr	Val	Gln	Gly	Val	Gly	Met
	50					55					60				
Ala	Gly	Leu	Lys	Ala	Pro	Gln	Asn	Ala	Leu	Asn	Met	Gly	Asn	Ser	Gly
65					70				75					80	
Thr	Ser	Ile	Arg	Leu	Ile	Ser	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Ala	Asp	Phe	Glu
			85					90						95	
Val	Glu	Met	Phe	Gly	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser	Lys	Arg	Pro	Met	Asp	Arg
		100						105					110		
Val	Thr	Leu	Pro	Leu	Lys	Lys	Met	Gly	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Gln	Thr
		115					120						125		
Glu	Arg	Asp	Leu	Pro	Pro	Leu	Arg	Phe	Lys	Arg	Asp	Glu	Lys	Pro	Lys
	130					135					140				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Xaa	Val	Ala	Asn	Cys	Leu	Cys	Pro	Ser	Gln	Val	Ser
145					150				155					160	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Gly	Glu	Ser	Val	Ile	Ile	Glu
			165					170					175		
Lys	Glu	Tyr	Thr	Arg	Asn	His	Thr	Glu	Asp	Met	Leu	Gln	Gln	Phe	Gly
		180						185					190		
Gly	His	Leu	Ser	Val	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Val	Gln	Gly	Pro	Gln
	195						200					205			
Lys	Leu	Thr	Gly	Gln	Lys	Val	Val	Val	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Ser	Ala
	210					215					220				
Ala	Phe	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Asn	Ser	Arg	Leu	Val
225					230				235					240	
Leu	Gln	Asn	Val	Gly	Ile	Asn	Glu	Thr	Arg	Thr	Gly	Ile	Ile	Asp	Val
			245					250					255		
Ile	Arg	Ala	Met	Gly	Gly	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Glu	Ile	Asp	Pro	Val
		260					265						270		
Ala	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Ile	Val	Glu	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr
	275						280					285			
Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Ile	Pro	Arg	Leu	Ile	Asp	Glu	Leu	Pro	Ile
	290					295					300				

```

Ile Ala Leu Leu Ala Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Val Ile Lys Asp
305                310                315                320
Ala Glu Glu Leu Lys Val Lys Glu Thr Asp Arg Ile Gln Val Val Ala
                325                330                335
Asp Ala Leu Asn Ser Met Gly Ala Asp Ile Thr Pro Thr Ala Asp Gly
                340                345                350
Met Ile Ile Lys Gly Lys Ser Ala Leu His Gly Ala Arg Val Asn Thr
                355                360                365
Phe Gly Asp His Arg Ile Gly Met Met Thr Ala Ile Ala Ala Leu Leu
                370                375                380
Val Ala Asp Gly Glu Val Glu Leu Asp Arg Ala Glu Ala Ile Asn Thr
                385                390                395                400
Ser Tyr Pro Ser Phe Phe Asp Asp Leu Glu Ser Leu Ile His Gly
                405                410                415

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 順方向反応におけるGLPによるEPSPシンターゼの阻害を示す。パネルA：S3P（1mM）を固定して測定したPEPに対する拮抗阻害；[GLP] = 0（白丸）、0.5 μM（黒丸）、3 μM（白四角）および6 μM（黒四角）。パネルB：PEP（1mM）を固定して測定したS3Pに対する拮抗阻害；[GLP] = 0（白丸）、25 μM（黒丸）、50 μM（白四角）および100 μM（黒四角）。

【図2】 順方向反応におけるEPSPによるEPSPシンターゼの阻害を示す。パネルA：S3P（1mM）を固定して測定したPEPに対する拮抗阻害；[EPSP] = 0（白丸）、50 μM（黒丸）、100 μM（白四角）、200 μM（黒四角）および400 μM（白三角）。パネルB：PEP（1mM）を固定して測定したS3Pに対する拮抗阻害；[EPSP] = 0（白丸）、25 μM（黒丸）、50 μM（白四角）、75 μM（黒四角）および100 μM（白三角）。

【図3】 逆方向反応におけるGLPによるEPSPシンターゼの阻害を示す。パネルA：Pi（10mM）を固定して測定したEPSPに対する混合阻害；[GLP] = 0（白丸）、0.25 mM（黒丸）、0.5 mM（白四角）、0.75 mM（黒四角）および1 mM（白三角）。パネルB：EPSP（0.5m

M)を固定して測定した P_i に対する混合阻害； $[GLP] = 0$ (白丸)、 0.1 mM (黒丸)、 0.5 mM (白四角)および 1 mM (黒四角)。

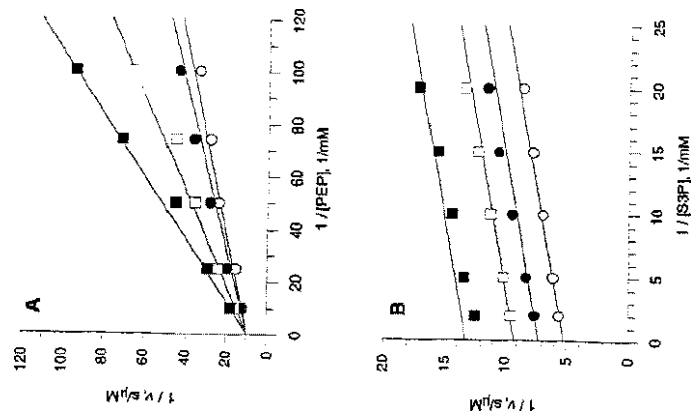
【図4】 逆方向反応における S_3P による $EPSP$ シンターゼの阻害を示す。パネルA： P_i (10 mM)を固定した $EPSP$ に対する拮抗阻害； $[S_3P] = 0$ (白丸)、 0.1 mM (黒丸)、 0.25 mM (白四角)および 0.5 mM (黒四角)。パネルB： $EPSP$ (0.5 mM)を固定した P_i に対する不拮抗阻害； $[S_3P] = 0$ (白丸)、 0.1 mM (黒丸)、 0.25 mM (白四角)および 0.5 mM (黒四角)。

【図5】 各スキーム1および2において、 $EPSP$ シンターゼ触媒作用反応および PEP オキソニウムイオンの形成を示す。

【図6】 スキーム3において、エス・ニューモニア $EPSP$ シンターゼの順方向反応について提案されている機構を示す。

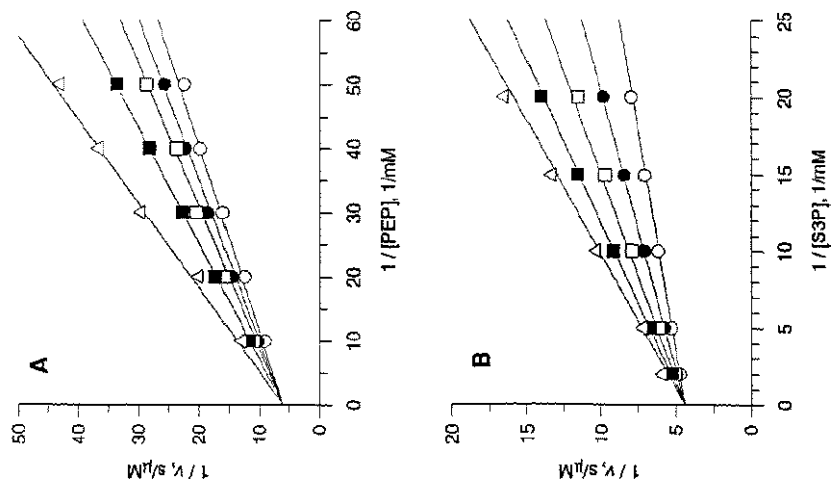
【図1】

Figure 1



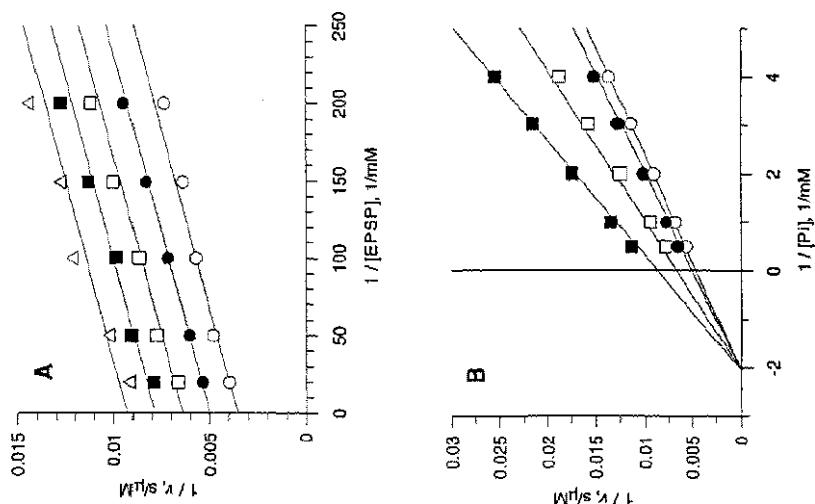
【図2】

Figure 2



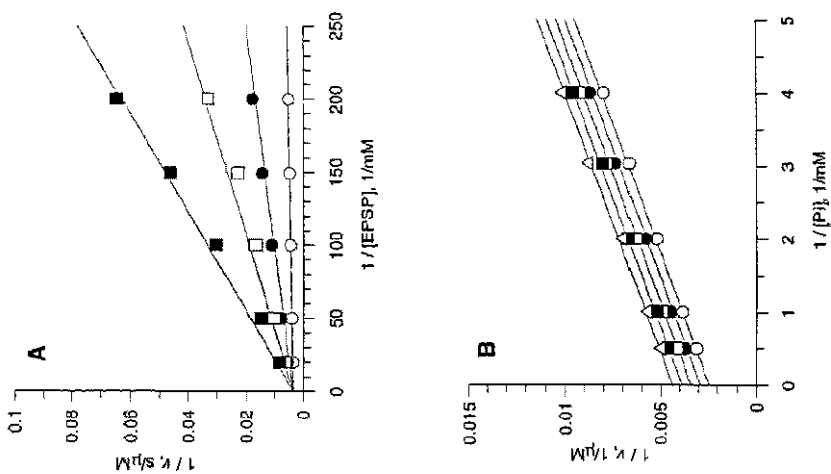
【図3】

Figure 3



【図4】

Figure 4

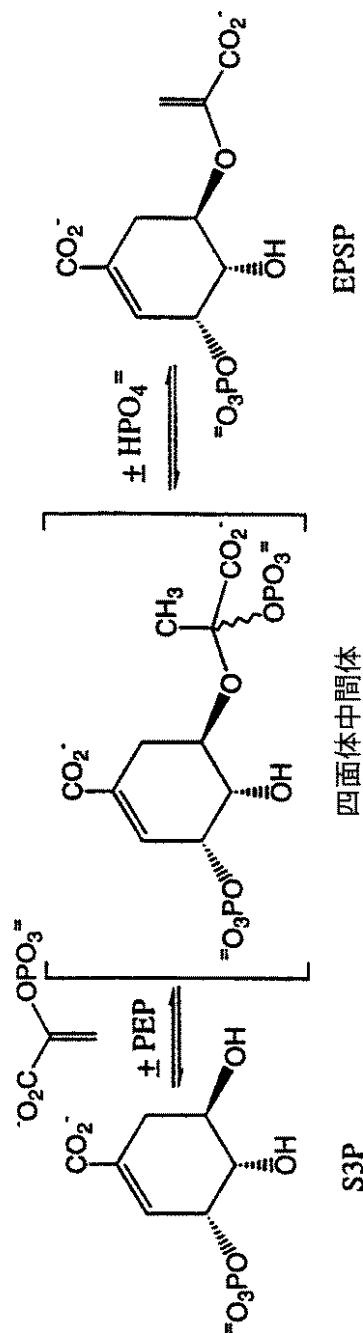


【図5】

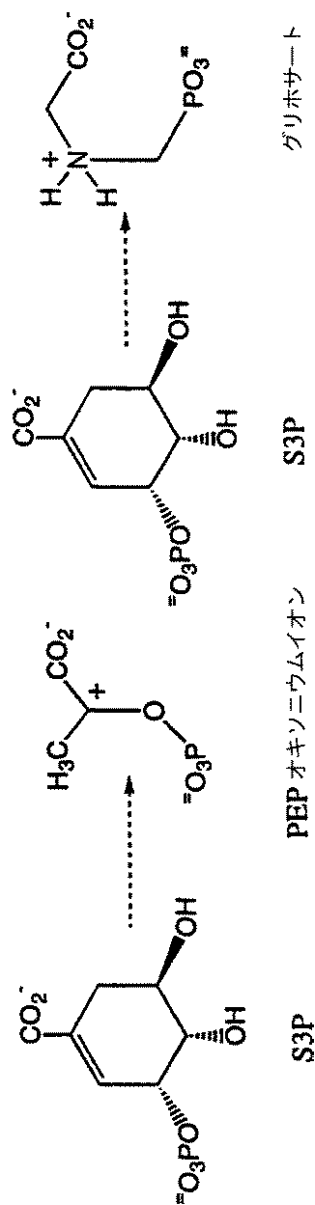
Figure 5

スキーム1および2

スキーム1 EPSPシンターゼ触媒作用性反応



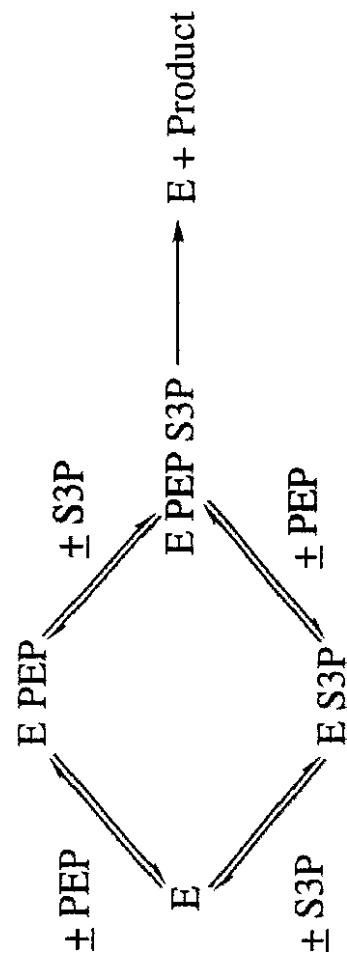
スキーム2 触媒作用の間に一時的に形成されるPEPオキシニウムイオンおよびグリホサートについて提案されている遷移状態アナロジ—



【図6】

Figure 6

Scheme 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/12251
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C12P 21/06; C12N 1/20, 15/00 US CL : 536/23.1, 23.7; 435/69.1, 69.2, 252.3, 320.1 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) U.S. : 536/23.1, 23.7; 435/69.1, 69.2, 252.3, 320.1 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) West and STN files : medline, caplus, uspatfull, biosis, scisearch - search terms : aroA gene? and streptococcus pneumoniae.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US, 5,883,239A (BROWN ET AL.) 16 March 1999 (16.3.1999), see entire document, especially the abstract.	1-12, 14, 16, 21-42
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims) 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 25 JULY 2000		Date of mailing of the international search report 10 AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer TEKCHNAR SAIDHA Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/12251

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

This international 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:

Please See Extra 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.:
1-12, 14, 16 & 21-42
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/US00/12251

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-12, drawn to polynucleotide encoding *aroA* polypeptide, vector host cells and method of making the polypeptide.

Group II, claim(s) 13, drawn to antibody against the polypeptide of claim 11.

Group III, claim(s) 14, 16 & 21-42, drawn to antagonists and method of use.

Group IV, claim(s) 15 drawn to a method of treatment using *aroA*.

Group V, claim(s) 17, drawn to Process of diagnosing a disease.

Group VI, claim(s) 18, drawn to polypeptide inhibitors

Group VII, claims 19-20, drawn to a method of inducing an immunological response.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The Polynucleotide of Group I and the antibody of Group II do not require each other for their practice, have separate utilities, such as the polynucleotide of Group I can be used for recombinant expression of the *aroA* polypeptide versus the use of antibody to detect proteins. Group I has a special technical feature of nucleotide sequence encoding *aroA* which Groups II-VII do not share; Group II has the special technical feature of an antibody which Group I and III-VII do not share. Group III has the special technical feature of an antagonist, which Groups I-II and Groups IV-VII do not share; Group IV has the special technical feature of an a treatment based upon *aroA* polypeptide, which Groups I-III and Groups V-VII do not share; Group V has the special technical feature of a process for diagnosis of disease based upon expression of protein, which Groups I-IV and Groups VI-VII do not share; Group VI has the special technical feature of an of a method for identifying compounds which inhibit polypeptide activity, which Groups I-V and Groups VII do not share; Group VII has the special technical feature of a method for inducing an immunological response, which Groups I-VI do not share.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)
A 6 1 P	27/16	C 0 7 K 16/40	4 H 0 4 5
	31/04	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K	16/40		1/19
C 1 2 N	1/15		1/21
	1/19		9/10
	1/21	G 0 1 N 33/15	Z
	5/10		Z
	9/10		D
G 0 1 N	33/15		M
	33/50		
	33/53		1 0 3
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/566	A 6 1 K 37/02	
	37/00	C 1 2 N 5/00	A
(71)出願人	スミスクライン ビーチャム パブリック リミテッド カンパニー SmithKline Beecham p . l . c . イギリス国 ティダブリュ8 9 ジーエ ス , ミドルセックス , プレントフォード , グレート ウェスト ロード 980		
(72)発明者	ジェイムズ・アール・ブラウン アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州バ ーウィン、ロビンズ・レイン9番		
(72)発明者	アリソン・エフ・チョーカー アメリカ合衆国19426ペンシルベニア州ト ラップ、カレッジ・ウッズ、ハーバード・ ドライブ137番		
(72)発明者	リサ・ケイ・カツ アメリカ合衆国18940ペンシルベニア州ニ ュータウン、イースト・パーク・ロード6 番		
(72)発明者	マリー・ジーン・マズラ アメリカ合衆国19426ペンシルベニア州カ レッジビル、グリーンズ・ウェイ・サーク ル2029番		
(72)発明者	デイビッド・ジェイ・ペイン アメリカ合衆国19460ペンシルベニア州フ ェニックスビル、ウォーターフォール・ウ ェイ618番		
(72)発明者	クリストファー・エム・トレイニ アメリカ合衆国19063ペンシルベニア州メ ディア、ポッター・コート50番		

(72)発明者 ドウ・ウェンシェン
アメリカ合衆国19453ペンシルベニア州モ
ント・クレア、メドービュー・レイン406
番

F ターム(参考) 2G045 AA28 AA34 AA35 CA25 CA26
CB03 CB04 CB07 CB09 CB13
CB14 CB21 DA12 DA13 DA14
DA36 DA80 FB02 FB03 FB04
4B024 AA01 AA11 AA20 BA10 CA02
DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
GA11
4B050 CC03 DD02 LL01
4B065 AA01X AA49Y AA57X AA87X
AB01 AC14 BA02 CA29 CA44
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA22
CA53 CA56 CA59 MA63 MA66
NA14 ZA331 ZA341 ZA591
ZB351 ZC781
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA75
EA20 EA31

专利名称(译)	使用aroA的动作机制的方法		
公开(公告)号	JP2002543776A	公开(公告)日	2002-12-24
申请号	JP2000616217	申请日	2000-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公司 史克必成公共有限公司		
[标]发明人	ジェイムズアールブラウン アリソンエフチョーカー リサケイカツ マリージーンマズラ デイビッドジェイペイン クリストファーエムトレイニ ドウエンシェン		
发明人	ジェイムズ・アール・ブラウン アリソン・エフ・チョーカー リサ・ケイ・カツ マリー・ジーン・マズラ デイビッド・ジェイ・ペイン クリストファー・エム・トレイニ ドウ・ウエンシェン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61P11/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07K14/315 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/10 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/53 A61P11/00 A61P27/02 A61P27/16 C07K14/3156		
FI分类号	A61K45/00 A61P11/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/10 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.103 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB09 2G045/CB13 2G045/CB14 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA80 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA10 4B024/CA02 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/LL01 4B065/AA01X 4B065/AA49Y 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA29 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA591 4C084/ZB351 4C084/ZC781 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA31		
优先权	60/133070 1999-05-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了编码aroA多肽的aroA多核苷酸和DNA (RNA) , 以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还提供了一种利用aroA来筛选抗微生物化合物的方法。

