

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-120050

(P2005-120050A)

(43) 公開日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/08</b>	C07K 7/08 ZNA	4C084
<b>A01N 37/46</b>	A01N 37/46	4C086
<b>A01N 63/00</b>	A01N 63/00 A	4H011
<b>A61K 38/00</b>	A61P 31/04	4H045
<b>A61P 31/04</b>	A61K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-359002 (P2003-359002)	(71) 出願人	000003034 東亜合成株式会社 東京都港区西新橋1丁目14番1号
(22) 出願日	平成15年10月20日 (2003.10.20)	(71) 出願人	501046958 高麗 寛紀 徳島県徳島市川内町富吉230-2
特許法第30条第1項適用申請有り		(72) 発明者	高麗 寛紀 徳島県徳島市川内町富吉230-2
		(72) 発明者	前田 拓也 徳島県徳島市南常三島町1-4-1 グラン ヴィア常三島904号
		(72) 発明者	長宗 秀明 徳島県徳島市昭和町1-35
		(72) 発明者	小林 菜穂子 徳島県徳島市国府町日開57

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗菌性ペプチドとその利用

(57) 【要約】

【課題】

本発明は、従前の抗菌性ペプチド含有抗菌剤の開発アプローチによらず、自然界において抗菌性ペプチドとして存在し機能しているペプチドとは異なるアミノ酸配列の抗菌性ペプチド及び該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することを目的の一つとする。また、そのような抗菌性ペプチドを含有する抗菌剤の提供を目的の一つとする。

【解決手段】

一般式(1)で表される抗菌性ペプチドである。



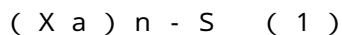
式(1)のXaは親水性アミノ酸残基であり、nは1~4の整数あり、Sは疎水性アミノ酸部-塩基性アミノ酸部-ブリッジ部-塩基性アミノ酸部-疎水性アミノ酸部で表されペプチドであり、ブリッジ部のアミノ酸残基としては疎水性のアミノ酸および中性のアミノ酸から選ばれるものである。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般式(1)で表される抗菌性ペプチド。



式(1)のXaは親水性アミノ酸残基であり、nは1~6の整数あり、Sは疎水性アミノ酸部・塩基性アミノ酸部・ブリッジ部・塩基性アミノ酸部・疎水性アミノ酸部で表されペプチドであり、ブリッジ部のアミノ酸残基としては疎水性のアミノ酸および中性のアミノ酸から選ばれるものである。

## 【請求項 2】

一般式(1)の親水性アミノ酸はアルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれるものであり、

疎水性アミノ酸部はアミノ酸残基数が2~6のものであり、疎水性アミノ酸部のアミノ酸としてはバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、グリシン、アラニンおよびメチオニンから選ばれるものであり、2ヶ所にある疎水性アミノ酸部のアミノ酸残基が異なっても同一でもよく、疎水性アミノ酸部のアミノ酸残基数が異なっても同一でもよく、

塩基性アミノ酸部はアミノ酸残基数が2~6のものであり、2ヶ所ある塩基性アミノ酸部のアミノ酸残基が異なっても同一でもよく、塩基性アミノ酸部のアミノ酸残基数が異なっても同一でもよく、

ブリッジ部はアミノ酸残基数が2~6のものであり、ブリッジ部の疎水性のアミノ酸および中性のアミノ酸としてはバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、アラニン、メチオニン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれるものである。

## 【請求項 3】

配列番号1、配列番号2または配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる抗菌性ペプチド。

## 【請求項 4】

請求項3に記載の抗菌ペプチドを含有する抗菌剤または消毒剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は人為的に設計され合成した抗菌性ペプチドに関する。また、当該抗菌性ペプチドを含有する抗菌剤または殺菌剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

抗菌性ペプチドは幅広い抗菌スペクトルを有し、薬剤耐性菌が出現し難いと考えられていることから、ヒト及び動物の細菌感染性疾患の予防や治療、或いは、食材等の物品に抗菌性を付与する目的に抗菌性ペプチドの利用が期待されている。

## 【0003】

これまでに多くの抗菌性ペプチドが動植物から単離されている。例えば、台湾カブトムシ由来の抗菌性ペプチド及び当該抗菌性ペプチドを有効成分とする抗菌剤が開示されている(特許文献1参照)。また、サソリ毒由来の抗菌性ペプチド及び当該抗菌性ペプチドを有効成分とする抗菌剤が開示されている(例えば特許文献2参照)。

## 【0004】

上記記載の抗菌性ペプチドは、いずれもリジン、アルギニンおよび/またはヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を含むもので、ペプチド分子全体の電荷が正となるカチオン性抗菌性ペプチドと呼ばれるものである。これら抗菌性ペプチドの作用原理は、抗菌性ペプチド中の正に荷電した塩基性アミノ酸部分が菌表面の膜と静電相互作用することによるものと考えられている(例えば、非特許文献1参照)。

## 【0005】

10

20

30

40

50

上記の各公報に記載の抗菌性ペプチドは、何れも自然界において元々抗菌性ペプチドとして存在していたものを発見し単離したもの（或いは天然型抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を一部改変したペプチド）である。従って、本来的に抗菌性ペプチドとして存在するペプチドを主成分とする限り、自然界において元来そのペプチドが奏していた抗菌活性や抗菌スペクトルを上回る抗菌性能を有する抗菌剤を開発することは一般に困難である。

【0006】

先行文献

【特許文献1】特開2000-063400号公報（特許請求の範囲）

【特許文献2】特開2001-186887号公報（特許請求の範囲）

【非特許文献1】M. Zaslouff、Nature、2002年、415巻、p. 389 - 395 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、従前の抗菌性ペプチド含有抗菌剤の開発アプローチによらず、自然界において抗菌性ペプチドとして存在し機能しているペプチドとは異なるアミノ酸配列の抗菌性ペプチド及び該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することを目的の一つとする。また、そのような抗菌性ペプチドを含有する抗菌剤の提供を目的の一つとする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、鋭意研究をすすめた結果、一般式(1)で表される抗菌性ペプチドが抗菌性をさらに向上できることを見出し、本発明を完成するに至った。



式(1)のXaは親水性アミノ酸残基であり、nは1~6の整数あり、Sは疎水性アミノ酸部-塩基性アミノ酸部-ブリッジ部-塩基性アミノ酸部-疎水性アミノ酸部で表されペプチドであり、ブリッジ部のアミノ酸残基としては疎水性のアミノ酸および中性のアミノ酸から選ばれるものである。

一般式(1)の親水性アミノ酸はアルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれるものである。

疎水性アミノ酸部はアミノ酸残基数が2~6のものであり、疎水性アミノ酸部のアミノ酸としてはバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、グリシン、アラニンおよびメチオニンから選ばれるものであり、2ヶ所にある疎水性アミノ酸部のアミノ酸残基が異なっても同一でもよく、疎水性アミノ酸部のアミノ酸残基数が異なっても同一でもよい。 30

一般式(1)の塩基性アミノ酸部はアミノ酸残基数が2~6のものであり、2ヶ所ある塩基性アミノ酸部のアミノ酸残基が異なっても同一でもよく、塩基性アミノ酸部のアミノ酸残基数が異なっても同一でもよい。

一般式(1)のブリッジ部はアミノ酸残基数が2~6のものであり、ブリッジ部の疎水性のアミノ酸および中性のアミノ酸としてはバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、アラニン、メチオニン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれるものである。 40

【発明の効果】

【0009】

本発明の抗菌性ペプチドからなる抗菌剤若しくは消毒剤又は本発明の抗菌性ペプチドを含有する抗菌剤若しくは消毒剤は、高い抗菌性を有することから細菌感染症の予防や食材等の消毒・殺菌等に有用である。

また、本発明の抗菌性ペプチドをコードするヌクレオチド配列及び/又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含むか或いはそれら配列により実質的に構成されるポリヌクレオチド(DNAセグメント又はRNAセグメントの形態であり得る)から組換え蛋白質を提供することができる。この組換え蛋白質又は抗菌活性を有するこの分解物は、細菌感染症 50

の予防や食材等の消毒・殺菌等に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明の好適な実施形態を説明する。なお、本明細書において特に言及している事項（例えば抗菌性ペプチドの一次構造や鎖長）以外の事柄であって本発明の実施に必要な事柄（例えばペプチド合成、ポリヌクレオチド合成およびペプチドを成分とする薬剤の調製に関する一般的な事項）は、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、薬学および医学等の分野における当業者が容易に把握され得るものである。本発明は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて当業者が容易に実施することができる。なお、以下の説明では、アミノ酸をIUPAC-IUBガイドラインで示されたアミノ酸に関する命名法に準拠した1文字表記（但し配列表では3文字表記）で表す。

10

【0011】

ここで「ペプチド」とは、ペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーを指す用語であり、ペプチドに含まれるアミノ酸残基の数は限定されない。アミノ酸残基数が10未満の所謂オリゴペプチドも本明細書におけるペプチドに包含される。また、「ポリヌクレオチド」とは、複数のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で結ばれたポリマー（核酸）を指す用語であり、ヌクレオチドの数によって限定されない。種々の長さのDNAフラグメント及びRNAフラグメントが本明細書におけるポリヌクレオチドに包含される。

【0012】

本発明の発明者らは、従前の抗菌性ペプチドの開発アプローチによらず、自然界において抗菌性ペプチドとして存在し機能しているペプチドとは異なるアミノ酸配列の抗菌性ペプチドを提供することを目的として研究を行ってきた。この結果、ビス型第4アンモニウム塩の構造的特徴、即ち、分子中に2箇所の塩基性部分を持つこと、分子の構造が左右対称性であること、および両末端が疎水性であるという特徴を抗菌性ペプチドの分子設計に取り入れることで、高い抗菌活性を発揮し、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、及びMRSA等の薬剤耐性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有する抗菌性ペプチドを実現できることを見出した（特願2002-344538号）。本発明の発明者らは、この抗菌性ペプチドの抗菌性を更に向上させるため研究を続けた結果、この抗菌性ペプチドの一方の末端に、1～6個の親水性のアミノ酸残基のものを付加させたものがこの性能を有することを見出し、本発明を完成させたものである。

20

30

【0013】

本発明の抗菌性ペプチドにおける親水性アミノ酸とはアルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミンから選ばれるものであり、好ましくはアルギニン、リジンまたはヒスチジンであり、更に好ましくはアルギニンまたはリジンである。式(1)のnは1～6の整数であり、好ましくは1～4の整数であり、更に好ましくは1～3である。

【0014】

本発明の抗菌性ペプチドにおける疎水性アミノ酸部とはアミノ酸残基数が2～6のものであり、好ましくは2～3であり、当該アミノ酸としてはバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、グリシン、アラニンおよびメチオニンなどがあげられ、好ましくはバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンおよびアラニンであり、更に好ましくはバリン、ロイシン、イソロイシンおよびアラニンである。本発明の抗菌性ペプチドには疎水性アミノ酸部が2ヶ所あり、この2ヶ所におけるアミノ酸残基数は異なっても同一でもよく、好ましくは同一であり、アミノ酸配列は異なった配列でも同一配列でも逆配列でもよく、好ましくは逆配列である。

40

【0015】

本発明の抗菌性ペプチドにおける塩基性アミノ酸部とはアミノ酸残基数が2～6のものであり、好ましくは2～3であり、当該アミノ酸としてはリジン、アルギニンおよびヒスチジンであり、好ましくはリジンおよびアルギニンである。本発明の抗菌性ペプチドには

50

塩基性アミノ酸部が2ヶ所あり、この2ヶ所におけるアミノ酸残基数は異なっても同一でもよく、好ましくは同一であり、アミノ酸配列は異なった配列でも同一配列でも逆配列でもよく、好ましくは逆配列である。

**【0016】**

本発明の抗菌性ペプチドにおけるブリッジ部とはアミノ酸残基数が2～6のものであり、好ましくは3～4であり、当該アミノ酸としては疎水性のアミノ酸および中性のアミノ酸が挙げられ、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、アラニン、メチオニン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンなどが例示でき、好ましくはフェニルアラニン、トリプトファン、セリン、トレオニンまたはメチオニンであり、更に好ましくはトリプトファンまたはメチオニンである。

10

**【0017】**

本発明の抗菌性ペプチドは、L型アミノ酸残基でもD型アミノ酸残基でもDL混合のアミノ酸残基のものでも良く、抗菌性ペプチドの全てのアミノ酸残基がL型アミノ酸であるものが好ましく、更にこの一部がD型アミノ酸残基のものがペプチド分解酵素に対し安定性があることから好ましい。また、抗菌活性を失わない限りにおいて、アミノ酸残基の一部又は全部が抗原になり難いという観点から直鎖状又はヘリックス状のものが好ましい。このような形状のペプチドはエピトープを構成し難い。かかる観点から、抗菌剤に適用するペプチドとしては、直鎖状が好ましい。また、本発明の抗菌性ペプチドはアミノ酸残基数が11～30であり、好ましくは12～20のものである。

20

本発明の抗菌性ペプチドのN末端及び/又はC末端を化学修飾すること、例えばN末端のアシル化又はC末端のアミド化を行うことも抗菌力を高めることに有効である。

**【0018】**

本発明の抗菌性ペプチドの具体例として、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列から実質的に構成されるペプチドが挙げられる。これら3種のペプチドは、何れも30アミノ酸以下(具体的には12～14アミノ酸)で構成されており、直鎖形状を維持するのに好適である。また、免疫原性も低いために抗菌剤の主成分(抗菌成分)として好適である。

**【0019】**

本発明の抗菌性ペプチドは、一般的な化学合成法に準じて容易に製造することができる。例えば、従来公知の固相合成法又は液相合成法のいずれを採用してもよい。アミノ基の保護基としてBoc(t-butyloxycarbonyl)、或いはFmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)を適用した固相合成法が好適である。

30

本発明の抗菌性ペプチドは、市販のペプチド合成機(例えば、Applied Biosystems社等から入手可能である。)を用いた固相合成法により、所望するアミノ酸配列、修飾(C末端アミド化等)部分を有するペプチド鎖を合成することができる。

**【0020】**

或いは、遺伝子工学的手法に基づいて本発明の抗菌性ペプチドを生合成により作製してもよい。このアプローチは、比較的鎖長の長い抗菌性ペプチドを製造する場合に好適である。すなわち、所望する抗菌性ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列(ATG開始コドンを含む)のDNAを合成する。そして、このDNAと該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント(プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメントを包含する)とから成る発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを、宿主細胞に応じて構築する。

40

一般的な技法によって、この組換えベクターを所定の宿主細胞(例えばイースト、昆虫細胞、植物細胞、動物(哺乳類)細胞)に導入し、所定の条件で当該宿主細胞又は該細胞を含む組織や個体を培養する。このことにより、目的とする抗菌性ペプチドを細胞内で発現、生産させることができる。そして、宿主細胞(分泌された場合は培地中)から抗菌性ペプチドを単離し、精製することによって、目的の抗菌性ペプチドを得ることができる。

50

## 【0021】

本発明の抗菌性ペプチドをコードするヌクレオチド配列及び/又は該配列と相補的なヌクレオチド配列から実質的に構成されるポリヌクレオチドは、従来公知の方法によって容易に製造(合成)することができる。すなわち、抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を構成する各アミノ酸残基に対応するコドンを選択し、抗菌性ペプチドのアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列が容易に決定される。ひとたびヌクレオチド配列が決定されれば、DNA合成機等を利用して、所望するヌクレオチド配列に対応するポリヌクレオチド(一本鎖)を容易に得ることができる。さらに得られた一本鎖DNAを鋳型として用い、種々の酵素的合成手段を採用して目的の二本鎖DNAを得ることができる。

本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、RNA(mRNA等)の形態であってもよく、DNAの形態であってもよい。DNAは、二本鎖又は一本鎖で提供され得る。一本鎖で提供される場合は、コード鎖(センス鎖)であってもよく、それと相補的な配列の非コード鎖(アンチセンス鎖)であってもよい。

本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、種々の宿主細胞中で本発明の抗菌性ペプチドを発現させるための組換え遺伝子(発現カセット)を構築するための材料として使用することができる。

## 【0022】

例えば、本発明に係る抗菌性ペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと、該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント(プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメント等を包含する。)とを用いて外来ペプチド発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを構築することができる。ベクターの構成やその構築に使用される調節エレメントの種類は、目的とする宿主細胞のタイプに依存して異なり得る。組換えベクターの構築には、遺伝子工学分野でよく理解されている種々の制限酵素によるポリヌクレオチド切断技法(restriction)やポリヌクレオチド断片連結技法(ligation)が採用される。これら技法は、市販されている種々の装置類を利用することによって容易に行うことができる。

なお、組換えベクターの構築方法及び構築した組換えベクターの宿主細胞への導入方法等は、当該分野で従来から行われている方法をそのまま採用すればよく、かかる方法自体は特に本発明を特徴付けるものではないため、詳細な説明は省略する。

## 【0023】

本発明の抗菌ペプチドは、広い抗菌スペクトルを有していることから、抗菌剤、殺菌剤、消毒剤、防腐剤、防臭剤などの成分として好適に用いられる。例えば、細菌感染症の治療、創傷面の消毒、眼病予防、口腔内洗浄(例えばうがい)や練り歯磨き用の抗菌剤または殺菌剤、化粧品の防腐剤、コンタクトレンズの保存、食品の防腐剤や鮮度保持剤、台所用品、浴室用品およびトイレ用品などの静菌剤または殺菌剤、家具や衛生機器表面の殺菌剤または静菌剤などに用いることができる。また、衣類やカーテンなどの繊維製品の静菌剤または殺菌剤、壁や床の静菌剤または殺菌剤、さらには各種用水例えば工業用水、ビル管理用水および浴用水などの殺菌剤、静菌剤または防腐剤などに用いることができる。また、抗菌または殺菌作用から防臭効果も期待できる。更に、農業分野での静菌剤または殺菌剤として、例えば作物や農業資材に対する農薬などとして使用できる。また、畜産・養蜂業分野での静菌剤または殺菌剤として、例えば畜産飼料の防腐剤として、養蜂箱の静菌剤または殺菌剤などに用いることができる。また、漁業分野での静菌剤または殺菌剤として、例えば養魚場において細菌に感染した魚の治療、網や手袋などの資材の殺菌などに用いることができる。

## 【0024】

本発明の抗菌ペプチドを含有する抗菌剤の形態に関して特に限定はない。例えば、内用剤および外用剤の典型的な形態として、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセル、軟膏、クリームなどが挙げられる。また、注射などに用いるため、使用直前に生理食塩水などに溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物、造粒物

10

20

30

40

50

とすることもできる。

【0025】

本発明の抗菌ペプチドを含有する抗菌剤などの製剤において、他の担体すなわち副次的成分（製薬上許容されるもの）としては、抗菌剤などの用途や形態に応じて適宜異なり得るが、種々の充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、賦形剤、色素、香料など一般的に製剤として製造するとき用いるものが使用できる。

なお、本発明の抗菌ペプチドおよび種々の担体を材料にして上記形態の各種薬剤を調製するプロセス自体は公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本発明を特徴付けるものでもないため詳細な説明は省略する。

【0026】

本発明の抗菌ペプチドによって提供される抗菌剤は、その形態および目的に応じた方法や用量で使用することができる。例えば、液剤は、静脈内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内への注射によって投与することができる。また、錠剤などの固体形態のものは経口投与することができる。このときの投与量は、目的とする菌に対する抗菌活性から算出することができる。

また、衛生陶器表面の消毒（殺菌）や食品の防腐目的に使用する場合は、比較的多量（例えば1～100mg/ml）の本発明の抗菌ペプチドを含有する液剤を対象物の表面に直接スプレーするか、或いは、当該液剤で濡れた布や紙で対象物の表面を拭くことにより行うことができる。これらは例示にすぎず、従来 of 抗菌剤による農薬、医薬部外品などの抗菌剤や消毒剤と同じ形態、使用方法を適用することができる。

【0027】

例えば、放射線治療を受けているガン患者やエイズ患者は、免疫不全症を合併症として発症し、本来の疾病それ自体の原因であることよりも細菌感染により重篤な症状をきたすことがある。本発明によって提供される抗菌ペプチドは、細菌に選択的に抗菌作用を示すとともにヒトなどの哺乳動物に対しては毒性を有しない。このため、本発明に係る抗菌ペプチドは、抗菌剤の成分として有用であり、本発明によって提供される抗菌剤は人体に対して安全に適用することができる。

【0028】

再生医療の分野において、皮膚、骨、各種の臓器などの培養時における細菌感染を防止することを目的として本発明の抗菌ペプチドを用いることができる。例えば、適当な濃度で本発明の抗菌ペプチド単独または当該ペプチドを成分の一つとする抗菌剤を培養液中に添加することにより、培養中の組織や臓器などの細菌感染を防止することができる。

【0029】

また、培養細胞や培養組織に対して、本発明の抗菌ペプチドをコードするポリヌクレオチドを遺伝子治療に使用する素材として用いることができる。例えば、本発明の抗菌ペプチドをコードする遺伝子（DNAセグメントまたはRNAセグメント）を適当なベクターに組み込み、目的とする培養組織（細胞）に導入することにより、常時或いは所望する時期に培養組織（細胞）内で、本発明の抗菌ペプチドを発現させることが可能となる。従って、本発明の抗菌ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNAセグメントまたはRNAセグメント）は、培養組織（細胞）の細菌感染を防止する薬剤として有用である。

【0030】

本発明の抗菌ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、いわゆる遺伝子治療に使用する素材として用いることができる。例えば、本発明の抗菌ペプチドをコードする遺伝子（DNAセグメントまたはRNAセグメント）を適当なベクターに組み込み、目的とする部位に導入することにより、常時生体（細胞）内で本発明の抗菌ペプチドを発現させることが可能となる。従って、本発明の抗菌ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNAセグメントまたはRNAセグメント）は、上述した患者などに対し、細菌感染を予防または治療する薬剤として有用である。

【0031】

<実施例>

10

20

30

40

50

以下に説明する実施例によって、本発明を更に詳細に説明するが、本発明をかかると実施例に示すものに限定することを意図したものではない。

【実施例 1】

【0032】

抗菌性ペプチドの合成

サンプル 1 ~ 3 および比較例 1 の 4 種類のペプチドを後述するペプチド合成機を用いて製造した。下記に、これらペプチドのアミノ酸配列を列挙する。

【0033】

試料名	アミノ酸配列	総アミノ酸残基数
サンプル 1	R L L R K W W W K R L L (配列番号 1)	12
サンプル 2	R R L L R K W W W K R L L (配列番号 2)	13
サンプル 3	R R R L L R K W W W K R L L (配列番号 3)	14
比較例 1	L L R K W W W K R L L (配列番号 4)	11

10

【0034】

上述した各ペプチド(個々のアミノ酸配列は配列表を参照)は、市販のペプチド合成機(ABI 433A peptide synthesizer (Applied Biosystems社製品))を用いてFastMoc<sup>TM</sup> protocolに従い固相合成法(Fmoc法)により合成した。なお、縮合剤としてHATU(Applied Biosystems社製品)を使用し、固相合成法に用いた樹脂及びアミノ酸はNOVA biochem社から購入した。また、用いたFmoc-アミノ酸の内、Lysの保護基にはtert-butoxycarbonyl (Boc)、Hisの保護基にはtriphenylmethyl (Trt)、Argの保護基にはpentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc)を使用した。

20

アミノ酸配列のC末端をアミド化する場合には、固相担体として「Fmoc-PAL-Polyethylen(PEG-PS)樹脂」を使用した。

而して、上記ペプチド合成機の合成プログラムに準じて脱保護基反応及び縮合反応を反復して樹脂に結合するFmoc-アミノ酸からペプチド鎖を伸長していき、目的の鎖長の合成ペプチドを得た。具体的には、20%ピペリジン/ジメチルホルムアミド(DMF)(ペプチド合成用グレード、関東化学(株)製品)によって、アミノ酸のアミノ保護基であるFmocを切断除去し、DMFで洗浄し、Fmoc-アミノ酸(-OH)各3eqを反応させ、DMFで洗浄する操作を反復した。そして、ペプチド鎖の伸長反応が全て終了した後、20%ピペリジン/DMFによりFmoc基を切断し、DMF、メタノールの順で上記反応物を洗浄した。側鎖の脱保護では、82.5%Trifluoroacetic acid(以下TFA)(TFA:1,2-ethandithiol:m-cresole:Thioanisole:水=82.5:2.5:5:5:5)(以上、和光純薬)5mlを加え、室温で3h反応させてresinからペプチドを切り離した。樹脂を除き、ジエチルエーテル(関東化学)中に沈殿させた後、遠心(3000rpm、4、3min)しエーテル層を取り除いた。これを3回繰り返すことによってペプチドを洗浄した。最後にエーテル層を取り除いた後、ペプチドを風乾させ、Milli Q水に溶解させた。Milli Q水に溶解しないものは30%以下のエタノール/Milli Q水に溶解させた。その後、凍結乾燥した。

30

【0035】

得られたペプチド沈殿物を真空乾燥し、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製を行った。

40

具体的には、プレカラム(Guard-Pak社製品、製品名Deltapak C18 A300)及びC18逆相カラム(DAISOPAK SP-120-5-ODS-AP、20mmI.D. x 250mm(DAISO))を使用し、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液との混合液を溶離液に用いた。すなわち、溶離液に含まれる上記トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液の分量を経時的に増大させつつ(容積比で10%から80%への濃度勾配を設ける)、7.0ml/分の流速で上記カラムを用いて40~50分間の分離精製を行った。なお、逆相カラムから溶離したペプチドは紫外線検出器(波長:220nm)で検出した。

また、溶離した各ペプチドの分子量をKRATOS 質量分析装置 KOMPACT MALDI III(島津製作所)を用いてMALDI-TOF/MS(Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry:マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型-質量分析)に基づい

50



て決定した。その結果、目的のペプチドが合成・精製されていることが確認された。

【実施例 2】

【0036】

合成ペプチドの抗菌活性

実施例 1 で製造したサンプル 1 ~ 3 および比較例 1 のペプチドについて、下記に示すグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に対する抗菌活性（最小阻止濃度：MIC）を 96 穴（well）マイクロプレートを用いた液体培地希釈法により求めた。

【0037】

供試菌

・グラム陽性菌

Staphylococcus aureus IF012732  
Staphylococcus aureus COL1(MRSA)  
Bacillus cereus IF03001  
Bacillus subtilis ATCC6633  
Micrococcus luteus IF012708

10

・グラム陰性菌

Escherichia coli IF012713  
Escherichia coli O157:H7 sakai  
Klebsiella pneumoniae ATCC4352  
Salmonella enteritidis IF03313  
Pseudomonas aeruginosa ATCC10145

20

【0038】

すなわち、ペプチド濃度が 500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9、1.9、1.0 及び 0.5  $\mu$ M となる液体肉汁培地（DIFCO社製品「NUTRIENT BROTH Dehydrated」）をそれぞれ作成し、96 穴マイクロプレートに 150  $\mu$ l ずつ分注した。一方、LB Broth, Lennox（DIFCO社製品）で 18 時間、37 にて静置培養した菌液（約  $2 \times 10^6$  cells/mL）を、薬剤溶液（上記ペプチド含有肉汁培地）と等量、96 穴マイクロプレートの各ウェル（well）に接種した。接種後、37 の恒温器内で培養を開始し、24 時間後の濁度により菌発生の有無を調べた。その計測時における菌による濁度の増加が認められない最小ペプチド濃度を本実施例における MIC と定めた。

30

かかる抗菌試験に基づく各サンプル及び比較サンプルの抗菌活性（最小発育阻止濃度：MIC）を表 1 に示す。

【0039】

【表 1】

	MIC (μg/ml)			
	サンプル1	サンプル2	サンプル3	比較例1
グラム陽性菌				
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO12732	1.95	1.95	1.95	1.95
<i>Staphylococcus aureus</i> COL1(MRSA)	15.6	15.6	15.6	31.3
<i>Bacillus cereus</i> IFO3001	62.5	62.5	62.5	62.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	1.95	1.95	1.95	0.98
<i>Micrococcus luteus</i> IFO12708	3.9	3.9	7.8	7.8
グラム陰性菌				
<i>Escherichia coli</i> IFO12713	15.6	7.8	15.6	62.5
<i>Escherichia coli</i> O157:H7(sakai)	15.6	7.8	15.6	31.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352	7.8	3.9	3.9	15.6
<i>Salmonella enteritidis</i> IFO3313	3.9	3.9	3.9	15.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	15.6	15.6	15.6	62.5

10

20

30

40

## 【0040】

表 1 に示す結果から明らかなように、本発明に係るペプチド（サンプル 1～3）は、比較対照（配列番号 4）の対称型抗菌性ペプチドと比べ、グラム陽性菌に対してはほぼ同一の高い抗菌力を維持しながら、グラム陰性菌に対しては、比較例 1 よりもさらに 2～8 倍

高い優れた抗菌力を示した。表 1 に示す結果より、本発明に係る抗菌性ペプチドが、グラム陰性、グラム陽性、薬剤耐性菌に対して優れた抗菌活性と広い抗菌スペクトルを有することが明らかである。

## 【0041】

以上、本発明の具体例を詳細に説明したが、これらは例示にすぎず、特許請求の範囲を限定するものではない。特許請求の範囲に記載の技術には、以上に例示した具体例を様々な変形、変更したものが含まれる。また、本明細書に説明した技術要素は、単独あるいは各種の組み合わせによって技術的有用性を発揮するものであり、出願時請求項記載の組み合わせに限定されるものではない。また、本明細書に例示した技術は複数目的を同時に達成するものであり、そのうちの一つの目的を達成すること自体で技術的有用性を持つ

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0042】

- 配列番号 1 設計された抗菌性ペプチド。
- 配列番号 2 設計された抗菌性ペプチド。
- 配列番号 3 設計された抗菌性ペプチド。
- 配列番号 4 設計された抗菌性ペプチド。

## 【配列表】

2005120050000001.xml

## フロントページの続き

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

// A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00

F I

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00

テーマコード(参考)

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA18 BA23 MA01 NA14 ZB352

4C086 AA02 EA16 NA14 ZB35

4H011 AA02 BB06 BB21

4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 EA01 EA06 EA29 FA20 FA74