

[illegible]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヌクレオチド配列が、野生型 *aveC* 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現するストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株 ATCC 53692 の細胞がアベルメクチンのクラス 2 : 1 比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (SEQ ID NO) : 2 のアミノ酸位置に相当するアミノ酸残基にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis aveC* の対立遺伝子、プラスミド pSE186 (ATCC 209604) の *S. avermitilis AveC* 遺伝子産物コード配列若しくは図 1 (配列番号 (SEQ ID NO) : 1) 記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又はこれらの縮重変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス 2 : 1 アベルメクチンがシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンであるときクラス 2 : 1 アベルメクチン比は 0.35 : 1 以下である、ポリヌクレオチド分子。

【請求項 2】

前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が、約 0.20 : 1 以下である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 3】

前記アミノ酸置換の組み合わせが、

【化 1】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
- (q) D48E, L136P, G179S, R250W;

【化 2】

(r)	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;	
(s)	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;	
(t)	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;	
(u)	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;	
(v)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;	
(w)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;	
(x)	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;	10
(y)	D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;	
(z)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;	
(aa)	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;	
(ab)	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;	
(ac)	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(ad)	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;	
(ae)	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;	
(af)	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;	20
(ag)	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;	
(ah)	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;	
(ai)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;	
(aj)	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;	
(ak)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;	
(al)	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;	
(am)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;	
(an)	D48E, A89T, S138T, G179S;	
(ao)	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;	30
(ap)	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;	
(aq)	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;	
(ar)	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(as)	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;	
(at)	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;	
(au)	D48E, A89T, L136P, G179S;	
(av)	D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;	
(aw)	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;	40
(ax)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(ay)	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;	
(az)	D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;	
(ba)	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;	

【化 3】

- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; 及び
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子。 10

【請求項 4】

ヌクレオチド配列が、野生型 *aveC* 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現するストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株 ATCC 53692 の細胞がアベルメクチンのクラス 2 : 1 比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (SEQ ID NO) : 2 のアミノ酸位置に相当するアミノ酸残基にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis aveC* の対立遺伝子、プラスミド pSE186 (ATCC 209604) の *S. avermitilis AveC* 遺伝子産物コード配列若しくは図 1 (配列番号 (SEQ ID NO) : 1) に記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又はそれらの縮重変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス 2 : 1 アベルメクチンがシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンであるとき、クラス 2 : 1 アベルメクチン比は約 0.40 : 1 以下に減少されており、且つ前記アミノ酸置換の組み合わせが 20

(bf) D48E、S138T、A139T、G179S、E238D ; 及び

(bg) Y28C、Q38R、D48E、L136P、G179S、E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む、ポリヌクレオチド分子。

【請求項 5】

30

請求項 1 又は請求項 4 に記載の前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 6】

(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(ii) *S. avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、*S. avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせが、

【化 4】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;

【化 5】

- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L; 10
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
- (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
- (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
- (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
- (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
- (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L; 20
- (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
- (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
- (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
- (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D; 30
- (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
- (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D; 40
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;

【化 6】

- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D; 10
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; 及び
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D 20

からなる群から選択された組み合わせを含む、方法。

【請求項 7】

(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、
 (ii) *S. avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、*S. avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又は縮重変異体を含む細胞が、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0.35 : 1 以下の比で産生できるものである、方法。 30

【請求項 8】

前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせが、

【化 7】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S; 40
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;

【化 8】

(k)	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;	
(l)	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;	
(m)	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;	
(n)	D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;	
(o)	Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;	
(p)	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;	10
(q)	D48E, L136P, G179S, R250W;	
(r)	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;	
(s)	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;	
(t)	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;	
(u)	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;	
(v)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;	
(w)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;	
(x)	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;	
(y)	D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;	20
(z)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;	
(aa)	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;	
(ab)	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;	
(ac)	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(ad)	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;	
(ae)	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;	
(af)	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;	
(ag)	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;	30
(ah)	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;	
(ai)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;	
(aj)	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;	
(ak)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;	
(al)	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;	
(am)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;	
(an)	D48E, A89T, S138T, G179S;	
(ao)	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;	
(ap)	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;	40
(aq)	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;	
(ar)	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(as)	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;	
(at)	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;	

【化 9】

- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; 及び
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

10

からなる群から選択された組み合わせを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

20

前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が、約 0 . 2 0 : 1 以下である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 a v e C 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 A v e C 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(i i) *S . avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規 *S . avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記アミノ酸置換の組み合わせが、

30

(b f) D 4 8 E 、 S 1 3 8 T 、 A 1 3 9 T 、 G 1 7 9 S 、 E 2 3 8 D ; 及び

(b g) Y 2 8 C 、 Q 3 8 R 、 D 4 8 E 、 L 1 3 6 P 、 G 1 7 9 S 、 E 2 3 8 D

からなる群から選択されたものである、方法。

【請求項 11】

【化 10】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;

40

【化 1 1】

(j)	D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;	
(k)	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;	
(l)	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;	
(m)	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;	
(n)	D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;	
(o)	Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;	
(p)	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;	10
(q)	D48E, L136P, G179S, R250W;	
(r)	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;	
(s)	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;	
(t)	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;	
(u)	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;	
(v)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;	
(w)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;	
(x)	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;	20
(y)	D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;	
(z)	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;	
(aa)	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;	
(ab)	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;	
(ac)	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(ad)	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;	
(ae)	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;	
(af)	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;	
(ag)	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;	30
(ah)	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;	
(ai)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;	
(aj)	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;	
(ak)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;	
(al)	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;	
(am)	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;	
(an)	D48E, A89T, S138T, G179S;	
(ao)	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;	40
(ap)	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;	
(aq)	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;	
(ar)	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;	
(as)	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;	

【化 1 2】

- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; 及び
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

10

からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた S . a v e r m i t i l i s a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む S t r e p t o m y c e s 種の細胞。

20

【請求項 1 2】

ストレプトミセスアベルミティリス (S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s) の細胞である、請求項 1 1 に記載の細胞。

【請求項 1 3】

(b f) D 4 8 E 、 S 1 3 8 T 、 A 1 3 9 T 、 G 1 7 9 S 、 E 2 3 8 D ; 及び

(b g) Y 2 8 C 、 Q 3 8 R 、 D 4 8 E 、 L 1 3 6 P 、 G 1 7 9 S 、 E 2 3 8 D

からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させたストレプトミセスアベルミティリス (S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s) a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含むストレプトミセス種の細胞。

30

【請求項 1 4】

ストレプトミセスアベルミティリス (S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s) の細胞により産生されるシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンの組成物であって、前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンが前記細胞が培養された培地に存在しており、前記培地に存在するシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が 0 . 3 5 : 1 以下である、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、主に動物の健康の分野に有効である「ドラメクチン (d o r a m e c t i n) 」等のアベルメクチンを効率的に製造するための組成物及び方法に関する。より詳細には、本発明は、ストレプトミセスアベルミティリス (S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s) の発酵培養により産生されるクラス 2 : 1 アベルメクチン比を調節するのに用いることができる、A v e C 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子に関する。さらに、本発明は、a v e C 遺伝子を産生されるクラス 2 : 1 アベルメクチン比を調節するように突然変異させた、ベクター、形質転換された宿主細胞及び新規な S . a v e r m i t i l i s の突然変異菌株に関する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

2. 1. アベルメクチン

ストレプトミセス (*Streptomyces*) 種は、強力な駆虫活性及び殺虫活性を有する一連の 8 種類の関連した 16 員大環式ラクトンを含む、アベルメクチンを含む多種多様な二次代謝産物を産生する。これら 8 種の異なるが密接に関連した化合物は、A 1 a、A 1 b、A 2 a、A 2 b、B 1 a、B 1 b、B 2 a 及び B 2 b と称される。「a」系列の化合物は、C 25 位の置換基が (S) - sec - ブチルである天然アベルメクチンを意味し、「b」系列は、C 25 位の置換基がイソプロピルであるこれらの化合物を意味する。名称「A」及び「B」は、C 5 位の置換基が、それぞれメトキシ及びヒドロキシであるアベルメクチンを意味する。数字「1」は、二重結合が C 22 位、C 23 位に存在するアベルメクチンを意味し、数字「2」は、C 22 位に水素及び C 23 位にヒドロキシを有するアベルメクチンを意味する。関連アベルメクチンのうち、ドラメクチン等の B 1 型アベルメクチンは、最も有効な抗寄生生物活性及び有害生物駆除活性を有するとされており、したがって、最も商業的に望ましいアベルメクチンである。

10

【0003】

アベルメクチン及び *S. avermitilis* 菌株の好氣的発酵によるそれらの産生は、米国特許第 4,310,519 号及び第 4,429,042 号に記載されている。天然アベルメクチンの生合成は、イソ酪酸及び S - (+) - 2 - メチル酪酸の CoA チオエステル類似体から内因的に開始されると考えられている。

【0004】

ランダム突然変異誘発による菌株の改善と、外因的に供給される脂肪酸を使用することとを組み合わせることにより、アベルメクチン類似体が効率的に産生されるようになった。分岐鎖 2 - オキソ酸デヒドロゲナーゼを欠いている *S. avermitilis* の突然変異体 (bkd 欠失突然変異体) は、発酵に脂肪酸を補充したとき、アベルメクチンのみを産生することができる。分岐鎖デヒドロゲナーゼ活性を欠く突然変異体 (例えば、*S. avermitilis*、ATCC 53567) のスクリーニング及び単離が、ヨーロッパ特許 (EP) 第 276103 号に記載されている。外因的に供給される脂肪酸の存在下でのこのような突然変異体の発酵では、用いられる脂肪酸に相当する 4 種のアベルメクチンのみが産生する。このように、*S. avermitilis* (ATCC 53567) の発酵に S - (+) - 2 - メチル酪酸を補充することにより、天然アベルメクチン A 1 a、A 2 a、B 1 a 及び B 2 a が産生し；発酵にイソ酪酸を補充することにより、天然アベルメクチン A 1 b、A 2 b、B 1 b 及び B 2 b を産生し；発酵にシクロペンタンカルボン酸を補充することにより、4 種の新規なシクロペンチルアベルメクチン A 1、A 2、B 1 及び B 2 が産生する。

20

30

【0005】

他の脂肪酸を補充すると、新規なアベルメクチンが産生される。800 種類を超える可能性のある前駆体をスクリーニングすることにより、60 種類を超える他の新規なアベルメクチンが同定されている (例えば、Dutton 等、1991、J. Antibiot. 44:357-365；及び Banks 等、1994、Roy. Soc. Chem. 147:16-26 参照)。さらに、5 - O - メチルトランスフェラーゼ活性を欠く *S. avermitilis* の突然変異体は、実質的に B 類似体アベルメクチンのみを産生する。その結果、分岐鎖 2 - オキソ酸デヒドロゲナーゼ活性と 5 - O - メチルトランスフェラーゼ活性の両方を欠く *S. avermitilis* 突然変異体は、発酵を補充するのに用いられる脂肪酸に相当する B アベルメクチンのみ産生する。したがって、このような二重突然変異体に S - (+) - 2 - メチル酪酸を補充すると、天然アベルメクチン B 1 a 及び B 2 a のみが産生し、一方、イソ酪酸又はシクロペンタンカルボン酸を補充すると、それぞれ天然のアベルメクチン B 1 b 及び B 2 b 又は新規なシクロペンチル B 1 及び B 2 アベルメクチンが産生する。二重突然変異菌株にシクロヘキサンカルボン酸を補充するのは、商業的に重要な新規アベルメクチンであるシクロヘキシルアベルメクチン B 1 (ドラメクチン) を産生するのに好ましい方法である。このような二重突然変異体、例えば、*S. avermitilis* (ATCC 53692) の単離及び特性については、EP 2761

40

50

03号に記載されている。

【0006】

2.2. アベルメクチン生合成に関与する遺伝子

多くの場合において、二次代謝物の産生に関与する遺伝子及び特定の抗生物質をコードする遺伝子は、染色体上に一緒に塊となっている。このようなことは、例えば、*Streptomyces* ポリケチドシンターゼ遺伝子クラスター (PKS) の場合にみられる (*Hopwood* 及び *Sherman*, 1990, *Ann. Rev. Genet.*, 24: 37-66 参照)。したがって、生合成経路において遺伝子をクローニングする一つの方法は、薬物耐性遺伝子を単離後、その特定の抗生物質の生合成に係る他の遺伝子について染色体の隣接する領域を試験することであった。重要な代謝産物の生合成に関与する遺伝子をクローニングするもう一つの方法として、突然変異体の相補性があった。例えば、特定の代謝産物を生産することができる生物からのDNAライブラリーの一部分を、非生産性突然変異体に導入し、代謝産物の産生について形質転換体をスクリーニングする。さらに、他の *Streptomyces* 種から得たプローブを用いたライブラリーのハイブリダイゼーションを使用して、生合成経路において遺伝子を同定し且つクローニングしている。

【0007】

アベルメクチン生合成に関与する遺伝子 (ave 遺伝子) は、他の *Streptomyces* 二次代謝産物の生合成に必要な遺伝子 (例えば、PKS) のように、染色体上に塊としてみられる。多数の ave 遺伝子が、アベルメクチン生合成においてブロックされた *S. avermitilis* 突然変異体を相補するためにベクターを用いてうまくクローニングされた。このような遺伝子のクローニングは、米国特許第 5,252,474 号に記載されている。更に、*Ikedo* 等, 1995, *J. Antibiot.* 48: 532-534 は、*S. avermitilis* の 4.82 Kb BamHI フラグメントへの C22, 23 脱水工程を含む染色体領域 (aveC) の局在化だけでなく、単一成分 B2a プロデューサーの産生を生じる aveC 遺伝子の突然変異について記載している。強力な駆虫化合物であるイベルメクチンは、アベルメクチン B2a から化学的に製造することができるので、このようなアベルメクチン B2a の単一成分プロデューサーは、イベルメクチンの商業生産に特に有用であると考えられる。

【0008】

米国特許第 6,248,579 号 (*Stutzman-Engwall* 等; 2001 年 6 月 19 日発行) は、シクロヘキシル B2: シクロヘキシル B1 比が約 0.75:1 に減少する *Streptomyces avermitilis* の aveC 遺伝子に対する一定の突然変異を記載している。

【0009】

PCT 公開 WO 01/12821 (*Pfizer Products* 社; 2001 年 2 月 22 日公開) は、シクロヘキシル B2: シクロヘキシル B1 比が 0.40:1 にさらに減少する *Streptomyces avermitilis* の aveC 遺伝子に対する一定のさらなる突然変異を記載している。

【0010】

アベルメクチン産生の複雑さをさらに最小限とする aveC 遺伝子におけるさらなる突然変異又は突然変異の組み合わせ、例えば、アベルメクチンの B2: B1 比をさらに減少させる突然変異を同定することは、商業的に重要なアベルメクチンの産生及び精製を簡略化するであろう。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明によれば、ヌクレオチド配列が、野生型 aveC 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現するストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株 ATCC 5

10

20

30

40

50

3692の細胞がアベルメクチンのクラス2:1比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (SEQ ID NO): 2 のアミノ酸位置に相当するアミノ酸残基にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis* *aveC* の対立遺伝子、プラスミド pSE186 (ATCC209604) の *S. avermitilis* *AveC* 遺伝子産物コード配列若しくは図1 (配列番号 (SEQ ID NO): 1) 記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又はそれらの縮重変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス2:1アベルメクチンがシクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1アベルメクチンであるときクラス2:1アベルメクチン比は0.35:1以下である、ポリヌクレオチド分子が提供される。より好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1アベルメクチン比が、約0.30:1以下である。より好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1アベルメクチン比が、約0.25:1以下である。より好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1アベルメクチン比が、約0.20:1以下である。

10

【0012】

その特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、

【化 1】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
 (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
 (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
 (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
 (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
 (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
 (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D; 10
 (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
 (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
 (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
 (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
 (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
 (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
 (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
 (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D; 20
 (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
 (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
 (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
 (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
 (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
 (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
 (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
 (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
 (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S; 30
 (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
 (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
 (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
 (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
 (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
 (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
 (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
 (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D; 40

【化 2】

- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S; 10
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S; 20
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L; 及び 30
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む。

【0013】

さらに、本発明によれば、ヌクレオチド配列が、野生型 *aveC* 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現するストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株 ATCC 53692 の細胞がアベルメクチンのクラス 2 : 1 比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (SEQ ID NO) : 2 のアミノ酸位置に相当するアミノ酸残基にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis* *aveC* の対立遺伝子、プラスミド pSE186 (ATCC 209604) の *S. avermitilis* *AveC* 遺伝子産物コード配列若しくは図 1 (配列番号 (SEQ ID NO) : 1) 記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又はそれらの縮重変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス 2 : 1 アベルメクチンがシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンであるとき、クラス 2 : 1 アベルメクチン比は約 0.40 : 1 以下に減少されており、且つ前記アミノ酸置換の組み合わせが

10

20

30

40

50

(b f) D 4 8 E、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D ; 及び

(b g) Y 2 8 C、Q 3 8 R、D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D

からなる群から選択された組み合わせを含む、ポリヌクレオチド分子が提供される。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド分子を含む組換えベクターが提供される。

【 0 0 1 5 】

さらに、本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド分子又は組換えベクターを含む宿主細胞が提供される。好ましい実施態様によれば、宿主細胞は、*Streptomyces* 細胞である。より好ましい実施態様によれば、宿主細胞は、*Streptomyces avermitilis* の細胞である。

10

【 0 0 1 6 】

さらに、本発明によれば、(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(ii) *S. avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規な *S. avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記アミノ酸置換の組み合わせが、上記した (a) ~ (b e) から選択されたものである、方法が提供される。

20

【 0 0 1 7 】

さらに、本発明によれば、(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(ii) *S. avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規な *S. avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又は縮重変異体を含む細胞が、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0 . 3 5 : 1 以下の比で産生できるものである、方法が提供される。その非制限的实施態様によれば、突然変異 *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (a) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている。

30

【 0 0 1 8 】

その好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 3 0 : 1 以下である。非制限的实施態様によれば、突然変異 *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (f) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている。

【 0 0 1 9 】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 5 : 1 以下である。非制限的实施態様によれば、突然変異 *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (w) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている。

40

【 0 0 2 0 】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 0 : 1 以下である。非制限的实施態様によれば、突然変異 *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (a o) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている。

【 0 0 2 1 】

さらに、本発明によれば、(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突

50

然変異させて、前記突然変異により前記 A v e C 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(i i) S . a v e r m i t t i l i s 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規 S . a v e r m i t t i l i s 菌株の製造方法であって、前記アミノ酸置換の組み合わせが、上記した (b f) ~ (b g) からなる群から選択されたものである、製造方法が提供される。その好ましい実施態様によれば、このような突然変異させた a v e C 対立遺伝子又は縮重変異体を含む S . a v e r m i t t i l i s の細胞は、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを約 0 . 4 0 : 1 以下の比で産生できる。

【 0 0 2 2 】

10

さらに、本発明によれば、上記した (a) ~ (b e) から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた S . a v e r m i t t i l i s a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む S t r e p t o m y c e s 種の細胞が提供される。その好ましい実施態様によれば、S t r e p t o m y c e s の種は、S . a v e r m i t t i l i s である。

【 0 0 2 3 】

さらに、本発明によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0 . 3 5 : 1 以下の比で産生できる S t r e p t o m y c e s a v e r m i t t i l i s の細胞が提供される。その非限定的実施態様によれば、上記細胞は、上記した (a) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

20

【 0 0 2 4 】

その好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 3 0 : 1 以下である。非制限的实施態様によれば、上記細胞は、上記した (f) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【 0 0 2 5 】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 5 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、上記細胞は、上記した (w) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

30

【 0 0 2 6 】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 0 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、上記細胞は、上記した (a o) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【 0 0 2 7 】

さらに、本発明によれば、上記した (b f) 及び (b g) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた S . a v e r m i t t i l i s a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む、S t r e p t o m y c e s 種の細胞が提供される。その好ましい実施態様によれば、S t r e p t o m y c e s の種は、S . a v e r m i t t i l i s である。より好ましい実施態様によれば、上記細胞は、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを約 0 . 4 0 : 1 以下の比で産生できる S . a v e r m i t t i l i s の細胞である。

40

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明によれば、アベルメクチンの製造方法であって、本発明の S t r e p t o m y c e s a v e r a v m i t t i l i s 細胞の菌株を、培地中で、それからアベルメクチンを産生するか又は誘発する条件下で培養することと、培養から上記アベルメクチン

50

を回収することを含む、方法が提供される。

【0029】

さらに、本発明によれば、ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) の細胞により産生されるシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンの組成物であって、前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンが前記細胞が培養された培地に存在しており、前記培地に存在するシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が 0.35 : 1 以下、好ましくは約 0.30 : 1 以下、より好ましくは約 0.25 : 1 以下、さらに好ましくは約 0.20 : 1 以下である、組成物が提供される。特定の実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンの組成物は、突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を発現する *S. avermitilis* の菌株の細胞により産生される。この場合の、突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を発現する *S. avermitilis* の菌株の細胞は、突然変異させた *aveC* 対立遺伝子を発現しないが、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する同様の *S. avermitilis* の菌株の細胞と比較して、細胞により産生されるシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンのクラス 2 : 1 比の減少する遺伝子産物をコードするものである。

10

【0030】

その好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が 0.35 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (a) ~ (be) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

20

【0031】

そのさらに好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0.30 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (f) ~ (be) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

【0032】

そのさらに好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0.25 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (w) ~ (be) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

30

【0033】

そのさらに好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0.20 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (ao) ~ (be) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

【0034】

さらに、本発明によれば、ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) の細胞により産生されるシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンの組成物であって、前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンが前記細胞が培養された培地に存在しており、前記培地に存在するシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0.40 : 1 以下であり、そして上記 (bf) ~ (bg) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される、組成物が提供される。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

50

本発明は、*Streptomyces avermitilis*からのAveC遺伝子産物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分子の同定及び特性付け、突然変異したAveC遺伝子産物をそれらのアベルメクチン産生への影響についてスクリーニングするのに用いることができる新規な*S. avermitilis*菌株の構築、及び一定の突然変異したAveC遺伝子産物が、*S. avermitilis*によって産生されるB2:B1比アベルメクチンを減少させることができるという知見に関する。一例として、本発明を、プラスミドpSE186(ATCC209604)の*S. avermitilis* AveC遺伝子産物をコードしている配列と同様であるヌクレオチド配列を有するか、又は図1(配列番号(SEQ ID NO):1)のORFのヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子について、並びにそれに由来する突然変異したヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子及びそれらの縮重変異体について、下記のセクションで説明する。しかしながら、本発明において記載されている原理は、例えば、とりわけ*S. hygroscopicus*及び*S. griseochromogenes*を含む他の*Streptomyces*種からのaveC相同遺伝子を含む他のポリヌクレオチド分子に同様に適用することができる。

10

【0036】

5.1. *S. avermitilis* AveC遺伝子産物をコードするポリヌクレオチド分子

本発明によれば、*S. avermitilis*の完全なaveC ORF又はその実質的な部分を含む単離されたポリヌクレオチド分子であって、*S. avermitilis* 染色体中のそのままの位置のaveC ORFから下流に位置する次の完全なORFを欠く単離されたポリヌクレオチド分子が提供される。

20

【0037】

本発明の単離されたポリヌクレオチド分子は、好ましくはプラスミドpSE186(ATCC209604)の*S. avermitilis* AveC遺伝子産物をコードしている配列と同様であるか；図1(配列番号(SEQ ID NO):1)のORFのヌクレオチド配列又はその実質的な部分と同じであるヌクレオチド配列を含む。本明細書において使用される*S. avermitilis* AveC遺伝子産物をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子の「実質的な部分」とは、図1(配列番号(SEQ ID NO):1)に示される完全なaveC ORF配列の少なくとも約70%を含む単離されたポリヌクレオチド分子を意味し、これは、機能的に同等なAveC遺伝子産物をコードしている。これに関して、「機能的に同等な」AveC遺伝子産物は、天然aveC対立遺伝子が失活した*S. avermitilis*菌株ATCC53692中で発現された場合、*S. avermitilis*菌株ATCC53692由来の野生型の機能性aveC対立遺伝子だけを代わりに発現する*S. avermitilis*菌株ATCC53692によって生産されるのと実質的に同様の比及び量のアベルメクチンを産生する遺伝子産物として定義される。

30

【0038】

本発明の単離されたポリヌクレオチド分子は、aveC ORFのヌクレオチド配列の他に、図1(配列番号(SEQ ID NO):1)に示されるフランキングヌクレオチド配列のような、*S. avermitilis*の原位置のaveC遺伝子の脇に生来位置するヌクレオチド配列をさらに含むことがある。

40

【0039】

さらに、本発明によれば、配列番号(SEQ ID NO):1のヌクレオチド配列、又は遺伝子コードの公知の縮重に基づくその縮重変異体を含む単離されたポリヌクレオチド分子が提供される。

【0040】

本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド分子」、「ポリヌクレオチド配列」、「コード配列」、「オープンリーディングフレーム」及び「ORF」は、一本鎖か又は二本鎖でありうるDNA及びRNA両方の分子を意味し、これは、AveC遺伝子産物中に、

50

又は適当な調節要素の制御下に置かれた場合の適当な宿主細胞発現系におけるAveC遺伝子産物に相同であるポリペプチド中に転写し且つ翻訳(DNA)することができるか、又は翻訳(RNA)することができる。コード配列には、原核性配列、cDNA配列、ゲノムDNA配列及び化学合成されたDNA及びRNA配列を含むことができるが、これらには限定されない。

【0041】

図1(配列番号(SEQ ID NO):1)に示されるヌクレオチド配列は、bp42位、bp174位、bp177位及びbp180位に4個の異なったGTGコドンを含む。上記した米国特許第6,248,579号に記載されているように、aveC ORF(図1;配列番号(SEQ ID NO):1)の5'領域の多重欠失を構築して、これらのコドンのうちのどれが、タンパク質発現の出発部位としてaveC ORFにおいて機能できるか明確にしやすくした。bp42の最初のGTG部位の欠失により、AveC活性はなくならなかった。bp174位、bp177位及びbp180位のGTGコドンの全てを一緒にさらに欠失させると、AveC活性が除去され、この領域がタンパク質発現に必要であるということがわかった。したがって、本発明は、可変長さaveC ORFを包含する。

【0042】

さらに、本発明によれば、プラスミドpSE186(ATCC209604)のS. avermitilis AveC遺伝子産物をコードしている配列と相同であるか、図1(配列番号(SEQ ID NO):1)のaveC ORFのヌクレオチド配列又はその実質的な部分と相同であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子が提供される。S. avermitilis AveC遺伝子産物をコードしている配列に相同であるポリヌクレオチド分子に言及するのに使用される場合の用語「相同」は、(a)プラスミドpSE186(ATCC209604)のS. avermitilis AveC遺伝子産物をコードしている配列と同様のAveC遺伝子産物をコードするか、又は図1(配列番号(SEQ ID NO):1)に示されるaveC ORFのヌクレオチド配列と同様のAveC遺伝子産物をコードするが、遺伝コードの縮重によるヌクレオチド配列への一つ又はそれ以上のサイレント変化を含む(すなわち、縮重変異体);又は(b)プラスミドpSE186(ATCC209604)のAveC遺伝子産物をコードしている配列によってコードされるアミノ酸配列をコードする又は図1(配列番号(SEQ ID NO):2)に示されるアミノ酸配列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分子の補体に、適度なストリンジェント条件、すなわち、0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中において65℃でのフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーション及び0.2xSSC/0.1%SDS中において42℃での洗浄(Ausubel等(編者),1989,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学における現在のプロトコル),第1巻,Green Publishing Associates社,及びJohn Wiley & Sons社,New York,p.2.10.3参照)の下でハイブリッドを形成し、上に定義の機能的に同等なAveC遺伝子産物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分子を意味する。好ましい態様によれば、相同ポリヌクレオチド分子は、プラスミドpSE186(ATCC209604)のAveC遺伝子産物をコードしているヌクレオチド配列の補体にか、又は図1(配列番号(SEQ ID NO):1)に示されるaveC ORFのヌクレオチド配列の補体又はその実質的な部分に、高度なストリンジェント条件下、すなわち、0.5M NaHPO₄、7%SDS、1mM EDTA中において65℃でのフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーション及び0.1xSSC/0.1%SDS中において68℃での洗浄(Ausubel等,1989,上記)の下でハイブリッドを形成し、そして上記で定義した機能的に同等なAveC遺伝子産物をコードする。

【0043】

AveC遺伝子産物及びその可能な機能的同等物の活性は、以下の実施例に記載のよう

に、発酵生成物のHPLC分析によって決定することができる。S. avermitilis AveC遺伝子産物の機能的同等物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分子には、他のS. avermitilis菌株中に存在する天然に存在するaveC遺伝子、Streptomycesの他の種に存在するaveC相同遺伝子、及び天然又は遺伝子操作された、突然変異したaveC対立遺伝子を含むことができる。

【0044】

さらに、本発明によれば、プラスミドpSE186(ATCC209604)のAveC遺伝子産物コード配列によりコードされているアミノ酸配列に相同であるアミノ酸配列が、図1(配列番号(SEQ ID NO):2)又はその実質的な部分のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子が提供される。本明細書において使用される、図1(配列番号(SEQ ID NO):2)のアミノ酸配列の「実質的な部分」は、図1(配列番号(SEQ ID NO):2)に示されるアミノ酸配列の少なくとも約70%を含むポリペプチドを意味し、これは、上記で定義したように、機能的に同等なAveC遺伝子産物を構成する。

10

【0045】

S. avermitilisからのAveC遺伝子産物のアミノ酸配列に相同であるアミノ酸配列に言及するのに本明細書中で用いられる用語「相同」は、1個又はそれ以上のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で保存的に置換された以外は図1(配列番号(SEQ ID NO):2)のアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、ここにおいて、このアミノ酸配列は、BLASTPアルゴリズム(GENBANK, NCBI)のような任意の標準的なアミノ酸配列同一性アルゴリズムによって決定したときに、プラスミドpSE186(ATCC209604)のAveC遺伝子産物をコードしている配列によってコードされるポリペプチド又は図1(配列番号(SEQ ID NO):2)のアミノ酸配列に少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列の同一性を有し、このような保存的置換により、上記で定義した機能的に同等な遺伝子産物を生じる。保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において周知である。このような置換を行うための規則には、とりわけDayhof, M. D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D. C., 第5巻, Sup. 3に記載のものが含まれる。より詳細には、保存的アミノ酸置換は、酸性度又は極性において関連しているアミノ酸のファミリー内で一般的に生じる。遺伝子的にコードされるアミノ酸は、一般的に4つの群に分類される:(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸;(2)塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン;(3)無極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン;及び(4)非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは、芳香族アミノ酸としても分類される。任意の特定のグループ内での、例えば、ロイシンとイソロイシン又はバリン、又はアスパラギン酸とグルタミン酸、又はトレオニンとセリン、又は任意の他のアミノ酸残基と構造的に関連したアミノ酸残基、例えば、類似した酸性度又は極性を有する又はそれらのいくつかの組合せにおいて類似性を有するアミノ酸残基との一つ又はそれ以上の置換によっては、一般的にポリペプチドの機能に対して顕著な影響はない。

20

30

40

【0046】

本明細書中に開示されたポリヌクレオチド分子の製造及び操作は、当該技術の範囲内であり、例えば、Maniatis等, 1989, Molecular Cloning(分子クローニング), A Laboratory Manual(実験マニュアル), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel等, 1989, Current Protocols In Molecular Biology(分子生物学における現在のプロトコール), Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook等, 1989, Mole

50

cular Cloning: A Laboratory Manual (分子クローニング: 実験マニュアル), 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis等 (編者), 1995, PCR Strategies (PCRの方法), Academic Press社, San Diego; 及び Erlich (編者), 1992, PCR Technology (PCR技術), Oxford University Press, New York (これらの全ては、引用することにより本明細書の内容とする) に記載されている組換え技術によっておこなうことができる。AveC 遺伝子産物又は AveC 相同遺伝子産物をコードしているポリヌクレオチドクローンは、以下のセクション 7 に記載の方法が含まれるがこれには限定されない当該技術分野において公知の任意の方法を用いて同定することができる。ゲノムDNAライブラリーは、aveC 及び aveC 相同コード配列に関して、バクテリオファージライブラリーについては Benton 及び Davis, 1977, Science 196: 180 に、そしてプラスミドライブラリーについては Grunstein 及び Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3961 - 3965 に記載の方法などの方法を用いてスクリーニングすることができる。ここでは、例えば、プラスミド pSE186 (ATCC 209604) 中又はプラスミド pSE119 (以下のセクション 7 に記載されている) 中に aveC ORF を含むことが知られているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子は、これらスクリーニング実験においてプローブとして用いることができる。代わりの方法として、精製された AveC 相同遺伝子産物の部分的又は完全なアミノ酸配列から推定されるヌクレオチド配列に該当するオリゴヌクレオチドプローブを合成してもよい。

10

20

【0047】

5.2. 組換え系

5.2.1. クローニングベクター及び発現ベクター

さらに、本発明によれば、例えば、S. avermitilis の aveC ORF 又は任意の aveC 相同 ORF を含む本発明のポリヌクレオチド分子のクローニング又は発現する場合に有用である組換えクローニングベクター及び発現ベクターが提供される。非制限的实施態様において、本発明により、S. avermitilis の aveC 遺伝子の完全な ORF を含むプラスミド pSE186 (ATCC 209604) が提供される。

30

【0048】

また、S. avermitilis 由来の aveC ORF、又は S. avermitilis 由来の aveC ORF 又はその一部分を含むポリヌクレオチド分子、又は S. avermitilis AveC 遺伝子産物に関する以下の説明の全ても、明記又は前後関係によって示されない限り、下記で説明する突然変異された aveC 対立遺伝子についてのものである。

【0049】

種々の異なるベクターは、とりわけファージ、高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド及び大腸菌 (E. coli) - Streptomyces シャトルベクターを含む、Streptomyces において特定の用いるために開発されたものであり、これらのいずれかをを用いて、本発明を実施することができる。また、多数の薬物耐性遺伝子も、Streptomyces からクローニングされており、これら遺伝子のいくつかは、選択可能マーカーとしてベクター中に組み込まれた。Streptomyces において用いるための現在のベクターの例は、とりわけ Hutchinson, 1980, Applied Biochem. Biotech. 16: 169 - 190 に示されている。

40

【0050】

本発明の組換えベクター、特に発現ベクターは、好ましくは本発明のポリヌクレオチド分子のコード配列が、そのコード配列を転写及び翻訳してポリペプチドを生じるのに必要な一つ又はそれ以上の調節要素と機能的に結合しているように構築される。本明細書で用いられる用語「調節要素」は、誘導及び非誘導プロモーター、エンハンサー、オペレータ

50

ー及びポリヌクレオチドコード配列の発現を促進する及び/又は調節するのに役立つ当該技術分野において公知の他の要素をコードするヌクレオチド配列を含むが、これには限定されない。また、本明細書で用いられるコード配列は、調節要素が、コード配列の転写若しくはそのmRNAの翻訳又は両方を有効に調節し且つ可能にする場合、一つ又はそれ以上の調節要素と「機能的に関連」している。

【0051】

本発明のポリヌクレオチド分子を含有するように遺伝子操作されることができる典型的なプラスミドベクターには、とりわけpCR-Blunt、pCR2.1(Invitrogen)、pGEM3Zf(Promega)及びシャトルベクターpWHM3(Vara等, 1989, J. Bact. 171: 5872-5881)が含まれる。

10

【0052】

適当な調節要素と機能的に関連している特定のコード配列を含有する組換えベクターを構築するための方法は、当該技術分野において周知であり、これらを用いて本発明を実施することができる。これら方法には、in vitro組換え技術、合成技術、及びin vivo 遺伝的組換えが含まれる。例えば、Maniatis等, 1989, 上記; Ausubel等, 1989, 上記; Sambrook等, 1989, 上記; Innis等, 1995, 上記; 及びErllich, 1992, 上記に記載の方法を参照されたい。

【0053】

これらベクターの調節要素は、強度及び特異性が異なってもよい。用いられる宿主/ベクター系に応じて、多数の適当な転写及び翻訳要素のうちのいずれかを用いることができる。細菌についての転写調節領域又はプロモーターの非制限的例には、-galプロモーター、T7プロモーター、TACプロモーター、左右プロモーター、trp及びlacプロモーター、trp-lac融合プロモーター、そしてより具体的にはStreptomycesに関して、ermE、melC及びtipAのプロモーター等が含まれる。具体的な実施態様によれば、サッカロポリスポラエリトレア(Saccharopolyspora erythraea)からの強力な構成性プロモーター、例えば、ermEプロモーターに隣接してクロニングされたaveC ORF又はその突然変異させたORFを含有する発現ベクターを生成できる。米国特許第6,248,579号に記載されているように、ermEプロモーターを含むベクターを、S. avermitilisに形質転換し、引き続き発酵生成物をHPLC分析したところ、野生型aveC対立遺伝子のみを代わりに発現する同様の菌株による産生と比較して増加した力価のアベルメクチンが産生されることがわかった。

20

30

【0054】

融合タンパク質発現ベクターを使用して、AveC遺伝子産物融合タンパク質を発現することができる。精製された融合タンパク質を使用して、AveC遺伝子産物に対する高血清を産生させたり、AveC遺伝子産物の生化学的性状を研究したり、異なる生化学的活性を有するAveC融合タンパク質を遺伝子操作したり、又は発現されたAveC遺伝子産物の同定又は精製しやすくするのに用いることができる。可能な融合タンパク質発現ベクターには、-ガラクトシダーゼ及びtrpE融合、マルトース結合タンパク質融合、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合、及びポリヒスチジン融合(担体領域)をコードする配列を含むベクターが含まれるが、これに限定されない。別の実施態様によれば、AveC遺伝子産物又はその一部分は、例えば、S. hygroscopicus又はS. グリセオクロモジェネス(S. griseochromogenes)のようなStreptomycesの別の種又は菌株に由来するAveC相同遺伝子産物又はその一部分に融合することができる。このようなハイブリッドベクターは、S. avermitilis細胞中に形質転換され且つ試験して、例えば、生産されるクラス2:1アベルメクチン比に対するそれらの影響を測定することができる。

40

【0055】

AveC融合タンパク質を遺伝子操作して、精製に有用な領域を含むようにすることができる。例えば、AveC-マルトース結合タンパク質融合は、アミロース樹脂を用いて

50

精製することができ；A v e C - グルタチオン - S - トランスフェラーゼ融合タンパク質は、グルタチオン - アガロースビーズを用いて精製することができ；A v e C - ポリヒスチジン融合は、二価ニッケル樹脂を用いて精製することができる。別の方法として、担体タンパク質又はペプチドに対する抗体を、融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製に用いることができる。例えばモノクローナル抗体の標的エピトープをコードするヌクレオチド配列を遺伝子操作して、調節要素と機能的に関連した発現ベクターにし、発現されたエピトープがA v e C ポリペプチドに融合するように位置させることができる。例えば、F L A G (商標) エピトープ標識 (International Biotechnology社) をコードするヌクレオチド配列 (親水性マーカールペプチド) は、標準的な方法によって発現ベクター中に、例えば、A v e C ポリペプチドのカルボキシル末端に相当する点に挿入することができる。次に、発現されたA v e C ポリペプチド - F L A G (商標) エピトープ融合生成物を、商業的に入手可能な抗F L A G (商標) 抗体を用いて検出し且つアフィニティー精製することができる。

10

【0056】

A v e C 融合タンパク質をコードしている発現ベクターは、特定のプロテアーゼ切断部位をコードするポリリンカー配列を含有するように遺伝子操作して、発現されたA v e C ポリペプチドが、特定のプロテアーゼを用いた処理によって担体領域又は融合パートナーから放出されることができるようにもできる。例えば、融合タンパク質ベクターは、とりわけトロンピン又は因子X a の切断部位をコードしているD N A 配列を含むことができる。

20

【0057】

a v e C O R F から上流の及びそれを含む読み枠のシグナル配列を、公知の方法によって発現ベクター中に遺伝子操作して、発現される遺伝子産物の輸送及び分泌を支配することができる。シグナル配列の非制限的例には、とりわけ 因子、免疫グロブリン、外膜タンパク質、ペニシリナーゼ及びT細胞受容体由来のものが含まれる。

【0058】

本発明のクローニングベクター又は発現ベクターを用いて形質転換された又はトランスフェクションされた宿主細胞の分泌しやすくするために、ベクターを、リポーター遺伝子産物又は他の選択可能マーカのコード配列をさらに含むように遺伝子操作することができる。このようなコード配列は、好ましくは上記のように調節要素コード配列と機能的に関連している。本発明において有用なリポーター遺伝子は、当該技術分野において周知であり、とりわけグリーン蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、x y l E 及びチロシナーゼをコードしているものが含まれる。選択可能マーカールをコードしているヌクレオチド配列は、当該技術分野において周知であり、これには、抗生物質又は代謝拮抗物質に耐性を与える遺伝子産物をコードする、又は栄養要求必要条件を与えるものが含まれる。このような配列の例には、とりわけエリスロマイシン、チオストレプトン又はカナマイシンへの耐性をコードするものが含まれる。

30

【0059】

5.2.2. 宿主細胞の形質転換

さらに、本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド分子又は組換えベクターを含む形質転換された宿主細胞、及びそれに由来する新規な菌株又は細胞系が提供される。本発明の実施において有用な宿主細胞は、好ましくはS t r e p t o m y c e s 細胞であるが、他の原核細胞又は真核細胞を用いることもできる。このような形質転換された宿主細胞には、典型的には、とりわけ組換えバクテリオファージD N A、プラスミドD N A 又はコスミドD N A のベクターを用いて形質転換された細菌、又は組換えベクターを用いて形質転換された酵母のような微生物が含まれるが、これには限定されない。

40

【0060】

本発明のポリヌクレオチド分子は、S t r e p t o m y c e s 細胞中で機能するためのものであるが、例えば、クローニング又は発現の目的のために、他の細菌又は真核細胞中に形質転換することもできる。E . c o l i 菌株は、典型的には、例えば、A m e r i

50

can Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (受託番号31343)から入手可能な、及び市販元 (Stratagene)からのDH5 菌株などを用いることができる。好ましい真核宿主細胞には、酵母細胞が含まれるが、哺乳動物細胞又は昆虫細胞も有効に利用することができる。

【0061】

本発明の組換え発現ベクターは、好ましくは実質的に均一な細胞培養物からの一つ又はそれ以上の宿主細胞中に導入、例えば、形質転換又はトランスフェクションする。発現ベクターは、一般的に既知の方法によって、例えば、プロトプラスト形質転換、リン酸カルシウム沈降、塩化カルシウム処理、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、組換えウイルスとの接触によるトランスフェクション、リポソーム媒介トランスフェクション、DEAE-デキストラントランスフェクション、形質導入、接合、又は微粒子銃などによって宿主細胞中に導入される。形質転換細胞の選択は、上記のように組換えベクターに関連した標準法によって、例えば、選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性を発現する細胞について選択することによって行うことができる。

10

【0062】

発現ベクターがいったん宿主細胞中に導入されると、宿主細胞染色体中又はエピソームによるaveCコード配列の組み込み及び維持については、標準的な方法、例えば、サザンハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、逆転写酵素PCR (rt-PCR)を含めたPCR分析、又は予想される遺伝子産物を検出する免疫学的検定によって確認することができる。組換えaveCコード配列を含有及び/又は発現する宿主細胞は、(i) DNA-DNA、DNA-RNA又はRNA-アンチセンスRNAハイブリダイゼーション; (ii) 「マーカー」遺伝子機能の存在を検出すること; (iii) 宿主細胞中でのaveC特異的mRNA転写物の発現によって測定される転写レベルを評価すること; 及び (iv) 例えば、免疫検定によって又はAveC生物学的活性 (例えば、S. avermilitilis宿主細胞中でAveC活性を示す具体的な比及び量のアベルメクチン生産)の存在によって測定される成熟ポリペプチド生成物の存在を検出することを含む、当該技術分野において周知である少なくとも4種類の一般的な手法のいずれかによって同定することができる。

20

【0063】

5.2.3. 組換えAveC遺伝子産物の発現及び特性決定

30

生来の又は突然変異させたaveCコード配列が適当な宿主細胞中に安定して導入されたら、その形質転換された宿主細胞をクローン増殖させ、得られた細胞を、生来の又は突然変異させたAveC遺伝子産物の産生を最大するのに寄与する条件下で増殖させることができる。このような条件には、典型的には細胞を高密度まで増殖させることが含まれる。発現ベクターが誘導プロモーターを含む場合、適当な誘導条件、例えば、温度シフト、栄養素の消耗、無償インデューサー (例えば、イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) のような炭水化物類似体) の添加、過剰の代謝副生成物の蓄積等を、発現を誘導するのに必要に応じて使用する。

【0064】

発現されたAveC遺伝子産物が宿主細胞内に保持される場合、それら細胞を採取し且つ溶解させ、そしてその溶解産物から、タンパク質分解を最小限にする当該技術分野において公知の抽出条件下、例えば、4 で又はプロテアーゼインヒビターの存在下で、又は両方などで生成物を単離し且つ精製する。発現されたAveC遺伝子産物が宿主細胞から分泌される場合、枯渇した栄養培地を単純に集めて、それから生成物を単離することができる。

40

【0065】

発現されたAveC遺伝子産物は、必要に応じて、細胞溶解産物又は培地から、次の方法、すなわち、硫酸アンモニウム沈降、サイズ分画、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、密度遠心分離及びアフィニティークロマトグラフィーの任意の組合せが含まれるがこれに限定されない標準法を用いて単離する又は実質的に精製することができる。発現

50

された A v e C 遺伝子産物が生物学的活性を示す場合、その標品の増加純度は、適当な検定の使用によって精製法の各段階で監視することができる。発現された A v e C 遺伝子産物が生物学的活性の有無には無関係に、それは、例えば、サイズ、又はそれ以外の場合には A v e C に特異的な抗体との反応性に基づいて、又は融合標識の存在によって検出することができる。本明細書で用いられる A v e C 遺伝子産物は、その産物が特定の標品中の約 20 重量%を越えるタンパク質を構成する場合に「実質的に精製」されている。さらに、本明細書で用いられる A v e C 遺伝子産物は、その産物が特定の標品中の少なくとも約 80 重量%のタンパク質を構成する場合に「単離」されている。

【0066】

したがって、本発明によれば、プラスミド p S E 1 8 6 (A T C C 2 0 9 6 0 4) の A v e C 遺伝子産物をコードしている配列によってコードされるアミノ酸配列又は図 1 (配列番号 (S E Q I D N O) : 2) のアミノ酸配列又はその実質的な部分並びに突然変異型及びその縮重変異体を含む、組換え発現されて単離された又は実質的に精製された S . a v e r m i t i l i s A v e C 遺伝子産物が提供される。

10

【0067】

さらに、本発明によれば、A v e C 遺伝子産物を製造する方法であって、組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、組換え A v e C 遺伝子産物の産生を促進する条件下で培養し、このベクターは、A v e C 遺伝子産物をコードしているヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子であって、宿主細胞中のポリヌクレオチド分子の発現を制御する一つ又はそれ以上の調節要素と機能的に関連しているポリヌクレオチド分子を含み、そして細胞培養物から A v e C 遺伝子産物を回収することを含む方法が提供される。

20

【0068】

組換え発現された S . a v e r m i t i l i s A v e C 遺伝子産物は、A v e C 遺伝子産物機能を変化させ、それによってアベルメクチン生合成を調節する化合物をスクリーニングすること、及び A v e C 遺伝子産物に対する抗体を増加させることを含む種々の目的に有用である。

【0069】

充分な純度の A v e C 遺伝子産物が得られたら、それを S D S - P A G E、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸配列分析、アベルメクチン生合成経路で適当な生成物を生産する場合の生物学的活性等を含めた標準法によって特性決定することができる。例えば、A v e C 遺伝子産物のアミノ酸配列は、標準的なペプチド配列決定法を用いて決定することができる。A v e C 遺伝子産物は、親水性分析 (例えば、H o p p 及び W o o d s , 1 9 8 1 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 8 : 3 8 2 4 参照) 又は類似のソフトウェアアルゴリズムを用いて、A v e C 遺伝子産物の疎水性領域及び親水性領域を決定するようにさらに特性決定することができる。構造分析は、具体的な二次構造を推定する A v e C 遺伝子産物の領域を同定するようになうことができる。X 線結晶学 (E n g s t r o m , 1 9 7 4 , B i o c h e m . E x p . B i o l . 1 1 : 7 - 1 3) 、コンピュータモデリング (F l e t t e r i c k 及び Z o l l e r (編者) , 1 9 8 6 , C u r r e n t C o m m u n i c a t i o n s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (分子生物学における現在のコミュニケーション) , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y) 、及び核磁気共鳴 (N M R) のような生物物理学的方法は、A v e C 遺伝子産物とその基質との間の相互作用部位をマッピングし且つ検討するのに用いることができる。これら研究から得られる情報を用いて、a v e C O R F 中の突然変異のための新規な部位を選択して、より望ましいアベルメクチン産生特性を有する新規な S . a v e r m i t i l i s 菌株を開発することができる。

30

40

【0070】

5 . 3 . A v e C 突然変異体の構成及び使用

本発明の主要な目的は、B 1 : B 2 アベルメクチンの比の変化、最も好ましくは減少を生じる、S . a v e r m i t i l i s の a v e C 対立遺伝子における新規な突然変異を同定す

50

ることにある。したがって、本発明によれば、野生型aveC対立遺伝子のみを発現すること
を除いて同じである菌株の細胞と比較してアベルメクチン産生の検出可能な変化を示すS
・avermittilis細胞の新規な菌株を産生するのに有用なポリヌクレオチド分子
が提供される。好ましい実施態様によれば、このようなポリヌクレオチド分子は、野生型
aveC対立遺伝子だけを発現する以外は同じである菌株の細胞と比較して減少したクラ
ス2：1比でアベルメクチンを生産する新規なS・avermittilisの細胞の菌株
を産生するのに有用である。また、このような菌株の細胞は、単一の野生型のaveC対立遺
伝子のみを発現すること以外は同じである菌株の細胞よりも多い量のアベルメクチンを産
生するように追加の突然変異を含むこともできる。

【0071】

aveC対立遺伝子又はコード配列の突然変異には、一つ又はそれ以上のアミノ酸の置
換、欠失及び／又は付加をAveC遺伝子産物中に導入する、又はAveC遺伝子産物の
切断を引き起こす、又はその任意の組合せ、及び所望の結果を生じる任意の突然変異が含
まれる。このような突然変異したaveC対立遺伝子配列は、それらの任意の縮重変異体
を含むことを意図している。例えば、本発明によれば、aveC対立遺伝子又はその縮重
変異体、又はプラスミドpSE186(ATCC209604)のAveC遺伝子産物を
コードしている配列又はその縮重変異体、又は図1(配列番号(SEQ ID NO):
1)に示されるS・avermittilisのaveC ORFのヌクレオチド配列又は
その縮重変異体のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であるが、これは、AveC
遺伝子産物中の選択された位置にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異を更
に含む、ポリヌクレオチド分子が提供される。非制限的实施態様において、このような置
換は、配列番号(SEQ ID NO):2のアミノ酸25位、28位、35位、36位
、38位、40位、41位、48位、55位、61位、78位、84位、89位、90位
、99位、107位、108位、111位、120位、123位、136位、138位、
139位、141位、154位、159位、163位、179位、192位、196位、
198位、200位、202位、220位、228位、229位、230位、231位、
234位、238位、239位、250位、252位、266位、275位、278位、
289位又は298位に相当するAveC遺伝子産物の一つ以上のアミノ酸位置で生じる
。置換されるアミノ酸位置の好ましい組み合わせは、アミノ酸残基D48、A61、A8
9、L136、S138、A139、R163、G179、V196、A198、E23
8及びP289の一つ以上を含む。アミノ酸置換の具体的に好ましい組み合わせは、D4
8及びG179の両方並びにより具体的にはD48E及びG179Sの両方に置換を含む
。シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1比の減少を生じるアミノ酸置換の組み合わせ
の具体例を、図6A～6Jにまとめて示す。

【0072】

したがって、本発明によれば、ヌクレオチド配列が、野生型aveC対立遺伝子が失活
されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現するストレ
プトミセスアベルミティリス(*Streptomyces avermittilis*)菌
株ATCC53692の細胞がアベルメクチンのクラス2：1比を産生することができ、
この比は、代わりに野生型aveC対立遺伝子のみを発現するS・avermittilis
菌株ATCC53692の細胞により産生される比と比較して減少しているものである
ような、配列番号(SEQ ID NO):2のアミノ酸位置に相当するアミノ酸残基に
アミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、S・ave
rmittilis aveCの対立遺伝子、プラスミドpSE186(ATCC2096
04)のS・avermittilis AveC遺伝子産物コード配列若しくは図1(配
列番号(SEQ ID NO):1)記載のS・avermittilisのaveC ORF
のヌクレオチド配列又はそれらの縮重変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポ
リヌクレオチド分子であって、クラス2：1アベルメクチンがシクロヘキシルB2：シク
ロヘキシルB1アベルメクチンであるときクラス2：1アベルメクチン比は0.35：1
以下である、ポリヌクレオチド分子が提供される。より好ましい実施態様によれば、シク

10

20

30

40

50

ロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が、約 0 . 3 0 : 1 以下である。より好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が、約 0 . 2 5 : 1 以下である。より好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が、約 0 . 2 0 : 1 以下である。

【 0 0 7 3 】

その特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 8 があげられる (図 6 参照) 。

【 0 0 7 4 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b) : G 4 0 S、D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 5 9 があげられる。

【 0 0 7 5 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(c) : D 4 8 E、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 6 7 があげられる。

【 0 0 7 6 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(d) : D 4 8 E、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 7 0 及び p S E 5 7 2 があげられる。

【 0 0 7 7 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(e) : D 4 8 E、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S、A 2 0 0 G、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 7 1 があげられる。

【 0 0 7 8 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(f) : D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 1 及び p S E 5 4 6 があげられる。

【 0 0 7 9 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(g) : D 4 8 E、A 6 1 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 0 があげられる。

【 0 0 8 0 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(h) : D 4 8 E、A 6 1 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 2 があげられる。

【 0 0 8 1 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(i) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 9 があげられる。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(j): D 4 8 E、A 6 1 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、P 2 0 2 S、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 2 6 があげられる。

【0083】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(k): D 4 8 E、A 6 1 T、L 1 3 6 P、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 2 8 があげられる。

【0084】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(l): D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 0 があげられる。

【0085】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(m): D 4 8 E、A 6 1 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 1 があげられる。

【0086】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(n): D 4 8 E、L 8 4 P、G 1 1 1 V、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 4 があげられる。

【0087】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(o): Y 2 8 C、D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 5 があげられる。

【0088】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(p): D 4 8 E、A 6 1 T、A 1 0 7 T、S 1 0 8 G、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、S 1 9 2 A、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 2 があげられる。

【0089】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(q): D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、R 2 5 0 W からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 5 があげられる。

【0090】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(r): D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 8 があげられる。

【0091】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(s): D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 5 2 があげられる。

【0092】

10

20

30

40

50

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(t) : D 4 8 E、F 7 8 L、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 5 7 があげられる。

【 0 0 9 3 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(u) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D、F 2 7 8 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 6 4 及び p S E 5 6 5 があげられる。

【 0 0 9 4 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(v) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 6 8 があげられる。

【 0 0 9 5 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(w) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、G 1 1 1 V、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 3 があげられる。

【 0 0 9 6 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(x) : D 2 5 G、D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、V 1 4 1 A、I 1 5 9 T、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 4 があげられる。

【 0 0 9 7 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(y) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 9 0 G、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 8 があげられる。

【 0 0 9 8 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(z) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、G 1 1 1 V、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 1 があげられる。

【 0 0 9 9 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a a) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 2 0 があげられる。

【 0 1 0 0 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a b) : D 4 8 E、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S、S 2 3 1 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 2 3 があげられる。

【 0 1 0 1 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a c) : D 4 8 E、L 1 3 6 P、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 2 7 があげられる。

【 0 1 0 2 】

10

20

30

40

50

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a d) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、F 9 9 S、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 9 があげられる。

【 0 1 0 3 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a e) : G 3 5 S、D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 0 があげられる。

【 0 1 0 4 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a f) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 7 があげられる。

【 0 1 0 5 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a g) : D 4 8 E、A 8 9 T、G 1 1 1 V、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 5 0 があげられる。

【 0 1 0 6 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a h) : S 4 1 G、D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 5 8 があげられる。

【 0 1 0 7 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a i) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S、P 2 5 2 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 6 3 があげられる。

【 0 1 0 8 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a j) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、F 2 3 4 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 6 6 があげられる。

【 0 1 0 9 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a k) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 7 3 及び p S E 5 7 8 があげられる。

【 0 1 1 0 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a l) : Q 3 6 R、D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 7 4 があげられる。

【 0 1 1 1 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a m) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、R 1 6 3 Q、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 7 5 及び p S E 5 7 6 があげられる。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a n) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 7 7 があげられる。

【 0 1 1 3 】

その特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a o) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 2 及び p S E 5 2 4 があげられる。

【 0 1 1 4 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a p) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、K 1 5 4 E、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 3 があげられる。

【 0 1 1 5 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a q) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、K 1 5 4 R、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 5 があげられる。

【 0 1 1 6 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a r) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 6 があげられる。

【 0 1 1 7 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a s) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、A 1 9 8 G、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 7 があげられる。

【 0 1 1 8 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a t) : D 4 8 E、A 6 1 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、G 1 9 6 A、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 0 9 があげられる。

【 0 1 1 9 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a u) : D 4 8 E、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 4 及び p S E 5 2 5 があげられる。

【 0 1 2 0 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a v) : D 4 8 E、A 8 9 T、V 1 2 0 A、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 5 があげられる。

【 0 1 2 1 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a w) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、A 1 9 8 G、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 7 があげられる。

【 0 1 2 2 】

10

20

30

40

50

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a x) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、G 1 1 1 V、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 1 8 があげられる。

【 0 1 2 3 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a y) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 2 9 及び p S E 5 5 4 があげられる。

【 0 1 2 4 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(a z) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、L 1 3 6 P、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 2 があげられる。

【 0 1 2 5 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b a) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、A 1 9 8 G、V 2 2 0 A からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 6 があげられる。

【 0 1 2 6 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b b) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D、R 2 3 9 H、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 3 7 があげられる。

【 0 1 2 7 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b c) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 1 があげられる。

【 0 1 2 8 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b d) : D 4 8 E、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D、P 2 8 9 L からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 4 9 及び p S E 5 5 3 があげられる。

【 0 1 2 9 】

その別の特定の実施態様によれば、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b e) : D 4 8 E、A 6 1 T、A 8 9 T、S 1 3 8 T、A 1 3 9 F、G 1 7 9 S、V 1 9 6 A、E 2 3 8 D からなる群から選択された組み合わせを含む。これらのアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的例として、p S E 5 5 1 があげられる。

【 0 1 3 0 】

さらに、本発明によれば、ヌクレオチド配列が、野生型 a v e C 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現するストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株 A T C C 5 3 6 9 2 の細胞がアベルメクチンのクラス 2 : 1 比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 a v e C 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 A T C C 5 3 6 9 2 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (S E Q I D N O) : 2 のアミノ酸位置に相当するアミノ酸残基にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis* a v e C の対立遺伝子、プラスミド p S E 1 8 6 (A T C C 2 0 9 6 0 4

10

20

30

40

50

）の *S. avermitilis* AveC 遺伝子産物コード配列若しくは図 1（配列番号（SEQ ID NO）：1）記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又はそれらの縮重変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス 2：1 アベルメクチンがシクロヘキシル B 2：シクロヘキシル B 1 アベルメクチンであるとき、クラス 2：1 アベルメクチン比は約 0.40：1 以下に減少されており、且つ前記アミノ酸置換の組み合わせが

（b f）D 4 8 E、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D；及び

（b g）Y 2 8 C、Q 3 8 R、D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D

からなる群から選択された組み合わせを含む、ポリヌクレオチド分子が提供される。

【0131】

10

（b f）群のアミノ酸置換をコードするプラスミドの非制限的な例として、p S E 5 5 6 及び p S E 5 6 9 があげられる。（b g）群のアミノ酸置換をコードしているプラスミドの非制限的な例として、p S E 5 6 1 があげられる。

【0132】

本発明では、上記したアミノ酸置換は、このような置換を生じる *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体のヌクレオチド配列に対する修飾によりおこなうことができることを意図している。例えば、生来のコドン配列又はその縮重変異体を同じアミノ酸置換をコードするいくつかの別のコドンに変更することにより、ここに記載されているアミノ酸置換のほとんどをおこなうことが可能である。上記したアミノ酸置換をコードできる種々の可能な配列は、本発明の開示及び遺伝子コードの公知の縮重から、当業者には容易に明らかとなろう。上記で列挙した各具体的な組み合わせについての非限定的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、図 6 に示した非サイレント的ヌクレオチドの変更によりおこなうことができる。

20

【0133】

本明細書で使用される表現「アミノ酸置換の組み合わせは、・・・からなる群の組み合わせを含む」等は、本発明による *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換が、少なくとも具体的に列挙した置換を含み、また、他のアミノ酸置換、又はアミノ酸欠失、又はアミノ酸付加、又はこれらの組み合わせを含んでいてもよく、ここで *S. avermitilis* 細胞における得られた *AveC* 遺伝子産物の発現が、B 2：B 1 アベルメクチン比の所望の減少を生じることを意味する。

30

【0134】

aveC 対立遺伝子又はその縮重変異体に対する突然変異は、種々の公知の方法、例えば、誤りがちの PCR を使用することによるか、又はカセット突然変異誘発のいずれかにより実施することができる。例えば、オリゴヌクレオチドに対する突然変異誘発を用いて、*aveC* 対立遺伝子又は ORF の配列を一定方法で、例えば、一つ又はそれ以上の制限部位、又は終止コドンを *aveC* 対立遺伝子又は ORF 内の特定の領域に導入するように変更することができる。ランダムフラグメント化、突然変異誘発の反復サイクル及びヌクレオチドシャッフリングを含む、米国特許第 5,605,793 号、米国特許第 5,830,721 号及び米国特許第 5,837,458 号に記載のような方法は、*aveC* 突然変異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の大きなライブラリーを生成するのに使用できる。

40

【0135】

標的突然変異は、特にそれらが *AveC* 遺伝子産物中の一つ又はそれ以上の保存アミノ酸残基を変更するのに役立つ場合に有用なことがある。例えば、米国特許第 6,248,579 号に記載されているように、*S. avermitilis*（配列番号（SEQ ID NO）：2）の *AveC* 遺伝子産物の演繹したアミノ酸配列と、*S. griseo chromogenes*（配列番号（SEQ ID NO）：5）及び *S. hygroscopicus*（配列番号（SEQ ID NO）：4）由来の *AveC* 相同遺伝子産物の演繹したアミノ酸配列を比較すると、これら種間にアミノ酸残基の有意に保存された部位があることが明らかである。これら保存アミノ酸残基の一つ又はそれ以上の変化を生じる

50

標的突然変異誘発は、アベルメクチン産生において望ましい変更を示す新規な突然変異菌株を産生するのに有効である。

【0136】

ランダム突然変異誘発も有用であり、*S. avermitilis*の細胞を紫外線又はx線にあてるか、又はN-メチル-N'-ニトロソグアニジン、スルホン酸エチルメタン、亜硝酸又はナイトロジェンマスタードのような化学的突然変異原に暴露することによっておこなうことができる。突然変異誘発技術の概要については、例えば、上記したAusubel, 1989を参照されたい。

【0137】

いったん突然変異したポリヌクレオチド分子が生成したら、それらをスクリーニングして、それらが*S. avermitilis*中でアベルメクチン生合成を調節することができるかどうかを確認する。好ましい態様によれば、突然変異したヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を、*aveC*遺伝子が失活して*aveC*ネガティブ(*aveC*⁻)バックグラウンドを与える*S. avermitilis*菌株を相補することによって調べる。非制限的方法において、突然変異したポリヌクレオチド分子をスプライシングして、一つ又はそれ以上の調節要素と機能的に関連した発現プラスミドにするが、このプラスミドは、好ましくは形質転換された細胞の選択を可能にする一つ又はそれ以上の薬物耐性遺伝子も含む。次に、このベクターを、公知の方法を用いて*aveC*宿主細胞に形質転換し、そして形質転換された細胞を選択し、適当な発酵培地中においてアベルメクチン生産を可能にする又は誘導する条件下で培養する。例えば、好適なスターターサブユニットを培地を含め、当該技術分野において公知なアベルメクチン産生に最適な条件下で培養することにより実施する。次に、発酵生成物を、HPLCによって分析して、突然変異したポリヌクレオチド分子が宿主細胞を相補する能力について測定する。pSE188、pSE199、pSE231、pSE239及びpSE290～pSE297を含む、アベルメクチンのB2:B1比を減少させることができる突然変異したポリヌクレオチド分子を有するいくつかのプラスミドベクターを、以下のセクション8.3に例示する。このようなプラスミドベクターの他の例を、図6に列挙する。

【0138】

本発明の上記した方法のいずれかを、好ましくはシクロヘキサンカルボン酸を補充した発酵培養培地を用いて実施できるが、他の好適な脂肪酸前駆体、例えば、表1にあげた脂肪酸前駆体のいずれか一つ又はメチルチオ乳酸を使用してもよい。

【0139】

望ましい方向でのアベルメクチン産生を調節する突然変異させたポリヌクレオチド分子が同定されると、ヌクレオチド配列における突然変異の位置を決定できる。例えば、突然変異*aveC*遺伝子産物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分子を、PCRにより単離し、公知の方法を用いてDNA配列分析に附することができる。突然変異した*aveC*対立遺伝子のDNA配列を、野生型*aveC*対立遺伝子のDNA配列と比較することにより、アベルメクチン産生の変更の原因となる突然変異(単一又は複数)を決定することができる。例えば、残基55(S55F)、138(S138T)、139(A139T)又は230(G230D)のいずれかにおける単一アミノ酸置換か、又は138位(S138T)及び139位(A139T又はA139F)における二重置換を含む*S. avermitilis* *aveC*遺伝子産物は、産生されるクラス2:1アベルメクチン比が変更されるような*aveC*遺伝子産物機能の変化を生じたが(以下のセクション8参照)、ここで、列挙されるアミノ酸位置は、図1(配列番号(SEQ ID NO):2)に示される位置に相当する。さらに、次の7種の突然変異の組合せが、各々アベルメクチンのクラス2:1比を効果的に減少させることがわかった:(1)D48E/A89T;(2)S138T/A139T/G179S;(3)Q38P/L136P/E238D;(4)F99S/S138T/A139T/G179S;(5)A139T/M228T;(6)G111V/P289L;(7)A139T/K154E/Q298H。本発明によれば、アベルメクチンのシクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1

10

20

30

40

50

比を減少させる突然変異の59種類のさらなる組み合わせが提供され、これらは、図6に示され、且つ添付の特許請求の範囲で列挙されている。

【0140】

本明細書で用いられるA139Tのような上記表示は、表示の位置（この場合、ポリペプチドの139位（配列番号（SEQ ID NO）：2参照）での単一文字表示による最初のアミノ酸残基（この例では、アラニン（A））を示し、その後最初にアミノ酸残基に取ってかわるアミノ酸残基（この例では、トレオニン（T））を示している。

【0141】

本明細書において、*S. avermitilis* 染色体又は本発明のベクター又は単離ポリヌクレオチド分子において *aveC* 対立遺伝子によりコードされているアミノ酸残基が配列番号（SEQ ID NO）：2の特定のアミノ酸残基「に相当する」と称される場合、又はアミノ酸置換が、配列番号（SEQ ID NO）：2の特定の番号付けされたアミノ酸残基のもの「に相当する」特定の位置で生じると称される場合、これは、*AveC* 遺伝子産物において同じ相対位置でのアミノ酸残基を指すことを意図している。当業者は、これを、配列番号（SEQ ID NO）：2としてここで示されているアミノ酸配列を参照することにより迅速に決定することができる。

10

【0142】

本明細書において、特定の突然変異をコードしている *aveC* 対立遺伝子における特定の突然変異は、配列番号（SEQ ID NO）：1に示すような特定のヌクレオチド位置「に相当する」*aveC* 対立遺伝子における特定のヌクレオチド位置での塩基の変更としてあげられる場合、又は *aveC* 対立遺伝子におけるヌクレオチド位置が配列番号（SEQ ID NO）：1における特定のヌクレオチド位置「に相当する」と称される場合、*aveC* ヌクレオチド配列又はその縮重変異体における同じ相対位置でのヌクレオチドを指すことを意図している。当業者は、これを、配列番号（SEQ ID NO）：1としてここで示されているヌクレオチド配列を参照することにより迅速に決定することができる。

20

【0143】

本明細書においてシクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンの比を指す用語「約」は、具体的に述べた数値に、述べた値の10%をプラス又はマイナスした値を指す。

30

【0144】

本発明のポリヌクレオチド分子は、「単離」してもよい。このことは、(i)異なるヌクレオチド配列を有する他のポリヌクレオチド分子を実質的に含有しない程度まで精製するか、又は(ii)自然発生しない環境、例えば、*S. avermitilis* 由来の *aveC* 対立遺伝子又はその突然変異型が、*S. avermitilis* の細胞以外の細胞に存在する環境に存在するか、又は(iii)自然発生しない形態、例えば、より短いDNA片、例えば、細菌染色体から消化した制限断片であり、主に *aveC* コード領域又はその突然変異型を含み、その関連調節配列を有するか又は有さないものとしてか、又は続いて、細菌細胞（*S. avermitilis* の細胞以外）の染色体等のDNAの非相同片、又はプラスミド又はファージ等のベクターのDNAに組み込むか、又は生来の *aveC* 対立遺伝子のもので他の座での *S. avermitilis* 染色体に組み込んだ形態で存在することを意味する。

40

【0145】

さらに、本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド分子を含む組み換えベクターが提供される。このような組み換えベクターを使用して、*S. avermitilis* 染色体の *aveC* 対立遺伝子の部位に対して本発明の突然変異させたヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子のいずれかを標的として、例えば、相同的組み換えにより、*aveC* ORF又はその一部分に挿入するか、又はそれと置き換えることができる。しかしながら、本発明によれば、このようにして提供される本発明の突然変異させたヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子も、*aveC* 対立遺伝子以外の部位の *S. avermit*

50

i l i s 染色体に挿入したとき、又は *S . a v e r m i t i l i s* 細胞にエピゾーム的に維持したときに、アベルメクチン合成を調節する役割を果たすことができる。したがって、さらに、本発明によれば、本発明の突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含むベクターが提供される。このベクターを使用して、*a v e C* 遺伝子以外の *S . a v e r m i t i l i s* 染色体における部位にポリヌクレオチド分子を挿入したり、又はエピゾーム的に維持することができる。

【0146】

非制限的な実施態様によれば、ベクターは、遺伝子置換ベクターである。このベクターを使用して、本発明による突然変異させた *a v e C* 対立遺伝子又はその縮重変異体を *S . a v e r m i t i l i s* の菌株の細胞に挿入することにより、*S . a v e r m i t i l i s* の新規な菌株を生成することができる。ここで、その細胞は、野生型 *a v e C* 対立遺伝子のみを発現する以外は同じ菌株の細胞と比較して、減少したクラス 2 : 1 比でアベルメクチンを産生することができるものである。このような遺伝子置換ベクターは、このようにして提供される発現ベクター、例えば、以下のセクション 8 で例示する発現ベクター、に存在する突然変異させたポリヌクレオチド分子を用いて構築することができる。

10

【0147】

さらに、本発明によれば、突然変異させた *a v e C* 対立遺伝子又はその縮重変異体を *S . a v e r m i t i l i s* の菌株の細胞に挿入して、野生型 *a v e C* 対立遺伝子のみを発現する以外は同じである菌株の細胞と比較してアベルメクチンの産生量を変更して産生する新規な細胞菌株を生成することができるベクターが提供される。好ましい実施態様によれば、細胞により産生されるアベルメクチンの量が増加する。具体的な実施態様ではあるが非制限的な実施態様によれば、このようなベクターは、当該技術分野において公知の強力なプロモーター、例えば、*a v e C* O R F から上流に位置し且つそれと機能的に関連している *S a c c h a r o p o l y s p o r a e r y t h r a e a* からの強力な構成性 *e r m E* プロモーターなどをさらに含む。このようなベクターは、プラスミド p S E 1 8 9 の突然変異させた *a v e C* 対立遺伝子を使用し、米国特許第 6 , 2 4 8 , 5 7 9 号に記載の方法により構築できる。

20

【0148】

本発明によれば、*S . a v e r m i t i l i s* の野生型菌株において *a v e C* 遺伝子を不活性化するのに有用である遺伝子置換ベクターが提供される。非制限的な実施態様によれば、このような遺伝子置換ベクターを、以下のセクション 8 . 1 で例示するプラスミド p S E 1 8 0 (A T C C 2 0 9 6 0 5) 中に存在する突然変異したポリヌクレオチド分子を用いて構築することができる (図 3) 。さらに、本発明によれば、*S . a v e r m i t i l i s* 染色体における原位置の *a v e C* 遺伝子の脇に生来位置するヌクレオチド配列、例えば、図 1 (配列番号 (S E Q I D N O) : 1) に示すフランキングヌクレオチド配列、を含むか、又はこのヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド分子を含む遺伝子置換ベクターが提供される。このベクターは、*S . a v e r m i t i l i s a v e C* O R F を欠失させるのに使用できる。

30

【0149】

さらに、本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド分子又は組換えベクターを含む宿主細胞が提供される。この宿主細胞は、ポリヌクレオチド分子又は組み換えベクターのための宿主として使用することができる原核細胞又は真核細胞であることができる。好ましい実施態様によれば、宿主細胞は、細菌性細胞である。より好ましい実施態様によれば、宿主細胞は、*S t r e p t o m y c e s* 細胞である。より好ましい実施態様によれば、宿主細胞は、*S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s* の細胞である。

40

【0150】

さらに、本発明によれば、(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s*) 菌株の細胞における前記 *a v e C* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *A v e C* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(i i) *S . a v e r m i t i l i s* 菌株の細胞に、アミノ酸置

50

換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規な S . a v e r m i t t i l i s 菌株の製造方法であって、前記アミノ酸置換の組み合わせが、上記した (a) ~ (b e) から選択されたものである、方法が提供される。

【 0 1 5 1 】

さらに、本発明によれば、(i) S . a v e r m i t t i l i s 菌株の細胞における前記 a v e C 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 A v e C 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(i i) S . a v e r m i t t i l i s 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規な S . a v e r m i t t i l i s 菌株の製造方法であって、前記突然変異させた a v e C 対立遺伝子又は縮重変異体を含む細胞が、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0 . 3 5 : 1 以下の比で産生できるものである、方法が提供される。その非制限的实施態様によれば、突然変異 a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (a) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている。

10

【 0 1 5 2 】

その好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 3 0 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、突然変異 a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (f) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている。

20

【 0 1 5 3 】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 5 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、突然変異 a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (w) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている。

【 0 1 5 4 】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 0 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、突然変異 a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体は、上記した (a o) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている。

30

【 0 1 5 5 】

さらに、本発明によれば、(i) ストレプトミセスアベルミティリス (S t r e p t o m y c e s a v e r m i t t i l i s) 菌株の細胞における前記 a v e C 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 A v e C 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(i i) S . a v e r m i t t i l i s 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規 S . a v e r m i t t i l i s 菌株の製造方法であって、前記アミノ酸置換の組み合わせが、(b f) 及び (b g) からなる群から選択されたものである、製造方法が提供される。その好ましい実施態様によれば、このような突然変異させた a v e C 対立遺伝子又は縮重変異体を含む S . a v e r m i t t i l i s の細胞は、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを約 0 . 4 0 : 1 以下の比で産生できる。

40

【 0 1 5 6 】

a v e C 対立遺伝子をそのように突然変異させることにより、又は突然変異させた a v e C 対立遺伝子若しくはその縮重変異体をそのように導入することにより、上記であげた工程により、新規な S . a v e r m i t t i l i s の菌株が得られる。

【 0 1 5 7 】

さらに、本発明によれば、上記した (a) ~ (b e) から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又は

50

その縮重変異体を含む *Streptomyces* 種の細胞が提供される。その好ましい実施態様によれば、*Streptomyces* の種は、*S. avermitilis* である。

【0158】

さらに、本発明によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0 . 3 5 : 1 以下の比で産生できる *S. avermitilis* の細胞が提供される。その非限定的実施態様によれば、上記細胞は、上記した (a) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0159】

その好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 3 0 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、上記細胞は、上記した (f) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0160】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 5 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、上記細胞は、上記した (w) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0161】

そのより好ましい実施態様によれば、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比は、約 0 . 2 0 : 1 以下である。その非制限的实施態様によれば、上記細胞は、上記した (a o) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0162】

さらに、本発明によれば、上記した (b f) 及び (b g) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む、*Streptomyces* 種の細胞が提供される。その好ましい実施態様によれば、*Streptomyces* の種は、*S. avermitilis* である。そのより好ましい実施態様によれば、上記細胞は、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを約 0 . 4 0 : 1 以下の比で産生できる *S. avermitilis* の細胞である。

【0163】

上記であげた突然変異のいずれも、プラスミド等の染色体外要素上の本発明の細胞上に存在することができるけれども、このような突然変異は、*S. avermitilis* 染色体に組み込んだ a v e C コード配列に存在し、好ましくは必ずというわけではないけれども、生来の a v e C 対立遺伝子の部位に存在することが好ましい。

【0164】

このような新規な細胞菌株は、ドラメクチン等の商業的に望ましいアベルメクチンの大規模生産に有用である。

【0165】

さらに、本発明によれば、アベルメクチンの製造方法であって、本発明の *S. avermitilis* 細胞を、培地中で、それからアベルメクチンを産生するか又は誘発する条件下で培養することと、培養から上記アベルメクチンを回収することを含む、方法が提供される。好ましい実施態様によれば、この方法に使用される細胞は、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0 . 3 5 : 1 以下の比、より好ましくは約 0 . 3 0 : 1 以下の比、より好ましくは約 0 . 2 5 : 1 以下の比、より好ましくは約 0 . 2 0 :

10

20

30

40

50

1以下の比で産生する。

【0166】

その好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンを0.35：1以下の比で産生する細胞は、上記(a)～(be)からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含むAveC遺伝子産物をコードする突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0167】

そのさらに好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンを約0.30：1以下の比で産生する細胞は、上記(f)～(be)からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含むAveC遺伝子産物をコードする突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

10

【0168】

そのさらに好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンを約0.25：1以下の比で産生する細胞は、上記(w)～(be)からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含むAveC遺伝子産物をコードする突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0169】

そのさらに好ましい実施態様によれば、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンを約0.20：1以下の比で産生する細胞は、上記(ao)～(be)からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含むAveC遺伝子産物をコードする突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

20

【0170】

別の実施態様によれば、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンを約0.40：1以下の比で産生する細胞は、上記(bf)～(bg)からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含むAveC遺伝子産物をコードする突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を含む。

【0171】

本発明の方法によれば、ドラメクチン等の商業的に価値のあるアベルメクチンの産生効率が増加する。

【0172】

さらに、本発明によれば、ストレプトミセスアベルミティリス(*Streptomyces avermitilis*)の細胞により産生されるシクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンの組成物であって、前記シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンが前記細胞が培養された培地に存在しており、前記培地に存在するシクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比が0.35：1以下、好ましくは約0.30：1以下、より好ましくは約0.25：1以下、さらに好ましくは約0.20：1以下である、組成物が提供される。特定の実施態様によれば、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンの組成物は、突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を発現する*S. avermitilis*の菌株の細胞により産生される。この場合の、突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を発現する*S. avermitilis*の菌株の細胞は、突然変異させたaveC対立遺伝子を発現しないが、代わりに野生型aveC対立遺伝子のみを発現する同様の*S. avermitilis*の菌株の細胞と比較して、細胞により産生されるシクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比の減少する遺伝子産物をコードするものである。

30

40

【0173】

その好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比が0.35：1以下である場合、この組成物は、上記(a)～(be)からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含むAveC遺伝子産物をコードする突然変異させたaveC対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

【0174】

50

そのさらに好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0 . 3 0 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (f) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

【 0 1 7 5 】

そのさらに好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0 . 2 5 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (w) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

10

【 0 1 7 6 】

そのさらに好ましい実施態様によれば、組成物がシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0 . 2 0 : 1 以下である場合、この組成物は、上記 (a o) ~ (b e) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される。

【 0 1 7 7 】

さらに、本発明によれば、ストレプトミセスアベルミティリス (*S t r e p t o m y c e s a v e r m i t i l i s*) の細胞により産生されるシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンの組成物であって、前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンが前記細胞が培養された培地に存在しており、前記培地に存在するシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が約 0 . 4 0 : 1 以下であり、そして上記 (b f) 及び (b g) からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードする突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む細胞により産生される、組成物が提供される。

20

【 0 1 7 8 】

新規なアベルメクチン組成物は、細胞を、例えば、部分的又は完全に枯渇した発酵培養液中で培養した培地に存在することが好ましいけれども、アベルメクチン組成物を、公知の生化学的精製方法、例えば、硫酸アンモニウム沈降、透析、サイズ分画、イオン交換クロマトグラフィー、H P L C 等により、培養液から部分的又は実質的に精製してもよい。

30

【 0 1 7 9 】

上記したようなシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 の比を減少させて産生できる細胞を含む *S . a v e r m i t i l i s* の新規な菌株を得る他に、本発明は、さらなる突然変異を *S . a v e r m i t i l i s* の細胞に組み込んでアベルメクチン産生の特性をさらに改善することができることを意図している。非限定的実施態様によれば、本発明の細胞は、さらに修飾を含んでいてアベルメクチンの産生レベルを増加することができる。一実施態様によれば、このような細胞は、(i) *S . a v e r m i t i l i s* の細胞における aveC 対立遺伝子を突然変異させるか、又は (i i) 突然変異させた aveC 対立遺伝子若しくはその縮重変異体を *S . a v e r m i t i l i s* の菌株の細胞に導入するが、ここで突然変異させた対立遺伝子の発現により、単一の野生型 aveC 対立遺伝子のみを発現する以外は同じである菌株の細胞と比較して、突然変異させた aveC 対立遺伝子を発現する *S . a v e r m i t i l i s* の菌株の細胞により産生されるアベルメクチンの量が増加するものであり、そして単一の野生型 aveC 対立遺伝子のみを発現する菌株の細胞により産生されるアベルメクチンの量と比較してアベルメクチンを増加した量で産生する形質転換細胞を選択することにより調製できる。例えば、a v e C O R F から上流に挿入され、且つ a v e C O R F と動作可能に関連している強力なプロモーター、例えば、*S a c c h a r o p o l y s p o r a e r y t h r a e a* 由来の強力な構成性 e r m E プロモーターを含むように aveC 対立遺伝子を修飾することができる。別の実施態様によれば、一つ以上の突然変異を、*S . a v e r m i t i l i s* の a v e R 1 及び / 又は a v e R 2 遺伝子に導入す

40

50

ることにより、米国特許第6,197,591号(Stutzman-Engwall等; 2001年3月6日発行)に記載のアベルメクチン産生のレベルを増加することができる。

【0180】

5.4. アベルメクチンの使用

アベルメクチンは、駆虫薬、外部寄生生物撲滅薬、殺虫薬及びダニ駆除薬として特に有用である高活性な抗寄生生物薬である。本発明の方法によって製造されるアベルメクチン化合物は、これら目的のいずれにも有用である。例えば、本発明によって製造されるアベルメクチン化合物は、ヒトにおける種々の疾患又は状態、とりわけ当該技術分野において公知の寄生生物感染によって引き起こされる疾患又は状態を治療するのに有用である。例えば、Ikeda及びOmura, 1997, Chem. Rev. 97(7): 2591-2609を参照。より詳細には、本発明により製造されるアベルメクチン化合物は、ヒト、家畜、ブタ、ヒツジ、家禽、ウマ又はウシに感染できる寄生線虫のような内部寄生生物によって引き起こされる種々の疾患又は状態を治療する場合に効果的である。

10

【0181】

より詳細には、本発明により製造されるアベルメクチン化合物は、ヒトに感染する線虫、更には、様々な動物種に感染する線虫に対して有効である。このような線虫には、鉤虫属(Ancylostoma)、アメリカ鉤虫属(Necator)、回虫属(Ascaris)、ストロングロイデス属(Strongyloides)、旋毛虫属(Trichinella)、毛頭虫属(Capillaria)、鞭虫属(Trichuris)、蟯虫属(Enterobius)、イヌ糸状虫(Dirofilaria)のような胃腸寄生虫、及びフィラリア蟻虫のように血液又は他の組織若しくは器官中、及び Strongyloides 及び Trichinella の腸管内状態抽出物中に見出される寄生虫が含まれる。

20

【0182】

本発明によって製造されるアベルメクチン化合物は、例えば、マダニ、ダニ、シラミ、ノミ、クロバエ類、刺咬性昆虫、又は特にウシ及びウマに影響を与えることがある移行性双翅類幼虫によって引き起こされる哺乳類及び鳥類の節足動物外寄生を含む外部寄生生物感染を治療するのに有用である。

【0183】

本発明によって製造されるアベルメクチン化合物は、例えば、特に、ゴキブリ、イガ、カツオブシムシ及びイエバエなどの家庭害虫、さらには貯蔵穀物及び農業用植物の害虫であって、クモダニ、アリマキ、イモムシ及び、特にバッタのような直翅類昆虫を含む害虫に対する殺虫剤としても有用である。

30

【0184】

本発明によって製造されるアベルメクチン化合物を用いて治療することができる動物には、ヒツジ、ウシ、ウマ、シカ、ヤギ、ブタ、家禽を含めた鳥類、及びイヌ及びネコが含まれる。

【0185】

本発明によって製造されるアベルメクチン化合物は、具体的に意図される使用、治療される宿主動物の具体的な種、及び関与する寄生生物又は昆虫に適した製剤において投与される。殺寄生生物薬としての使用には、本発明によって製造されるアベルメクチン化合物を、カプセル剤、大型丸剤、錠剤又は液状飲薬の形で経口投与することができ、又は他に、滴下剤として、又は注射によって、又は植込錠として投与することができる。このような製剤は、標準的な獣医学慣例によって慣用的に製造される。したがって、カプセル剤、大型丸剤又は錠剤は、デンプン、ラクトース、タルク、ステアリン酸マグネシウム等のような崩壊剤及び/又は結合剤を更に含有する適当な微粉希釈剤又は担体と一緒に活性成分を混合することによって製造することができる。飲薬製剤は、分散助剤又は湿潤剤等と一緒に水溶液中に活性成分を分散させることによって製造することができる。注射用製剤は、滅菌液剤の形で製造することができ、これは、他の物質、例えば、その溶液を血液と等

40

50

張にするのに十分な塩類及び／又はグルコースなどを含有できる。

【0186】

このような製剤は、活性化合物の重量に関して、患者、又は治療される宿主動物の種、感染の重症度及び種類、及び宿主の体重によって異なる。一般的に、経口投与の場合、単一用量として又は分割用量で与えられる約0.001～10mg/kg（患者又は動物の体重）の用量の活性化合物を、1～5日間投与することで十分である。しかしながら、臨床症状に基づいて、例えば、医師又は獣医師によって決定されるように、これよりも高い又は低い投薬量範囲が指示される場合がある。

【0187】

他に、本発明によって製造されるアベルメクチン化合物は、動物用飼料と組み合わせて投与しうが、この目的には、普通の動物用試料と混合するための濃厚飼料添加物又はプレミックスを製造することができる。

【0188】

殺虫剤としての使用に、及び農業病害虫を処理には、本発明により製造されるアベルメクチン化合物は、標準的な農学慣例によって、噴霧剤、散布剤、乳剤等として適用することができる。

【実施例】

【0189】

6. 実施例：Streptomyces avermitilisの発酵およびB2：B1アベルメクチンの分析

分岐状鎖2-オキソ酸デヒドロゲナーゼおよび5-O-メチルトランスフェラーゼの両方の活性を欠く菌株は、発酵培地に脂肪酸を補充しない場合、アベルメクチンを産生しない。この実施例では、このような突然変異体において、種々の脂肪酸の存在下で生合成を開始するとき、広範囲のB2：B1比のアベルメクチンを得ることができることを示す。

【0190】

6.1. 材料および方法

Streptomyces avermitilis ATCC 53692を、Starch (Nadex, Laing National) 20g; Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN) 15g; Ardamine pH (Yeast Products社) 5g; 炭酸カルシウム1gから成る種培地中で調製された全ブイオンとして-70℃で貯蔵した。最終容積を、水道水を用いて1リットルに調整し、pHは7.2に調整し、培地を121℃で25分間オートクレーブ処理した。

【0191】

上記標品の融解懸濁液2mlを用いて、50mlの同培地が入っているフラスコに接種した。28℃においてロータリーシェーカー上、180rpmで48時間インキュベーション後、2mlのブイオンを用いて、Starch 80g; 炭酸カルシウム7g; Pharmamedia 5g; リン酸水素二カリウム1g; 硫酸マグネシウム1g; グルタミン酸0.6g; 硫酸第一鉄七水和物0.01g; 硫酸亜鉛0.001g; 硫酸マンガン0.001gから成る産生培地50mlが入っているフラスコに接種した。最終容積を、水道水を用いて1リットルに調整し、pHは7.2に調整し、培地を121℃で25分間オートクレーブ処理した。

【0192】

種々のカルボン酸基質（表1参照）を、メタノール中に溶解させ、接種から24時間後に発酵ブイオンに加えて、0.2g/リットルの最終濃度にした。その発酵ブイオンを28℃で14日間インキュベーション後、ブイオンを遠心分離し（2,500rpm、2分間）、上澄みを捨てた。菌糸体ペレットを、アセトン（15ml）を用い、次にジクロロメタン（30ml）を用いて抽出し、有機相を分離し、濾過した後、蒸発乾固させた。残留物を、メタノール（1ml）中に取り、240nmに設定した走査型ダイオードアレイ

10

20

30

40

50

検出器を備えた Hewlett-Packard 1090A 液体クロマトグラフを用いた HPLC により分析した。用いたカラムは、40 で維持した Beckmann Ultrasphere C-18、5 μ m、4.6 mm \times 25 cm カラムであった。25 μ l の上のメタノール溶液をカラムに注入した。溶離は、80 : 20 ~ 95 : 5 のメタノール - 水の直線勾配を用いて 0.85 ml / 分で 40 分間にわたっておこなった。2 種類の標準濃度のシクロヘキシル B 1 を用いて、検出器応答を検量し、B 2 および B 1 のアベルメクチンの曲線下面積を測定した。

【0193】

6.2. 結果

B 2 および B 1 のアベルメクチンについて観察された HPLC 保持時間、および 2 : 1 比率を表 1 に示す。 10

【0194】

【表 1】

表 1

基質	保持時間 (分)		比
	B2	B1	B2 : B1
4-テトラヒドロピラン・カルボン酸	8.1	14.5	0.25
イソ酪酸	10.8	18.9	0.5
3-フロ酸	7.6	14.6	0.62
S-(+)-2-メチル酪酸	12.8	21.6	1.0
シクロヘキサンカルボン酸	16.9	26.0	1.6
3-チオフェンカルボン酸	8.8	16.0	1.8
シクロペンタンカルボン酸	14.2	23.0	2.0
3-トリフルオロメチル酪酸	10.9	18.8	3.9
2-メチルペンタン酸	14.5	24.9	4.2
シクロヘプタンカルボン酸	18.6	29.0	15.0

20

30

【0195】

表 1 に示されたデータは、極めて広範囲の B 2 : B 1 アベルメクチン生成物比を示し、供給される脂肪酸側鎖スターター単位の性状によって、クラス 2 化合物のクラス 1 化合物への脱水変換の結果に顕著な差があることがわかる。これは、AveC タンパク質への変更によって生じる B 2 : B 1 比の変化が、特定の基質に特異的でありうるということを示している。したがって、特定の基質を用いて得られる B 2 : B 1 比の変化を示す突然変異体に関するスクリーニングは、その基質の存在下でおこなう必要がある。続いての以下の実施例では、シクロヘキサンカルボン酸をスクリーニング基質として用いる。しかしながら、この基質は、単に本発明の可能性を示すのに用いられ、発明の適応性を限定するものではない。 40

【0196】

7. 実施例 : aveC 遺伝子の単離

この実施例では、AveC 遺伝子産物をコードする Streptomyces avermitilis 染色体のある領域の単離および特性決定を記載する。下に示されるように、aveC 遺伝子は、産生されるシクロヘキシル - B 2 対シクロヘキシル - B 1 (B 2 : B 1) アベルメクチン比を変更できることが確認された。

【0197】

7.1. 材料および方法

50

7.1.1. DNA単離用のStreptomycesの増殖

次の方法により、Streptomycesを増殖させた。S. avermitilis ATCC 31272の単一コロニー（単一コロニー単離物#2）を、Difco Yeast Extract 5g; Difco Bactoペプトン 5g; デキストロース 2.5g; MOPS 5g; Difco Bacto寒天 15gを含有する1/2強度YPD-6上で分離した。最終容積は、dH₂Oを用いて1リットルに調整し、pHは7.0に調整し、培地を121で25分間オートクレーブ処理した。

【0198】

上の培地中で増殖した菌系体を用いて、25mm x 150mm試験管中の10mlのTSB培地（Difco Tryptic Soy Broth 30g、1リットルdH₂O中、121で25分間オートクレーブ処理される）に接種し、これを28で振とうしながら（300rpm）48~72時間維持した。

【0199】

7.1.2. Streptomycesからの染色体DNA単離

上記のように増殖した菌系体のアリコート（0.25mlまたは0.5ml）を、1.5mlミクロ遠心管に入れ、12,000 x gで60秒間の遠心分離によって細胞を濃縮した。上澄みを捨て、細胞を、2mg/mlリゾチームを含有する0.25mlのTSE緩衝液（20mlの1.5Mスクロース、2.5mlの1MトリスHCl, pH 8.0、2.5mlの1M EDTA, pH 8.0および75mlのdH₂O）中に再懸濁させた。これらの試料を、37で振とうしながら20分間インキュベーションし、Auto Gen 540（商標）自動核酸単離装置（Integrated Separation Systems、Natick、MA）中に加え、Cycle 159（装置ソフトウェア）を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって用いてゲノムDNAを単離した。

【0200】

別法として、5mlの菌系体を17mm x 100mm試験管に入れ、3,000rpmで5分間の遠心分離によって細胞を濃縮し、上澄みを除去した。細胞を、1mlのTSE緩衝液中に再懸濁させ、3,000rpmで5分間の遠心分離によって濃縮し、上澄みを除去した。細胞を、2mg/mlリゾチームを含有する1mlのTSE緩衝液中に再懸濁させ、37で振とうしながら30~60分間インキュベーションした。インキュベーション後、0.5mlの10%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を加え、そして細胞を、溶解が完了するまで37でインキュベーションした。その溶解産物を65で10分間インキュベーションし、室温まで冷却し、2本の1.5ml Eppendorf試験管に分け、0.5mlフェノール/クロロホルム（0.5Mトリス, pH 8.0を用いて予め平衡化された50%フェノール; 50%クロロホルム）を用いて1回抽出した。水相を取り出し、クロロホルム: イソアミルアルコール（24:1）を用いて2~5回抽出した。1/10容の3M酢酸ナトリウム, pH 4.8を加えることによってDNAを沈澱させ、その混合物を氷上で10分間インキュベーションし、その混合物を5において15,000rpmで10分間遠心分離し、そして上澄みを清浄な試験管に取り出し、それに1容のイソプロパノールを加えた。次に、イソプロパノールを加えた上澄み混合物を、氷上で20分間インキュベーションし、5において15,000rpmで20分間遠心分離し、上澄みを除去し、そしてDNAペレットを、70%エタノールを用いて1回洗浄した。ペレットを乾燥させた後、DNAをTE緩衝液（10mMトリス, 1mM EDTA, pH 8.0）中に再懸濁させた。

【0201】

7.1.3. StreptomycesからのプラスミドDNA単離

菌系体のアリコート（1.0ml）を、1.5mlミクロ遠心管に入れ、12,000 x gで60秒間の遠心分離によって細胞を濃縮した。上澄みを捨て、細胞を1.0mlの10.3%スクロース中に再懸濁させ、12,000 x gで60秒間の遠心分離によって濃縮し、上澄みを捨てた。次に、細胞を、2mg/mlリゾチームを含有する0.25

mlのTSE緩衝液中に再懸濁させ、37 で振とうしながら20分間インキュベーションし、AutoGen 540（商標）自動核酸単離装置中に加えた。プラスミドDNAは、Cycle 106（装置ソフトウェア）を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって用いて単離した。

【0202】

別法として、1.5mlの菌系体を1.5mlミクロ遠心管中に入れ、12,000×gで60秒間の遠心分離によって細胞を濃縮した。上澄みを捨て、細胞を1.0mlの10.3%スクロース中に再懸濁させ、12,000×gで60秒間の遠心分離によって濃縮し、上澄みを捨てた。細胞を、2mg/mlリゾチームを含有する0.5mlのTSE緩衝液中に再懸濁させ、37 で15～30分間インキュベーションした。インキュベーション後、0.25mlのアルカリ性SDS（0.3N NaOH, 2% SDS）を加え、そして細胞を55 で15～30分間または溶液が透明になるまでインキュベーションした。酢酸ナトリウム（0.1ml, 3M、pH4.8）をそのDNA溶液に加えた後、これを氷上で10分間インキュベーションした。それらDNA試料を、5 において14,000rpmで10分間遠心分離した。上澄みを清浄な試験管に取り出し、0.2mlフェノール：クロロホルム（50%フェノール：50%クロロホルム）を加え、静かに混合した。そのDNA溶液を、5 において14,000rpmで10分間遠心分離し、上層を清浄な Eppendorf 試験管に取り出した。イソプロパノール（0.75ml）を加え、その溶液を静かに混合後、室温で20分間インキュベーションした。そのDNA溶液を、5 において14,000rpmで15分間遠心分離し、上澄みを除去し、そしてDNAペレットを、70%エタノールを用いて洗浄し、乾燥させ、TE緩衝液中に再懸濁させた。

10

20

【0203】

7.1.4. E. coliからのプラスミドDNA単離

形質転換されたE. coli単コロニーを、5mlのLuria-Bertani（LB）培地（1リットルのdH₂O中に Bacto-Tryptone 10g、Bacto酵母エキス5gおよびNaCl 10g、pH7.0, 121 で25分間オートクレーブ処理され且つ100μg/mlアンピシリンを補充）中に接種した。その培養物を一晩インキュベーションし、1mlアリコートをして1.5mlミクロ遠心管中に入れた。それら培養試料を、AutoGen 540（商標）自動核酸単離装置中に加え、プラスミドDNAを、Cycle 3（装置ソフトウェア）を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって用いて単離した。

30

【0204】

7.1.5. S. avermitilisプロトプラストの調製および形質転換

S. avermitilisの単コロニーを、1/2強度YPD-6上で単離した。その菌系体を用いて、25mm×150mm試験管中の10mlのTSB培地に接種後、これを28 で振とうしながら（300rpm）48時間インキュベーションした。1mlの菌系体を用いて、50mlのYEME培地に接種した。YEME培地は、1リットルにつき、Difco Yeast Extract 3g；Difco Bactoペプトン 5g；Difco Malt Extract 3g；スクロース 300gを含有する。121 で25分間オートクレーブ処理後、次を加えた。2.5M MgCl₂・6H₂O（別個に、121 で25分間オートクレーブ処理される）2ml；およびグリシン（20%）（濾過滅菌される）25ml。

40

【0205】

菌系体を、30 で48～72時間増殖させ、50ml遠心管（Falcon）中において3,000rpmで20分間の遠心分離によって採取した。上澄みを捨て、菌系体をP緩衝液中に再懸濁させた。P緩衝液は、スクロース205g；K₂SO₄ 0.25g；MgCl₂・6H₂O 2.02g；H₂O 600ml；K₂PO₄（0.5%）10ml；微量元素溶液20ml；CaCl₂・2H₂O（3.68%）100ml；およびMES緩衝液（1.0M、pH6.5）10mlを含有する。（微量元素溶液は、1リットルにつ

50

き、 ZnCl_2 40 mg ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg ; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg を含有する)。pH を 6.5 に調整し、最終容積を 1 リットルに調整し、その培地を 0.45 ミクロンフィルターを介して熱濾過した。

【0206】

菌系体を、3,000 rpm で 20 分間ベレット化し、上澄みを捨て、菌系体を、2 mg / ml のリゾチームを含有する 20 ml の P 緩衝液中に再懸濁させた。その菌系体を 35 で振とうしながら 15 分間インキュベーションし、顕微鏡検査して、プロトプラスト形成の程度を確認した。プロトプラスト形成が完了した時点で、プロトプラストを、8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄みを除去し、プロトプラストを 10 ml の P 緩衝液中に再懸濁させた。プロトプラストを、8,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを除去し、プロトプラストを 2 ml の P 緩衝液中に再懸濁させ、約 1×10^9 個のプロトプラストを 2.0 ml 低温バイアル (Nalgene) に分配した。

10

【0207】

1×10^9 個のプロトプラストが入っているバイアルを、8,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを除去し、プロトプラストを 0.1 ml の P 緩衝液中に再懸濁させた。2 ~ 5 μg の形質転換用 DNA をプロトプラストに加えた直後に、0.5 ml 作業用 T 緩衝液を加えた。T 緩衝液基剤は、PEG-1000 (Sigma) 25 g ; スクロース 2.5 g ; H_2O 83 ml を含有する。pH は、1 N NaOH (濾過滅菌される) を用いて 8.8 に調整し、T 緩衝液基剤を濾過滅菌し且つ 4 で貯蔵した。使用の同日に作られる作業用 T 緩衝液は、T 緩衝液基剤 8.3 ml ; K_2PO_4 (4 mM) 1.0 ml ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 M) 0.2 ml ; および TES (1 M、pH 8) 0.5 ml であった。作業用 T 緩衝液の各成分は、個々に濾過滅菌された。

20

【0208】

T 緩衝液を、プロトプラストに加えてから 20 秒以内に、1.0 ml の P 緩衝液をさらに加え、プロトプラストを 8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄みを捨て、プロトプラストを 0.1 ml の P 緩衝液中に再懸濁させた。次に、プロトプラストを、RM 14 培地上にプレーティングした。この培地は、スクロース 205 g ; K_2SO_4 0.25 g ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.12 g ; グルコース 10 g ; Difco Casamino Acids 0.1 g ; Difco Yeast Extract 5 g ; Difco Oatmeal Agar 3 g ; Difco Bacto Agar 22 g ; H_2O 800 ml を含有する。その溶液を、121 で 25 分間オートクレーブ処理した。オートクレーブ処理後、次の滅菌原液を加えた。 K_2PO_4 (0.5%) 10 ml ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 M) 5 ml ; L-プロリン (20%) 15 ml ; MES 緩衝液 (1.0 M、pH 6.5) 10 ml ; 微量元素溶液 (上記と同様) 2 ml ; シクロヘキシミド原液 (25 mg / ml) 40 ml ; および 1 N NaOH 2 ml。2.5 ml の RM 14 培地をプレートに分別し、プレートを使用前に 24 時間乾燥させた。

30

【0209】

プロトプラストを、95% 湿度において 30 で 20 ~ 24 時間インキュベーションした。チオストレプトン耐性形質転換細胞を選択するために、125 μg / ml チオストレプトンを含有する 1 ml の上層用緩衝液を、RM 14 再生プレート上に均一に広げた。上層用緩衝液は、100 ml につき、スクロース 10.3 g ; 微量元素溶液 (上記と同様) 0.2 ml ; および MES (1 M、pH 6.5) 1 ml を含有する。プロトプラストを、95% 湿度において 30 で 7 ~ 14 日間、チオストレプトン耐性 (Thio^r) コロニーが目に見えるまでインキュベーションした。

40

【0210】

7.1.6. Streptomyces lividans プロトプラストの形質転換

S. リビダンス (S. lividans) TK64 (John Innes Institute, Norwich, U.K. によって提供) を、場合によって、形質転換に用い

50

た。*S. lividans*を成長させ、プロトプラスト形成させ、そして形質転換するための方法および組成物は、Hopwood等, 1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual (*Streptomyces*の遺伝子操作、実験マニュアル), John Innes Foundation, Norwich, U.K.に記載され、そこに記載のように実施される。プラスミドDNAは、上記セクション7.1.3に記載のように、*S. lividans*形質転換細胞から単離した。

【0211】

7.1.7. *S. avermitilis* 菌株の発酵分析

1/2強度YPD-6上で4~7日間増殖させた*S. avermitilis*菌系体を、8mlのプレフォーム培地および2個の5mmガラスビーズが入っている1x6インチ試験管中に接種した。プレフォーム培地は、可溶性デンプン(低粘度ノリデンプンか、又はKOSO、日本コーンスターチ社、名古屋)20g/L; Pharmamedia 15g/L; Ardamine pH 5g/L (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO_3 2g/L; 培地中最終濃度50ppmの2-(+/-)-メチル酪酸、60ppmのイソ酪酸および20ppmのイソ吉草酸を含有する2x bcf a (「bcf a」は、分岐状鎖脂肪酸を意味する)を含有する。pHを7.2に調整し、培地を121で25分間オートクレーブ処理した。

【0212】

その試験管を、角度17度で、29において215rpmで3日間振とうした。種培養物の2mlアリコートを用いて、デンプン(低粘度ノリデンプン又はKOSO)160g/L; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) 10g/L; Ardamine pH 10g/L; K_2HPO_4 2g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L; MnCl_2 0.002g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002g/L; CaCO_3 14g/L; 2x bcf a (同上); およびシクロヘキサンカルボン酸(CHC)(pH7.0で20%溶液として調製される)800ppmを含有する産生用培地25mlが入っている300mlエルレンマイヤーフラスコに接種した。pHを6.9に調整し、培地を121で25分間オートクレーブ処理した。(上記したように、CHC以外のスターターユニットを代わりに利用できる(例えば、表1参照))

【0213】

接種後、フラスコを、29において200rpmで振とうしながら12日間インキュベーションした。インキュベーション後、2ml試料をフラスコから取り出し、8mlのメタノールを用いて希釈し、混合し、その混合物を1,250xgで10分間遠心分離してペレット片とした。次に、上澄みを、Beckman UltraspHERE OD Sカラム(25cmx4.6mm内径)を用いたHPLCにより、0.75ml/分の流量および240nmでの吸光度による検出を用いて検定した。移動相は、86/8.9/5.1のメタノール/水/アセトニトリルであった。

【0214】

7.1.8. *S. avermitilis* PKS 遺伝子の単離

S. avermitilis (ATCC 31272, SC-2)染色体DNAのコスミドライブラリーを調製し、*Saccharopolyspora erythraea* ポリケチドシンターゼ(PKS)遺伝子のフラグメントから調製したケトシンターゼ(KS)プローブとハイブリッド形成させた。コスミドライブラリーの調製についての詳細な説明が、上記したSambrook等, 1989になされている。*Streptomyces* 染色体DNAライブラリーの調製についての詳細な説明が、上記したHopwood等, 1985になされている。ケトシンターゼハイブリッド形成領域を含有するコスミドクローンは、pEX26 (Dr. P. Leadlay, Cambridge, UKにより快く提供されたもの)からの2.7Kb Nde I/Eco 47IIIフラグメントへのハイブリダイゼーションによって同定した。約5ngのpEX26を、Nde IおよびEco

10

20

30

40

50

o 47 I I I を用いて消化した。その反応混合物を、0.8% SeaPlaque GTG アガロースゲル (FMC BioProducts, Rockland, ME) 上加えた。2.7 Kb Nde I / Eco 47 I I I フラグメントを、電気泳動後のゲルから切り取り、そのゲルから、Epicentre Technologies 製の GELase (商標) を用い、Fast Protocol を用いて DNA を回収した。2.7 Kb Nde I / Eco 47 I I I フラグメントを、[^{-32}P] dCTP (デオキシシチジン 5' - 三リン酸, テトラ (トリエチルアンモニウム) 塩, [^{-32}P] -) (NEN-Dupont, Boston, MA) を用い、BRL Nick Translation System (BRL Life Technologies 社、GaitHERSBURG, MD) を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって用いて 10
標識した。典型的な反応は、0.05 ml 容積中で行った。5 μ l の停止緩衝液の添加後、標識された DNA を、含まれていないヌクレオチドから、G-25 Sephadex Quick Spin (商標) Column (Boehringer Mannheim) を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって用いて分離した。

【0215】

約 1,800 種のコスミドクローンを、コロニーハイブリッド形成によってスクリーニングした。Sacc. erythraea KS プローブに強くハイブリッド形成した 10 種類のクローンを同定した。コスミド DNA を含有する E. coli コロニーを LB 液体培地中で増殖させ、コスミド DNA を、各培養物から、AutoGen 540 (商標) 自動核酸単離装置中で Cycle 3 (装置ソフトウェア) を製造業者から提供された 20
取り扱い説明書にしたがって用いて単離した。制限エンドヌクレアーゼ地図およびサザンブロットハイブリダイゼーション分析により、それらクローンの内の 5 種類が、重複染色体領域を含有することがわかった。5 種類のコスミド (すなわち、pSE65、pSE66、pSE67、pSE68、pSE69) の S. avermitilis ゲノム BamHI 制限地図を、重複コスミドの分析およびハイブリダイゼーションによって構築した (図 4)。

【0216】

7.1.9. アベルメクチン B2 : B1 比を調節する DNA の同定および aveC ORF の同定

次の方法を用いて、pSE66 コスミドクローンに由来するサブクローン化フラグメントの、AveC 突然変異体におけるアベルメクチン B2 : B1 比の調節能について調べた。pSE66 (5 μ g) を、SacI および BamHI を用いて消化した。その反応混合物を、0.8% SeaPlaque (商標) GTG アガロースゲル (FMC BioProducts) 上加え、2.9 Kb SacI / BamHI フラグメントを、電気泳動後のゲルから切り取り、そのゲルから、GELase (商標) (Epicentre Technologies) を用い、Fast Protocol を用いて DNA を回収した。約 5 μ g のシャトルベクター pWHM3 (Vara 等, 1989, J. Bacteriol. 171: 5872 - 5881) を、SacI および BamHI を用いて消化した。約 0.5 μ g の 2.9 Kb インサートおよび 0.5 μ g の消化した pWHM3 を一緒に混合し、1 単位のリガーゼ (New England Biolabs 社, Beverly, MA) と一緒に 20 μ l の全容積中において、製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって 15 で一晩インキュベーションした。インキュベーション後、5 μ l の連結反応混合物を、70 で 10 分間インキュベーションし、室温まで冷却し、そして用いて、コンピテント E. coli DH5 細胞 (BRL) を製造業者から提供された 40
取り扱い説明書にしたがって形質転換した。プラスミド DNA は、アンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、2.9 Kb SacI / BamHI インサートの存在は、制限分析によって確認した。このプラスミドを pSE119 と命名した。

【0217】

S. avermitilis 菌株 1100-SC38 (Pfizer 内菌株) のプロトプラストを、上記セクション 7.1.5 に記載のように、調製し且つ pSE119 を用い 50

て形質転換した。菌株 1100-SC38 は、シクロヘキサンカルボン酸を補充した場合、アベルメクチンシクロヘキシル B1 型と比較して、有意に多いアベルメクチンシクロヘキシル B2 型を産生する突然変異体である（約 30 : 1 の B2 : B1）。*S. avermitilis* プロトプラストを形質転換するのに用いられる pSE119 は、*E. coli* 菌株 GM2163 (Dr. B. J. Bachmann, Curator, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University から入手される) か、*E. coli* 菌株 DM1 (BRL) か、又は *S. lividans* 菌株 TK64 から単離した。菌株 1100-SC38 のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、発酵生成物の HPLC 分析によって分析した。pSE119 を含有する *S. avermitilis* 菌株 1100-SC38 の形質転換細胞は、約 3.7 : 1 の変更された比率のアベルメクチンシクロヘキシル B2 : シクロヘキシル - B1 を産生した（表 2）。

10

【0218】

pSE119 が、*AveC* 突然変異体におけるアベルメクチン B2 : B1 比を調節するということが確認されたら、インサート DNA を配列決定した。約 10 µg の pSE119 を、プラスミド DNA 単離キット (Qiagen, Valencia, CA) を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって用いて単離し、そして ABI 373A Automated DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いて配列決定した。配列データは、Genetic Computer Group プログラム (GCG, Madison, WI) を用いて集め且つ整理した。DNA 配列および *aveC* ORF を、図 1 (配列番号 (SEQ ID NO) : 1) に示す。

20

【0219】

pSE118 と称される新規のプラスミドを、次のように構築した。約 5 µg の pSE66 を、*SphI* および *BamHI* を用いて消化した。その反応混合物を、0.8 % SeaPlaque GTG アガロースゲル (FMC BioProducts) 上加え、2.8 Kb *SphI* / *BamHI* フラグメントを、電気泳動後のゲルから切り取り、そのゲルから、GELase (商標) (Epicentre Technologies) を用い、Fast Protocol を用いて DNA を回収した。約 5 µg のシャトルベクター pWHM3 を、*SphI* および *BamHI* を用いて消化した。約 0.5 µg の 2.8 Kb インサートおよび 0.5 µg の消化した pWHM3 を一緒に混合し、1 単位のリガーゼ (New England Biolabs) と一緒に 20 µl の全容積中において、製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって 15 で一晩インキュベーションした。インキュベーション後、5 µl の連結反応混合物を、70 で 10 分間インキュベーションし、室温まで冷却し、それを用いて、コンピテント *E. coli* DH5 細胞を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって形質転換した。プラスミド DNA は、アンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、2.8 Kb *SphI* / *BamHI* インサートの存在を、制限分析によって確認した。このプラスミドを、pSE118 と命名した。pSE118 および pSE119 中のインサート DNA は、約 838 のヌクレオチドが重複する（図 4）。

30

40

【0220】

S. avermitilis 菌株 1100-SC38 のプロトプラストを、上記のように pSE118 を用いて形質転換した。菌株 1100-SC38 のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、発酵生成物の HPLC 分析によって分析した。pSE118 を含有する *S. avermitilis* 菌株 1100-SC38 の形質転換細胞は、菌株 1100-SC38 と比較して、アベルメクチンシクロヘキシル B2 : アベルメクチンシクロヘキシル B1 の比を変化させなかった（表 2）。

【0221】

7.1.10. *S. avermitilis* 染色体 DNA からの *aveC* 遺伝子の PCR 増幅

50

a v e C O R Fを含有する約1.2 K bフラグメントを、*S. avermitilis* 染色体DNAから、上記で得られたa v e Cヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマーを用いるPCR増幅によって単離した。それらPCRプライマーは、Genosys Biotechnologies社(テキサス)によって供給された。右方向プライマーは、5' - T C A C G A A A C C G G A C A C A C - 3' (配列番号: 6)であり; 左方向プライマーは、5' - C A T G A T C G C T G A A C C G A G - 3' (配列番号: 7)であった。PCR反応は、Deep Vent (商標)ポリメラーゼ(New England Biolabs)を用いて製造元から供給された緩衝液中で、および100 μ lの最終容積中に300 μ M d N T P、10%グリセロール、各200 p m o l プライマー、0.1 μ g 鋳型および2.5単位の酵素の存在下、Perkin-Elmer Cetus熱サイクラーを用いて行われた。最初のサイクルの熱プロフィールは、95 で5分間(変性工程)、60 で2分間(アニーリング工程)および72 で2分間(伸長工程)であった。引き続きの24サイクルは、変性工程を45秒に短縮し、アニーリング工程を1分に短縮したことを除き、同様の熱プロフィールを有していた。

10

20

30

40

50

【0222】

PCR産物を、1%アガロースゲル中で電気泳動させ、約1.2 K bの単一DNAバンドを検出した。このDNAをゲルから精製し、25 ngの直鎖状プラントpCR-Bluntベクター(Invitrogen)と、1:10モルのベクター対インサート比で、製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって連結した。その連結反応混合物を用いて、One Shot (商標)Competent E. coli細胞(Invitrogen)を、製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって形質転換した。プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、約1.2 K bインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを、pSE179と命名した。

【0223】

pSE179からのインサートDNAを、BamHI/XbaIを用いた消化によって単離し、電気泳動によって分離し、そのゲルから精製し、そしてBamHI/XbaIを用いて消化されているシャトルベクターpWHM3と、1 μ gの全DNA濃度において1:5モルのベクター対インサート比で連結した。その連結反応混合物を用いて、コンピテントE. coli DH5細胞を製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって形質転換した。プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、約1.2 K bインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドをpSE186(図2, ATCC209604)と命名し、これをE. coli DM1中に形質転換し、プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離した。

【0224】

7.2. 結果

pSE119からの2.9 K b SacI/BamHIフラグメントは、*S. avermitilis* 菌株1100-SC38中に形質転換された場合、B2:B1アベルメクチン産生の比率を有意に変化させたということが確認された。*S. avermitilis* 菌株1100-SC38は、通常は、約30:1のB2:B1比を有するが、2.9 K b SacI/BamHIフラグメントを含むベクターを用いて形質転換された場合、B2:B1アベルメクチンの比率は約3.7:1に減少した。形質転換細胞培養物の発酵後分析は、形質転換用DNAの存在を示した。

【0225】

2.9 K b pSE119フラグメントを配列決定し、約0.9 K b O R Fを同定したが(図1)(配列番号(SEQ ID NO):1)、これは、B2生成物だけを産生するように予めどこか他のところで突然変異しているPstI/SphIフラグメントを包含する(Ikeda等, 1995, 上記)。このO R Fまたはその該当する推定ポリペプチドの既知のデータベース(GenEMBL, SWISS-PROT)に対する比較は、既知のDNAまたはタンパク質配列との強い相同性を全く示さなかった。

【0226】

表 2 は、種々のプラスミドを用いて形質転換された *S. avermitilis* 菌株 1100-SC38 の発酵分析を示す。

【0227】

【表 2】

表 2

S. avermitilis 株 (形質転換プラスミド)	試験した形質転換体の数	平均 B2 : B1 比
1100-SC38 (none)	9	30.66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31.3
1100-SC38 (pSE119)	12	3.7
1100-SC38 (pSE118)	12	30.4
1100-SC38 (pSE185)	14	27.9

10

【0228】

8. 実施例 : *S. avermitilis* AveC 突然変異体の構築

この実施例では、上記の組成物および方法を用いて、いくつかの異なる *S. avermitilis* AveC 突然変異体の構築を説明する。Streptomyces の遺伝子中に突然変異を導入する方法についての概要が、Kieser 及び Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204: 430-458 によって記載されている。より詳細な説明が、Anzai 等, 1988, J. Antibiot. XLII (2): 226-233 及び Stutzman - Engwall 等, 1992, J. Bacteriol. 174 (1): 144-154 になされている。これら参考文献は、それらの全体が引用することにより本明細書の内容とされる。

20

【0229】

8.1. *S. avermitilis* aveC 遺伝子の失活

失活した aveC 遺伝子を含む AveC 突然変異体を、以下で詳述されるいくつかの方法を用いて構築した。

30

【0230】

第一の方法では、pSE119 (上記セクション 7.1.9 に記載のプラスミド) 中の aveC 遺伝子に内在する 640 bp SphI / PstI フラグメントを、Saccharothraea からの ermE 遺伝子 (エリスロマイシン耐性に関する) と交換した。この ermE 遺伝子は、pIJ4026 (John Innes Institute, Norwich, U.K. によって提供される; Bibb 等, 1985, Gene 41: 357-368 も参照されたい) から、BglII および EcoRI を用いた制限酵素消化後、電気泳動によって単離され、そのゲルから精製された。この約 1.7 Kb フラグメントを、BamHI および EcoRI を用いて消化されている pGEM7Zf (Promega) 中に連結し、その連結反応混合物を、コンピテント *E. coli* DH5 細胞中に、製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって形質転換した。プラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、約 1.7 Kb インサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを pSE27 と命名した。

40

【0231】

pSE118 (上記セクション 7.1.9 に記載される) を、SphI および BamHI を用いて消化し、その消化物を電気泳動し、そして約 2.8 Kb SphI / BamHI インサートをゲルから精製した。pSE119 を、PstI および EcoRI を用いて消化し、その消化物を電気泳動し、そして約 1.5 Kb PstI / EcoRI インサートをゲルから精製した。シャトルベクター pWHM3 を、BamHI および EcoRI を用いて消化した。pSE27 を、PstI および SphI を用いて消化し、その消化物を

50

電気泳動し、そして約 1.7 Kb Pst I / Sph I インサートをゲルから精製した。4 種全部のフラグメント（すなわち、約 2.8 Kb、約 1.5 Kb、約 7.2 Kb、約 1.7 Kb）を、4 方連結で互いに連結した。連結反応混合物を、コンピテント E. coli DH5 細胞中に、製造業者から提供された取り扱い説明書にしたがって形質転換した。プラスミド DNA は、アンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を、制限分析によって確認した。このプラスミドを pSE180（図 3；ATCC 209605）と命名した。

【0232】

pSE180 を、S. lividans TK64 中に形質転換し、形質転換されたコロニーを、チオストレプトンおよびエリスロマイシンへの耐性によって同定した。pSE180 は、S. lividans から単離され、S. avermitilis プロトプラストを形質転換するのに用いられた。4 種類のチオストレプトン耐性 S. avermitilis 形質転換細胞を同定し、そしてプロトプラストを製造し、RM14 培地上の非選択的条件下でプレーティングした。プロトプラストを再生した後、単コロニーを、エリスロマイシン耐性の存在およびチオストレプトン耐性の不存在についてスクリーニングして、失活した aveC 遺伝子の染色体組込みおよび遊離レプリコンの損失が示された。一つの Erm^rThio^s 形質転換細胞を同定し、菌株 SE180-11 と命名した。全染色体 DNA を、菌株 SE180-11 から単離し、制限酵素 BamHI、HindIII、PstI または SphI を用いて消化し、0.8% アガロースゲル上の電気泳動によって分割し、ナイロン膜に移し、ermE プロブにハイブリッド形成させた。これら分析により、ermE 耐性遺伝子の染色体組込み、及び付随する 640 bp Pst I / Sph I フラグメントの欠失が、二重交差変化によって起こっていることがわかった。菌株 SE180-11 の発酵生成物の HPLC 分析により、通常のアベルメクチンがもはや産生されないことがわかった（図 5A）。

【0233】

aveC 遺伝子を失活させる第二の方法では、1.7 Kb ermE 遺伝子を、S. avermitilis 菌株 SE180-11 の染色体から除去し、aveC 遺伝子における 640 bp Pst I / Sph I 欠失をそのままにした。遺伝子置換プラスミドを、次のように構築した。pSE180 を、XbaI を用いて部分消化し、約 11.4 Kb フラグメントをゲルから精製した。その約 11.4 Kb バンドは、1.7 Kb ermE 耐性遺伝子を欠いている。次に、その DNA を連結し且つ E. coli DH5 細胞中に形質転換した。プラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを、pSE184 と命名し、これを E. coli DM1 中に形質転換し、そしてプラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離した。このプラスミドを用いて、S. avermitilis 菌株 SE180-11 のプロトプラストを形質転換した。プロトプラストは、菌株 SE180-11 のチオストレプトン耐性形質転換細胞から製造し、RM14 上の単コロニーとしてプレーティングした。プロトプラストが再生した後、単コロニーを、エリスロマイシン耐性およびチオストレプトン耐性両方の不存在についてスクリーニングして、失活した aveC 遺伝子の染色体組込みおよび ermE 遺伝子を含む遊離レプリコンの損失が示された。一つの Erm^sThio^s 形質転換細胞を同定し、SE184-1-13 と命名した。SE184-1-13 の発酵分析により、通常のアベルメクチンが産生されなかったことおよび SE184-1-13 が SE180-11 と同様の発酵プロフィールを有することがわかった。

【0234】

aveC 遺伝子を失活させる第三の方法では、PCR を用いて nt 471 位の C の後に 2 個の G を加えることによって BspE1 部位を生じることにより、染色体 aveC 遺伝子中にフレームシフトを導入した。遺伝子操作される BspE1 部位の存在は、遺伝子置換を検出する場合に有用であった。PCR プライマーは、aveC 遺伝子中にフレームシフト突然変異を導入するように設計され、Genosys Biotechnology

10

20

30

40

50

e s 社によって供給されたものである。右方向プライマーは、5' - G G T T C C G G A T G C C G T T C T C G - 3' (配列番号: 8) であり、左方向プライマーは、5' - A A C T C C G G T C G A C T C C C C T T C - 3' (配列番号: 9) であった。P C R 条件は、上記セクション 7. 1. 10 に記載されたのと同様であった。6 6 6 b p P C R 産物を、S p h I を用いて消化して、それぞれ 2 7 8 b p および 3 8 8 b p の二つのフラグメントを生じた。3 8 8 b p フラグメントをゲルから精製した。

【0235】

遺伝子置換プラスミドを、次のように構築した。シャトルベクター p W H M 3 を、E c o R I および B a m H I を用いて消化した。p S E 1 1 9 を、B a m H I および S p h I を用いて消化し、その消化物を電気泳動し、そして約 8 4 0 b p フラグメントをゲルから精製した。p S E 1 1 9 を、E c o R I および X m n I を用いて消化し、その消化物を電気泳動によって分割し、そして約 1. 7 K b フラグメントをゲルから精製した。4 種類全部のフラグメント (すなわち、約 7. 2 K b、約 8 4 0 b p、約 1. 7 K b および 3 8 8 b p) を、4 方連結で互いに連結した。連結反応混合物を、コンピテント E. c o l i D H 5 細胞中に形質転換した。プラスミド DNA を、アンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を、制限分析および DNA 配列分析によって確認した。このプラスミドを p S E 1 8 5 と命名し、これを E. c o l i D M 1 中に形質転換し、そしてプラスミド DNA を、アンピシリン耐性形質転換細胞から単離した。このプラスミドを用いて、S. a v e r m i t i l i s 菌株 1 1 0 0 - S C 3 8 のプロトプラストを形質転換した。菌株 1 1 0 0 - S C 3 8 のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、発酵生成物の H P L C 分析によって分析した。p S E 1 8 5 は、S. a v e r m i t i l i s 菌株 1 1 0 0 - S C 3 8 中に形質転換された場合、B 2 : B 1 アベルメクチン比をほとんど変化させなかった (表 2)。

【0236】

p S E 1 8 5 を用いて S. a v e r m i t i l i s のプロトプラストを形質転換して、染色体 a v e C 遺伝子中でフレームシフト突然変異を生じさせた。プロトプラストを、チオストレプトン耐性形質転換細胞から製造し、R M 1 4 上で単コロニーとしてプレーティングした。プロトプラストが再生した後、単コロニーを、チオストレプトン耐性の不存在についてスクリーニングした。チオストレプトン感受性コロニーからの染色体 DNA を単離し、染色体中に組み込まれたフレームシフト突然変異の存在について P C R によってスクリーニングした。それら P C R プライマーは、a v e C ヌクレオチド配列に基づいて設計され、G e n o s y s B i o t e c h n o l o g i e s 社 (テキサス) によって供給されたものである。右方向 P C R プライマーは、5' - G C A A G G A T A C G G G G A C T A C - 3' (配列番号: 10) であり、左方向 P C R プライマーは、5' - G A A C C G A C C G C C T G A T A C - 3' (配列番号: 11) であり、P C R 条件は、上記セクション 7. 1. 10 に記載されたのと同様であった。得られた P C R 産物は 5 4 3 b p であったが、B s p E 1 を用いて消化された場合、3 6 8 b p、9 6 b p および 7 9 b p の三つのフラグメントが認められ、失活した a v e C 遺伝子の染色体組込みおよび遊離レプリコンの損失が明らかとなった。

【0237】

a v e C 遺伝子中にフレームシフト突然変異を含有する S. a v e r m i t i l i s 突然変異体の発酵分析により、通常のアベルメクチンがもはや産生されないこと、及びこれら突然変異体が、菌株 S E 1 8 0 - 1 1 および S E 1 8 4 - 1 - 1 3 と同様の発酵 H P L C プロフィールを有することがわかった。一つの T h i o^s 形質転換細胞を同定し、菌株 S E 1 8 5 - 5 a と命名した。

【0238】

さらに、1 1 6 位のトリプトファン (W) をコードしているコドンの終止コドンへの変化を引き起こす、n t 5 2 0 位を G から A に変化させる a v e C 遺伝子中の突然変異を生じさせた。この突然変異を含む S. a v e r m i t i l i s 菌株は、通常のアベルメクチンを産生せず、且つ菌株 S E 1 8 0 - 1 1、S E 1 8 4 - 1 - 1 3 及び S E 1 8 5 - 5 a

10

20

30

40

50

と同様の発酵プロフィールを有していた。

【0239】

さらに、(i) 266位のアミノ酸をグリシン(G)からアスパラギン酸(D)に変化させる、nt 970位をGからAへ、および(ii) 275位のアミノ酸をチロシン(Y)からヒスチジン(H)に変化させる、nt 996位をTからCへと両方とも変化させるaveC遺伝子中の突然変異を生じさせた。これら突然変異を含むS. avermitilis菌株(G266D/Y275H)は、通常のアベルメクチンを産生せず、且つ菌株SE180-11、SE184-1-13及びSE185-5aと同様の発酵プロフィールを有していた。

【0240】

このようにして提供されたS. avermitilis aveC失活突然変異菌株SE180-11、SE184-1-13、SE185-5a等により、aveC遺伝子中の他の突然変異の影響を評価するスクリーニング手段が提供される。pSE186は、aveC遺伝子の野生型コピーを含有するが、これをE. coli DM1中に形質転換し、プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離した。このpSE186 DNAを用いて、S. avermitilis菌株SE180-11のプロトプラストを形質転換した。菌株SE180-11のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、エリスロマイシン耐性の存在を確認し、そしてThio^rErm^r形質転換細胞を、発酵生成物のHPLC分析によって分析した。機能性aveC遺伝子のin trans存在により、菌株SE180-11に通常のアベルメクチン産生を回復させることができた(図5B)。

【0241】

8.2. クラスB2:B1比を変更するaveC遺伝子中の突然変異の分析

上記のように、不活性aveC遺伝子を含有するS. avermitilis菌株SE180-11を、機能性aveC遺伝子を含有するプラスミド(pSE186)を用いた形質転換によって相補した。菌株SE180-11は、下記のようにaveC遺伝子中の他の突然変異を特性決定するための宿主菌株としても利用された。

【0242】

染色体DNAを、菌株1100-SC38から単離し、aveC遺伝子のPCR増幅の鋳型として用いた。1.2Kb ORFを、aveCヌクレオチド配列に基づいて設計されたプライマーを用いたPCR増幅によって単離した。右方向プライマーは配列番号:6であり、左方向プライマーは配列番号:7であった(上記セクション7.1.10参照)。PCRおよびサブクローニングの条件は、セクション7.1.10に記載されたのと同様であった。1.2Kb ORFのDNA配列分析は、55位のアミノ酸をセリン(S)からフェニルアラニン(F)に変化させる、nt 337位をCからTに変化させるaveC遺伝子の突然変異を示す。S55F突然変異を含有するaveC遺伝子を、pWHM3中にサブクローニングして、pSE187と称されるプラスミドを生じ、これを用いて、S. avermitilis菌株SE180-11のプロトプラストを形質転換した。菌株SE180-11のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、エリスロマイシン耐性の存在を確認し、そしてThio^rErm^r形質転換細胞を、発酵生成物のHPLC分析によって分析した。アミノ酸残基55の変化(S55F)をコードしているaveC遺伝子の存在は、菌株SE180-11に通常のアベルメクチン産生を回復させることができたが(図5C)、しかしながら、シクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1比は、pSE186を用いて形質転換された、約1.6:1のB2:B1比を有した菌株SE180-11と比較したところ、約26:1であり(表3)、単一の突然変異(S55F)により、シクロヘキシル-B1に対するシクロヘキシル-B2の産生量が調節されることがわかった。

【0243】

230位のアミノ酸をグリシン(G)からアスパラギン酸(D)に変化させる、nt 862位をGからAに変化させるaveC遺伝子中のもう一つの突然変異を同定した。この

10

20

30

40

50

突然変異 (G 2 3 0 D) を有する *S . a v e r m i t i l i s* 菌株は、約 3 0 : 1 の B 2 : B 1 比でアベルメクチンを産生する。

【 0 2 4 4 】

8 . 3 . B 2 : B 1 比を減少させる突然変異

シクロヘキシル - B 1 に対するシクロヘキシル - B 2 の産生量を減少させるいくつかの突然変異を、次のように構築した。

【 0 2 4 5 】

1 3 9 位のアミノ酸をアラニン (A) からトレオニン (T) に変化させる、 n t 5 8 8 位を G から A に変化させる a v e C 遺伝子中の突然変異を同定した。A 1 3 9 T 突然変異を含有する a v e C 遺伝子を、p W H M 3 中にサブクローニングして、p S E 1 8 8 と称されるプラスミドを生じ、これを用いて、*S . a v e r m i t i l i s* 菌株 S E 1 8 0 - 1 1 のプロトプラストを形質転換した。菌株 S E 1 8 0 - 1 1 のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、エリスロマイシン耐性の存在を確認し、T h i o^r E r m^r 形質転換細胞を、発酵生成物の H P L C 分析によって分析した。アミノ酸残基 1 3 9 の変化 (A 1 3 9 T) をコードしている突然変異した a v e C 遺伝子の存在により、菌株 S E 1 8 0 - 1 1 にアベルメクチン産生を回復させることができたが (図 5 D)、B 2 : B 1 比は約 0 . 9 4 : 1 であり、この突然変異は、シクロヘキシル - B 1 に対するシクロヘキシル - B 2 の産生量を減少させることがわかった。公表されている結果だけでなく、上記の突然変異の結果も、a v e C 遺伝子の失活又は B 1 型に対する B 2 型アベルメクチンの産生の増加を示しているだけであったので、この結果は、予想外のものであった (表 3)。

【 0 2 4 6 】

A 1 3 9 T 突然変異は、B 2 : B 1 比をより好ましい B 1 方向に変更したので、アミノ酸 1 3 8 位のセリンの代わりにトレオニンをコードした突然変異を構築した。したがって、p S E 1 8 6 を、E c o R I を用いて消化し、E c o R I を用いて消化されている p G E M 3 Z f (P r o m e g a) 中にクローン化した。このプラスミドを、p S E 1 8 6 a と命名し、これを、A p a I および K p n I を用いて消化し、それら DNA フラグメントをアガロースゲル上で分離し、そして約 3 . 8 K b および約 0 . 4 K b の二つのフラグメントをゲルから精製した。p S E 1 8 6 からの約 1 . 2 K b インサート DNA を P C R 鋳型として用いて、n t 5 8 5 位に単一塩基変化を導入した。P C R プライマーは、n t 5 8 5 位に突然変異を導入するように設計され、G e n o s y s B i o t e c h n o l o g i e s 社 (テキサス) によって供給された。右方向 P C R プライマーは、5 ' - G G G G G C G G G C C C G G G T G C G G A G G C G G A A A T G C C C C T G G C G A C G - 3 ' (配列番号 : 1 2) であり、左方向 P C R プライマーは、5 ' - G G A A C C G A C C G C C T G A T A C A - 3 ' (配列番号 : 1 3) であった。P C R 反応は、A d v a n t a g e G C ゲノム P C R キット (C l o n e t e c h L a b o r a t o r i e s , P a l o A l t o , C A) を用いて製造元から提供された緩衝液中において、5 0 μ l の最終容積中に 2 0 0 μ M d N T P、各 2 0 0 p m o l プライマー、5 0 n g 鋳型 DNA、1 . 0 M G C - M e l t および 1 単位の K l e n T a q P o l y m e r a s e M i x の存在下で行われた。最初のサイクルの熱プロフィールは、9 4 で 1 分間 ; 次に、9 4 で 3 0 秒間および 6 8 で 2 分間を 2 5 サイクル ; および 6 8 で 3 分間を 1 サイクルであった。2 9 5 b p の P C R 産物を、A p a I および K p n I を用いて消化して、2 5 4 b p フラグメントを放出したが、これを、電気泳動によって分割し、ゲルから精製した。3 種類全部のフラグメント (約 3 . 8 K b、約 0 . 4 K b および 2 5 4 b p) を、3 方連結で互いに連結させた。その連結反応混合物を、コンピテント E . c o l i D H 5 細胞中に形質転換した。プラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを p S E 1 9 8 と命名した。

【 0 2 4 7 】

p S E 1 9 8 を、E c o R I を用いて消化し、E c o R I を用いて消化されている p W H M 3 中にクローン化し、そして E . c o l i D H 5 細胞中に形質転換した。プラス

ミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を、制限分析およびDNA配列分析によって確認した。このプラスミドDNAを、*E. coli* DM1中に形質転換し、プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、そして正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドをpSE199と命名し、これを用いて、*S. avermitilis* 菌株SE180-11のプロトプラストを形質転換した。菌株SE180-11のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、エリスロマイシン耐性の存在を確認し、そしてThio⁺Erm^r形質転換細胞を、発酵生成物のHPLC分析によって分析した。アミノ酸残基138の変化(S138T)をコードしている突然変異したaveC遺伝子の存在は、菌株SE180-11に通常のアベルメクチン産生を回復させることができたが、しかしながら、B2:B1比は0.88:1であり、この突然変異は、シクロヘキシル-B1に対するシクロヘキシル-B2の産生量を減少させることがわかった(表3)。このB2:B1比は、上記のようにpSE188を用いた菌株SE180-11の形質転換によって生じたA139T突然変異について認められる比0.94:1よりも低い。

10

20

30

40

50

【0248】

もう一つの突然変異を、アミノ酸138位および139位両方にトレオニンを導入するように構築した。pSE186からの約1.2KbインサートDNAをPCR鋳型として用いた。PCRプライマーは、nt585位および588位に突然変異を導入するように設計され、Genosys Biotechnologies社(テキサス)によって供給された。右方向PCRプライマーは、5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAATAATGCCGCTGGCGACGACCC-3'(配列番号:14)であり、左方向PCRプライマーは、5'-GGAAACATCACGGGCATTTCACCC-3'(配列番号:15)であった。PCR反応は、この項目の直ぐ上に記載された条件を用いておこなった。449bpのPCR産物を、ApaIおよびKpnIを用いて消化して、254bpフラグメントを放出したが、これを、電気泳動によって分割し、ゲルから精製した。pSE186aを、ApaIおよびKpnIを用いて消化し、それらDNAフラグメントをアガロースゲル上で分離し、そして約3.8Kbおよび約0.4Kbの二つのフラグメントをゲルから精製した。3種類全部のフラグメント(約3.8Kb、約0.4Kbおよび254bp)を、3方連結で互いに連結させ、その連結反応混合物を、コンピテント*E. coli* DH5細胞中に形質転換した。プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドをpSE230と命名した。

【0249】

pSE230を、EcoRIを用いて消化し、EcoRIを用いて消化されているpWHM3中にクローン化し、そして*E. coli* DH5細胞中に形質転換した。プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を、制限分析およびDNA配列分析によって確認した。このプラスミドDNAを、*E. coli* DM1中に形質転換し、プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、そして正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを、pSE231と命名し、これを用いて、*S. avermitilis* 菌株SE180-11のプロトプラストを形質転換した。SE180-11のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、エリスロマイシン耐性の存在を確認し、そしてThio⁺Erm^r形質転換細胞を発酵によって分析した。S138T/A139Tをコードしている二重突然変異したaveC遺伝子の存在は、菌株SE180-11に通常のアベルメクチン産生を回復させることができたが、しかしながら、B2:B1比は0.84:1であり、この突然変異により、上記のようなpSE188またはpSE199を用いた菌株SE180-11の形質転換による減少よりもさらに、シクロヘキシル-B1に対してのシクロヘキシル-B2の産生量を減少させることがわかった(表3)。

【0250】

もう一つの突然変異を、シクロヘキシル-B1に対するシクロヘキシル-B2の産生量

をさらに減少するように構築した。S 1 3 8 T / A 1 3 9 T 突然変異は、B 2 : B 1 比をより好ましい B 1 方向に変更したので、アミノ酸 1 3 8 位にトレオニンおよびアミノ酸 1 3 9 位にフェニルアラニンを導入するように突然変異を構築した。p S E 1 8 6 からの約 1 . 2 K b インサート DNA を P C R 鋳型として用いた。P C R プライマーは、n t 5 8 5 位 (T を A に変化させる)、5 8 8 位 (G を T に変化させる) および 5 8 9 位 (C を T に変化させる) に突然変異を導入するように設計され、Genosys Biotechnologies 社 (テキサス) によって供給された。右方向 P C R プライマーは、5 ' - G G G G G C G G G C C C G G G T G C G G A G G C G G A A A T G C C G C T G G C G A C G T T C - 3 ' (配列番号 : 1 6) であり、左方向 P C R プライマーは、5 ' - G G A A C A T C A C G G C A T T C A C C - 3 ' (配列番号 : 1 5) であった。P C R 反応は、Advantage GC ゲノム P C R キット (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) を用いて、製造元から提供された緩衝液中において、5 0 μ l の最終容積中に 2 0 0 μ M d N T P、各 2 0 0 p m o l のプライマー、5 0 n g 鋳型 DNA、1 . 1 m M 酢酸 Mg、1 . 0 M G C - M e l t および 1 単位の T t h DNA Polymerase の存在下おこなった。最初のサイクルの熱プロフィールは、9 4 で 1 分間 ; 次に、9 4 で 3 0 秒間および 6 8 で 2 分間を 2 5 サイクル ; および 6 8 で 3 分間を 1 サイクルであった。4 4 9 b p の P C R 産物を、A p a I および K p n I を用いて消化して、2 5 4 b p フラグメントを放出したが、これを、電気泳動によって分割し、ゲルから精製した。3 種類全部のフラグメント (約 3 . 8 K b、約 0 . 4 K b および 2 5 4 b p) を、3 方連結で互いに連結させた。その連結反応混合物を、コンピテント E . c o l i D H 5 細胞中に形質転換した。プラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを、p S E 2 3 8 と命名した。

【 0 2 5 1 】

p S E 2 3 8 を、E c o R I を用いて消化し、E c o R I を用いて消化されている p W H M 3 中にクローニングし、そして E . c o l i D H 5 細胞中に形質転換した。プラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、正しいインサートの存在を、制限分析および DNA 配列分析によって確認した。このプラスミド DNA を、E . c o l i D M 1 中に形質転換し、プラスミド DNA をアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し、そして正しいインサートの存在を制限分析によって確認した。このプラスミドを p S E 2 3 9 と命名し、これを用いて、S . a v e r m i t i l i s 菌株 S E 1 8 0 - 1 1 のプロトプラストを形質転換した。S E 1 8 0 - 1 1 のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、エリスロマイシン耐性の存在を確認し、そして T h i o ' E r m ' 形質転換細胞を、発酵生成物の H P L C 分析によって分析した。S 1 3 8 T / A 1 3 9 F をコードしている二重突然変異した a v e C 遺伝子の存在は、菌株 S E 1 8 0 - 1 1 に通常のアベルメクチン産生を回復させることができたが、しかしながら、B 2 : B 1 比は 0 . 7 5 : 1 であり、この突然変異により、上記のような p S E 1 8 8、p S E 1 9 9 または p S E 2 3 1 を用いた菌株 S E 1 8 0 - 1 1 の形質転換による減少よりもさらに、シクロヘキシル - B 1 に対するシクロヘキシル - B 2 の産生量を減少させることがわかった (表 3) 。

【 0 2 5 2 】

【表 3】

表 3

S. avermitilis株 (形質転換プラスミド)	試験した形質 転換体の数	相対 B2濃度	相対 B1濃度	平均 B2 : B1比
SE180-11 (none)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1.59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26.3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0.94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0.88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0.84
SE180-11 (pSE239)	20	184	242	0.75

10

【0253】

さらに別の突然変異を、Stemmer, 1994, Nature 370:389-391; 及びStemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751に記載の; および米国特許第5605793号、第5811238号、第5830721号及び第5837458号にも記載のDNAシャッフリング法を用いて、シクロヘキシル-B1に対するシクロヘキシル-B2の産生量を相さらに減少するように構築した。

20

【0254】

突然変異したaveC遺伝子を含むDNAシャッフリングされたプラスミドを、コンピテントdam dcm E. coli細胞中に形質転換した。プラスミドDNAをアンピシリン耐性形質転換細胞から単離し且つ用いて、S. avermitilis菌株SE180-11のプロトプラストを形質転換した。菌株SE180-11のチオストレプトン耐性形質転換細胞を単離し、そして1:1またはそれより小さいシクロヘキシル-B2:シクロヘキシル-B1比を有するアベルメクチン産生についてスクリーニングした。1:1またはそれより小さいB2:B1比でアベルメクチンを産生するSE180-11形質転換細胞からのプラスミドDNAのDNA配列を決定した。

30

【0255】

シクロヘキシル-B1に対するシクロヘキシル-B2の生産量が減少した8種の形質転換細胞を同定した。これら形質転換細胞の中で得られる最低のB2:B1比は、0.40:1であった(表4)。プラスミドDNAを、8種の形質転換細胞それぞれから単離し、DNA配列を決定して、aveC遺伝子中の突然変異を決定した。突然変異は、次の通りである。

【0256】

pSE290は、nt317位でTからAへ、nt353位でCからAへ、nt438位でGからAへ、そしてnt1155位でTからAへの4種類のヌクレオチド突然変異を含む。nt317位でのヌクレオチド変化は、AA48位のアミノ酸をDからEへ変化させ、nt438位でのヌクレオチド変化は、AA89位のアミノ酸をAからTへ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じるB2:B1比は、0.42:1であった(表4)。

40

【0257】

pSE291は、nt272位でGからAへ、nt585位でTからAへ、nt588位でGからAへ、そしてnt708位でGからAへの4種類のヌクレオチド突然変異を含む。nt585位でのヌクレオチド変化は、AA138位のアミノ酸をSからTへ変化させ、nt588位でのヌクレオチド変化は、AA139位のアミノ酸をAからTへ変

50

化させ、そして n t 7 0 8 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 7 9 位のアミノ酸を G から S へ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 5 7 : 1 であった (表 4)。

【 0 2 5 8 】

p S E 2 9 2 は、p S E 2 9 0 と同様の 4 種類のヌクレオチド突然変異を含有する。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 4 0 : 1 であった (表 4)。

【 0 2 5 9 】

p S E 2 9 3 は、n t 2 4 位で A から G へ、n t 2 8 6 位で A から C へ、n t 4 9 7 位で T から C へ、n t 5 5 4 位で C から T へ、n t 5 8 0 位で T から C へ、そして n t 8 8 6 位で A から T への 6 種類のヌクレオチド突然変異を含有する。n t 2 8 6 位でのヌクレオチド変化は、A A 3 8 位のアミノ酸を Q から P へ変化させ、n t 5 8 0 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 3 6 位のアミノ酸を L から P へ変化させ、そして n t 8 8 6 位でのヌクレオチド変化は、A A 2 3 8 位のアミノ酸を E から D へ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 6 8 : 1 であった (表 4)。

10

【 0 2 6 0 】

p S E 2 9 4 は、n t 4 6 9 位で T から C へ、n t 5 8 5 位で T から A へ、n t 5 8 8 位で G から A へ、n t 7 0 8 位で G から A へ、n t 8 3 3 位で C から T へ、そして n t 1 1 8 4 位で G から A への 6 種類のヌクレオチド突然変異を含有する。さらに、1 7 3 位、1 7 4 位および 1 7 5 位で n t を欠失している。n t 4 6 9 位でのヌクレオチド変化は、A A 9 9 位のアミノ酸を F から S へ変化させ、n t 5 8 5 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 3 8 位のアミノ酸を S から T へ変化させ、n t 5 8 8 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 3 9 位のアミノ酸を A から T へ変化させ、そして n t 7 0 8 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 7 9 位のアミノ酸を G から S へ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 5 3 : 1 であった (表 4)。

20

【 0 2 6 1 】

p S E 2 9 5 は、n t 5 8 8 位で G から A へ、そして n t 8 5 6 位で T から C への 2 種類のヌクレオチド突然変異を含有する。n t 5 8 8 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 3 9 位のアミノ酸を A から T へ変化させ、そして n t 8 5 6 位でのヌクレオチド変化は、A A 2 2 8 位のアミノ酸を M から T へ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 8 0 : 1 であった (表 4)。

30

【 0 2 6 2 】

p S E 2 9 6 は、n t 1 5 5 位で T から C へ、n t 5 0 5 位で G から T へ、n t 1 0 3 9 位で C から T へ、n t 1 2 0 2 位で C から T へ、そして n t 1 2 1 0 位で T から C への 5 種類のヌクレオチド突然変異を含有する。n t 5 0 5 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 1 1 位のアミノ酸を G から V へ変化させ、そして n t 1 0 3 9 位でのヌクレオチド変化は、A A 2 8 9 位のアミノ酸を P から L へ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 7 3 : 1 であった (表 4)。

【 0 2 6 3 】

p S E 2 9 7 は、n t 3 7 7 位で G から T へ、n t 5 8 8 位で G から A へ、n t 6 3 3 位で A から G へ、そして n t 1 0 6 7 位で A から T への 4 種類のヌクレオチド突然変異を含有する。n t 5 8 8 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 3 9 位のアミノ酸を A から T へ変化させ、n t 6 3 3 位でのヌクレオチド変化は、A A 1 5 4 位のアミノ酸を K から E へ変化させ、そして n t 1 0 6 7 位でのヌクレオチド変化は、A A 2 9 8 位のアミノ酸を Q から H へ変化させる。このプラスミドを有する細胞によって生じる B 2 : B 1 比は、0 . 6 7 : 1 であった (表 4)。

40

【 0 2 6 4 】

【表 4】

表 4

S. avermitilis株 (形質転換プラスミド)	試験した形質 転換体の数	相対 B2濃度	相対 B1濃度	平均 B2 : B1比
SE180-11 (none)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0.42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0.57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0.40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0.68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0.53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0.80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0.73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0.67

10

【0265】

20

追加のラウンドのDNAシャフリングを実施して、以下のようにシクロヘキシル - B 1 アベルメクチンに対するシクロヘキシル - B 2 アベルメクチンの産生量をさらに減少させた。

【0266】

半合成シャフリング

最良のクローンを、PCT国際公開WO97/20078 (Maxygen社)に記載の方法を用いてシャフリングした。減少したB2 : B1比に最もよく対応する有益な置換をコードする個々のオリゴヌクレオチドを、aveC鋳型ストランドに対して5モル過剰となるようにシャフリング反応に添加した。オリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドの不一致を、完全同一の20のヌクレオチドによりランキングしてシャフリング反応中に確実に適切に組み込まれるようにした。オリゴヌクレオチドは、Operon Technologies社 (Alameda, CA) から購入したものである。

30

【0267】

S. avermitilisのHTP増殖

独立したクローンを、形質転換プレートから選び、深い96ウエルシードプレートにおける200μl R5培地 (Kieser, T等「Practical Streptomyces Genetics (実用Streptomyces遺伝学)」, 2000, Norwich, 英国, John Innes Foundation) に接種し、震盪しながら30で増殖させた。各ウエルに、ガラスビーズを分注し、菌糸体を分散するとともに、培養液を攪拌した。この間に、培養液が均一となり、且つ高密度に増殖した。4~5日後、シード培地培養液20μlを、産生プレートに分注し、残りの量は、グリセロールを最終濃度20%まで添加した後、マスタープレートとして-80で凍結させた。産生プレートを、加湿下、12~14日間30度でインキュベーションした。インキュベーションの5~8日後に、菌株の孢子形成が生じた。産生プレートを、固体面を確保するためにアガロース1%を添加することを除いて、PCT国際公開WO99/41389 (Pfizer社) に記載されているのと実質的に同様に操作した。

40

【0268】

抽出及びESI-MS/MSスクリーニング

合計1mlの酢酸エチルを各ウエルに添加し、室温で20分間震盪しながらインキュベーションした。約750μlの酢酸エチル相を回収し、96ウエルプレートに移し、一晚

50

蒸発させた。得られた沈殿を、100 μ l メタノール 1 mM NaCl に再懸濁し、そのうちの5 μ l 溶液を、96 ウエルフォーマットにおいてオートサンプラーにより質量分析計に注入し、液体クロマトグラフィーや他の分離をおこなうことなくフローインジェクション相で直接分析した。化合物を、電気スプレーイオン化によりイオン化し、2つの別個のチャンネルを、2つのMS/MS遷移についてモニターした。B1ナトリウム化イオンについてのMS/MS遷移は、m/z 921 ~ m/z 777であり、B2ナトリウム化イオンについては、m/z 939 ~ m/z 795である（正モード）。Finnigan TSQ-7000, Micromass Quattro-LC質量分析計及びLeap Technology Twin-Palオートサンプラーを、この高スループットスクリーニングに使用した。各ウエル位置についての別個のB1クロマトグラム及びB2クロマトグラムを積分して、対象物を同定した。

10

【0269】

シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比が0.35：1以下であるアミノ酸置換の57の新しい組み合わせを、同定した（図6）。これらの新しい突然変異のいくつかでは、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比が約0.30：1以下で発生することができ、いくつかは、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比が約0.25：1以下で発生することができ、いくつかは、シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチン比が約0.20：1以下で発生することができる。シクロヘキシルB2：シクロヘキシルB1アベルメクチンを0.37又は0.38の比で発生できる2つの新しい突然変異が同定された。

20

【0270】

生物材料の寄託

次のプラスミドを、1998年1月29日に、12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USAのAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託し、次の受託番号が付与された。

プラスミド	受託番号
プラスミド pSE180	209605
プラスミド pSE186	209604

【0271】

American Type Culture Collectionの現在の住所は、10801 University Blvd, Manassas, VA, 20110, USAである。

30

【0272】

上記でとりあげた全ての特許、特許出願及び刊行物は、それらの全体が引用することにより本明細書の内容とされる。

【0273】

本発明は、本明細書中に記載の、本発明の個々の態様の単一説明としての具体的実施態様により範囲が限定されるものではなく、機能的に均等な方法および成分は、本発明の範囲内である。実際に、本明細書中に示され且つ記載されるものに加えて、本発明の種々の変更は、上記の説明及び添付図面から当業者に明らかになるであろう。このような変更は、請求の範囲の範囲内である。

40

【図面の簡単な説明】

【0274】

【図1】S. avermitilis aveC ORFを含むDNA配列（配列番号（SEQ ID NO）：1）および推定のアミノ酸配列（配列番号（SEQ ID NO）：2）である。

【図2】S. avermitilisのaveC遺伝子のORF全体を含むプラスミドベクターpSE186（ATCC 209604）である。

【図3】S. avermitilisのaveC ORF中に挿入されたSacc. er

50

y t h r a e a の e r m E 遺伝子を含む遺伝子置換ベクター p S E 1 8 0 (A T C C 2 0 9 6 0 5) である。

【図 4】同定された 5 種類の重複コスミドクローン (すなわち、p S E 6 5 , p S E 6 6 , p S E 6 7 , p S E 6 8 , p S E 6 9) を含む S . a v e r m i t t i l i s 由来のアベルメクチンポリケチドシンターゼ遺伝子クラスターの B a m H I 制限地図であり、p S E 1 1 8 と p S E 1 1 9 との関係も示す。

【図 5 A】S . a v e r m i t t i l i s 菌株によって産生される発酵生成物の H P L C 分析を示した図であり、失活した a v e C O R F を含む S . a v e r m i t t i l i s 菌株 S E 1 8 0 - 1 1 についてのものである。ピーク定量は、シクロヘキシル B 1 の標準量との比較によって行われた。シクロヘキシル B 2 保持時間は 7 . 4 ~ 7 . 7 分 ; シクロヘキシル B 1 保持時間は 1 1 . 9 ~ 1 2 . 3 分であった。 10

【図 5 B】図 5 A と同様な分析を示した図であり、p S E 1 8 6 (A T C C 2 0 9 6 0 4) を用いて形質転換された S . a v e r m i t t i l i s 菌株 S E 1 8 0 - 1 1 についてのものである。

【図 5 C】図 5 A と同様な分析を示した図であり、p S E 1 8 7 を用いて形質転換された S . a v e r m i t t i l i s 菌株 S E 1 8 0 - 1 1 についてのものである。

【図 5 D】図 5 A と同様な分析を示した図であり、p S E 1 8 8 を用いて形質転換された S . a v e r m i t t i l i s 菌株 S E 1 8 0 - 1 1 についてのものである。

【図 6 A】第二ラウンドの「遺伝子シャフリング」により同定された a v e C 対立遺伝子に対する突然変異によりコードされているアミノ酸置換の組み合わせと、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 産生の比に対するそれらの影響を集めたリストである。各プラスミドについて、「突然変異」としてある欄において、上のボックスには、アミノ酸置換が記載されており、下のボックスには、アミノ酸置換を生じるヌクレオチド塩基の変化が記載されている。括弧内のヌクレオチド塩基の変化は、サイレント変化、すなわち、アミノ酸配列の変化を生じないものである。 20

【図 6 B】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 C】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 D】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 E】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 F】図 6 A と同様なリストである。 30

【図 6 G】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 H】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 I】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 J】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 K】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 L】図 6 A と同様なリストである。

【図 6 M】図 6 A と同様なリストである。

【図 5 B】

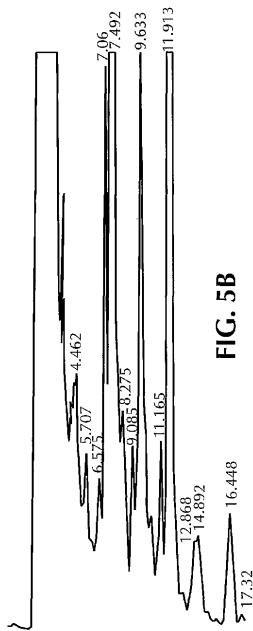


FIG. 5B

【図 5 C】

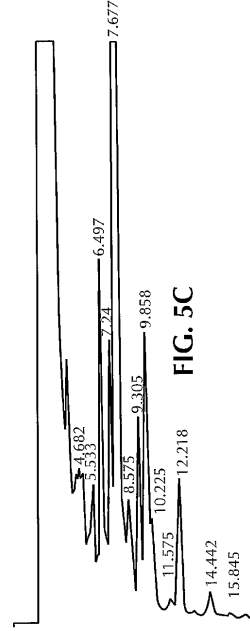


FIG. 5C

【図 5 D】

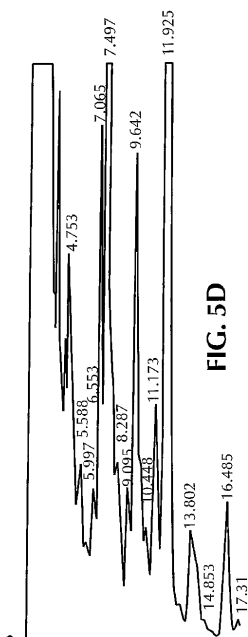


FIG. 5D

【図 6 A】

FIG. 6A

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE501	D48E, L136P, G179S, E238D (A132G), T317A, T580C, G708A, A887T, (A1124G)	52	184	0.28
pSE502	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D T317A, G438A, T580C, G708A, A887T	42	204	0.2
pSE503	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D T317A, G438A, (T497C), T580C, T633C, G708A, (C775T), A887T	32	172	0.19
pSE504	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S A247G, T317A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588A, T595C, T649C, G661A, G708A, (C884T)	44	205	0.21
pSE505	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L T317A, G438A, T585A, G588A, A634G, G708A, T760C, A761C, C1039T	35	178	0.2
pSE506	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, G589T, G708A, T760C, A761C, A887C	26	135	0.19
pSE507	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, T760C, A761C, C766G, C1039T	18	88	0.2

【図 6 B】

FIG. 6B

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE508	D48E, A89T, S90C, L136P, R163Q, G179S, E238D, T317A, G438A, A441 G, T580C, G661A, G708A, A887T, (A938G)	22	91	0.24
pSE509	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L (G136A), T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	22	114	0.19
pSE510	D48E, A61T, L136P, G179S, E238D, T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, A887C	64	211	0.30
pSE511	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L, T317A, G354A, (T416C), G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, (G775T), A887C, C1039T	20	91	0.21
pSE512	D48E, A61T, L136P, G179S, T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A	55	88	0.29
pSE514	D48E, A89T, L136P, G179S, (T33A), T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A	36	175	0.20
pSE515	D48E, A89T, V120A, L136P, G179S, T317A, G438A, T532C, T580C, G708A, (T1031C)	36	189	0.19

【図 6 C】

FIG. 6C

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE517	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D, T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, C766G, A887C	20	99	0.20
pSE518	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D, T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C	11	57	0.18
pSE519	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, T317A, G438A, T585A, G588A, G708A	40	153	0.26
pSE520	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, T317A, G438A, (T497C), T585C, G588A, G708A	45	177	0.25
pSE523	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L, T317A, T580C, G661A, G708A, (T797C), C865T	37	168	0.22
pSE524	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D, T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A, A887T	25	137	0.18
pSE525	D48E, A89T, L136P, G179S, T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A	22	129	0.17

【図 6 D】

FIG. 6D

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE526	D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L, T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C777T, A887C, C1039T	35	135	0.26
pSE527	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D, T317A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C	31	119	0.25
pSE528	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L, T317A, G354A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T	50	160	0.30
pSE529	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L, T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	26	150	0.17
pSE530	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L, (C97T), T317A, T580C, G708A, C766G, A887C, C1039T	37	136	0.27
pSE531	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L, T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, C1039T	27	101	0.27

【図 6 E】

FIG. 6E

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE532	D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D, T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, A887C	19	91	0.20
pSE534	D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L, T317A, T424C, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T	37	139	0.26
pSE535	Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, A256G, T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, A887C	34	132	0.26
pSE536	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A, (G137T), T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, T832C	19	106	0.17
pSE537	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L, T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, G889A, C1039T	34	171	0.19
pSE538	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L, T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T	13	39	0.33
pSE539	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D, T317A, G354A, G438A, G469C, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887C, (C1094T)	43	179	0.24

【図 6 F】

FIG. 6F

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE540	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L G276A, T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, C1039T	42	180	0.23
pSE541	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L (C266T), T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, C1039T	36	174	0.20
pSE542	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L T317A, G354A, G492A, A495G, (T497C), T580C, G708A, T747G, A887C, C1039T	50	175	0.29
pSE543	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T	17	67	0.25
pSE545	D48E, L136P, G179S, R250W G317A, T580C, G708A, C921T	37	134	0.27
pSE546	D48E, L136P, G179S, E238D G317A, T580C, G708A, A887T	48	178	0.27
pSE547	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C	32	142	0.23

【図 6 G】

FIG. 6G

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE548	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S (T114C), (T130C), T317A, G438A, T585A, G588A, G661A, G708A	41	157	0.26
pSE549	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L G317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	24	141	0.17
pSE550	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D T317A, G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, A887C	19	76	0.25
pSE551	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C	24	141	0.17
pSE552	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L T317A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C1039T	40	154	0.26
pSE553	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	23	123	0.18
pSE554	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T	30	162	0.18

【図 6 H】

FIG. 6H

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE556	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D (T169C), T317A, T585A, G588A, G708A, A887T	66	177	0.37
pSE557	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S A317A, T405C, G438A, T580C, G708A	57	219	0.26
pSE558	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S (G87A), A294G, T317A, G438A, T580C, G708A	51	215	0.24
pSE559	G40S, D48E, L136P, G179S, E238D G291A, T317A, T580C, G708A, A887T	81	247	0.33
pSE561	Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D A256G, A286G, T317A, (T497C), T580C, G708A, A887T	31	83	0.37
pSE563	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, C927T	43	177	0.24
pSE564	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C	61	216	0.28
pSE565	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C	59	210	0.28

【図 6 I】

FIG. 6I

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE566	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S T317A, (C341T), G438A, (T497C), T580C, (C695T), G708A, T874C	37	154	0.24
pSE567	D48E, L136P, R163Q, G179S, T317A, T580C, G661A, G708A	60	192	0.31
pSE568	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S (T85C), T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, (C800T)	48	173	0.28
pSE569	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D (T104C), T317A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T	59	153	0.38
pSE570	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D T317A, T580C, G661A, G708A, A887T	73	221	0.33
pSE571	D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D (T67C), T317A, T580C, G661A, G708A, C772G, A887T	75	236	0.32
pSE572	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D T317A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T	74	229	0.32
pSE573	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, A887T	39	173	0.23

【図 6 J】

FIG. 6J

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE574	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D A280G, T317A, (G359A), G438A, T580C, G708A, (T836C), A887T	53	231	0.23
pSE575	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S T317A, G438A, T580C, G661A, (C704T), G708A, (G965A)	49	217	0.23
pSE576	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S T317A, G438A, T580C, G661A, G708A	44	197	0.22
pSE577	D48E, A89T, S138T, G179S T317A, G438A, (T497C), T585A, G708A	36	140	0.25
pSE578	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T	45	193	0.23

【図 6 K】

FIG. 6K

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE582 ca	V3L, L136M	186	178	1.04
pSE583 cb	G26A, D48Y, R75W, S93N	94	88	1.07
pSE584 cc	R71L	314	293	1.07
pSE585 cd	T471, W110L, A139T	168	189	0.89
pSE586 ce	V1041, S138T, V2201, F2341	150	138	1.10
pSE587 cf	G45R, A64V, R69K	182	192	0.95
pSE588 cg	S90N	251	243	1.03
pSE589 ch	G26D, W111OL, R233H	97	107	0.91
pSE590 ci	Q36R, V1041, P128S, C152W, T276A	194	171	1.13
pSE591 cj	S90N	164	147	1.12
pSE592 ck	C142Y, A302T	152	133	1.14
pSE593 cl	V2M, V56D	117	121	0.97
pSE594 cm	S41G, L87V, A139T, L206M,	122	212	0.58
pSE595 cn	A62V, A139D	150	122	1.23
pSE596 co	F176C	203	204	1.0
pSE597 cp	T149S	120	135	0.89
pSE598 cq	A64T, C142Y	105	90	1.17
pSE599 cr	A130V, C142Y, L224M, E238V, L293M	79	71	1.11
pSE600 cs	A16T, K154M, L206F	103	97	1.06

【図 6 L】

FIG. 6L

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE601 da	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L	17	137	0.12
pSE602 db	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L	17	87	0.19
pSE603 dc	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V	19	146	0.13
pSE604 dd	D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V	26	180	0.14
pSE605 de	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L	22	158	0.14
pSE606 df	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q	16	94	0.17
pSE607 dg	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	21	243	0.13
pSE608 dh	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	18	146	0.12
pSE609 di	Q36R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	20	150	0.13
pSE610 dj	D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	14	110	0.13
pSE611 dk	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L	25	184	0.14
pSE612 di	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	132	0.12

【図 6 M】

FIG. 6M

プラスミド	突然変異	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE617 ea	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	4	86	0.05
pSE620 eb	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V	17	179	0.08
pSE621 ec	Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	12	204	0.06
pSE622 ed	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	16	226	0.07
pSE639 ee	V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	15	225	0.07
pSE643 ef	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T	19	247	0.08
pSE646 eg	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L	7	100	0.06
pSE655 eh	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T	10	139	0.07
pSE657 ei	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	9	157	0.06
pSE659 ej	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D	7	105	0.06
pSE670 ek	V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	7	104	0.07
pSE682 el	D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	4	83	0.05
pSE683 em	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D	8	154	0.05
pSE684 en	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V	11	155	0.07
pSE685 eo	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	11	134	0.08
pSE686 ep	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	8	100	0.08
pSE579 eq	D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	178	0.09
pSE580 er	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	14	149	0.09
pSE581 es	D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	8	146	0.06

【配列表】

2005517406000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成16年5月26日(2004.5.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヌクレオチド配列が、野生型 *aveC* 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現する *Streptomyces avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞がアベルメクチンのクラス2:1比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (SEQ ID NO): 2 のアミノ酸位置に対するアミノ酸残基においてアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis aveC* の対立遺伝子、プラスミド pSE186 (ATCC 209604) の *S. avermitilis AveC* 遺伝子産物コード配列若しくは図1 (配列番号 (SEQ ID NO): 1) 記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又は遺伝子コードの縮重によって当該ヌクレオチド配列に対して1以上のサイレントな変更を含むそれらの変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス2:1アベルメクチンがシクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1アベルメクチンであるときクラス2:1アベルメクチン比は0.35:1以下である、ポリヌクレオチド分子。

【請求項2】

前記シクロヘキシルB2:シクロヘキシルB1アベルメクチン比が、約0.20:1以下である、請求項1に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項3】

前記アミノ酸置換の組み合わせが、

【化 1】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
- (q) D48E, L136P, G179S, R250W;

【化 2】

- (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
- (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
- (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
- (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
- (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
- (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
- (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
- (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
- (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;

【化 3】

(bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;

(bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;

(bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;

(be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 4】

ヌクレオチド配列が、野生型 *aveC* 対立遺伝子が失活されており且つ突然変異ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を発現する *Streptomyces avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞がアベルメクチンのクラス 2 : 1 比を産生することができ、この比は、代わりに野生型 *aveC* 対立遺伝子のみを発現する *S. avermitilis* 菌株 ATCC 53692 の細胞により産生される比と比較して減少しているものであるような、配列番号 (SEQ ID NO) : 2 のアミノ酸位置に対するアミノ酸残基にアミノ酸置換の組み合わせをコードする突然変異をさらに含むことを除いて、*S. avermitilis aveC* の対立遺伝子、プラスミド pSE186 (ATCC 209604) の *S. avermitilis AveC* 遺伝子産物コード配列若しくは図 1 (配列番号 (SEQ ID NO) : 1) 記載の *S. avermitilis* の *aveC* ORF のヌクレオチド配列又は遺伝子コードの縮重によって当該ヌクレオチド配列に対して 1 以上のサイレントな変更を含むそれらの変異体と同じであるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であって、クラス 2 : 1 アベルメクチンがシクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンであるとき、クラス 2 : 1 アベルメクチン比は約 0.40 : 1 以下に減少されており、且つ前記アミノ酸置換の組み合わせが

(bf) D48E、S138T、A139T、G179S、E238D ; 及び

(bg) Y28C、Q38R、D48E、L136P、G179S、E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む、ポリヌクレオチド分子。

【請求項 5】

請求項 1 又は請求項 4 に記載の前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 6】

(i) *Streptomyces avermitilis* 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(ii) *S. avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又は遺伝子コードの縮重によって当該ヌクレオチド配列に対して 1 以上のサイレントな変更を含むその変異体を導入することを含む、*S. avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせが、

【化 4】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;

【化 5】

- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
- (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
- (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
- (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
- (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
- (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
- (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
- (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
- (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
- (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
- (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;

【化 6】

- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む、方法。

【請求項 7】

(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 *aveC* 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(ii) *S. avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードしている突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又は遺伝子コードの縮重によって当該ヌクレオチド配列に対して 1 以上のサイレントな変更を含むその変異体を導入することを含む、*S. avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記突然変異させた *aveC* 対立遺伝子又は縮重変異体を含む細胞が、シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチンを 0.35 : 1 以下の比で産生できるものである、方法。

【請求項 8】

前記 *AveC* 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせが、

【化 7】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;

【化 8】

- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
- (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
- (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
- (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
- (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
- (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
- (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
- (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
- (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
- (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
- (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;
- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;

【化 9】

- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

からなる群から選択された組み合わせを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記シクロヘキシル B 2 : シクロヘキシル B 1 アベルメクチン比が、約 0 . 2 0 : 1 以下である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

(i) ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) 菌株の細胞における前記 a v e C 対立遺伝子を突然変異させて、前記突然変異により前記 A v e C 遺伝子産物におけるアミノ酸置換の組み合わせを生じさせるか、(i i) *S . avermitilis* 菌株の細胞に、アミノ酸置換の組み合わせを含む A v e C 遺伝子産物をコードしている突然変異させた a v e C 対立遺伝子又はその縮重変異体を導入することを含む、新規 *S . avermitilis* 菌株の製造方法であって、前記アミノ酸置換の組み合わせが、

(b f) D 4 8 E 、 S 1 3 8 T 、 A 1 3 9 T 、 G 1 7 9 S 、 E 2 3 8 D ; 及び

(b g) Y 2 8 C 、 Q 3 8 R 、 D 4 8 E 、 L 1 3 6 P 、 G 1 7 9 S 、 E 2 3 8 D

からなる群から選択されたものである、方法。

【請求項 11】

【化 10】

- (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D;
- (c) D48E, L136P, R163Q, G179S;
- (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D;
- (f) D48E, L136P, G179S, E238D;
- (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D;
- (h) D48E, A61T, L136P, G179S;
- (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;

【化 1 1】

- (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L;
- (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L;
- (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L;
- (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L;
- (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L;
- (q) D48E, L136P, G179S, R250W;
- (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S;
- (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L;
- (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S;
- (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L;
- (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L;
- (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S;
- (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L;
- (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S;
- (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L;
- (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D;
- (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L;
- (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D;
- (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D;
- (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S;
- (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S;
- (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S;
- (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D;
- (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S;
- (an) D48E, A89T, S138T, G179S;
- (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D;
- (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D;
- (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L;
- (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L;

【化 1 2】

- (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L;
- (au) D48E, A89T, L136P, G179S;
- (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S;
- (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D;
- (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D;
- (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D;
- (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A;
- (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L;
- (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L;
- (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L;
- (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D

からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させた *S. avermitilis* *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含む *Streptomyces* 種の細胞。

【請求項 1 2】

ストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) の細胞である、請求項 1 1 に記載の細胞。

【請求項 1 3】

(b f) D 4 8 E、S 1 3 8 T、A 1 3 9 T、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D ; 及び

(b g) Y 2 8 C、Q 3 8 R、D 4 8 E、L 1 3 6 P、G 1 7 9 S、E 2 3 8 D

からなる群から選択されたアミノ酸置換の組み合わせを含む *AveC* 遺伝子産物をコードする突然変異させたストレプトミセスアベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) *aveC* 対立遺伝子又はその縮重変異体を含むストレプトミセス種の細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Classification No PCT/IB 03/00348
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N1/21 C12N9/88 C12N15/60 C12N15/76 C12R1/465 C12P17/18 C12P19/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 12821 A (MINSHULL JEREMY STEPHEN ;CHEN YAN (US); KREBBER ANKE (US); PFIZER) 22 February 2001 (2001-02-22) claims; examples; table 4	1-14
X	WO 01 12822 A (PFIZER PROD INC) 22 February 2001 (2001-02-22) examples; table 4	1-14
X	WO 99 41389 A (KATOH YOSHIHIRO ;PFIZER PROD INC (US); MCARTHUR HAMISH ALASTAIR IR) 19 August 1999 (1999-08-19) claims; examples; table 3	1-14
X	WO 95 09863 A (PFIZER ;CRAWFORD THOMAS CHARLES (US); DEMERS NEIL (US); GIBSON STE) 13 April 1995 (1995-04-13) page 2, line 15 -page 7, line 10	14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2003		Date of mailing of the international search report 05/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommer, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 internal application No.
 PCT/IB 03/00348
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/IB 03 00348

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-3, 5-9, 11,
12 and 14 (all partially);

a polynucleotide comprising the *Streptomyces avermitilis* aveC gene mutant (a) as listed in claim 3 and being capable of directing the production of cyclohexylB2:cyclohexylB1 avermectins in *S. avermitilis* strain ATCC 53692 to a ratio of 0.35:1 or less as well as subject-matter related thereto;

Inventions 2-57: claims 1-3, 5-9, 11,
12 and 14 (all partially);

a polynucleotide comprising the *Streptomyces avermitilis* aveC gene mutant (b)-(be), respectively, as listed in claim 3 and being capable of directing the production of cyclohexylB2:cyclohexylB1 avermectins in *S. avermitilis* strain ATCC 53692 to a ratio of 0.35:1 or less as well as subject-matter related thereto;

Inventions 58 and 59: claims 4, 5,
10 and 13 (all partially)

a polynucleotide comprising the *Streptomyces avermitilis* aveC gene mutant (bf) or (bg), respectively, as listed in claim 4 and being capable of directing the production of cyclohexylB2:cyclohexylB1 avermectins in *S. avermitilis* strain ATCC 53692 to a ratio of 0.40:1 or less as well as subject-matter related thereto;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 03/00348

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0112821 A	22-02-2001	AU 5838600 A BG 106479 A BR 0013119 A CA 2380872 A1 CN 1373809 T CZ 20020296 A3 EP 1200606 A1 HU 0202487 A2 WO 0112821 A1 JP 2003507017 T NO 20020664 A SK 1392002 A3	13-03-2001 31-10-2002 23-04-2002 22-02-2001 09-10-2002 14-08-2002 02-05-2002 28-10-2002 22-02-2001 25-02-2003 11-02-2002 03-12-2002
WO 0112822 A	22-02-2001	US 6248579 B1 AU 5702100 A BR 0013093 A CA 2381427 A1 CN 1370239 T CZ 20020297 A3 EP 1200605 A1 HU 0202517 A2 WO 0112822 A1 JP 2003507018 T NO 20020665 A SK 1382002 A3 US 2003134313 A1 US 2003129635 A1 US 2003124607 A1 US 2003129636 A1 US 2001016350 A1 US 2001024818 A1	19-06-2001 13-03-2001 13-08-2002 22-02-2001 18-09-2002 14-08-2002 02-05-2002 28-11-2002 22-02-2001 25-02-2003 11-02-2002 06-11-2002 17-07-2003 10-07-2003 03-07-2003 10-07-2003 23-08-2001 27-09-2001
WO 9941389 A	19-08-1999	AU 752343 B2 AU 1887899 A BG 104759 A BR 9907893 A CA 2320031 A1 CN 1297485 T EP 1053335 A1 HR 20000539 A1 HU 0100784 A2 WO 9941389 A1 JP 2002503473 T NO 20004044 A NZ 505676 A PL 342468 A1 SK 11722000 A3 US 2003134313 A1 US 2003129635 A1 US 2003124607 A1 US 2003129636 A1 US 6248579 B1 US 2001016350 A1 US 2001024818 A1 ZA 9901138 A	19-09-2002 30-08-1999 30-04-2001 14-11-2000 19-08-1999 30-05-2001 22-11-2000 30-04-2001 28-06-2001 19-08-1999 05-02-2002 11-10-2000 28-02-2003 04-06-2001 09-04-2001 17-07-2003 10-07-2003 03-07-2003 10-07-2003 19-06-2001 23-08-2001 27-09-2001 14-08-2000
WO 9509863 A	13-04-1995	AP 499 A AT 185571 T	05-06-1996 15-10-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International	Publication No
PCT/IB	03/00348

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9509863	A	AU 680039 B2	17-07-1997
		AU 7545494 A	01-05-1995
		BG 61842 B1	31-07-1998
		BG 100470 A	31-12-1996
		BR 9407747 A	12-02-1997
		CA 2173494 A1	13-04-1995
		CN 1132513 A ,B	02-10-1996
		CN 1202493 A ,B	23-12-1998
		CZ 9600963 A3	16-10-1996
		DE 69421190 D1	18-11-1999
		DE 69421190 T2	03-02-2000
		DK 722453 T3	27-12-1999
		EG 20802 A	29-03-2000
		EP 0722453 A1	24-07-1996
		ES 2138090 T3	01-01-2000
		FI 944623 A	06-04-1995
		GR 3032042 T3	31-03-2000
		HR 940642 A1	30-06-1997
		HU 75344 A2	28-05-1997
		WO 9509863 A1	13-04-1995
		IL 111075 A	11-01-2001
		JP 2761296 B2	04-06-1998
		JP 8510758 T	12-11-1996
		KR 186946 B1	01-04-1999
		KR 195653 B1	15-06-1999
		KR 204739 B1	15-06-1999
		LV 11474 A	20-08-1996
		LV 11474 B	20-12-1996
		NO 961380 A	03-04-1996
		NZ 271734 A	19-12-1997
		PL 313781 A1	22-07-1996
		RO 115884 B1	28-07-2000
		RU 2120943 C1	27-10-1998
		SI 9420059 A	28-02-1997
		SK 45396 A3	05-03-1997
		US 5665708 A	09-09-1997
		ZA 9407740 A	04-04-1996

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
// A 6 1 K 31/7048	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 33/00	1 7 1
(C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1:465)	C 1 2 R 1:465	

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 スタッツマン - イングウォール, キム ジョネル
アメリカ合衆国, コネチカット 0 6 3 4 0, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイ
ザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント

(72) 発明者 グスタフソン, クラエス エリック ダニエル
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, ベイビュー アベニュー 1 8 1 3

(72) 発明者 クレバー, アンケ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 3 0 3, パロ アルト, パン オーケン サークル 9 4
6

(72) 発明者 ライラルト, スン アイ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 4 0, マウンテン ビュー, トロフィー ドライブ 9
6 4

(72) 発明者 ミンシュル, ジェレミー スティーブン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 2 5, ロス アルトス, ロス ニノス ウェイ 6 7 9

(72) 発明者 キム, セラン
アメリカ合衆国, イリノイ 6 0 0 8 5, ウォークガン, サウス ホワイト オーク ドライブ
1 3 2 0 # 6 3 3

(72) 発明者 チェン, ヤン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 0 5 1, サンタ クララ, パウアーズ アベニュー 1 7 6
5

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA10 BA67 CA02 DA05 EA04 GA25
4B065 AA50X AA50Y AB01 AC14 BA16 BA21 BB10 CA34 CA43 CA44
4C086 AA01 AA04 EA14 MA01 MA04 NA20 ZC61