

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-501641

(P2015-501641A)

(43) 公表日 平成27年1月19日 (2015.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 C	4 B O 6 5
A 6 1 K 31/702 (2006.01)	A 6 1 K 31/702	4 C O 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)		

(21) 出願番号	特願2014-545206 (P2014-545206)	(71) 出願人	512137348
(86) (22) 出願日	平成24年12月4日 (2012.12.4)		バイエル・インテレクチュアル・プロパティ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月5日 (2014.8.5)		Bayer Intellectual Property GmbH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/074366		ドイツ40789モンハイム・アム・ライン、アルフレート・ノーベル・シュトラッセ10番
(87) 国際公開番号	W02013/083566	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成25年6月13日 (2013.6.13)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	11192618.4	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成23年12月8日 (2011.12.8)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 関連するアクチノバクテリアの遺伝的形質転換のためのプラスミドとしての、アクチノプラネス属 SE50/110 由来の新規な放線菌組込み接合エレメント

(57) 【要約】

本発明は、放線菌組込み接合エレメント (AICE) の構造に似た、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110 の完全なゲノム配列内の生来の DNA 配列を対象とする。関連する AICE は、過去に他の細菌のための遺伝子操作ツールを確立するために用いられた。本明細書において、我々は、全体として任意の他の既知の AICE とは明らかに異なるが、他種由来の他の特徴づけられた AICE と様々な配列類似性で小部分を共有する、アクチノプラネス属 SE50/110 で発見された特定の AICE の独自の特徴について記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- d) 配列番号 1 の配列を有するポリヌクレオチド、
 - e) (a) で特定されるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、および
 - f) 配列番号 1 の配列と少なくとも 90% 同一性を有するポリヌクレオチド
- からなる群から選択される、放線菌組込み接合エレメント。

【請求項 2】

配列番号 1 の配列と少なくとも 95% 同一性を有する、請求項 1 の放線菌組込み接合エレメント。

10

【請求項 3】

配列番号 1 および 2 の放線菌組込み接合エレメントで形質転換された宿主細胞。

【請求項 4】

細胞がアクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) である、請求項 3 の宿主細胞。

【請求項 5】

- d) 有用な培地において請求項 3 または 4 の宿主細胞を培養する段階、
 - e) 培養物から産物を回収する段階、および
 - f) 産物を単離および精製する段階
- を含む、生物学的産物の調製のための方法。

20

【請求項 6】

産物がアカルボースである、請求項 5 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の説明

原核生物アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110 は、2 型糖尿病の治療において世界中で使用されている、 α -グルコシダーゼ阻害剤アカルボースを産生する。2 型糖尿病の発生率が世界的に急速に上昇しているという事実に基づいて、アカルボースの需要の増大が、将来的に予測されている。これらの期待に応えるために、株およびその誘導体の遺伝子操作は、アカルボース収量を増大させることを目指して行われなければならない。しかしながら、現在、この株のための遺伝子操作のためのツールは存在しておらず、菌株改良の過程を妨げている。

30

【0002】

本発明は、放線菌組込み接合エレメント (*actinomycete integrative and conjugative element*) (AICE) の構造に似た、アクチノプラネス属 SE50/110 の完全なゲノム配列内の生来の DNA 配列を対象とする。関連する AICE は、過去に他の細菌のための遺伝子操作ツールを確立するために用いられた。本明細書において、我々は、全体として任意の他の既知の AICE とは明らかに異なるが、他種由来の他の特徴づけられた AICE と様々な配列類似性で小部分を共有する、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110 で発見された特定の AICE の独自の特徴について記載する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の説明

アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110 は、約 9.25 MB の大きさの高 G+C 含量のゲノムを有する、グラム陽性、好気性細菌である (*Schwientek et al.*, 2012)。その医学的に重要な生物は、ヒト α -グルコシダーゼを阻害することが見出された様々な化学的に関連する物質の天然の生産者であり (*Caspary and Graf*, 1979)、医薬用途に特に適し

50

ている (Frommer et al., 1975, 1977 a, 1977 b, 1979)。特に、十分に特徴付けられたアカルボース遺伝子クラスターにコードされる酵素によって合成される、シュードテトラサッカライドアカルボースは、2型糖尿病 (インスリン非依存性) の治療に世界中で使用されている。

【発明の概要】

【0004】

2型糖尿病は、世界的に、2億5000万人以上の影響を受けた人々がいる慢性疾患である。不適切に投与または処置されると、腎不全、失明、遅い創傷治癒、および冠状動脈アテローム性動脈硬化症を含む動脈疾患の重症なケースにつながり得る (IDF, 2009)。2型糖尿病の発生率が世界的に急速に上昇するにつれ、アカルボースのような糖尿病薬の需要が益々増大すると予想される必要がある。シュードテトラサッカライドアカルボースは、現在、野生型微生物アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110に基づく、収率が最適化された株の工業的発酵により生産されている。従来の突然変異誘発による古典的な菌株最適化は、過去、アカルボースの生産を増加させる大成功した方法であったが、この戦略は今では限界に達しているようである。さらに生産効率を高めるために、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110のための機能的形質転換システムを必要とする、標的遺伝子工学的な方法が適用されなければならない。以前の実験は、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110およびアクチノプラネス・フリウリエンシス (*Actinoplanes friuliensis*) (ならびに、おそらく他のほとんどのアクチノプラネス属) が、行われてきた真剣な努力にもかかわらず、エレクトロポレーションまたはPEG媒介形質転換のような標準的な形質転換法を可能にしないことを明らかにした (Heinzelmann et al., 2003)。本文脈において、関連する種について以前に示されているように (Hosted et al., 2005)、この目的のために使用することができる、放線菌組込み接合エレメント (AICE) が、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110ゲノム (GenBank: CP003170) 上で同定されている。

【0005】

AICEは、切除/組込み、複製、接合伝達および調節のための機能的モジュールを有する、高度に保存された構造組織を保有する、可動性遺伝因子のクラスである (te Poele, Bolhuis, et al., 2008)。自律的に複製することができ、それらはまた、特定の環境条件下で宿主に選択的優位性を付与する、抵抗および代謝特性などの、機能をコードするさらなるモジュールの取得を媒介すると言われている (Burrus and Waldor, 2004)。pACPLと呼ばれる、新規のAICEが、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110の完全なゲノム配列中で同定された (図1)。その13.6 kbの大きさと構造的遺伝子構成は、ミクロモノスポラ・ロザリア (*Micromonospora rosario*)、サリニスボラ・トロピカ (*Salinispora tropica*) またはストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) のような近縁種の他の既知のAICEに良く一致する (te Poele, Bolhuis, et al., 2008)。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】アクチノプラネス属 (*Actinoplanes* sp.) SE50/110由来の新たに同定された放線菌組込み接合エレメント (AICE) pACPLの構造的構成。他のAICE上でも見られる典型的な遺伝子はカラー表示されている：切除/組込み (オレンジ)、複製 (黄)、主要な伝達 (濃青)、接合 (青)、NUDIXヒドロラーゼ (濃緑)、調節 (緑)、他の注釈付き機能 (赤)、未知の機能 (灰色)。

【図2】ペアードエンドおよびホールゲノムショットガンパイロシーケンスの実行の自動的に組み合わせたアセンブリから生じる、571個のアクチノプラネス属 (*Actin*

10

20

30

40

50

o p l a n e s s p .) S E 5 0 / 1 1 0 コンティグ (c o n t i g) の散布図。塩基ごとの読み込みの平均数は 2 1 . 1 2 であり、「平均」でマークされた中央の斜線によってプロットに描かれている。さらなる線は、それぞれ最大で 1 0 倍および 1 / 1 0 倍の係数 (f a c t o r) の、塩基ごとの読み込みの過剰および過小出現の係数を示す。軸は対数スケールを表す。大規模で高度に過剰出現したコンティグは、特別な記号で強調表示されている。各コンティグは、以下の記号の一つで表される：菱形、通常のコンティグ；正方形、放線菌組込み接合エレメント (A I C E) に関連するコンティグ；三角形、リボソームオペロン (r r n) に関連するコンティグ；丸、トランスポゾンに関連する。

【発明を実施するための形態】

【0007】

10

最も知られている A I C E は、それぞれ、ゲノム上に位置する付着部位 (a t t B) および A I C E (a t t P) 内の 2 つの短い同一の配列 (a t t 同一セグメント (a t t i d e n t i t y s e g m e n t s)) の間の部位特異的組換えによる t R N A 遺伝子の 3 ' 末端への組込みにより、それらの宿主ゲノムにおいて存在する (t e P o e l e , B o l h u i s , e t a l . , 2 0 0 8) 。 p A C P L では、a t t 同一セグメントは大きさが 4 3 n t であり、a t t B はプロリント R N A 遺伝子の 3 ' 末端に重複している。さらにまた、a t t P における同一セグメントは、2 つのミスマッチを含有する 2 つの 2 1 n t の繰り返し：G T C A C C C A G T T A G T (T / C) A C (C / T) C A G によって隣接されている。これらはストレプトマイセス・アンボファシエンス (S t r e p o m y c e s a m b o f a c i e n s) 由来の A I C E p S A M 2 で同定されたアーム型部位に高い類似性を示す。p S A M 2 については、インテグラーゼがこれらの繰り返しに結合し、かつ効率的な組換えのためにそれらが不可欠なことが示された (R a y n a l e t a l . , 2 0 0 2) 。

20

【0008】

プロリント R N A ゲノム組込み部位に加えて、p A C P L は、平均的なアクチノプラネス属 (A c t i n o p l a n e s s p .) S E 5 0 / 1 1 0 細胞における染色体外エレメントとして (S c h w i e n t e k e t a l . , 2 0 1 2) 、少なくとも 1 2 コピーで存在することが示された (図 2) 。 p A C P L は 2 2 個のタンパク質をコードする配列を有する。

【0009】

30

本発明の放線菌組込み接合エレメントは：

- a) 配列番号 1 の配列を有するポリヌクレオチド、
 - b) (a) で特定されるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、および
 - c) 配列番号 1 の配列と少なくとも 9 0 % 同一性を有するポリヌクレオチド
- からなる群から選択される。

【0010】

配列番号 1 の配列と少なくとも 9 5 % 同一性を有する A I C E が好ましい。配列番号 1 の配列と少なくとも 9 8 % 同一性を有する A I C E がより好ましい。本発明はさらに、上述の放線菌組込み接合エレメントで形質転換された宿主細胞に関する。最も好ましい宿主細胞はアクチノプラネス属 (A c t i n o p l a n e s s p .) である。該宿主は、

40

- a) 有用な培地において上記宿主細胞を培養する段階、
- b) 培養物から産物を回収する段階、および
- c) 産物を単離および精製する段階

を含む、生物学的産物の調製のための方法において有用である。この方法における最も好ましい産物はアカルボースである。

【0011】

p A C P L の 2 2 個のタンパク質をコードする配列の詳細な説明

遺伝子 i n t (ゲノム遺伝子座タグ：A C P L _ 6 3 1 0) は、3 8 8 アミノ酸の長さを有する A I C E のインテグラーゼをコードする。その配列は、最初の 3 8 3 アミノ酸内

50

で、ストレプトマイセス・グリセオフラブス (*Streptomyces griseoflavus*) Tu4000のインテグラーゼ (GenBank: EFL40120.1) に74%の類似性を示す。該タンパク質のインテグラーゼドメインは、アミノ酸182-365に位置し、Int/Topo IBシグネチャーモチーフ (保存ドメイン: cd01182) に高い類似性 (e値 $2.90e-21$) を示す。該インテグラーゼは、2つの類似する、染色体上の付着部位 attBおよびAICE上の attPの間で生じる、部位特異的組換えによる、tRNA遺伝子内への組込みの原因である (te Poelle, Bolhuis, et al., 2008)。

【0012】

遺伝子 xis (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6309) は68アミノ酸の長さを有するAICEの除去酵素をコードする。それは、ストレプトスポランギウム・ロセウム (*Streptosporangium roseum*) DSM 43021由来の推定タンパク質 Sros_7036 (GenBank: ACZ89735.1) に最も高い類似性を示す。該タンパク質は、アミノ酸9-55の間に中程度に保存された (e値: $1.31e-07$) ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ (pfam12728) を含有する。Xisは、増幅および他の宿主への伝達に備えて、染色体からのAICEの削除を媒介するために、Intと組み合わせて必要である (te Poelle, Bolhuis, et al., 2008)。

【0013】

遺伝子 repSA (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6308) は、598アミノ酸の長さを有するAICEの複製開始タンパク質をコードする。それは、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (*Micromonospora aurantiaca*) ATCC 27029由来の推定プラスミド複製開始タンパク質に最も高い類似性を有する。該タンパク質は、ローリングサイクル複製機構を適用することが見出されたストレプトマイセス・アンボファシエンス (*Streptomyces ambofaciens*) 由来の十分に特徴付けられた RepSAタンパク質に似ている。

【0014】

遺伝子 aice1 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6307) は、97アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、最初の80アミノ酸において、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (*Micromonospora aurantiaca*) ATCC 27029由来の推定タンパク質 Micau_5360 (GenBank: ADL48866.1) に69%の類似性を示す。

【0015】

遺伝子 spdA (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6306) は、107アミノ酸の長さを有するAICEの推定拡散タンパク質 (spread protein) をコードする。SpdAはフランキア属 (*Frankia* sp.) CcI3由来の拡散タンパク質 (GenBank: ABD10289.1) に54%の類似性を示す。拡散タンパク質は、ドナー細胞からAICEを獲得する過程に存在する、レシピエント細胞の一時的な増殖遅延を反映する、ポック形成に関与している。それゆえ、拡散タンパク質は菌系内拡散 (intramyceial spread) を補助する (Kataoka et al., 1994; Grohmann et al., 2003; te Poelle, Bolhuis, et al., 2008)。

【0016】

遺伝子 spdB (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6305) は、169アミノ酸の長さを有するAICEの推定拡散タンパク質をコードする。SpdBは、アミノ酸40-131の間で、ミクロモノスポラ・ロザリア (*Micromonospora rosaria*) 由来の拡散タンパク質 (GenBank: AAX38998.1) に84%の類似性を示す。拡散タンパク質は、ドナー細胞からAICEを獲得する過程に存在する、レシピエント細胞の一時的な増殖遅延を反映する、ポック形成に関与している。それゆえ、拡散タンパク質は菌系内拡散 (intramyceial spread) を補助する

10

20

30

40

50

(Kataoka et al., 1994; Grohmann et al., 2003; te Poelle, Bolhuis, et al., 2008)。SpdBについてシグナルペプチドが発見され、その切断部位は位置18と予測される。またさらに、3つの膜貫通ヘリックスが位置i53 - 70o75 - 97i109 - 131oで発見された。

【0017】

遺伝子aice2 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6304) は、96アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、アミノ酸12 - 89の間で、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (Micromonospora aurantiaca) ATCC27029由来の推定タンパク質Micau__5358 (GenBank: ADL48864.1) に57%の類似性を示す。

10

【0018】

遺伝子aice3 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6303) は、61アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、公開データベース中のいずれのタンパク質にも著しい類似性を示さなかった。

【0019】

遺伝子aice4 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6302) は、138アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、最後の113アミノ酸において、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (Micromonospora aurantiaca) ATCC27029由来の推定タンパク質Micau__5357 (GenBank: ADL48863.1) に69%の類似性を示す。

20

【0020】

遺伝子aice5 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6301) は、108アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (Micromonospora aurantiaca) ATCC27029由来の推定タンパク質Micau__5356 (GenBank: ADL48862.1) の完全アミノ酸配列に79%の類似性を示す。このタンパク質は、細胞質外機能 (ECF) を備えるシグマ因子に対する低いpfamヒット (e値 0.0022) を有する。これらのシグマ因子は、特定の遺伝子の転写を刺激するためにRNAポリメラーゼに結合できる。それらは、環境からの刺激を受けて活性化されると考えられ、多くの場合、1以上の負の調節因子と共転写される (Helmann, 2002)。

30

【0021】

遺伝子aice6 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6300) は、149アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、ベルコシスポラ・マリス (Verrucosisspora maris) AB-18-032由来の推定タンパク質VAB18032__01645 (GenBank: AEB47413.1) の完全アミノ酸配列に50%の類似性を示す。

【0022】

遺伝子aice7 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6299) は、66アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、公開データベース中のいずれのタンパク質にも類似性を示さなかった。Aice7はアミノ酸9 - 31の範囲に単一膜貫通ヘリックスを含有する。

40

【0023】

遺伝子tra (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL__6298) は、293アミノ酸の長さを有するAICEの主要な伝達タンパク質をコードする。それは、大部分にわたって、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (Micromonospora aurantiaca) ATCC27029由来の細胞分裂タンパク質 (GenBank: ADL48859.1) に74%の類似性を示す。Traは、アミノ酸29 - 187の間で、全てのAICEおよびストレプトマイセス属 (Streptomyces) トランスフェラーゼ遺伝子において見られる、FtsK/SpoIIIEドメイン (te Poelle, Bo

50

l h u i s , e t a l . , 2 0 0 8) に著しい類似性 (e 値 3.1×10^{-14}) を有するドメインを含有する。いくつかの実験は、T r a のホモログがレシピエント株への二本鎖DNAの移行 (t r a n s l o c a t i o n) に関与しているという証拠を提供した。移行は、交配 (m a t i n g) 菌系体の菌系先端で生じる (P o s s o z e t a l . , 2 0 0 1 ; R e u t h e r e t a l . , 2 0 0 6) 。

【0024】

遺伝子 a i c e 8 (ゲノム遺伝子座タグ : A C P L _ 6 2 9 7) は、124 アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、アミノ酸 44 - 116 の間で、マイコバクテリウム・コロンビエンス (M y c o b a c t e r i u m c o l o m b i e n s e) C E C T 3 0 3 5 由来の F a d E 6 タンパク質 (G e n B a n k : E G T 8 6 7 0 1 . 1) の配列に 44 % の類似性を示す。完全な F a d E 6 タンパク質は、733 アミノ酸を有し、アシル - C o A デヒドロゲナーゼに似ているが、A i c e 8 は、それが F a d E 6 の触媒ドメインを含有せず、長さ 124 アミノ酸のみであるため、同様の機能を有する可能性は低い。

10

【0025】

遺伝子 a i c e 9 (ゲノム遺伝子座タグ : A C P L _ 6 2 9 6) は、320 アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、配列の大部分にわたって、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (M i c r o m o n o s p o r a a u r a n t i a c a) A T C C 2 7 0 2 9 由来の推定タンパク質 M i c a u _ 5 3 5 2 (G e n B a n k : A D L 4 8 8 5 8 . 1) に 68 % の類似性を示す。このタンパク質は位置 i 32 - 51 o 57 - 79 i 88 - 110 o 115 - 134 i に 4 つの膜貫通ヘリックスを含有する。

20

【0026】

遺伝子 a i c e 10 (ゲノム遺伝子座タグ : A C P L _ 6 2 9 5) は、69 アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、公開データベース中のいずれのタンパク質にも著しい類似性を示さなかった。

【0027】

遺伝子 p r a (ゲノム遺伝子座タグ : A C P L _ 6 2 9 4) は、r e p S A、x i s および i n t の活性化因子をコードするようである。それは、105 アミノ酸の長さを有し、かつ、完全配列にわたって、ミクロモノスポラ・オーランティアカ (M i c r o m o n o s p o r a a u r a n t i a c a) A T C C 2 7 0 2 9 由来の推定タンパク質 M i c a u _ 5 3 5 2 (G e n B a n k : A D L 4 8 8 5 7 . 1) に 90 % の類似性を示す。A I C E の伝達および複製を調節する P r a は、ストレプトマイセス・アンボファシエンス (S t r e p t o m y c e s a m b o f a c i e n s) 由来の A I C E p S A M 2 において、転写調節因子 K o r S A によって抑制されると考えられている (S e z o n o v e t a l . , 2 0 0 0) 。P r a を抑制することにより、A I C E は染色体上に組み込まれた形で残る。

30

【0028】

遺伝子 r e g (ゲノム遺伝子座タグ : A C P L _ 6 2 9 3) は、444 アミノ酸の長さを有する A I C E の調節タンパク質をコードする。それは、完全配列にわたって、ストレプトマイセス・カトレヤ (S t r e p t o m y c e s c a t t l e y a) N R R L 8 0 5 7 由来の推定調節因子 (G e n B a n k : C C B 7 5 9 9 9 . 1) に 50 % の類似性を示す。R e g はアミノ酸 4 - 72 の範囲にヘリックス - ターン - ヘリックスドメインを含有する。R e g と p S A M 2 由来の K o r S A との間の配列類似性は非常に低いが、p r a と n u d 遺伝子の間の r e g の局在は、この遺伝子構成で頻繁に見られ、R e g が K o r S A に対するホモログに似ていることを表し得る (t e P o e l l e , B o l h u i s , e t a l . , 2 0 0 8) 。

40

【0029】

遺伝子 n u d (ゲノム遺伝子座タグ : A C P L _ 6 2 9 2) は、アミノ酸 29 - 144 の間に N U D I X - ヒドロラーゼを含有するタンパク質をコードする。それは、172 ア

50

ミノ酸の大きさを有し、かつ、配列にわたって、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.) AA4の推定タンパク質 (GenBank: EF09132.1) および近縁種由来の様々なNUDIXヒドロラーゼに72%の類似性を示す。Nudは、アミノ酸21-108の間で、pSAM2のPifタンパク質に42%の類似性を示す。Pifはまた、NUDIX-ヒドロラーゼドメインを含有し、かつ、pSAM2を有する細胞との間の重複した伝達を防止するために、AICEの複製および転写を阻害すると考えられている、細胞間シグナル伝達に関与することが示された (Possoz et al., 2003; te Poelle, Bolhuis, et al., 2008)。それゆえ、pACPLにおけるPra、RegおよびNudは、pSAM2についてPra、KorSAおよびPifが行うような同様の調節メカニズムに似ている可能性が高い。

10

【0030】

遺伝子mdp (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6291) は、80アミノ酸の長さを有する金属依存性ホスホヒドロラーゼをコードする。それは、その配列にわたって、フランキア属 (*Frankia* sp.) CcI3由来の金属依存性ホスホヒドロラーゼ (GenBank: ABD10513.1) に66%の類似性を示す。Mdpをコードする遺伝子は、pra、regおよびnudホモログを有するクラスター内および他のAICE上で頻繁に見られる (te Poelle, Bolhuis, et al., 2008)。金属依存性ホスホヒドロラーゼは、シグナル伝達または核酸代謝に関与し得る (te Poelle, Samborsky, et al., 2008)。

20

【0031】

遺伝子aice11 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6290) は、256アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、公開データベース中のいずれのタンパク質にも著しい類似性を示さなかった。

【0032】

遺伝子aice12 (ゲノム遺伝子座タグ: ACPL_6289) は、93アミノ酸の長さを有する機能未知のタンパク質をコードする。それは、公開データベース中のいずれのタンパク質にも著しい類似性を示さなかった。

【0033】

参考文献

30

【表 1】

Burrus, V., Waldor, M.K., 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol* 155, 376-386.

Caspary, W.F., Graf, S., 1979. Inhibition of human intestinal alpha-glucosidehydrolases by a new complex oligosaccharide. *Res Exp Med (Berl)* 175, 1-6.

Frommer, W., Junge, B., Keup, U., Mueller, L., Schmidt, D., 1977. Amino sugar derivatives. German patent DE 2347782 (US patent 4,062,950). 10

Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D., Truscheit, E., 1979. Neue Enzyminhibitoren aus Mikroorganismen. *Planta Med* 35, 195-217.

Frommer, W., Puls, W., Schäfer, D., Schmidt, D., 1975. Glycoside-hydrolase enzyme inhibitors. German patent DE 2064092 (US patent 3,876,766).

Frommer, W., Puls, W., Schmidt, D., 1977. Process for the production of a saccharase inhibitor. German patent DE 2209834 (US patent 4,019,960). 20

Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M., 2003. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 277-301.

Hagège, J., Pernodet, J.L., Friedmann, A., Guérineau, M., 1993. Mode and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Microbiol.* 10, 799-812. 30

Heinzelmann, E., Berger, S., Puk, O., Reichenstein, B., Wohlleben, W., Schwartz, D., 2003. A Glutamate Mutase Is Involved in the Biosynthesis of the Lipopeptide Antibiotic Friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 447-457.

Helmann, J.D., 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* 46, 47-110.

Hosted, T.J., Jr, Wang, T., Horan, A.C., 2005. Characterization of the *Micromonospora rosaria* pMR2 plasmid and development of a high G+C codon optimized integrase for site-specific integration. *Plasmid* 54, 249-258. 40

【表 2】

IDF, 2009. IDF Diabetes Atlas, 4th edn. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.

Kataoka, M., Kiyose, Y.M., Michisuji, Y., Horiguchi, T., Seki, T., Yoshida, T., 1994. Complete Nucleotide Sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* Plasmid, pSN22: Genetic Organization and Correlation with Genetic Properties. *Plasmid* 32, 55-69.

te Poele, E.M., Bolhuis, H., Dijkhuizen, L., 2008. Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 127-143.

10

te Poele, E.M., Samborskyy, M., Oliynyk, M., Leadlay, P.F., Bolhuis, H., Dijkhuizen, L., 2008. Actinomycete integrative and conjugative pMEA-like elements of *Amycolatopsis* and *Saccharopolyspora* decoded. *Plasmid* 59, 202-216.

Possoz, C., Gagnat, J., Sezonov, G., Guérineau, M., Pernodet, J.-L., 2003. Conjugal immunity of *Streptomyces* strains carrying the integrative element pSAM2 is due to the pif gene (pSAM2 immunity factor). *Mol. Microbiol.* 47, 1385-1393.

20

Possoz, C., Ribard, C., Gagnat, J., Pernodet, J.L., Guérineau, M., 2001. The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol. Microbiol.* 42, 159-166.

Raynal, A., Friedmann, A., Tuphile, K., Guerineau, M., Pernodet, J.-L., 2002. Characterization of the attP site of the integrative element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 148, 61-67.

30

Reuther, J., Gekeler, C., Tiffert, Y., Wohlleben, W., Muth, G., 2006. Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip. *Mol. Microbiol.* 61, 436-446.

Schwientek, P., Szczepanowski, R., Rückert, C., Kalinowski, J., Klein, A., Selber, K., Wehmeier, U.F., Stoye, J., Pühler, A., 2012. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics* 1-2.

40

【表 3】

Sezonov, G., Possoz, C., Friedmann, A., Pernodet, J.L., Guérineau, M., 2000. KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites. *J. Bacteriol.* 182, 1243-1250.

Wehmeier, U.F., Piepersberg, W., 2004. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 63, 613-625.

10

【図 1】

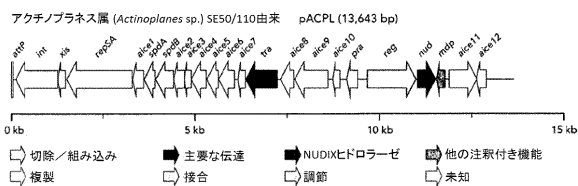


図1

【図 2】

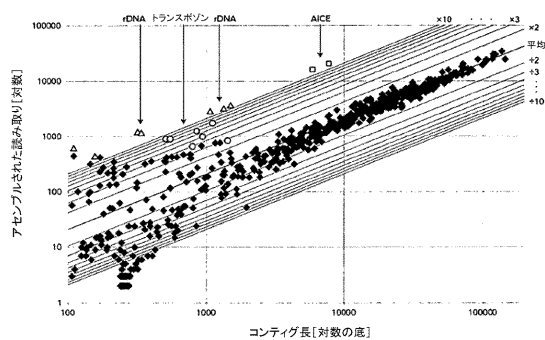


図2

【配列表】

2015501641000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/074366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/365
ADD.

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)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2012/016960 A1 (BAYER PHARMA AG [DE]; SELBER KLAUS [DE]; WEINGAERTNER BERNHARD [DE]; W) 9 February 2012 (2012-02-09) sequence 4953 -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent 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

1 February 2013

Date of mailing of the international search report

15/02/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheffzyk, Irmgard

Information on patent family members

PCT/EP2012/074366

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 アンドレアス・クライン

ドイツ 5 9 3 9 4 ノルトキルヒェン、ヴィッペルトシュトラッセ 1 4 番

(72)発明者 クラウス・ゼルバー

ドイツ 4 2 7 8 1 ハーン、バッハシュトラッセ 3 2 番

(72)発明者 ヘルマン・ヴェールマン

ドイツ 4 2 3 4 9 ヴッパータール、マストヴェーク 3 アー番

(72)発明者 ヴィンフリート・ローゼン

ドイツ 4 2 8 5 7 レムシャイト、クレメンホル 2 7 アー番

(72)発明者 アルフレート・ピューラー

ドイツ 3 3 6 1 5 ビーレフェルト、アム・ヴァルトシュレスヒェン 2 番

(72)発明者 パトリック・シュヴィーンテック

アメリカ合衆国 9 5 6 1 8 カリフォルニア州デビス、ラミータ・テラス 3 6 5 2 番

(72)発明者 イェルン・カリノウスキー

ドイツ 3 3 6 1 5 ビーレフェルト、レンバッハシュトラッセ 1 9 番

(72)発明者 ウド・ヴェーマイアー

ドイツ 4 2 1 1 9 ヴッパータール、ホスピタルシュトラッセ 1 6 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 DA05 EA04 GA11

4B064 AF11 CA03 CA19 DA01

4B065 AA07X AB01 AC14 BA01 CA44

4C086 EA01 ZC35