

(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2005-501912

(P2005-501912A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int.Cl.⁷

A O 1 N 63/00

C 1 2 Q 1/26

// C 1 2 N 15/09

F I

A O 1 N 63/00

C 1 2 Q 1/26

C 1 2 N 15/00

Z N A D

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 3

4 H O 1 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 106 頁)

(21) 出願番号 特願2003-526198 (P2003-526198)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月10日 (2002. 9. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年3月9日 (2004. 3. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/003073
 (87) 国際公開番号 W02003/022056
 (87) 国際公開日 平成15年3月20日 (2003. 3. 20)
 (31) 優先権主張番号 01/11689
 (32) 優先日 平成13年9月10日 (2001. 9. 10)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 503325538
 バイエル・クロツプサイエンス・エス・ア
 ー
 フランス国、エフー69009・リヨン、
 リュ・ジャンマリー・ルクレール、16
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真菌病罹病性作物を処置するためのケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤の使用

(57) 【要約】

本発明は、真菌病罹病性作物を処置するためのアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼの使用に関する。本発明は、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ阻害剤を施用することを含む、真菌病に対して作物を処置するための方法に関する。本発明は、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ阻害剤を特定することに存する段階を含む、新規殺真菌化合物の特定法にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤の有効量を含む殺真菌組成物を施用することを特徴とする、真菌病に対して作物を処置する方法。

【請求項 2】

前記ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤が、ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤が、N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートである、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤および他の殺真菌化合物を含むことを特徴とする、殺真菌組成物。

【請求項 5】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を使用することを特徴とする、殺真菌組成物を製造するための方法。

【請求項 6】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する化合物を特定することを含む、殺真菌化合物を特定するための方法。 20

【請求項 7】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する前記化合物が真菌の成長および病理発生を阻害するかどうかを判定する追加段階を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する化合物の前記特定が、

a) 前記化合物を、マグネシウム、NADPH および基質の存在下で、ケトール酸レダクトイソメラーゼと接触させる段階、および

b) 前記酵素の活性を測定する段階

を含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。 30

【請求項 9】

配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する化合物の前記特定が、

a) 宿主生物においてケトール酸レダクトイソメラーゼを発現させる段階、

b) 前記宿主生物によって生産されたケトール酸レダクトイソメラーゼを精製する段階、

c) 前記化合物を、マグネシウム、NADPH および基質の存在下で、前記精製ケトール酸レダクトイソメラーゼと接触させる段階、および

d) 前記酵素の活性を測定する段階

を含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。 40

【請求項 10】

前記酵素活性の測定が、340 nm での NADPH の吸収の低下を測定することを含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記基質が、2 - アセト乳酸 (AL) または 2 - アセト - 2 - ヒドロキシ酪酸 (AHB) である、請求項 8 から 10 のうち一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、真菌病罹病性作物を処置するためのケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤の 50

使用に関する。

【背景技術】

【0002】

真菌は、様々な植物種の作物の相当な損失を招く破壊的な流行病の原因である。病原性真菌からの酵素の阻害剤を利用する原理およびこれらの真菌に対して有効な新規分子を特定するための試験におけるこれらの酵素を使用する原理は、それ自体知られている。しかし、真菌酵素の単純な特性付けでは、目的 - 潜在的な殺真菌分子の対象として選択される酵素が、真菌の生存に不可欠なものでもあり、その殺真菌分子による阻害の結果、真菌の死がもたらされねばならない、または真菌の病理発生に不可欠でもあり、その阻害が、真菌にとって致命的ではなく、その発病能力を単に阻害するものでなければならない - を達成するために充分ではない。従って、代謝経路の特定ならびに病理発生および真菌の生存に不可欠な酵素の特定が、新規殺真菌製品の開発には必要である。

10

【0003】

ケトール酸レダクトイソメラーゼは、植物ならびに細菌および酵母菌などの微生物においてよく特性付けされている酵素である。この酵素は、分枝鎖アミノ酸についての生合成経路の第二酵素であり、基質 2 S - 2 - アセト乳酸 (AL) または 2 S - 2 - アセト - 2 - ヒドロキシ酪酸 (AHB) から、それぞれ、2, 3 - ジヒドロキシ - 3 - イソ吉草酸 (DHIV) または 2, 3 - ジヒドロキシ - 3 - メチル吉草酸 (DHIM) への転化を触媒する。この反応は、マグネシウムイオン (Mg^{2+}) の存在を必要とし、また、メチルまたはエチル基の異性化、その後の NADPH による還元という 2 段階で発生する。除草剤の対象としての植物イソメロリダクターゼ (isomeroreductase) については膨大な知識が得られており (Wittenbachら, Plant Physiol. 96, No. 1, Suppl., 94, 1991; Schulzら, FEBS Lett., 238: 375 - 378, 1998)、また、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、除草剤として記載されている (欧州特許第 106114 号; 米国特許第 4,594,098 号、欧州特許第 196026 号、欧州特許第 481407 号、国際公開公報第 94/23063 号、カナダ特許第 2002021 号)。しかし、これらの化合物は、植物に対して有効な除草作用を示さなかった。

20

【発明の開示】

【0004】

本発明の主題は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を施用することを含む、真菌病に対して作物を処置する方法である。マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) (イネいもち病菌) においてケトール酸レダクトイソメラーゼをコードしている ILV5 遺伝子を不活性化することによって、真菌の成長が阻害されるということがわかった。この真菌の成長の阻害は、ケトール酸レダクトイソメラーゼに特異的な阻害剤の存在下、インビボでも観察される。M. グリセア (M. grisea) は、米などの多くの作物植物種に対して病原性である。

30

【0005】

(配列表の説明)

配列番号 1 マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) ケトール酸レダクトイソメラーゼ。

40

【0006】

配列番号 2 サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) ケトール酸レダクトイソメラーゼ。

【0007】

配列番号 3 ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa) ケトール酸レダクトイソメラーゼ。

【0008】

配列番号 4 マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) ケトール酸レダクトイソメラーゼ遺伝子 cDNA。

50

【 0 0 0 9 】

配列番号 5 マグナポルテ・グリセア (*M a g n a p o r t h e g r i s e a*) ケトール酸レダクトイソメラーゼ。

【 0 0 1 0 】

配列番号 6 マグナポルテ・グリセア (*M a g n a p o r t h e g r i s e a*) ケトール酸レダクトイソメラーゼ遺伝子。

【 0 0 1 1 】

配列番号 7 から 1 8 P C R のためのプライマー。

【 0 0 1 2 】

本発明の主題は、有効量のケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を施用することによる、真菌病に対して作物を処置するための方法である。 10

【 0 0 1 3 】

本発明の主題は、有効（耕種学的に有効）且つ非植物毒性量のケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を、植物が生育しているまたは生育しそうな土壤に、植物の葉および/もしくはは果実に、または植物の種子に施用することを特徴とする、植物病原性真菌罹病性作物を治療的または予防的立場で退治するための方法である。「有効且つ非植物毒性量」という表現は、作物に存在するまたは出現しがちな真菌を防除または駆除するために充分であり、はっきりと感知できるいかなる植物毒性症状も前記作物に生じさせない阻害剤の量を意味するものと解釈する。そうした量は、退治すべき真菌、作物のタイプ、気候条件、および本発明の殺真菌組成物に含まれる化合物に依存して、広範に変化する。この量は、当業者の範囲内である系統的な現地試験によって決定することができる。 20

【 0 0 1 4 】

本発明の方法は、穀類（特に、コムギ、ライムギ、ライコムギおよびオオムギ）、バレイショ、綿、エンドウ、ナタネ、トウモロコシもしくはアマの種子、または他に森林の木の種子、または他にこれらの植物の遺伝修飾を受けた種子の処理に有用である。本発明は、農作物への塗布、すなわち、該当植物の葉、花、果実および/または幹への経葉塗布にも関する。本発明の方法の対象となる植物の中で、米、トウモロコシ、綿、穀類（コムギ、オオムギまたはライコムギなど）、果樹（特に、リンゴの木、西洋ナシの木、モモの木、ブドウの木、バナナの木、オレンジの木、レモンの木など）、油生産作物、例えば、ナタネまたはヒマワリ、市場向けの農園および野菜作物、トマト、サラダ用野菜、蛋白質生産作物、エンドウ、ナス科植物、例えば、バレイショ、ビートの根、アマ、および森林の木、およびまた、これらの作物の遺伝修飾相同体を挙げることができる。 30

【 0 0 1 5 】

本発明の方法の対象となる植物の中で、

- 次の種子の病気：赤かび病 [*ミクロドキウム・ニバレ* (*M i c r o d o c h i u m n i v a l e*) および *フザリウム・ロゼウム* (*F u s a r i u m r o s e u m*)]、黒穂病 [*チルレチア・カリエス* (*T i l l e t i a c a r i e s*)、*チルレチア・コントロベルサ* (*T i l l e t i a c o n t r o v e r s a*) または *チルレチア・インディカ* (*T i l l e t i a i n d i c a*)]、セプトリア病 [*セプトリア・ノドラム* (*S e p t o r i a n o d o r u m*)]、裸黒穂病 [*ウスチラゴ・トリチシ* (*U s t i l a g o t r i t i c i*)]、と闘うことに関して、コムギ； 40
- 地上の植物の部分の次の病気：穀物眼紋病 [*タペシア・ヤルンダ* (*T a p e s i a y a l l u n d a e*)、*タペシア・アクイフォルミス* (*T a p e s i a a c u i f o r m i s*)]、立枯病 [*ガエウマンノミセス・グラミニス* (*G a e u m a n n o m y c e s g r a m i n i s*)]、フットブライト病 [*フザリウム・セルモラム* (*F . c u l m o r u m*)、*フザリウム・グラミネアラム* (*F . g r a m i n e a r u m*)]、ヘッドブライト病 [*フザリウム・セルモラム* (*F . c u l m o r u m*)、*フザリウム・グラミネアラム* (*F . g r a m i n e a r u m*)、*ミクロドキウム・ニバル* (*M i c r o d o c h i u m n i v a l e*)]、黒斑点病 [*リゾクトニア・セラリス* (*R h i z o c t o n i a c e r e a l i s*)]、うどんこ病 [*エリシペ・グラミニス*；以前種名 *トリチシ* (*E r y* 50

siphe graminis forma specie tritici)]、さび [ブッシニア・ストリフォルミス (Puccinia striiformis)、ブッシニア・レコンディタ (Puccinia recondita)]、およびセプトリア病 [セプトリア・トリチシ (Septoria tritici) およびセプトリア・ノドラム (Septoria nodorum)]、と闘うことに関して、コムギ；

- 次の種子の病気：網斑病 [ピレノホラ・グラミニア (Pyrenophora graminea)、ピレノホラ・トレス (Pyrenophora teres) およびコクリオボラス・サティバス (Cochliobolus sativus)]、裸黒穂病 [ウスチラゴ・ヌダ (Ustilago nuda)] および赤かび病 [ミクロドキウム・ニバレ (Microdochium nivale) およびフザリウム・ロゼウム (Fusarium roseum)]、と戦うことに関して、オオムギ； 10

- 地上の植物の部分の次の病気：穀物眼紋病 [タペシア・ヤルンダ (Tapesia yellundae)]、網斑病 [ピレノホラ・テレス (Pyrenophora teres) およびコクリオボラス・サティバス (Cochliobolus sativus)]、うどんこ病 [エリシペ・グラミニス；以前種名ホルデイ (Erysiphe graminis forma specie hordei)]、小さび病 [プクシニア・ホルデリ (Puccinia hordei)] および汚斑病 [リンコスボリウム・セカリス (Rhynchosporium secalis)]、と闘うことに関して、オオムギ；

- 塊茎の病気 [特に、ヘルミントスポリウム・ソラニ (Helminthosporium solani)、フォーマ・チューベローサ (Phoma tuberosa)、リゾクトニア・ソラニ (Rhizoctonia solani)、フザリウム・ソラニ (Fusarium solani)] およびベト病 [フィトプソラ・インフェスタンス (Phytophthora infestans)] と戦うことに関して、バレイショ； 20

- 次の葉の病気：夏疫病 [アルテルナリア・ソラニ (Alternaria solani)]、ベト病 [フィトプソラ・インフェスタンス (Phytophthora infestans)]、と闘うことに関して、バレイショ；

- 種子から成長した若い植物の次の病気：立枯病および頸領腐れ [リゾクトニア・ソラニ (Rhizoctonia solani)、フザリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)]、黒根病 [シエラピオプシス・バシコーラ (Thielaviopsis basicola)]、と闘うことに関して、綿； 30

- 次の種子の病気：炭疽病 [アスコチタ・ピシ (Ascochyta pisi)、ミコスフェセラ・ピノデス (Mycosphaerella pinodes)]、赤かび病 [フザリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)]、灰色かび病 [ボトリチス・シネレア (Botrytis cinerea)]、ベト病 [ヘロノスポラ・ピシ (Peronospora pisi)]、と闘うことに関して、蛋白質生産穀物、例えば、エンドウ；

- 次の種子の病気：フォーマ・リンガム (Phoma lingam)、アルテルナリア・ブラッシカエ (Alternaria brassicae) およびスクレロチニア・スクレロイオルム (Sclerotinia sclerotiorum) と闘うことに関して、油生産作物、例えば、ナタネ； 40

- 種子の病気：[リゾプス属種 (Rhizopus sp.)、ペネシリウム属種 (Penicillium sp.)、アスペルギウス属種 (Aspergillus sp.) およびギビレラ・フジクロイ (Gibberella fujikuroi)] と闘うことに関して、トウモロコシ；

- 種子の病気：アルテルナリア・リニコラ (Alternaria linicola) と闘うことに関して、アマ；

- 立枯病 [フザリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)、リゾクトニア・ソラニ (Rhizoctonia solani)]、と闘うことに関して、森林の木；

- 地上部分の次の病気：いもち病 [マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*)]、黒斑点病 [リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*)]、と闘うことに、米；
- 次の実生の病気または種子から成長した若い植物の病気：立枯病および頸領腐れ [フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*)、ピシウム属種 (*Pythium sp.*)]、と闘うことに、作物野菜；
- 地上部分の次の病気：灰色かび病 [ボトリチス属種 (*Botrytis sp.*)]、うどんこ病 [特に、エリシフェ・シコラセアラム (*Erysiphe cichoracearum*)、スフェロセカ・フリギネア (*Sphaerotheca fuliginea*)、レベイルラ・タウリカ (*Leveillula taurica*)]、赤かび病 [フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)]、斑点病 [クラドスポリウム属種 (*Cladosporium sp.*)]、アルテルナリア斑点病 [アルテルナリア属種 (*Alternaria sp.*)]、炭疽病 [コレトトリチューム属種 (*Colletotrichum sp.*)]、セプトリア斑点病 [セプトリア属種 (*Septoria sp.*)]、黒斑点病 [リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*)]、べと病 [例えばブレミア・ラクツカエ (*Bremia lactucae*)、ペロノスポラ属種 (*Peronospora sp.*)、シュードペロノスポラ属名 (*Pseudoperonospora sp.*)、フィトソラ属名 (*Phytophthora sp.*)]、と闘うことに、作物野菜；
- 地上部分の病気：モニリア病 [モニリア・フルクティガーナ (*Monilia fructigenae*)、モニリア・ラクサ (*M. laxa*)]、黒星病 [ベンツリア・イナエクアリス (*Venturia inaequalis*)]、うどんこ病 [ポドスフェラ・リユーコトリカ (*Podosphaera leucotricha*)]、に関して、果樹；
- 葉の病気：特に、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*)]、うどんこ病 [ウンシヌラ・ネカトル (*Uncinula necator*)]、黒腐病 [グイニャーディア・ビウェリ (*Guignardia viwelli*)]、べと病 [プラスモパラ・ビチコラ (*Plasmopara viticola*)]、に関して、ブドウの木；
- 地上部分の次の病気：サーコスポラ葉枯病 [サーコスポラ・ベチコラ (*Cercospora beticola*)]、うどんこ病 [エリシフェ・ベチコラ (*Erysiphe beticola*)]、斑点病 [ラムラリア・ベチコラ (*Ramularia beticola*)]、に関して、ビートの根を挙げることができる。

【 0 0 1 6 】

ケトール酸レダクトイソメラーゼは、植物および微生物（細菌、酵母菌、真菌）において見出される、よく特性付けされた酵素である。本発明の方法は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を使用する。本実施形態において、本発明は、真菌病罹病性作物を処置するための、真菌ケトール酸レダクトイソメラーゼの阻害剤の使用、さらに好ましくは、植物病原性真菌のケトール酸レダクトイソメラーゼの阻害剤の使用に関する。本発明の特定の実施形態において、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) および / またはサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) および / またはニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) のケトール酸レダクトイソメラーゼを阻害する。もう一つの実施形態において、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 および / または配列番号 5 のケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性の阻害剤である。

【 0 0 1 7 】

あらゆるケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を本発明の方法において使用することができる。ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、当業者によく知られており、これらの阻害剤は、特に、欧州特許第106114号、米国特許第4,594,098号、欧州特許第196026号、欧州特許第481407号、国際公開公報第94/23063号、カナダ特許第2002021号および国際公開公報第97/37660号に記載されている。

【0018】

本発明の特定の実施形態において、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、ケトール酸レダクトイソメラーゼの活性部位に結合している反応中間類似体である。

【0019】

好ましくは、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、ジメチルホスフィノイル-2-ヒドロキシアセテートである。

【0020】

さらに好ましくは、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、N-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートである。

【0021】

本発明の好ましい実施形態において、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、殺真菌組成物の形態である。本発明は、有効量の少なくとも一つのケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を含む殺真菌組成物にも関する。本発明の殺真菌組成物は、前記阻害剤に加えて、農業上許容可能な固体もしくは液体担体および/または界面活性剤（これも、農業上許容可能なものである）を含む。詳細には、通常の不活性担体および通常の界面活性剤を使用することができる。本発明のこれらの殺真菌組成物は、例えば、保護コロイド、粘着剤、増粘剤、チキソトロップ剤、浸透剤、安定剤、金属イオン封鎖剤などの、あらゆるタイプの他の成分も含有することができる。さらに一般的には、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤は、通常の調合法に対応するすべての固体または液体添加剤と併用することができる。

【0022】

本発明の主題は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤および別の殺真菌化合物を含む殺真菌組成物でもある。他の殺真菌剤との混合物、詳細には、アシベンゾラ-S-メチル；アゾキシストロピン；ベナラキシル；ベノミル；プラスチックジン-S、プロムコナゾール；カブタホール；カブタン；カルベンダジム；カルボキシシン；カルプロパミド；クロロサロニル；銅、または水酸化銅もしくはオキシ塩化銅などの銅誘導体をベースにした殺真菌組成物；シアゾファミド；シモキサニル；シクプロコナゾール；シブロジニル；ジクロラン；ジクロシメット；ジクロラン；ジエトフェンカルブ；ジフェノコナゾール；ジフルメトリム；ジメトモルフ；ジニコナゾール；ジスコストロピン；ドデモルフ；ドジン；エジフェンフォス；エボキシコナゾール；エタボキサム；エチリモール；ファモキサドン；フェナミドン；フェナリモール；フェンブコナゾール；フェンヘキサミド；フェンピクロニル；フェンプロピジン；フェンプロピモルフ；フェリムゾン；フルアジナム；フルジオキソニル；フルメトーパー；フルキノコナゾール；フルシラゾール；フルスルファミド；フルトラニル；フルトリアホール；ホルベット；フララキシル；フラメトピル；グアザチン；ヘキサコナゾール；ヒメキサゾール；イマザリル；イプロベンホス；イプロジオン；イソプロチオラン；カスガマイシン；クレゾキシム-メチル；マンコゼブ；マネブ；メフェノキサム；メパニピリム；メタラキシル、およびメタラキシル-Mなどのその誘導体；メタコナゾール；メチラム-亜鉛；メトミノストロピン；オキサジキシル；ペフラゾエート；ペンコナゾール；ペンシクロン；リン酸およびホセチル-A1などのその誘導体；フタリド、ピコオキシストロピン；プロベナゾール；プロクロラズ；プロシミドン；プロパモカルブ；プロピコナゾール；ピラクロストロピン；ピリメタニル；ピロキロン；キノキシフェン；シルチオフアム；シメコナゾール；スピロキサミン；テブコナゾール；テトラコナゾール；チアベンダゾール；チフルザミド；チオフアナート、例えば、チオフアナート-メチル；チラム；トリジメホン；トリアジメノール；トリシクラゾール；トリデモル

10

20

30

40

50

フ；トリフロキシストロピン；トリチコナゾール；例えば、イプロバリカルブなどのバリンアミド誘導体；ピンクロゾリン；ジネブおよびゾキサミドとの混合物は、特に有利である。こうして得られた混合物は、より広い活性範囲を有する。本発明の組成物は、一つ以上の殺虫剤、殺菌剤または殺ダニ剤またはフェロモンまたは生物活性を有する他の化合物も含むことができる。

【0023】

本発明の主題は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害剤を使用する殺真菌組成物の製造法でもある。

【0024】

本発明の主題は、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する化合物を特定することを含む殺真菌化合物の調製法でもある。 10

【0025】

そのケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性の阻害を測定するために、試験化合物の存在下で酵素反応を行う。ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を測定するための、従って、この酵素活性を阻害する化合物を特定するためのすべての生化学的アッセイを、本発明の方法に使用することができる。前記生化学的アッセイは、当業者によく知られている (Dumasら, Biochem. J. 288: 865 - 874, 1992; Dumasら, Biochem. J. 301: 813 - 820, 1994; Dumasら, Febs Letters 408: 156 - 160, 1997; Halgandら, Biochemistry 37: 4773 - 4781, 1998; Wessellら, Biochemistry 37: 12753 - 12760, 1998; Halgandら, Biochemistry 38: 6025 - 6034, 1999)。 20

【0026】

その酵素反応は、適するバッファ中の溶液で行うと有利である。このタイプの反応媒体の使用によって、多数の反応を並行して行うことが可能となり、従って、例えば、マイクロプレートフォーマットで多数の化合物を試験することが可能となる。

【0027】

好ましくは、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する化合物を特定するための方法は、これらの化合物を、マグネシウムの存在下、基質中のNADPHの存在下で、ケトール酸レダクトイソメラーゼと接触させるし、この酵素活性を測定することを含む。 30

【0028】

有利には、本発明の方法における酵素活性の測定は、340nmでのNADPHの吸収の低下を測定することを含み、その酵素反応に使用される基質は、2 - アセト酪酸 (ALまたは2 - アセト - 2 - ヒドロキシ酪酸 (AHB)) である。当業者には公知の他の酵素活性測定法を本発明の方法に使用できることは理解される。

【0029】

あらゆるケトール酸レダクトイソメラーゼを本発明の方法において使用することができる。ケトール酸レダクトイソメラーゼは、植物、細菌、酵母菌および真菌などの一部の微生物において特性付けされている。対応する遺伝子をクローン化することによって、この酵素の蛋白質の配列を決定することが可能となる (Dumasら, Biochem. J. 277: 69 - 475, 1991; Curienら, Plant Mol. Biol. 21: 717 - 722, 1993; Dumasら, Biochem. J. 294: 821 - 828, 1993; Biouら, EMBO J. 16: 3405 - 3415, 1997; Dumasら, Biochemistry 34: 6026 - 6036, 1995; Dumasら, Accounts of Chemical Research 34: 399 - 408, 2001; Sistaら, Gene, 120: 115 - 118, 1992; Zelenaya - Troitskayaら, EMBO J. 14: 3268 - 3276, 1995)。 40

【0030】

本発明の好ましい実施形態において、本発明の方法において使用されるケトール酸レダクトイソメラーゼは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 および / または配列番号 5 で表される。

【0031】

好ましくは、ケトール酸レダクトイソメラーゼは、その自然環境から単離され、精製または不完全精製される。ケトール酸レダクトイソメラーゼは、様々な方法を利用して調製することができる。これらの方法は、詳細には、これらのポリペプチドを自然発現する細胞などの天然供給源からの精製；適切な宿主細胞による組換えポリペプチドの生産およびその後のそれらの精製；化学合成による製造であり、または最終的にはこれらの様々なアプローチの組合せである。これらの様々な製造法は、当業者によく知られている。

10

【0032】

本発明の第一の実施形態において、ケトール酸レダクトイソメラーゼは、例えば、E. コリ菌などの細菌、サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) などの酵母菌、または N. クラッサ (*N. crassa*) もしくは M. グリセア (*M. grisea*) などの真菌のようなこの酵素を自然生産する生物から精製される。

【0033】

本発明の好ましい実施形態において、ケトール酸レダクトイソメラーゼは、組換え宿主生物において過発現される。DNA フラグメントを設計するための方法および宿主細胞内でポリペプチドを発現させるための方法は、当業者によく知られており、例えば、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience により出版 (1989) された「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocol in Molecular Biology)」の 1 巻および 2 巻、F. M. Ausubel ら著、または Molecular Cloning, T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982) に記載されている。

20

【0034】

好ましくは、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する化合物を特定するための方法は、宿主生物においてケトール酸レダクトイソメラーゼを発現させること、その宿主生物によって生産されたケトール酸レダクトイソメラーゼを精製すること、これらの化合物と精製されたケトール酸レダクトイソメラーゼとをマグネシウム、NADPH および基質の存在下で接触させること、ならびに酵素活性を測定することを含む。

30

【0035】

好ましい実施形態において、これらの方法はすべて、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する前記化合物が真菌の成長および / または病理発生を阻害するかどうかを判定する追加段階を含む。

【0036】

従って、本発明は、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害することによって真菌の成長および / または病理発生を阻害する化合物を特定するための方法に関する。これらの方法は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ阻害化合物の特定に適するアッセイに化合物または化合物の混合物を付すし、前記アッセイに対して正に反応する化合物を選択すること、適切な場合にはそれらを単離するし、その後、それらを特定することに存する。

40

【0037】

好ましくは、前記の適するアッセイとは、上で定義したようなケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性についてのアッセイである。

【0038】

好ましくは、これらの方法に従って特定した化合物を、その後、当業者には公知の方法に従って、その抗真菌特性について、ならびに植物に対する真菌の病理発生および / または成長を阻害するその能力について試験する。好ましくは、葉または植物全体に対する病理発生分析を利用して化合物を評価する。

【0039】

50

本発明によると、用語「化合物」は、ペプチドおよび蛋白質を含むあらゆる化学化合物または化学化合物の混合物を意味するものと解釈される。

【0040】

本発明によると、用語「化合物の混合物」は、例えば、分子の立体異性体（ジアステレオ異性体）、生物材料（植物、植物組織、細菌培養物、酵母菌培養物もしくは真菌培養物、昆虫、動物組織など）の抽出物由来の天然起源の混合物、または未精製、完全精製もしくは不完全精製反応混合物、または他にコンビナトリアルケミストリーによって誘導された生成物の混合物などの、少なくとも二つの異なる化合物を意味するものと理解される。

【0041】

最後に、本発明は、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する新規真菌病発生阻害化合物、詳細には、本発明の方法によって特定された化合物および／または本発明の方法によって特定された化合物から誘導された化合物に関する。

10

【0042】

好ましくは、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する真菌病発生阻害化合物は、一般的な酵素阻害剤ではない。また、好ましくは、本発明の化合物は、殺真菌活性および／または真菌の病理発生に対して活性を有することが既に知られている化合物ではない。

【0043】

本発明の主題は、植物病原性真菌に備えて植物を処理する方法でもあり、この方法は、本発明の方法によって特定された化合物で前記植物を処理することを含むことを特徴とする。

20

【0044】

本発明は、本発明の特定法によって、ケトール酸レダクトイソメラーゼの酵素活性を阻害する真菌病発生阻害化合物を特定することに存する段階、およびその後、通常の化学合成法、酵素的合成法および／または生物材料の抽出法によって前記特定化合物を調製することに存する段階を含む、真菌病発生阻害化合物を調製するための方法にも関する。化合物を調製する段階を進めて、適切な場合には、本発明の特定法により特定された化合物から誘導された化合物を特定し、その後、前記誘導化合物を通常の方法により調製する「最適化」段階を行ってもよい。

【0045】

30

（実施例）

【実施例1】

【0046】

マグナポルテ・グリセア（*Magnaporthe oryzae*）（イネいもち病菌）ILV5遺伝子のクローニング

M. グリセア（*M. oryzae*）ILV5遺伝子の内部フラグメントを、真菌イソメロレダクターゼ間に保存されている蛋白質ドメインに対応する対の縮重プライマーを使用して、この真菌のゲノムDNAからPCRにより増幅した。得られたPCR生成物を、その後、プラスミドpGEM-T-Easy（Promega）にクローニングし、配列して、新たな対のプライマーでPCRにより増幅した。後者のPCR生成物を、M. グリセア（*M. oryzae*）コスミドDNAライブラリをスクリーニングするための相同プローブとして使用した。その後、正のクローンのうちのひとつと、既に得られているPCR生成物の配列から誘導したオリゴヌクレオチドとを使用して、M. グリセア（*M. oryzae*）ILV5遺伝子の配列を製作した。

40

【0047】

1. 1. 縮重オリゴヌクレオチドを使用する増幅によるM. グリセア（*M. oryzae*）ILV5遺伝子の内部フラグメントの分離

1. 1. 1. 縮重オリゴヌクレオチドの選択

M. グリセア（*M. oryzae*）ILV5遺伝子の内部フラグメントの増幅は、縮重オリゴヌクレオチドを使用するPCRによって行った。これらの縮重オリゴヌクレオチドは

50

、*N. クラッサ* (*N. crassa*) および *サッカロミセス・セレビスエ* (*S. cerevisiae*) のイソメロダクターゼの蛋白質配列の比較に基づいて選択した。この比較によって、*M. グリセア* (*M. grisea*) のイソメロダクターゼ中に存在するはずである、これら二つの真菌イソメロダクターゼ配列間に保存されている4つのドメインを示すことができた。これら4つの保存ドメインは、連続した少なくとも7つの保存アミノ酸から成る。縮重オリゴヌクレオチドのこの配列は、遺伝子コードに従って翻訳された保存ドメインのアミノ酸のものから決定した。縮重度(所定のアミノ酸についてのコドンの数)をできるだけ低くするために、アルギニン、ロイシンまたはセリンなどのアミノ酸は、6つのコドンがそれらに対応するので、避けなければならない。そうしたものとしては、アミノ酸メチオニンおよびトリプトファンが望ましい。たった一つのコドンがそれらに対応するからである。縮重度は、増幅の特異性を増すために、そのオリゴヌクレオチドの3'末端では低くあらねばならない。本発明者らは、*M. グリセア* (*M. grisea*) DNAの(+)鎖上のオリゴヌクレオチド1(+)および3(+)ならびに(-)鎖上のオリゴヌクレオチド2(-)および4(-)という4つのオリゴヌクレオチドを規定することができた。従って、PCR増幅は、1(+)と2(-)、1(+)と4(-)、3(+)と2(-)、3(+)と4(-)という縮重オリゴヌクレオチドの4つの異なる対を使用して行うことができる。

10

【0048】

1. 1. 2. 縮重オリゴヌクレオチドを使用する*M. グリセア* (*M. grisea*) ILV5遺伝子の内部フラグメントの増幅

20

M. グリセア (*M. grisea*) ILV5遺伝子の増幅に最適な条件は、プライマーの対およびそれらのハイブリダイゼーション温度を変化させることによって決定した。最初の3増幅サイクルは、可変的なハイブリダイゼーション温度(42、50または55)で行ったのに対して、他のサイクルのハイブリダイゼーション温度は、55である。正の対照は、*N. クラッサ* (*N. crassa*) および *S. セレビスエ* (*S. cerevisiae*) のゲノムDNAを用い、*M. グリセア* (*M. grisea*) のゲノムDNAについてのもと同じ条件下で行った。ハイブリダイゼーション温度42で、プライマー対(1-4)、(1-2)、(3-4)および(3-2)をそれぞれ用いて*S. セレビスエ* (*S. cerevisiae*) DNAフラグメントを期待サイズ、すなわち590bp、610bp、440bpおよび470bp、で増幅した。しかし、プライマー対(1-4)および(3-2)での*S. セレビスエ* (*S. cerevisiae*) ゲノムDNAの増幅プロファイルは、複合している。ハイブリダイゼーション温度50については、プライマー対(1-4)、(1-2)、(3-4)および(3-2)をそれぞれ使用して*N. クラッサ* (*N. crassa*) DNAフラグメントを期待サイズ、すなわち660bp、685bp、523bpおよび544bp、で増幅したが、プライマー対(1-4)および(3-4)での増幅プロファイルは、複合している。様々な縮重オリゴヌクレオチド対によって、酵母菌ゲノムDNAおよび*N. クラッサ* (*N. crassa*) ゲノムDNAから期待サイズのフラグメントを増幅することができた。そのため、これらの縮重オリゴヌクレオチドを、*M. グリセア* (*M. grisea*) ILV5遺伝子を増幅するために、使用することができた。ハイブリダイゼーション温度42で試験した、オリゴヌクレオチドの使用量は、*M. グリセア* (*M. grisea*) ゲノムDNAの増幅に対してなんらかの影響を及ぼすようには見えない。最初のPCRでのハイブリダイゼーション温度42で、様々なプライマー対を用いて得られた*M. グリセア* (*M. grisea*) ゲノムDNAの増幅プロファイルは、かなり複合している。ハイブリダイゼーション温度50で、*M. グリセア* (*M. grisea*) ゲノムDNAの増幅プロファイルの単純化が、殆どのプライマー対について、特に、プライマー対(1-2)(期待サイズ(685bp)での単一のDNAフラグメントの増幅を可能にする)について観察された。最初のPCRサイクルでのハイブリダイゼーション温度が55では、プライマー対(1-2)および(3-2)での増幅の特異性を上昇させることおよびその収率を低下させることが可能とならない。従って、*M. グリセア* (*M. grisea*) ゲノムDNAからの増幅につ

30

40

50

いての最良の条件は、オリゴヌクレオチド対 (1 - 2) を使用して、最初の P C R サイクルでのプライマーハイブリダイゼーション温度 5 0 で得られた。

【 0 0 4 9 】

1 . 1 . 3 . プラスミド p G E M - T - e a s y における、M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の P C R 増幅内部フラグメントのクローニング
プライマー対 (1 - 2) を使用し、3 サイクルはプライマーハイブリダイゼーション温度 5 0 、その後、他の増幅サイクルは 5 5 で M . グリセア (M . g r i s e a) ゲノム DNA から P C R により M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の内部フラグメントを増幅した。約 6 8 0 p b のこの P C R 生成物を、アガロースゲル電気泳動のよって分離した後、精製し、その後、プラスミド p G E M - T - e a s y にクローニングする。形質転換後、ホワイト/ブルー選択システム (X - G a l) を使用して得られた細菌コロニーは、ホワイト、ブルー、およびコロニーの中心がブルーであるホワイト (ホワイト/ブルーコロニーと呼ばれる) という 3 つの異なる表現型を示した。プラスミド p G E M - T - e a s y のクローニング部位のいずれかの側にハイブリダイズする万能プライマー S p 6 および T 7 を使用する P C R によって、様々な表現型の 3 0 のコロニーを分析した。2 0 のホワイトコロニーおよび 1 0 のホワイト/ブルーコロニーが正である。実際、これらのコロニーから、挿入体のサイズ (6 8 0 b p) + プライマー S p 6 および T 7 各々と挿入体とを分かち距離 (1 2 0 b p) に対応する期待サイズ (8 1 0 b p) で、DNA フラグメントを増幅した。その後、異なる表現型の二つのクローン、ホワイトおよびホワイト/ブルー、を選択して、配列した。これらが、クローン番号 4 (ホワイト) および番号 2 0 (ホワイト/ブルー) である。

10

20

【 0 0 5 0 】

1 . 1 . 4 . M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子のクローン化内部フラグメントの配列の分析

二つのクローン、番号 4 および番号 2 0 、のヌクレオチド配列の比較は、それらが、プラスミド p G E M - T - e a s y に異なる配向でクローニングした同じ DNA フラグメントに対応することを示し、それによって、それらの表現型の違い (ホワイトおよびホワイト/ブルー) を説明することができた。このクローン化フラグメントの二本鎖ヌクレオチド配列は、このようにして得られた。既知蛋白質をコードしているものとこのヌクレオチド配列との相同性を、N C B I (N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n : (米国) バイオテクノロジー情報センター) からの B l a s t x プログラムを使用して探索した。このプログラムは、ヌクレオチド配列の 6 つのリーディングフレームの翻訳配列を、そのデータベースに収容されているすべてのたんぱく質配列と比較する。前記クローン化フラグメントのヌクレオチド配列と N . クラッサ (N . c r a s s a) イソメロレダクターゼの蛋白質配列 (e - 1 0 2 のエラー) の間に有意な相同性が確認された。これら 2 つの配列と比較するために前記ソフトウェアにより規定された領域内でのアミノ酸の同一度は、9 4 % である。従って、プラスミド p G E M - T - e a s y にクローニングしたフラグメントは、M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の内部フラグメントに対応する。M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の内部フラグメントの配列と N . クラッサ (N . c r a s s a) I L V 5 遺伝子のものは、強い相同性を示すが、M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の配列の中心に違いが存在する。N . クラッサ (N . c r a s s a) ではこの位置に 7 7 b p のイントロンが存在するので、この違いは、M . グリセア (M . g r i s e a) 配列内のイントロンの存在に対応しうる。このイントロンの配列中での位置を探索した。5 ' スプライシングコンセンサスモチーフと共に、3 ' スプライシングコンセンサスモチーフおよび投げ縄型配列を、M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の内部フラグメントのヌクレオチド配列において特定した。従って、M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の内部フラグメントの推定イントロン (8 6 b p) を特定した。M . グリセア (M . g r i s e a) I L V 5 遺伝子の内部フラグメントの配列のイントロンのスプライシングによって、「理論上の」c D N A フラグメントを得ることが可能とな

30

40

50

る。その後、この「理論上の」cDNAから理論的に導き出したM.グリセア(M. grisea)イソメロダクターゼの蛋白質配列のフラグメントをN.クラッサ(N. crassa)イソメロダクターゼのものと比較すると、それは、これら二つの酵素の主配列の間の非常に強い同一性を示した(図1)。

【0051】

1.2.M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子用のプローブでのM.グリセア(M. grisea)コスミドライブラリのスクリーニング

1.2.1M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子用の相同プローブの構築
プラスミドpGEM-T-easyにクローニングしたM.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子の配列に基づき規定したプライマー13Uおよび549Lを使用して、クローン番号4からM.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子の内部フラグメントをPCRにより増幅した。アガロースゲルで精製した後、このフラグメントを、ILV5遺伝子用の標識プローブを作成するためのマトリックスとして使用した。

【0052】

1.2.2.M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子に特異的なプライマーを使用するPCRによるM.グリセア(M. grisea)Guy11コスミドライブラリのスクリーニング

Guy11コスミドライブラリは、96ウエルプレート内に存在する96の異なるコスミドに対応する96のDNAミニ作成体の28のプール(2688クローン)の形で表される。M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子の既知配列に基づいて規定したプライマー300Uおよび549Lを使用し、これらのDNAミニ作成体プールに対してPCR増幅を行うことによって、このコスミドライブラリにおいて、M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子を探索した。プール番号17、19、20、21、27、28および29から、期待サイズ(249bp)のフラグメントを増幅した。前記ILV5遺伝子についての検索は、前記ILV5遺伝子用のプローブと、前記プレート番号17、19、20、21、27、28および29からのコスミドをハイブリダイズさせることにより継続した。

【0053】

1.2.3.M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子用の相同プローブでのハイブリダイゼーションによるM.グリセア(M. grisea)Guy11コスミドライブラリのスクリーニング

プレート番号17、19、20、21、27、28および29由来の細菌コロニーをナイロン膜上に複製し、M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子用のプローブでハイブリダイズした。このハイブリダイゼーションによって、プレート番号20および27からそれぞれコスミドG6およびG7を、ならびにプレート29からコスミドB5およびB6を選択することができた。

【0054】

1.2.4.コスミド20/G6を使用するM.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子の特性付け

a)コスミド20/G6を使用するM.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子の配列

前記ILV5遺伝子の配列を段階的に行った。第一の配列反応は、PCRによって得られたM.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子の内部フラグメントの既知配列から選択した分岐プライマーを使用して行った。この新たなILV5遺伝子配列に基づき、さらなるプライマーを規定して、M.グリセア(M. grisea)ILV5遺伝子が完全に配列されるまで、他の配列反応を行った。6つのリーディングフレームのILV5遺伝子の全ヌクレオチド配列から翻訳された配列をN.クラッサ(N. crassa)イソメロダクターゼの蛋白質配列と比較して、翻訳開始ATG、翻訳停止の停止コドン、および様々な可能なイントロンの位置を確認した。このようにして、翻訳開始ATGをILV5遺伝子のヌクレオチド配列上で特定した。これは、前記配列の他の要素を位置決めするリ

フェレンス(+1)として役立つ。3つの推定イントロンが、M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子のヌクレオチド配列内にあった。第一のイントロンは、M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子の位置199と280(単位:bp)の間、第二のイントロンは、位置314~390にあると考えられ、第三のイントロンは、位置670と755の間にあると考えられる。翻訳停止の停止コドンは、M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子の配列の位置1449にあると考えられる。M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子のcDNAの単離を行って、M.グリセア(M. grisea)およびN.クラッサ(N. crassa)の蛋白質配列の比較により、推測イントロンの位置を確認した。

【0055】

b) M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子のcDNAの単離およびM.グリセア(M. grisea)遺伝子のイントロンについての検索

M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子のcDNAは、ILV5遺伝子配列に基づき規定したオリゴヌクレオチド(オリゴヌクレオチド22Uおよび1063L)を使用して、cDNAライブラリから分離体P1.2(完全培地中で培養した菌系のRNA)のPCR増幅を行うことによって単離した。オリゴヌクレオチド22Uは、翻訳開始ATGの前にあり、オリゴヌクレオチド1603Lは、翻訳停止STOPコドンの後、93bpにある。二つのフラグメント(サイズ500bp未満のフラグメントおよび期待サイズ、すなわち1.6kb、で増幅したフラグメント)をこのプライマー対で増幅する。期待サイズで増幅したフラグメントを、アガロースゲル電気泳動により分離した後、精製し、プラスミドpGEM-T-easyにクローニングする。形質転換後に得られた24の細菌クローンを、プライマー22Uと1603Lの対を使用するPCRによって分析する。DNAフラグメントが、期待サイズ(1.6kb)で実際に増幅されたので、これら24のクローンは、M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子のcDNAを有する。クローン番号18を選択して、万能プライマーSp6およびT7を使用して配列した。ILV5遺伝子のcDNAのヌクレオチド配列の比較によって、イントロンの正確な位置を決定することができた。3つのイントロンは、N.クラッサ(N. crassa)イソメロレダクターゼの蛋白質配列とM.グリセア(M. grisea)の翻訳体の蛋白質配列の比較によって予測される位置にある。N.クラッサ(N. crassa)では、前記ILV5遺伝子は、4つのイントロンを有し、それらは、M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子と比較して異なる位置にあり、長さが異なる。

【0056】

c) M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子を使用して得られたすべてのデータから導き出されたM.グリセア(M. grisea)イソメロレダクターゼの蛋白質配列

M.グリセア(M. grisea) ILV5遺伝子の蛋白質配列をこの遺伝子のcDNA配列から導き出した。M.グリセア(M. grisea)、アカバンカビ(N. crassa)およびS.セレビスエ(S. cerevisiae)のイソメロレダクターゼの蛋白質配列の比較は、これら3種のイソメロレダクターゼの非常に強い同一性を示す。実際、M.グリセア(M. grisea)イソメロレダクターゼの配列とN.クラッサ(N. crassa)イソメロレダクターゼの配列の間の同一度は、86%である。M.グリセア(M. grisea)イソメロレダクターゼと酵母菌イソメロレダクターゼの間の同一度は、70%であり、N.クラッサ(N. crassa)イソメロレダクターゼと酵母菌イソメロレダクターゼの間の同一度は、72%である(図1)。N.クラッサ(N. crassa)とM.グリセア(M. grisea)は、非常に類似した真菌種(核菌類)であり、そのことによってこれら二つの種のイソメロレダクターゼの間の高い同一度が説明できる。

【0057】

d) 様々なストレス条件に付したM.グリセア(M. grisea)におけるM.グリセア(M. grisea)イソメロレダクターゼの発現の研究

10

20

30

40

50

様々なストレス条件に付した菌系から発生させたM. グリセア (M. g r i s e a) 全 R N A を抽出して、膜に転移させ、その後、M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子用の相同プローブとハイブリダイズさせた。I L V 5 遺伝子は、構成的に発現される。それ故、c A M P による導入のための高浸透ストレスもしくは窒素系栄養欠乏、熱ショックまたは酸化ストレス中に同じレベルで発現される。しかし、炭素系栄養欠乏中には発現されない。

【実施例 2】

【0058】

M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子の分解

I L V 5 遺伝子の単離および特性付けに次ぐ目的は、病原性能力を試験するためにM. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子の突然変異体を得ることであった。I L V 5 遺伝子を分解するために使用した手法は、インビトロでの転置による挿入突然変異誘発である。

【0059】

2. 1. プラスミド p B C S K + におけるM. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子のサブクローニング

前記 I L V 5 遺伝子のサブクローニングをプラスミド p B C S K + において行い、その後、トランスポゾンに基づく挿入突然変異誘発を行う。I L V 5 遺伝子を含むコスミド 20 / G 6 は、アンピシリンに対する耐性に関する遺伝子を有し、そのため、この挿入突然変異誘発のターゲットとして直接使用することはできない。実際、カナマイシンとアンブリシンの二重選択は、トランスポゾン供与プラスミド (p G P S₃ Hygro (登録商標)) もカナマイシンおよびアンピシリンに対して耐性であるので、トランスポゾンが組み込まれたターゲットプラスミドに対して充分に選択的ではない。そのため、クロラムフェニコールに対する耐性に関する遺伝子を有するプラスミド、プラスミド p B C S K +、に I L V 5 遺伝子をサブクローニングした。ターゲットプラスミドにトランスポゾンが組み込まれたクローン (I L V 5 遺伝子を有する p B C S K +) は、カナマイシンおよびクロラムフェニコールに対する二重の耐性のために、選択することができる。加えて、コスミド挿入体のサイズが、あまりにも大きい (40 kb)。プラスミド p B C S K + にサブクローニングした、I L V 5 遺伝子を含む約 15 kb のフラグメントを選択した。実際、トランスポゾンが I L V 5 遺伝子に組み込まれる確立は、I L V 5 遺伝子を有するフラグメントのサイズを低下させると大きくなる。I L V 5 遺伝子は、長さ約 3 kb であり、トランスポゾンがコスミド (46 kb) 中に存在する遺伝子に組み込まれる確立は、6.5% であるのに対し、プラスミド p B C S K + (18 kb) にサブクローニングした I L V 5 遺伝子にトランスポゾンが組み込まれる確立は、約 3 倍高い、すなわち、約 17% である。I L V 5 遺伝子を有するゲノム DNA フラグメントのサブクローニングは、挿入体の中心にこの遺伝子を配置することによって行った。このタイプの構築体は、相同組換えによるM. グリセア (M. g r i s e a) ゲノムへの突然変異 I L V 5 遺伝子の組み込みを促進する。I L V 5 を有するコスミド 20 / G 6 の領域をマッピングすることによって、I L V 5 遺伝子が比較的よく中心に配置されている 15 kb の C l a I - C l a I フラグメントを選択することが可能になる。実際、I L V 5 遺伝子は、前記ゲノム配列の 5 kb によって 5' 位に、および 5.5 kb によって 3' 位に配列される。C l a I でコスミド 20 / G 6 を消化した後、I L V 5 遺伝子を含む 15 kb のフラグメントをアガロースゲルで分離し、その後、精製して、プラスミド p B C S K + にサブクローニングした。形質転換後に得られた 24 のコロニーを、I L V 5 遺伝子に特異的なプライマー 22 U と 1603 L の対を使用する P C R によって分析した。5 つのクローンが、I L V 5 遺伝子を有する期待サイズ (1.6 kb) のフラグメントを増幅する。I L V 5 遺伝子のインビトロでの転置に基づく挿入突然変異誘発を行うために、クローン番号 19 を選択した。

【0060】

2. 2. M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子のインビトロでの転位に基づ

く挿入突然変異誘発

M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子のインビトロでの転置に基づく挿入突然変異誘発は、クローン番号 19 を使用して、GPS (商標) (New England Biolabs) で行った。プラスミド pGPS₃ Hygro (登録商標) (このトランスプライマー中にカナマイシンおよびヒグロマイシンに対する耐性に関する遺伝子を有する) をトランスポゾン供与体として使用する。I L V 5 遺伝子およびクロラムフェニコールに対する耐性に関する遺伝子を有するプラスミド pBC SK+ は、ターゲットプラスミドに相当する。挿入突然変異誘発を行ったら、熱反応性細菌 DH5 または電気反応性細菌 DH10B を「突然変異誘発混合物」で形質転換する。形質転換後、ターゲットプラスミド pBC SK+ へのトランスポゾンの組み込みがある細菌クローンを、カナマイシンとクロラムフェニコールの両方に対する耐性によって選択する。この二重耐性は、ターゲットプラスミドと無損傷の供与体プラスミドを両方有する細菌クローンに対しても付与されている可能性がある。P1-ScEI での消化による供与体プラスミドの分解によって、この問題を克服することが可能となる。トランスポゾンが M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子に組み込まれているかどうか判定するために、選択した細菌クローンを、I L V 5 遺伝子のコード領域の両側に位置するプライマー 22U と 1603L の対を使用する PCR によって分析する。具体的には、トランスポゾン Tn7 が I L V 5 遺伝子に挿入されると、プライマー 22U と 1603L の対での増幅はない。これら二つのプライマーの間にある DNA フラグメントのサイズが大きすぎて (4.3 kb)、増幅できないからである。このサイズは、M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子 (1.6 kb) のコード領域のサイズと 2.7 kb の Tn7 トランスポゾンのコード領域のサイズの合計に相当する。熱反応性細胞 DH5 の形質転換後、試験した 32 のコロニーのうち、4 つのコロニー (クローン番号 3、4、8 および 18) について、増幅の不在が観察された (12.5%)。従って、これらの細菌クローンには、I L V 5 遺伝子への前記トランスプライマーの挿入がある。電気反応性細胞 DH10B の形質転換後、PCR によって試験した 38 のコロニーのうち、1 つだけ (2.6%) が、増幅の不在を示す (クローン番号 29)。トランスポゾンの各末端に位置する縮重プライマー Tn7L および Tn7R を使用して細菌クローン番号 3、8、18 および 29 を配列して、I L V 5 遺伝子の配列内の Tn7 トランスポゾンの挿入部位の正確な位置を確認した。トランスポゾンは、クローン番号 18 については ATG の前 21 bp、クローン番号 8 については ATG の後 9 bp、クローン番号 3 については ATG の後 809 bp およびクローン番号 29 については ATG の後 1176 bp に組み込まれることとなった。本発明者らは、M. グリセア (M. g r i s e a) の形質転換のためにクローン番号 8 を選択した。実際、このクローンでは、トランスポゾンが、M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子のコード領域の開始点 (ATG の後 + 9 bp) に組み込まれ、その結果、I L V 5 遺伝子の不活性化が生じた。

【0061】

2.3. そのコード領域において分解された M. グリセア (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子での M. グリセア (M. g r i s e a) 株 P1.2 の形質転換
そのコード領域 (ATG の後 9 bp) において分解されたネいもち病菌 (M. g r i s e a) I L V 5 遺伝子を有するクローン番号 8 の挿入体を、Clai 酵素での消化により、プラスミドから再び切り出し、アガロースゲルで精製する。それは、線状化された構築体に該当する。未消化のクローン番号 8 から生じたプラスミド pBC SK+ は、「環状」構築体に該当する。前記線状化構築体 5 µg または前記「環状」構築体 4 µg のいずれかで、M. グリセア (M. g r i s e a) 株 P1.2 プロトプラストの形質転換を行う。形質転換の正の対照は、ヒグロマイシンに対する耐性に関する遺伝子を有するプラスミド pCB1003 を 3 µg 使用して行い、負の対照は、DNA を使用せずに行う。線状化構築体については 62 の形質転換体を得られ、「環状」構築体については 24 の形質転換体を得られる。これら 86 の形質転換体を、120 g/L のヒグロマイシンを補充した完全培地および 120 mg/L または 60 mg/L のヒグロマイシンを補充した最小培地で二次

10

20

30

40

50

培養した。このタイプの二次培養によって、ロイシン、バリンおよびイソロイシンについて栄養要求性であり、それ故、最小培地では成長しない *ilv5⁻* を特定することが可能となる。線状化構築体で得られた 62 のうち 8 の形質転換体 (13%) は、栄養要求性であると考えられ、これに対して、「環状」構築体で得られた 24 のうち 2 つの形質転換体 (8.3%) が栄養要求性であると考えられた。「環状」構築体と比較して、線状化構築体での *ilv5⁻* 突然変異体の良好な獲得効率は、相同組換えが線状化構築体で促進されることによって説明できる。これらの形質転換体を「米粉」培地で二次培養して、それらを孢子にし、その後、その孢子を T N K Y E グルコース完全培地にプレティングし、放置して発芽させて、単一孢子の単離を行う。120 mg / L のヒグロマイシンを補充した T N K Y E グルコース培地で前記単一孢子を二次培養して、前記形質転換体を精製する。栄養要求性形質転換体の特定は、これらの単一孢子由来のこれらのコロニーを、最小培地または 0.3 mM のロイシン、バリンおよびイソロイシンを補充した最小培地で、ならびに T N K Y E グルコース完全培地で二次培養することによって行う。このようにして、遺伝子的に精製された安定な形質転換体を得た。ロイシン、バリンおよびイソロイシンについて栄養要求性の潜在的形質転換体 10 のうち 8 (80%) は、有効に栄養要求性であることがわかった。2 つの非栄養要求性形質転換体は、単一孢子精製前の非選択培地での形質転換体の成長中に大部分の *ilv5⁺* に進化した遺伝的に異なる集団 (*ilv5⁺* および *ilv5⁻*) の混合物に該当したはずである。

10

【実施例 3】

【0062】

20

ロイシン、バリンおよびイソロイシンについて栄養要求性のマグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) *ilv5⁻* 形質転換体の表現型の特性付けならびにそれらの病原性能力の研究

3.1. M. グリセア (*M. grisea*) 形質転換体の成長および発育に対する *ILV5* 遺伝子の分解の影響

様々な培地で *ilv5⁻* 形質転換体の発育を試験した。例えば、硝酸塩最小培地では *ilv5⁻* 形質転換体を成長させることができず、これに対して、0.3 mM のバリン、ロイシンおよびイソロイシンを補充した最小培地ではそれらの成長が可能である。しかし、最小培地 + 0.3 mM のバリン、ロイシンおよびイソロイシンでの *ilv5⁻* 形質転換体の発育は、野生型 M. グリセア (*M. grisea*) 株 P1.2 のものとは異なる。それらの成長は、実際、遅速し、それらの菌糸は、灰色 / 緑色で、低く、扁平で、孢子形成性であり、野生型株のように気生ではない。0.3 mM のイソロイシンおよびバリンを補充した最小培地で得られた結果は、0.3 mM のロイシン、バリンおよびイソロイシンを補充した最小培地で得られたものと同じであるので、ロイシンの存在は、*ilv5⁻* 形質転換体の成長には必要でない。0.3 mM のバリンおよびイソロイシンを補充した最小培地での *ilv5⁻* 形質転換体の発育は、最終濃度 1 mM のバリンおよびイソロイシンをその最小培地に補充することによって改善することができる。完全培地では、*ilv5⁻* 形質転換体は、野生型株に比較的類似した表現型を示し、それらの菌糸は、灰色 / 白色であり、多少気生 (野生型株よりは劣った気生) である。1 mg / L のパントテイン (ロイシンの生合成に必要なパントテン酸塩の酸化形) を最小培地 + 0.3 mM のバリンおよびイソロイシンに添加しても、*ilv5⁻* 形質転換体の発育は改善されない。*ilv5⁻* 形質転換体の孢子形成は、「米粉」寒天培地では野生型と比較して遅く、10 倍少ない。最終濃度 1 mM のバリンおよびイソロイシンをその「米粉」寒天培地に添加すると、*ilv5⁻* 形質転換体の孢子形成は、野生型株とほぼ同じである。

30

40

【0063】

3.2. 人工的な生残条件下でオオムギの葉を切り刻むことに基づく *ilv5⁻* 栄養要求突然変異体の病原性能力についての試験

M. グリセア (*M. grisea*) *ilv5⁻* 形質転換体の病原性能力の試験は、試験形質転換体孢子浮遊液のブロックを、切り刻んだオオムギの葉に綿棒で塗布するか、切り刻んだオオムギの葉の上に堆積させることによって行った。ある接種は、湿潤 Q チップを使

50

用して行われ、この湿潤Qチップは、胞子の浮遊液（一般に、胞子数 $3 \times 10^4 / \text{mL}$ ）に浸漬されたものであり、また、人工的な生残条件（水中に寒天1%の培地、 $2 \text{ mg} / \text{カイネチン} 1 \text{ L}$ ）下でのオオムギの葉の断片に綿棒で塗布するために用いられるものである。他のタイプの接種は、オオムギの葉の表面の異なる場所3箇所に $30 \mu\text{L}$ の液滴を堆積させることに存する。26 で5日から9日間インキュベートした後、症状が観察される。

【0064】

これらの突然変異体によって生じる病変は、野生型株についてのものよりサイズが小さく、数が75%少ない（下の表1参照）。

【0065】

表1：人工的な生残条件下でのオオムギの葉に対する $i1v5^-$ 形質転換体の病原性能力についての試験

接種後5日目（L41およびL21）および接種後7日目（L57、L64、L71、L85）にオオムギの葉の上のM.グリセア（M. grisea）によって、または綿棒塗布試験において生じた病変の数。

【0066】

A) 胞子数 $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ で調製した形質転換体の胞子の浮遊液

【0067】

【表1】

形質転換体	葉1枚あたりの病変の平均数
L57 ($i1v5^+$)	4
L64 ($i1v5^+$)	4
L71 ($i1v5^-$)	1 (−80%)
L85 ($i1v5^-$)	1 (−80%)

【0068】

B) 胞子数 $10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ で調製した形質転換体の胞子の浮遊液

【0069】

【表2】

形質転換体	葉1枚あたりの病変の平均数
L41 ($i1v5^+$)	10
L21 ($i1v5^-$)	2 (−80%)

【0070】

$i1v5^-$ 突然変異体によって生じる病変は、非定型的でもあり、それらは、より遅く現れる。それらは、野生型株での4日から9日に対し、6日から9日間、26 でインキュベートした後、現れる（下の表2参照）。

【0071】

$i1v5^-$ 形質転換体によって生じる幾つかの病変は、オオムギの葉の端に現れる（表2）。葉の端の損傷は、真菌の浸透を促進しうるので、これらの病変を説明することができる。それ故、植物全体の病原性能力についての試験を行って、まず、 $i1v5^-$ 形質転換体の病原性能力の低下の存在を確認し、次に、 $i1v5^-$ 突然変異体の病理発生 of 低下および $i1v5^-$ 真菌の浸透のための損傷の重要性を統計的に予測した。

【0072】

表 2：人工的な生残条件下でオオムギの葉の上の M. グリセア (M. g r i s e a) 形質転換体によって生じた症状の進展

【 0 0 7 3 】

【 表 3 】

形質転換体	滴下試験		綿棒塗布試験	
	4 日 目	9 日 目	4 日 目	9 日 目
L 7 1 (i l v 5 ⁻)	病変不在	非定型病変	病変不在	病変不在 (葉の端を除く)
L 7 3 (i l v 5 ⁻)	病変不在	幾つかのまばらな病変	病変不在	病変不在
L 8 5 (i l v 5 ⁻)	病変 1 つ	非定型病変	まばらな病変	まばらな非定型病変
L 6 3 (i l v 5 ⁻)	病変不在	非定型病変	病変不在	病変不在
L 6 4 (i l v 5 ⁺)	胞子形成性病変	灰色胞子形成性病変	幾つかの胞子形成性病変	灰色胞子形成性病変

10

【 0 0 7 4 】

3 . 3 . 植物全体に対する i l v 5⁻ 栄養要求突然変異体の病原性能力についての試験
i l v 5⁻ 形質転換体の病原性能力についての試験は、これらの形質転換体の胞子の浮遊液 (胞子数 10^4 および $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$) をオオムギの葉に噴霧することによって行った。最終濃度 0 . 5 % (重量 / 容積) のゼラチンをこの胞子浮遊液に添加して、葉の表面へ胞子の良好な付着を可能にする。前記植物を、接種後一晩、多湿チャンバ内に置く。症状は、オオムギにとっての周囲温度で 5 日から 1 0 日間インキュベートした後、一般に観察される。

20

【 0 0 7 5 】

i l v 5⁺ 形質転換体と比較して、オオムギのいもち病の症状の顕著な減少が、i l v 5⁻ 形質転換体において観察される。周囲温度で 1 0 日間インキュベートした後、葉 (約 1 2 c m) 1 枚あたりの病変の数は、i l v 5⁺ 形質転換体 L 5 7 では平均 3 7 であるのに対し、i l v 5⁻ 形質転換体 (L 8 7、L 7 4 および C 2 4) では 6 から 9 である (表 3 参照) 。従って、i l v 5⁻ 突然変異体によって生じた病変の数は、野生型株で得られるものと比較して、8 0 % 減少される。加えて、病変は、i l v 5⁺ 形質転換体についてより、i l v 5⁻ 突然変異体についてのほうが 2 倍小さく (13 mm^2 に対して 6 mm^2) 、これらの病変は、二倍遅く現れる。具体的には、病変の数は、実験の 5 日目と 1 0 日目の間で i l v 5⁻ 突然変異体については二倍になり、これに対して、野生型では同じままだった。人工的な生残条件下で i l v 5⁻ 形質転換体によって生じるオオムギの葉の端での一定の病変の出現は、真菌の浸透が、この病理発生試験中にオオムギの葉に加えられた損傷によって促進されたことを示唆していた。しかし、i l v 5⁻ 形質転換体を用いて植物全体に対して行った病理発生試験の結果は、人工的な生残条件下で大麦の葉を用いた場合と同じ程度 (8 0 %) のこれらの突然変異体の病原性能力の低下を示している。

30

40

【 0 0 7 6 】

表 3：植物全体 (オオムギ) に対する i l v 5⁻ 形質転換体の病原性能力についての試験
その病原性能力を試験したい形質転換体の胞子の浮遊液 (胞子数 $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$) を噴霧することによって、オオムギ植物に対する接種を行った。前記植物を、接種後一晩、多湿チャンバ内に置いた。接種後、1 0 日間、周囲温度で症状を観察した。形質転換体 L 5 7 (i l v 5⁺) について得られた値を基準にして計算した葉 1 枚あたりの病変の数の減少率およびサイズの低下率を、カッコ内に示す。

【 0 0 7 7 】

【 表 4 】

形質転換体	12cmのオオムギの葉 1枚あたりの病変の平均数	平均病変サイズ (単位: mm ²)
L57 (ilv5 ⁺)	37±9	13
L87 (ilv5 ⁻)	9±2 (-75%)	6 (-50%)
C24 (ilv5 ⁻)	6±2 (-83%)	4 (-70%)
L74 (ilv5 ⁻)	8±3 (-80%)	6 (-50%)

10

【実施例4】

【0078】

アセトヒドロキシイソメロダクターゼ阻害剤の殺真菌効果

4.1. 植物病原性真菌マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) に対するアセトヒドロキシイソメロダクターゼ阻害剤の殺真菌効果

植物病原性真菌 *M. grisea* に対する阻害剤ジメチルホスフィノイル-2-ヒドロキシアセテートおよび *N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメートの殺真菌効果を、様々な濃度の阻害剤の存在下で7日間にわたってこの真菌の成長び進展を追跡することにより、試験した。例えば、所定の培地(硝酸塩最小培地(MM); MM+0.3mMのロイシン、バリンおよびイソロイシン; TNYEグルコース完全培地(MC); MC+0.3mMのロイシン、バリンおよびイソロイシン)に、孢子数 10^5 /mLの最終濃度で *M. grisea* 株P1.2の孢子の浮遊液を接種する。試験生成物、*N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメート(pH5)、の一定の範囲の希釈液を、前記生成物が100倍濃縮されるように、水で調製する。接種した培地200μLを96ウエルのマイクロプレートに分配し、それらのウエルに100倍濃縮物2μLを添加する。*N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメートは、最終用量3、1、0.3、0.1、ならびに最小培地中0.03μM、ならびに完全培地中0.3μMで試験する。そのマイクロプレートを周囲温度でインキュベートし、このマイクロプレートの630nmでの光学密度を読みとることによって、これらの様々な培養条件下、時間0(試験開始)の時点ならびに3日目、4日目、5日目、6日目および7日目の前記細菌の成長を追跡することが可能となる。

20

30

【0079】

この試験は、野生型 *M. grisea* 株P1.2の孢子の浮遊液を様々な培地に接種することによって行った。第一の実験は、硝酸塩最小培地(MM)中で行い、様々な濃度の阻害剤を試験した。それは、MM培地中での成長の有意な阻害の出現が2mMのジメチルホスフィノイル-2-ヒドロキシアセテートの存在下で観察される前、成長の6日目および7日目であった。阻害剤を含まない対照のものと比較して、実際、成長を50%低下させる。阻害剤 *N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメート(0.3μMから1μM)の存在下、3日目から、約50%の真菌成長阻害が、MM培地では観察される。ジメチルホスフィノイル-2-ヒドロキシアセテートと比較して *N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメートによる *M. grisea* 成長の阻害が大きかったことから、本発明者らは、阻害剤のさらに徹底した研究を行うこととなった。

40

【0080】

真菌 *M. grisea* についての成長アッセイを、阻害剤 *N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメート(0.03μMから3μMの範囲の濃度で)の存在下、様々な培地(MM、および0.3mMのロイシン、バリンおよびイソロイシンを補充したMM)中で、7日間にわたって行った。最小培地では、*N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメートは、*M. grisea* の成長を強く阻害する。*N*-ヒドロキシ-*N*-イソプロピルオキサメート(0.3μMから)による成長の阻害は、成長の3日目から観察され、その後の日々も同様のままである(図2)。そのため、本発明者

50

らは、成長の5日目に、 ID_{80} （真菌成長の阻害が80%になるような阻害剤濃度）および ID_{50} （真菌成長の阻害が50%になるような阻害剤濃度）を計算することを選択した。例えば、真菌M.グリセア（*M. grisea*）の成長は、 $1\mu M$ のN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメート濃度（ ID_{80} ）で、未処理の対照と比較して80%阻害される。 $0.3\mu M$ のN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメート濃度（ ID_{50} ）は、真菌成長を50%阻害する（表4）。

【0081】

表4：真菌M.グリセア（*M. grisea*）の成長に対する阻害剤N-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートの効果の研究

【0082】

10

【表5】

N-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメート (単位： μM)	0 (対照)	0.03	0.1	0.3	1	3
最小培地	100	92	89	72	56	13
MM+ILV	100	77.5	83.5	81	72.5	71.5

【0083】

20

病原性真菌M.グリセア（*M. grisea*）に対する阻害剤N-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートの効果は、様々な濃度の阻害剤の存在下、様々な培地中、7日間にわたってこの真菌の成長の進展を追跡することによって、試験した。表に与えた値は、2つの実験から成長5日目に得られた真菌M.グリセア（*M. grisea*）の平均成長率に相当する。対照（M.グリセア（*M. grisea*）の野生型菌株）は、成長率100%に相当する。 $200\mu L$ の培地、最長培地（MM）または最小培地+ $0.3mM$ のロイシン、バリンおよびイソロイシン（MM+ILV）、に、孢子数 $10^5 \cdot mL^{-1}$ の最終濃度でM.グリセア（*M. grisea*）株P1.2の孢子の浮遊液を接種した。そのマイクロプレート周囲温度でインキュベートし、 $630nm$ （ OD_{630} ）での光学密度を0、3、4、5、6および7日目（D0、D3、D4、D5、D6およびD7）に測定した。

30

【0084】

真菌M.グリセア（*M. grisea*）の成長に対するN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートの毒性は、使用されるN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートの濃度が何であれ、最小培地に $0.3mM$ のロイシン、バリンおよびイソロイシンを補充することによって上昇する。最小培地にバリン、ロイシンおよびイソロイシンを添加することによるN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメート毒性のこの上昇は、この毒性が、そのイソメロレダクターゼを阻害することによるこれらのアミノ酸の生合成経路の特異的な阻害に起因することを示している。

【0085】

40

実際、M.グリセア（*M. grisea*）イソメロレダクターゼに対して特異的に作用するN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートは、非常に低い濃度でM.グリセア（*M. grisea*）の成長を強く阻害する。イソメロレダクターゼおよび阻害剤N-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートは、非常に良いターゲット/殺真菌剤のカップルであることが判明した。

【0086】

本発明者らは、阻害剤N-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートがM.グリセア（*M. grisea*）孢子の発芽に影響を及ぼすかどうかを判定することにも努めた。0日目および2日目、最小培地中、1および $3\mu M$ のN-ヒドロキシ-N-イソプロピルオキサメートの存在下で以前に行った実験中のM.グリセア（*M. grisea*）孢子の顕微

50

鏡観察は、胞子の発芽が阻止されないことを示した。高濃度ではN - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートが胞子の発芽を阻止できるのかどうかを判定するために、追加試験を行った。例えば、10 mMでのN - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートは、24時間および72時間の時点で、水においても、最小培地においても、M . グリセア (M . grisea) の胞子の発芽を阻害しない。N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートによるM . グリセア (M . grisea) の成長の阻害は、それ自体、発芽後、菌系の成長中にのみ現れる。従って、胞子中に存在する貯蔵アミノ酸 (バリンおよびイソロイシン) の使用によって、最初は、発芽することができると考えられる。貯蔵アミノ酸の限界および多少速いその枯渇は、M . グリセア (M . grisea) の成長を制限する因子としての役割を果たす。

10

【0087】

4 . 2 . 他の真菌に対するアセトヒドロキシイソメロダクターゼ阻害剤の殺真菌効果
 ピシウム・ウルチマム (Pythium ultimum)、ボトリチス・シネレア (Botrytis cinerea)、ウスチラゴ・ヌダ (Ustilago nuda) およびミコスフェレラ・グラミニコラ (Mycosphaerella grainicola) などの他の真菌腫に関するIpOHAの毒性を、M . グリセア (M . grisea) と同じ条件 (96ウエルのマイクロプレート内、液体最小培地中での培養) 下で測定した。ボトリチス・シネレア (Botrytis cinerea) の成長は、使用した最高濃度のIpOHA (30 μ M) による影響を受けず、このことは、この種が、IpOHAに対して耐性であることを示している。ウスチラゴ・ヌダ (Ustilago nuda) およびピシウム・ウルチマム (Pythium ultimum) の成長は、10 μ Mを始点としてIpOHAによって阻害される。ミコスフェレラ・グラミニコラ (Mycosphaerella grainicola) の成長は、0 . 3 μ Mから阻害される (表5)。この最小培地 (MM - liq) にイソロイシン、ロイシンおよびバリン (1 mM) を補充すると、IpOHAの毒性は、すべての感受性真菌種について上昇する。一方、0 . 3 mMの濃度では、阻害は、30 μ M未満のIpOHA濃度についてのみ、ウスチラゴ・ヌダ (Ustilago nuda) において向上する。

20

【0088】

表5 : 様々な真菌種についてのIpOHAの毒性

【0089】

30

【表6】

	ID ₈₀	ID ₅₀	IpOHAに対する感受性のレベル
ボトリチス・シネレア (Botrytis cinerea)	/	/	耐性
ピシウム・ウルチマム (Pythium ultimum)	30	10	中程度感受性
ウスチラゴ・ヌダ (Ustilago nuda)	30	3	中程度感受性
ミコスフェレラ・グラミニコラ (Mycosphaerella grainicola)	3	1	感受性
マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea)	3	1	感受性

40

【0090】

ID₅₀ : 真菌成長を50%阻害する濃度

ID₈₀ : 真菌成長を80%阻害する濃度

【実施例5】

【0091】

S . セレビシエ (S . cerevisiae) のアセトキシイソメロダクターゼの生化学的研究

トランジットペプチドを含まない酵母菌ILV5遺伝子のコドン配列をE . コリ (E . coli) において過発現させて、大量の酵素を得て、それらの生化学的研究、特に、それらの構造研究を可能した。

50

【0092】

前記酵母菌イソメロレダクターゼを研究するために利用した戦略は、次のとおりである：最初に、酵母菌イソメロレダクターゼ I L V 5 遺伝子を、トランジットペプチドをコードしている蛋白質を用いない P C R によって増幅した。次に、その P C R 反応生成物を I P T G 誘導性発現ベクター p E T にクローニングした。次に、そのイソメロレダクターゼを大腸菌において過発現させて、精製し、その後、生化学的特性を研究した。

【0093】

5. 1. 成熟蛋白質をコードしている酵母菌イソメロレダクターゼ I L V 5 遺伝子の部分の P C R 増幅およびクローニング

酵母菌イソメロレダクターゼをその細胞区画、ミトコンドリウム、に合わせることができるシグナルペプチドは、その蛋白質がそのミトコンドリウムに浸透した時、切断される。そのため、本発明者らは、トランジットペプチドをコードしている領域を含まない I L V 5 遺伝子をクローニングして、E. コリにおいてその成熟ペプチドに対応する酵母菌イソメロレダクターゼを過発現させることを選択した。

10

【0094】

トランジットペプチドの末端と翻訳停止 S T O P コドンの間に位置する酵母菌 I L V 5 遺伝子の領域を、プライマー対 (1 ' - 3 ') および (2 ' - 3 ') で、S. セレビシエ (S. cerevisiae) のゲノム DNA から P C R によって増幅した。プライマー対 (1 ' - 3 ') および (2 ' - 3 ') で増幅した DNA フラグメントのサイズは、それぞれ、1079 bp および 1124 bp である。これらの DNA フラグメントを、電気泳動によって分離した後、精製し、その後、消化し、S a l I / N c o I においてベクター P E T - 23 d にクローニングした。酵素 N c o I および S a l I でのクローニングベクターと P C R 反応生成物の二重消化によって、酵母菌 I L V 5 遺伝子をベクター P E T - 23 d に正しい配向でクローニングすることが、実際、可能である。アンピシリンに対する耐性に関する遺伝子を有するプラスミド p E T - 23 d (T e b u) を、E. コリにおいて大量の酵母菌イソメロレダクターゼを生産するための誘導性発現ベクターとして使用する。このタイプのベクターは、E. coli の RNA ポリメラーゼによってではなく、T7 RNA ポリメラーゼによって認識される T7 ファージプロモータを有する。クローン化蛋白質の生産は、菌株 B L 21 p L y s S (クロラムフェニコールに対して耐性) の I P T G 導入後に発生する。この菌株において、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は、I P T G 誘導性 l a c プロモータの支配下にある。S. セレビシエ (S. cerevisiae) I L V 5 遺伝子を有する、プラスミド p E T - 23 d で形質転換された菌株 B L 21 p L y s S は、B L 21 p L y s S - p E T - 23 d - イソメロレダクターゼと呼ばれる。構築体番号 1 は、プライマー (1 ' - 3 ') で増幅されたフラグメントのクローニングに対応し、構築体番号 2 は、プライマー (2 ' - 3 ') で増幅されたフラグメントのクローニングに対応する。構築体番号 1 での D H 5 細胞の形質転換後に得られた 12 のクローンおよび構築体番号 2 で形質転換された 6 つのクロンの S a l I / N c o I 二重消化によって、ベクター p E T にクローニングされたフラグメントを再び切り出し、従って、様々なクローンにおいてこれら二つの構築体のうちの一方の存在を証明することが可能となる。これらの細菌クローンについての消化プロファイルの分析は、それらが、対応する構築体をすべて有することを示した。

20

30

40

【0095】

二つのクローンを選択した：クローン P E T 1 - 4 (構築体番号 1) およびクローン P E T 2 - 1 (構築体番号 2)。それらを使用して B L 21 p L y s S 細胞を形質転換して、E. コリにおいて酵母菌イソメロレダクターゼを過剰生産させた。

【0096】

5. 2. E. コリにおいて過剰生産された酵母菌イソメロレダクターゼの精製
酵母菌イソメロレダクターゼの「短」形 (構築体番号 1) および「長」形 (構築体番号 2) の過発現を、E. コリにおいて I P T G で誘導した。トランジットペプチドをコードしている領域を含まない酵母菌 I L V 5 遺伝子を含有するプラスミド p E T 23 - d で形

50

質転換し菌株 B L 2 1 p L y s S を、約 0 . 6 の O D₆₀₀ と同等の密度が得られるまで、カルベニシリン (1 0 0 m g / L) およびクロラムフェニコール (3 0 m g / L) を補充した L B 培地中で振盪しながら、28℃で培養する。その後、最終濃度 0 . 4 m M で I P T G を添加し、その細菌を約 1 5 時間振盪しながら 28℃の培地中に放置する。この細菌培養物を遠心分離 (3 0 分、4 5 0 0 r p m) し、細菌のペレットを 1 5 m L のバッファ (1 0 m M の K H₂ - K₂ P O₄ (p H 7 . 5)、1 m M の E D T A、1 m M の D D T およびプロテアーゼ阻害剤 : 1 m M のベンズアミジン H C l、5 m M のアミノカプロン酸) に再び浮遊させ、V i b r a - c e l l d i s r u p t o r (S o n i c s a n d M a t e r i a l s , D a n b u r y , C T , U . S . A .) を使用し、15 分間、パワー 4、全溶解時間の 40 %、で超音波処理する。その細胞抽出物を遠心分離 (2 0 分、1 5 0 0 0 r p m) し、その後、可溶性蛋白質を含有する上清を - 8 0℃で保存する。

10

【 0 0 9 7 】

アクリルアミドゲルでの全蛋白質画分および可溶性蛋白質画分の分析は、「短」および「長」形の酵母菌イソメロレダクターゼが、可溶性蛋白質画分に存在するし、それらが、これらの蛋白質の約 25 % から 30 % を代表することを示した。酵母菌イソメロレダクターゼトランジットペプチド分解部位に関して最も有望な位置は、この酵素の蛋白質配列のアミノ酸 47 と 48 の間である (P e t e r s e n , G . L . ら , N A R 14 , 24 : 9631 - 9650 , 1986) ので、本発明者らは、短形の酵母菌イソメロレダクターゼを用いて研究を継続することを選択した。

【 0 0 9 8 】

従って、短形のイソメロレダクターゼの精製は、可溶性蛋白質画分を使用し、先ず、アニオン交換カラム (Q - S e p h a r o s e) 用い、次にパーミエーションカラム (S u p e r d e x 75) を用いて、二段階で行った。酵母菌イソメロレダクターゼ (粗製抽出物) を含有する可溶性蛋白質抽出物 (15 . 5 m L ; 227 . 8 m g の蛋白質) を、10 m M の K H₂ - K₂ P O₄ バッファ / 1 m M の E D T A / 1 m M の D D T で予め平衡させた、P h a r m a c i a F P L C システムに連結されたアニオン交換カラム、H i L o a d 16 / 10 Q - S e p h a r o s e (P h a r m a c i a) にかけた。その酵素を、このバッファ 78 m L で溶離する (流量 = 1 m L / 分、画分サイズ = 3 m L)。酵母菌イソメロレダクターゼを含有するクロマトグラフ画分を、m a c r o s e p - 10 u n i t (f i l t r o n) において 5500 r p m で遠心分離することにより、1 . 6 m L に濃縮する。その後、この抽出物 (27 . 7 m g) を、25 m M の H e p e s - K O H で予め平衡させた、P h a r m a c i a F P L C システムに連結された H i L o a d 16 / 60 S u p e r d x 75 c o l u m n (P h a r m a c i a) にかける。その酵素を、この同じバッファ 58 m L で溶離する (流量 = 1 m L / 分、画分サイズ = 1 m L)。酵母菌イソメロレダクターゼを含有するクロマトグラフ画分 (18 . 99 m g) を、m i c r o s e p (f i l t r o n) において 5500 r p m で遠心分離することにより、9 . 7 m g / m L に濃縮し、- 8 0℃で保存する。

20

30

【 0 0 9 9 】

Q - S e p h a r o s e カラムに可溶性蛋白質画分 (約 230 m g) を注入した後、酵母菌イソメロレダクターゼを、10 m M の K H₂ - K₂ P O₄ バッファ / 1 m M の E D T A / 1 m M の D D T で希釈する。予備実験が、この酵素は前記カラムに保持されないことを示したので、漸増濃度傾斜のリン酸バッファの作用によってこの酵素を溶離する必要は、実際ない。この第一精製段階の後、約 30 g の蛋白質を回収した。活性に関して、精製からの収率は、55 % である (表 6)。

40

【 0 1 0 0 】

表 6 : E . コリ中で過発現された酵母菌イソメロレダクターゼを精製するための段階

【 0 1 0 1 】

【 表 7 】

精製段階	蛋白質の量		全活性 (酸化した NADPH の $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)	非活性(全活性/(蛋白質の $\text{mg})^{-1}$)		収率 (単位: %)
	ブラッド フォード	205		ブラッド フォード	205	
可溶性蛋白質の 粗製抽出物	227.82	n.d.	134.16	0.59	n.d.	100
Q-Sepharose の 画分プール	27.72	14.34	73.22	2.64	5.11	54.58
Superdex75 の 画分プール	18.99	8.4	45.85	2.4	5.46	34.18

10

【0102】

活性は、反応培地(50 mMのHepesナトリウム(pH 7.5)、10 mMの MgCl_2 、250 μM のNADPHおよび0.48 mMのAHB)中で判定した。

【0103】

ブラッドフォード法(Bradford)に従って、または205 nmでの吸収を測定すること(205)によって、蛋白質を検定した。n.d. = 判定不能

【0104】

アクリルアミドゲルでのQ-Sepharose画分プールの分析は、この第一精製段階後、その酵素が実質的に純粋であることを示す。そのQ-Sepharose画分プールをゲル濾過用カラムに注入し、酵母菌イソメロダクターゼを25 mMのHepes-KOHバッファで溶離する。この第二精製段階後、約20 gの純粋な蛋白質が回収される。酵母菌イソメロダクターゼを精製するためのこれら二つの段階からの最終収率は、約34%である。

20

【0105】

5.3.E. コリにおいて過剰生産された酵母菌イソメロダクターゼの動力学的特性の研究

酵母菌イソメロダクターゼについての動力学的パラメータは、マグネシウム、NADPHおよびAHBまたはAL基質についての飽和条件下、分光光度計で酵素反応の進展を追跡することによって決定した。すべての酵素活性測定は、25 で、最終量1 mLのHepesナトリウムバッファ(50 mM、pH 7.5)、10 mMの MgCl_2 および250 μM のNADPHを収容している、光路1 cmの石英キュベットで行った。酵素反応は、0.48 mMのAHBまたはALの添加によって開始した。この反応の進展を340 nmでのNADPHの吸収の低下によって追跡した。

30

【0106】

5.3.1. 精製組換え酵母菌イソメロダクターゼの活性に最適なpHの判定
酵母菌イソメロダクターゼに関する動力学的測定の実施に最適な条件を決定するために、様々なpHのバッファ中で精製酵素の活性を測定することによって、この酵素の活性に最適なpHを判定した。複数の研究によって、植物イソメロダクターゼの活性に最適なpHは、8.2であることが証明されていたが、酵母菌イソメロダクターゼの活性に最適なpHは、7.5である。イソメロダクターゼ活性に最適なpHに関する植物と酵母菌の間のこの違いは、これら二つの酵素の細胞の位置によって説明される。植物イソメロダクターゼは、葉緑体(このpHは、光を受けて8.2である)に位置し、これに対して、酵母菌イソメロダクターゼは、ミトコンドリウム(このpHは、7.5である)に位置する。従って、イソメロダクターゼの活性に最適なpHは、それらが見出される細胞環境によく適するものである。

40

【0107】

5.3.2. 精製された組換え酵母菌イソメロダクターゼについての動力学的パラメー

50

タの決定

様々なリガンドに対する酵母菌イソメロレダクターゼの親和性を研究した。

【0108】

a) 比活性

AHBおよびAL基質に対する酵母菌イソメロレダクターゼの比活性は、それぞれ、6および $1 \mu\text{mol}$ の酸化NADPH・(分) $^{-1}$ ・(蛋白質のmg) $^{-1}$ である。従って、AHB基質の存在下での酵素反応の最大速度(V_m)の、アセト乳酸基質の存在下での酵素反応の最大速度(V_m)に対する比率は、酵母菌酵素については、植物酵素と比較して変わらない($V_m \text{ AHB} / V_m \text{ AL} = 6$)。さらに、AHBおよびAL基質に対する植物イソメロレダクターゼの比活性は、それぞれ、6および $1 \mu\text{mol}$ の酸化NADPH・(分) $^{-1}$ ・(蛋白質のmg) $^{-1}$ である。

10

【0109】

b) 補助因子NADPHおよびNADHに対する親和性

NADPHに対する酵母菌イソメロレダクターゼの親和性は、非常に高い(図3)。実際、このコファクターについて $1.6 \mu\text{M}$ の K_m が測定された。この K_m は、植物酵素について測定されたもの($K_m = 5 \mu\text{M}$)に比較的類似している。精製酵母菌イソメロレダクターゼについて得られた $K_m \text{ NADPH}$ 値は、不完全精製酵母菌酵素について得られた値($K_m < 2.5 \mu\text{M}$; Hawkesら, 1989)と一貫性がある。しかし、非常に低い親和性(AHBおよび Mg^{2+} の存在下、 $K_m \text{ NADH} = 645 \mu\text{M}$; Dumasら, Biochem. J., 288: 865-874, 1992)で、NADHを使用することができ植物酵素とは異なり、酵母菌酵素は、NADHを使用することができないようである。AHB基質およびマグネシウムについての飽和条件下、NADH($300 \mu\text{M}$)の存在下では、いかなる酵素活性も検出されなかった。植物イソメロレダクターゼのものよりいっそう低い、そのNADHに対する親和性のためである。酵母菌イソメロレダクターゼは、植物酵素よりさらにいっそう著しい特異性で水素供与体としてNADPHを使用すると考えられる。

20

【0110】

c) AHBおよびAL基質に対する親和性

AHB基質に対する酵母菌イソメロレダクターゼの親和性(ラセミ形では $K_m = 104 \mu\text{M}$)は、植物イソメロレダクターゼのものより約5倍低いのにに対し、AL基質に対する酵母菌イソメロレダクターゼの親和性(ラセミ形では $K_m = 266 \mu\text{M}$)は、植物イソメロレダクターゼのものより約10倍低い(図4)。これらの K_m 値は、N. クラッサ(N. crassa)の不完全精製酵素について得られたものにかかなり近い。具体的には、N. クラッサ(N. crassa)イソメロレダクターゼについての $K_m \text{ AHB}$ 値および $K_m \text{ AL}$ 値は、それぞれ、 $160 \mu\text{M}$ および $320 \mu\text{M}$ である。

30

【0111】

酵母菌イソメロレダクターゼと植物イソメロレダクターゼの間の生化学的特性の最も注目すべき違いは、マグネシウムに対するこの酵素の親和性である。

【0112】

d) マグネシウムに対する親和性

酵母菌イソメロレダクターゼの親和性($K_m = 968 \mu\text{M}$)は、植物酵素のもの($K_m = \text{約} 5 \mu\text{M}$)より実質的に200倍低い。図5を参照。マグネシウムに対する酵母菌イソメロレダクターゼのこの低い親和性は、真菌イソメロレダクターゼの特徴である。実際、N. クラッサ(N. crassa)イソメロレダクターゼに関して行われた研究により、この酵素がNADPHおよびAHB基質の存在下で $580 \mu\text{M}$ の K_m マグネシウムを有することが示されている(Kritaniら, J. Biological Chemistry, 241: 2047-2051, 1965)。酵母菌、N. クラッサ(N. crassa)および植物イソメロレダクターゼの主配列の比較は、これら三つの酵素の間の主な違いが、植物酵素の二つのモノマー間の相互作用に関わる140のアミノ酸配列の真菌蛋白質における不在であることを示した。しかし、植物酵素における Mg^{2+} イオンに結合する

40

50

ことが知られている二つのドメインが、酵母菌酵素には存在する。前記 140 のアミノ酸二量化領域における 7 つのアミノ酸を削除することによって得られた植物イソメロレダクターゼの単量体型突然変異体の研究によって、この酵素が、この酵素の野生型形よりずっと低いマグネシウムに対する親和性を示すことが証明された (We s s e l ら, B i o c h e m i s t r y, 37: 12753 - 12760, 1998)。従って、植物イソメロレダクターゼの四次構造は、植物酵素の活性部位およびマグネシウムに対する高親和性部位の安定化に一定の役割を果たすと考えられる。それ故、酵母菌イソメロレダクターゼは、二つの Mg^{2+} イオン結合ドメインを明らかに有するが、酵母菌酵素におけるこの 140 のアミノ酸領域の配列の不在は、植物酵素のものとはおそらく異なるこの酵素の活性部位の空間構成によって、マグネシウムに対する酵母菌イソメロレダクターゼの、より低い親和性を説明することができる。酵母菌イソメロレダクターゼのマグネシウム結合部位は、このカチオンに対してずっと低い親和性を有するが、NADPH に対する酵母菌酵素の親和性は、植物酵素のものと類似している。従って、酵母菌イソメロレダクターゼの立体配座は、NADPH の結合に関わるアミノ末端ドメインが、植物酵素のものに比較的類似しているようなものであり、ならびに二つのマグネシウム原子の結合および基質の結合に責任を負うカルボキシ末端ドメインが、植物酵素のものとは異なるようなものであると考えられる。結晶化による酵母イソメロレダクターゼの四次構造の知識によって、 Mg^{2+} イオンに対するこの低い親和性を説明することが可能となる。

10

【0113】

5.4. 酵母菌イソメロレダクターゼに対する阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの効果の研究

20

5.4.1. 酵母菌イソメロレダクターゼに対する阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの結合の化学量論の研究

阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの結合の化学量論の研究は、様々な量の酵素 (0.1 nmol から 0.4 nmol) を、最終量 10 μ L の 25 nmol の NADPH および 0.25 μ mol の $MgCl_2$ を含有する一定量の阻害剤と共に 20 分間インキュベートすることによって行った。この反応は、10 mM の $MgCl_2$ を含有する 50 mM の H e p e s ナトリウムバッファ (pH 7.5) 中 0.48 mM の AHB を添加することによって、開始さ

30

【0114】

0.1 nmol のジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの存在下、酵素活性は、0.09 nmol より多い酵素量でのみ検出される。同様に、0.1 nmol の N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート存在下、酵素活性は、0.1 nmol より多い酵素量でのみ検出される (図 6)。加えて、これら二つの阻害剤については、酵素が反応培地中の阻害剤に対して過剰に存在する時、酵素活性が、阻害剤を含有しない対照のものと並行して増加する。従って、N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートは、酵母菌イソメロレダクターゼに対して不可逆的阻害剤として作用すると考えられる。実際、不可逆的阻害の場合、低量の酵素の存在下ですべての酵素が阻害剤と複合する。反応培地中にはもはやいずれの遊離酵素も存在しないので、その時、酵素活性はゼロになる。反応培地中に存在する酵素の量が、阻害剤の量より多い時には、その培地中の過剰な遊離酵素は、阻害剤を含有しない対照のような挙動をとる (対照に対して平行な直線)。さらに、0.1 nmol の阻害剤 (N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートまたはジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテート) が、0.1 nmol の酵素を完全に阻害するために必要であり、従って、酵母菌イソメロレダクターゼに対する阻害剤の結合の化学量論比は、酵素 1 mol あたり阻害剤 1 mol である。

40

【0115】

5.4.2. 酵母菌イソメロレダクターゼに対する阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロ

50

ピロオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの結合速度の研究

分光光度計において 340 nm での NADPH の吸収の低下を測定することにより、酵母菌イソメロダクターゼに対する阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの効果を経時的に追跡した。各測定は、MgCl₂ (10 mM) および NADPH (0.25 mM) についての飽和条件下、6 分間、所定濃度の阻害剤 (N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート = 15 μM またはジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセレート = 10 μM) および酵素 (110 nM) の存在下で行なう。使用した AHB 基質の濃度は、250 μM から 2375 μM の範囲である。酵母菌イソメロダクターゼに対する阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートの結合の化学量論比の研究は、これらの阻害剤が不可逆的阻害剤のような挙動をとることを示した。従って、不可逆的阻害剤に適用することができる下記方程式 (1) によって、反応生成物の生成の動態を説明することが可能となる。下記方程式 (1) に基づき定義されるパラメータ m₁、m₂ および m₃ は、これらのパラメータの決定に付随する誤差に加えて Kaleda Graph プログラムを使用し、実験曲線を調整することにより、直接得られる。

10

【0116】

方程式 (1)

$$OD_{340} = m_1 + (m_2 - m_1) \cdot e^{-m_3 \cdot t}$$

20

この式中のパラメータは、次のとおりである：

OD₃₄₀ は、分光光度計を使用し、340 nm、時間「t」で測定した光学密度である。

m₁ は、「t」が無大に向かっている時の光学密度である。

m₂ は、初期光学密度である。

m₃ は、NADPH の見掛けの消滅定数を掛けた阻害剤の濃度の積である。

【0117】

可逆的阻害剤については、二つのケースがあり得る。一段階で阻害剤が直接酵素に結合するか、可逆的酵素 / 阻害剤中間複合体を生成して二段階で酵素に結合する。阻害剤濃度の関数としてのグラフ表示 m₃ によって、不可逆的阻害のタイプを定義することが可能となる。従って、阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセレートが酵母菌イソメロダクターゼに一段で結合するか、2 段で結合するかを判定するために、この酵素の酵素活性に対するこれらの阻害剤の効果を、所定の酵素濃度 (110 nM) および AHB 濃度 (0.48 mM) に対して阻害剤の濃度を変化させることにより、経時的に (6 分間) 追跡する (図 7)。可逆的酵素 / 阻害剤中間複合体の生成を伴わない単純な不可逆的阻害については、酵素 / 阻害剤複合体の見掛けの生成速度 (K_{obs} または m₃) は、阻害剤の濃度の一次関数である。不可逆的阻害が可逆的中間複合体の存在を伴う場合、阻害剤の濃度の関数としてのグラフ表示 m₃ は、双曲線である。阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセレートについては、阻害剤の濃度の関数としてのグラフ表示 m₃ は、直線であり、これは、これらの生成物による酵母菌イソメロダクターゼの阻害が、植物イソメロダクターゼの阻害の場合のように、一段階で発生することを示唆している (図 8)。しかし、実験誤差を考慮に入れても、阻害剤の濃度の関数としてのグラフ表示 m₃ は、これら二つの阻害剤についての起点を通らない。これら二つの阻害剤、N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセレート、は、完全に不可逆的ではない可能性がある。この場合、酵素 / 阻害剤複合体についての解離定数、K_d、は、無視できない値を有しうる。阻害剤のメカニズム (競合性または非競合性) は、酵素 / 阻害剤複合体の見掛けの生成速度に対する基質の濃度の影響を研究することによって判定することができる。この判定は、基質の濃度の関数としてグラフ表示 1 / m₃ を使用して行う。競合性阻害剤については、基質の

30

40

50

濃度の関数としてグラフ表示 $1/m_3$ は、直線である。非競合性阻害剤については、パラメータ m_3 は、基質の濃度に依存する。阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートについては、 m_3 の逆数が、A H B 基質の濃度の関数のごとく直線的に変化する。従って、N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートは、A H B 基質に対して競合性である酵母イソメロレダクターゼの阻害剤のような挙動をとる（図 9）。阻害剤 / 酵母菌酵素結合定数（ k_0 ）は、下記方程式（2）によって計算する。

【 0 1 1 8 】

【 数 1 】

方程式（2）

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 \cdot [I]}{1 + \frac{[S]}{K_M^S}} + k_{-0}$$

10

【 0 1 1 9 】

$k_{\text{obs}} = m_3$ = 酵素 / 阻害剤複合体の見掛けの生成速度

k_0 = 阻害剤 / 酵素結合定数

k_{-0} = 阻害剤 / 酵素解離定数

K_M^S = A H B 基質についてのミカエリス - メンテン定数

[I] = 阻害剤の濃度

[S] = 基質の濃度

不可逆的阻害剤について、 k_{-0} は、無視できると考えられる。そこで、 k_0 は、K a l e i d a G r a p h プログラムを使用して下記方程式（3）により計算する。

【 0 1 2 0 】

【 数 2 】

方程式（3）

$$\frac{1}{m_3} = \frac{1}{k_0 \cdot [I]} + \frac{1}{K_M^S \cdot [I] \cdot k_0} \cdot [S]$$

30

【 0 1 2 1 】

この方程式は、阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートに用いることはできるが、ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートに用いることはできない。ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートについては、基質の濃度の関数としてのグラフ表示 $1/m_3$ は直線であるが、起点を通らない。N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートについては、基質の濃度の関数としてのグラフ表示 $1/m_3$ は直線であり、y 軸上の起点での値は無視できる。この結果を説明することができる仮説は、「阻害剤ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートは、おそらく完全には不可逆的でない」である。そこで、線形回帰線によって、ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートについての k_0 の値を得ることが可能となる。阻害剤 N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートおよびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートに対応する k_0 の値は、それぞれ、 $12433 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ および $7721 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ である。従って、植物イソメロレダクターゼ（N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートについての $k_0 = 1900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ およびジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートについての $k_0 = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ）とは異なり、N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートは、ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートより良好な酵母菌酵素阻害剤である。

40

【 0 1 2 2 】

50

5.5. 酵母菌イソメロレダクターゼの構造研究

酵母菌イソメロレダクターゼの四次構造を二つの異なるアプローチ（質量分析法およびゲル濾過）に従って研究した。

【0123】

二つの異なるオリゴマー化状態の存在を非変性条件下で質量分析法によって示した。この方法は、酵母菌イソメロレダクターゼは、主として二量体系で存在するが、少量の単量体形も存在することを示した。二量体は、電荷状態分布 $[D + 18H]^{18+}$ から $[D + 21H]^{21+}$ によって表される。電荷状態 $[D + 12H]^{12+}$ から $[D + 14H]^{14+}$ によって表される酵母菌イソメロレダクターゼの少量の単量体の存在が、この同じ質量スペクトルで示した。従って、酵母菌イソメロレダクターゼは、単量体形と二量体形の平衡状態にある。第一精製段階後に得られた酵母菌イソメロレダクターゼ画分のプールをゲル濾過（Superdex 75）にかけると、このイソメロレダクターゼが、単一ピークで溶離されることおよびその分子量が、67 kDaと概算されることが判明する。そこで、非変性条件下で、この酵素の単量体形の予想分子量は、約40 kDaであり、二量体形については80 kDaである。酵母菌イソメロレダクターゼの単量体形と二量体形の間の中間的な分子量によって、この酵素のこれら二つの形の平衡の存在が確認される。これら二つの形の間の急速な動的平衡によってしか、ゲル濾過において得られる単一の溶離ピークを説明することはできない。具体的には、この平衡が遅かった場合、一方がその酵素の単量体形に対応し、他方がその酵素の二量体系に対応する二つの溶離ピークが、ゲル濾過で観察される。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】M. グリセア (M. grisea)、N. クラッサ (N. crassa) および S. セレビシエ (S. cerevisiae) のイソメロレダクターゼの蛋白質配列の比較を示す図である。CLUSTAL W (1.4) ソフトウェアを使用して配列したもの。・：類似のアミノ酸 *：同じアミノ酸

【図2】N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート (IpOHA) の存在下、様々な培養条件下でのM. グリセア (M. grisea) についての成長アッセイを示す図である。病原性真菌M. グリセア (M. grisea) に対する阻害剤IpOHAの効果、様々な濃度の阻害剤の存在下、様々な培地中で7日間にわたってこの真菌の成長変化を追跡することによって、試験する。200 μ Lの培地、最小培地 (MN)、または最小培地 + 0.3 mMのロイシン、バリンおよびイソロイシン (MN + ILV)、に孢子数 10^5 / mLの最終濃度でM. グリセア (M. grisea) P1.2の孢子の浮遊液を接種する。そのマイクロプレート周囲温度でインキュベートし、0、3、4、5、6および7日 (D0、D3、D4、D5、D6およびD7) 目に、630 nmでの光学密度 (OD_{630}) を測定する。この光学密度によって、菌糸の成長寸法が提供される。

30

【図3】酵母菌イソメロレダクターゼの酵素活性に対するNADPHの濃度の影響を示す図である。酵素活性の測定は、1 mLの反応培地 (10 mMのMgCl₂、0 ~ 175 μ MのNADPH、0.48 mMのAHB)、および50 mMのナトリウムHepesバッファ (pH 7.5) 中、25 °Cで行う。曲線は、メカエリス - メンテンモデルで調整する。NADPHについてのK_Mは、1.6 μ Mである。

40

【図4】酵母菌イソメロレダクターゼの酵素活性に対する基質AHB [A] およびAL [B] の濃度の影響を示す図である。酵素活性の測定は、反応培地 (10 mMのMgCl₂、250 μ MのNADP)、および1 mLの50 mMナトリウムHepesバッファ (pH 7.5) 中、AHB [A] およびAL [B] の存在下、25 °Cで行う。曲線は、メカエリス - メンテンモデルで調整する。A: AHBのK_Mは、1.04 μ Mである。B: ALのK_Mは、266 μ Mである。

【図5】酵母菌イソメロレダクターゼの酵素活性に対するマグネシウムの濃度の影響を示す図である。酵素活性の測定は、1 mLの反応培地 (0 ~ 40 mMのMgCl₂、250 μ MのNADPH、0.48 mMのAHB)、および50 mMのナトリウムHepesバッ

50

ファー (pH 7.5) 中、25℃で行う。曲線は、メカエリス - メンテンモデルで調整する。 Mg^{2+} についての K_M は、 $968 \mu M$ である。

【図6】阻害剤ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテートおよび N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメートの結合についての化学量論比を示す図である。阻害剤 $Ho e$ $704 [A]$ および $I p O H A [B]$ ($0.1 nmol$) を、酵素の量を変化させて ($0 \sim 0.4 nmol$) 20 分間 25℃で $10 \mu L$ 量の $N A D P H$ ($25 nmol$) および Mg^{2+} ($0.25 \mu mol$) と共にインキュベートする。酵素活性の測定は、 $1 mL$ の反応培地 ($10 mM$ の $M g C l_2$ 、 $250 \mu M$ の $N A D P H$ 、 $0.48 mM$ の $A H B$)、および $50 mM$ のナトリウム $H e p e s$ バッファー (pH 7.5) 中、25℃で行う。

【図7】阻害剤ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテート $[A]$ および N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート $[B]$ の存在下での酵母菌イソメロレダクターゼの阻害の動態を示す図である。酵素活性の測定は、 $50 mM$ のナトリウム $H e p e s$ バッファー (pH 7.5) 中の反応培地 ($10 mM$ の $M g C l_2$ 、 $250 \mu M$ の $N A D P H$ 、 $0.48 mM$ の $A H B$) $1 mL$ 中、 $110 nM$ の酵素の存在下、25℃で行う。反応は、様々な量の阻害剤ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテート $[A]$ および N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート $[B]$ ($2 \mu M \sim 30 \mu M$) を前記反応培地に同時に添加することによって開始する。方程式 (1) に従って曲線をプロットし、それによって、 K_{obs} (酵素 - 阻害剤複合体の生成の見掛けの速度) の値を決定することが可能となる。

【図8】阻害剤ジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテート $[A]$ および N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート $[B]$ の存在下での酵母菌イソメロレダクターゼの阻害の動態を示す図である。酵素活性の測定は、 $50 mM$ のナトリウム $H e p e s$ バッファー (pH 7.5) 中の反応培地 ($10 mM$ の $M g C l_2$ 、 $250 \mu M$ の $N A D P H$ 、 $0.48 mM$ の $A H B$) $1 mL$ 中、 $110 nM$ の酵素の存在下、25℃で行う。反応は、様々な量の阻害剤 $[A]$ および $[B]$ ($2 \mu M \sim 50 \mu M$) を前記反応培地に同時に添加することによって開始する。

【図9】基質 $A H B$ の濃度の関数としての式 $1 / K_{obs}$ の使用による、酵母イソメロレダクターゼに対するジメチルホスフィノイル - 2 - ヒドロキシアセテート $[A]$ および N - ヒドロキシ - N - イソプロピルオキサメート $[B]$ の結合定数 k_0 の決定を示す図である。酵素活性の測定は、 $1 mL$ の反応培地 ($10 mM$ の $M g C l_2$ 、 $250 \mu M$ の $N A D P H$ 、 $125 \mu M \sim 2.375 mM$ の $A H B$)、および $50 mM$ のナトリウム $H e p e s$ バッファー (pH 7.5) 中、 $110 nM$ の酵素の存在下、25℃で行う。前記反応は、様々な量の基質 $A H B$ ($125 \mu M \sim 2.375 mM$) および阻害剤 $[A]$ ($10 \mu M$) および $[B]$ ($15 \mu M$) を前記反応培地に同時に添加することによって開始する。方程式 (3) に従って曲線をプロットし、それによって、 K_0 (阻害と酵素の結合速度) の値を決定することが可能となる。

10

20

30

【 図 1 】

M. grisea MSARGPSKALRPMARQLATPAVQRSEFVAASSMVRATK--KAAVAPTQQQ
 N. crassa MAARNCTKALRPLARQLATPAVQRRTFVAASAVRASVAVKAAAPARQQ
 S. cerevisiae ---MLRTQAARLICNSRVITAK--RTFALATRAAAYSRP-AARFVKPMIT
 ..* * .. * * * * *

M. grisea IRGVKTMDFAGHKYQVWERADWPKEKLEVFYFKDDTLALIGVGSQGHQGL
 N. crassa VGVKTMDFAGHKYQVWERADWPKEKLEVFYFKDDTLALIGVGSQGHQGL
 S. cerevisiae TRGLKQINFGGTVFVYERADWPKEKLEVFYFKDDTLALIGVGSQGHQGL
 ** * * * * *

M. grisea NLRDNLNVIIGVRKDKGSKMDAVQDGVVFGKNLFEVDEAISRGTVIMNL
 N. crassa NLRDNLNVIIGVRKDKGSKMDAVQDGVVFGKNLFEVDEAISRGTVIMNL
 S. cerevisiae NLRDNLNVIIGVRKDKGSKMDAVQDGVVFGKNLFEVDEAISRGTVIMNL
 ***** ** * * * * *

M. grisea LSDAAQSETWPAIKPQITKGKTLFVSHGFSVPFKDLTKVEVPTDQVILC
 N. crassa LSDAAQSETWPAIKPQITKGKTLFVSHGFSVPFKDLTKVEVPTDQVILC
 S. cerevisiae LSDAAQSETWPAIKPQITKGKTLFVSHGFSVPFKDLTKVEVPTDQVILC
 ***** ** * * * * *

M. grisea APKSGRTVRSFLFREGRLNSSFVAVQDVTGKAKEKALGVAIGSGYLY
 N. crassa APKSGRTVRSFLFREGRLNSSFVAVQDVTGKAKEKALGVAIGSGYLY
 S. cerevisiae APKSGRTVRSFLFREGRLNSSFVAVQDVTGKAKEKALGVAIGSGYLY
 ***** ** * * * * *

M. grisea KTTFFKEVYSDLYGERGCLMGGINHMFQAQYEVLRERGHSPSEAFNETVE
 N. crassa KTTFFKEVYSDLYGERGCLMGGINHMFQAQYEVLRERGHSPSEAFNETVE
 S. cerevisiae KTTFFKEVYSDLYGERGCLMGGINHMFQAQYEVLRERGHSPSEAFNETVE
 ***** ** * * * * *

M. grisea EATQSLYPLIGAHMDMWFACSTTARRGALDWSPFKDALKPFVFNQIYD
 N. crassa EATQSLYPLIGAHMDMWFACSTTARRGALDWSPFKDALKPFVFNQIYD
 S. cerevisiae EATQSLYPLIGAHMDMWFACSTTARRGALDWSPFKDALKPFVFNQIYD
 ***** ** * * * * *

M. grisea SVKDGSETQSLDYNSSQPDYREKYEAIMEEIRNLEIWRAGKAVRSLRPFEN
 N. crassa SVKDGSETQSLDYNSSQPDYREKYEAIMEEIRNLEIWRAGKAVRSLRPFEN
 S. cerevisiae STNGTETKRLSPNNSQPDYREKLELDITRAMEIKVQEVKVRKLPEN
 * * * * *

M. grisea QKQK
 N. crassa QK--
 S. cerevisiae Q---

Fig. 1

【 図 2 】

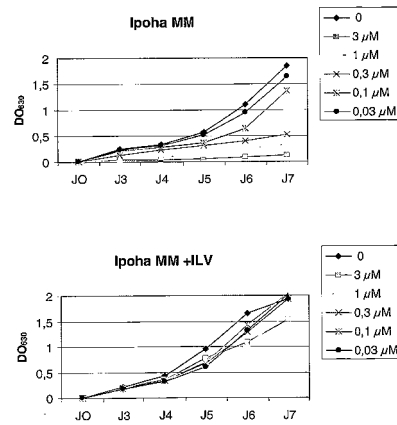


Fig. 2

【 図 3 】

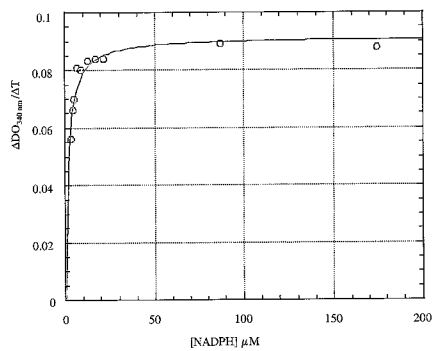


Fig. 3

【 図 4 】

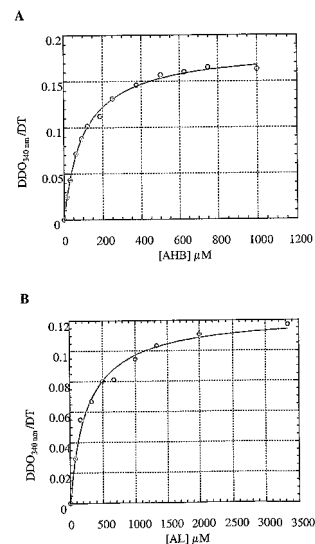


Fig. 4

【 図 5 】

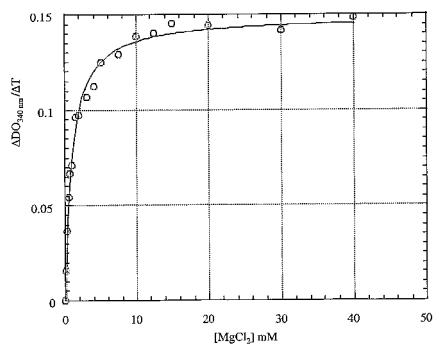


Fig.5

【 図 6 】

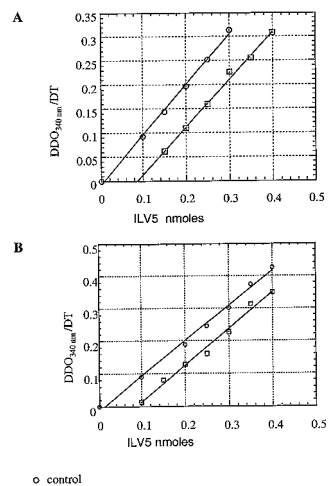


Fig. 6

【 図 7 】

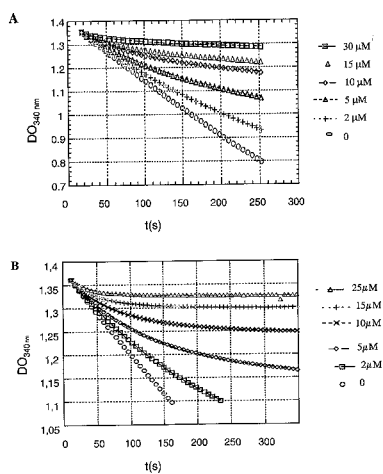


Fig.7

【 図 8 】

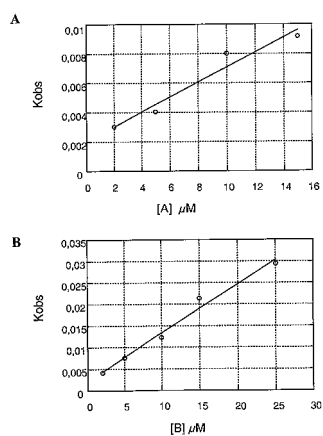


Fig. 8

【 図 9 】

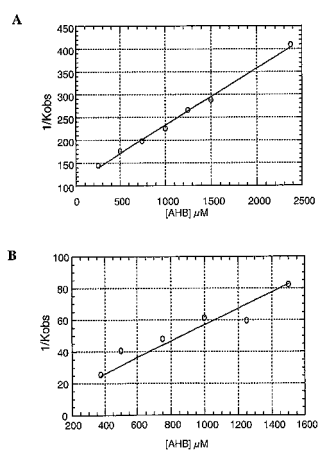


Fig. 9

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
20 mars 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/022056 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A01N 61/00, 57/20, 37/28, C12Q 1/26, 1/533(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03073(22) Date de dépôt international :
10 septembre 2002 (10.09.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/11689 10 septembre 2001 (10.09.2001) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BAYER
CROPSCIENCE S.A. [FR/FR]; 55 avenue René Cassin,
F-69009 Lyon (FR).(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DUMAS,
Renaud [FR/FR]; 17 D rue Ernest Fabrigues, F-69009
Lyon (FR). LEBRUN, Marc-Henri [FR/FR]; 62 rue de
Brest, F-69002 Lyon (FR). ZUNDEL, Jean-Luc [FR/FR];
2 rue Tête d'Or, F-69002 Lyon (FR). EFFANTIN, Géraldine
[FR/FR]; Les Petits Jardins, 101 rue du 11 Novembre,
F-69560 Sainte Colombe (FR). MORIN, Valérie [FR/FR];
6 rue de Longchamp, F-61200 Urou lez Crennes (FR).(81) États désignés (national) : AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un
brevet (règle 4.17.ii) pour les désignations suivantes 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, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF,
BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)

relative au droit du déposant de revendiquer la priorité
de la demande antérieure (règle 4.17.iii) pour toutes les
désignations

relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US
seulement

Publiée :

avec rapport de recherche internationale
avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF ACETOHYDROXY ACID ISOMEROREDUCTASE INHIBITORS FOR TREATING FUNGAL DISEASES
AFFECTING CROPS(54) Titre : UTILISATIONS D'INHIBITEURS DE L'ACETOHYDROXYACIDE ISOMEROREDUCTASE POUR LE TRAITE-
MENT DES MALADIES FONGIQUES DES CULTURES(57) Abstract: The invention concerns the use of acetoxyhydroxy acid isomeroreductase for treating fungal diseases affecting crops.
The invention concerns methods for treating crops against fungal diseases comprising applying an acetoxyhydroxy acid isomeroreduc-
tase inhibitor. The invention also concerns methods for identifying novel fungicidal compounds comprising a step which consists in
identifying acetoxyhydroxy acid isomeroreductase inhibitors.(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase pour le traitement
des maladies fongiques des cultures. L'invention a pour objet des procédés de traitement des cultures contre les maladies fongiques
comportant l'application d'un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. L'invention se rapporte aussi à des procédés
pour l'identification de nouveaux composés fongicides comportant une étape d'identification d'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide
isoméroréductase.

WO 03/022056 A1

WO 03/022056 A1 

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

1

**Utilisations d'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase pour le traitement
des maladies fongiques des cultures**

La présente invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide
5 isoméroréductase pour le traitement des maladies fongiques des cultures.

Les champignons sont responsables d'épidémies dévastatrices qui peuvent entraîner
des pertes importants au niveau des cultures de différentes espèces végétales. Le principe
d'employer des inhibiteurs d'enzymes de champignons pathogènes, et d'utiliser ces enzymes
dans des tests pour identifier de nouvelles molécules actives contre ces champignons est
10 connu en soi. Toutefois, la simple caractérisation d'une enzyme de champignon n'est pas
suffisante pour atteindre cet objectif, encore faut-il que l'enzyme choisi comme cible de
molécules fongicides potentielles soit essentielle à la vie du champignon, son inhibition par
la molécule fongicide entraînant la mort du champignon, ou essentielle à la pathogénie du
champignon, son inhibition n'étant pas létale pour le champignon mais inhibant simplement
15 son pouvoir pathogène. L'identification de voies métaboliques et d'enzymes indispensables
à la pathogénie et à la survie du champignon est donc nécessaire au développement de
nouveaux produits fongicides.

L'acétohydroxyacide isoméroréductase est une enzyme bien caractérisée chez les
plantes et les microorganismes tels que les bactéries et les levures. Cette enzyme est la
20 deuxième enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée, elle
catalyse la transformation du substrat, le 2S-2-acétolactate (AL) ou le 2S-2-acéto-2-
hydroxybutyrate (AHB) en 2,3-dihydroxy-3-isovalérate (DHIV) ou en 2,3-dihydroxy-3-
méthylvalérate (DHIM) respectivement. Cette réaction nécessite la présence d'ions
magnésium (Mg^{2+}) et se déroule en deux étapes: une isomérisation d'un groupement
25 méthyle ou éthyle suivie d'une réduction par le NADPH. Un grand nombre de connaissances
ont été acquises sur l'isoméroréductase de plante en tant que cible pour des herbicides
(Wittenbach et al., Plant Physiol. 96, No.1, Suppl., 94, 1991; Schulz et al., FEBS Lett.,
238:375-378, 1988) et des inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase ont été
décrits comme herbicides (EP106114; US4,594,098, EP196026, EP481407, WO 94/23063,
30 CA2002021). Cependant, ces composés n'ont pas montré une activité herbicide efficace sur
plante.

La présente invention a pour objet des procédés de traitement des cultures contre les
maladies fongiques comprenant l'application d'un inhibiteur de l'acétohydroxyacide
isoméroréductase. On a trouvé que l'inactivation du gène *ILV5* codant pour

WO 03/022056

2

PCT/FR02/03073

l'acétohydroxyacide isoméroréductase chez *Magnaporthe grisea* entraîne une inhibition de la croissance du champignon. Cette inhibition de la croissance du champignon est également observé *in vivo* en présence d'inhibiteurs spécifiques de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. *M. grisea* est pathogène pour de nombreuses espèces de plantes cultivées
5 telles que le riz.

Description de la liste de séquences

SEQ ID No. 1	Acétohydroxyacide isoméroréductase de <i>Magnaporthe grisea</i> .
10 SEQ ID No. 2	Acétohydroxyacide isoméroréductase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
SEQ ID No. 3	Acétohydroxyacide isoméroréductase de <i>Neurospora crassa</i> .
SEQ ID No. 4	ADNc du gène de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de <i>Magnaporthe grisea</i> .
SEQ ID No. 5	Acétohydroxyacide isoméroréductase de <i>Magnaporthe grisea</i> .
15 SEQ ID No. 6	Gène de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de <i>Magnaporthe grisea</i> .
SEQ ID No. 7-18	Amorces pour PCR.

Description de l'invention

20

La présente invention a pour objet des procédés de traitement des cultures contre les maladies fongiques par application d'une quantité efficace d'un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase.

L'invention a pour objet un procédé de lutte, à titre curatif ou préventif, contre les
25 champignons phytopathogènes des cultures, caractérisé en ce que l'on applique sur le sol où poussent ou où sont susceptibles de pousser les végétaux, sur les feuilles et/ou les fruits des végétaux ou sur les semences des végétaux, une quantité efficace (agronomiquement efficace) et non phytotoxique d'un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. Par "quantité efficace et non phytotoxique", on entend une quantité d'inhibiteur suffisante pour
30 permettre le contrôle ou la destruction des champignons présents ou susceptibles d'apparaître sur les cultures, et n'entraînant pour lesdites cultures aucun symptôme notable de phytotoxicité. Une telle quantité est susceptible de varier dans de larges limites selon le champignon à combattre, le type de culture, les conditions climatiques, et les composés

WO 03/022056

3

PCT/FR02/03073

compris dans la composition fongicide selon l'invention. Cette quantité peut être déterminée par des essais systématiques au champ, à la portée de l'homme du métier.

- Les procédés selon l'invention sont utiles pour traiter les semences de céréales (blé, seigle, triticale et orge notamment), de pomme de terre, de coton, de pois, de colza, de maïs, de lin ou encore les semences d'arbres forestiers, ou encore les semences génétiquement modifiées de ces végétaux. La présente invention concerne aussi l'application foliaire sur les cultures végétales, c'est-à-dire sur les feuillages, les fleurs, les fruits et/ou les troncs des végétaux concernés. Parmi les végétaux visés par les procédés selon l'invention, on peut citer le riz, le maïs, le coton, les céréales, comme le blé, l'orge, le triticale, les arbres fruitiers, en particulier pommiers, poiriers, pêcheurs, vigne, bananiers, orangers, citronniers, etc., les cultures oléagineuses, par exemple, colza, tournesol, les cultures maraîchères et légumières, tomates, salades, les cultures protéagineuses, le pois, les solanées, par exemple la pomme de terre, la betterave, le lin, et les arbres forestiers, ainsi que les homologues génétiquement modifiés de ces cultures.
- 15 Parmi les végétaux visés par la méthode selon l'invention, on peut citer :
- le blé, en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des semences : les fusarioses (*Microdochium nivale* et *Fusarium roseum*), les caries (*Tilletia caries*, *Tilletia controversa* ou *Tilletia indica*), la septoriose (*Septoria nodorum*); le charbon nu (*Ustilago tritici*);
 - 20 - le blé, en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des parties aériennes de la plante : le piétin-verse (*Tapesia yellundae*, *Tapesia acuiformis*), le piétin-échaudage (*Gaeumannomyces graminis*), la fusariose du pied (*F. culmorum*, *F. graminearum*), la fusariose des épis (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *Microdochium nivale*), le rhizoctone (*Rhizoctonia cerealis*), l'oïdium (*Erysiphe graminis forma specie tritici*), les rouilles (*Puccinia striiformis* et *Puccinia recondita*) et les septorioses (*Septoria tritici* et *Septoria nodorum*), l'helminthosporiose (*Drechslera tritici-repentis*);
 - l'orge, en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des semences : les helminthosporioses (*Pyrenophora graminea*, *Pyrenophora teres* et *Cochliobolus sativus*), le charbon nu (*Ustilago nuda*) et les fusarioses (*Microdochium nivale* et *Fusarium roseum*);
 - 30 - l'orge, en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des parties aériennes de la plante : le piétin-verse (*Tapesia yellundae*), les helminthosporioses (*Pyrenophora teres* et *Cochliobolus sativus*), l'oïdium (*Erysiphe graminis forma specie hordei*), la rouille naine (*Puccinia hordei*) et la rhynchosporiose (*Rhynchosporium secalis*);

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

4

- la pomme de terre, en ce qui concerne la lutte contre les maladies du tubercule (notamment *Helminthosporium solani*, *Phoma tuberosa*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*), et le mildiou (*Phytophthora infestans*);
- la pomme de terre en ce qui concerne la lutte contre les maladies du feuillage suivantes :
- 5 l'alternariose (*Alternaria solani*), le mildiou (*Phytophthora infestans*);
- le coton, en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des jeunes plantes issues des semences : les fontes de semis et les nécroses du collet (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*), la pourriture noire des racines (*Thielaviopsis basicola*);
- 10 - les cultures protéagineuses, par exemple le pois, en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des semences : l'anthracnose (*Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes*), la fusariose (*Fusarium oxysporum*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le mildiou (*Peronospora pisi*);
- les cultures oléagineuses, par exemple le colza, en ce qui concerne la lutte contre les
- 15 maladies suivantes des semences : *Phoma lingam*, *Alternaria brassicae* et *Sclerotinia sclerotiorum*;
- le maïs, en ce qui concerne la lutte contre les maladies des semences : (*Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. Et *Gibberella fujikuroi*);
- le lin, en ce qui concerne la lutte contre la maladie des semences *Alternaria linicola*;
- 20 - les arbres forestiers, en ce qui concerne la lutte contre les fontes de semis (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*);
- le riz en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des parties aériennes : la pyriculariose (*Magnaporthe grisea*), le rhizoctone (*Rhizoctonia solani*);
- les cultures légumières en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des semis
- 25 ou des jeunes plants issus de semences : les fontes de semis et les nécroses du collet (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp.);
- les cultures légumières en ce qui concerne la lutte contre les maladies suivantes des parties aériennes : la pourriture grise (*Botrytis* sp.), les oïdiums (notamment *Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Leveillula taurica*), les fusarioses (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*), les cladosporioses (*Cladosporium* sp.), les alternarioses (*Alternaria* sp.), les anthracnoses (*Colletotrichum* sp.), les septorioses (*Septoria* sp.), le rhizoctone (*Rhizoctonia solani*), les mildious (par exemple *Bremia lactucae*, *Peronospora* sp., *Pseudoperonospora* sp., *Phytophthora* sp.);
- 30

WO 03/022056

5

PCT/FR02/03073

- les arbres fruitiers en ce qui concerne les maladies des parties aériennes : la moniliose (*Monilia fructigenae*, *M. laxa*), la tavelure (*Venturia inaequalis*), l'oïdium (*Podosphaera leucotricha*);
- la vigne en ce qui concerne les maladies du feuillage : notamment la pourriture grise
- 5 (*Botrytis cinerea*), l'oïdium (*Uncinula necator*), le black-rot (*Guignardia biwelfi*), le mildiou (*Plasmopara viticola*);
- la betterave en ce qui concerne les maladies suivantes des parties aériennes : la cercosporiose (*Cercospora beticola*), l'oïdium (*Erysiphe beticola*), la ramulariose (*Ramularia beticola*).

- 10 L'acétohydroxyacide isoméroréductase est une enzyme bien caractérisée que l'on retrouve chez les plantes et les microorganismes (bactéries, levures, champignons). Les procédés de la présente invention mettent en œuvre des l'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. Dans un premier mode de réalisation, l'invention concerne l'utilisation d'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de champignon, plus
- 15 préférentiellement d'inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de champignon phytopathogène pour le traitement des maladies fongiques des cultures. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase inhibent l'acétohydroxyacide isoméroréductase de *Magnaporthe grisea* et/ou de *Saccharomyces cerevisiae* et/ou de *Neurospora crassa*. Dans un autre mode de réalisation
- 20 particulier, l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase est un inhibiteur de l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de la SEQ ID No.1, de la SEQ ID No.2, de la SEQ ID No.3 et/ou de la SEQ ID No. 5.

- Tout inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase peut être utilisé dans les procédés selon l'invention. Des inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase sont
- 25 bien connues de l'homme du métier et ces inhibiteurs ont notamment été décrits dans EP106114; US4,594,098, EP196026, EP481407, WO 94/23063, CA2002021 et WO 97/37660.

- Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase est un analogue d'intermédiaire de réaction se fixant
- 30 au site actif de l'acétohydroxyacide isoméroréductase.

Préférentiellement, l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase est le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate.

Plus préférentiellement, l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase est le N-hydroxy-N-isopropylloxamate.

WO 03/022056

6

PCT/FR02/03073

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase est sous la forme d'une composition fongicide. L'invention concerne aussi des compositions fongicides comportant une quantité efficace d'au moins un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. Les compositions fongicides selon l'invention comprennent, outre l'inhibiteur, les supports solides ou liquides, acceptables en agriculture et/ou les agents tensioactifs également acceptables en agriculture. En particulier sont utilisables les supports inertes et usuels et les agents tensioactifs usuels. Ces compositions fongicides selon l'invention peuvent contenir aussi toute sorte d'autres ingrédients tels que, par exemple, des colloïdes protecteurs, des adhésifs, des épaississants, des agents thixotropes, des agents de pénétration, des stabilisants, des séquestrants, etc...

Plus généralement les inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméro-réductase peuvent être combinés à tous les additifs solides ou liquides correspondant aux techniques habituelles de la mise en formulation.

La présente invention a également pour objet des compositions fongicides comprenant un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase et un autre composé fongicide. Les mélanges avec d'autres fongicides sont particulièrement avantageux, notamment les mélanges avec l'acibenzolar-S-méthyl, l'azoxystrobin, le benalaxyl, le benomyl, la blasticidin-S, le bromuconazole, le captafol, le captane, le carbendazim, la carboxine, le carpropamide, le chlorothalonil, les compositions fongicides à base de cuivre ou de dérivés du cuivre tels que l'hydroxide de cuivre ou l'oxychlorure de cuivre, le cyazofamide, le cymoxanil, le cyproconazole, le cyprodinyl, le dichloran, le diolocymet, le dicloran, le diethofencarb, le difenoconazole, le diflumetorim, le diméthomorph, le diniconazole, le discostrobin, le dodemorph, la dodine, l'edifenphos, l'époxyconazole, l'ethaboxam, l'ethirimol, la famoxadone, la fenamidone, le fenarimol, le fenbuconazole, le fenhexamid, le fenpiclonil, le fenpropidine, le fenpropimorph, la ferimzone, le fluazinam, le fludioxonil, le flumetover, le fluquinconazole, le flusilazole, le flusulfamide, le flutolanil, le flutriafol, le folpet, le furalaxyl, le furametpyr, la guazatine, l'hexaconazole, l'hymexazol, l'imazalil, l'iprobénphos, l'iprodione, l'isoprothiolane, la kasugamycin, le kresoxim-méthyl, le mancozeb, le maneb, le mefenoxam, le mepanipyrin, le metalaxyl et ses entiomères tels que le metalaxyl-M, le metconazole, le metiram-zinc, la metominostrobin, l'oxadixyl, le pefurazoate, le penconazole, le pencycuron, l'acide phosphorique et ses dérivés tels que le fosetyl-Al, la phthalide, la picoxystrobine, le probenazole, le prochloraz, le procymidone, le propamocarb, le propiconazole, la pyraclostrobin, le pyrimethanil, le pyroquilon, le quinoxyfen, le silthiofam, le simeconazole, la spiroxamine, le tebuconazole, le

WO 03/022056

7

PCT/FR02/03073

tetraconazole, le thiabendazole, la thifluzamide, le thiophanate, e.g. thiophanate-methyl, le thiram, le triadimefon, le triadimenol, le tricyclazole, le tridemorph, la trifloxystrobine, le triticonazole, les dérivés de la valinamide tels que par exemple l'iprovalicarb, la vinclozoline, le zineb et le zoxamide. Les mélanges ainsi obtenus ont un spectre d'activité plus large. Les compositions selon l'invention peuvent également comprendre un ou plusieurs insecticides, bactéricides, acaricides ou des phéromones ou d'autres composés ayant une activité biologique.

La présente invention a également pour objet des procédés de fabrication d'une composition fongicide utilisant un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase.

La présente invention a également pour objet des procédés pour la préparation de composés fongicides comprenant l'identification de composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase.

La réaction enzymatique est effectuée en présence du composé à tester pour mesurer l'inhibition de l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. Tous les tests biochimiques permettant de mesurer l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase et donc d'identifier des composés inhibant cette activité enzymatique peuvent être utilisés dans les procédés selon l'invention. Ces tests biochimiques sont bien connus de l'homme du métier (Dumas et al., *Biochem.J.* 288:865-874, 1992; Dumas et al., *Biochem. J.* 301:813-820, 1994; Dumas et al., *Febs Letters* 408:156-160, 1997; Halgand et al., *Biochemistry* 37:4773-4781, 1998; Wessel et al., *Biochemistry* 37:12753-12760, 1998; Halgand et al., *Biochemistry* 38:6025-6034, 1999).

Les réactions enzymatiques sont avantageusement effectuées en solution dans un tampon approprié. L'utilisation de ce type de milieu réactionnel permet de faire un grand nombre de réactions en parallèle et donc de tester un grand nombre de composés dans un format microplaque par exemple.

De manière préférée, les procédés d'identification de composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase comprennent la mise en contact de ces composés avec l'acétohydroxyacide isoméroréductase en présence de magnésium, de NADPH et de substrat; et la mesure de cette activité enzymatique.

Avantageusement, dans les procédés selon l'invention, la mesure de l'activité enzymatique comprend la mesure de la décroissance d'absorption du NADPH à 340 nm et le substrat utilisé pour la réaction enzymatique est le 2S-2-acétolactate (AL) ou le 2S-2-acéto-2-hydroxybutyrate (AHB). Il est entendu que toute autre méthode de mesure de l'activité

WO 03/022056

8

PCT/FR02/03073

enzymatique connue de l'homme du métier pourra être utilisée dans les procédés selon l'invention.

Toute acétohydroxyacide isoméroréductase peut être utilisée dans les procédés selon l'invention. Les acétohydroxyacide isoméroréductases ont été caractérisées chez plusieurs
5 organismes tels que les plantes, les bactéries, les levures et les champignons. Les gènes correspondants ont été clonés permettant de déterminer la séquence protéique de cette enzyme (Dumas et al., *Biochem. J.* 277:69-475, 1991; Curien et al., *Plant Mol. Biol.* 21:717-722, 1993; Dumas et al., *Biochem. J.* 294:821-828, 1993; Biou et al., *EMBO J.* 16:3405-3415, 1997; Dumas et al., *Biochemistry* 34:6026-6036, 1995; Dumas et al., *Accounts of*
10 *Chemical Research* 34:399-408, 2001; Sista et al., *Gene*, 120:115-118, 1992; Zelenaya-Troitskaya et al., *EMBO J.* 14:3268-3276, 1995).

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'acétohydroxyacide isoméroréductase utilisée dans les procédés selon l'invention est représentée à la SEQ ID No.1, à la SEQ ID No.2, de la SEQ ID No.3 et/ou à la SEQ ID No.5.

De préférence, l'acétohydroxyacide isoméroréductase est isolée, purifiée ou
15 partiellement purifiée de son environnement naturel. L'acétohydroxyacide isoméroréductase peut être préparée au moyen de différents procédés. Ces procédés sont notamment la purification à partir de sources naturelles telles que des cellules exprimant naturellement ces polypeptides, la production de polypeptides recombinants par des cellules hôtes appropriées
20 et leur purification ultérieure, la production par synthèse chimique ou, enfin, une combinaison de ces différentes approches. Ces différents procédés de production sont bien connus de l'homme du métier.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, l'acétohydroxyacide isoméroréductase est purifiée à partir d'un organisme produisant naturellement cette enzyme
25 comme par exemple les bactéries telle que *E. coli*, les levures telles que *S. cerevisiae*, ou les champignons tels que *N.crassa* ou *M.grisea*.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'acétohydroxyacide isoméroréductase est surexprimée dans un organisme hôte recombinant. Les méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN et l'expression de polypeptides dans des cellules hôtes
30 sont bien connues de l'homme du métier et ont par exemple été décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al., publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989) ou dans Molecular Cloning, T.Manias, E.F.Fritsch, J.Sambrook (1982).

WO 03/022056

9

PCT/FR02/03073

Préférentiellement, les procédés d'identification de composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase comprennent l'expression de l'acétohydroxyacide isoméroréductase dans un organisme hôte, la purification de l'acétohydroxyacide isoméroréductase produite par l'organisme hôte, la mise en contact de ces composés avec l'acétohydroxyacide isoméroréductase purifiée en présence de magnésium, de NADPH et de substrat; et la mesure de l'activité enzymatique.

Dans un mode de réalisation préféré, tous ces procédés comprennent une étape supplémentaire dans laquelle on détermine si lesdits composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase inhibent la croissance et/ou la pathogénie des champignons.

La présente invention concerne donc des procédés pour identifier des composés inhibant la croissance et/ou la pathogénie des champignons en inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase. Ces procédés consistant à soumettre un composé, ou un mélange de composés, à un test approprié pour l'identification des composés inhibiteurs de l'acétohydroxyacide isoméroréductase et à sélectionner les composés réagissant de manière positive audit test, le cas échéant à les isoler, puis à les identifier.

De manière préférentielle, le test approprié est un test de l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase tel que défini ci-dessus.

De manière préférée, un composé identifié selon ces procédés est ensuite testé pour ses propriétés anti-fongiques et pour sa capacité à inhiber la pathogénie et/ou la croissance du champignon pour les plantes selon des méthodes connues de l'homme du métier. Préférentiellement, le composé est évalué à l'aide de tests phénotypiques tels que des essais de pathogénie sur feuilles ou sur plantes entières.

Par composé on entend selon l'invention tout composé chimique ou mélange de composés chimiques, y compris les peptides et les protéines.

Par mélange de composés on comprend selon l'invention au moins deux composés différents, comme par exemple les (dia)stéréoisomères d'une molécule, des mélanges d'origine naturelle issus de l'extraction de matériel biologique (plantes, tissus végétaux, culture bactériennes, cultures de levures ou de champignons, insectes, tissus animaux, etc.) ou des mélanges réactionnels non purifiés ou purifiés totalement ou en partie, ou encore des mélanges de produits issus de techniques de chimie combinatoire.

La présente invention concerne enfin de nouveaux composés inhibiteurs de la pathogénie des champignons inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide

WO 03/022056

10

PCT/FR02/03073

isoméroréductase, notamment les composés identifiés par les procédés selon l'invention et/ou les composés dérivés des composés identifiés par les procédés selon l'invention.

De manière préférentielle, les composés inhibiteurs de la pathogénie des champignons inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase ne sont pas des inhibiteurs généraux d'enzymes. De manière également préférentielle, les composés selon l'invention ne sont pas des composés déjà connus pour avoir une activité fongicide et/ou une activité sur la pathogénie des champignons.

L'invention a également pour objet un procédé pour traiter des plantes contre un champignon phytopathogène caractérisé en ce qu'il comprend le traitement desdites plantes avec un composé identifié par un procédé selon l'invention.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un composé inhibiteur de la pathogénie des champignons, ledit procédé comprenant les étapes d'identification d'un composé inhibant la pathogénie des champignons inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase par le procédé d'identification selon l'invention, puis de préparation dudit composé identifié par les méthodes usuelles de synthèse chimique, de synthèse enzymatique et/ou d'extraction de matériel biologique. L'étape de préparation du composé peut être précédée le cas échéant par une étape dite d'optimisation par laquelle on identifie un composé dérivé du composé identifié par le procédé d'identification selon l'invention, ledit composé dérivé étant ensuite préparé par les méthodes usuelles.

Description des figures

Figure 1: Comparaison des séquences protéiques des isoméroréductases de *M.grisea*, *N.crassa* et de la levure *S.cerevisiae*. Alignement des séquences à l'aide du logiciel CLUSTAL W(1.4).

.: acide aminé similaire.

*: acide aminé identique.

Figure 2: Test de croissance de *M.grisea* en présence de l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate (IpOHA) et sous différentes conditions de culture.

L'effet de l'inhibiteur IpOHA est testé sur le champignon pathogène *M. grisea* en suivant l'évolution de la croissance de ce champignon en présence de différentes concentrations en inhibiteur, dans différents milieux de culture et sur une période de 7 jours.

200 µl de milieu de culture, milieu minimum (MM) ou milieu minimum + leucine, valine et isoleucine à 0.3 mM (MM + ILV), est inoculé avec une suspension de spores de la souche P1.2 de *M. grisea* à une concentration finale de 10^5 spores / ml. La microplaque est incubée

WO 03/022056

11

PCT/FR02/03073

à température ambiante et la densité optique à 630 nm (DO_{630}) est mesurée aux jours 0, 3, 4, 5, 6 et 7 (J0, J3, J4, J5, J6 et J7). La densité optique permet une mesure de la croissance mycélienne.

Figure 3: Influence de la concentration en NADPH sur l'activité enzymatique de

5 l'isoméroréductase de levure. Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25°C dans

1 ml de milieu réactionnel suivant : $MgCl_2$ 10 mM, NADPH de 0 à 175 μ M, AHB 0.48 mM

et dans le tampon Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5. La courbe est ajustée au modèle de Michaelis-Menten. Le K_M pour le NADPH est de 1.6 μ M.

Figure 4: Influence de la concentration en substrat AHB [A] et AL [B] sur l'activité

10 enzymatique de l'isoméroréductase de levure. Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25°C dans le milieu réactionnel suivant : $MgCl_2$ 10 mM, NADPH 250 μ M et dans 1 ml de tampon Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5 et en présence d'AHB [A] et d'AL [B]. Les courbes sont ajustées au modèle de Michaelis-Menten.

A Le K_M pour l'AHB est de 104 μ M.

15 B Le K_M pour l'AL est de 266 μ M.

Figure 5: Influence de la concentration en magnésium sur l'activité enzymatique de

l'isoméroréductase de levure. Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25 °C

dans 1 ml de milieu réactionnel suivant : $MgCl_2$ de 0 à 40 mM, NADPH 250 μ M, AHB 0.48

mM et dans le tampon Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5.

20 La courbe est ajustée au modèle de Michaelis-Menten. Le K_M pour le Mg^{2+} est de 968 μ M.

Figure 6: Stoechiométrie de fixation des inhibiteurs Diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate et N-hydroxy-N-isopropylloxamate sur l'isoméroréductase de levure. Les inhibiteurs Hoe 704 [A] et IpOHA [B] (0.1 nmoles) sont incubés avec des quantités variables d'enzyme (0 à 0.4 nmoles) pendant 20 minutes à 25°C avec 25 nmoles de NADPH et 0.25 μ moles de Mg^{2+}

25 dans un volume de 10 μ l. Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25°C dans 1 ml de milieu réactionnel suivant : $MgCl_2$ 10 mM, NADPH 250 μ M, AHB 0.48 mM et dans le tampon Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5.

Figure 7: Cinétiques d'inhibition de l'isoméroréductase de levure en présence des inhibiteurs diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate [A] et N-hydroxy-N-isopropylloxamate

30 [B]. Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25°C dans 1 ml de milieu réactionnel suivant : $MgCl_2$ 10 mM, NADPH 250 μ M, AHB 0.48 mM dans le tampon Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5 et en présence d'enzyme à 110 nM.

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

12

Les réactions sont initiées en ajoutant simultanément des quantités variables d'inhibiteurs diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate [A] et N-hydroxy-N-isopropylloxamate [B] (de 2 μM à 30 μM) dans le milieu réactionnel. Les courbes sont tracées suivant l'équation (1), ce qui permet la détermination des valeurs de K_{obs} , vitesse apparente de formation du complexe

5 enzyme-inhibiteur.

Figure 8: Cinétiques d'inhibition de l'isoméroréductase de levure en présence des inhibiteurs diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate [A] et N-hydroxy-N-isopropylloxamate [B]. Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25°C dans 1 ml de milieu réactionnel suivant : MgCl_2 10 mM ; NADPH 250 μM ; AHB 0.48 mM dans le tampon

10 Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5 et en présence d'enzyme à 110 nM.

Les réactions sont initiées en ajoutant simultanément des quantités variables d'inhibiteurs [A] et [B] (de 2 μM à 50 μM) dans le milieu réactionnel.

Figure 9: Détermination de la constante d'association k_o du diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate [A] et du N-hydroxy-N-isopropylloxamate [B] sur l'isoméroréductase de

15 levure grâce à la représentation $1/K_{\text{obs}}$ en fonction de la concentration en substrat AHB.

Les mesures d'activité enzymatique sont réalisées à 25°C dans 1 ml de milieu réactionnel suivant : MgCl_2 10 mM, NADPH 250 μM , AHB de 125 μM à 2.375 mM et dans le tampon

Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5 et en présence d'enzyme à 110 nM. Les réactions sont initiées en ajoutant simultanément des quantités variables de substrat AHB (de 125 μM à

20 2.375 mM) et les inhibiteurs [A] (10 μM) et [B] (15 μM) dans le milieu réactionnel.

Les courbes sont tracées suivant l'équation (3), ce qui permet la détermination des valeurs de k_o , vitesse d'association de l'inhibiteur à l'enzyme.

Exemples

25

Exemple 1: Clonage du gène *ILV5* de *Magnaporthe grisea*

Un fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de ce champignon grâce à des couples d'amorces dégénérées correspondant à des domaines protéiques conservés entre les isoméroréductases de

30 champignons. Le produit de PCR obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pGEM-T-Easy (Promega), séquencé et amplifié par PCR avec un nouveau couple d'amorces. Ce dernier produit de PCR a été utilisé comme sonde homologue pour cribler une banque d'ADN cosmidique de *M. grisea*. La séquence du gène *ILV5* de *M. grisea* a alors été réalisée à partir

WO 03/022056

13

PCT/FR02/03073

d'un des clones positifs et d'oligonucléotides dérivés de la séquence du produit de PCR déjà obtenu.

1.1. Isolement d'un fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* par amplification à

5 l'aide d'oligonucléotides dégénérés

1.1.1 Choix des oligonucléotides dégénérés

L'amplification d'un fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* a été réalisée par PCR à l'aide d'oligonucléotides dégénérés. Ces oligonucléotides dégénérés ont été choisis à partir de la comparaison des séquences protéiques des isoméroréductases de *N. crassa* et de
 10 *S. cerevisiae*. Cette comparaison a permis de mettre en évidence 4 domaines conservés entre ces deux séquences d'isoméroréductases fongiques, qui devraient être présents dans l'isoméroréductase de *M. grisea*. Ces 4 domaines conservés sont constitués d'une succession d'au moins 7 acides aminés conservés. La séquence des oligonucléotides dégénérés a été déterminée à partir de celle des acides aminés des domaines conservés
 15 traduits d'après le code génétique. Afin que le degré de dégénérescence (nombre de codons pour un acide aminé donné) soit le plus faible possible, les acides aminés tels que l'arginine, la leucine, la sérine sont à éviter car six codons leur correspondent. Les acides aminés méthionine et tryptophane sont quant à eux recherchés, puisqu'un seul codon leur correspond. Le degré de dégénérescence doit aussi être faible à l'extrémité 3' de
 20 l'oligonucléotide, afin d'augmenter la spécificité de l'amplification. Nous avons pu définir 4 oligonucléotides : les oligonucléotides 1(+) et 3(+) sur le brin (+) ; et les oligonucléotides 2(-) et 4(-) sur le brin (-) de l'ADN de *M. grisea*. Ainsi, l'amplification PCR peut être effectuée avec quatre couples différents d'oligonucléotides dégénérés : 1(+) et 2(-) ; 1(+) et 4(-) ; 3(+) et 2(-) ; 3(+) et 4(-).

25 1.1.2. Amplification d'un fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* à l'aide d'oligonucléotides dégénérés

Les conditions optimales d'amplification du gène *ILV5* de *M. grisea* ont été déterminées en faisant varier le couple d'amorces et leur température d'hybridation. Les 3 premiers cycles d'amplification ont été effectués à une température d'hybridation variable
 30 (42°C, 50°C ou 55°C), alors que la température d'hybridation des autres cycles est de 55°C. Des contrôles positifs ont été réalisés avec l'ADN génomique de *N. crassa* et de *S. cerevisiae* dans les mêmes conditions que pour l'ADN génomique de *M. grisea*. A une température d'hybridation de 42°C, les fragments d'ADN de *S. cerevisiae* ont été amplifiés à la taille attendue soit 590 pb, 610 pb, 440 pb et 470 pb avec les couples d'amorces (1-4),

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

14

(1-2), (3-4) et (3-2), respectivement. Les profils d'amplification de l'ADN génomique de *S. cerevisiae* avec les couples d'amorces (1-4) et (3-2) sont cependant complexes. Pour une température d'hybridation de 50°C, des fragments d'ADN de *N. crassa* ont été amplifiés à la taille attendue soit 660 pb, 685 pb, 523 pb et 544 pb avec les couples d'amorces (1-4), (1-2), (3-4) et (3-2), respectivement, bien que les profils d'amplification avec les couples d'amorces (1-4) et (3-4) soient complexes. Les différents couples d'oligonucléotides dégénérés ont permis d'amplifier à partir de l'ADN génomique de levure et de *N. crassa* un fragment de taille attendue. Ces oligonucléotides dégénérés ont donc pu être utilisés pour amplifier le gène *ILV5* de *M. grisea*. La quantité d'oligonucléotides utilisés, testée à une température d'hybridation de 42°C, ne semble pas avoir d'influence sur l'amplification de l'ADN génomique de *M. grisea*. A une température d'hybridation des premiers cycles de PCR de 42°C, les profils d'amplification de l'ADN génomique de *M. grisea*, obtenus avec les différents couples d'amorces sont assez complexes. A une température d'hybridation de 50°C, une simplification des profils d'amplification de l'ADN génomique de *M. grisea* a été observée pour la plupart des couples d'amorces ; en particulier pour le couple d'amorces (1-2) qui permet d'amplifier un seul fragment d'ADN à la taille attendue (685 pb). Une température d'hybridation des premiers cycles de PCR de 55°C ne permet pas d'augmenter la spécificité de l'amplification avec les couples d'amorces (1-2) et (3-2) et réduit son rendement. Les meilleures conditions d'amplification à partir de l'ADN génomique de *M. grisea* ont donc été obtenues à une température d'hybridation des amorces des premiers cycles de PCR de 50°C, avec le couple d'oligonucléotides (1-2).

1.1.3. Clonage d'un fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* amplifié par PCR dans le plasmide pGEM-T-easy

Le fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *M. grisea*, avec le couple d'amorces (1-2), à une température d'hybridation des amorces de 50°C pendant 3 cycles, puis 55°C pour les autres cycles d'amplification. Ce produit de PCR, d'environ 680 pb, est purifié après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose puis cloné dans le plasmide pGEM-T-easy. Les colonies bactériennes obtenues après transformation et grâce à un système de sélection blanc/bleu (X-Gal) montraient trois phénotypes différents : blanches, bleues et blanches avec le centre de la colonie bleu (nommées colonies blanc/bleu). 30 colonies de différents phénotypes ont été analysées par PCR en utilisant les amorces universelles Sp6 et T7 qui s'hybrident de part et d'autre du site de clonage du plasmide pGEM-T-easy. Les 20 colonies blanches et les 10 colonies blanc/bleu sont positives. En effet, à partir de ces colonies, un fragment d'ADN a

WO 03/022056

15

PCT/FR02/03073

été amplifié à la taille attendue (810 pb) qui correspond à la taille de l'insert (680 pb) additionné de la distance séparant l'insert de chacune des amorces Sp6 et T7 (129 pb). Deux clones de phénotypes différents, blanc et blanc/bleu, ont alors été choisis afin d'être séquencés. Ce sont les clones n°4 (blanc) et n°20 (blanc/bleu).

5 1.1.4. Analyse de la séquence du fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* cloné

La comparaison des séquences nucléotidiques des deux clones n°4 et n°20 a montré qu'ils correspondent à un même fragment d'ADN cloné dans des orientations différentes dans le plasmide pGEM-T-easy, ce qui pourrait expliquer leur différence phénotypique (blanc et blanc/bleu). La séquence nucléotidique double brin de ce fragment cloné a ainsi été
10 obtenue. L'homologie de cette séquence nucléotidique avec celles codant pour des protéines connues a été recherchée grâce au programme Blastx de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ce programme compare les séquences traduites des six phases de lecture d'une séquence nucléotidique à l'ensemble des séquences protéiques contenues dans les bases de données. Une homologie significative entre la séquence nucléotidique du
15 fragment cloné et la séquence protéique de l'isoméroréductase de *N. crassa* (erreur de e-102) a été identifiée. Le pourcentage d'identité en acides aminés au sein de région définie par le logiciel pour comparer ces deux séquences est de 94 %. Le fragment cloné dans le plasmide pGEM-T-easy correspond donc au fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea*. Bien que la séquence du fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* et celle du gène *ILV5*
20 de *N. crassa* présentent une forte homologie, une différence au centre de la séquence du gène *ILV5* de *M. grisea* existe. Cette différence pourrait correspondre à la présence d'un intron au sein de la séquence de *M. grisea*, puisqu'un intron de 77 pb existe chez *N. crassa* à cette position. La position et la séquence de cet intron ont été recherchées. Un motif consensus d'épissage en 5' a été identifié dans la séquence nucléotidique du fragment
25 interne du gène *ILV5* de *M. grisea*, ainsi qu'un motif consensus d'épissage en 3' et une séquence lariat. L'intron putatif (86 pb) du fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* a donc été identifié. L'épissage de l'intron de la séquence du fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* permet d'obtenir un fragment d'ADNc " théorique ". Le fragment de la séquence protéique de l'isoméroréductase de *M. grisea* alors déduit de cet ADNc
30 " théorique ", a été comparé avec celle de l'isoméroréductase de *N. crassa*, montrant une très forte identité entre les séquences primaires de ces deux enzymes (figure 1).

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

16

1.2. Criblage d'une banque cosmidique de *M. grisea* avec une sonde du gène *ILV5* de *M. grisea*

1.2.1. Construction de la sonde homologue du gène *ILV5* de *M. grisea*

Un fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* a été amplifié par PCR, à partir du clone n°4, à l'aide des amorces 13U et 549L définies à partir de la séquence du gène *ILV5* cloné dans le plasmide pGEM-T-easy. Ce fragment, après purification sur gel d'agarose, a été utilisé comme matrice pour réaliser une sonde du gène *ILV5* marquée.

1.2.2. Criblage de la banque cosmidique Guy11 de *M. grisea* par PCR à l'aide d'amorces spécifiques du gène *ILV5* de *M. grisea*

La banque cosmidique Guy11 est représentée sous forme de 28 pools de 96 minipréparations d'ADN correspondant aux 96 cosmides différents présents dans une plaque 96 puits (2688 clones). Le gène *ILV5* de *M. grisea* a été recherché dans cette banque cosmidique en réalisant une amplification PCR sur ces pools de minipréparations d'ADN à l'aide des amorces 300U et 549L définies à partir de la séquence connue du gène *ILV5*. Un fragment de taille attendue (249 pb) a été amplifié à partir des pools n°17 ; 19 ; 20 ; 21 ; 27 ; 28 et 29. La recherche du gène *ILV5* a été poursuivie en hybridant avec la sonde du gène *ILV5* les cosmides des plaques n°17 ; 19 ; 20 ; 21 ; 27 ; 28 et 29.

1.2.3. Criblage de la banque cosmidique Guy11 de *M. grisea* par hybridation avec la sonde homologue du gène *ILV5* de *M. grisea*

Les colonies bactériennes issues des plaques n°17 ; 19 ; 20 ; 21 ; 27 ; 28 et 29 ont été répliquées sur membranes de Nylon et hybridées avec la sonde du gène *ILV5* de *M. grisea*. Cette hybridation a permis de sélectionner les cosmides G6 et A7 des plaques n°20 et 27, respectivement et les cosmides B5 et B6 de la plaque n°29.

1.2.4. Caractérisation du gène *ILV5* de *M. grisea* à partir du cosmide 20/G6

25 a) Séquençage du gène *ILV5* de *M. grisea* à partir du cosmide 20/G6

Le séquençage du gène *ILV5* a été effectué par étapes. La première réaction de séquence a été réalisée à l'aide d'amorces divergentes choisies à partir de la séquence connue du fragment interne du gène *ILV5* de *M. grisea* obtenu par PCR. A partir de cette nouvelle séquence du gène *ILV5*, de nouvelles amorces ont été définies pour réaliser d'autres réactions de séquence et ceci jusqu'à ce que le gène *ILV5* de *M. grisea* ait été entièrement séquencé. Les séquences traduites à partir la séquence nucléotidique entière du gène *ILV5* selon les 6 phases de lecture sont comparées avec la séquence protéique de l'isoméroréductase de *N. crassa*, afin de repérer la position de l'ATG initiateur de la traduction, du codon STOP de terminaison de la traduction, et des différents introns

WO 03/022056

17

PCT/FR02/03073

possibles. Ainsi, l'ATG initiateur de la traduction a été identifiée sur la séquence nucléotidique du gène *ILV5* et sert de référence (+1) à partir de laquelle les autres éléments de la séquence sont positionnés. Trois introns putatifs ont été repérés dans la séquence nucléotidique du gène *ILV5* de *M. grisea*. Le premier intron serait localisé entre les positions (en pb) 199 et 280, le deuxième intron en position 314-390 et le troisième intron serait situé entre les positions 670 et 755 du gène *ILV5* de *M. grisea*. Le codon STOP de terminaison de la traduction serait en position 1449 de la séquence du gène *ILV5* de *M. grisea*. L'isolement de l'ADNc du gène *ILV5* de *M. grisea* a été entrepris, afin de vérifier la position des introns suspectés par la comparaison des séquences protéiques de *M. grisea* et de *N. crassa*.

b) Isolement de l'ADNc du gène *ILV5* de *M.grisea* et recherche des introns du gène de *M.grisea*

L'ADNc du gène *ILV5* de *M. grisea* a été isolé en réalisant une amplification PCR à partir d'une banque d'ADNc de l'isolat P1.2 (ARN de mycélium cultivé en milieu complet) à l'aide des oligonucléotides définis à partir de la séquence du gène *ILV5* : les oligonucléotides 22U et 1603L. L'oligonucléotide 22U est situé avant l'ATG initiateur de la traduction et l'oligonucléotide 1603L est situé 93 pb après le codon STOP de terminaison de la traduction. Deux fragments sont amplifiés avec ce couple d'amorces : un fragment de taille inférieure à 500 pb et un fragment amplifié à la taille attendue soit 1.6 kb. Le fragment amplifié à la taille attendue est purifié après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose et cloné dans le plasmide pGEM-T-easy. Les 24 colonies bactériennes obtenues après transformation sont analysées par PCR à l'aide du couple d'amorces 22U et 1603L. Ces 24 clones possèdent l'ADNc du gène *ILV5* de *M. grisea*, car un fragment d'ADN a en effet été amplifié à la taille attendue (1.6 kb). Le clone n°18 a été choisi afin d'être séquencé à l'aide des amorces universelles Sp6 et T7. La comparaison de la séquence nucléotidique de l'ADNc et du gène *ILV5* nous a permis de déterminer la position exacte des introns. Les trois introns sont localisés aux positions prédites par la comparaison des séquences protéiques des isoméroréductases de *N. crassa* et des traductions du gène *ILV5* de *M. grisea*. Chez *N. crassa*, le gène *ILV5* possède 4 introns positionnés différemment et de longueurs différentes par rapport au gène *ILV5* de *M. grisea*.

c) Séquence protéique de l'isoméroréductase de *M.grisea* déduite de l'ensemble des données acquises sur le gène *ILV5* de *M.grisea*

La séquence protéique du gène *ILV5* de *M. grisea* a été déduite de la séquence de l'ADNc de ce gène. La comparaison des séquences protéiques des isoméroréductases de *M.*

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

18

grisea, de *N. crassa* et de *S. cerevisiae* montre une très forte identité entre les isoméroréductases de ces trois espèces. En effet, le pourcentage d'identité entre les séquences des isoméroréductases de *M. grisea* et de *N. crassa* est de 86 %. Celui entre les isoméroréductases de *M. grisea* et de levure est de 70 % et celui entre les isoméroréductases de *N. crassa* et de levure est de 72 % (figure 1). *N. crassa* et *M. grisea* sont des espèces fongiques très proches (pyrenomycètes), ce qui pourrait expliquer le pourcentage d'identité élevé entre les isoméroréductases de ces deux espèces.

d) Etude de l'expression de l'isoméroréductase de *M. grisea* chez ce champignon soumis à différentes conditions de stress

Les ARN totaux de *M. grisea* provenant de mycélium soumis à différentes conditions de stress ont été extraits puis transférés sur membrane avant d'être hybridés avec la sonde homologue du gène *ILV5* de *M. grisea*. Le gène *ILV5* est exprimé de façon constitutive. Il est ainsi exprimé au même niveau lors d'un stress hyperosmotique ou d'une carence nutritionnelle azotée ou d'une induction par l'AMPc, d'un choc thermique ou d'un stress oxydatif. Il n'est cependant pas exprimé lors d'une carence nutritionnelle carbonée.

Exemple 2: Disruption du gène *ILV5* de *Magnaporthe grisea*

Après l'isolement et la caractérisation du gène *ILV5*, l'objectif était d'obtenir des mutants du gène *ILV5* de *M. grisea* pour tester leur pouvoir pathogène. La technique utilisée pour disrupter le gène *ILV5* est la mutagenèse insertionnelle par transposition *in vitro*.

2.1. Sous-clonage du gène *ILV5* de *M. grisea* dans le plasmide pBC SK +

Le sous-clonage du gène *ILV5* est réalisé dans le plasmide pBC SK + avant la mutagenèse insertionnelle par transposon. Le cosmide 20/G6 contenant le gène *ILV5* est porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline, il ne peut donc pas être utilisé directement comme cible pour la mutagenèse insertionnelle. En effet, une double sélection par la kanamycine et l'ampicilline ne serait pas assez sélectifs des plasmides cibles ayant intégré le transposon, car le plasmide donneur de transposon (pGPS3 Hygro^R) est également résistant à la kanamycine et à l'ampicilline. Le gène *ILV5* a donc été sous-cloné dans un plasmide porteur d'un gène de résistance au chloramphénicol, le plasmide pBC SK+. Les clones ayant intégré le transposon au niveau du plasmide cible (pBC SK+ porteur du gène *ILV5*) pourront être sélectionnés pour leur double résistance à la kanamycine et au chloramphénicol. De plus, la taille de l'insert cosmétique est trop importante (40 kb). Nous avons choisi un fragment d'environ 15 kb contenant le gène *ILV5* sous-cloné dans le plasmide pBC SK+. En effet, la probabilité que le transposon s'intègre dans le gène *ILV5* est plus importante

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

19

lorsque la taille du fragment portant le gène *ILV5* est réduite. La longueur du gène *ILV5* est d'environ 3 kb, la probabilité que le transposon s'intègre dans le gène présent au niveau du cosmide (46 kb) est de 6.5 %, alors que la probabilité d'intégration du transposon dans le gène *ILV5* sous-cloné dans le plasmide pBC SK+ (18 kb) est environ 3 fois plus élevée, soit environ 17 %. Le sous-clonage du fragment d'ADN génomique portant le gène *ILV5* a été réalisé en positionnant ce gène au centre de l'insert. Ce type de construction facilite l'intégration du gène *ILV5* muté dans le génome de *M. grisea* par recombinaison homologue. La cartographie de la région du cosmide 20/G6 portant *ILV5* a permis de choisir un fragment *Clal*-*Clal* de 15 kb dans lequel le gène *ILV5* est relativement bien centré. En effet, le gène *ILV5* est encadré en 5' par 5 kb de la séquence génomique et en 3' par 5.5 kb. Après digestion du cosmide 20/G6 par *Clal*, le fragment de 15 kb contenant le gène *ILV5* a été purifié après séparation sur gel d'agarose et sous cloné dans le plasmide pBC SK+. 24 colonies obtenues après transformation ont été analysées par PCR à l'aide du couple d'amorces 22U et 1603L spécifiques du gène *ILV5*. Les 5 clones amplifient un fragment à la taille attendue (1.6 kb) possèdent le gène *ILV5*. Le clone n°19 a été choisi pour réaliser la mutagenèse insertionnelle par transposition *in vitro* du gène *ILV5*.

2.2. Mutagenèse insertionnelle par transposition *in vitro* du gène *ILV5* de *M. grisea*

La mutagenèse insertionnelle par transposition *in vitro* du gène *ILV5* de *M. grisea* a été réalisée avec le kit GPSTM (New England Biolabs) à partir du clone n°19. Le plasmide pGPS₃ Hygro^R, qui porte un gène de résistance à la kanamycine et à l'hygromycine au niveau du transprimer, est utilisé comme donneur de transposon. Le plasmide pBC SK+, porteur du gène *ILV5* et du gène de résistance au chloramphénicol, correspond au plasmide cible. Une fois la mutagenèse insertionnelle réalisée, des bactéries DH5α thermocompétentes ou des bactéries DH10B électrocompétentes sont transformées avec le "mélange de mutagenèse". Après transformation, les clones bactériens possédant une intégration du transposon au niveau du plasmide cible pBC SK+ sont sélectionnés grâce à leur résistance à la fois à la kanamycine et au chloramphénicol. Cette double résistance pourrait également être conférée aux clones bactériens possédant à la fois le plasmide cible et le plasmide donneur intacts. Une destruction du plasmide donneur par digestion avec l'enzyme *Pi-SceI* permet de palier à ce problème. Afin de déterminer si le transposon s'est intégré au niveau du gène *ILV5* de *M. grisea*, les clones bactériens sélectionnés sont analysés par PCR à l'aide du couple d'amorces 22U et 1603L, situées de part et d'autre de la région codante du gène *ILV5*. En effet, lorsque le transposon Tn7 s'insère au niveau du gène *ILV5*, il n'y a pas d'amplification avec le couple d'amorces 22U et 1603L, puisque la

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

20

taille du fragment d'ADN situé entre ces 2 amorces est trop élevée pour être amplifiée (4.3 kb). Cette taille correspond à la somme de la taille de la région codante du gène *ILV5* de *M. grisea* (1.6 kb) et du transposon Tn7 de 2.7 kb. Après transformation des cellules DH5 thermocompétentes, une absence d'amplification a été observée pour 4 colonies (clones n°3 ; 4 ; 8 ; 18) sur 32 colonies testées (12.5 %). Ces clones bactériens possèdent donc une insertion du transposon au niveau du gène *ILV5*. Après transformation des cellules DH10B électrocompétentes, sur 38 colonies testées par PCR, une seule (2.6 %) présente une absence d'amplification (clone n°29). Les clones bactériens n°3 ; 8 ; 18 et 29 ont été séquencés à l'aide d'amorces divergentes Tn7L et Tn7R situées à chaque extrémité du transposon, afin de localiser la position exacte du site d'insertion du transposon Tn7 au sein de la séquence du gène *ILV5*. Le transposon s'est intégré 21 pb avant l'ATG pour le clone n°18, 9 pb après l'ATG pour le clone n°8, 809 pb après l'ATG pour le clone n°3 et 1176 pb après l'ATG pour le clone n°29. Nous avons choisi le clone n°8 pour la transformation de *M. grisea*. En effet, chez ce clone, le transposon s'est intégré au début de la région codante du gène *ILV5* de *M. grisea* (+ 9 pb après l'ATG), entraînant une inactivation du gène *ILV5*.

2.3.Transformation de la souche P1.2 de *M. grisea* par le gène *ILV5* de *M. grisea* disrupté dans sa région codante

L'insert du clone n°8 contenant le gène *ILV5* de *M. grisea* disrupté dans sa région codante (9 pb après l'ATG) est ressorti du plasmide par une digestion avec l'enzyme *ClaI* et purifié sur gel d'agarose. Il correspond à la construction linéarisée. Le plasmide pBC SK + provenant du clone n°8 non digéré correspond à la construction "circulaire". La transformation des protoplastes de la souche P1.2. de *M. grisea* est réalisée soit avec 5 µg de la construction linéarisée, soit avec 4 µg de la construction "circulaire". Le témoin positif de transformation est réalisé en utilisant 3 µg de plasmide PCB1003 porteur d'un gène de résistance à l'hygromycine et le témoin négatif est réalisé sans ADN. 62 transformants sont obtenus pour la construction linéarisée et 24 pour la construction "circulaire". Ces 86 transformants ont été repiqués sur milieu complet supplémenté en hygromycine à 120 mg/l et sur milieu minimum supplémenté en hygromycine à 120 mg/l ou à 60 mg/l. Ce type de repiquage permet d'identifier les transformants *ilv5*⁻ qui sont auxotrophes pour la leucine, la valine et l'isoleucine et par conséquent qui ne poussent pas sur milieu minimum. 8 transformants seraient auxotrophes sur les 62 (13 %) obtenus avec la construction linéarisée, alors que 2 transformants sur 24 (8.3 %) le seraient avec la construction "circulaire". La meilleure efficacité d'obtention de mutants *ilv5*⁻ avec la construction linéarisée par rapport à la construction "circulaire" pourrait s'expliquer par le fait que la recombinaison

WO 03/022056

21

PCT/FR02/03073

homologue est facilitée avec une construction linéarisée. Ces transformants sont repiqués sur milieu " farine de riz " afin de les faire sporuler, puis les spores sont étalées sur milieu complet TNKYE glucose et mises à germer afin de réaliser un isolement monospore. Les monospores sont repiquées sur milieu TNKYE glucose supplémenté en hygromycine à 120 mg/l afin de purifier les transformants. Une identification des transformants auxotrophes est réalisée en effectuant des repiquages de ces colonies issues de ces monospores sur milieu minimum, sur milieu minimum supplémenté en leucine, en valine et en isoleucine à 0.3 mM et sur milieu complet TNKYE glucose. Ainsi, des transformants génétiquement purifiés et stables ont été obtenus. Sur 10 transformants potentiels auxotrophes pour la leucine, la valine et l'isoleucine, 8 (80 %) se sont révélés effectivement auxotrophes. Les 2 transformants non auxotrophes devaient correspondre à un mélange de populations génétiquement différentes (ilv5⁺ et ilv5⁻) qui a évolué vers une majorité d'ilv5⁺ lors de la croissance du transformant sur milieu non sélectif avant purification monospore.

Exemple 3: Caractérisation phénotypique des transformants *ilv5*⁻ de *Magnaporthe grisea* auxotrophes pour la leucine, la valine et l'isoleucine et étude de leur pouvoir pathogène

3.1. Effet de la disruption du gène *ILV5* sur la croissance et le développement des transformants de *M.grisea*

Le développement des transformants *ilv5*⁻ a été testé sur différents milieux de culture. Ainsi, sur milieu minimum nitrate, les transformants *ilv5*⁻ sont incapables de pousser, alors que leur croissance est possible sur milieu minimum supplémenté en valine, leucine et isoleucine à 0.3 mM. Le développement des transformants *ilv5*⁻ sur milieu minimum + valine, leucine et isoleucine à 0.3 mM est cependant différent de celui de la souche sauvage P1.2 de *M. grisea*. Leur croissance est en effet ralentie et leur mycélium est gris-vert, ras et sporulant et non pas aérien comme pour la souche sauvage. La présence de leucine n'est pas nécessaire à la croissance des transformants *ilv5*⁻, puisque les résultats obtenus sur milieu minimum supplémenté en isoleucine et valine à 0.3 mM sont identiques à ceux obtenus sur milieu minimum supplémenté en leucine, valine et isoleucine à 0.3 mM.

Le développement des transformants *ilv5*⁻ sur milieu minimum supplémenté en valine et isoleucine à 0.3 mM peut être amélioré en supplémentant le milieu minimum avec une concentration finale en valine et en isoleucine de 1 mM. Sur milieu complet, les transformants *ilv5*⁻ présentent un phénotype peu différent de la souche sauvage : leur mycélium est gris-blanc plus ou moins aérien (moins aérien que la souche sauvage). L'ajout

WO 03/022056

22

PCT/FR02/03073

de panthotéine, forme oxydée du panthoténate qui intervient dans la biosynthèse de la leucine, à 1 mg/l au milieu minimum + valine et isoleucine à 0.3 mM n'améliore pas le développement des transformants *ilv5⁻*. La sporulation des transformants *ilv5⁻* est plus lente et dix fois moins importante sur milieu gélosé "farine de riz" par rapport à la souche

- 5 sauvage. La sporulation des transformants *ilv5⁻* est presque identique à la souche sauvage lorsque la valine et l'isoleucine sont ajoutées au milieu gélosé "farine de riz" à une concentration finale de 1 mM.

3.2. Tests du pouvoir pathogène des mutants auxotrophes *ilv5⁻* sur feuilles d'orge découpées en survie

- 10 Les tests du pouvoir pathogène des transformants *ilv5⁻* de *M. grisea* ont été réalisés en badigeonnant ou en déposant des gouttes de suspension de spores des transformants à tester sur des feuilles d'orge découpées. Une inoculation est réalisée à l'aide d'un coton tige humide trempé dans une suspension de spores (3.10^4 spores/ml en général) et utilisé pour badigeonner les fragments de feuilles d'orge en survie (sur milieu eau gélosée 1 %, kinétine
- 15 2 mg/l). L'autre type d'inoculation consiste à déposer des gouttes de 30 µl en trois endroits différents de la surface des feuilles d'orge. Les symptômes sont observés après 5 à 9 jours d'incubation à 26°C.

Les lésions provoquées par ces mutants sont de taille plus réduite que pour la souche sauvage et leur nombre est réduit de 75 % (voir tableau 1 ci-dessous).

- 20 **Tableau 1: Test du pouvoir pathogène des transformants *ilv5⁻* sur feuilles d'orge en survie**
Nombre de lésions provoquées par les transformants de *M. grisea* sur feuilles d'orge ou en test en badigeon, 5 jours après inoculation (L41 et L21) et 7 jours après inoculation (L57, L64, L71, L85).

A) Suspension de spores des transformants préparés à 3.10^4 spores.ml⁻¹

25

Transformants	Nombre moyen de lésions par feuille
L57 (<i>ilv5⁻</i>)	4
L64(<i>ilv5⁻</i>)	4
L71(<i>ilv5⁻</i>)	1 (-80%)
L85(<i>ilv5⁻</i>)	1 (-80%)

B) Suspension de spores des transformants préparés à 10^5 spores.ml⁻¹

Transformants	Nombre moyen de lésions par feuille
L41 (<i>ilv5⁻</i>)	10
L21(<i>ilv5⁻</i>)	2 (-80%)

Les lésions provoquées par les mutants *ilv5⁻* sont en outre atypiques et leur apparition plus tardive. Elles apparaissent après 6 à 9 jours d'incubation à 26 °C, contre 4 à 9 jours pour la souche sauvage (voir tableau 2 ci-dessous).

- 5 Certaines lésions provoquées par les transformants *ilv5⁻* apparaissent aux extrémités des feuilles d'orge (tableau 2). Des blessures au niveau des extrémités des feuilles pourraient expliquer ces lésions, car elles pourraient faciliter la pénétration du champignon. Des tests du pouvoir pathogène sur plante entière ont par conséquent été réalisés, afin d'une part de confirmer l'existence d'une réduction du pouvoir pathogène des transformants *ilv5⁻* et d'autre
- 10 part d'estimer la réduction de la pathogénie des mutants *ilv5⁻* et l'importance des blessures pour la pénétration du champignon *ilv5⁻*.

Tableau 2: Evolution des symptômes provoqués par les transformants de *M.grisea* sur feuilles d'orge en survie

Transformants	Test en gouttes		Test en badigeon	
	4 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour
L71 (<i>ilv5⁻</i>)	Absence de lésion	Lésions atypiques	Absence de lésion	Absence de lésion (sauf aux extrémités de la feuille)
L73 (<i>ilv5⁻</i>)	Absence de lésion	Quelques rares lésions	Absence de lésion	Absence de lésion
L85 (<i>ilv5⁻</i>)	Une lésion	Lésions atypiques	Rares lésions	Rares lésions atypiques
L63 (<i>ilv5⁻</i>)	Absence de lésion	Lésions atypiques	Absence de lésion	Absence de lésion
L64 (<i>ilv5⁺</i>)	Lésions sporulantes	Lésions sporulantes grises	Quelques lésions sporulantes	Lésions sporulantes grises

15 3.3. Tests du pouvoir pathogène des mutants auxotrophes *ilv5⁻* sur plante entière

- Les tests du pouvoir pathogène des transformants *ilv5⁻* ont été réalisés en pulvérisant une suspension de spores (10^4 et 3.10^4 spores.ml⁻¹) de ces transformants sur des plants d'orge. De la gélatine à une concentration finale 0.5 % (p/v) est ajoutée à cette suspension de spores pour permettre une meilleure adhésion des spores à la surface des feuilles. Les
- 20 plantes sont placées une nuit en chambre humide après l'inoculation. Les symptômes sont observés généralement après 5 à 10 jours d'incubation à température ambiante pour l'orge.

Une réduction notable des symptômes de la pyriculariose sur orge est observée chez les transformants *ilv5⁻* par rapport au transformant *ilv5⁺*. Après 10 jours d'incubation à température ambiante, le nombre de lésions par feuille (d'environ 12 cm) varie de 6 à 9 pour

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

24

les transformants *ilv5⁻* (L87, L74 et C24) contre 37 en moyenne pour le transformant L57 *ilv5⁺* (voir tableau 3). Le nombre de lésions provoquées par les mutants *ilv5⁻* est donc réduit de 80 % par rapport à celui obtenu avec la souche sauvage. De plus, la taille des lésions est deux fois plus petite pour les mutants *ilv5⁻* que pour le transformant *ilv5⁺* (6 mm² contre 13 mm²), et ces lésions apparaissent deux fois plus lentement. En effet, le nombre de lésions a doublé pour les mutants *ilv5⁻* entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour d'expérience, alors qu'il est resté identique pour le sauvage. L'apparition de certaines lésions provoquées par les transformants *ilv5⁻* aux extrémités des feuilles d'orge en survie suggéraient que la pénétration du champignon pouvait être facilitée par les blessures infligées aux feuilles d'orge au cours du test de pathogénie. Cependant, les résultats des tests de pathogénie menés sur les transformants *ilv5⁻* sur plante entière, montrent clairement une réduction du pouvoir pathogène de ces mutants du même ordre (80 %) que sur feuilles d'orge en survie.

Tableau 3 : Test du pouvoir pathogène des transformants *ilv5⁻* sur plante entière (orge)

L'inoculation des plants d'orge a été effectuée en pulvérisant une suspension de spores (3.10^4 spores.ml⁻¹) des transformants dont on souhaite tester le pouvoir pathogène. Les plantes ont été placées une nuit en chambre humide après l'inoculation. Les symptômes ont été observés après 10 jours d'incubation à température ambiante. Les pourcentages de réduction du nombre et de la taille des lésions par feuille, calculés par rapport aux valeurs obtenues pour le transformant L57 (*ilv5⁺*), sont indiqués entre parenthèses.

Transformants	Nombre moyen de lésions par feuille d'orge de 12cm	Taille moyenne des lésions (en mm ²)
L57 (<i>ilv5⁺</i>)	37 ± 9	13
L87 (<i>ilv5⁻</i>)	9 ± 2 (- 75%)	6 (- 50 %)
C24 (<i>ilv5⁻</i>)	6 ± 2 (- 83 %)	4 (- 70 %)
L74 (<i>ilv5⁻</i>)	8 ± 3 (- 80 %)	6 (- 50 %)

Exemple 4: Effet fongicide des inhibiteurs de l'acétohydroxy isoméroréductase

25

4.1 Effet fongicide des inhibiteurs de l'acétohydroxy isoméroréductase sur le champignon phytopathogène *Magnaporthe grisea*

L'effet fongicide des inhibiteurs diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate et N-hydroxy-N-isopropylloxamate a été testé sur le champignon pathogène *M. grisea* en suivant

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

25

l'évolution de la croissance de ce champignon en présence de différentes concentrations en inhibiteur, sur une période de 7 jours. Ainsi, un milieu de culture donné (milieu minimum nitrate (MM) ; MM + leucine, valine et isoleucine à 0.3 mM; milieu complet TNKYE glucose (MC) ; MC + leucine, valine et isoleucine à 0.3 mM) est inoculé avec une

- 5 suspension de spores de la souche P1.2 de *M. grisea* à une concentration finale de 10^5 spores/ml. Une gamme de dilutions du produit à tester, le N-hydroxy-N-isopropylloxamate (à pH 5), est préparée dans de l'eau tel que le produit soit 100 X concentré. 200 µl de milieu inoculé sont distribués dans une microplaque 96 puits auxquels sont additionnés 2 µl de produit 100X concentré. Le N-hydroxy-N-isopropylloxamate est testé à des doses finales de
 10 3 ; 1 ; 0.3 ; 0.1 ; et 0.03 µM en milieux minimums et 3 et 0.3 µM en milieux complets. La microplaque est incubée à température ambiante et la lecture de la densité optique à 630 nm de cette microplaque permet de suivre la croissance du champignon dans ces différentes conditions de culture aux temps 0 (début du test) et aux jours 3, 4, 5, 6 et 7.

- Ce test a été réalisé en inoculant différents milieux de culture avec une suspension de
 15 spores de la souche sauvage P1.2 de *M. grisea*. Les premières expériences ont été réalisées en milieu minimum nitrate (MM) et différentes concentrations en inhibiteur ont été testées. Il faut attendre le 6^{ème} et le 7^{ème} jour de croissance avant de voir apparaître une inhibition significative de la croissance en milieu MM en présence de diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate à 2 mM. La croissance est en effet réduite de 50 % par rapport à celle du
 20 témoin sans inhibiteur. En présence de l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate (0.3 à 1µM), dès le 3^{ème} jour, une inhibition d'environ 50 % de la croissance du champignon est observée en milieu MM. L'inhibition plus importante de la croissance de *M. grisea* par le N-hydroxy-N-isopropylloxamate par rapport au diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate nous a amené à approfondir l'étude de cet inhibiteur.

- 25 Des tests de croissance du champignon *M. grisea* ont été effectués sur une période de 7 jours, en présence de l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate (à des concentrations variant de 0.03 µM à 3 µM) dans différents milieux (MM et MM supplémenté en leucine, valine et isoleucine à 0.3 mM). En milieu minimum, le N-hydroxy-N-isopropylloxamate inhibe fortement la croissance de *M. grisea*. Cette inhibition de croissance par le N-
 30 hydroxy-N-isopropylloxamate (dès 0.3 µM) est observée à partir du 3^{ème} jour de croissance, et reste similaire les jours suivants (Figure 2). Nous avons donc choisi de calculer la DI_{80} (concentration en inhibiteur telle que l'inhibition de la croissance du champignon est de 80 %) et la DI_{50} (concentration en inhibiteur telle que l'inhibition de la croissance est de 50 %) au 5^{ème} jour de croissance. Ainsi, la croissance du champignon *M. grisea* est réduite de 80 %

WO 03/022056

26

PCT/FR02/03073

par rapport au témoin non traité, à une concentration en N-hydroxy-N-isopropylloxamate de 1 μM (DI_{50}). Une concentration en N-hydroxy-N-isopropylloxamate de 0.3 μM (DI_{50}) inhibe la croissance du champignon de 50 % (tableau 4).

5 **Tableau 4 : Etude de l'effet de l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate sur la croissance du champignon *M. grisea***

N-hydroxy-N-isopropylloxamate en μM	0 (témoin)	0.03	0.1	0.3	1	3
Milieu Minimum (MM)	100	92	89	72	56	13
MM + ILV	100	77.5	83.5	81	72.5	71.5

L'effet de l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate a été testé sur le champignon pathogène *M. grisea* en suivant l'évolution de la croissance de ce champignon en présence de différentes concentrations en inhibiteur, dans différents milieux de culture et sur une période de 7 jours. Les valeurs données dans le tableau correspondent aux pourcentages moyens de croissance du champignon *M. grisea* obtenus au 5^{ème} jour de croissance à partir de deux essais. Le témoin (souche sauvage de *M. grisea*) correspond à un taux de croissance de 100 %. 200 μl de milieu de culture, milieu minimum (MM) ou milieu minimum + leucine, valine et isoleucine à 0.3 mM (MM + ILV), ont été inoculé avec une suspension de spores de la souche P1.2 de *M. grisea* à une concentration finale de 10^5 spores. ml^{-1} . La microplaque a été incubée à température ambiante et la densité optique à 630 nm (DO_{630}) a été mesurée aux jours 0, 3, 4, 5, 6 et 7 (JO, J3, J4, J5, J6 et J7).

En supplémentant le milieu minimum en valine, leucine et isoleucine à 0.3 mM, la toxicité du N-hydroxy-N-isopropylloxamate sur la croissance du champignon *M. grisea* est levée, quelle que soit la concentration de N-hydroxy-N-isopropylloxamate utilisée. Cette levée de toxicité du N-hydroxy-N-isopropylloxamate par l'addition de valine, de leucine et d'isoleucine au milieu minimum montre que cette toxicité provient d'une inhibition spécifique de la voie de biosynthèse de ces acides aminés, en inhibant l'isoméroréductase.

En effet, le N-hydroxy-N-isopropylloxamate agissant spécifiquement sur l'isoméroréductase de *M. grisea*, inhibe fortement la croissance de *M. grisea* à très faibles

WO 03/022056

27

PCT/FR02/03073

concentrations. L'isoméroréductase et l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate se révèlent être un bon couple cible/fongicide.

Nous avons aussi cherché à déterminer si l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate avait un effet sur la germination des spores de *M. grisea*. Une observation microscopique des spores de *M. grisea* au cours des expériences réalisées précédemment en milieu minimum, en présence de N-hydroxy-N-isopropylloxamate à 1 et 3 μM aux jours 0 et 2 a montré que la germination des spores n'était pas bloquée. Des tests supplémentaires ont été réalisés, afin de déterminer si à des concentrations élevées, le N-hydroxy-N-isopropylloxamate pouvait bloquer la germination des spores. Ainsi, à 10 mM, le N-hydroxy-N-isopropylloxamate n'inhibe pas la germination des spores de *M. grisea* aussi bien dans l'eau qu'en milieu minimum, à 24 et à 72 heures. L'inhibition de la croissance de *M. grisea* par le N-hydroxy-N-isopropylloxamate ne se manifeste qu'après la germination, lors de la croissance des hyphes. Nous pouvons donc supposer que l'utilisation des réserves en acides aminés (valine et isoleucine) présentes dans la spore pourrait permettre dans un premier temps la germination. La limitation des réserves en acides aminés et leur épuisement plus ou moins rapide pourraient agir comme facteur limitant de la croissance de *M. grisea*.

4.2 Effet fongicide des inhibiteurs de l'acétohydroxy isoméroréductase sur d'autres

20 champignons

Nous avons réalisé des mesures de la toxicité d'IpoHA vis-à-vis d'autres espèces fongiques telles que *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Ustilago nuda* et *Mycosphaerella graminicola* dans les mêmes conditions que pour *M. grisea* (culture en milieu minimum liquide en microplaques à 96 puits). La croissance de *Botrytis cinerea* n'est pas affectée par la plus forte concentration d'IpoHA utilisée (30 μM), ce qui montre que cette espèce est résistante à IpoHA. La croissance d'*Ustilago nuda* et de *Pythium ultimum* est inhibée par IpoHA à partir de 10 μM . Celle de *Mycosphaerella graminicola* est inhibée dès 0,3 μM (tableau 5). Lorsque le milieu minimum (MM-liq) est supplémenté par de l'isoleucine, de la leucine et de la valine (1 mM), la toxicité d'IpoHA est levée pour toutes les espèces fongiques sensibles. Par contre, avec une concentration de 0,3mM, l'inhibition n'est levée chez *Ustilago nuda* que pour les concentrations inférieures à 30 μM d'IpoHA. IpoHA a une forte action sur la croissance de *Mycosphaerella graminicola*.

WO 03/022056

28

PCT/FR02/03073

Tableau 5: Toxicité d'IpOHA pour différentes espèces fongiques

	DI ₅₀	DI ₈₀	Niveau de sensibilité à IpOHA
<i>Botrytis cinerea</i>	/	/	Résistant
<i>Pythium ultimum</i>	30	10	Moyennement sensible
<i>Ustilago nuda</i>	30	3	Moyennement sensible
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	3	1	Sensible
<i>Magnaporthe grisea</i>	3	1	Sensible

DI₅₀ : concentration inhibant la croissance du champignon de 50 %.

5 DI₈₀ : concentration inhibant la croissance du champignon de 80 %.

Exemple 5: Etudes biochimiques de l'acétohydroxy isoméroréductase de *S.cerevisiae*

La séquence codante du gène *ILV5* de levure sans le peptide transit a été surexprimée chez *E.coli* afin d'obtenir de grandes quantités d'enzyme pour faciliter son étude

10 biochimique et en particulier son étude structurale.

La stratégie employée pour l'étude de l'isoméroréductase de levure a été la suivante : le gène *ILV5* de l'isoméroréductase de levure a été dans un premier temps amplifié par PCR sans la partie codant pour le peptide transit. Le produit de la réaction PCR a été ensuite cloné dans un vecteur d'expression pET inductible par l'IPTG. L'isoméroréductase a été

15 ensuite surproduite chez *E. coli*, purifiée puis ses propriétés biochimiques étudiées.

5.1 Amplification par PCR et clonage de la partie du gène *ILV5* de l'isoméroréductase de levure codant pour la protéine mature

Le peptide signal, qui permet l'adressage de l'isoméroréductase de levure dans son

20 compartiment cellulaire, la mitochondrie, est clivé lorsque la protéine a pénétré dans la mitochondrie. Nous avons donc choisi de cloner le gène *ILV5* sans la région codant pour le peptide transit afin de surproduire l'isoméroréductase de levure correspondant à la protéine mature chez *E. coli*.

La région du gène *ILV5* de levure située entre la fin du peptide transit et le codon

25 STOP de terminaison de la traduction a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de *S. cerevisiae* avec les couples d'amorces (1'-3') et (2'-3'). La taille des fragments d'ADN amplifiés avec les couples d'amorces (1'-3') et (2'-3') est de 1079 pb et 1124 pb, respectivement. Ces fragments d'ADN ont été purifiés après séparation par électrophorèse, puis digérés et clonés dans le vecteur PET-23d en *SalI/NcoI*. Une double digestion du

30 vecteur de clonage et du produit de réaction PCR par les enzymes *NcoI* et *SalI* permet en effet le clonage du gène *ILV5* de levure dans la bonne orientation dans le vecteur PET-23d.

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

29

Le plasmide pET-23d (Tebu), porteur du gène de résistance à l'ampicilline, est utilisé comme vecteur d'expression inducible pour produire en grande quantité l'isoméroréductase de levure chez *E. coli*. Ce type de vecteur possède un promoteur du phage T7, qui est reconnu par l'ARN polymérase T7, mais pas par l'ARN polymérase d'*E. coli*. La production de la protéine clonée a lieu après l'induction par l'IPTG de la souche BL21 pLysS (résistante au chloramphénicol) ; chez cette souche bactérienne, le gène de l'ARN polymérase T7 est sous le contrôle du promoteur *lac* inducible par l'IPTG. La souche BL21 pLysS transformée avec le plasmide pET-23d, porteur du gène *ILV5* de *S. cerevisiae* est appelée BL21 pLysS-pET-23d-isoméroréductase. La construction n° 1 correspond au clonage du fragment amplifié avec les amorces (1'-3') et la construction n° 2 au clonage du fragment d'ADN amplifié avec les amorces (2'-3'). Une double digestion *Sall/NcoI* des 12 clones obtenus après transformation des cellules DH5 avec la construction n°1 et des 6 clones transformés avec la construction n°2 permet de ressortir le fragment cloné dans le vecteur pET et de vérifier ainsi la présence d'une des 2 constructions au sein des différents clones. L'analyse des profils de digestion de ces clones bactériens a montré qu'ils possédaient tous la construction correspondante. Deux clones ont été sélectionnés : le clone PET 1-4 (construction n° 1) et le clone PET 2-1 (construction n° 2) ; ils ont été utilisés pour transformer des cellules BL21 pLysS, afin de surproduire l'isoméroréductase de levure chez *E. coli*.

20

5.2 Purification de l'isoméroréductase de levure surproduite chez *E. coli*

La suexpression de la forme " courte " (construction n°1) et de la forme " longue " (construction n°2) de l'isoméroréductase de levure a été induite chez *E. coli* par l'IPTG. La souche bactérienne BL21 pLysS, transformée avec le plasmide pET 23-d contenant le gène *ILV5* de levure sans la région codant pour le peptide transit, est mise en culture à 28°C sous agitation dans du milieu LB supplémenté en carbénicilline (100 mg/l) et en chloramphénicol (30 mg/l) jusqu'à une densité équivalente à une DO_{600} d'environ 0.6. L'IPTG est alors ajouté à une concentration de 0.4 mM finale et les bactéries sont laissées en culture à 28°C sous agitation durant environ 15 heures. Cette culture bactérienne est ensuite centrifugée (30 minutes, 4500 rpm) ; le culot bactérien est resuspendu dans 15 ml de tampon ($KH_2-K_2PO_4$ 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, DTT 1 mM et inhibiteurs de protéase : benzamidine HCl 1 mM, acide amino-caproïque 5 mM) et soniqué par le Vibra-cell disruptor (Sonics and Materials, Danbury, CT, U.S.A) pendant 15 minutes, à puissance

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

30

4, 40 % du temps total de lyse. L'extrait cellulaire est centrifugé (20 minutes, 15000 rpm) ; le surnageant, contenant les protéines solubles, est alors conservé à -80°C .

L'analyse sur gel d'acrylamide des fractions protéiques totales et des fractions protéiques solubles a montré que les formes " courte " et " longue " de l'isoméroréductase de levure sont présentes dans la fraction de protéines solubles et qu'elles représentent environ 25 à 30 % de ces protéines. La position la plus vraisemblable du site de clivage du peptide transit de l'isoméroréductase de levure étant située entre les acides aminés 47 et 48 de la séquence protéique de cette enzyme (Petersen, G.L. et al., NAR 14, 24:9631-9650, 1986), nous avons choisi de continuer à travailler avec la forme courte de l'isoméroréductase de levure.

La purification de la forme courte de l'isoméroréductase a donc été réalisée en deux étapes à partir de la fraction des protéines solubles ; d'abord sur une colonne échangeuse d'anions (Q-Sépharose), puis sur une colonne de perméation (Superdex 75). L'extrait de protéines solubles (15.5 ml ; 227.8 mg de protéines), qui contient l'isoméroréductase de levure (extrait brut) est appliqué sur une colonne échangeuse d'anions, HiLoad 16/10 Q-Sépharose (Pharmacia) connectée à un système F.P.L.C de Pharmacia, préalablement équilibrée avec du tampon $\text{KH}_2\text{-K}_2\text{PO}_4$ 10 mM/EDTA 1 mM/DTT 1 mM. L'enzyme est éluée par 78 ml de ce même tampon (débit = 1 ml/min ; taille des fractions = 3 ml). Les fractions chromatographiques contenant l'isoméroréductase de levure sont concentrées à 1.6 ml par centrifugation à 5500 rpm dans un macrosep-10 unit (filtion). Cet extrait (27.7 mg) est alors appliqué sur une colonne Hiload 16/60 Superdex 75 (Pharmacia) connectée à un système F.P.L.C de Pharmacia, préalablement équilibrée avec du tampon Hépès KOH 25 mM. L'enzyme est éluée par 58 ml de ce même tampon (débit = 1 ml/min ; taille des fractions = 1 ml). Les fractions chromatographiques contenant l'isoméroréductase de levure (18.99 mg) sont concentrées à 9.7 mg/ml par centrifugation à 5500 rpm dans un microsep 10K (filtion) et conservés à -80°C .

Après injection de la fraction des protéines solubles (environ 230 mg) sur la colonne Q-Sépharose, l'isoméroréductase de levure est éluée avec du tampon $\text{KH}_2\text{-K}_2\text{PO}_4$ 10 mM/EDTA 1 mM/DTT 1 mM. Il est en effet inutile d'éluer cette enzyme en faisant agir un gradient de concentration croissante en tampon phosphate puisque des expériences préliminaires ont montré que cette enzyme n'était pas retenue par la colonne. Après cette première étape de purification, environ 30 mg de protéine a été récupéré et le rendement de la purification en terme d'activité est de 55 % (tableau 6).

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

31

Tableau 6 : Etapes de la purification de l'isoméroréductase de levure surexprimée chez *E.coli*

Etapes de la purification	Quantité de protéines (mg)		Activité totale (μmoles de NADPH oxydées.min ⁻¹)	Activité spécifique (Activité totale.mg ⁻¹ de protéines)		Rendement en %
	Bradford	205		Bradford	205	
Extrait brut de protéines solubles	227.82	n.d.	134.16	0.59	n.d.	100
Pool des fractions de la Q-Sépharose	27.72	14.34	73.22	2.64	5.11	54.58
Pool des fractions de la Superdex 75	18.99	8.4	45.85	2.4	5.46	34.18

5

Les activités ont été déterminées dans le milieu réactionnel suivant : Hépès de sodium 50mM, pH 7.5 ; MgCl₂ 10mM ; NADPH 250μM et AHB 0.48mM.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (**Bradford**) ou en mesurant l'absorbance à 205 nm (**205**).

10 n.d. = non déterminé

L'analyse sur gel d'acrylamide du pool des fractions de la Q-Sépharose montre qu'après cette première étape de purification l'enzyme est presque pure. Le pool des fractions de la Q-Sépharose est injecté sur la colonne de gel filtration et l'isoméroréductase de levure est éluée avec du tampon Hépès KOH 25 mM. Après cette 2^{ème} étape de purification, environ 20 mg de protéine pure est récupérée; le rendement final des deux étapes de purification de l'isoméroréductase de levure est d'environ 34 %.

15

5.3 Etudes des propriétés cinétiques de l'isoméroréductase de levure surproduite chez *E. coli*

La détermination des paramètres cinétiques de l'isoméroréductase de levure a été réalisée en suivant l'évolution de la réaction enzymatique au spectrophotomètre en conditions saturantes en magnésium, en NADPH et en substrat AHB ou AL. Toutes les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées dans une cuve en quartz d'un trajet optique de 1 cm contenant du tampon Hépès de sodium (50 mM, pH 7.5), du MgCl₂ 10 mM, du NADPH 250μM, dans un volume final de 1 ml, à 25°C. La réaction enzymatique a été initiée par l'ajout de 0.48 mM d'AHB ou d'AL. L'évolution de cette réaction a été suivie grâce à la décroissance d'absorption du NADPH à 340 nm.

20

25

5.3.1. Détermination du pH optimum d'activité de l'isoméroréductase recombinante de levure purifiée

Afin de déterminer les conditions optimales pour réaliser les mesures cinétiques sur l'isoméroréductase de levure, le pH optimum d'activité de cette enzyme a été déterminé, en mesurant l'activité de l'enzyme purifiée dans des tampons de pH variables. Le pH optimum d'activité de l'isoméroréductase de levure est de 7.5, alors que des études avaient montré que celui de l'isoméroréductase de plante était de 8.2. Cette différence de pH optimum d'activité de l'isoméroréductase entre la plante et la levure s'explique par la localisation cellulaire de ces 2 enzymes. L'isoméroréductase de plante est localisée dans le chloroplaste dont le pH est de 8.2 à la lumière, alors que l'isoméroréductase de levure est située dans la mitochondrie dont le pH est de 7.5. Le pH optimum d'activité de ces isoméroréductases est donc bien adapté à l'environnement cellulaire dans lequel elles se trouvent.

5.3.2. Détermination des paramètres cinétiques de l'isoméroréductase recombinante de levure purifiée

L'affinité de l'isoméroréductase de levure pour ses différents ligands a été étudiée.

a) Activités spécifiques

L'activité spécifique de l'isoméroréductase de levure pour les substrats AHB et AL sont de 6 et 1 $\mu\text{moles de NADPH oxydées} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine, respectivement. Le rapport entre les vitesses maximales (V_m) de réaction enzymatique en présence du substrat AHB par rapport au substrat acétolactate est donc inchangé pour l'enzyme de levure par rapport à celle de plante ($V_m \text{ AHB} / V_m \text{ AL} = 6$). Les activités spécifiques de l'isoméroréductase de plante pour les substrats AHB et AL sont par ailleurs de 6 et 1 $\mu\text{moles de NADPH oxydées} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine, respectivement.

b) Affinités pour les cofacteurs NADPH et NADH

L'affinité de l'isoméroréductase de levure pour le NADPH est très élevée (figure 3). En effet, un K_m pour ce cofacteur de 1.6 μM a été mesuré. Ce K_m est peu différent de celui mesuré pour l'enzyme de plante ($K_m = 5 \mu\text{M}$). La valeur de K_m NADPH obtenue pour l'isoméroréductase de levure purifiée est cohérente avec la valeur obtenue pour l'enzyme de levure partiellement purifiée ($K_m < 2.5 \mu\text{M}$; Hawkes et al., 1989). Cependant, contrairement à l'enzyme de plante, qui est capable d'utiliser du NADH, avec une très faible affinité ($K_m \text{ NADH} = 645 \mu\text{M}$ en présence de AHB et de Mg^{2+} ; Dumas et al., Biochem. J., 288:865-874, 1992), l'enzyme de levure semble être incapable d'utiliser le NADH. Aucune activité enzymatique n'a été détectée en présence de NADH (à 300 μM) en conditions saturantes en substrat AHB et en magnésium, peut-être à cause d'une affinité pour le NADH encore plus

WO 03/022056

33

PCT/FR02/03073

faible que celle de l'isoméroréductase de plante. L'isoméroréductase de levure utiliserait le NADPH comme donneur d'hydrogène avec une spécificité encore plus marquée que l'enzyme de plante.

c) Affinités pour les substrats AHB et AL

- 5 L'affinité de l'isoméroréductase de levure pour le substrat AHB ($K_M = 104 \mu M$ pour la forme racémique) est environ 5 fois plus faible que celle de l'isoméroréductase de plante ; alors que l'affinité de l'isoméroréductase de levure pour le substrat AL ($K_M = 266 \mu M$ pour la forme racémique) est 10 fois plus faible que l'isoméroréductase de plante (**figure 4**). Ces valeurs de K_M sont assez proches de celles obtenues pour l'enzyme partiellement purifiée de
- 10 *N. crassa*. En effet, les K_M AHB et AL pour l'isoméroréductase de *N. crassa* sont de 160 μM et 320 μM respectivement.

La différence de propriétés biochimiques la plus marquante entre l'isoméroréductase de levure et de plante est l'affinité de cette enzyme pour le magnésium.

d) Affinités pour le magnésium

- 15 L'affinité de l'isoméroréductase de levure ($K_M = 968 \mu M$) est en effet 200 fois plus faible que celle de l'enzyme de plante ($K_M = 5 \mu M$ environ). Voir **figure 5**. Cette faible affinité de l'isoméroréductase de levure pour le magnésium pourrait être une caractéristique de l'isoméroréductase de champignon. En effet, les études menées sur l'isoméroréductase de *N. crassa* ont montré que cette enzyme a un K_M magnésium de 580 μM en présence de
- 20 NADPH et du substrat AHB (Kritani et al., J. Biological Chemistry, 241:2047-2051, 1965). La comparaison des séquences primaires des isoméroréductases de levure, de *N. crassa* et de plante a montré que la principale différence entre ces trois enzymes était l'absence au sein de la protéine de champignon d'une séquence de 140 acides aminés impliquée dans l'interaction entre les deux monomères de l'enzyme de plante. Les 2 domaines connus pour
- 25 fixer les ions Mg^{2+} chez l'enzyme de plante sont cependant présents au niveau de l'enzyme de levure. L'étude d'un mutant monomérique de l'isoméroréductase de plante obtenu en délétant 7 acides aminés dans la région de dimérisation de 140 acides aminés a montré que l'enzyme présente une affinité beaucoup plus réduite pour le magnésium ($K_M = 640 \mu M$) que la forme sauvage de l'enzyme (Wessel et al., Biochemistry, 37:12753-12760, 1998). La
- 30 structure quaternaire de l'isoméroréductase de plante jouerait donc un rôle dans la stabilisation du site actif de l'enzyme de plante et des sites de forte affinité pour le magnésium. Ainsi, bien que l'isoméroréductase de levure possède bien les deux domaines de fixation des ions Mg^{2+} , l'absence de la séquence de cette région de 140 acides aminés au sein de l'enzyme de levure pourrait expliquer l'affinité plus réduite de l'isoméroréductase de

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

34

levure pour le magnésium de par l'organisation spatiale du site actif de cette enzyme probablement différente de celle de l'enzyme de plante. Bien que les sites de liaison pour le magnésium de l'isoméroréductase de levure ont une affinité beaucoup plus faible pour ce cation, l'affinité de l'enzyme de levure pour le NADPH est similaire à celle de plante. Nous pouvons donc supposer que la conformation de l'isoméroréductase de levure pourrait être telle que le domaine amino-terminal qui intervient dans la fixation du NADPH est peu différent de celui de l'enzyme de plante et que le domaine carboxy-terminal qui est responsable de la fixation des deux atomes de magnésium et du substrat est différent de celui de l'enzyme de plante. La connaissance de la structure quaternaire de l'isoméroréductase de levure grâce à la cristallisation de l'enzyme permettrait d'expliquer cette faible affinité pour les ions Mg^{2+} .

5.4 Etude de l'effet des inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate sur l'isoméroréductase de levure

5.4.1 Etude de la stoechiométrie de fixation des inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate sur l'isoméroréductase de levure

L'étude de la stoechiométrie de fixation des inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et du diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate a été réalisée en incubant des quantités variables d'enzyme (de 0.1 à 0.4 nmoles) avec une quantité constante en inhibiteur pendant 20 minutes avec 25 nmoles de NADPH et 0.25 μ moles de $MgCl_2$ dans un volume final de 10 μ l. Les réactions sont initiées en ajoutant de l'AHB 0.48mM dans du tampon Hépès de sodium 50 mM, pH 7.5, contenant du $MgCl_2$ 10 mM.

En présence de 0.1 nmoles de diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate, une activité enzymatique n'est détectée qu'avec des quantités d'enzyme supérieures à 0.09 nmoles. De la même manière, en présence de 0.1 nmole de N-hydroxy-N-isopropylloxamate, une activité enzymatique n'est détectée que pour des quantités d'enzyme supérieures à 0.1 nmoles (figure 6). De plus, pour ces deux inhibiteurs, lorsque l'enzyme est en excès par rapport à l'inhibiteur dans le milieu réactionnel, les activités enzymatiques augmentent parallèlement à celles du témoin sans inhibiteur. Le N-hydroxy-N-isopropylloxamate et le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate agiraient donc sur l'isoméroréductase de levure comme des inhibiteurs irréversibles. En effet, dans le cas d'une inhibition irréversible, en présence d'une faible quantité d'enzyme, toute l'enzyme se complexe avec l'inhibiteur. L'activité enzymatique est alors nulle, puisqu'il n'existe plus d'enzyme libre dans le milieu réactionnel. Lorsque la quantité d'enzyme présente dans le milieu réactionnel est supérieure

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

35

à la quantité d'inhibiteur, l'enzyme libre en excès dans le milieu se comporte alors comme le témoin sans inhibiteur (droite parallèle au témoin). Par ailleurs, 0.1 nmoles d'inhibiteur (N-hydroxy-N-isopropylloxamate ou diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate) étant nécessaire pour inhiber entièrement 0.1 nmoles d'enzyme, la stoechiométrie de fixation des inhibiteurs sur l'isoméroréductase de levure est par conséquent de 1 mole d'inhibiteur par mole d'enzyme.

5.4.2 Etude de la vitesse de fixation des inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate sur l'isoméroréductase de levure

L'effet des inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate sur l'isoméroréductase de levure a été suivi au cours du temps en mesurant au spectrophotomètre la décroissance d'absorbance du NADPH à 340 nm. Chaque mesure est réalisée en conditions saturantes en $MgCl_2$ (10 mM) et en NADPH (0.25 mM) pendant une durée de 6 minutes en présence d'une concentration donnée en inhibiteur (N-hydroxy-N-isopropylloxamate = 15 μM ou diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate = 10 μM) et en enzyme (110 nM) ; la concentration en substrat AHB utilisée varie de 250 μM à 2 375 μM . L'étude de la stoechiométrie de fixation des inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate sur l'isoméroréductase de levure a montré que ces inhibiteurs se comportent comme des inhibiteurs irréversibles. L'équation (1) permet donc de décrire la cinétique de formation du produit de la réaction, cette équation étant applicable aux inhibiteurs irréversibles. Les paramètres m_1 , m_2 et m_3 , définis à partir de l'équation (1), sont obtenus directement à partir de l'ajustement des courbes expérimentales par le logiciel KaleidaGraph, ainsi que les erreurs associées à la détermination de ces paramètres.

Equation (1) :

$$DO_{340} = m_1 + (m_2 - m_1) \cdot e^{(-m_3 \cdot t)}$$

où les paramètres sont les suivants :

- . DO_{340} est la densité optique mesurée au spectrophotomètre à 340 nm au temps "t"
- . m_1 la densité optique quand "t" tend vers l'infini
- . m_2 la densité optique initiale
- . m_3 le produit de la concentration en inhibiteur par la constante apparente de disparition du NADPH

Pour une inhibition irréversible, deux cas peuvent se présenter : soit l'inhibiteur se fixe directement en une seule étape sur l'enzyme, soit il se fixe en deux étapes sur l'enzyme en formant un complexe intermédiaire enzyme-inhibiteur réversible. La représentation

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

36

graphique m_3 en fonction de la concentration en inhibiteur permet de définir le type d'inhibition irréversible. Ainsi, pour déterminer si les inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate se fixent en une ou deux étapes sur l'isoméreréductase de levure, l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité enzymatique de cette enzyme est suivi au cours du temps (6 min) en faisant varier la concentration en inhibiteur, pour des concentrations en enzyme (110 nM) et AHB (0.48 mM) données (**figure 7**). Pour une inhibition irréversible simple, sans formation du complexe intermédiaire enzyme-inhibiteur réversible, la vitesse apparente de formation du complexe enzyme-inhibiteur (K_{obs} ou m_3) est une fonction linéaire de la concentration en inhibiteur. Si l'inhibition irréversible implique l'existence d'un complexe intermédiaire réversible, la représentation graphique m_3 en fonction de la concentration en inhibiteur est une hyperbole. Pour les inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate, la représentation graphique m_3 en fonction de la concentration en inhibiteur est linéaire, suggérant que l'inhibition de l'isoméreréductase de levure par ces produits se fait en seule étape (**figure 8**), comme c'est le cas pour l'inhibition de l'isoméreréductase de plante. Cependant, même en tenant compte des erreurs expérimentales, les représentations graphiques m_3 en fonction de la concentration en inhibiteur ne passent pas par l'origine pour les deux inhibiteurs. Ces deux inhibiteurs, N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate, pourraient ne pas être entièrement irréversibles. Dans ce cas, la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur, k_d , pourrait avoir une valeur non négligeable. Le mécanisme d'inhibition (compétitive ou non compétitive) peut être déterminé en étudiant l'effet de la concentration en substrat sur la vitesse apparente de formation du complexe enzyme-inhibiteur. Cette détermination se fait grâce à la représentation graphique $1/m_3$ en fonction de la concentration en substrat. Pour des inhibiteurs de type compétitif, la représentation graphique $1/m_3$ en fonction de la concentration en substrat est linéaire. Pour les inhibiteurs non compétitifs, le paramètre m_3 est indépendant de la concentration en substrat. Pour les inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate, l'inverse de m_3 varie linéairement en fonction de la concentration en substrat AHB. Le N-hydroxy-N-isopropylloxamate et le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate se comportent donc comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat AHB de l'isoméreréductase de levure (**figure 9**). La constante d'association de l'inhibiteur à l'enzyme de levure (k_o) est alors calculée grâce à l'équation (2).

WO 03/022056

37

PCT/FR02/03073

Equation (2) :

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_o \cdot [I]}{1 + \frac{[S]}{K_M^S}} + k_{-o}$$

$k_{\text{obs}} = m_3$ = vitesse apparente de formation du complexe enzyme-inhibiteur

5 k_o = constante d'association de l'inhibiteur à l'enzyme

k_{-o} = constante de dissociation de l'inhibiteur à l'enzyme

K_M^S = constante de Michaelis et Menten du substrat AHB

$[I]$ = concentration en inhibiteur

$[S]$ = concentration en substrat

10 Pour des inhibiteurs irréversibles, le k_{-o} peut être considéré comme négligeable, le k_o est alors calculé grâce à l'équation (3) grâce au programme KaleidaGraph.

Equation (3) :

$$\frac{1}{m_3} = \frac{1}{k_o \cdot [I]} + \frac{1}{K_M^S \cdot [I] \cdot k_o} \cdot [S]$$

15 Cette équation est utilisable pour l'inhibiteur N-hydroxy-N-isopropylloxamate, mais pas pour le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate. Pour le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate, la représentation graphique $1/m_3$ en fonction de la concentration en substrat est linéaire, mais ne passe par l'origine. Pour le N-hydroxy-N-isopropylloxamate, la représentation graphique $1/m_3$ en fonction de la concentration en substrat est linéaire et la

20 valeur de l'ordonnée à l'origine est négligeable. Une hypothèse peut expliquer ce résultat : l'inhibiteur diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate n'est peut être pas complètement irréversible. Une droite de régression linéaire permet alors d'obtenir la valeur du k_o pour le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate. Les valeurs de k_o correspondant aux inhibiteurs N-hydroxy-N-isopropylloxamate et diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate sont de $12\,433\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et $7721\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivement. Ainsi, contrairement à l'isoméroréductase de plante (k_o

25 pour le N-hydroxy-N-isopropylloxamate = $1\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et k_o pour le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate = $22\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), le N-hydroxy-N-isopropylloxamate est un meilleur inhibiteur de l'enzyme de levure que le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate.

WO 03/022056

38

PCT/FR02/03073

5.5. Etude structurale de l'isoméroréductase de levure

La structure quaternaire de l'isoméroréductase de levure a été étudiée selon deux approches différentes : la spectrométrie de masse et la gel filtration.

L'existence de deux états d'oligomérisation différents a été mise en évidence grâce à la spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes. Cette technique a montré que l'isoméroréductase de levure est présente majoritairement sous forme dimérique mais une forme monomérique minoritaire est aussi présente. Le dimère est représenté par une distribution des états de charge $[D + 18H]^{18+}$ à $[D + 21H]^{21+}$. Une faible présence de monomère de l'isoméroréductase de levure, représenté par les états de charge $[M + 12H]^{12+}$ à $[M + 14H]^{14+}$ est mis en évidence sur ce même spectre de masse. L'isoméroréductase de levure pourrait donc être en équilibre entre une forme monomérique et une forme dimérique.

L'application sur gel filtration (Superdex 75) du pool des fractions de l'isoméroréductase de levure obtenues après la 1^{ère} étape de purification montre que l'isoméroréductase est éluée en un seul pic et que sa masse moléculaire est estimée à 67 kDa. Or, la masse moléculaire attendue de la forme monomérique de cette enzyme est d'environ 40 kDa et de 80 kDa pour la forme dimérique en condition non dénaturante. La masse moléculaire intermédiaire entre les formes monomérique et dimérique de l'isoméroréductase de levure confirme l'existence d'un équilibre entre ces deux formes de l'enzyme. Seul un équilibre dynamique rapide entre ces deux formes pourrait expliquer l'obtention d'un seul pic d'éluion en gel filtration. En effet, si cet équilibre était lent, 2 pics d'éluion auraient été observés en sortie de gel filtration ; l'un correspondrait à la forme monomérique, et l'autre à la forme dimérique de l'enzyme.

25

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

39

Revendications

- 1) Procédé de traitement des cultures contre les maladies fongiques, caractérisé en ce que
5 l'on applique une composition fongicide comprenant une quantité efficace d'un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ ID No.3.
- 2) Procédé suivant la revendication 1, dans laquelle l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide
10 isoméroréductase est le diméthylphosphinoyl-2-hydroxyacétate.
- 3) Procédé suivant la revendication 1, dans laquelle l'inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase est le N-hydroxy-N-isopropylloxamate.
- 15 4) Compositions fongicides caractérisées en ce qu'elles comprennent un inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ ID No.3 et un autre composé fongicide.
- 5) Procédé de fabrication d'une composition fongicide caractérisé en ce que l'on utilise un
20 inhibiteur de l'acétohydroxyacide isoméroréductase isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ ID No.3.
- 6) Procédé pour l'identification de composés fongicides comprenant l'identification de composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase
25 isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ ID No.3.
- 7) Procédé selon la revendication 6 comprenant une étape supplémentaire dans laquelle on détermine si lesdits composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ
30 ID No.3 inhibent la croissance et la pathogénie des champignons.
- 8) Procédé selon les revendications 6 ou 7, dans lequel l'identification de composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ ID No.3 comprend les étapes suivantes :

WO 03/022056

40

PCT/FR02/03073

- a) mettre en contact ledit composé avec l'acétohydroxyacide isoméroréductase en présence de magnésium, de NADPH et de substrat; et
 - b) mesurer ladite activité enzymatique.
- 5 9) Procédé selon les revendications 6 ou 7, dans lequel l'identification de composés inhibant l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide isoméroréductase de la SEQ ID No.1, la SEQ ID No.2 et/ou la SEQ ID No.3 comprend les étapes suivantes:
- a) exprimer l'acétohydroxyacide isoméroréductase dans un organisme hôte;
 - b) purifier l'acétohydroxyacide isoméroréductase produite par ledit organisme hôte;
- 10 c) mettre en contact ledit composé avec ladite acétohydroxyacide isoméroréductase purifiée en présence de magnésium, de NADPH et de substrat; et
- d) mesurer ladite activité enzymatique.
- 10) Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, dans lequel la mesure de ladite activité
- 15 enzymatique comprend la mesure de la décroissance d'absorption du NADPH à 340 nm.
- 11) Procédé selon l'une des revendications 8 à 10, dans lequel ledit substrat est le 2S-2-acétolactate (AL) ou le 2S-2-acéto-2-hydroxybutyrate (AHB).

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

1/9

```

M. grisea      MSARGFSKALRPMARQLATPAVQRRSFVAASSMVRATR--KAAPTQQQ
N. crassa      MAARNCTKALRPLARQLATPAVQRRTFVAASAVRASVAVKAAAPARQQ
S. cerevisiae  ---MLRTQAARLICNSRVITAK--RTFALATRAAAYSRLP-AARFVKPMIT
               . . * . . . * . * . . . *

M. grisea      IRGVKTMDPAGHKEQVWERADWPKEKILEYFKDDTLALIGYSQGHGQGL
N. crassa      VRGVKTMDPAGHKEEVHERADWPAEKLLDYFKNDTLALIGYSQGHGQGL
S. cerevisiae  TRGLKQINFGGTVETVYERADWPREKLLDYFKNDTFALIGYSQGYGQGL
               **.*. * * * * * **.* * * * * **.* * * * * **.* * * * *

M. grisea      NLRDNGLNVIIGVRKDGKSWKDAVQDGWVPKGNLFVDEAISRGTVMNL
N. crassa      NLRDNGLNVIIGVRKNGKSWEDAIQDGWVPKGNLFDVDEAISRGTVMNL
S. cerevisiae  NLRDNGLNVIIGVRKDGASWKAIEDGWVPKGNLFTVEDAIKRGSYVMNL
               *****.* * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

M. grisea      LSDAAQSETWPALKPQITKGKTLYFSHGFSVPFKDLTKVEVPTDQDVLILC
N. crassa      LSDAAQSETWPHIKPQITKGKTLYFSHGFSVPFKDLTKVEVPTDQDVLILV
S. cerevisiae  LSDAAQSETWPAIKPLLTKGKTLYFSHGFSVPFKDLTHVEPPKDLQDVLILV
               *****.* * . *****.* * . * . * . * . * . * . * . *

M. grisea      APKGSGRTVRSLFREGRGINSSFAVYQDVTGEAEKAIALGVAIGSGYLY
N. crassa      APKGSGRTVRSLFREGRGINSSFAVYQDVTGKAKEKAVAGVAVGSGYLY
S. cerevisiae  APKGSGRTVRSLFKEGRGINSSYAVVNDVTGKAHEKAQALAVAIGSGYVY
               *****.* . *****.* * . * . * . * . * . * . * . *

M. grisea      KTTFEKEVYSDLYGERGCLMGGIHGMFLAQYEVLRERGHSPSEAFNETVE
N. crassa      ETTFEKEVYSDLYGERGCLMGGIHGMFLAQYEVLRERGHSPSEAFNETVE
S. cerevisiae  QTTFEREVNSDLYGERGCLMGGIHGMFLAQYDVLRENGHSPSEAFNETVE
               ****.* * *****.* * . * . * . * . * . * . * . *

M. grisea      EATQSLYPLIGANGMDWMYEACSTTARRGALDWSRPFKDALKPVPFNQLYD
N. crassa      EATQSLYPLIGAHGMDWMFDACSTTARRGALDWTPKFKDALKPVPFNQLYD
S. cerevisiae  EATQSLYPLIGKYGMDYMDACSTTARRGALDWYPIFKNALKPVPFQDLYE
               *****.* * * . *****.* * * * * * . * . * . *

M. grisea      SVKDGSETQSRSLDYNQPDYREKYAEEMEEIRNLEIWRACKAVRSLRPEN
N. crassa      SVKNGDERKRSLEYNSQPDYRERYEAELEIRNLEIWRACK--RSLRPEN
S. cerevisiae  STKNGTETKRSLEFNSQPDYREKLEKELDTIRNMEIWKVGKEVRKLRPEN
               * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

M. grisea      QKQK
N. crassa      QK--
S. cerevisiae  Q---
               *

```

Fig. 1

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

2/9

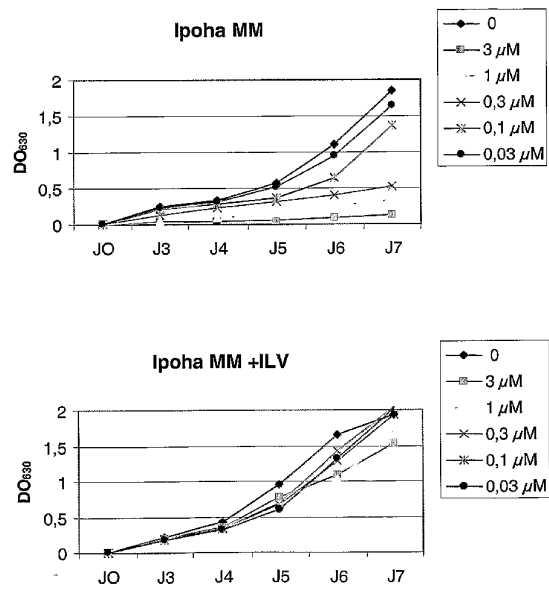


Fig. 2

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

3/9

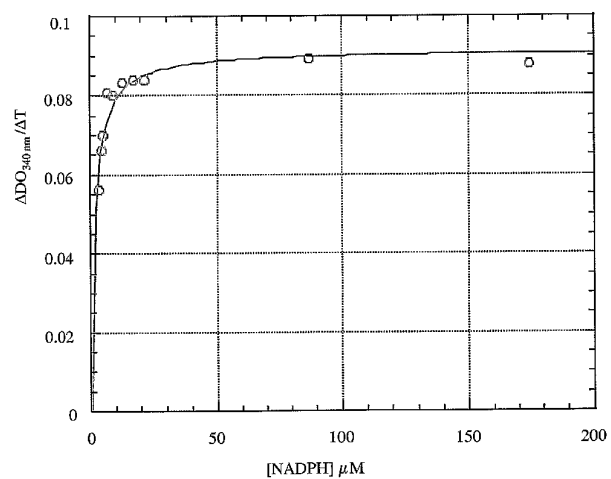


Fig. 3

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

4/9

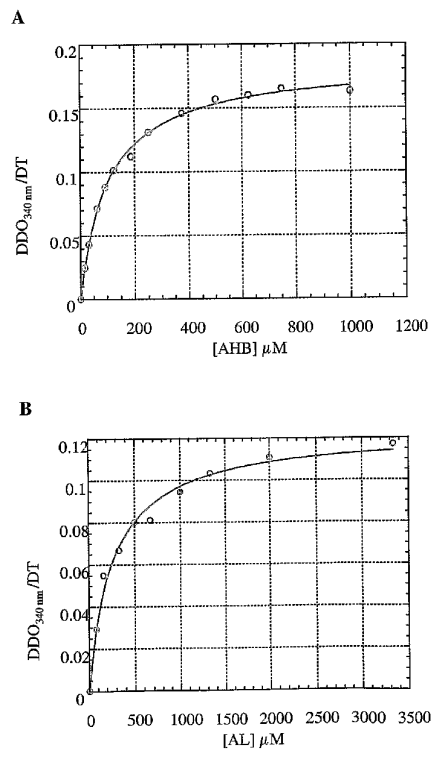


Fig.4

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

5/9

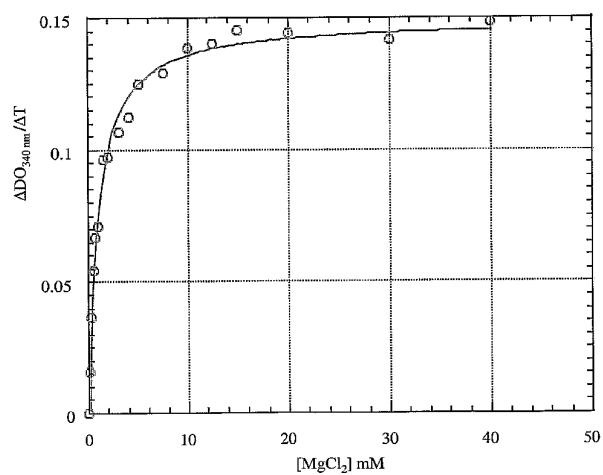


Fig.5

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

6/9

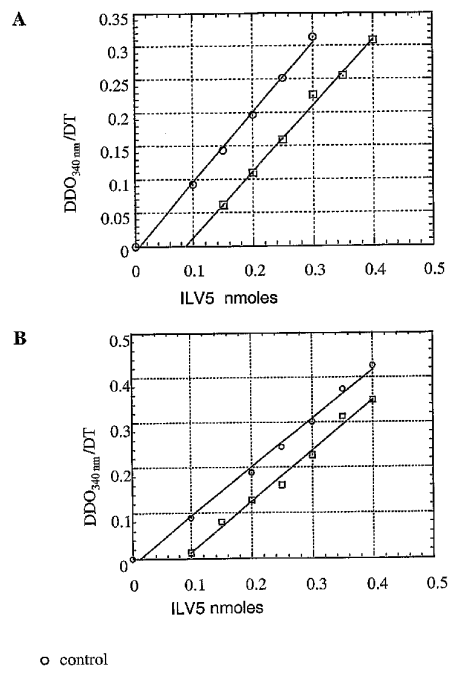


Fig. 6

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

7/9

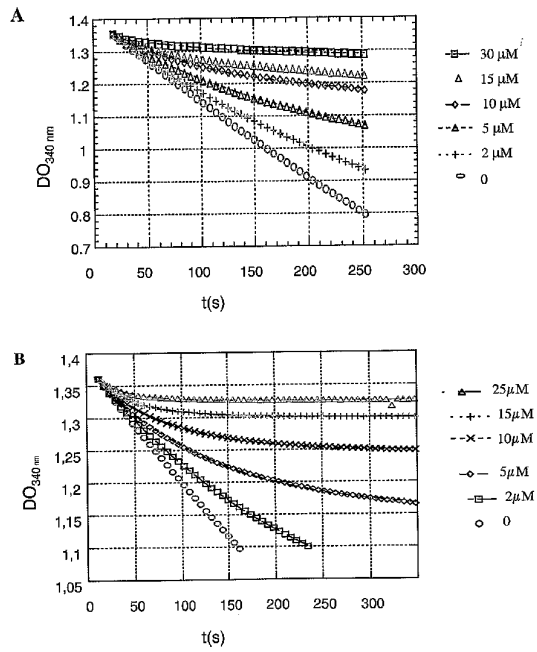


Fig.7

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

8/9

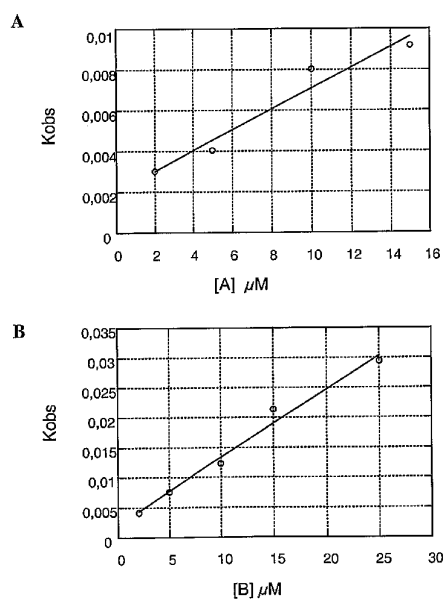


Fig. 8

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

9/9

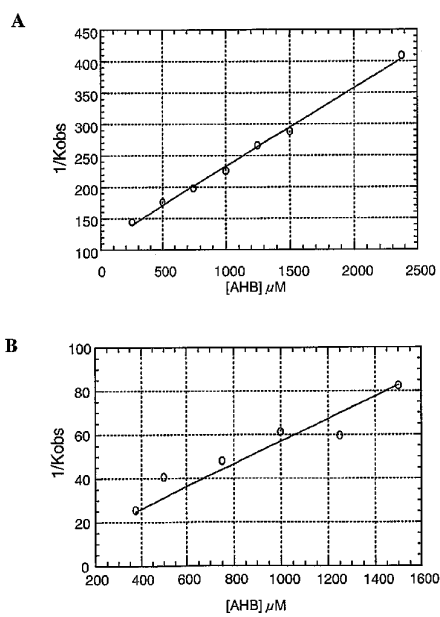


Fig. 9

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

1

LISTE DE SEQUENCES

<110> Aventis CropScience SA

<120> Utilisation d'inhibiteurs de l'acétylhydroxyacide
isoméroréductase pour le traitement des maladies
fongiques des cultures

<130> PM01035 FR

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

<213> Magnaporthe grisea

<220>

<221> TRANSIT

<222> (1)..(51)

<223> Putative mitochondrial transit peptide

<400> 1

Met Ser Ala Arg Gly Phe Ser Lys Ala Leu Arg Pro Met Ala Arg Gln
1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Val Gln Arg Arg Ser Phe Val Ala Ala Ser Ser
20 25 30

Met Val Arg Ala Thr Arg Lys Ala Ala Val Ala Pro Thr Gln Gln Gln
35 40 45

Ile Arg Gly Val Lys Thr Met Asp Phe Ala Gly His Lys Glu Gln Val
50 55 60

Trp Glu Arg Ala Asp Trp Pro Lys Glu Lys Leu Leu Glu Tyr Phe Lys
65 70 75 80

Asp Asp Thr Leu Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Gly Gln
85 90 95

Gly Leu Asn Leu Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Ile Gly Val Arg
100 105 110

Lys Asp Gly Lys Ser Trp Lys Asp Ala Val Gln Asp Gly Trp Val Pro
115 120 125

Gly Lys Asn Leu Phe Glu Val Asp Glu Ala Ile Ser Arg Gly Thr Val
130 135 140

Ile Met Asn Leu Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp Pro Ala
145 150 155 160

Leu Lys Pro Gln Ile Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser His Gly
165 170 175

Phe Ser Pro Val Phe Lys Asp Leu Thr Lys Val Glu Val Pro Thr Asp
180 185 190

WO 03/022056

2

PCT/FR02/03073

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

<210> 2
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <220>
 <221> TRANSIT
 <222> {1}..(47)
 <223> mitochondrial transit peptide
 <300>
 <308> gb:X04969
 <309> 1993-09-12
 <400> 2
 Met Leu Arg Thr Gln Ala Ala Arg Leu Ile Cys Asn Ser Arg Val Ile
 1 5 10 15

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

3

Thr Ala Lys Arg Thr Phe Ala Leu Ala Thr Arg Ala Ala Ala Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Pro Ala Ala Arg Phe Val Lys Pro Met Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 35 40 45
 Lys Gln Ile Asn Phe Gly Gly Thr Val Glu Thr Val Tyr Glu Arg Ala
 50 55 60
 Asp Trp Pro Arg Glu Lys Leu Leu Asp Tyr Phe Lys Asn Asp Thr Phe
 65 70 75 80
 Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Gly Leu Asn Leu
 85 90 95
 Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Ile Gly Val Arg Lys Asp Gly Ala
 100 105 110
 Ser Trp Lys Ala Ala Ile Glu Asp Gly Trp Val Pro Gly Lys Asn Leu
 115 120 125
 Phe Thr Val Glu Asp Ala Ile Lys Arg Gly Ser Tyr Val Met Asn Leu
 130 135 140
 Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp Pro Ala Ile Lys Pro Leu
 145 150 155 160
 Leu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser His Gly Phe Ser Pro Val
 165 170 175
 Phe Lys Asp Leu Thr His Val Glu Pro Pro Lys Asp Leu Asp Val Ile
 180 185 190
 Leu Val Ala Pro Lys Gly Ser Gly Arg Thr Val Arg Ser Leu Phe Lys
 195 200 205
 Glu Gly Arg Gly Ile Asn Ser Ser Tyr Ala Val Trp Asn Asp Val Thr
 210 215 220
 Gly Lys Ala His Glu Lys Ala Gln Ala Leu Ala Val Ala Ile Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Tyr Val Tyr Gln Thr Thr Phe Glu Arg Glu Val Asn Ser Asp Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Glu Arg Gly Cys Leu Met Gly Gly Ile His Gly Met Phe Leu
 260 265 270
 Ala Gln Tyr Asp Val Leu Arg Glu Asn Gly His Ser Pro Ser Glu Ala
 275 280 285
 Phe Asn Glu Thr Val Glu Glu Ala Thr Gln Ser Leu Tyr Pro Leu Ile
 290 295 300
 Gly Lys Tyr Gly Met Asp Tyr Met Tyr Asp Ala Cys Ser Thr Thr Ala
 305 310 315 320
 Arg Arg Gly Ala Leu Asp Trp Tyr Pro Ile Phe Lys Asn Ala Leu Lys
 325 330 335
 Pro Val Phe Gln Asp Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 340 345 350

WO 03/022056

PCT/FR02/03073

4

Lys Arg Ser Leu Glu Phe Asn Ser Gln Pro Asp Tyr Arg Glu Lys Leu
 355 360 365

Glu Lys Glu Leu Asp Thr Ile Arg Asn Met Glu Ile Trp Lys Val Gly
 370 375 380

Lys Glu Val Arg Lys Leu Arg Pro Glu Asn Gln
 385 390 395

<210> 3

<211> 400

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<220>

<221> TRANSIT

<222> (1)..(53)

<223> putative mitochondrial transit peptide

<300>

<308> gb:M84189.1

<309> 1996-05-23

<400> 3

Met Ala Ala Arg Asn Cys Thr Lys Ala Leu Arg Pro Leu Ala Arg Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Val Gln Arg Arg Thr Phe Val Ala Ala Ala Ser
 20 25 30

Ala Val Arg Ala Ser Val Ala Val Lys Ala Val Ala Pro Ala Arg
 35 40 45

Gln Gln Val Arg Gly Val Lys Thr Met Asp Phe Ala Gly His Lys Glu
 50 55 60

Glu Val His Glu Arg Ala Asp Trp Pro Ala Glu Lys Leu Leu Asp Tyr
 65 70 75 80

Phe Lys Asn Asp Thr Leu Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His
 85 90 95

Gly Gln Gly Leu Asn Leu Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Val Gly
 100 105 110

Val Arg Lys Asn Gly Lys Ser Trp Glu Asp Ala Ile Gln Asp Gly Trp
 115 120 125

Val Pro Gly Lys Asn Leu Phe Asp Val Asp Glu Ala Ile Ser Arg Gly
 130 135 140

Thr Ile Val Met Asn Leu Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp
 145 150 155 160

Pro His Ile Lys Pro Gln Ile Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser
 165 170 175

His Gly Phe Ser Pro Val Phe Lys Asp Leu Thr Lys Val Glu Val Pro
 180 185 190

Thr Asp Val Asp Val Ile Leu Val Ala Pro Lys Gly Ser Gly Arg Thr
 195 200 205

WO 03/022056

5

PCT/FR02/03073

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

<210> 4
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Magnaporthe grisea

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(43)

<220>
 <221> CDS
 <222> (44)..(1246)

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1247)..(1356)

<220>
 <221> polyA_site
 <222> (1322)..(1330)

<400> 4

WO 03/022056	6	PCT/FR02/03073
ttgtttttct tggttacotta ttctaccttg tcacacaaca aac atg tct gct cgc	55	
	Met Ser Ala Arg	
	1	
ggt ttc tca aag got ttg agg cca atg gcc cgc caa ttg gcc act ccc	103	
Gly Phe Ser Lys Ala Leu Arg Pro Met Ala Arg Gln Leu Ala Thr Pro		
5 10 15 20		
gcc gtt cag agg cgt acc ttc gtg gct gct tct agc atg gtg cgg gcc	151	
Ala Val Gln Arg Arg Thr Phe Val Ala Ala Ser Ser Met Val Arg Ala		
25 30 35		
acc agg aaa gcc gcc gtc gct ccc act cag cag cag atc cgt ggt gtc	199	
Thr Arg Lys Ala Ala Val Ala Pro Thr Gln Gln Gln Ile Arg Gly Val		
40 45 50		
aag acc atg gat ttt got ggc cac aag gag cag gtc tgg gag cgt gcc	247	
Lys Thr Met Asp Phe Ala Gly His Lys Glu Gln Val Trp Glu Arg Ala		
55 60 65		
gac tgg ccc aag gag aag ctg ctg gag tac ttc aag gac gac acc ctt	295	
Asp Trp Pro Lys Glu Lys Leu Leu Glu Tyr Phe Lys Asp Asp Thr Leu		
70 75 80		
gcc ctc atc ggc tat ggt tcg cag gcc cac gcc cag ggt ctt aac ctc	343	
Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Gly Gln Gly Leu Asn Leu		
85 90 95 100		
cgc gac aac gcc ctc aac gtc atc atc ggt gtg cgc aag gac gga aag	391	
Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Ile Gly Val Arg Lys Asp Gly Lys		
105 110 115		
tcg tgg aag gac gcc gtc cag gac gcc tgg gtt ccc gcc aag aac ctc	439	
Ser Trp Lys Asp Ala Val Gln Asp Gly Trp Val Pro Gly Lys Asn Leu		
120 125 130		
ttc gag gtc gac gag gcc atc tcg cgc ggt acc gtc atc atg aac ctt	487	
Phe Glu Val Asp Glu Ala Ile Ser Arg Gly Thr Val Ile Met Asn Leu		
135 140 145		
ctg agc gac gct gcc cag agc gag acg tgg cct gct ctg aag ccc cag	535	
Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp Pro Ala Leu Lys Pro Gln		
150 155 160		
atc act aag gcc aag act ctc tac ttc tcg cac ggt ttc tct ccc gtc	583	
Ile Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser His Gly Phe Ser Pro Val		
165 170 175 180		
ttc aag gac ctc acc aag gtc gag gtc ccc acc gac gtc gac gtc atc	631	
Phe Lys Asp Leu Thr Lys Val Glu Val Pro Thr Asp Val Asp Val Ile		
185 190 195		
ctc tgc gcc ccc aag gcc tcc gcc cgc act gtc cgc tcg ctc ttc cgc	679	
Leu Cys Ala Pro Lys Gly Ser Gly Arg Thr Val Arg Ser Leu Phe Arg		
200 205 210		
gag ggt cgt gcc atc aac tcc tcc ttc gcc gtc tac cag gac gtg act	727	
Glu Gly Arg Gly Ile Asn Ser Ser Phe Ala Val Tyr Gln Asp Val Thr		
215 220 225		
ggc gag gct gaa gag aag gct atc got ctc ggt gtt gcc att gcc agt	775	
Gly Glu Ala Glu Glu Lys Ala Ile Ala Leu Gly Val Ala Ile Gly Ser		
230 235 240		

WO 03/022056

7

PCT/FR02/03073

```

ggt tac ctc tac aag acc acc ttc gag aag gag gtc tac tct gac ctg 823
Gly Tyr Leu Tyr Lys Thr Thr Phe Glu Lys Glu Val Tyr Ser Asp Leu
245                250                255                260

tac ggt gag cgt gcc tgc ctg atg ggt ggt atc cac ggt atg ttc ctt 871
Tyr Gly Glu Arg Gly Cys Leu Met Gly Gly Ile His Gly Met Phe Leu
265                270                275

gcc cag tac gag gtt ctc cgc gag cgt gcc cac agc ccc tcg gag gct 919
Ala Gln Tyr Glu Val Leu Arg Glu Arg Gly His Ser Pro Ser Glu Ala
280                285                290

ttc aac gag act gtc gag gag gcc acc cag tct ctc tac ccc ctg atc 967
Phe Asn Glu Thr Val Glu Glu Ala Thr Gln Ser Leu Tyr Pro Leu Ile
295                300                305

ggt gcc aac gcc atg gac tgg atg tac gag gcc tgc tct acc act got 1015
Gly Ala Asn Gly Met Asp Trp Met Tyr Glu Ala Cys Ser Thr Thr Ala
310                315                320

cgt cgt ggt gcc att gac tgg agc ccc cgc ttc aag gac gcc ctc aag 1063
Arg Arg Gly Ala Ile Asp Trp Ser Pro Arg Phe Lys Asp Ala Leu Lys
325                330                335                340

ccc gtc ttc aac cag ctc tac gac tcg gtc aag gac gcc tct gag act 1111
Pro Val Phe Asn Gln Leu Tyr Asp Ser Val Lys Asp Gly Ser Glu Thr
345                350                355

cag cgc tcg ctc gac tac aac agc cag ccc gac tac cgc gag aag tac 1159
Gln Arg Ser Leu Asp Tyr Asn Ser Gln Pro Asp Tyr Arg Glu Lys Tyr
360                365                370

gag gcc gag atg gag gag atc cgc aac ctg gag atc tgg agg gcg ggt 1207
Glu Ala Glu Met Glu Glu Ile Arg Asn Leu Glu Ile Trp Arg Ala Gly
375                380                385

aag gct gtg cgc agc ctc cgt cct gag aac cag aag taa actgtatatt 1256
Lys Ala Val Arg Ser Leu Arg Pro Glu Asn Gln Lys
390                395                400

tgcttccaag ttccgggttaa atgccagtgg atctctacag agtgctggtg ggtgggtcaat 1316
ttgttgaaaa ataactcgga gtcacgccta catttcttgg 1356

```

<210> 5

<211> 400

<212> PRT

<213> Magnaporthe grisea

<400> 5

```

Met Ser Ala Arg Gly Phe Ser Lys Ala Leu Arg Pro Met Ala Arg Gln
1          5          10          15
Leu Ala Thr Pro Ala Val Gln Arg Arg Thr Phe Val Ala Ala Ser Ser
20          25          30
Met Val Arg Ala Thr Arg Lys Ala Ala Val Ala Pro Thr Gln Gln Gln
35          40          45
Ile Arg Gly Val Lys Thr Met Asp Phe Ala Gly His Lys Glu Gln Val
50          55          60
Trp Glu Arg Ala Asp Trp Pro Lys Glu Lys Leu Leu Glu Tyr Phe Lys
65          70          75          80

```

WO 03/022056

8

PCT/FR02/03073

Asp Asp Thr Leu Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Gly Gln
 85 90 95
 Gly Leu Asn Leu Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Ile Gly Val Arg
 100 105 110
 Lys Asp Gly Lys Ser Trp Lys Asp Ala Val Gln Asp Gly Trp Val Pro
 115 120 125
 Gly Lys Asn Leu Phe Glu Val Asp Glu Ala Ile Ser Arg Gly Thr Val
 130 135 140
 Ile Met Asn Leu Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp Pro Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Pro Gln Ile Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser His Gly
 165 170 175
 Phe Ser Pro Val Phe Lys Asp Leu Thr Lys Val Glu Val Pro Thr Asp
 180 185 190
 Val Asp Val Ile Leu Cys Ala Pro Lys Gly Ser Gly Arg Thr Val Arg
 195 200 205
 Ser Leu Phe Arg Glu Gly Arg Gly Ile Asn Ser Ser Phe Ala Val Tyr
 210 215 220
 Gln Asp Val Thr Gly Glu Ala Glu Glu Lys Ala Ile Ala Leu Gly Val
 225 230 235 240
 Ala Ile Gly Ser Gly Tyr Leu Tyr Lys Thr Thr Phe Glu Lys Glu Val
 245 250 255
 Tyr Ser Asp Leu Tyr Gly Glu Arg Gly Cys Leu Met Gly Gly Ile His
 260 265 270
 Gly Met Phe Leu Ala Gln Tyr Glu Val Leu Arg Glu Arg Gly His Ser
 275 280 285
 Pro Ser Glu Ala Phe Asn Glu Thr Val Glu Glu Ala Thr Gln Ser Leu
 290 295 300
 Tyr Pro Leu Ile Gly Ala Asn Gly Met Asp Trp Met Tyr Glu Ala Cys
 305 310 315 320
 Ser Thr Thr Ala Arg Arg Gly Ala Ile Asp Trp Ser Pro Arg Phe Lys
 325 330 335
 Asp Ala Leu Lys Pro Val Phe Asn Gln Leu Tyr Asp Ser Val Lys Asp
 340 345 350
 Gly Ser Glu Thr Gln Arg Ser Leu Asp Tyr Asn Ser Gln Pro Asp Tyr
 355 360 365
 Arg Glu Lys Tyr Glu Ala Glu Met Glu Glu Ile Arg Asn Leu Glu Ile
 370 375 380
 Trp Arg Ala Gly Lys Ala Val Arg Ser Leu Arg Pro Glu Asn Gln Lys
 385 390 395 400

<210> 6
 <211> 3827
 <212> ADN
 <213> Magnaporthe grisea

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1460)

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1461)..(1503)

<220>
 <221> intron
 <222> (1700)..(1781)

<220>
 <221> intron
 <222> (1814)..(1890)

WO 03/022056

9

PCT/FR02/03073

```

<220>
<221> intron
<222> (2170)..(2253)

<220>
<221> 3'UTR
<222> (2952)..(3061)

<220>
<221> terminator
<222> (3062)..(3827)

<400> 6
ccgagtttcc cgaccccgac gacatcctca actttaggct tatcatcgag cccggcgagg 60
gcatgtaccc cggcggggcga ttccactttcg acttcaagat taacccaaac ttcccgcatg 120
agcccccacaa ggtcttctgtgt gaacagaaaga tctaccatcc caatatogat cttagaggga 180
aggtttgctt gaacattctgt cgtgaggattt ggaagccggt cctgaacctc aacgcgctca 240
ttgtttgctt tcaggttaagt ccaaatatag ctttgatgcc cgcactgtta catcctatat 300
gtgacacaac ataactcaaaa gaactcgtagc tctatacgtg agcactggca caatgtaaaa 360
caactgggat cagaaaaagc taaccagacc acttctgtgc gtcttagttc cttttctctg 420
agcccaacgc ctgggacccg ctgaacaaagg acgcggtgga agcactcaga agcaacgggg 480
agggcttcaa acgttaacgtc cggacctcca tggcgggagg ggcagtcaag gggattttct 540
tcgatcgctt tctgaataaa agataggcgg aagggaaggca aactctgctg caaagagaac 600
atgatccctt cctaactaaga ctcaagagtc gcaacctgtg ccatgggaac gatcatttct 660
atcccgacgc gaaaacctac gcgtcggcgt cccagcggtg gctatgagt agtcattctg 720
atgcctggaa cattoaggac aatagacccc agggagtcac ctcaagtccc agaaggcaaa 780
catggttgaa tcgagaaata agccggggag gtgaatggat ggcgacagg gttttctcgc 840
tggccattgg acttctctaga cctagtctta aatacggagt atcggaacat aagatgggtg 900
gggcaagcgg tctcgtattt tagcgtattc ggcggtctgt atttcaaca ttggcggttt 960
ctgcttcttt atttcaacct ctattaaagt ctacctcatc tcccaataaa atacataaat 1020
ctagatggtt ttcatgtctt taagaacata gatcgaggct ttttgtactg gaatggctgg 1080
tttcaaaaga atgaactgat tggctgagta atgaatttta totcgtggtt gttattatgg 1140
aattaggcga aagcctatcc ggtcgtctgc gataacgctg acccaagagg cttctccggt 1200
ttggagagct gctggttctt ggtagatcaa agcggggcat ctgggtctgg ggcctccgta 1260
tgccggcggt ctccacccga gctacacctg ttttcaaaac ggctccgat t cgtccgcta 1320
ggaaaatttt ttaaccccaa tgcctaaagt ctttagtggt ctttagtggt agttttgttg 1380
aagctcgtct ctaaattoat cttaatttga ctctacattg tctgtgaata cggattccct 1440
ttctctccat ctccactcaa ttgtttttct tgggtcttta ttctacottg tccacacaaa 1500
aaatgtctgt ctcccggttt ctcaaaagct ttgaggccaa tggcccgcaa attggccact 1560
cccgccgttc agaggcgtac ctctgtggct gctctagcaa tggctcgggg caccaggaaa 1620
gcgcgcgtgc ctcccaactc gcagcagatc cgtggtgtca agacactgga ttttgtcggc 1680
cacaaggagc aggtctctgg tgagttggac agctcaattg ctcaattcgc actggccaa 1740
attcgtaaac tgacaggctt ttttllcgtc taccaatcta gacgctgccg actggccaa 1800
gggaagcgtc ctggtgagtc atgtcaattt tttttgctg acaattccac caacttcaag 1860
cagtcacaaat actaatcact tgaactacag gagtacttca aggacgacac ccttgccctc 1920
atcggtctatg gttcgcaggg ccacggccag ggtcttaacc tcccgacaa cggcctcaac 1980
gtcatcatcg gtgtgcgcaa ggacggaaa gctgtggaag acgccgtcaa ggacggctgg 2040
gttcccgcca agaacctctt cagagtcgac gaggccatct cgcgcgtac cgtcatcatg 2100
aacctcttga gcgacgtctc ccagagcag agctggcctg ctctgaagcc ccagatcact 2160
aagggcgaag tatgtggcgc ttaagactga ccgtttcttt ttacttaacc cgtcgtctta 2220
taagaataaa aaagagctaa caagtcttta tgtagactct ctactctcgc cagcgtttct 2280
ctcccgctct caaggacctc accaagctgc aggtcccccac cgcactgac gtcactctct 2340
gcgcgcccaa gggctcgggc cgcactgtcc gctcgtctct ccgcgagggt cgtggcatca 2400
actcctcctt cgcctctac caggacgtga ctggcgaggc tgaagagaag gctatcgtc 2460
tcggtgttgc caltggcagt ggttacctct acaagaacac cttagagaag gaggtctact 2520
ctgacctgta cgttgagcgt ggttcctctg tgggtggtat ccaoggtatg ttccctgccc 2580
agtacagagc tctcccgagc cgtggccaca gccctcggga ggctttcaac gagaactgtc 2640
aggagggcac ccagctctctc taccocctga tccgtgcnaa cggcatggac tggatgtacg 2700
aggcctgctc taccactgct cgtcgtgtgt coattgactg gagcccccgc ttcaaggacg 2760
ccctcaagcc cgtcttcaac cagctctacg actcgttcaa ggacggctct gagactcagc 2820
gctcgtcga ctacaacagc cagcccgact acccgagaa gtacgaggcc gagatggagg 2880
agatccgcaa cctggagatc tggagggcgg gtaagctgt gcgcgcctc cgtcctgaga 2940

```

WO 03/022056

10

PCT/FR02/03073

```

accagaagta aactgtatat ttgcttccaa gtcccggtca aatgccagtg gatctctaca 3000
gagtgctggg ggggtgtcaa ttgttgaaa aataatctgg agtcacogct acatttcttg 3060
gaatatcgcg ggggtctgtg tccaaaaagc ttgcggtatt tgcacgggt ttgcttttaa 3120
tgtttatcag atttcatctt tgtctgggat tacatcagtc tactatacct cgcatttta 3180
aatgggtato ttttttttgt ctttacctgc ttattcaact gtcccatgc taotgtgccg 3240
ottttgatto atottotoca tggcgcttg gcagttgttt tgcgagttcc aaaaaacotc 3300
ottttggto accaocaaag gtgatccaaa gtcaaccca tgcggggca tctcgtago 3360
gtctctcgga cctaatacat tcttctcac ccacgcctc aaggtatag gtacgcaagc 3420
cgcaggcttt tgcgccttg aggtcgcta agtgggcagc aacctatgca acctcatcg 3480
ggcgcgagcc caagccctca acagctccca agtacgtctc tgggtttggc ttgtatgac 3540
caagctctc agccgagaag agacgatcga acccagggc atcgtggtag gtgttgaggt 3600
cctgacgag agactgggtg ccgttagaca agggggccgt gaccagacc cggctcgcca 3660
ggcgcgagag accttgacgg gtatcgggcc agggctccag cctatgcac gcccgactca 3720
actcagcac ctcatcgctc gtgaacaggc cggctagtc tgcctcctc agcagacgct 3780
cgaggctctc gcggtggtgc gtgtcaatgt cctccaggg cgtgatg 3827

```

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: primer 1

<400> 7
 gaytaytya araaygayac 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: primer 2

<400> 8
 atgttytng cncartayga 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: primer 3

<400> 9
 gayggntggg tncnggnaa 20

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: primer 4

<400> 10
 atggnggna tacaygnat g 21

WO 03/022056

11

PCT/FR02/03073

<210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer 2'

<400> 11
ctgcttccat ggcaccagct gccogtttc 29

<210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer 1'

<400> 12
ctaccccat ggtgaagcaa atcaacttc 29

<210> 13
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer 3'

<400> 13
gcacttgata ttattgtoga cttattggt tttctg 36

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer
13U

<400> 14
aacgacaccc ttgccctcat 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer
300U

<400> 15
accgtttctt ttacttacc 20

WO 03/022056

12

PCT/FR02/03073

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer
549L

<400> 16
gogatagcct totttcagc

20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: primer
22U

<400> 17
ttgtttttct tggttcotta

20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Primer
1603L

<400> 18
ccaagaaatg tagcgatgac

20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FR 02/03073
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A01N61/00 A01N57/20 A01N37/28 C12Q1/26 C12Q1/53		
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 A01N C12Q		
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) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, CAB Data, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE MEDLINE 'Online! May 2001 (2001-05) DUMAS R ET AL: "Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase." Database accession no. NLM11352718 XP002205453 abstract	1-11
Y	& ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH. UNITED STATES MAY 2001, vol. 34, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 399-408, ISSN: 0001-4842 --- -/--	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2003		Date of mailing of the international search report 27/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 518 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-2016		Authorized officer Lamers, W

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/03073
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CA 2 002 021 A (DU PONT) 3 May 1990 (1990-05-03) cited in the application page 1, line 7 - line 11 page 2, line 22 - line 25 page 6, line 15 - line 27 page 11, line 11 - line 17 page 16, line 25 - line 27 page 23, line 33 ---	1-11
Y	DATABASE MEDLINE 'Online! 10 October 1988 (1988-10-10) SCHULZ A ET AL: "The herbicidally active experimental compound Hoe 704 is a potent inhibitor of the enzyme acetolactate reductoisomerase." Database accession no. NLM3049163 XP002205454 abstract & FEBS LETTERS. NETHERLANDS 10 OCT 1988, vol. 238, no. 2, 10 October 1988 (1988-10-10), pages 375-378, ISSN: 0014-5793 ---	2
Y	DATABASE MEDLINE 'Online! 1 August 1994 (1994-08-01) DUMAS R ET AL: "Interactions of plant acetohydroxy acid isomeroreductase with reaction intermediate analogues: correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects." Database accession no. NLM8053906 XP002205455 abstract & THE BIOCHEMICAL JOURNAL. ENGLAND 1 AUG 1994, vol. 301 (Pt 3), 1 August 1994 (1994-08-01), pages 813-820, ISSN: 0264-6021 ---	3
Y	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; J DURNER ET AL.: "Ketol-acid reductoisomerase from plants: extraction and enzymic assay" retrieved from STN-INTERNATIONAL Database accession no. 120:238770 CA XP002205456 abstract & TARGET ASSAYS MOD. HERBIC. RELAT. PHYTOTOXIC COMPD., 1993, pages 137-141, ---	8-11

Form PCT/ISA/E10 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/03073
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE AGRICOLA 'Online! H.SISTA ET AL.: "Characterization of the ilv-2 gene from Neurospora crassa encoding alpha-keto-beta-hydroxyacyl reductoisomerase" retrieved from STN-INTERNATIONAL Database accession no. 93:8799 AGRICOLA XP002205457 abstract & GENE, vol. 120, no. 1, 1992, pages 115-118, -----	1-11
A	WO 97 37660 A (UNIV NEW JERSEY MED) 16 October 1997 (1997-10-16) page 3, line 27 - line 31 page 9, line 1 - line 21 figure 1 -----	1-11
A	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 12 October 1992 (1992-10-12) SISTA H ET AL: "Characterization of the ilv-2 gene from Neurospora crassa encoding alpha-keto-beta-hydroxyacyl reductoisomerase." Database accession no. NLM1398116 XP002231069 abstract & GENE, NETHERLANDS 12 OCT 1992, vol. 120, no. 1, 12 October 1992 (1992-10-12), pages 115-118, ISSN: 0378-1119 -----	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International Application No PCT/FR 02/03073	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
CA 2002021	A	03-05-1990	CA	2002021 A1	03-05-1990
WO 9737660	A	16-10-1997	US	5998420 A	07-12-1999
			AU	2451397 A	29-10-1997
			WO	9737660 A1	16-10-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande nationale No PCT/FR 02/03073
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A01N61/00 A01N57/20 A01N37/28 C12Q1/26 C12Q1/533		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, CAB Data, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE MEDLINE 'en ligne! mai 2001 (2001-05) DUMAS R ET AL: "Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase." Database accession no. NLM11352718 XP002205453 abrégé	1-11
Y	& ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH. UNITED STATES MAY 2001, vol. 34, no. 5, mai 2001 (2001-05), pages 399-408, ISSN: 0001-4842 --- -/-	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *C* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre la portée ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 13 février 2003		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/02/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 6816 Pohlstrasse 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 240-2240, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 240-3016		Fonctionnaire autorisé Lamers, W

Formulaire PCT/ISA 10 (document annexe) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/03073

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CA 2 002 021 A (DU PONT) 3 mai 1990 (1990-05-03) cité dans la demande page 1, ligne 7 - ligne 11 page 2, ligne 22 - ligne 25 page 6, ligne 15 - ligne 27 page 11, ligne 11 - ligne 17 page 16, ligne 25 - ligne 27 page 23, ligne 33 ---	1-11
Y	DATABASE MEDLINE 'en ligne! 10 octobre 1988 (1988-10-10) SCHULZ A ET AL.: "The herbicidally active experimental compound Hoe 704 is a potent inhibitor of the enzyme acetolactate reductoisomerase." Database accession no. NLM3049163 XP002205454 abrégé & FEBS LETTERS. NETHERLANDS 10 OCT 1988, vol. 238, no. 2, 10 octobre 1988 (1988-10-10), pages 375-378, ISSN: 0014-5793 ---	2
Y	DATABASE MEDLINE 'en ligne! 1 août 1994 (1994-08-01) DUMAS R ET AL.: "Interactions of plant acetohydroxy acid isomeroeductase with reaction intermediate analogues: correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects." Database accession no. NLM8053906 XP002205455 abrégé & THE BIOCHEMICAL JOURNAL. ENGLAND 1 AUG 1994, vol. 301 (Pt 3), 1 août 1994 (1994-08-01), pages 813-820, ISSN: 0264-6021 ---	3
Y	DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; J.DURNER ET AL.: "Ketol-acid reductoisomerase from plants: extraction and enzymic assay" retrieved from STN-INTERNATIONAL Database accession no. 120:238770 CA XP002205456 abrégé & TARGET ASSAYS MOD. HERBIC. RELAT. PHYTOTOXIC COMPD., 1993, pages 137-141, ---	8-11
	--- -/-	

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/03073

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE AGRICOLA 'en ligne! H.SISTA ET AL.: "Characterization of the ilv-2 gene from Neurospora crassa encoding alpha-keto-beta-hydroxyacyl reductoisomerase" retrieved from STN-INTERNATIONAL Database accession no. 93:8799 AGRICOLA XP002205457 abrégé & GENE, vol. 120, no. 1, 1992, pages 115-118,</p>	1-11
A	<p>WO 97 37660 A (UNIV NEW JERSEY MED) 16 octobre 1997 (1997-10-16) page 3, ligne 27 - ligne 31 page 9, ligne 1 - ligne 21 figure 1</p>	1-11
A	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 12 octobre 1992 (1992-10-12) SISTA H ET AL: "Characterization of the ilv-2 gene from Neurospora crassa encoding alpha-keto-beta-hydroxylacyl reductoisomerase." Database accession no. NLM1398116 XP002231069 abrégé & GENE. NETHERLANDS 12 OCT 1992, vol. 120, no. 1, 12 octobre 1992 (1992-10-12), pages 115-118, ISSN: 0378-1119</p>	1-11

Formulaire PCT/ISA(210) (suite de la deuxième feuille) (Juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Rendelungsmeldung relative aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/03073

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
CA 2002021	A	03-05-1990	CA	2002021 A1	03-05-1990
WO 9737660	A	16-10-1997	US	5998420 A	07-12-1999
			AU	2451397 A	29-10-1997
			WO	9737660 A1	16-10-1997

Formulaire PCT/ISA/210 (membres de familles de brevets) (juillet 1992)

フロントページの続き

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デュマ, ルノー

フランス国、エフ - 6 9 0 0 9 ・リヨン、リュ・エルネスト・ファブレーグ・ 1 7 ・デ

(72)発明者 ルブラン, マルク - アンリ

フランス国、エフ - 6 9 0 0 2 ・リヨン、リュ・ドウ・プレスト、 6 2

(72)発明者 ズンデル, ジャン - リュック

フランス国、エフ - 6 9 0 0 2 ・リヨン、リュ・テット・ドール・ 2

(72)発明者 エフアンタン, ジェラルディヌ

フランス国、エフ - 6 9 5 6 0 ・サント・コロンプ、リュ・ドユ・ 1 1 ・ノバンプル・ 1 0 1、
レ・プティ・ジャルダン

(72)発明者 モラン, バレリー

フランス国、エフ - 6 1 2 0 0 ・ユル・エ・クレンヌ、リュ・ドウ・ロンシャン・ 6

F ターム(参考) 4B024 AA07 BA08 CA04 DA06 EA04

4B063 QA01 QA05 QQ22 QR02 QR42 QX01

4H011 AA01 BB21 DA13 DD03 DD04