

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年9月11日(11.09.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/133609 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C07K 14/37 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/056667
- (22) 国際出願日: 2015年3月6日(06.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-044277 2014年3月6日(06.03.2014) JP
特願 2014-232267 2014年11月15日(15.11.2014) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 長野 希美(NAGANO Nozomi); 〒1350064 東京都江東区青海2丁目4番7 独立行政法人産業技術総合研究所 臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 梅村 舞子(UMEMURA Maiko); 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 小池 英明(KOIKE Hideaki); 〒3058561 茨城県つくば市東1

丁目1番1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内 Ibaraki (JP). 熊谷 俊高(KU-MAGAI Toshitaka); 〒1350021 東京都江東区白河4丁目3番1の913 株式会社ファームラボ内 Tokyo (JP). 町田 雅之(MACHIDA Masayuki); 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

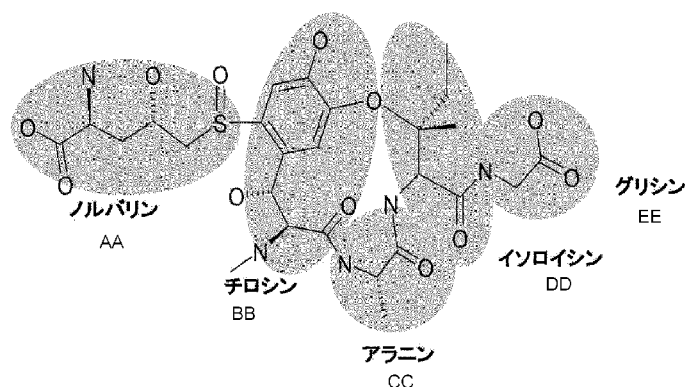
- (74) 代理人: 一入 章夫, 外(HITOSHIO Akio et al.); 〒0600062 北海道札幌市中央区南2条西7丁目6番2 南2条ビル5階 IPアシスト特許事務所 Hokkaido (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FUNGUS-DERIVED RIBOSOMAL PEPTIDE

(54) 発明の名称: 真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法

[図1]



AA Norvaline
BB Tyrosine
CC Alanine
DD Isoleucine
EE Glycine

(57) Abstract: [Problem] To provide a method for identifying a gene cluster that is involved in the biosynthesis of a fungus-derived ribosomal peptide and for using the gene cluster to recombinantly produce the fungus-derived ribosomal peptide. [Solution] Provided is a production method for a fungus-derived ribosomal protein, the production method including: a step for forcing a cell to express a ribosomal protein biosynthesis gene cluster that includes at least a gene that codes for a ribosomal peptide precursor that comprises an amino acid sequence that includes an ER localization signal sequence and a repeated sequence, and a gene that has a base sequence that codes for a protein involved in the biosynthesis of a ribosomal peptide, the base sequence having an E value of less than 1e-4 with regard to a base sequence indicated by SEQ ID NO: 1 or the like; and a step for collecting the ribosomal peptide from the cell. The present invention can produce a novel fungus-derived ribosomal peptide and can provide a ribosomal peptide that is a fungus-derived secondary metabolite that has potential applications in medicines and other useful substances.

(57) 要約:

[続葉有]



MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に
関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

【課題】 真菌由来のリボソームペプチドの生合成に関与する遺伝子クラスターを特定し、これを用いて真菌由来のリボソームペプチドを組換え的に生産する方法を提供する。 【解決手段】 小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子、並びに配列番号 1 等に表示される塩基配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満でリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させる工程、並びに細胞からリボソームペプチドを回収する工程を含む、真菌由来のリボソームペプチドの製造方法を提供する。 本発明によれば、新規な真菌由来のリボソームペプチドを製造することができ、医薬その他の有用物質への応用が期待される真菌由来の二次代謝産物であるリボソームペプチドを提供することが可能となる。

明 細 書

発明の名称：真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法

技術分野

[0001] 本発明は、真菌が産生するペプチド性二次代謝産物に關与する真菌特異的な生合成遺伝子クラスターを利用したペプチド性二次代謝産物の製造方法、及び前記クラスターにおいて発現誘導されるタンパク質に關する。

背景技術

[0002] 真菌、放線菌及び細菌を含む微生物が産生する二次代謝産物は、医薬又は医薬原料を含む様々な用途に用いられている。

[0003] 幾つかの真菌、代表的にはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属の真菌の幾つかのゲノム解析が行われた結果、真菌には、ポリケタイド化合物、非リボソーム型ペプチド（リボソームを経由せずに非リボソームペプチド合成酵素によりアミノ酸から合成される、ペプチド結合を有する化合物）、テルペン類又はアルカロイドなどを含む多様な二次代謝産物の生合成に關与する遺伝子クラスター（生合成遺伝子クラスター）が存在していることが明らかにされている。

[0004] 例えば、黄色麹菌 (*A. flavus*) では、55種類の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが染色体上にコードされていることが示されている。しかし、この様な遺伝子クラスターの半数以上は真菌細胞内において殆ど発現されていないか、あるいは極めて微量の二次代謝産物しか産生されない程度にしか発現されていないのが現実である。

[0005] このことは、未だその具体的な構造や機能が特定されていない多数の未知の二次代謝産物を生産する能力を真菌が潜在的に有していることを意味する。そこで、真菌の潜在的な二次代謝産物の生産能力を発揮させるために、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの発現を人為的に誘導し、十分な量の二次代謝産物を合成させようとする試みが提唱されている。その1つは、目的となる二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子クラスターの

転写因子を過剰発現させ、二次代謝産物の合成量を高める方法である。もう一つは、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターのcDNAを構築し、これを適当な宿主発現系を用いて高発現させて二次代謝産物を合成させる方法である。特に後者の場合、複数の生合成遺伝子クラスターの間で各クラスターの構成遺伝子を組み換えて非天然の二次代謝産物を合成しようとする試みも提唱されている。

[0006] ところで、放線菌の一部では、二次代謝産物としてリボソームペプチドと称される化合物を生成することが知られている。リボソームペプチドは、タンパク質合成の場であるリボソームを介して生合成されるが、環状構造、枝状構造あるいは非天然アミノ酸を含むなど、通常の構成タンパク質や酵素タンパク質にはあまり見られない化学的特徴を伴った、ペプチド結合を有する化合物である。一方、前述のように真菌が産生する二次代謝産物としてはポリケタイド化合物、非リボソーム型ペプチド、テルペン類又はアルカロイドなどが知られているが、真菌由来のリボソームペプチド及びその生合成に関する生合成遺伝子クラスターに関する報告は、これまでのところAmanita属由来のものが知られている程度しかない（非特許文献1）。

[0007] 本発明者らは、塩基配列情報を基にして二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの存在を推定するバイオインフォマティクス的手法を提唱している（特許文献1）。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Hallenら、2007年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第104巻、19097-19101ページ

特許文献

[0009] 特許文献1：WO2012/039484

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、真菌由来のリボソームペプチドの生合成に関与する遺伝子クラスターを特定し、これを用いて真菌由来のリボソームペプチドを組換え的に生産する方法を提供することを目的とするものである。真菌由来のリボソームペプチドの生合成遺伝子クラスターのさらなる存在を明らかにすること、及びその組換え的生产を可能にするための真菌由来のリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの特定及び利用は、真菌由来のリボソームペプチドの有効利用において重要である。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、稲コウジ病菌（ウスチラギノイデア・ヴィレンス、*Ustilaginoida virens*）が産生する二次代謝産物として知られているウスチロキシシン（*ustiloxin*）Bの生合成経路に関する研究過程において、ウスチロキシシンB生合成に関連する遺伝子が遺伝子クラスターを形成していることを見いだした。さらに、小胞体移行シグナル配列とウスチロキシシンBの化学構造中に見られるアミノ酸配列が複数回繰り返されてなる反復配列とを含むウスチロキシシンBの前駆体ペプチドをコードする遺伝子（*ustA*）が同クラスターの構成遺伝子であること、真菌特異的なアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子が同クラスターの構成遺伝子として存在することを見いだした。さらに、前記小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むという特徴を有するリボソームペプチド前駆体遺伝子、前記真菌特異的なアミノ酸配列を含むタンパク質のアミノ酸配列と一定の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子を含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、*A. flavus*を含む複数の糸状菌のゲノムに多数存在していることを確認し、下記の各発明を完成させた。

[0012] （１）真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法であって、
工程 a）小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子、並びに配列番号 1 に示される塩基配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満でリボソームペプチドの生合成に

関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子、配列番号2に示されるアミノ酸配列に対するE値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に対するE値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、及び／又は配列番号6に示されるアミノ酸配列に対するE値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させる工程、並びに

工程b) 細胞からリボソームペプチドを回収する工程を含む、前記製造方法。

(2) リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子が、AspGD ID番号がAFL2T_08516、Acar5010_211921、Acar5010_131040、ACLA_063320、Aspbr1_0148406、An06g02130、Aspz01_1501727、Acar5010_210441、Aspz01_0132961、Aacu16872_042334、An03g05230、Asptu1_0047109、Aspfo1_0048058、Aspka1_0178058、Aspz01_0673756、AFUB_096780、Aspwe1_0028756、Aspwe1_0177551、Aspfo1_0041528、Aspka1_0176174、Aspz01_0138840及びAacu16872_044658である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、(1)に記載の製造方法。

(3) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対するE値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子が、AspGD ID番号がAFL2T_08517、Acar5010_156521、Acar5010_131041、ACLA_063300、ACLA_063310、Aspbr1_0073580

、An06g02120、Aspz01__0020615、Aspz01__0147593、Acar5010__399409、Aspz01__0097397、Aacu16872__042333、An03g05220、Asptu1__0047108、Aspf01__0048061、Aspk a1__0178059、Aspz01__0070555、AFUB__096790、Aspwe1__0041401、Aspwe1__0188242、Aspf01__0203572、Aspk a1__0176173、Aspz01__0163562及びAacu16872__044657である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、(1)又は(2)に記載の製造方法。

(4) 工程a)の強制発現が、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターに含まれる転写因子をコードする遺伝子のプロモーターを高発現プロモーターに組み換えることによって達成される、(1)～(3)のいずれかに記載の製造方法。

(5) 前記リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、ペプチダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、(1)～(4)のいずれかに記載の製造方法。

(6) 細胞が真菌細胞である、(1)～(5)のいずれかに記載の製造方法。

(7) 真菌細胞が*Aspergillus*属真菌の細胞である、(6)に記載の製造方法。

(8) 配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質。

(9) (8)に記載のタンパク質をコードするcDNA。

(10) 配列番号6に示されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞

内におけるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質。

(11) (10)に記載のタンパク質をコードするcDNA。

(12) 真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法であって、

工程a) 小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子、並びに配列番号3に示されるアミノ酸配列の81番目～225番目のアミノ酸配列と20%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、及び／又は配列番号6に示されるアミノ酸配列の57番目～259番目のアミノ酸配列と20%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させる工程、並びに

工程b) 細胞からリボソームペプチドを回収する工程を含む、前記製造方法。

(13) リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子が、AspGD 1 D番号がAFL2T__08516、Acar5010__211921、Acar5010__131040、ACLA__063320、Aspbr1__0148406、An06g02130、Aspz01__1501727、Acar5010__210441、Aspz01__0132961、Aacu16872__042334、An03g05230、Asptu1__0047109、Aspfo1__0048058、Aspk a1__0178058、Aspz01__0673756、AFUB__096780、Aspwe1__0028756、Aspwe1__0177551、Aspfo1__0041528、Aspk a1__0176174、Aspz01__0138840及びAacu16872__044658である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、(12)に記載の製造方法。

(14) 配列番号3に示されるアミノ酸配列の81番目～225番目のアミノ酸配列と20%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペ

プチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子が、AspGD
ID番号がAFL2T_08517、Acar5010_156521、Acar5010_131041、ACLA_063300、ACLA_063310、Aspbr1_0073580、An06g02120、Aspz01_0020615、Aspz01_0147593、Acar5010_399409、Aspz01_0097397、Aacu16872_042333、An03g05220、Asptu1_0047108、Aspfo1_0048061、Aspkal_0178059、Aspz01_0070555、AFUB_096790、Aspwe1_0041401、Aspwe1_0188242、Aspfo1_0203572、Aspkal_0176173、Aspz01_0163562及びAacu16872_044657である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、(12)又は(13)に記載の製造方法。

(15) 工程a)の強制発現が、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターに含まれる転写因子をコードする遺伝子のプロモーターを高発現プロモーターに組み換えることによって達成される、(12)～(14)のいずれかに記載の製造方法。

(16) 前記リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、ペプチダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、(12)～(15)のいずれかに記載の製造方法。

(17) 細胞が真菌細胞である、(12)～(16)のいずれかに記載の製造方法。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、これまでに報告のない新規な真菌由来のリボソームペプチドを製造することができる。これにより、医薬その他の有用物質への応用が期待される真菌由来の二次代謝産物であるリボソームペプチドを提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]ウスチロキシシンBの化学構造を示す一般式である。

[図2]ウスチロキシシンB生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子を欠失させた *A. flavus* 変異体のウスチロキシシンB産生能を示すグラフである。パネルAは各変異体の培養液中に含まれるウスチロキシシンBのLC-MS解析のチャートを示す。パネルBは培養液中のウスチロキシシンBを定量した結果を示すグラフである。

[図3]ウスチロキシシンB生合成遺伝子クラスター内における各構成遺伝子の配置を示す。

[図4]mRNAから実際に翻訳されるウスチロキシシンB生合成に関与するタンパク質とウスチロキシシンB生合成遺伝子クラスターのゲノム配列から演繹推定される推定アミノ酸配列それぞれについて、ゲノム配列に対するORFの位置を対比させた図（上流側）である。図中、濃いグレーがゲノム配列から演繹推定されるORFを、薄いグレーがmRNAから翻訳されるアミノ酸配列のORFをそれぞれ示す。

[図5]mRNAから実際に翻訳されるウスチロキシシンB生合成に関与するタンパク質とウスチロキシシンB生合成遺伝子クラスターのゲノム配列から演繹推定される推定アミノ酸配列それぞれについて、ゲノム配列に対するORFの位置を対比させた図（下流側）である。図中、濃いグレーがゲノム配列から演繹推定されるORFを、薄いグレーがmRNAから翻訳されるアミノ酸配列のORFをそれぞれ示す。

[図6] *A. flavus* 及び *U. virens* のウスチロキシシン生合成遺伝子クラスター内における各構成遺伝子の配置の比較を示す図である。

[図7] (A) *A. flavus* の産生するウスチロキシシン前駆体の構造を示す図である。(B) *U. virens* が産生するウスチロキシシン前駆体の構造を示す図である。

[図8]ウスチロキシシンFの化学構造を示す図である。

[図9]ウスチロキシシンFからメチル基が除去された化合物F Δ Meの化学構造を示す図である。

[図10] u s t Y a の H X X H C モチーフの点変異体をコードする遺伝子で形質転換された A. f l a v u s がウスチロキン B の産生能を失うことを示す LC-MS 解析のチャートである。

[図11] 特許文献 1 に記載された方法によってウスチロキシン B 生合成遺伝子クラスターとは別に A. f l a v u s で見いだされた、分子量 1019 のリボソームペプチドの生合成に関与する遺伝子クラスター領域を示す図である。

[図12] 分子量 1019 のリボソームペプチドの生合成遺伝子クラスターの一部が破壊された A. f l a v u s 変異株が、分子量 1019 のリボソームペプチドの産生能を失うことを示す LC-MS 解析チャートである。

[図13] 特許文献 1 に記載された方法によってウスチロキシン B 生合成遺伝子クラスターとは別に A. f l a v u s で見いだされた、分子量 809 のリボソームペプチドの生合成に関与する遺伝子クラスター領域を示す図である。

[図14] 分子量 809 のリボソームペプチドの生合成遺伝子クラスターの一部が破壊された A. f l a v u s 変異株が、分子量 809 のリボソームペプチドの産生能を失うことを示す LC-MS 解析チャートである。

発明を実施するための形態

- [0015] 本発明は、真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法であって、工程 a) 小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子、並びに配列番号 1 に示される塩基配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満でリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、若しくは配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、及び／又は配列番号 6 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタ

ンパク質をコードする遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させる工程、並びに工程b) 細胞からリボソームペプチドを回収する工程を含む、前記製造方法を提供する。

[0016] 本発明者らは、前記特許文献1に記載された二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの存在を推定するバイオインフォマティクス的手法をさらに発展させて、MIDDAS-M (Motif-Independent De novo Detection Algorithm for Secondary Metabolite Gene clusters)を開発した (Umemuraら、2013年、PLOS ONE、第8巻、e84028、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/articles/PMC3877130/pdf/pone.0084028.pdf>)。このMIDDAS-Mを用いて、*A. flavus*を含む3種類のカビのゲノム塩基配列上で、480の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの存在を推定し、*A. flavus*が産生するウスチロキシンBがリボソームペプチドであり、遺伝子情報のデータベースを提供しているNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 遺伝子IDでAFLA_094940からAFLA_095110遺伝子で構成される遺伝子クラスターの働きによって産生されることを明らかにした。

[0017] ウスチロキシンBは、図1に示される一般式で表される物質で、稲コウジ病菌 (ウスチラギノイデア・ヴィレンス、*Ustilaginoides virens*) が産生する二次代謝産物として知られている。ウスチロキシンBは、チロシン (Tyr)、アラニン (Ala)、イソロイシン (Ile) 及びグリシン (Gly) がペプチド結合によって繋がった基本構造と、TyrとIleの間の環状構造とを有し、Tyrの芳香環にノルバリンが硫黄原子を介して結合している構造を有する。

[0018] <リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子>

本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、小胞体移

行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子（以下、リボソームペプチド前駆体遺伝子と表す）を含む。ここで小胞体移行シグナル配列とは、タンパク質分子のN末端に位置する、正に荷電したアミノ酸、疎水性アミノ酸に富む領域及び極性を有するアミノ酸から構成されるアミノ酸配列として一般に認識されているアミノ酸配列であり、その具体的なアミノ酸配列は多数存在することが当業者に広く知られている。

[0019] リボソームペプチドは、非リボソームペプチドとは異なり、タンパク質合成の場であるリボソームを介して生合成されるが、環状構造、枝状構造あるいは非天然アミノ酸を含むなど、通常の構造タンパク質や酵素タンパク質にはあまり見られることのない化学的特徴を伴った、ペプチド結合を有する化合物をいう。本発明は、真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法であり、かかるリボソームペプチドは、真菌のゲノムにコードされるリボソームペプチド前駆体から生合成される。

[0020] ウスチロキシンBの生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子を詳細に解析したところ、NCBI遺伝子IDがAFLA__094980である機能未同定であった遺伝子が、小胞体移行シグナル配列とウスチロキシンBに見られる4つのアミノ酸（Tyr、Ala、Ile、Gly）がこの順序で並ぶ配列が16回繰り返されてなる反復配列とを含むアミノ酸配列をコードしていることが確認された。

[0021] 上記解析の結果から、AFLA__094980は、小胞体移行能を有し、小胞体内でのペプチド合成経路を経てウスチロキシンBに変換されるウスチロキシンB前駆体をコードする遺伝子、すなわちリボソームペプチド前駆体遺伝子であると判断される。

[0022] また、*Aspergillus*属の真菌の分子生物学的情報をデータベース化しているAspGD (<http://www.aspgd.org/>、Cerqueiraら、2013年、*Nucleic Acids Res.*、第42巻、705-710ページ) に対して、Smith-Water

man アルゴリズム (Smith ら、1981 年、J. Mol. Biol.、第 147 巻、195-197 ページ) を用いて自己配列内で局所的に類似する配列を有する反復配列を含むタンパク質を探索し、さらにフリーソフトである SignalP 4.1 (Nielsen ら、1997 年、Protein Eng.、第 10 巻、1-6 ページ及び Petersen ら、2011 年、Nat. Methods、第 8 巻、785-786 ページ) を用いてシグナルペプチドの有無を確認したところ、リボソームペプチド前駆体遺伝子が下記表 1 に示されるように複数の *Aspergillus* 属の真菌において見いだされた。これら遺伝子は、本発明における真菌由来のリボソームペプチド前駆体遺伝子としての好適な例を構成する。

[0023]

[表1]

AspGD ID	真菌株	反復配列	配列番号
AFL2T_08516	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357	NTVEDYAIGIDKR	2 1
Acar5010_211921	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010	VDXADGF	2 2
Acar5010_131040	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010	EDGDDNVAYTWVPEKR	2 3
ACLA_063320	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	DTQEPAYVWAST	2 4
Aspbr1_0148406	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740	SMASGPVAEEAVPTYDKR	2 5
An06g02130	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	SMASGPVAEEAVPTYDKR	2 5
Aspzo1_1501727	<i>Aspergillus zonatus</i>	GTDTAATYPVAEEDI	2 6
Acar5010_210441	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010	HEYTVDDDEV	2 7
Aspzo1_0132961	<i>Aspergillus zonatus</i>	HSYGVDGDEV	2 8
Aacu16872_042334	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872	AELDGDLYN	2 9
An03g05230	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	LDGDLYNY	3 0
Asptu1_0047109	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48	[YGX]n	
Aspfo1_0048058	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47	[YGX]n	
Aspka1_0178058	<i>Aspergillus kawachii</i>	[YGX]n	
Aspzo1_0673756	<i>Aspergillus zonatus</i>	[YGX]n	
AFUB_096780	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	[YGX]n	
Aspwe1_0028756	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9	SADLAFWQSGKW	3 1
Aspwe1_0177551	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9	AEPLQWI	3 2
Aspfo1_0041528	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47	VEERDXXAVLNXRFTYED	3 3
Aspka1_0176174	<i>Aspergillus kawachii</i>	VEERDXXAVLNXRFTYED	3 4
Aspzo1_0138840	<i>Aspergillus zonatus</i>	ETEEPYEHXXSIYN	3 5
Aacu16872_044658	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872	DDADAAYLIGY	3 6

[0024] <ustYaホモログ>

本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、配列番号 1 に示される塩基配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満でリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含む。

[0025] また本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、配列番号 1 に示される塩基配列に対するビットスコア (b i t s c o r e) が 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むものであってもよい。

[0026] さらに本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の 81 番目～225 番目のアミノ酸配列と 20% 以上、好ましくは 40% 以上、より好ましくは 60% 以上、なおより好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むものであってもよい。

[0027] また本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、
(i) 配列番号 1 に示される塩基配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満でリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する

遺伝子、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、若しくは配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、

(i i) 配列番号 1 に示される塩基配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、若しくは配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、
又は

(i i i) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の 81 番目～225 番目のアミノ酸配列と 20% 以上、好ましくは 40% 以上、より好ましくは 60% 以上、なおより好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

であって、かつ、少なくとも一つの 2 核型金属捕捉モチーフを有するタンパク質をコードする遺伝子を含むものであってもよい。2 核型金属捕捉モチーフの好ましいアミノ酸配列は His-Xxx-Xxx-His-Cys (HXXHC) である。

[0028] 配列番号 1 に示される塩基配列からなる遺伝子（以下、ustYa と表す）は、NCBI 遺伝子 ID が AFLA_094990 である機能未同定であった遺伝子である。本発明者らの研究により、ウスチロキシン B を生合成することのできる黄色麹菌 (*A. flavus*) のゲノム上で ustYa が破

壊された株は、ウスチロキシンBを生産しなくなることが確認された。すなわち *ustY a* は、リボソームペプチドであるウスチロキシンBの生合成に関与する遺伝子である。また、ゲノム上の位置は、ウスチロキシンBの前駆体をコードしている前記 *AFLA__094980* に隣接して存在しており、ウスチロキシンBの生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子の1つである。

[0029] また、配列番号2は、配列番号1の塩基配列から演繹推定されたアミノ酸配列として、NCBIデータベースに登録されているアミノ酸配列である。このアミノ酸配列を基に、2013年12月16日の時点の前記 *AspGD* 及びUniProtKB (version 2013_08、Magraneら、2011年、Database bar009) に対してBlastp検索を行ったところ、E値が $1e-4$ 未満のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードしている遺伝子が、下記表2に示されるように複数の *Aspergillus* 属の真菌において見いだされた。さらに、これら遺伝子はいずれも、各真菌においてリボソームペプチド前駆体遺伝子に隣接あるいは最大で25Kbの範囲内（遺伝子の数では、リボソームペプチド前駆体遺伝子との間に最大で10遺伝子が存在している程度の範囲）といった近傍に位置していることも確認された。これら遺伝子は、リボソームペプチド前駆体遺伝子と共に真菌由来のリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子であり、当該リボソームペプチド前駆体からのリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子としての好適な例を構成する。なお、表中の *AspGD* ID番号は、前記 *AspGD* において使用されている、登録された遺伝子のID番号である。

[0030]

[表2]

ustYaホモログ AspGD ID	真菌株
AFL2T_08517	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
Acar5010_156521	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_131041	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
ACLA_063300; ACLA_063310	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1
Aspbr1_0073580	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
An06g02120	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
Aspzo1_0020615; Aspzo1_0147593	<i>Aspergillus zonatus</i>
Acar5010_399409	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Aspzo1_0097397	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aacu16872_042333	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
An03g05220	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
Asptu1_0047108	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Aspfo1_0048061	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspka1_0178059	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspzo1_0070555	<i>Aspergillus zonatus</i>
AFUB_096790	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163
Aspwe1_0041401	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspwe1_0188242	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspfo1_0203572	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspka1_0176173	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspzo1_0163562	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aacu16872_044657	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872

[0031] 配列番号3に示されるアミノ酸配列は、後に説明するように、配列番号1の塩基配列を有する遺伝子から転写翻訳されることで実際に生合成されるタンパク質（以下、ustYaタンパク質と表す）のアミノ酸配列である。

[0032] E値（E-value、expectation value）とは、ある配列（クエリー配列）ともう一つの配列との間の相同性を評価する指標の一つであり、あるクエリー配列に対してランダムな配列データベースを検索した際に、そのスコア以上の値になるアライメントの本数の期待値をいう。特に本発明では、配列データベースに対して検索手段としてblastx、tblastx、tblastn、blastp、又はpsi-blast

のいずれかの相同性検索プログラム（以下、纏めてB l a s t 法と表す）を用いた相同性検索を実行したときのE値を採用する。特にB l a s t 法においてデフォルトのパラメータ条件で相同性検索を実行したときのE値であることが好ましい。従って、ある1つの種の微生物の全配列情報に対して、配列番号1に示される塩基配列をクエリー配列とし、B l a s t 法を用いた相同性検索の結果としてE値が 1×10^{-4} 未満である塩基配列を含む遺伝子、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列をクエリー配列とし、B l a s t 法を用いた相同性検索の結果としてE値が 1×10^{-4} 未満であるアミノ酸配列をコードする遺伝子などを含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、本発明の対象とされる。また、検索対象とされるデータベースとしては、前述のUniProt若しくはAspGD、又はUniProtKB/Swiss-Prot (http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html)などを挙げるができる。

[0033] ビットスコアは、B l a s t 法においてデフォルトのパラメータ条件で相同性検索を実行したときの値であることが好ましい。

[0034] また本発明では、配列番号3に示されるアミノ酸配列の81番目～225番目のアミノ酸配列と20%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上、なおより好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターも対象とされる。前記81番目～225番目のアミノ酸配列は、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の膜貫通（TM）ヘリックスよりもC末端側の領域である。

[0035] 本発明では、u s t Y aと上記の一定の相同性を示す遺伝子をU s t Y aホモログ遺伝子と表す。

[0036] 本発明にいうリボソーム前駆体ペプチドとu s t Y aホモログ遺伝子との組合せは、前記表1に示されるリボソーム前駆体ペプチドをコードする遺伝

子22種類と表2に示されるu s t Y aホモログ遺伝子22種類を含み、2013年12月16日の時点でA s p G Dに登録されているA s p e r g i l l u s 属細菌において多数存在することが本発明者らにより確認された。これら両遺伝子の組合せを表3～表6に示す。これら組合せを含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは本発明の製造方法において利用可能なものの例である。

[0037]

[表3]

ustYaホモログ 遺伝子 (AspGD ID)	リボソームペプチド 前駆体遺伝子 (AspGD ID)	真菌株
AFL2T_08517	AFL2T_08516	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
Acar5010_156521	Acar5010_211921	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_131041	Acar5010_131040	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
ACLA_063300; ACLA_063310	ACLA_063320	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1
Aspbr1_0073580	Aspbr1_0148406	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
An06g02120	An06g02130	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
Aspzo1_0020615; Aspzo1_0147593	Aspzo1_1501727	<i>Aspergillus zonatus</i>
Acar5010_399409	Acar5010_210441	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Aspzo1_0097397	Aspzo1_0132961	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aacu16872_042333	Aacu16872_042334	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
An03g05220	An03g05230	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
Asptu1_0047108	Asptu1_0047109	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Aspfo1_0048061	Aspfo1_0048058	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspka1_0178059	Aspka1_0178058	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspzo1_0070555	Aspzo1_0673756	<i>Aspergillus zonatus</i>
AFUB_096790	AFUB_096780	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163
Aspwe1_0041401	Aspwe1_0028756	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspwe1_0188242	Aspwe1_0177551	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspfo1_0203572	Aspfo1_0041528	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspka1_0176173	Aspka1_0176174	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspzo1_0163562	Aspzo1_0138840	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aacu16872_044657	Aacu16872_044658	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872

[表4]

ustYaホモログ 遺伝子 (AspGD ID)	リボソームペプチド 前駆体遺伝子 (AspGD ID)	真菌株
Aspfo1_0203572	Aspfo1_0041528	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0061852	Aspfo1_0047724	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0164938	Aspfo1_0047724	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0048061	Aspfo1_0048058	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0048978	Aspfo1_0048977	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0210672	Aspfo1_0142682	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0058365	Aspfo1_0204647	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0065782	Aspfo1_0212561	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0147781	Aspfo1_0212561	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aspfo1_0068034	Aspfo1_0215337	<i>Aspergillus acidus</i> CBS 106.47
Aacu16872_040746	Aacu16872_040745	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_040747	Aacu16872_040745	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_042042	Aacu16872_042043	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_042041	Aacu16872_042043	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_042333	Aacu16872_042334	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_044657	Aacu16872_044658	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_035708	Aacu16872_047472	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aacu16872_025148	Aacu16872_058375	<i>Aspergillus aculeatus</i> ATCC16872
Aspbr1_0204573	Aspbr1_0027471	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0660526	Aspbr1_0058559	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0059883	Aspbr1_0059885	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0138381	Aspbr1_0059885	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0050307	Aspbr1_0060998	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0073580	Aspbr1_0148406	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0053362	Aspbr1_0148406	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Aspbr1_0045108	Aspbr1_0641345	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740
Acar5010_399425	Acar5010_008889	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_131041	Acar5010_131040	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_406329	Acar5010_131040	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_512947	Acar5010_204497	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_127372	Acar5010_204497	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_130793	Acar5010_207789	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_132386	Acar5010_209286	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_399409	Acar5010_210441	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_156521	Acar5010_211921	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_010511	Acar5010_211921	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_127432	Acar5010_403156	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_010385	Acar5010_510682	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010
Acar5010_211853	Acar5010_510682	<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010

[表5]

ustYaホモログ 遺伝子 (AspGD ID)	リボソームペプチド 前駆体遺伝子 (AspGD ID)	真菌株
ACLA_063300	ACLA_063320	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1
ACLA_063310	ACLA_063320	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1
ACLA_085380	ACLA_085390	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1
ACLA_099130	ACLA_099140	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1
AFL2T_00286	AFL2G_00285	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_03008	AFL2G_03012	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_05091	AFL2G_05092	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_08517	AFL2G_08516	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_10819	AFL2G_10818	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_11535	AFL2G_11536	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_03905	AFL2T_03904	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_05070	AFL2T_05071	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_05072	AFL2T_05071	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_06430	AFL2T_06427	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFL2T_06428	AFL2T_06427	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357
AFUB_081350	AFUB_081340	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163
AFUB_096790	AFUB_096780	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163
Afu6g00680	Afu6g00690	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293
Afu8g06420	Afu8g06430	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293
Aspgl1_0081100	Aspgl1_0045319	<i>Aspergillus glaucus</i> CBS 516.65
Aspkal_0176164	Aspkal_0176165	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0176173	Aspkal_0176174	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0177554	Aspkal_0177555	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0178059	Aspkal_0178058	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0179299	Aspkal_0179298	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0179300	Aspkal_0179298	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0181441	Aspkal_0181440	<i>Aspergillus kawachii</i>
Aspkal_0181565	Aspkal_0181566	<i>Aspergillus kawachii</i>
AN8376	AN8375	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4
AN8625	AN8624	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4
An01g07950	An01g07940	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An01g07970	An01g07940	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An01g07960	An01g07940	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An03g05220	An03g05230	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An05g01710	An05g01730	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An05g01720	An05g01730	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An06g02120	An06g02130	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An06g02140	An06g02130	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An06g02150	An06g02130	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An11g07050	An11g07040	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An11g07180	An11g07170	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An12g01750	An12g01760	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An12g10210	An12g10200	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88
An14g07300	An14g07280	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88

[0040] [表6]

ustYaホモログ 遺伝子 (AspGD ID)	リボソームペプチド 前駆体遺伝子 (AspGD ID)	真菌株
AO090011000285	AO090011000284	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
AO090020000511	AO090020000512	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
AO090023000003	AO090023000004	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
AO090113000025	AO090113000024	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
AO090701000862	AO090701000861	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
AO090701000863	AO090701000861	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
AO090701000865	AO090701000861	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40
Aspsy1_0134841	Aspsy1_0034092	<i>Aspergillus sydowii</i>
Aspsy1_0094191	Aspsy1_0050464	<i>Aspergillus sydowii</i>
ATET_02256	ATEG_02257	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
ATET_07507	ATEG_07504	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
ATET_07506	ATEG_07504	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
ATET_07806	ATEG_07807	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
ATET_08706	ATEG_08707	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
ATET_08827	ATET_08826	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624
Asptu1_0060055	Asptu1_0034279	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0044449	Asptu1_0044448	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0047108	Asptu1_0047109	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0200240	Asptu1_0117580	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0191588	Asptu1_0191587	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0048498	Asptu1_0194567	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0133911	Asptu1_0195731	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Asptu1_0919877	Asptu1_0196149	<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48
Aspve1_0086396	Aspve1_0044581	<i>Aspergillus versicolor</i>
Aspve1_0089044	Aspve1_0374943	<i>Aspergillus versicolor</i>
Aspwe1_0041401	Aspwe1_0028756	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspwe1_0054465	Aspwe1_0045184	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspwe1_0188242	Aspwe1_0177551	<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9
Aspzo1_0126660	Aspzo1_0011589	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0105549	Aspzo1_0029343	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0137405	Aspzo1_0029343	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0097397	Aspzo1_0132961	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0163562	Aspzo1_0138840	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0070555	Aspzo1_0673756	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0020615	Aspzo1_1501727	<i>Aspergillus zonatus</i>
Aspzo1_0147593	Aspzo1_1501727	<i>Aspergillus zonatus</i>
NFIA_047840	NFIA_047850	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181

[0041] <ustYbホモログ>

本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、上記us

t Y a ホモログ遺伝子と共に又はこれに代えて、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含んでいるものでもよい。

[0042] また本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、上記 u s t Y a ホモログ遺伝子と共に又はこれに代えて、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むものであってもよい。

[0043] また、本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、上記 u s t Y a ホモログ遺伝子と共に又はこれに代えて、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の 57 番目～259 番目のアミノ酸配列と 20% 以上、好ましくは 40% 以上、より好ましくは 60% 以上、なおより好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含んでいるものでもよい。

[0044] また本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列に対するビットスコアが 50 以上、好ましくは 60 以上、さらに好ましくは 75 以上であるアミノ酸配列、又は配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の 57 番目～259 番目のアミノ酸配列と 20% 以上、好ましくは 40% 以上、より好ましくは 60% 以上、なおより好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ少なくとも一つの 2 核型金属捕捉モチーフを有するタンパク質をコードする遺伝子を含むものであってもよい。2 核型金属捕捉モチーフの好ましいアミノ酸配列は H i s - X x x - X x x - H i s - C y s (H X X H C) である。

[0045] 配列番号 4 に示される塩基配列からなる遺伝子は、N C B I 遺伝子 I D が

AFLA__095020である機能未同定であった遺伝子である。本発明者らの研究により、ウスチロキシシンBを生合成することのできる黄色麹菌（*A. flavus*）のゲノム上で遺伝子AFLA__095020を欠失させた株は、ウスチロキシシンBを殆ど生産しなくなることが確認された。すなわち遺伝子AFLA__095020は、リボソームペプチドであるウスチロキシシンBの生合成に関与する遺伝子である。また、ゲノム上の位置は、ウスチロキシシンBの前駆体をコードしている前記AFLA__094980から2 kbほどの範囲内といった近傍に存在しており、ウスチロキシシンBの生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子の1つである。

[0046] 一方、遺伝子AFLA__095020から演繹推定され、NCBIに登録されているタンパク質のアミノ酸配列は配列番号5に示されるものであるが、実際に遺伝子AFLA__095020を含むゲノム領域から転写翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号6に示されるものであることが確認された。したがって、かかる配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（以下、ustYbタンパク質と表す）が、ウスチロキシシンB生合成経路に関与していることが明らかとなった。

[0047] 本発明は、前記リボソームペプチド前駆体遺伝子、及びustYbタンパク質に対する先に説明したE値が $1e-4$ 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子（以下、ustYbホモログ遺伝子と表す）を含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターも、対象とするものである。

[0048] ここで、E値、ビットスコア、Blast法の検索条件、対象データベース等については先に述べたとおりである。従って、データベースに登録されたアミノ酸配列情報に対して、配列番号6に示されるアミノ酸配列をクエリー配列とし、Blast法を用いた相同性検索の結果としてE値が $1e-4$ 未満であるアミノ酸配列又はビットスコアが50以上、好ましくは60以上、さらに好ましくは75以上であるアミノ酸配列をコードする遺伝子及び前記リボソームペプチド前駆体遺伝子を含むリボソームペプチド生合成遺伝子

クラスターは、本発明の対象とされる。

[0049] また本発明では、前記リボソームペプチド前駆体遺伝子及び配列番号6に示されるアミノ酸配列の57番目～259番目のアミノ酸配列と20%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上、なおより好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターも本発明の対象に含まれる。配列番号6に示されるアミノ酸配列の57番目～259番目のアミノ酸配列は、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の膜貫通（TM）ヘリックスよりもC末端側の領域である。

[0050] 本発明では、u s t Y bと上記の一定の相同性を示す遺伝子をU s t Y bホモログ遺伝子と表す。

[0051] <強制発現>

本発明は、前述のリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子並びにu s t Y aホモログ遺伝子及び／又はu s t Y bホモログ遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させる工程a)を含む。

[0052] 真菌における前記特徴を有するリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターに関する報告は非特許文献1以外にはなく、またかかるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させて真菌由来のリボソームペプチドを製造しようとする試みも行われてはいなかった。本発明は、これまでに報告のない新規な真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法を提供するものである。

[0053] リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子並びにu s t Y aホモログ遺伝子及び／又はu s t Y bホモログ遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、M I D D A S - Mアルゴリズムを用いることで、ゲノム配列上において特定すればよい。また、真菌由来のリボソーム

ムペプチドの配列情報が蓄積されたときは、SMURF (J. Craig Venter Institute、<http://jcv.i.org/smurf/index.php>) 又はantiSMASH (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell、<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) 等の既知の二次代謝遺伝子クラスター予測アルゴリズムも利用可能となる。あるいは、配列番号1～6に示されるアミノ酸配列又は塩基配列を基にそれぞれのホモログ遺伝子を検索し、その結果を基に当該遺伝子の近傍にあるリボソームペプチド前駆体遺伝子を含むクラスターを特定してもよい。なお、前記リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子とustYaホモログ遺伝子及び／又はustYbホモログ遺伝子とが、隣接している又は最大で25Kbの範囲内に位置している、又はリボソームペプチド前駆体遺伝子とustYaホモログ遺伝子及び／又はustYbホモログ遺伝子との間に最大で10遺伝子が存在している程度の範囲内に位置しているリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、本発明の対象である。

[0054] 本発明におけるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターは、ペプチダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むように特定することが好ましい。ペプチダーゼ活性を有するタンパク質は、リボソームペプチド前駆体の反復配列を切断するなどして、リボソームペプチドの生合成に関与する。ペプチダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、ゲノムの塩基配列から演繹推定される既知のペプチダーゼドメイン配列又はこれに類似するアミノ酸配列をコードする遺伝子として特定することができる。

[0055] リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの強制発現は、かかるリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターをゲノム上に有する真菌細胞内において行ってもよく、又は当業者に知られた遺伝子組換え手法を用いてリボソームペプチド生合成遺伝子クラスター全体を適当な発現ベクターにクローニングし、異種若しくは同種の真菌細胞、酵母、又は細菌その他の宿主細胞に導

入した後にこれを強制発現させてもよい。真菌細胞を宿主とするときは、*A. niger*、*A. nidulans*、*A. flavus*、*A. oryzae*その他の*Aspergillus*属の真菌細胞を用いることが好ましい。

[0056] 上記アルゴリズムあるいは相同性検索によって特定されたリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの強制発現は、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスター自身が有する転写因子をコードする遺伝子（以下、C6型TF遺伝子と称する）の転写を誘導することにより行うことができる。C6型TF遺伝子の転写は、C6型TF遺伝子自身のプロモーターによるものでもよく、又はC6型TF遺伝子プロモーターを細胞内で機能する別のプロモーターに置き換えて誘導してもよい。また、C6型TF遺伝子プロモーターに細胞内で機能する別のプロモーターを連結させて、C6型TF遺伝子の転写を誘導してもよい。あるいは、C6型TF遺伝子全体を細胞内で機能するプロモーターを有する別のTF遺伝子に置き換えて、リボソーム生合成遺伝子クラスター全体の発現を誘導してもよい。また、上記の方法に準じて、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを構成する遺伝子の一つ一つの発現を誘導することにより、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスター全体を強制発現させてもよい。

[0057] 細胞内で機能する別のプロモーターは、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを強制発現させようとする細胞の種類によって適宜選択し、当業者に知られた遺伝子組換え手法によってゲノム上で又はベクター上で組み換えることができる。真菌細胞内でリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを強制発現させるために好適なプロモーターの例としては、アスペルギルス属菌由来の*tef1*遺伝子プロモーター（Kitamotoら、1998年、*Appl. Microbiol. Biotechnol.*、第50巻、85-92ページ）、*gpdA*遺伝子プロモーター（Puntら、*J. Biotechnol.*、1991年、第17巻、19-33ページ）、 β -キシロシダーゼ α Indプロモーター、アルコール脱水素酵素（*alcA*）のプロモーター（Waringら、*Gene*、1989年、第79巻、119-

130ページ)、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター (Tadaら、Mol. Gen. Genet.、1991年、第229巻、301-306ページ)、ThiAプロモーター (Shojiら、FEMS Microbiol. Lett.、2005年、第244巻、41-46ページ)、大腸菌の β -グルクロニダーゼ遺伝子プロモーター (Robertsら、Curr. Genet.、1989年、第15巻、177-180ページ)、グルコアミラーゼ遺伝子 (glaA) のプロモーターなどを挙げることができる。

[0058] 細胞内でのリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの強制発現は、当該クラスターを有する細胞を、その細胞に適した培地で培養することにより行うことができる。真菌の培養に適した培地としては、サブローデキストロース培地、ポテトデキストロース培地、マイコセル培地、ブレインハートインフュージョン培地、野菜ジュース培地、イーストエクストラクト培地、トリプティックソイ培地等を挙げることができ、その形態は液体培地でも寒天培地等の固形培地でもよい。培養は、真菌に一般的な条件、例えば30℃前後の温度で好氣的に培養すればよい。

[0059] <回収>

本発明は、細胞からリボソームペプチドを回収する工程b)を含む。リボソームペプチドの細胞からの回収は、リボソームペプチドを生産可能な条件で培養した細胞の培地から、一般的に知られた手法により回収することができる。また、当該細胞の内部にリボソームペプチドが蓄積しているときは、細胞を適当な方法で破壊した後に通常的手法により回収すればよい。回収されたリボソームペプチドは、水又は適当な緩衝溶液あるいは有機溶媒などに溶解又は懸濁して保存し、使用してもよい。また、凍結乾燥その他の適当な方法によって乾燥させてもよい。

[0060] <ustYタンパク質>

本発明はさらに、配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり

、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質、及びこれをコードするcDNAを提供する。

[0061] 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、配列番号1に示される塩基配列からなる遺伝子すなわちustYa (NCBI遺伝子ID AFLA_094990) から転写翻訳され、生合成されるタンパク質である。ustYaの塩基配列の開始コドン及び読み枠を考慮した解析は、複数のイントロン及びエクソンの存在と、ustYa遺伝子産物として配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を示す。しかしながら、A. flavus細胞内で転写されているmRNAの塩基配列を実験的に決定した結果、ustYaタンパク質のアミノ酸配列は配列番号3に示されるものであり、演繹推定される配列番号2のそれとは異なることが確認された。この様に、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は新規な物質である。

[0062] 後に実施例で示すように、A. flavusのゲノム上のustYa遺伝子を外来遺伝子で置換してustYa遺伝子の機能を失わせることにより、A. flavusのウスチロキシンB及びウスチロキシンFの生産能が失われる。すなわち、ustYaタンパク質はウスチロキシンB及びウスチロキシンFの生合成に関与するタンパク質である。ustYaタンパク質には、金属イオン、特に亜鉛イオンとの結合に関与するモチーフ配列領域、及びWH1ドメインに似た領域などが認められ、リボソームペプチド前駆体の翻訳過程におけるタンパク質輸送、tyrとlleとの間の環状構造の形成、酸化還元活性、GTPase活性、ATP結合能、遺伝子発現又は転写制御能などの機能を通じて、ウスチロキシンBの生合成に関与していると推察される。

[0063] また、配列番号3に示されるアミノ酸配列を基にタンパク質配列データベースである前記UniProtKBについてBlast検索したところ、真菌類 (Fungi) 以外の生物種において相同性が認められる配列は検出されなかった。

[0064] なお、配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質も、本発明の一態様である。

[0065] タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸残基の電荷、大きさ、疎水性等の物理化学的性質について、保存性の高い変異が許容され得ることが、経験的に認められている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン (G l y) とプロリン (P r o)、G l y とアラニン (A l a) 又はバリン (V a l)、ロイシン (L e u) とイソロイシン (I l e)、グルタミン酸 (G l u) とグルタミン (G l n)、アスパラギン酸 (A s p) とアスパラギン (A s n)、システイン (C y s) とスレオニン (T h r)、T h r とセリン (S e r) 又はA l a、リジン (L y s) とアルギニン (A r g) 等が挙げられる。また、上述の保存性を超えた場合でも、なおそのタンパク質の本質的な機能を失わない変異が存在し得ることも当業者において経験されるところである。

[0066] したがって、配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、真菌由来のリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質、特にリボソームペプチド前駆体の翻訳過程におけるタンパク質輸送又はT y rとI l eとの間の環状構造の形成に関与するタンパク質は、本発明の一態様として理解される。

[0067] <u s t Y bタンパク質>

本発明はさらに、配列番号6に示されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質、及びこれをコードするc D N Aを提供する。

[0068] 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、配列番号4に

示される塩基配列からなる遺伝子（NCBI 遺伝子 ID AFLLA__095020）を一部に含む周辺領域から転写翻訳され、生合成されるタンパク質である。遺伝子 AFLLA__095020 から演繹推定され、NCBI に登録されているタンパク質のアミノ酸配列は配列番号 5 に示されるものであるが、実際に遺伝子 AFLLA__095020 を含むゲノム領域から転写翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 6 に示されるものであることが確認された。この様に、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は新規な物質である。

[0069] 後に実施例で示すように、*A. flavus* のゲノム上の遺伝子 AFLLA__095020 を外来遺伝子で置換して欠失させることにより、*A. flavus* のウスチロキシン生産能が失われる。すなわち、ustYb タンパク質はウスチロキシン B の生合成に関与するタンパク質である。ustYb タンパク質には、金属イオン、特に亜鉛イオンとの結合に関与するモチーフ配列領域が 2 箇所、及びヒスチジノーリッチ領域などが認められ、リボソームペプチド前駆体の翻訳過程におけるタンパク質輸送、Tyr と Ile との間の環状構造の形成、酸化還元活性、GTPase 活性、ATP 結合能、遺伝子発現又は転写制御能などの機能を通じて、ウスチロキシン B の生合成に関与していると推察される。

[0070] また、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を基にタンパク質配列データベースである前記 UniProtKB について Blast 検索したところ、真菌類（Fungi）以外の生物種において相同性が認められる配列は検出されなかった。

[0071] なお、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質も、本発明の一態様である。

[0072] 前述の通り、タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸残基の電荷、大きさ、疎水性等の物理化学的性質について、保存性の高い変異が許容され得るこ

とが、経験的に認められている。

[0073] したがって、配列番号6に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、真菌由来のリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質、特にリボソームペプチド前駆体の翻訳過程におけるタンパク質輸送又はTyrとIleとの間の環状構造の形成に関与するタンパク質は、本発明の一態様として理解される。

[0074] <cDNA>

本発明はさらに、前記ustYaタンパク質又はustYbタンパク質をコードするcDNAも提供する。ここにいうcDNAとは、配列番号3又は配列番号6に示されるアミノ酸配列を組換え的に生産するに適した、ゲノム上の塩基配列の一部に改変が加えられた塩基配列からなるDNA分子を意味する。その好適な例は、配列番号3又は配列番号6に示されるアミノ酸配列を一続きのオープンリーディングフレーム（ORF）としてコードするcDNA、又は配列番号3又は配列番号6に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を一続きのORFとしてコードするcDNAである。異なる態様として、ゲノム上の塩基配列にあるイントロン配列の一部を含むcDNAも本発明の範囲に含まれる。

[0075] 本発明のcDNAは1本鎖であっても、それに相補的な配列を有する核酸と結合した2本鎖、3重鎖であってもよい。また、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRPO）等の酵素や放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質等で標識されていてもよい。

[0076] 本発明のcDNAは、配列番号1～6に示される配列情報を基に、ハイブリダイゼーションやPCR法などの遺伝子工学的手法を用いたクローニングや、ホスホアミダイト法などの化学合成的手法を利用して、当業者が容易に製造することができる。また本発明のcDNAは、市販されあるいは当業者が一般に入手容易な様々なベクターに組み換えて使用することができる。ベ

クターは、必要に応じて他の塩基配列を有していてもよい。他の塩基配列の例としては、エンハンサー配列、プロモーター配列、リボゾーム結合配列、コピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のタンパク質をコードする塩基配列、ポリA付加配列、スプライシング配列、複製開始点、選択マーカーとなる遺伝子の塩基配列等を挙げることができる。

[0077] 本発明のcDNA、これを含む組み換えベクター、及び該ベクターによって形質転換された宿主細胞は、ustYaタンパク質、ustYbタンパク質の組換え的生産に利用することができる。本発明のタンパク質を組み換え生産するには、本発明のcDNA又は該cDNAを含むベクターで形質転換された宿主細胞を適当な条件下で培養して培養混合物を回収し、本発明のタンパク質を回収し、必要に応じて精製すればよい。培養混合物から本発明のタンパク質を精製する方法としては、タンパク質や低分子化合物の精製に通常使用されている方法の中から適切な方法を適宜選択して行うことができる。すなわち、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィー等、通常使用され得る方法の中から適切な方法を適宜選択し、必要によりHPLCシステム等を使用して適当な順序で精製を行えば良い。

[0078] なお、本発明のタンパク質を他のタンパク質やタグ（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインA、ヒスチジンタグ、FLAGタグその他）との融合タンパク質として発現させることも可能である。この様な融合タンパク質もまた、本発明の一態様である。これらの融合タンパク質は、適当なプロテアーゼ（例、トロンピンその他）を用いて切り出すことが可能であり、タンパク質の調製をより有利に行うことが可能となる。

[0079] この様に、本発明のタンパク質は、それ単独の形態でも別種のタンパク質との融合タンパク質の形態でも調製することができるが、これらのみに制限

されるものではなく、本願発明のタンパク質を更に種々の形態へと変換させることも可能である。例えば、タンパク質に対する種々の化学修飾、ポリエチレングリコール等の高分子との結合、不溶性担体への結合、リボソームへの封入など、当業者に知られている種々の手法による加工も可能である。

[0080] 本発明を通じて特定される真菌由来のリボソームペプチド合成遺伝子クラスターは、リボソームペプチド前駆体遺伝子並びに *u s t Y a* ホモログ遺伝子及び／又は *u s t Y b* ホモログ遺伝子の他に、様々な修飾反応に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含んでおり、それらタンパク質はそれぞれのリボソームペプチドの生合成に最適化されたタンパク質であると推察される。そのため、各クラスターの構成遺伝子を相互に組換え、あるいは複数の構成遺伝子を任意に組み合わせることで、天然に生産されるものとは異なる構造や生理活性を有する非天然型のリボソームペプチドを製造することも可能となる。

[0081] また、特定されたりボソームペプチド合成遺伝子クラスターが、例えば調節因子をコードする遺伝子を欠いている、あるいは *u s t Y a* 遺伝子ホモログ及び／又は *u s t Y b* 遺伝子ホモログの一部が欠失している等の場合には、他のリボソームペプチド合成遺伝子クラスターを構成する遺伝子から相当する機能を有する遺伝子又は別の *u s t Y a* 遺伝子ホモログ及び／又は *u s t Y b* 遺伝子ホモログを補填することで、新たなリボソームペプチドを製造することも可能である。

[0082] 本発明における遺伝子組換え手法、細胞培養、タンパク化学的手法は、当業者に知られた種々の実験ハンドブック、マニュアル、教科書あるいは様々な学術文献や特許文献に記載された手法を適宜選択して採用することができる。例えば J. Sambrook ら (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989 年) その他の実験操作マニュアルに記載された方法などを挙げることができる。

[0083] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

実施例

[0084] <実施例 1>ウスチロキシン B 生合成遺伝子クラスターの同定

(1) GenBank EQ963472-EQ966232として登録されている黄色麹菌 (*Aspergillus flavus*) の全ゲノム情報を基に、MIDDAS-M法を用いて二次代謝産物合成遺伝子クラスター解析を行った。その結果、NCBI 遺伝子 ID の AFLA__094940 から AFLA__095110 までの 18 遺伝子が、上記クラスターを構成する候補遺伝子として推定された。

[0085] (2) Minら (2007 年、Process Biochemistry、第 42 巻、729-733 頁) の方法に従い、pyrG 遺伝子を選択マーカーとして上記遺伝子を 1 つずつ選択マーカー遺伝子と置換することで欠失させた、計 18 種類の *A. flavus* 変異株を作成した。具体的な作業は次の通りである。

[0086] まず、標的となる 18 の遺伝子それぞれについて、その上流及び下流各 1 kb を含むゲノム領域が増幅されるよう設計したプライマーセットを用いて PCR を行い、前記ゲノム領域の増幅断片 1 を作製した。一方、*A. nidulans* の pyrG 遺伝子を含む約 1.8 kb のゲノム領域が増幅されるよう設計したプライマーセットを用いて PCR を行い、前記 pyrG 遺伝子を含むゲノム領域の増幅断片 2 を作製した。さらに、増幅断片 1 及び 2 を鋳型として、両断片が連結した核酸が増幅されるよう設計されたプライマーセットを用いて PCR を行い、両ゲノム領域の融合 PCR 増幅断片 3 を調製した。

[0087] 1. 12 mg/mL のウラシルを含む 24 g/L の Difco ポテトデキストロース培地に *A. flavus* (CA14 株、 $\Delta ku70$ $\Delta pyrG$ $\Delta niaD$) の分生胞子を懸濁し (10^6 /mL)、37°C で 2 日間培養した。菌体を回収し、溶菌酵素 (Sigma 社の lysing enzyme、TaKaRa 社の Yatalase、ヤクルト社のセルラーゼ) を含む緩

衝液中に懸濁して30℃で3時間インキュベートして、プロトプラストを調製した。このプロトプラストを等張液に懸濁後、前記18種類の融合PCR増幅断片3 (1 µg) を別々に加えて形質転換させ、ポリエチレングリコールの存在下でインキュベートした。インキュベーション後、プロトプラストを再生培地上に置き、3～5日間培養して真菌細胞を再生させた。再生された18の変異株が、導入されたpyrG遺伝子との置換によって各標的遺伝子が欠失したゲノム構造を有するものであることを、組み換えられたゲノム領域を鋳型にPCRで増幅させた核酸断片の配列解析により、確認した。

[0088] (3) 18の変異体それぞれを30mLのV8ジュース培地(20%キャンベル社V8野菜ジュース及び0.3%炭酸カルシウムを含む)中で30℃で5日間した後、23mLのアセトンを加えて室温で1時間インキュベートした。菌糸体をフィルターで取り除いた抽出液からアセトンを蒸発させ、残った濃縮液に等量の酢酸エチルを添加して1時間静置後、水相をポアサイズ0.22 µmのフィルターに通して、LC-MS用試料を調製した。

[0089] LC-MS用試料を、Develosil XG-C18M-5逆相カラム(野村化学社)をセットしたUltimate 3000 HPLC(Dionex社)及び水/アセトニトリルのグラジエント(0%-100%)溶媒を用いて分画した。溶出画分中のウスチロキシンBの含有量をmicrOTOF II K1K2 MS(Bruker社)を用いて定量した。定量は、RT=9分におけるm/z 644.2±0.1のEICs [M-H]⁻のピークエリアの算出によって行った。上記LC-MSの結果を図2に示す。

[0090] 上記の遺伝子のうち、ustH(AFLA__095030、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ)の欠失はウスチロキシンBの再生能に影響を与えなかったが、これはA. flavusのゲノムに同一の生理活性を有するタンパク質をコードする別の遺伝子(AFLA__074100)が存在しており、これが欠失したustHの機能を補っているためと推察される。

[0091] ustF1(AFLA__094950)及びustP2(AFLA__095010)がそれぞれ欠失した変異株はいずれも少量のウスチロキシンBの

産生能を示した。A. *flavus*のゲノムにはこれら遺伝子と高い相同性を有する別の遺伝子が存在しており、これらが欠失した遺伝子の機能を補っているものと推察される。

[0092] *ustP1* (AFLA__095000) 及び *ustYb* (AFLA__095020) については相同性の高い他の遺伝子がゲノム上には存在しないが、*ustP1* 及び *ustYb* がそれぞれ欠失した変異株も、少量のウスチロキシシンBの産生能を示した。後に説明するが、RNAシーケンスによって決定される *ustP1* 及び *ustYb* それぞれから発現されるタンパク質のアミノ酸配列は、NCBIデータベースにおいてアノテーションされているアミノ酸配列とは異なるものであった。推測に拘束されるものではないが、結果的に *pyrG* 遺伝子との置換は *ustP1* 及び *ustYb* それぞれから発現されるタンパク質の一部が欠損した変異体の発現を許しており、これが前記少量のウスチロキシシンBの産生能をもたらしているものと推察される。

[0093] UniProtKBに対するBlastpサーチの結果によると、*ustP1* はS41ペプチダーゼファミリーのN末端領域に、及び *ustP2* は同じS41ペプチダーゼファミリーの活性領域にそれぞれ相当する配列をコードしており、両遺伝子で1つのタンパク質をコードしていることが推察された。

[0094] *ustYa* (AFLA__094990) 及び *ustYb* は、Blastデータベースに対する検索の結果、真菌に特異的な遺伝子であることが確認された。

[0095] *ustS* (AFLA__095110、グルタチオンS-トランスフェラーゼ) は、ウスチロキシシンBの生合成において必須の反応工程である、ウスチロキシシンを構成するチロシン残基の芳香環にS-ノルバリンを転移させる反応を触媒する酵素である。しかし、*ustS* の欠失はウスチロキシシン産生能に影響を与えなかった。これは遺伝子クラスターの外に存在する相同遺伝子AFLA__087240が欠失した *ustS* の機能を補っているためと推察される。

[0096] AFLA__095080及びAFLA__095090にコードされているアミノ酸配列はそれぞれ、真菌特異的な転写因子ドメイン（p f a mドメイン）及びZ n² C y s⁶バイヌクレアクラスターDNA結合ドメインを完全に保持した、A. o r y z a e由来の転写因子（遺伝子名；A O O 9 0 1 1 3 0 0 0 0 3 5）のN末端とC末端のアミノ酸配列と一致していた。c D N AとしてAFLA__095080及びAFLA__095090をつなぐ領域が増幅されることが、定量的リアルタイムPCR法によって確認された。以上から、AFLA__095080及びAFLA__095090は連続して転写され、一つの転写因子（u s t R）を形成していることが確認された。

[0097] 上記の変異体の解析結果から、遺伝子の欠失でウスチロキシンBの産生が消失する遺伝子、欠失してもウスチロキシンBの産生能は維持されるが生合成経路上重要な役割を有する遺伝子として、u s t O（AFLA__094940）～u s t S（AFLA__095110）までの遺伝子をウスチロキシンBの生合成に実質的に関与しているウスチロキシンB生合成遺伝子クラスターと判断した。これらの遺伝子のNCBI ID番号、推定機能、及び大きさ（塩基対数）を表7に、またゲノム上の配置を図3に示す。

[0098]

[表7]

NCBI 遺伝子ID	推定機能	名称	塩基対
AFLA_094940	ピリドキサミン5' リン酸オキシダーゼ ファミリー	<i>ustO</i>	814
AFLA_094950	フラビン含有モノオキシゲナーゼ	<i>ustF1</i>	1812
AFLA_094960	シトクローム P 4 5 0	<i>ustC</i>	1869
AFLA_094970	リスキ様タンパク質	<i>ustU</i>	520
AFLA_094980	ウスチロキシン B 前駆体	<i>ustA</i>	770
AFLA_094990	ウスチロキシン B 生合成に関与	<i>ustYa</i>	910
AFLA_095000	ペプチダーゼ S41 ファミリータンパク質	<i>ustP1</i>	337
AFLA_095010	ペプチダーゼ S41 ファミリータンパク質	<i>ustP2</i>	1490
AFLA_095020	ウスチロキシン B 生合成に関与	<i>ustYb</i>	545
AFLA_095030	γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ	<i>ustH</i>	2065
AFLA_095040	システインデスルフェラーゼ	<i>ustD</i>	1453
AFLA_095050	フラビン含有モノオキシゲナーゼ	<i>ustF2</i>	1650
AFLA_095060	チロシナーゼ	<i>ustQ</i>	1350
AFLA_095070	MFS 多剤トランスポーター	<i>ustT</i>	1791
AFLA_095080 AFLA_095090	C 6 転写因子	<i>ustR</i>	1827
AFLA_095100	S AM 依存性メチルトランスフェラーゼ	<i>ustM</i>	1233
AFLA_095110	グルタチオン S - トランスフェラーゼ	<i>ustS</i>	732

[0099] <実施例 2> *ustR* の過剰発現による *ustB* の産生量の亢進

A. *flavus* の *tef1* 遺伝子 (Kitamoto ら、1998 年、*Appl. Microbiol. Biotechnol.*、第 50 巻、85-92 ページ) のプロモーター領域を増幅断片として得ることができるように設計したプライマーを用いて調製した増幅断片 4 と、ウスチロキシン B 生合成遺伝子クラスターをコードする核酸中の *ustR* プロモーター領域を増

幅断片として得ることができるように設計したプライマーを用いて調製した増幅断片5とを用いて、*ustR*のプロモーター領域が*tef1*遺伝子プロモーターに置き換わった増幅断片6を、融合PCR法で調製した。この増幅断片6を用いて*A. flavus* CA14株 ($\Delta ku70 \Delta pyrG \Delta niaD$) を形質転換して、*ustR*の過剰発現変異株 *ustR^{OE}* を得た。

[0100] *ustR^{OE}* を100mLのV8ジュース培地 (20%キャンベル社V8野菜ジュース及び0.3%炭酸カルシウムを含む) に植菌し、30℃で4日間攪拌培養した後、菌体を回収し、ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて全RNAを菌体から抽出し、high capacity RNA-to-cDNAキット (Applied Biosystems社) を用いてcDNAを誘導した。StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems社) 上で、qPCR with Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems社) を用いて*ustR*の発現の定量解析を行った。発現量は、チューブリン β サブユニット (AFLA_051840) の発現量を元に標準化した。

[0101] その結果、*ustR^{OE}*における*ustR*の発現量は、対照と比較して15倍に上昇することが確認された。また、実施例1と同様にしてウスチロキシシンBの定量を行ったところ、ウスチロキシシンBの産生量も4.8倍に上昇していた。

[0102] <実施例3> RNAシーケンシングによる*ustB*クラスター遺伝子翻訳領域の再アノテーション

A. flavus CA14株 ($\Delta ku70 \Delta pyrG \Delta niaD$) を親株として*pyrG*遺伝子を復帰させた復帰変異株を用意した。復帰変異株を100mLのV8ジュース培地 (20%キャンベル社V8野菜ジュース及び0.3%炭酸カルシウムを含む) に植菌し、30℃で4日間攪拌培養した。培養後に回収された菌体を液体窒素で凍らせ、乳鉢内で十分に粉砕した

。粉碎された菌体を、15 mLのISOGEN（ニッポンジーン社）に加えて十分に混和し、氷上に置いた。遠心後の上清を3 mLのクロロホルムに加えて十分に混和したのち、室温で3分間静置した。再び遠心して回収した水層を7.5 mLのイソプロパノールに加え、室温で10分間静置した。再度遠心して得たペレットをエタノール洗浄して、RNAサンプルとした。

[0103] SOLiD Total RNA-Seqキット（Applied Biosystems）を用いて、メーカーの取扱説明書に基づいてフラグメントライブラリを作成した。次世代シーケンサーシステムSOLiD 5500xl（Applied Biosystems）を用い、プロトコールに従ってRNAシーケンシングを行った。

[0104] SOLiDシステムから算出されたXSQファイルを展開し、各サンプルに対応したfastqファイルを得た。本データ及び公共配列リードデータベースNCBI SRA（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SRA>）に登録されたリードデータとして、SRR283857、SRR283858、SRR495778、SRR495942、SRR495943、SRR544871、SRR544872、SRR544873、SRR610531、SRR610532、SRR610533、SRR610534、SRR610535、SRR610537及びSRR610538を用いて、以下の作業を行った。未同定塩基を含まず、Q値（Quality value）が連続7塩基平均20未満の塩基をトリムした後の長さが30塩基以上のリードを用いて、マッピング作業を行った。ソフトウェアにはbowtie及びtophatを使用した。作業はコンピューター（DELL社製：CPU Intel Xeon E52643、メモリー256GB、ハードディスク40TB、OS：Ubuntu Linux（登録商標）13.10）上で行った。マッピング結果をゲノム情報可視化ツールで表示の上、該当遺伝子領域（スキャフォールドGenBank EQ963480上の遺伝子AFLA__094940-AFLA__095110）を目視で確認し、開始コドンとコドンの読み枠に矛盾のない領域を

CDS領域と同定した。この結果を表8～表12に示す。また、得られた結果すなわちmRNAから実際に翻訳される各タンパク質とゲノム配列から演繹推定される推定アミノ酸配列それぞれについて、それらのゲノム配列に対するORFの位置を対比させた図を図4及び図5に示す。なお、再アノテーションの結果から、AFLA__094970 (ustU) は、ustB生合成遺伝子クラスターを構成するものではないと推察された。

[0105]

[表8]

遺伝子名	アミノ酸配列
<i>ustO</i> AFLA_094940 配列番号 7	MPIFYESLSDNLRDWALRQPLFFVSSAPYRGRHINV SPKGLPDSSFAVLSPSKVAYVDSTGSGCETICHLREN GRATVMFCSDATPRIMRLFCTGSVIEWNDPRYAGY VKRMGVKSLVGARAVIILDIFKVQISCGFGVPLLDLT VDPETNEPKPCFTNRPRLGKFAEYTNRGELPEYQ MQWNSRSLDGLPGLHSAMRDKGEFIWWAHVTNW ASYHFFQLDIKTGMALMFLVMVVAQWVG YVLYQW
<i>ustF1</i> AFLA_094950 配列番号 8	MTVSQVRRVAVIGAGISGVVSTAHLVAAGFEVTVFE RNQQTGGIWLYDEQTPLECSFPSPGPSLADKVEKN ARFDREKLRLQHAPPGPCYKNLTNTVSTPLMRIKL RAWPENTPDFVHHSVVNEYIRDIALSTGVDERTIYG ARVEHVYKDGGKWHVNWSVLDDNGSIDGLEERRL ISTFDAVVVASGHYHSPHIPDIPGLSEVKKRWPSRVI HSKRYRTPEVYRDENVLMIGGGVSSMDISRDLGPF AKMIFQSTRNGDADPPALMLPDNAVRIGEIDHLELL SGTGDTLPEGDPLPLILCLKSSQRLCKIHKIIVCTGY QIVFPFLPDYHDDSMPLQDANDTILVTNGTQVHNI HRDIFYIPDPTLAFVGIPYFNTTFTLFEFQAI AVTAV WSRTACLPSTTEMREYLVKQKQTGGGRKFHSLKD KEKEYVRDLMAWINDGRNAHGLVPIEGHTAAWFE AMDKLWDEARAAMKERKEQQEKIIRIPFSADCTS VELPHLN
<i>ustC</i> AFLA_094960 配列番号 9	MSPFIFAVTLTFAILALGILRRRYFHPLSRFP GPFLGS VTSLYQTYWHVHPNKTLDHTELHRKYGPIVRYSPN GLIVNDPALLPVIYNRRANKTDFYAPVFDTHSTFTR KDYREHVASRKAISHAYSVTNTRLFEPQVDGILSELI SLLSESATEKRLVDIMEYGSWFTYDVTSLFVCGKPF GFVEKRTDVKG LIQNKKNKVL FIVFIMTIQENLSWIV RNTRLGRRYLMPHPTDQSGLG VVMAERDRIVDAVI DSDGKVKRHL LVKGSLSSLMEILGTEGCPLSLVDV KAEIFFAMLAGSSVTPSQLARVIFHISRNFKVQEKLY EELVAAEQDGRIPPLSAIISDEQAHRLPFLSACIREA QRYAPTMSQLPRYAPEGTGLELHEQYVPPGTSVSTS PWIIGRNKDLYGEDANSFRPERWLEASPEEERRWD HFSFHFGYGARKCLANNFGLMQLYKVAAEVFR RFE VKVEGSNEDTVSGGPPASARFRFDRRARSWS
<i>ustU</i> AFLA_094970 配列番号 10	MVRENHAWSKSSLFICLVGARSYLAGWLGPVRRRM REKITFQLYLLEAI

[表9]

遺伝子名	アミノ酸配列
<i>ustA</i> AFLA_094980 配列番号 1 1	MKLILTLIVSGLCALAAPAAKRDGVEDYAIGIDKR NSVEDYAIGIDKRNSVEDYAIGIDKRNSVEDYAIGI DKRNSVEDYAIGIDKRNTVEDYAIGIDKRNSVEDY AIGIDKRNTVEDYAIGIDKRNSVEDYAIGIDKRNSV EDYAIGIDKRGGSVEDYAIGIDKRNSVEDYAIGIDK RNSVEDYAIGIDKRGGSVEDYAIGIDKKRGTVEDYAI GIDKRGGSVEDYAIGIDKRHGGH
<i>ustYa</i> タンパク質 AFLA_094990 配列番号 3	MFSYFFRSREIKMAERSSSNGYKEVPVRQSEESTIA EEEKDTLLEARSYSRRDRKRSRSKAVWFLIALLLL SNIGLLGGLIHYFRKTHHKEKDVPWLPPKTAPTR KLFVFQTLTYGEPLNPEAEKAWDELMPIGRGFVNI NNDTALPDQPGLDQSLPHQRAMISVFHQLHCTYM TREGYYAAREGNLDQVNAAHLMHCWDYLRQAIM CHADTTLEWIPAPPNDKGSTGWGVEHTCGDFDAI ARWAEDNRLKTTYGIH
<i>ustP</i> AFLA_095000 AFLA_095010 配列番号 1 2	MGFSWYGVLLFVQLISSTIVYASDPCAQIDHYVAW GKKQGRNKISGIPGHLAYDVSSMPFRSDLAVKFVD DYAKYLQFHATVSMMLKDPPSGYISTGVDLWGGGLQ RIRQKASDNVYSSQYDFDSDLKYLTSRANDGHLSV GLCSLEIMHFEHDMPLVSISLDGVQLPQIYTTYDA EMKLRGTEAAISSVYCIEDMDPVYYLQANIGVTIG LQDPDARYNHLFPSPAAAFSGMYTGGLWTNNLGS WPGKANQTVFEFSNGTKMTVETTASVMLDRGLDF SSGESLFQTACMPNKKSRPPDPRPSLAVGKPPYSI PLGGPSMYPDPIHHKKDFVRGYYLHEERLEDVAV LQLPTFRLIGESPVSLARVAVQFLERARKDGKEKLI IDLSNNMGGDINLGFNLFRILFPDKPIYTATRFPS ELIGLMGRVFSTSQGNEAVEHDNTLDLPLVFQNA VTPDHRHSFGSWEKLFGPVEIAGQNMSHLHATY NFTTASTEDNPISGYGGIEFGPSTQLFHAENIIMT NGICASTCTILARLLKQQGVR SIVFGGRPRAAPMQ LLGSGKGGQYWSLVTISHYIKKAREIAVNASGAGS PILSEDELARFLELAPPPLTGFPIDSRGGSGVNF RNEYDEKDPTTPLQFVYEAADCRLFWTAENYVFP ESSWVAAADAMFGDASCVEESDGHHTP
<i>ustYb</i> タンパク質 AFLA_095020 配列番号 6	MSDLYAHRESDEYLLKPEHFAEKKNRPKRWDCL RPIIYTSLAFVGFIEILFFGIFFAQATRKTPERLLGE LNGLVGNFPARRVIFRS DPLAASDHKTEESRNAT MNNWLSYMPRGNGFIAVNQTERYTLPPPIKQLGQ DTYSIAVFHQLHCLYAIMSVYDDLAAAKSAADLNA HHSRDDTHSNEHPHEQVHVHSHDHVDHCFQYLR QSLCCGDTALEGQDPRTDNPGTDGTGAVHICKD FDGILAWADSRRLVDAKHN

[表10]

遺伝子名	アミノ酸配列
ustH AFLA_095030 配列番号 1 3	MASKWIEEQPLVHRRDIRISSKSRIAAGLLVLLVLWR YGLPSSIHFGFSSEEPKQLGAVASEHALCSRYGADM LERGCNAADAMVATMFCIGVVGMVHSGIGGGGFML IKSPDGDFFVDFRETAPAAIVALGKNTSAGLRSGVP GEVRGLEYLHRKYGVLPWSVVLEPAIRTARDGFLVQ EDLVNYIDMAVEETGEDFLSKHPSWAVDFSPSGSRV RLGDTMTRRRRLAATLERISVDGPDAFYSGPIAEDMV ASLRNVGGIMTLEDLANYTUVVTRDTSHIDYRGYQIT STTAPSSGTIAMNILKVLDTYDEFFTPGTTELSTHR MIEAMKFAFGLRTRLGDPSFVHGMEEYENHILSAE MIDHIRQSISDSHTQDTSAYNPDGLEVVNSTGTAHIA TVDHQGLAISATTTINRLFGNQIMCDRTGIIMNEM DDFSVPTSSPPTFGHTPSSTNFAEPGKRPLSAISPAII LHPDGSLFLIAGSAGSNWITTTTVQNIISGIDQNLA QEILATPRVHHQLIPNHAIFETTYDNGTVDFLSQLG HEVTWYPPAASMAHLIRVNADCGFDPAGDPRLKNS GGVVALQRRKFW
ustD AFLA_095040 配列番号 1 4	MKSVATSSLDDVDKDSVPLGSSINGTAQAETPLENV IDVESVRSHFPVLGGETAAFNNASGTVVLKEAIESTS NFMYSFPFPPGVDAKSMEAITAYTGNKGKVAAFINA LPDEITFGQSTTCLFRLLGLSLKPMLNNDCEIVCSTL CHEAAASAWIHLRELGITIKWWSPTTTTPNSPDDPV LTTDSLKPLLSPKTRLVTCNHVSNVVGTHPIREIAD VVHTIPGCMLIVDGVACVPHRPVDVKELDVDFYCFS WYKLFGPHLGTLYASRKAQDRYMTSINHVFVSSSSL DGKLALGMPSFELQLMCSPIVSYLQDTVGWDRIVR QETVLVTILLEYLLSKPSVYRVFGRNSDPSQRVAIV TFEVVGRSSGDVAMRVNTRNRFRITSGICLAPRPTW DVLKPKSSDGLVRVSFVHYNTVEEVRAFCSELDEIV TRDT
ustF2 AFLA_095050 配列番号 1 5	MANPQTTRVAVVGAGISGVLAAGHLLATGLEVTVFE RNAAPGGVWLYDERTPIEPSYPAMKPSKADPPATNE QETSRFMLQHAPPGPCYYNLQNNVPTPLLEVSLKP WPDGTPDTRHDVIQRFIQDMSIEAKVHDVTRYEA RVKKVVKDGAEWKITWSTPQVGLQSETSEFEQVSP FDVVIVASGHYHAPRVPDIPGLSDTKRKYCSRILHSK EYRRPENFRNKNILMIGGGVSSIDIANDISPFANTIY QSTRNSKFDLVESMLPENGVRVHEISHFEIQSHSDE PLSDDEPLPLTIHFESGQNLHGIHMIMLCTGYHITFP YLEEYHSDETTLQDADENILITDGTQVHNLYQDIFYI PDPTLVFVGLPYTFTFSIFDFQAIVVAQVLSGTVQL PTETEMRSEYNAKVERVGLGKVFSILGTEENYVH DLLTWVNTSRAAQELVAIKGFSPRWYEAKEALRQK YRAQVNK

[0108] [表11]

遺伝子名	アミノ酸配列
ustQ AFLA_095060 配列番号 1 6	MAVEYFQEKL NKWRYSPVAGSPDEEGGNATVKPKASFVP VYAGLTIISLITVTVSLVHLLSGTGTTTTFPCKNPAVRRE WRSITSSEKQNFQTQAVICLASIPSTWQPNGTTIYDDFAILHG GIGSWCHRSASFLPWHRITLVVFEKALREHCGFTGQVPY WDWTL DWMNLANSSIFNSVDGFGGDGDRGTGQEVVGGG RCVIDGPFAGLQPILYNHTYVRHCIARGFRDGDQAGRISG EYYRPE SIGGILRKQSYVELVREVEIYLHNPLHQGVNGDF LAMTAANDPLFYVHHAQLDRLWWRWQQESPDLRLKEY HGKHMYNSTGNATLDDILMYGGFAEDIPVSRVMDTKGG FLCYTY
ustT AFLA_095970 配列番号 1 7	MSGTSPPTPKDHITMVDHDYSDCSEDVSLIGADREHRRS STPDGLYQH KINRHYNPLYIAVVASLTFLITDIAGQIIVAPR LAIFEHIICKAYYTQVSGAAGTGMGDCKVEPVQSELALIN GWREMF DNIPALAVSIPYGVVADRFGRKKVLLIAMVGCLL SDIWVG VVTWFPDTFPLRAVWFSGIWQLIGGGGASISSMA FAMIADSCPADLRTTAFSQVHA AVLVAELVSV PAGAALAN FNPWIPVFGAAIFMVLGILFAYVVVPDVRPAGSKREGGSD GDFLSSAQESHPTWLMSIHRWRKIVDEFKDS SWIRDV NVLLIMASFFVCQLGRMISGITLQYAAAKFHWKFDKASLL VSLRAGVNLFLVLAALIPALSYILVKRFKLN DVVKDKRITQI NGVCLIGSFVMFLAASPGTLVFGQT V FALGFAFSVTARSF LTGMVDPMHIGTVFTGVTTMLYGGLVIGSPMLAKTLQWG LQLGGIWVGLPFLLA AVLFTLALGAISAARSY
ustR AFLA_095080 AFLA_095090 配列番号 1 8	MSGAQRRKTGCWTCRLRRKKCNEDGQPCSNCEARGVFC HGYGPKPSWKDRGEREREEAQRLQLISRARTRRARATPT NSINGEPRRPSIDMNTSDMGSP IQMGLGSSDSSIFETSSL DLLDIPELGSSLWEPTLDIIQVQPPPSDAPSALQFPSILGD GLEEKEIDLIMYYVVEVFPRQHSSYQCTSV MERSWLLCV LKRSSSFYYTSLSLSAHYRLMSMPEGGQGR TALLQEYER YKTC SLFRFQELVSSATRPQSP ISTGVVGESVICGVQIAML EAVSKNMQSSYLHLSSAALS LAQLLDNTSALDSSSISTNT TPPSSVLTTDLYHAGSM EYKALRCFSIILIWN DILHCSAQQ TIPAAAKTYQKLLADESFIPLFADIVGCEGWVLVPILEAML LASWKKDQEAKGQLSIRELLTKVDHIESILGDRMKRLAPA VLRQKEAGISSQSPEQIRLVHTYIFAHASFVHLHTVVSGA QPSVPEIRQSIDKSLAAWQLLP SLINFKTMAWPFCVCGS MAVGSQRELFQKIMSENFQNQSTSSNLHCLKSVVEECW KNFDKRVPEQSPSSYNWKV VMEKLNLSILFI

[0109]

[表12]

遺伝子名	アミノ酸配列
ustM AFLA_095100 配列番号 19	METILSSCLYDPNLKTKFYIPRFTHRLIAHAWGITPGQ RILDIGCGQGESCIVLAHLVGRTGHITGIDIAQPEYGGP YTVKESHDIYVRKSELGSRITFLRSDTPSFLRDLHRPARE VFDSVALFHSLWYFPNSQSVYDLFRTLAVDAQAPRVYL CEYSYEISLEEQNVHALAAQTQRLFYRYRRPRAPGDLE QNVRAGLDQASILEAARGAGYRVVRDGVTPDPSFLEG HFEVQYVEGEKFMRRVKEEALTEAQESEILASLARLRE VHEEWKRAGHETVRNLDIWWAVLELGA
ustS AFLA_095110 配列番号 20	MTKTEESPLHFFDIFSTLPGTSKSWSSNVLKIRMVLNY KGIPYTQSFHSYPDIAPLLQSLSVPPHKQGRFKYTLPAI CHPSSVKSSPSGAMMDSLPIACHLDETYPDPPLFPSGE ASYALALAIGKLMVPAALKTCDLLLPKAEVLDLDRGKE YFVRTRTEIFGKPLSELRPKTEEGVRAIVDGMKADMEV FISMLRGRGEGKKSQPFLEGEKPGYADFILVTFLSWSH RFDMEWLWREIMDMGNGEFRALWHASVQWLEGQGEE KEWAVPQLSTVD

[0110] <実施例4> *Ustilaginoida virens* のウスチロキシン合成遺伝子クラスターの同定

Zhangら (Nat. Commun. 2014年、第5巻、3849ページ) によって報告され、NCBIに登録されている *Ustilaginoida virens* (*U. virens*) のゲノム塩基配列 UV-8b (NCBIアクセッション番号 JHTR01000001-JHTR01000449) に対して、前記表8~12に示される *A. flavus* のウスチロキシンB合成遺伝子クラスターのうちの、ustUを除く遺伝子の各塩基配列 (表に示された各アミノ酸配列をコードするCDS領域に相当する塩基配列) をそれぞれクエリーとし、E値が 1×10^{-4} 未満であることを相同性のカットオフ値として tBLASTx 検索を行った。検出された領域について ALN法及び GlimmerHMM法を使用したパイプラインによる遺伝子アノテーションを再度行った後、アノテーションされた遺伝子がコードするアミノ酸配列情報をクエリーとして、*A. flavus* のウスチロキシン

ンB生合成遺伝子クラスターを構成する各遺伝子に対するBlastpサーチを行い、相同性を評価した。また同様のクエリーで、UniProtKBデータベースに対するBlastpサーチを行い、機能予測を行った。これらの解析により、NCIBアクセッション番号JHTR01000063.1であるU. *virens* ゲノムのスキファールドにおいて、表13に示される13の遺伝子が特定された。

[0111] ZhangらによってアノテーションされているUV8b__7484~UV8b__7494の他に、3つの遺伝子(uv__ustT、uv__ustC及びuv__ustYb)が新たに本発明者らによってアノテーションされた。また、これら13の遺伝子はいずれもA. *flavus*のウスチロキシンB生合成遺伝子クラスターを構成する各遺伝子に対するE値は $1e-4$ 未満であり、相同性が高いことが確認された。なお、上記の検索条件では、A. *flavus*のウスチロキシンB生合成遺伝子クラスターに含まれるustP及びustHに相同性のある遺伝子は、U. *virens*の上記スキファールドの範囲からは見いだされなかった。また、遺伝子の順序はA. *flavus*のそれとは異なるものであった(図6)。

[0112] 各遺伝子にコードされるアミノ酸配列の解析により、uv__ustAは、小胞体移行シグナル配列と、ウスチロキシンAを構成するアミノ酸残基であるTyr、Val、Ile及びGlyがこの順序で並ぶ反復配列及びウスチロキシンBを構成するアミノ酸残基であるTyr、Ala、Ile及びGlyがこの順序で並ぶ反復配列とをコードしていることが確認された(図7(B))。

このことから、uv__ustAはウスチロキシンA前駆体及びウスチロキシンB前駆体をコードする遺伝子であると推察された。また、A. *flavus*のustYa及びustYbと相同性の高い(E値が $1e-4$ 未満、ビットスコアが50以上)遺伝子として、uv__ustYa及びuv__ustYbがそれぞれ見いだされた。これらは、本発明にいうustYaホモログ遺伝子及びustYbホモログ遺伝子にそれぞれ相当する。

[0113] さらに、表 13 に示される 13 の遺伝子は、前記スキファールド内において概ね 30 kb ほどの範囲内にまとまって存在していることが確認された。さらに、uv__ustA と uv__ustYa との間及び uv__ustA と uv__ustYb との間は、それぞれ 1.4 Kb 及び 3.0 kb であった。

[0114] 以上から、U. viresns において今回確認された 13 の遺伝子は、ウスチロキシン A 及び B を合成することのできる U. viresns の、ウスチロキシン A 及び B の生合成遺伝子クラスターを構成しているものと推察された。

[0115] [表13]

遺伝子ID	U.virens スキファールド JHTR01000063.1 における位置	Zhangらの 遺伝子 ID	A.flavusウスチ ロキシシンクラス ターにおける 相同遺伝子	推定機能	配列 番号
uv_ustT	相補的 (40534..42355)	-	ustT	MF S 多剤トラン スポーター	37
uv_ustS	相補的 (44807..45532)	UV8b_7484	ustS	グルタチンS-ト ランスフェラーゼ	38
uv_ustM	46841..47779	UV8b_7485	ustM	SAM依存性メチ ルトランスフェ ラーゼ	39
uv_ustR	相補的 (47837..49772)	UV8b_7486	ustR	C6 転写因子	40
uv_ustC	50823..52666	-	ustC	シトクロームP4 50	41
uv_ustA	53637..54093	UV8b_7487	ustA	ウスチロキシン前 駆体、シグナルペ プチドを有する	42
uv_ustYa	相補的 (55577..56554)	UV8b_7488	ustYa	ウスチロキシン生 合成に関与	43
uv_ustYb	相補的 (57163..58117)	-	ustYb	ウスチロキシン生 合成に関与	44
uv_ustQ	58561..59854	UV8b_7490	ustQ	チロシナーゼ	45
uv_ustF1	相補的 (59909..61608)	UV8b_7491	ustF1	フラビン含有モノ オキシゲナーゼ	46
uv_ustF2	相補的 (61980..63659)	UV8b_7492	ustF2	フラビン含有モノ オキシゲナーゼ	47
uv_ustD	64167..65343	UV8b_7493	ustD	PLP依存性ス テインデスルフ ラーゼ	48
uv_ustO	相補的 (65730..66547)	UV8b_7494	ustO	ピリドキサミン 5'-リン酸オキシ ダーゼ様酵素	49

[0116] <実施例5>ウスチロキシン生合成遺伝子クラスター中の各遺伝子破壊株の分析

実施例1で特定したウスチロキシン生合成遺伝子クラスター中の15の遺伝子各々の破壊株の培養上清についてLC-MS分析を行ったところ、ウスチロキシンBに対応する m/z 644.2 [M-H]⁻のMSピークに加えて、いくつかの破壊株でのみ顕著に蓄積する2つのMSピーク (m/z 465.2 [M-H]⁻及び m/z 451.2 [M-H]⁻) が見いだされた。これらのピークを分取してNMRにより構造決定を行ったところ、それぞれウスチロキシンBからS-ノルバリリンが除かれたウスチロキシンF (図8) 及びさらにメチル基が除去された化合物FΔMe (図9) であると同定された。

[0117] また、ustA、ustR、ustYa、ustYb及びustQの各遺伝子の破壊株において、ウスチロキシンB、ウスチロキシンF及び化合物FΔMeの各環状ペプチドのピークはいずれも消失することが確認された。ustAはリボソームペプチドの前駆体タンパク質遺伝子であり、またustRは遺伝子クラスターの発現を誘導する転写因子であることから、ustYa、ustYb及びustQが、前記各化合物を環状化させてゴルジ体等のペプチダーゼによる分解から保護する役割を担っていると推定された。

<実施例6>ustYaの機能同定

[0118] ustYa (AFLA_094990) に含まれる2つの2核型金属捕捉モチーフであるHXXHCモチーフについて、それぞれのHC (配列番号3の168-169番目のHCと195-196番目のHC) をAS-AS、AS-HC、HS-HC、HC-HSへと変異させた4種類のustYa変異体をコードする遺伝子を含む発現ベクターを次のようにして構築した。

[0119] 上流145bp及び下流443bpを含むustYaの塩基配列を、両端に制限酵素サイトSmaIを付加した形で、Target Clone-Plus (東洋紡、TAK-201) を用いてTAクローニングによりプラスミドベクターに導入した。配列を確認後、PrimeSTAR Muta

genesis Basal Kit (TaKaRa, R046A) を用いて、モチーフ中の2つのHCをHC-HC (コントロール)、AS-AS、AS-HC、HS-HC、HC-HSとなるよう変異させた5種類のクローニングベクターを作製した。この際用いたコドンは、A : GCC、S : TCC、H : CATである。

[0120] 5種類それぞれについて、プラスミドベクター上で変異箇所の配列を確認した後、制限酵素Sma Iによって切り出したDNAコンストラクトを、ustY aと隣接するustP配列及びその下流でありustY aの残りの上流部分でもあるDNAコンストラクト、及びマーカーリサイクルシステムであるCre-loxP配列にAspergillus nidulans pyrGマーカーをつないだDNAコンストラクトとfusion PCR法により融合させて、7 kb 弱のDNAコンストラクトを作製した。

[0121] このDNAコンストラクトをプロトプラスト法によってA. flavus CA14株に形質転換し、ゲノム配列上での上記コンストラクト増幅によるPCR確認及び塩基配列確認を行い、ustY aの2種類のHXXHCモチーフを変化させた上記4種類の点変異株（それぞれAS-AS株、AS-HC株、HS-HC株、HC-HS株）とコントロール株（HC-HC株）を取得した。

[0122] 取得した4種類の点変異株及びHC-HC株を、1%キシロースを含む培地で培養してCre-loxP配列を除去した後、コーン固体培地上で培養を行い、80%アセトン及び等量の酢酸エチルによる抽出後の水層をLC-MS分析した。その結果、コントロール株であるHC-HC株では、ウスチロキシンB及びウスチロキシンFに対応する m/z 644.2及び m/z 465.2の[M-H]⁻MSピークが確認されたが、残りの点変異株4株ではいずれもこれらのピークが消失した（図10）。

[0123] 以上より、ustY a及びそのホモログであるustY bはウスチロキシン生産に必須な活性を持つ酵素であり、その活性中心は2つのHXXHCモチーフを中心とする2核型金属捕捉モチーフ部分であると推定された。

[0124] <実施例7>分子量1019のペプチド化合物を生合成するリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの同定

GenBank EQ963472-EQ966232として登録されている黄色麹菌 (*Aspergillus flavus*) の全ゲノム情報を基に、小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子及び配列番号3に示されるアミノ酸配列 (UstYa) に対するE値が $1e-4$ 未満のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子を、前述のSmith-Watermanアルゴリズム、signalP 4.1及びBlast法によって検索した。その結果、リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子 (AFLA_063260) 及び配列番号3に示されるアミノ酸配列 (UstYa) に対するE値が $1e-11$ のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を有する5つの遺伝子 (AFLA_063270~AFLA_063310) が隣接する領域が見いだされた。

[0125] さらに、公共データベース (NCBI GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登録された、二次代謝物質を多く産生する培養条件を含む28条件下で取得された発現情報 (GSE15435) 及び前述のMIDAS-Mを利用して、上記遺伝子を含み共同的に発現している遺伝子領域を調べた。

[0126] その結果 (図11) 及び遺伝子機能アノテーションから、少なくともNCBI遺伝子IDがAFLA_063170~AFLA_063330からなる領域が新規リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターとして推定された。

[0127] さらに、上記クラスター領域のうちAFLA_063260からAFLA_063320の7つの遺伝子全て、AFLA_063280及びAFLA_063310それぞれを選択マーカー遺伝子 (pyrG) と置換することで欠失させた、計3種類の*A. flavus*変異株を作成した。具体的な作業は次の通りである。

- [0128] 上記3種類の標的遺伝子領域それぞれについて、その上流及び下流各1 kbを含むゲノム領域が増幅されるよう設計したプライマーセットを用いてPCRを行い、前記ゲノム領域の増幅断片1を作製した。一方、*A. nidulans*のpyrG遺伝子を含む約1.8 kbのゲノム領域が増幅されるよう設計したプライマーセットを用いてPCRを行い、前記pyrG遺伝子を含むゲノム領域の増幅断片2を作製した。さらに、増幅断片1及び2を鋳型として、両断片が連結した核酸が増幅されるよう設計されたプライマーセットを用いてPCRを行い、両ゲノム領域の融合PCR増幅断片3を調製した。
- [0129] 1. 12 mg/mLのウラシルを含む24 g/LのDifcoポテトデキストロース培地に*A. flavus* (CA14株、 $\Delta ku70 \Delta pyrG \Delta niaD$)の分生胞子を懸濁し(10^6 /mL)、37°Cで2日間培養した。菌体を回収し、溶菌酵素(Sigma社のlysing enzyme、Takara社のYatalase、ヤクルト社のセルラーゼ)を含む緩衝液中に懸濁して30°Cで3時間インキュベートして、プロトプラストを調製した。このプロトプラストを等張液に懸濁後、前記3種類の融合PCR増幅断片3(1 μ g)を別々に加えて形質転換させ、ポリエチレングリコールの存在下でインキュベートした。インキュベーション後、プロトプラストを再生培地上に置き、3~5日間培養して真菌細胞を再生させた。再生された3つの変異株が、導入されたpyrG遺伝子との置換によって各標的遺伝子が欠失したゲノム構造を有するものであることを、組み換えられたゲノム領域を鋳型にPCRで増幅させた核酸断片の配列解析により確認した。
- [0130] 3つの変異体それぞれを、1.2 mLの蒸留水を加えて滅菌処理をした2.5 gの粉碎とうもろこし上で、30°Cで6日間した後、10 mLの80%アセトンを加えて室温で1時間インキュベートした。菌体や固形培地を除いた抽出液からアセトンを蒸発させ、残った濃縮液に等量の酢酸エチルを添加して1時間反応後、水相をポアサイズ0.22 μ mのフィルターに通して、LC-MS用試料を調製した。この試料をDevelosil XG-C1

8 M-5 逆相カラム（野村化学社）をセットした Ultimate 3000 HPLC（Dionex 社）及び水／アセトニトリルのグラジエント（0％-100％）溶媒を用いて分画した。

[0131] 3 種類の破壊株及びコントロール株（pyrG マーカー復帰株）間で保持時間と分子量に相当する m/z の値のパターンを比較したところ、コントロール株では存在するが、上記リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターに相当する 3 種類の破壊株でのみ消失する m/z 1018.4 [M-H]⁻（陽イオンで m/z 1020.4 [M+H]⁺）の MS ピークを保持時間 12 分の位置に見いだした（図 12）。

[0132] 上記ピークを分取して構成アミノ酸の種類を酸分解法で解析し、本化合物が新規リボソームペプチド前駆体タンパク質のコアペプチド配列を構成要素とする分子量 1019 のペプチド化合物（以下、PMW 1019 と表す）であることを同定した。

[0133] 以上の変異体の解析結果から、AFLA__063170~AFLA__063330 の 17 遺伝子を、PMW 1019 の生合成に実質的に関与している生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子と判断した。これらの遺伝子の NCBI ID 番号、推定機能、及び大きさ（塩基対数）を表 14 に示す。

[表14]

NCBI 遺伝子ID	推定機能	塩基対
AFLA_063330	蛋白質ホスファターゼ 1 制御抑制サブユニット様	426
AFLA_063320	キネシン軽鎖様	701
AFLA_063310	u n t Y a ホモログ	1039
AFLA_063300	u s t Y a ホモログ	1012
AFLA_063290	u s t Y a ホモログ	826
AFLA_063280	u s t Y a ホモログ	727
AFLA_063270	u s t Y a ホモログ	1012
AFLA_063260	リボソームペプチド前駆体タンパク質	814
AFLA_063250	ペプチダーゼ	1092
AFLA_063240	機能未知	605
AFLA_063230	トランスポーター	1501
AFLA_063220	チロシナーゼ	1297
AFLA_063210	アミノ酸輸送タンパク質	1767
AFLA_063200	アミノ酸輸送タンパク質	1992
AFLA_063190	ペルオキシソーム・カタラーゼ	903
AFLA_063180	膜結合タンパク質；ジンクフィンガー様モチーフ	1956
AFLA_063170	プロテインキナーゼ様	1017

[0134] <実施例 8> 転写因子の過剰発現による PMW 1019 の産生量の亢進

実施例 6 で特定した生合成遺伝子クラスターに含まれる NCBI 遺伝子 AFLA__063180 は、転写因子に含まれるジンクフィンガー C2H2 モチーフを含むタンパク質と相同性があることが、アミノ酸配列解析によって明らかとなった。そこで、*A. flavus* の *tef1* 遺伝子 (Kitamoto ら、1998 年、Appl. Microbiol. Biotechnol.、第 50 巻、85-92 ページ) のプロモーター領域を増幅断片として得ることができるように設計したプライマーを用いて調製した増幅断片 4 と、AFLA__063180 の翻訳領域約 1 kb を増幅断片として得ることができるように設計したプライマーを用いて調製した増幅断片 5 とを用いて、AFLA__063180 のプロモーター領域が *tef1* 遺伝子プロモーターに置き換わった増幅断片 6 を、融合 PCR 法で調製した。この増幅断片 6 を用いて *A. flavus* CA14 株 ($\Delta ku70$ $\Delta pyrG$ Δni

a D) を形質転換して、AFLA__063180の過剰発現変異株を得た。

[0135] AFLA__063180過剰発現変異株を、1.2 mLの蒸留水を加えて滅菌処理を施した2.5 gの粉碎とうもろこし上で、30℃で6日間培養した後、10 mLの80%アセトンを培地に加えて室温で1時間インキュベートした。菌体や固形培地を除いた抽出液からアセトンを蒸発させ、残った濃縮液に等量の酢酸エチルを添加して1時間反応後、水相をポアサイズ0.22 μ mのフィルターに通してLC-MS測定用試料を調製し、Developsil XG-C18M-5逆相カラム（野村化学社）をセットしたUltimate3000 HPLC（Dionex社）及び水／アセトニトリルのグラジエント（0%－100%）溶媒を用いて分画した。溶出画分中のPMW1019の含有量を、micrOTOF II K1K2 MS（Bruker社）を用いて定量した。定量は、RT=12分におけるm/z 1018.4 $\pm$ 0.1のEICs [M-H]⁻のピークエリアの算出によって行った。その結果、AFLA__063180過剰発現変異株のPMW1019の産生量は、対照である野生株と比較して1.8倍に上昇することが確認された。

[0136] <実施例9> PMW1019の構成アミノ酸の同定

培養菌体を80%アセトンで抽出、ろ過後、濃縮した。水に溶解する該当画分を吸着樹脂を用いて分離し、吸着画分を中圧クロマトグラフィーとODSカラムを用いて精製した。さらに、該当画分を高速液体クロマトグラフィーとODSカラムを用いてメタノール水溶液で分離し、再度高速液体クロマトグラフィーとODSカラムを用いてアセトニトリル水溶液で分離、精製した。精製した分子量1019のペプチド化合物を酸加水分解に供した。得られたアミノ酸はFDAA誘導化し、超高速液体クロマトグラフィーとODSカラムを用いて分析した。結果、グルタミン酸、アラニン、グリシンが検出された。これらは、該当リボソームペプチド前駆体タンパク質のコアペプチド配列の構成アミノ酸である。

[0137] <実施例10> RNAシーケンシングによるPMW1019生合成遺伝子ク

ラスターの遺伝子翻訳領域の再アノテーション

公共配列リードデータベースNCBI SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SRA>) に登録されたリードデータとして、SRR283857、SRR283858、SRR495778、SRR495942、SRR495943、SRR544871、SRR544872、SRR544873、SRR610531、SRR610532、SRR610533、SRR610534、SRR610535、SRR610537及びSRR610538を用いて、以下の作業を行った。

[0138] 未同定塩基を含まず、Q値 (Quality value) が連続7塩基平均20未満の塩基をトリムした後の長さが30塩基以上のリードを用いて、マッピング作業を行った。ソフトウェアにはbowtie及びtophatを使用した。作業はコンピューター (DELL社製: CPU Intel Xeon E52643、メモリー256GB、ハードディスク40TB、OS: Ubuntu Linux (登録商標) 13.10)) 上で行った。マッピング結果をゲノム情報可視化ツールで表示の上、該当遺伝子領域 (スキファールドGenBank EQ963477上の遺伝子AFLA__063120~AFLA__063320) を目視で確認し、開始コドンとコドンの読み枠に矛盾のない領域をCDS領域と同定した。

[0139] 配列解析の結果、AFLA__063230からは配列番号50及び51に示される2つのアミノ酸配列からなるタンパク質が、AFLA__063270から配列番号52に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が、AFLA__063280から配列番号53に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が、AFLA__063320から配列番号54に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が、AFLA__063330から配列番号55に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が、それぞれ転写翻訳されていることが確認された。また、表14に示される遺伝子のうち上記以外の遺伝子から転写翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列は、各遺伝子のNCBI遺伝子IDで演繹推定されているアミノ酸配列と同一であることが確認された。

[0140] <実施例 1 1>分子量 809 のペプチド化合物を生合成するリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターの同定

GenBank EQ963472-EQ966232として登録されている黄色麹菌 (*A. flavus*) の全ゲノム情報を基に、小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 (UstYa) に対する E 値が $1e-4$ 未満のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子を、前述の Smith-Waterman アルゴリズム、signalP 4.1 及び Blast 法によって検索した。その結果、リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子 (AFLA__041400) 及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 (UstYa) に対する E 値が $1e-48$ 未満のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子 (AFLA__041390) が隣接する領域が見いだされた。

[0141] さらに、公共データベース (NCBI GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登録された、二次代謝物質を多く産生する培養条件を含む 28 条件下で取得された発現情報 (GSE15435) を用いて、上記 2 遺伝子を含み共同的に発現している遺伝子領域を調べた。

[0142] その結果 (図 13) 及び遺伝子機能アノテーションから、NCBI 遺伝子 AFLA__041320~AFLA__041490 の計 18 の遺伝子が、新規リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターとして推定された。これらの遺伝子の NCBI ID 番号、推定機能、及び大きさ (塩基対数) を表 15 に示す。

[0143]

[表15]

NCBI 遺伝子ID	推定機能	塩基対
AFLA_041320	酸性ホスファターゼ	1547
AFLA_041330	C 6 転写因子	1242
AFLA_041340	オキシドレダクターゼ、短鎖デヒドロゲナーゼ／レダクターゼファミリー	939
AFLA_041350	スルホニルウレアレセプター／ABCトランスポーター	3173
AFLA_041360	仮想タンパク質	348
AFLA_041370	イソフラボン・リダクターゼ	946
AFLA_041380	トランスポーター	1559
AFLA_041390	u s t Y a ホモログ	1148
AFLA_041400	リボソームペプチド前駆体タンパク質	834
AFLA_041410	アルデヒドデヒドロゲナーゼファミリータンパク質	1582
AFLA_041420	GMPシンターゼ	837
AFLA_041430	グルタミンシンセターゼ	1636
AFLA_041440	ジエンラクトンヒドロラーゼ	1632
AFLA_041450	グルタミル-tRNAアミドトランスフェラーゼ、サブユニットA	1887
AFLA_041460	保存仮想タンパク質	726
AFLA_041470	仮想タンパク質	573
AFLA_041480	D 1 t D N末端ドメインタンパク質	1031
AFLA_041490	保存仮想タンパク質	1810

[0144] さらに、AFLA_041320～AFLA_041490の18の遺伝子すべて、並びにAFLA_041330（C6型転写因子）、AFLA_041390（UstYaホモログ）及びAFLA_041400（前駆体タンパク質）のそれぞれを選択マーカー遺伝子と置換することで欠失させた、計4種類のA. flavus変異株を作成した。具体的な作業は次の通りである。

[0145] 上記4種類の標的遺伝子領域それぞれについて、その上流及び下流各1k

bを含むゲノム領域が増幅されるよう設計したプライマーセットを用いてPCRを行い、前記ゲノム領域の増幅断片1を作製した。一方、*A. nidulans*のpyrG遺伝子を含む約1.8 kbのゲノム領域が増幅されるよう設計したプライマーセットを用いてPCRを行い、前記pyrG遺伝子を含むゲノム領域の増幅断片2を作製した。さらに、増幅断片1及び2を鋳型として、両断片が連結した核酸が増幅されるよう設計されたプライマーセットを用いてPCRを行い、両ゲノム領域の融合PCR増幅断片3を調製した。

[0146] 1. 12 mg/mLのウラシルを含む24 g/LのDifcoポテトデキストロース培地に*A. flavus* (CA14株、 $\Delta ku70 \Delta pyrG \Delta niaD$)の分生孢子を懸濁し(10⁶/mL)、37℃で2日間培養した。菌体を回収し、溶菌酵素(Sigma社のlysing enzyme、Takara社のYatalase、ヤクルト社のセルラーゼ)を含む緩衝液中に懸濁して30℃で3時間インキュベートして、プロトプラストを調製した。このプロトプラストを等張液に懸濁後、前記4種類の融合PCR増幅断片3(1 µg)を別々に加えて形質転換させ、ポリエチレングリコールの存在下でインキュベートした。インキュベーション後、プロトプラストを再生培地上に置き、3～5日間培養して真菌細胞を再生させた。再生された4つの変異株が、導入されたpyrG遺伝子との置換によって各標的遺伝子が欠失したゲノム構造を有するものであることを、組み換えられたゲノム領域を鋳型にPCRで増幅させた核酸断片の配列解析により確認した。

[0147] 4つの変異体それぞれを1.2 mLの蒸留水を加えて滅菌処理をした2.5 gの粉碎とうもろこし上で30℃で6日間した後、10 mLの80%アセトンを加えて室温で1時間インキュベートした。菌体や固形培地を除いた抽出液からアセトンを蒸発させ、残った濃縮液に等量の酢酸エチルを添加して1時間反応後、水相をボアサイズ0.22 µmのフィルターに通してLC-MS用試料を調製した。この試料を、Develosil XG-C18M-5逆相カラム(野村化学社)をセットしたUltimate 3000 HP

LC (Dionex社) 及び水／アセトニトリルのグラジエント (0%－100%) 溶媒を用いて分画した。

[0148] 上記4種類の破壊株及びコントロール株 (pyrGマーカー復帰株) 間で保持時間と分子量に相当する m/z の値のパターンを比較したところ、コントロール株では存在するが、AFLA_041320－AFLA_041490、AFLA_041390 (UstYaホモログ)、AFLA_041400 (前駆体タンパク質) を破壊した3種類の破壊株でのみ消失する m/z 808.3 [M－H][－] (陽イオンで m/z 810.3 [M+H]⁺) のMSピークを、保持時間13.8分の位置に見いだした (図14)。

[0149] 上記ピークを分取してNMRによる構造解析を行った結果、本化合物が新規リボソームペプチド前駆体タンパク質のコアペプチド配列を構成要素とする、新規な分子量809のペプチド化合物 (以下、PMW809と表す) であることが確認された。一方、C6型転写因子であるAFLA_041330を破壊しても、またtef1プロモーターを用いてC6型転写因子を過剰発現させても、PMW809の生産性に変化は見られなかった。

[0150] 以上から、NCBI遺伝子AFLA_041370～AFLA_041400の4つの遺伝子 (表16) を、新規リボソームペプチドであるPMW809の生合成に実質的に関与している生合成遺伝子クラスターと判断した。

[0151] [表16]

NCBI 遺伝子ID	推定機能	塩基対
AFLA_041370	イソフラボン・リダクターゼ	946
AFLA_041380	トランスポーター	1559
AFLA_041390	ustYaホモログ	1148
AFLA_041400	リボソームペプチド前駆体タンパク質	834

[0152] <実施例12> PMW809の構成アミノ酸の同定

培養菌体を80%アセトンで抽出、ろ過後、濃縮した。n-ブタノールに

溶解する該当画分を中圧クロマトグラフィーとODSカラムを用いて精製した。さらに、該当画分を高速液体クロマトグラフィーとODSカラムを用いてメタノール水溶液で分離し、再度高速液体クロマトグラフィーとODSカラムを用いてアセトニトリル水溶液で分離、精製した。精製した分子量809のペプチド化合物の構造解析を高分解能ESI質量分析及び核磁気共鳴スペクトルにより行った。まず、高分解能質量分析により分子式を $C_{42}H_{43}N_5O_{12}$ と決定した。また、 ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル及び 1H -核磁気共鳴スペクトルから、本化合物が、フェニルアラニン、チロシン3つ、スレオニン、グリシンを含むことが分かった。これらは該当リボソームペプチド前駆体タンパク質のコアペプチド配列に含まれるアミノ酸である。

[0153] <実施例13>RNAシーケンシングによるPMW809生合成遺伝子クスターの遺伝子翻訳領域再アノテーション

公共配列リードデータベースNCBI SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SRA>) に登録されたリードデータとして、SRR283857、SRR283858、SRR495778、SRR495942、SRR495943、SRR544871、SRR544872、SRR544873、SRR610531、SRR610532、SRR610533、SRR610534、SRR610535、SRR610537及びSRR610538を用いて、以下の作業を行った。未同定塩基を含まず、Q値(Quality value)が連続7塩基平均20未満の塩基をトリムした後の長さが30塩基以上のリードを用いて、マッピング作業を行った。ソフトウェアにはbowtie及びtophatを使用した。作業はコンピューター(DELL社製:CPU Intel Xeon E52643、メモリー256GB、ハードディスク40TB、OS:Ubuntu Linux(登録商標)13.10))上で行った。マッピング結果をゲノム情報可視化ツールで表示の上、該当遺伝子領域(スキャフォールドGenBank EQ963476上の遺伝子AFLA__041370~AFLA__041400)を目視で確認し、開始コドンとコドンの

読み枠に矛盾のない領域をCDS領域と同定した。以上の操作により、RNAシーケンシングで得られたPMW809生合成遺伝子クラスターの遺伝子翻訳領域は、いずれもNCBIに登録された翻訳領域と同一であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0154] 本発明によれば、これまでに報告のない新規な真菌由来のリボソームペプチドを製造することができる。これにより、医薬その他の有用物質への応用が期待される真菌由来の二次代謝産物であるリボソームペプチドを提供することが可能となる。また、各クラスターの構成遺伝子を相互に組換え、あるいは複数の構成遺伝子を任意に組み合わせることで、天然に生産されるものとは異なる構造や生理活性を有する非天然型のリボソームペプチドを製造することも可能となる。

請求の範囲

[請求項1]

真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法であって、

工程 a) 小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子、並びに配列番号 1 に示される塩基配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満でリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子、

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子若しくは

配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子、

及び／又は

配列番号 6 に示されるアミノ酸配列に対する E 値が 1×10^{-4} 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞内で強制発現させる工程、並びに

工程 b) 細胞からリボソームペプチドを回収する工程を含む、前記製造方法。

[請求項2]

リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子が、AspGD I D 番号が AFL2T__08516、Acar5010__211921、Acar5010__131040、ACLA__063320、Aspb r1__0148406、An06g02130、Aspz o1__1501727、Acar5010__210441、Aspz o1__0132961、Aacu16872__042334、An03g05230、Asptu1__0047109、Aspf o1__0048

058、Aspk a1__0178058、Aspz o1__0673756、AFUB__096780、Aspwe1__0028756、Aspwe1__0177551、Aspf o1__0041528、Aspk a1__0176174、Aspz o1__0138840及びAacu16872__044658である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、請求項1に記載の製造方法。

[請求項3] 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対するE値が $1e-4$ 未満のアミノ酸配列からなりリボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子が、AspGD ID番号がAFL2T__08517、Acar5010__156521、Acar5010__131041、ACLA__063300、ACLA__063310、Aspbr1__0073580、An06g02120、Aspz o1__0020615、Aspz o1__0147593、Acar5010__399409、Aspz o1__0097397、Aacu16872__042333、An03g05220、Asptu1__0047108、Aspf o1__0048061、Aspk a1__0178059、Aspz o1__0070555、AFUB__096790、Aspwe1__0041401、Aspwe1__0188242、Aspf o1__0203572、Aspk a1__0176173、Aspz o1__0163562及びAacu16872__044657である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、請求項1又は請求項2に記載の製造方法。

[請求項4] 工程a)の強制発現が、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターに含まれる転写因子をコードする遺伝子のプロモーターを高発現プロモーターに組み換えることによって達成される、請求項1～3のいずれかに記載の製造方法。

[請求項5] リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、ペプチダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、請求項1～4

のいずれかに記載の製造方法。

[請求項6] 細胞が真菌細胞である、請求項1～5のいずれかに記載の製造方法。

[請求項7] 真菌細胞が *Aspergillus* 属真菌の細胞である、請求項6に記載の製造方法。

[請求項8] 配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に参与するタンパク質。

[請求項9] 請求項8に記載のタンパク質をコードするcDNA。

[請求項10] 配列番号6に示されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、真菌細胞内におけるリボソームペプチドの生合成に参与するタンパク質。

[請求項11] 請求項10に記載のタンパク質をコードするcDNA。

[請求項12] 真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法であって、

工程a) 小胞体移行シグナル配列及び反復配列を含むアミノ酸配列からなるリボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子、並びに配列番号3に示されるアミノ酸配列の81番目～225番目のアミノ酸配列と20%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に参与するタンパク質をコードする遺伝子、及び／又は

配列番号6に示されるアミノ酸配列の57番目～259番目のアミノ酸配列と20%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に参与するタンパク質をコードする遺伝子を少なくとも含むリボソームペプチド生合成遺伝子クラスターを細胞

内で強制発現させる工程、並びに

工程 b) 細胞からリボソームペプチドを回収する工程を含む、前記製造方法。

[請求項13] リボソームペプチド前駆体をコードする遺伝子が、AspGD ID番号がAFL2T__08516、Acar5010__211921、Acar5010__131040、ACLA__063320、Aspbr1__0148406、An06g02130、Aspz01__1501727、Acar5010__210441、Aspz01__0132961、Aacu16872__042334、An03g05230、Asptu1__0047109、Aspfo1__0048058、Aspka1__0178058、Aspz01__0673756、AFUB__096780、Aspwe1__0028756、Aspwe1__0177551、Aspfo1__0041528、Aspka1__0176174、Aspz01__0138840及びAacu16872__044658である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、請求項12に記載の製造方法。

[請求項14] 配列番号3に示されるアミノ酸配列の81番目～225番目のアミノ酸配列と20%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、リボソームペプチドの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子が、AspGD ID番号がAFL2T__08517、Acar5010__156521、Acar5010__131041、ACLA__063300、ACLA__063310、Aspbr1__0073580、An06g02120、Aspz01__0020615、Aspz01__0147593、Acar5010__399409、Aspz01__0097397、Aacu16872__042333、An03g05220、Asptu1__0047108、Aspfo1__0048061、Aspka1__0178059、Aspz01__0070555、AFUB__096790、Aspwe1__004140

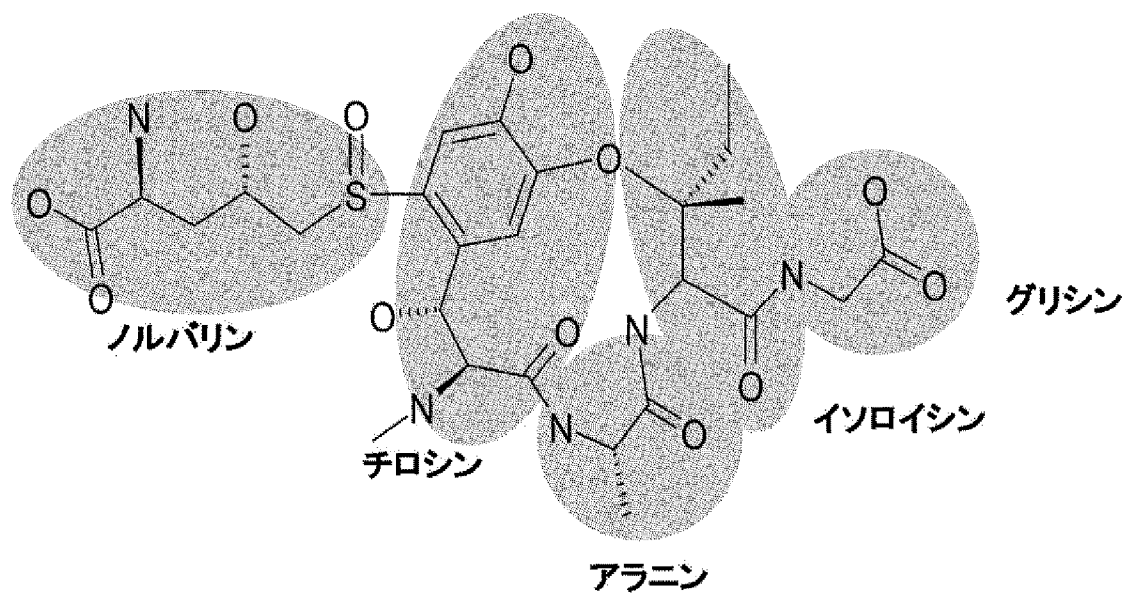
1、Aspwe1__0188242、Aspfo1__0203572、Aspka1__0176173、Aspzo1__0163562及びAacu16872__044657である遺伝子よりなる群から選ばれる遺伝子である、請求項12又は請求項13に記載の製造方法。

[請求項15] 工程a)の強制発現が、リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターに含まれる転写因子をコードする遺伝子のプロモーターを高発現プロモーターに組み換えることによって達成される、請求項12～14のいずれかに記載の製造方法。

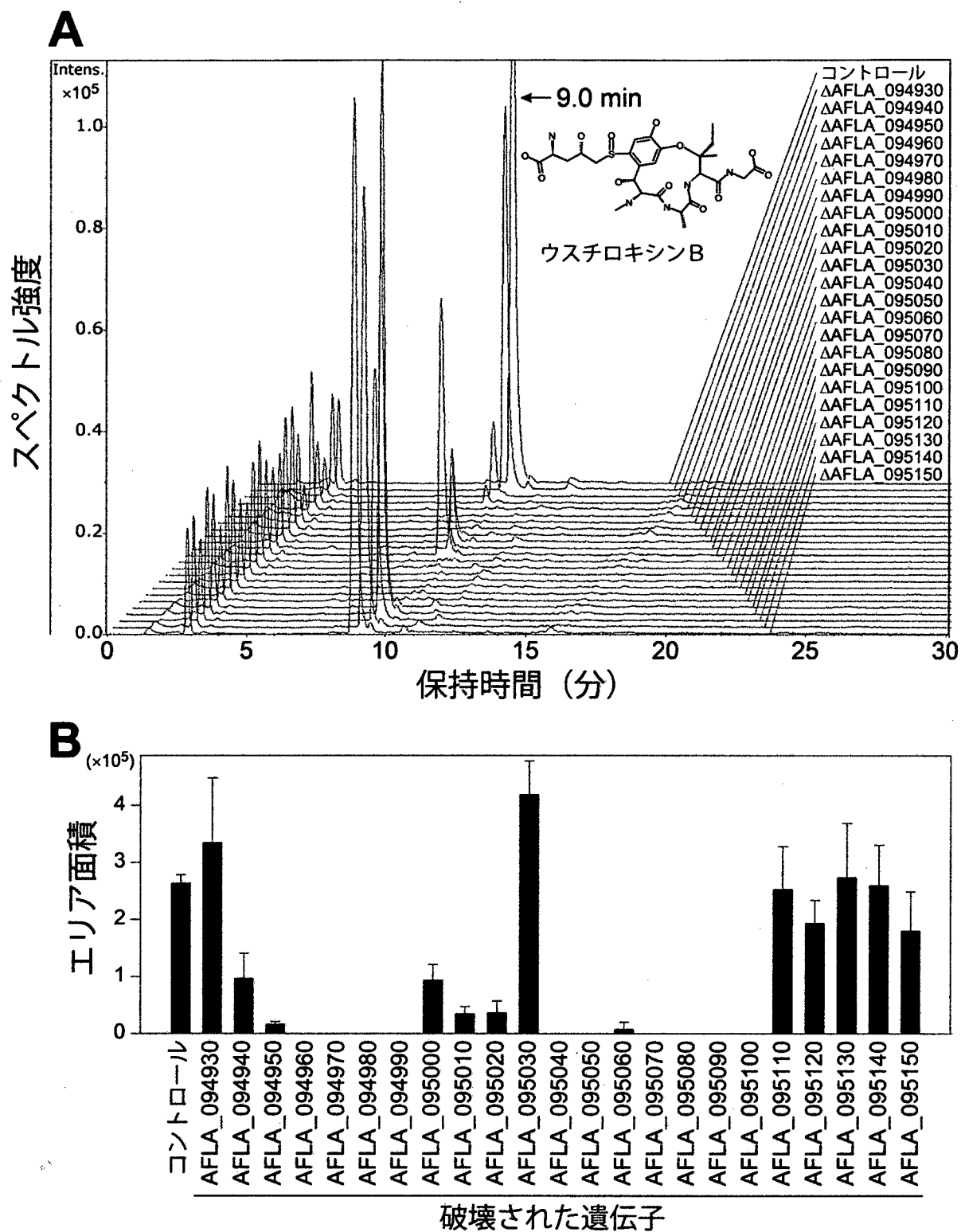
[請求項16] リボソームペプチド生合成遺伝子クラスターが、ペプチダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、請求項12～15のいずれかに記載の製造方法。

[請求項17] 細胞が真菌細胞である、請求項12～16のいずれかに記載の製造方法。

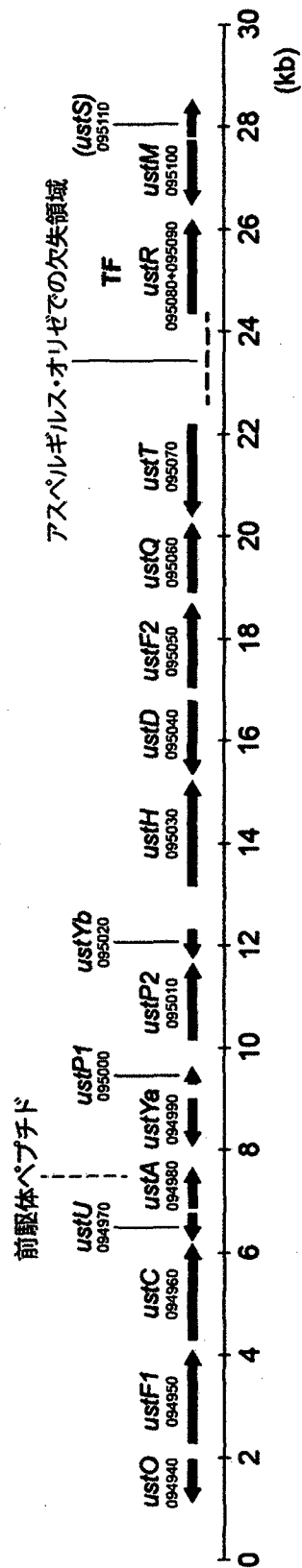
[図1]



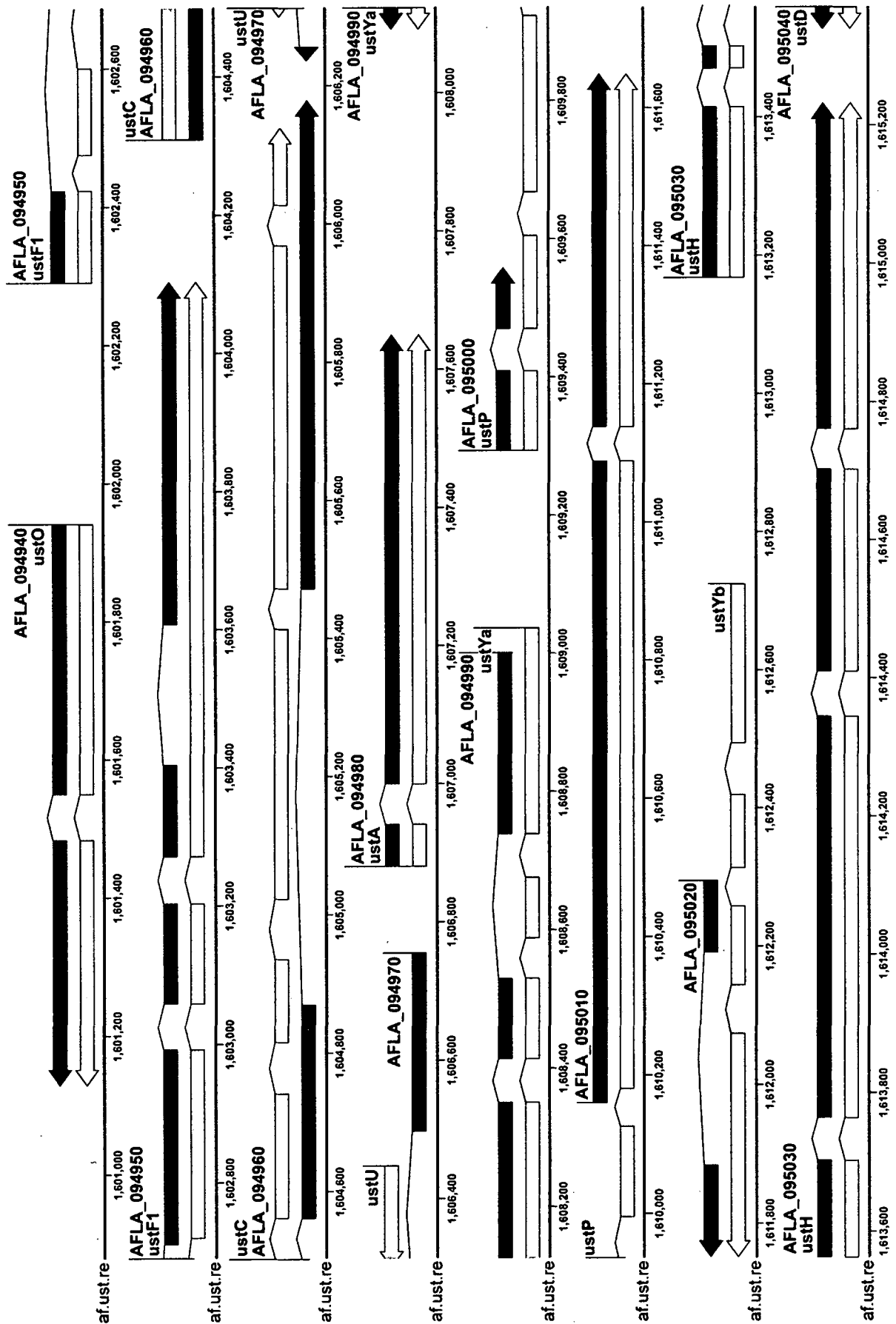
[図2]



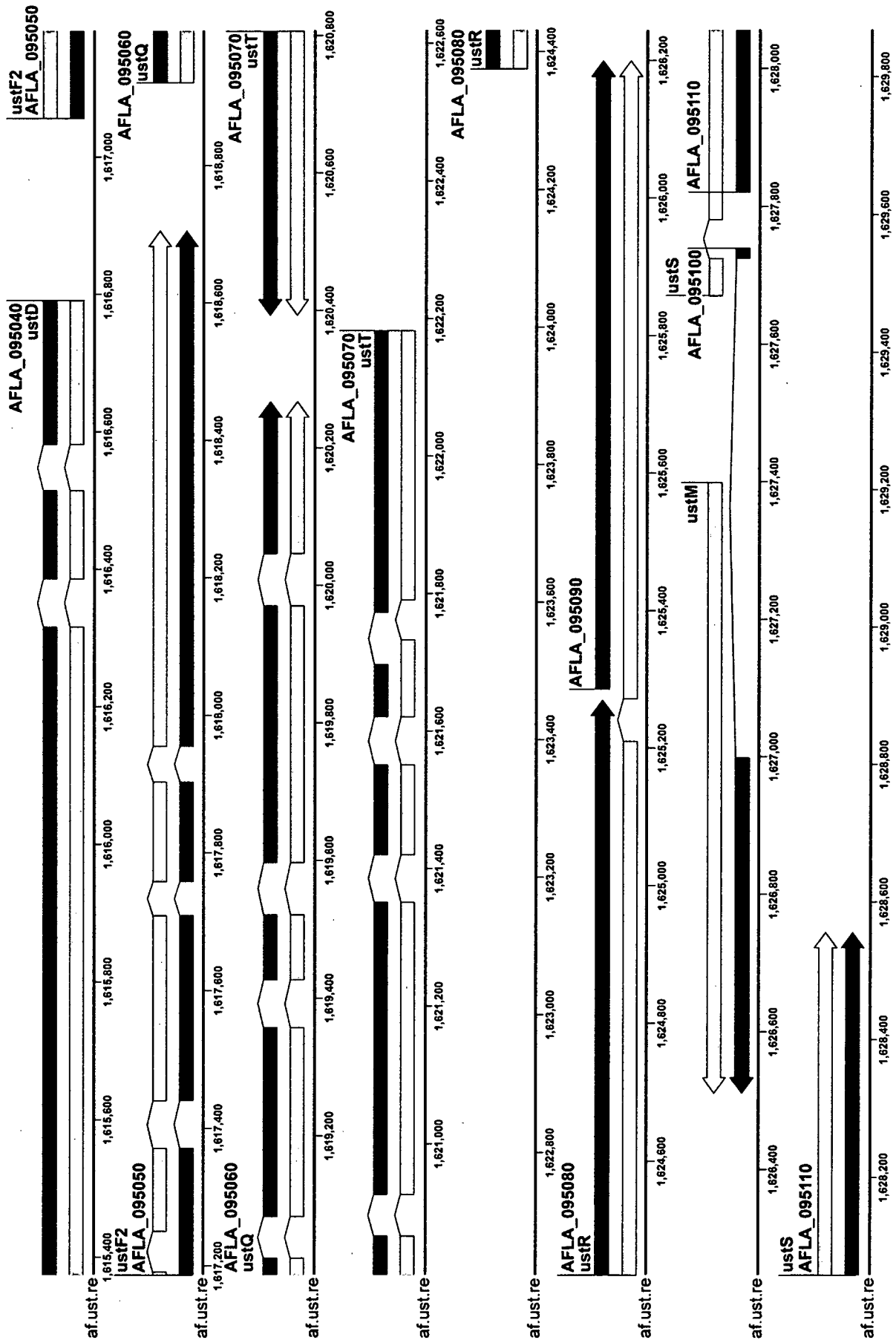
[図3]



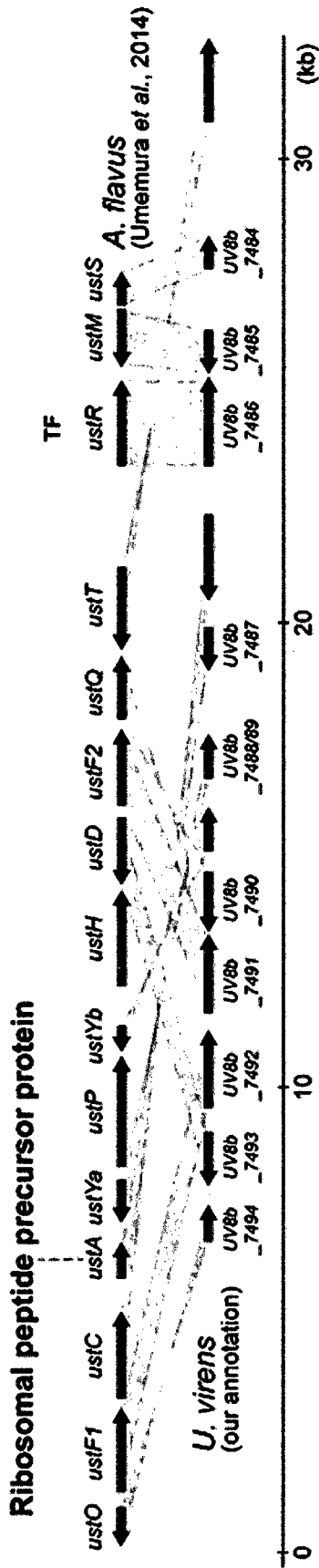
[図4]



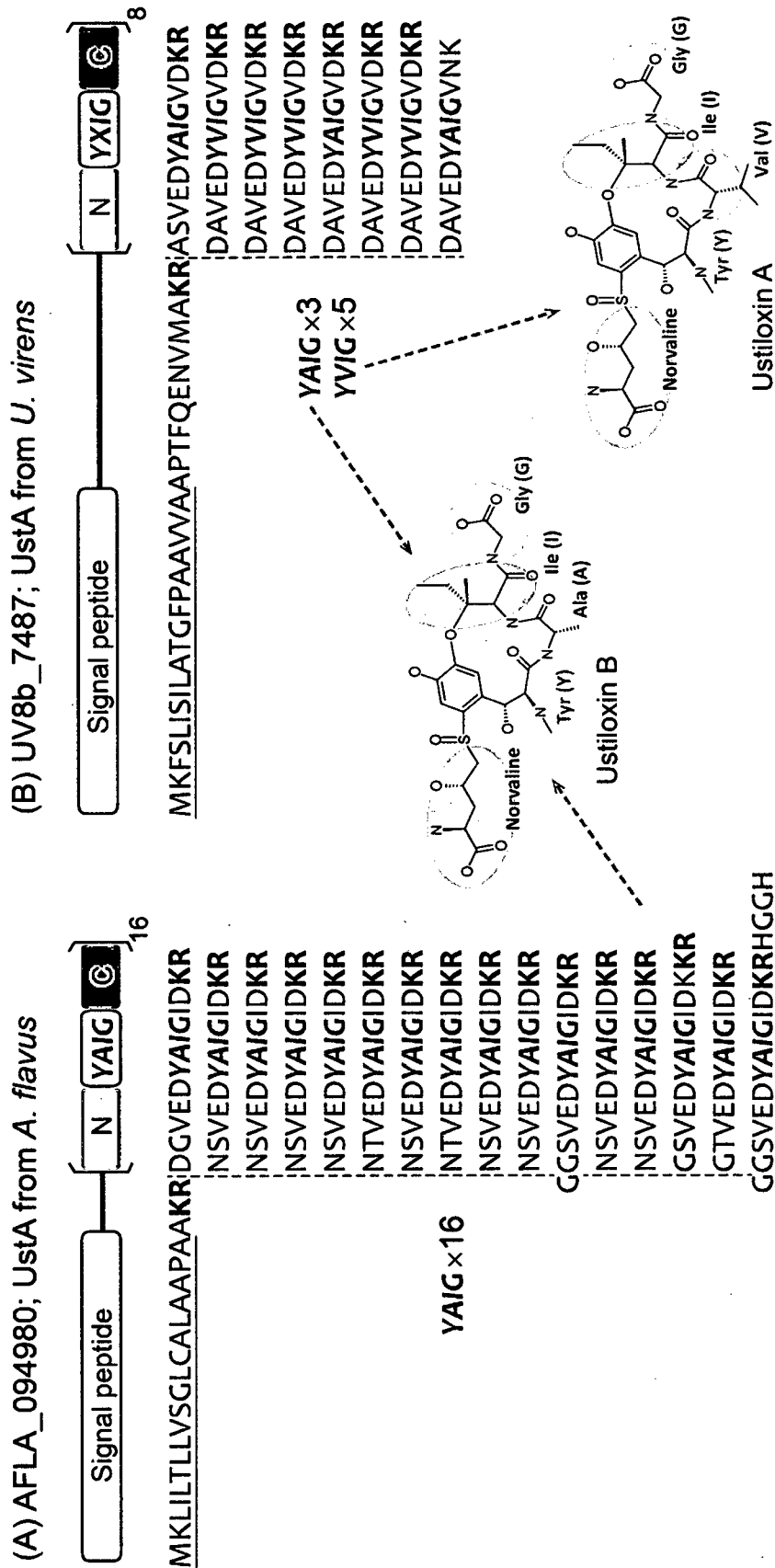
[図5]



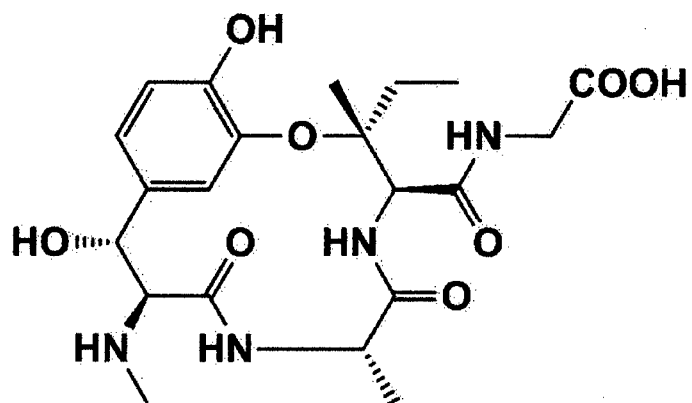
[図6]



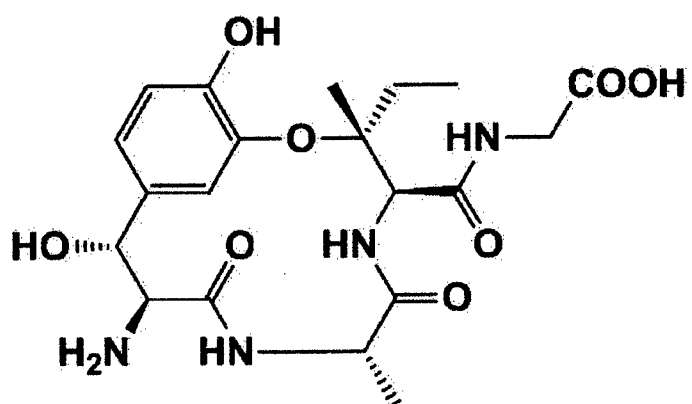
[図7]



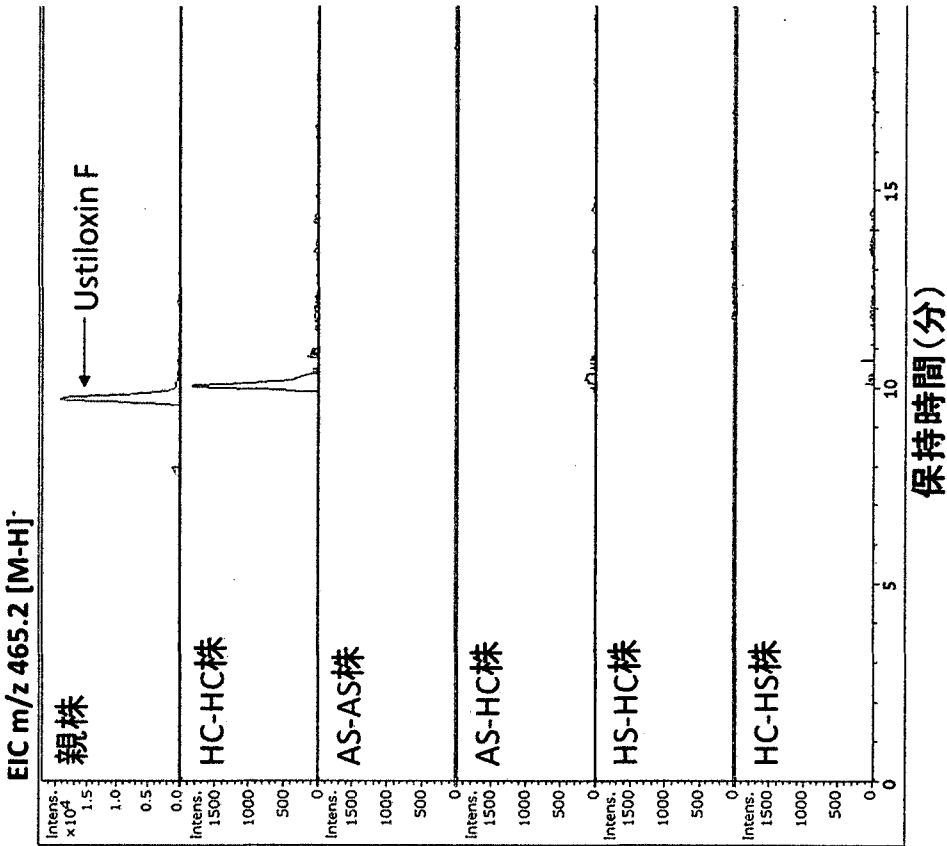
[図8]



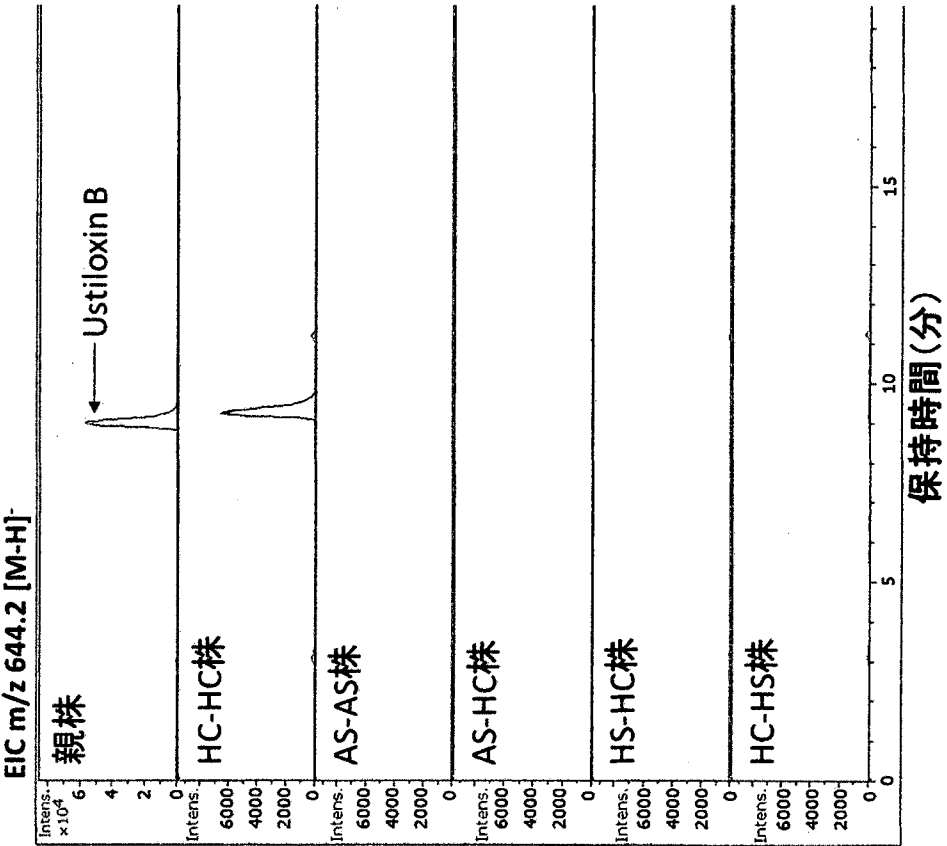
[図9]



[図10]

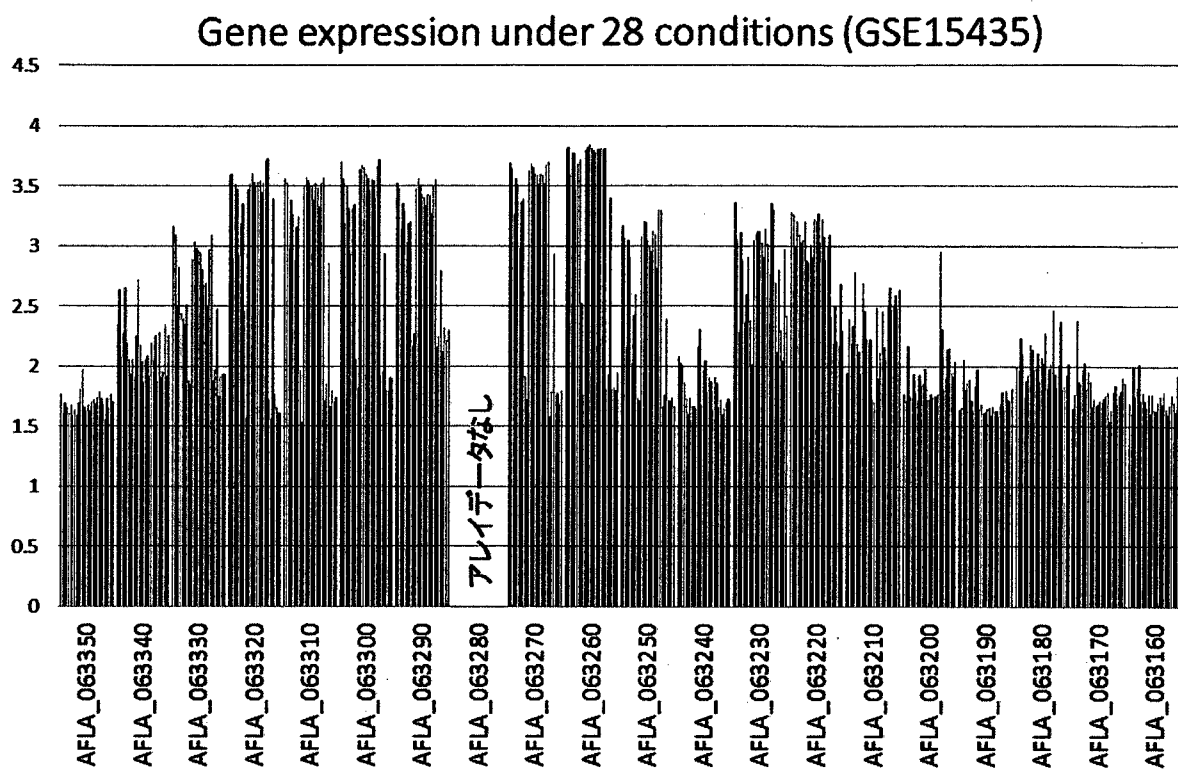


親株

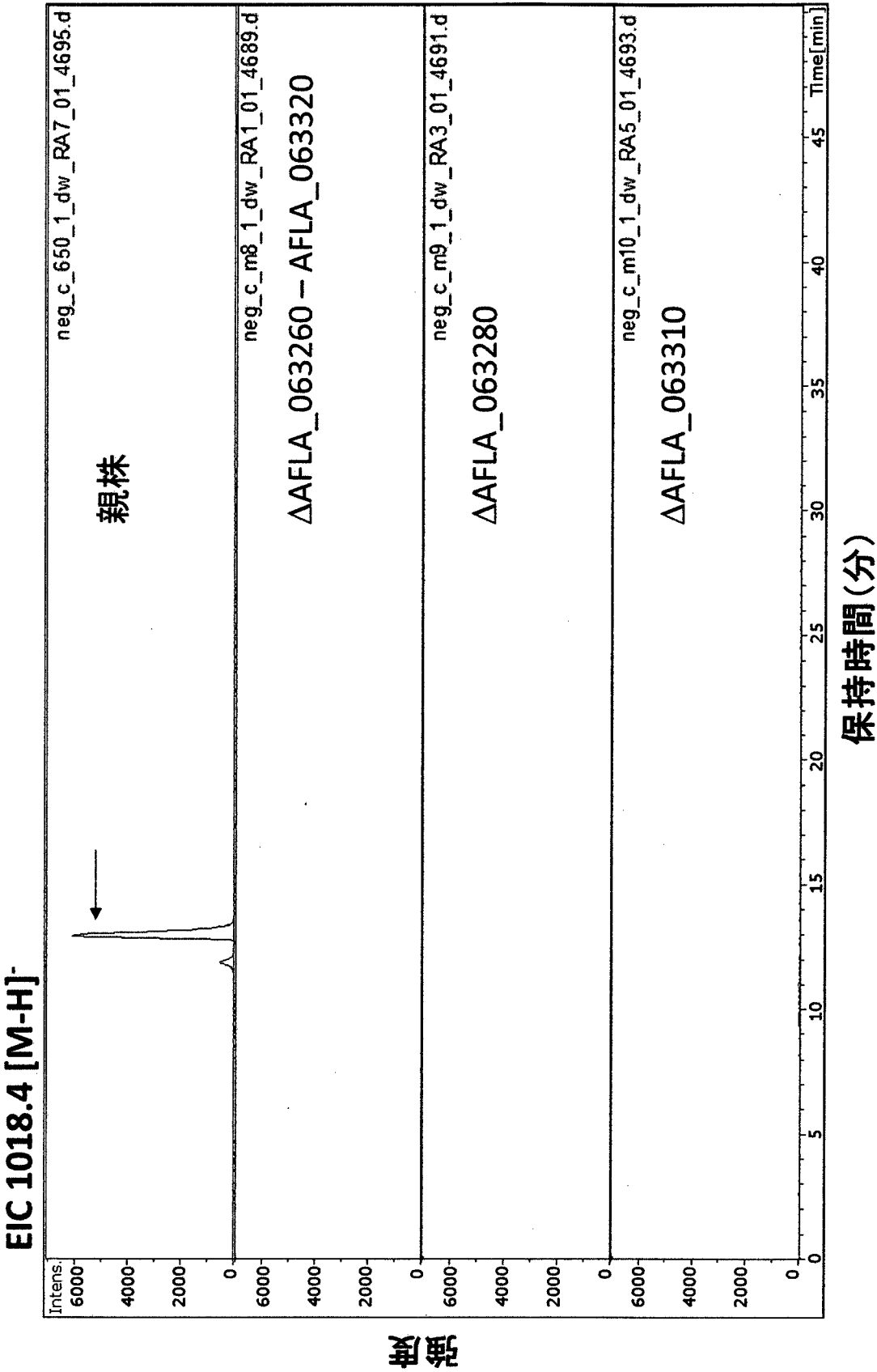


親株

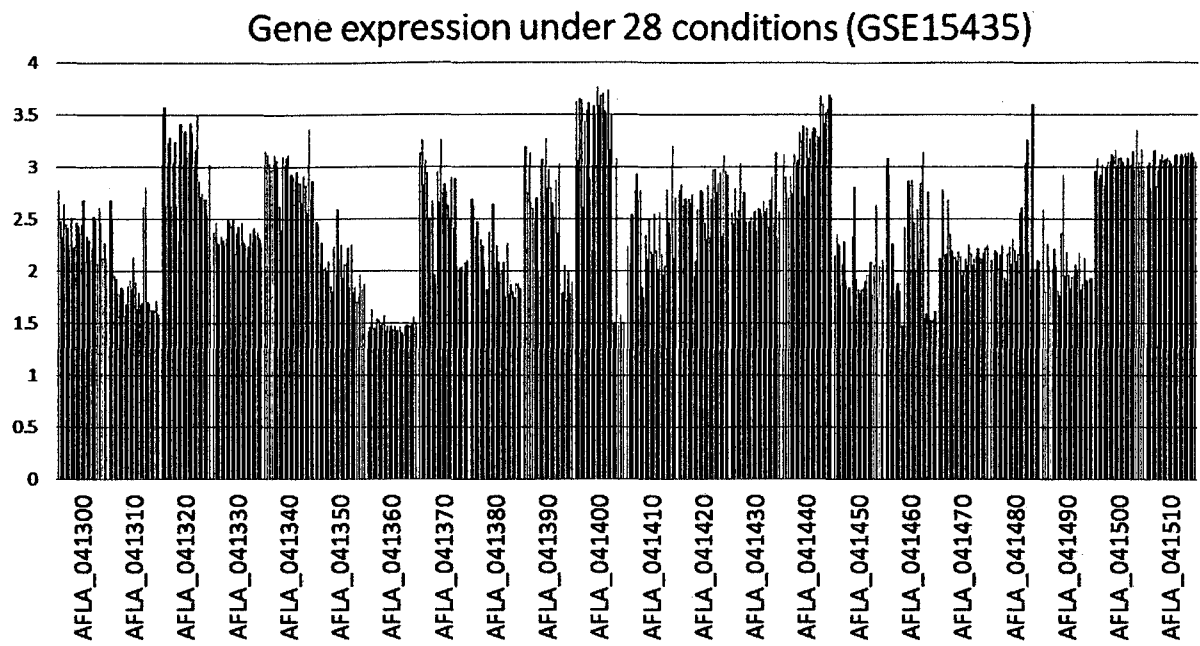
[図11]



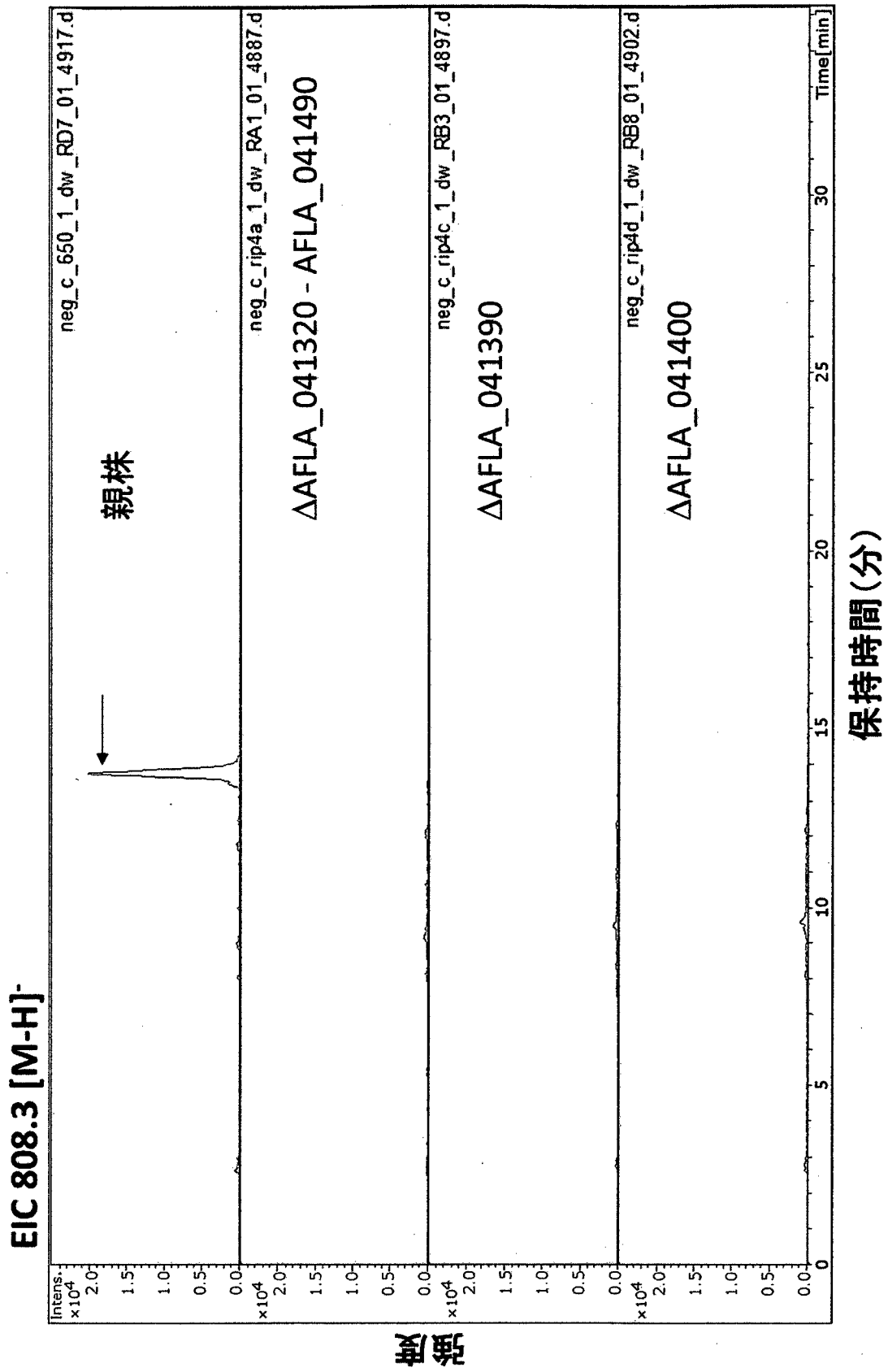
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/056667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K14/37(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

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)

C12N15/09, C07K14/37, C12P21/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	UMEMURA, M., et al., Characterization of the biosynthetic gene cluster for the ribosomally synthesized cyclic peptide ustiloxin B in <i>Aspergillus flavus</i> , 2014 May, Fungal Genetics and Biology, Vol.68, p.23-30, fig. 3, 5	1-17
P,X	TSUKUI, T., et al., Ustiloxins, fungal cyclic peptides, are ribosomally synthesized in <i>Ustilagoidea virens</i> , 2014 Nov., Bioinformatics, Vol.31, No.7, p.981-985, fig. 1, page 982, right column, 2nd paragraph, table 1	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 May 2015 (29.05.15)

Date of mailing of the international search report
09 June 2015 (09.06.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/056667

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UMEMURA, M., et al., MIDDAS-M: motif-independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters through the integration of genome sequencing and transcriptome data, 2013, PLoS One, Vol.8, No.12, e84028, p.1-10, table 1, abstract	1-17
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. XM_002381278 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_002381278 > 27-MAY-2009 uploaded, [retrieved on 2015-05-28] NIERMAN, W.C. Definition: Aspergillus flavus NRRL3357 conserved hypothetical protein, mRNA, entire text	1-17
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. XM_002381281 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_002381281 > 27-MAY-2009 uploaded, [retrieved on 2015-05-28] NIERMAN, W.C. Definition: Aspergillus flavus NRRL3357 hypothetical protein, mRNA. entire text	1-17
A	JP 2005-176602 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology et al.), 07 July 2005 (07.07.2005), SEQ ID NO:9702 & US 2004/0082053 A1 & US 2005/0142650 A1 & US 2006/0234320 A1 & WO 2003/056016 A1 & WO 2003/056018 A1 & EP 1466979 A1 & EP 1466982 A1	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/37(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C07K14/37, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2015年
日本国実用新案登録公報	1996-2015年
日本国登録実用新案公報	1994-2015年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	UMEMURA, M., et al., Characterization of the biosynthetic gene cluster for the ribosomally synthesized cyclic peptide ustiloxin B in <i>Aspergillus flavus</i> , 2014 May, Fungal Genetics and Biology, Vol.68, p.23-30 図3、図5	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.06.2015

国際調査報告の発送日

09.06.2015

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

福澤 洋光

4B

3963

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	TSUKUI, T., et al., Ustiloxins, fungal cyclic peptides, are ribosomally synthesized in Ustilagoidea virens, 2014 Nov., Bioinformatics, Vol.31, No.7, p.981-985 図 1、第 9 8 2 頁右欄第 2 段落、表 1	1 - 1 7
A	UMEMURA, M., et al., MIDDAS-M: motif-independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters through the integration of genome sequencing and transcriptome data, 2013, PLoS One, Vol.8, No.12, e84028, p.1-10 表 1、要約	1 - 1 7
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. XM_002381278 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_002381278 > 27-MAY-2009 uploaded, [retrieved on 2015-05-28] NIERMAN, W.C. Definition: Aspergillus flavus NRRL3357 conserved hypothetical protein, mRNA 全文	1 - 1 7
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. XM_002381281 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_002381281 > 27-MAY-2009 uploaded, [retrieved on 2015-05-28] NIERMAN, W.C. Definition: Aspergillus flavus NRRL3357 hypothetical protein, mRNA. 全文	1 - 1 7
A	JP 2005-176602 A (独立行政法人産業技術総合研究所、他) 2005.07.07, 配列番号 9 7 0 2 & US 2004/0082053 A1 & US 2005/0142650 A1 & US 2006/0234320 A1 & WO 2003/056016 A1 & WO 2003/056018 A1 & EP 1466979 A1 & EP 1466982 A1	1 - 1 7