

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/000902

発行日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(43) 国際公開日 平成15年1月3日(2003.1.3)

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

C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 9/00  
 C 1 2 N 9/02  
 C 1 2 N 9/12

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 9/00  
 C 1 2 N 9/02  
 C 1 2 N 9/12

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-507285 (P2003-507285)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人 科学技術振興機構
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/004381		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22) 国際出願日	平成14年5月2日(2002.5.2)	(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生
(31) 優先権主張番号	特願2001-188465 (P2001-188465)	(72) 発明者	及川 英秋 北海道札幌市豊平区中の島一条七丁目9-1 合同宿舍404-46
(32) 優先日	平成13年6月21日(2001.6.21)	(72) 発明者	佐々 武史 山形県鶴岡市大部町22-7
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	豊増 知伸 山形県鶴岡市朝陽町31-22サンポール 202号
(81) 指定国	CA, JP, US		

(54) 【発明の名称】 アフィディコリン生合成遺伝子クラスター

## (57) 【要約】

真核生物の複製で主要な役割を担うDNAポリメラーゼの特異的阻害剤であるアフィディコリン(aphidicolin)の生産に必要な遺伝子を発見し、これら生合成遺伝子を培養法の確立した異種微生物で発現させることによって、アフィディコリンの大量生産を可能にすること。

本発明は、DNAポリメラーゼ 特異的阻害剤アフィディコリンの生合成に必要な、GGDP合成酵素、環化酵素、及び3段階の酸化を触媒する酵素をコードする遺伝子、並びにアフィディコリンの毒性に対する耐性遺伝子、及び該遺伝子にコードされるタンパク質及びアフィディコリン、並びにそれらの製造方法等に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の ( a ) 又は ( b ) のタンパク質をコードする遺伝子：

( a ) 以下の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるアフイディコラン - 1 6 - オール ( a p h i d i c o l a n - 1 6 - o l ) 合成酵素  
(配列番号 1)

MVPISTRSEVQDGLIAQARSLITRIVHNSDDVYGFGLSCTVYDTAWVALVTK  
 HVNGIKHWLFPESFHYILASQCDDGTWCEDKTAQFDGVLNTIAGLLVLKRYR  
 RDPLQLKVDNRDLDSRIKLATSALHSLLEEDVSTTNNVGF E I V P T M L D L L V 10  
 QEDPSLSFELKGREALTEIREAKMNRFPPELLYQGKMLTHTSLEALLGRID  
 YDNVARYTVKGSMPASPSSTAAYLMSASTWDDEAETYLRYTITASTGKGS GG  
 VPGVFPTTYFEYTWILSTLFRAGFQSSSELDSPELTAMTDLLKAFKAFSGAIG  
 LDSGIEPDVDDSAKIVTTLNMLGKPAHARYLCDNFEVETHFRVYPRERDPSF  
 SANCNALAAFLHQPDVEVYSSQILKAASYLCERMWNADEKIDDKWNKSHLY  
 SSFLYTQVMTDLMAITEAGRLDGVFTRELLTRVCVTIFQSCLRAMLKQSHDG 20  
 SWNQSLEETAYAILHLTEARRLCFFEQISEPLENSIYRGITFLTITDKPPMEYL  
 WSDKVSYGSAYLAETYVLAARRAAESTSVTNLVGSSIWKDNASTKMHKLVGL  
 FHRTPLLKALPKWELQASMIEASIQGLLQDARLEVLQRPKVDGGEYLSIIPF  
 TWTSCSNSARTNASASHLWELMALSFFTYQVDEFMEAVAGPAFKGRMTHLH  
 AIIDEAVHCSQNRERTPGECENTNHVTSELLQAVRFILDNPTVRKASPYDRNT  
 LLQELRIFLHAHVTVQVEDNASFGRERLTGDKALTSYRSQLYRWVHTISSDHIA 30  
 GPFCFYATCLLGATLTAHPPNDCFPKSSQKYLAATCRHLSMCRMYNDIG  
 SWNRDHREGNLNCLHFPFSETTSDDAERKASLLTLAQYERKQWCNALQQ  
 LEKEMVHGASEPAAARLAKRRACLIDMFCKVTDLYGQIYVLRDVSSVIKDVV  
 RNGE ;

( b ) アミノ酸配列 ( a ) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、アフイディコラン - 1 6 - オール合成酵素活性を有するタンパク質。 40

## 【請求項2】

請求の範囲第 1 項に記載のアミノ酸配列 ( a ) において、その N 末端及び / 又は C 末端から 4 0 個以内のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなり、アフイディコラン - 1 6 - オール合成酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

## 【請求項3】

以下の ( a ) 又は ( b ) の DNA を含む遺伝子：

( a ) 以下の配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA

(配列番号 2)

ATGGTTCCAATTTGACTCGTTCAGAAGTCCAGGATGGCTTAATCGCCCAAGCCAGATCCTTGATCACACGG  
ATCGTCCACAACCTCCGACGACGTTTACGGGTTTGAACACTAAGTTGCACCGTCTATGATACTGCTTGGGTG  
GCTTTGGTTACGAAACATGTCAATGGTATCAAGCATTGGCTGTTTCCTGAAAGCTTCCATTACATTCTCGCG  
TCACAGTGGCAGATGGGACTTGGTGGGAGGACAAAACAGCACAGTTTCGACGGAGTTCTGAACACGATCGCT  
GGACTGCTTGTCCTAAAACGGTACAGGAGAGACCCTCTTCAACTAAAAGTTGACAACAGAGATCTCGATTCT  
CGTATCAAACCTCGCAACCTCTGCGCTACATTCCCTGTTGGAAGAGTGGGACGTTTCGACAACGAACAATGTT  
GGCTTTGAGATCATCGTCCCAACCATGCTGGACCTGTTAGTCCAAGAAGATCCATCACTCTCCTTCGAGCTC  
AAGGGTCGTGAAGCATTGACAGAGATACGGGAGGCTAAGATGAATCGATTCCAGCCAGAACTTCTATACCAA  
GGAAAATTGATGACCTTGACCCACTCCTTGAAGCATTGCTTGGCAGAATAGACTACGACAATGTTGCTCGA  
TATACAGTTAAAGGCTCCATGTTTGGCTCACCTTCATCCACGGCGCCTAATTTGATGAGTGGTCTACATGG  
GATGACGAGGCCGAGACTTACCTACGGTACACCATCACTGCATCGACGGGGAAGGGAAGCGGTGGTGTTCCT  
GGCGTCTTCCCTACCACATACTTTGAGTACACATGGATTTTGTCTACACTGTTTCGAGCGGGATTCCAATCC  
TCAGAACTCGACTCTCCCGAACTGACCGCAATGACCGATACTGCTCAAAGCTTTCAAGGCATTTCAGCGGT  
GCGATCGGGCTAGATTCCGGGATCGAGCCAGATGTTGATGACAGTGCTAAAATTGCTCACTACACTCAACATG  
CTGGGTAAGCCGGCTCATGCACGGTACTTATGTGATAACTTTGAGGTTGAGACCCATTTTCGCGTATACCCG  
AGGAAAAGAGACCCAAGCTTTAGCGCCAACCTGTAACGCGCTTGTGCTGATTCTTACATCAACCTGACGTTGAG  
GTGTAICTCATCACAGATACTCAAGGCAGCAAGCTATTTATGTGAGAGGATGTGGAACGCAGACGAGAAGATC  
GACGACAAATGGAACAAGAGCCACCTCTATTCAAGCTTCTCTACACTCAGGTAATGACGGACCTGATGGCA  
ATCACTGAGGCTGGAAGACTAGATGGTGTGTTTACCAGAGAGCTCTTGACCAGAGTCTGTGTGACCATCTTT  
CAAAGTTGCCTGAGGGCAATGTTGAAGCAGTCACATGATGGGTGATGGAACCAATCTTTAGAGGAGACAGCC  
TACGCGATCTTGCATCTGACGGAAGCACGCCGGCTCTGCTTCTTTGAGCAAATTTTCGGAGCCATTGGAGAAC

10

20

30

TCCATCTATCGTGGAAATAACATTTCTTACAACCATTGACAAGCCACCAATGGAGTATCTCTGGTCTGACAAG  
 GTCAGCTACGGCTCAGCCTATCTGGCAGAGACATATGTCTTAGCTGCCC GAAGGGCAGCAGAATCCACCTCA  
 GTCACCAATCTTGTGGTCCAGCATCTGGAAGGACAACGCTTCGACGAAGATGCACAAACTCGTTGGACTT  
 TTTCACCGGACACCCCTCCTCAAAGCACTTCTAAATGGGAGCTCCAAGCTTCCATGATAGAAGCTTCCATC  
 TATCAAGGCCTTCTGCAGGATGCACGATTAGAAGTACTGCAGAGACCCAAGGTAGATGGAGGCGAGTATCTT  
 TCCATCATTCTTTCACCTGGACAAGCTGTAGCAACAGTGTCTCGTACAAATGCTTCTGCATCTCATTATGG  
 GAGTTGATGGCTTTGTCATTCTTTACATATCAGGTGGACGAGTTCATGGAAGCCGTCGCAGGACCAGCATT  
 AAAGGACGGATGACGCATCTTCATGCAATCATCGACGAAGCCGTACATTGTTTCGAGAACCGGGAAAGAACA  
 CCAGGAGAGTGTGAAAATACCAATCAGTCACTTCCGAGCTTCTGCAAGCAGTTCGCTTCATACTAGACAAC  
 CCTACCGTCCGTAAAGCCAGCCCGTATGACCGCAACACTTTGTTACAGGAGTTACGAATCTTCTTTCACGCA  
 CATGTAACACAAGTTGAGGATAACGCCAGCTTTGGAAGAGAGAGGTTGACAGGCGACAAGGCCCTTACAAGC  
 TATCGCAGTCAGCTCTACCGTTGGGTGCACACCATATCATCCGACCATATTGCCGGGCCTTTTTGCTTCTAT  
 TATGCAACCTGCTTGTGGGAGCTACCTTGACAGCACACCCTCCGAACGACTGCTTTCCCAAGTCATCGCAA  
 AAGTATCTGGCAGCAGCGACATGTCGACACTTGTCTGTATGTGTGCATGTACAACGACATCGGCTCGTGG  
 AATCGAGATCACCGCGAGGGCAATCTCAACTGCCTTCACTTCCCTGAATTCAGCGAAACGACCTCGGACGAT  
 GCTGAAAGAAAGGCTTCTCTACTTACTCTCGCTCAGTACGAGCGAAAGCAATGGTGCAATGCACTACAGCAG  
 CTTGAGAAAAGAAATGGTACACGGGGCATCGGAGCCTGCTGCAGCGAGGCTCGCGAAGCGTCGCGCATGTCTG  
 ATAGACATGTTTTGCAAAGTGACGGATCTCTATGGACAGATCTATGTTCTCCGCGATGTTTCTCCGTCATC  
 AAGGATGTTGTTCCGAACGGGAATAG ;

10

20

30

40

50

(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、アフィニコラン - 16 - オール合成酵素活性を有するタンパク質をコードする  
 DNA。

【請求項 4】

以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子：

(a) 以下の配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるゲラニルゲラニルニリン酸合成  
 酵素

(配列番号 5)

MAYTVBPREHNSKNTTLPTVAMPPSPSSFSASFDPFRYDTKEVNFHDHWTSTKEKVVT  
 GPYDYIAAKPGKEVRTLLLACFDEWLQVPPESEVIGQVVRMLHTASLLIDDIQDNSE  
 LRRGKPVQNI FGTALTINSANYVYFLALEKLNLSLKNPNITDIFTEELLRLHRGQAMD  
 LYWRDTLTCPTBEYFEMVANKTGGLFRLMYRMMKABSSMPIDLLPVVELLGVIFQ  
 VVDDYKNLCSREYGLKLGFGEDLTEGKFSFPVIHSIRSNPEDLQLLHVLQQKSSNEH  
 VKLYAIEIMBSTGSLEYTKHVVENIVSIIQEIISTDEGQGRGKILDLLHKITRLS ;

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加  
 されたアミノ酸配列からなり、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するタンパク  
 質。

## 【請求項 5】

以下の ( a ) 又は ( b ) の D N A を含む遺伝子に係る :

( a ) 以下の配列番号 6 に示される塩基配列からなる D N A  
(配列番号 6)

ATGGCATATACGGTCGAACCCAGAGAACATTCTAAGAACCACCCTCCCAACGGTTGCCATGCCCCCTTCT  
CCTCCAAGTAGCTTCTCCGCATCCTTTGGTCCTTTCCGCTACGATACGAAGGAAGTCAACTTTGACCACTGG  
ACCTCGACAAAAGAGAAAGTGGTGACTGGCCCGTACGATTATATTGCAGCCAAGCCGGAAAGGAAGTACGT  
ACGCTACTCCTGGCATGTTTTGACGAATGGCTCCAAGTGCCACCAGAGTCTCTGGAGGTTATTGGCCAGGTT  
GTTGCGATGCTACATACGGCTTCGCTACTCATCGACGACATCCAGGACAATTCAGAGTTACGACGAGGCAAA  
CCTGTTGCACAAAACATCTTCGGCACAGCATTGACCATCAACTCAGCGAACTATGTCTACTTCCTCGCATTG  
GAAAAGCTCAACTCTCTGAAGAATCCGAATATTACCGATATATTTACCGAAGAAGTCTTCGCCTACACCGA  
GGCCAAGCTATGGATCTGTACTGGAGGGACACACTGACCTGCCCAACTGAAGAGGAATACTTTGAAATGGTC  
GCAAACAAGACAGGCGGGCTGTTTCGGCTGATGTACAGGATGATGAAGGCGGAGTCATCAATGCCATTGAC  
CTCCTTCCCGTGGTGGAGCTCCTTGGCGTAATCTTTCAAGTAGTGGATGATTACAAGAACCTGTGCAGTCGG  
GAATACGGCAAGCTGAAGGGTTTTGGGGAGGACCTGACTGAAGGCAAGTTCTCCTTTCCAGTAATTCATAGT  
ATCAGGTCCAATCCCGAGGACTTACAACCTTCTGCACGTTCTGCAACAGAAGTCTCCAACGAACATGTCAAA  
CTTTATGCTATCGAAATCATGGAGAGCACGGGGAGCCTTGAATATACAAAGCATGTTGTTGAAAACATAGTA  
TCTCAGATACAAGAGATTATCTACTCGACCGATGAGGGTCAAGGAAGGGGAAAAGGAATACTTGATCTACTG  
CATAAGATTACTAGGCTGTCGTAA ;

10

20

30

( b ) 塩基配列 ( a ) からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
且つ、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする D N A 。

## 【請求項 6】

以下の ( a ) 又は ( b ) のタンパク質をコードする遺伝子 :

( a ) 以下の配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるチトクローム P 4 5 0 水酸化酵  
素 ( P 4 5 0 - 1 )  
(配列番号 7)

MSHFLPTLILTSLLVAYVLARMIYNVYHPLSAFPGDAFFCATGLTKAYHMIAGDLQ  
LKVKDMHDKYGSVVR IAPTELSFSYCSAWKDIYGSRGGRELSKFYDFYRVDEAMPQ  
HIISAGKAKHSILRRYLAHGFSNAMKAQEPVILDVNLLMQRLREHABEGARVVD  
VNKWFNFATFE IIGKLTFGADLGNLRNRDHPWVKGSANNNMVVGFMAAANSVG  
LGPIIKWCISNEILPRQKYLDELAEMVQKRTGVTVERPDFIQGLLRDDVQLSNGEIVA  
NVEALIGAGSESTATLLTGTVCALLQNPDLAKVIDEVRSTFRTEDEITLHSVQRLDY  
MLACLNETFRYPPVTNGMPRVTPKEGAIIGGRLVPGNTVVVAIWQWAICHDPALWK  
DPYTFRPERFLEAPEFSTDVREALNPFVSGTRNCIGRNL SYAETRLILARLFYYFDLEL  
ADPDQDWFQAQKAYLVWDAPALNMYLKPVVR

40

50

( b ) アミノ酸配列 ( a ) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加

されたアミノ酸配列からなり、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 ( P 4 5 0 - 1 ) 活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

以下の ( a ) 又は ( b ) の D N A を含む遺伝子に係る：

( a ) 以下の配列番号 8 に示される塩基配列からなる D N A  
(配列番号 8)

ATGTCACACTTTCTACCTACATTAATCCTCACCTCTTTAACTTTGGTTGCGTATGTTCTCGCAAGAATGATA  
TATAACGTTTTCTATCATCCTCTAAGCGCCTTTCTGGCGATGCTTTCTTTTGTGCCACGGGGCTTACCAAA  
GCGTACCACATGATCGCCGGGGATCTTCAACTCAAAGTCAAAGACATGCACGACAAGTATGGCTCAGTAGTA  
CGAATAGCTCCCACTGAATTGAGCTTTTCTATTGTTCCGCGTGGAAGGACATCTATGGAAGCCGCGGGGT  
CGCGAACTATCTAAATTTTACGACTTCTACCGGGTGCACGAAGCGATGCCGCAACACATCATATCGGCGGGA  
AAAGCAAAACACAGTATTCTACGACGTTATTTGGCGCATGGTTTCTCAGAGAACGCCATGAAAGCTCAGGAG  
CCTGTCATTCTTGACCTTGTGAATCTCCTAATGCAGCGTTTGGAGAGAACATGCAGAAGAGGGTGCACGAGTC  
GTGGATGTGAACAAATGGTTCAATTTTGCTACCTTCGAAATCATTGGAAAACGACCTTCGGGGCTGATCTT  
GGAAAACCTTAAGGAACCGTGACTGGCATCCTTGGGTGAAAGGCAGTGCAAACAACAATATGGTGGTTGGTTTC  
ATGGCGGCCGCAATAGCGTGGGACTTGGGCCATTATCAAATGGTGCATAAGCAACGAGATCCTTCCGAGA  
CAAAAATATCTTGATGAGCTGGCAGAAATGGTCCAAAAGCGTACGGGGGTGACGGTTCGAGCGTCTGACTTC  
ATTCAAGGCCCTTTTGGGTGACGATGTCCAGCTGTCAAACGGAGAGATCGTTGCAAATGTGGAAGCTCTCATT  
GGAGCAGGATCCGAATCAACAGCGACCCTACTGACGGGCACCGTCTGCGCTCTTCTACAGAACCCCGACCAA  
CTGGCGAAGGTGATCGACGAGGTACGGTCAACCTTTCGCACCGAGGACGAAATCACTTTACACTCGGTTCAA  
CGCCTCGACTATATGCTTGCATGCTTGAACGAGACCTTCCGATATTACCCTCCAGTGACGAACGGTATGCCT  
AGGGTTACGCCTAAAGAAGGGGCAATCATAGGCGGACGCTTGGTGCCAGGAAATACAGTTGTCCGCGATTTGG  
CAATGGGCTATATGCCATGATCCTGCATTATGAAAGATCCATACACATTCCGACCTGAGAGATTTTTGGAG  
GCCCCAGAGTTCTCAACAGATGTGCGCGAAGCTCTGAATCCATTCAGTGTCGGCAGGAGGAACTGTATTGGT  
AGAAAATCTATCGTATGCTGAAACGCGCCTGATCCTCGCCCGTTTTGTTTTACTACTTCGACTTGGAAATGGCG  
GACCCTGATCAAGACTGGTTCGGAGCTCAGAAGGCTTATCTTGTATGGGACGCACCTGCGTTAAACATGTAT  
CTAAGCCGGTTGTTTCGATGA ;

10

20

30

40

( b ) 塩基配列 ( a ) からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 ( P 4 5 0 - 1 ) 活性を有するタンパク質をコードする D N A 。

【請求項 8】

以下の ( a ) 又は ( b ) のタンパク質をコードする遺伝子：

( a ) 以下の配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるトランスポータータンパク質 ( T P )

(配列番号 9)

MHPDQADTAAMQQQTTECSDRSRPEKAEEGHAREHTVTRTCSREPEQTATATKPT  
 GLKLI CLTTAICLTIFLISVDFSILATAIPAITAEFKSVADIGWYGSSYLLTTASSQLLGK  
 CYTVFDLKWTFLLALLTFEVGSIICATAPSSVVLIIGRAIAGCGNAGLLSGALLILTHSV  
 PLEKRPLFMAMTGGTYGVAAGPPLGGVFTDKLSWRWCFWINLPIGALTFLVIVFL  
 FKSPFRSGFDGSRSLAKVMRFDVGTLMFMPAII CVLLALQWGGTTHAWNSGIVV  
 ALLVVGGLVIAFGIVQWLMHDDATIPLRI IKKRTIWACAAYQFALGAFFVFIYFLPI  
 WFQGVQGASAIQSGVRTLPMLVGNIVATAVSGVLVTIIGYYAPFMILGTILASVGAGL  
 LLLFTPNTAASWIGYQAI VGLGIGFGWQQPFVAVQTVLDIKDVPIATATLSFAQTLGG  
 TLFVSVQAQTAFSTKLTQELVSVQVQLDPASILHEGGAELDKLVPEQYLPDVVLSYNN  
 SLLSAFFVATIMAIMSLVGCTFVEWNSVKGKKADAVPAA

10

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、トランスポーター (TP) 活性を有するタンパク質。

【請求項 9】

20

以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子：

(a) 以下の配列番号 10 に示される塩基配列からなる DNA

(配列番号 10)

ATGCATCCAGATCAAGCCGACACTGCAGCGATGCAGCAGCAGACAACAACCGAATGCTCGGATCGATCCCGG  
 CCGGAGAAGGCTGAAGAAGGGCATGCTCGCGAGCATAACAGTCACGCGTACATGCTCTCGAGAACCGGAGCAA  
 ACAGCCACAGCGACCAAACCGACTGGCTTGAACTCATCTGCTTGACGACAGCGATTTGTCTAACTATCTTT  
 CTGATCTCGGTTGACTTCTCGATACTTGCAACGGCCATCCCTGCGATTACAGCCGAGTTCAAGAGTGTGGCA  
 GACATTGGCTGGTATGGAAGTTCTTACTTGCTCACAACCTGCCTCCTCACAGCTTCTCCTCGGGAAGTGTTAC  
 ACCGTGTTGATCTCAAGTGGACCTTTCTGCTTGCTCTACTCACCTTCCAAGTGGGAGTATCATATGTGCA 10  
 ACTGCACCCAGCTCTGTCGTGCTCATAATTGGCCGCGCTATTGCTGGCTGTGGAATGCCGGCTCCTGTCA  
 GGAGCCCTGCTCCTCACTCATAGCGTACCGCTGGAGAAACGCCCACTTTTCATGGCAATGACTGGCGGT  
 ACCTACGGAGTCGCCGCAATCGCGGGACCACCGCTCGGTGGAGTCTTCACTGATAAGCTGTCGTGGCGGTGG  
 TGCTTCTGGATCAATCTTCCATTGGAGCGTTGACATTTTTGGTCATCGTCTTTCTCTTCAAAGCCCTCCG  
 AGAAGCGGATTTGACGGTCCCGATCCTGGCTCGCTAAGGTCATGCGTTTTGATCCCGTCGGAACACTCATG  
 TTCATGCCTGCCATCATCTGCGTGCTCCTTGCGCTGCAATGGGGAGGTACCACCCACGCTTGGAAATAGCGGC 20  
 ATAGTCGTCGCATTGCTGGTTGTTGGAGGTGTAAGTTCGTTATTGCATTTGGCATCGTTCAATGGCTCATGCAT  
 GATGATGCCACTATACCCCTTCGCATCATCAAGAAGCGTACAATTTGGGCATGCGCTGCCTACCAATTTGCA  
 CTCGGTGCTGCCTTTTTTGTCTTCATCTACTTCCTTCCCATCTGGTTCCAGGGTGTGCAAGGAGCCAGCGCC  
 ATCCAGTCAGGAGTTGAACTTCCAATGCTCGTCGGAACATCGTCGCTACAGCCGATCTGGCGTCTCTG  
 GTCACCATTATTGGATATTACGCTCCTTTTCATGATCCTCGGCACTATCCTCGCATCTGTGGGCGCCGGTCTC  
 CTATTGCTTTTACCCCTAACGTGACTGCGGCTTCATGGATTGGGTATCAGGCCATAGTCGGCCTGGGTATA  
 GGATTTGGATGGCAGCAACCCTTTGTTGCTGTGCAAACAGTCCTCGATATCAAAGATGTACCGATCGCCACT 30  
 GCCACTTTGTCTTTGCGCCAGACTCTCGGCGGTAAGTTCGTCAGCGTTGCGCAGACGGCTTTCTCCACC  
 AAGCTTACACAGGAGCTTGTAAGTCAAGTACCTCAACTGGATCCTGCCTCCATCTTACACGAAGGTGGTGCT  
 GCCGAGCTTGACAAGCTCGTTCCGGAACAATATCTTCCCGACGTTGTTCTGTTCATACAACAATAGCTTGCTT  
 AGCGCTTTCTTTGTTGCTACTATCATGGCGATTATGTCTCTCGTCGGCTGCACCTTCGTGGAATGGAACAGT  
 GTTAAGGGCAAGAAGGCTGATGCCGTGCCAGCTGCTTGA

10

20

30

(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、トランスポーター (TP) 活性を有するタンパク質をコードする DNA。

40

【請求項 10】

以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子：

(a) 以下の配列番号 11 に示されるアミノ酸配列からなるチトクローム P 450 水酸化  
 酵素 (P 450 - 2)

(配列番号 1 1)

MIKHSLSDCCLADPDHLIRIKSYVEANVRFGLGLSVTLVLIQMFRALGSPLRLNKPLV  
 GRRSILEPRWLVLGRFTKGGRELLRQAYKKYKDEIFKVQCNDTEICVLPHRYVEBLR  
 GLPASKVSSPQALYNKGLGSYTGLEVIVESHLEHFQAIQGHLTPNLASALGIVLDELQD  
 ALKTVLPDCSDEWVFPDVHTVLSSELVSRLSSRVFGGLELARNQWQIQLSTAYPRNAF  
 ACTMALRMVPRIIRPLLA AVLPTYWRTRSNI RDAKRIVGGIITKRRADGATDMSAKE  
 HPCDLLQWMMNAAAGTETHADDLAHRLLFISDASVMTTSLLSHCLYDLVAHPEAL  
 SCIREEVHNVLREGDNFQKTTLHKMRS LDSALKESQRLNPPFLMTFDRVVREPLLLS  
 DGTQIPVGT HLAMPTDAMLQDSSLLPQGGVAPDQFDPFRYARAREDPENAQRFLA  
 TTEAKSLVFGHGKHACPGRFFASSEAKIILSHLLLLYDFRYPEGKGRPESWLFSEVA  
 IDPNARLLIKKRNDAA SNLAMLAKAL

10

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 (P 4 5 0 - 2) 活性を有するタンパク質。

20

【請求項 1 1】

以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子：

(a) 以下の配列番号 1 2 に示される塩基配列からなる DNA  
 (配列番号 1 2)

ATGATCAAACACAGCCTTAGCGACTGTCTAGCTGACCCAGATCATCTGATCCGGATCAAGAGCTATGTGGAA

GCCAATGTTGATTTCTTGGTCTCTCCTTGGTTACCCTCCTTGTACCATCCAGATGTTTCGCGCCCTCGGC  
 TCGCCCTTGGCTCTCAACAAACCGTTGGTTGGACGTCGGTCGATCCTCGAACCGAGATGGTTGGTGGGACTG  
 CGTTTCACAAAGGGCGGCCGGGAGTTACTTCGCCAGGCATACAAAAAGTACAAAGATGAGATTTTCAAAGTA  
 CAATGCAATGACACTGAAATTTGTGTTCTTCCGCATAGATATGTGGAAGAGCTCCGCGGCTTGCCTGCAAGC  
 AAAGTGAGCTCTCCTCAGGCTCTCTATAACAAAGGCTTGGGAAGCTACACCGGTCTCGAGGTCATCGTGGAA  
 AGTCACCTTCACTTTCAGGCAATACAAGGCCACCTGACACCGAATCTCGCTTCGGCTCTTGGAAATTTGCTCTG  
 GACGAGTTGCAAGACGCATTGAAAACAGTCCTGCCGGATTGTTGAGATGAATGGGTTCCATTTGACGTACAC 10  
 ACAGTACTTTCTGAATTAGTCAGTCGCCTCTCCTCGCGTGTCTTTGGAGGTCTCGAGCTTGTCTCGAAACCAA  
 CAATGGATACAACCTGAGTACTGCTTATCCTAGGAACGCATTGCGCTGCACCATGGCTTTGCGCATGGTTCTT  
 CGTATCATTGCGCCACTCTTAGCTGCAGTCCTGCCTACTTACTGGCGTACGCGCAGCAACATAAGGGATGCC  
 AAACGCATTGTTGGTGGGATTATCACCAAGCGGCGTGGGATGAAGGAGCAACAGATATGAGCGCGAAAGAA  
 CATCCCTGTGATTTGCTGCAATGGATGATGAATGCCGCGCAGGTACGGAACCCACGCAGATGATTTAGCT  
 CACCGATTACTTTTCATCAGCGATGCTTCGGTCATGACCACGAGCCTGTTGATTTCCATTGTCTTTACGAC 20  
 CTGGTCGCCCATECCGAAGCTCTTTCATGCATTCCGGGAGGAAGTACACAATGTCTTGC CGGAAGGCGACAAC  
 TTTCAGAAAACCACTTCACAAGATGCGCAGTTTGGATAGTGCTTTGAAGGAATCCAGAGGTTAAACCCA  
 CCATTCTTGATGACATTGATCGCGTTGTGCGGGAGCCACTTCTTCTGTCCGATGGAACGCAAATCCCTGTA  
 GGGACGCATCTCGCTATGCCTACAGATGCAATGCTACAAGACTCAAGCCTCCTGCCTCAAGGCGGAGTTGCC  
 CCAGACCAATTCGATCCGTTTCGTTATGCGCGGGCGCGGAAGATCCAGAAAATGCACAGCGCTTTCAATTG  
 GCTACAACGGAGGCAAAGAGCTTGGTATTTGGACATGGAAGCATGCATGCCCTGGTCGCTTCTTTGCTAGC  
 AGCGAGGCTAAGATAATCTTGAGTCACCTGTTACTTTTGTACGATTTTCGGTATCCTGAGGGCAAGGGTCGT 30  
 CCCGAAAGTTGGCTCTTCTCGGAGAATGTTGCCATCGATCCTAATGCCAGATTGTTAATCAAGAAGCGAAAT  
 GACGCTGCAAGTAACCTAGCGATGCTAGCCAAGGCTTTGTAG ;

10

20

30

(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 (P 4 5 0 - 2) 活性を有するタンパク質をコー  
 ドする DNA。

【請求項 1 2】

請求の範囲第 1 ~ 1 1 項に記載の DNA 及び遺伝子から成る群から選択される 2 以上の D  
 NA 及び / 又は遺伝子を含有するアフィディコリン生合成遺伝子クラスター。 40

【請求項 1 3】

請求の範囲第 1 ~ 1 1 項のいずれか一項に記載の遺伝子を含有する組換え発現ベクター。

【請求項 1 4】

請求の範囲第 1 2 項に記載のアフィディコリン生合成遺伝子クラスターを含有する組換え発  
 現ベクター。

【請求項 1 5】

組換えベクターである請求の範囲第 1 3 又は 1 4 項に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 1 6】

請求の範囲第 1 3 項、第 1 4 項又は第 1 5 項に記載の発現ベクターによって形質転換され  
 た形質転換体。

50

## 【請求項 17】

大腸菌である請求の範囲第 16 項に記載の形質転換体。

## 【請求項 18】

請求の範囲第 16 項又は第 17 項に記載の形質転換体を培養することを含む、請求の範囲第 1 ~ 11 項のいずれか一項に記載の遺伝子にコードされる酵素の製造方法。

## 【請求項 19】

請求の範囲第 16 項又は第 17 項に記載の形質転換体を培養することを含む、アフィディコリンの製造方法。

## 【請求項 20】

請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載された遺伝子にコードされるアフィディコラン - 16 - オール合成酵素。 10

## 【請求項 21】

請求の範囲第 4 項、又は第 5 項に記載された遺伝子にコードされるゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素。

## 【請求項 22】

請求の範囲第 6 項、又は第 7 項に記載された遺伝子にコードされるチトクローム P 450 水酸化酵素 (P 450 - 1)。

## 【請求項 23】

請求の範囲第 8 項、又は第 9 項に記載された遺伝子にコードされるトランスポートタンパク質 (TP)。 20

## 【請求項 24】

請求の範囲第 10 項、又は第 11 項に記載された遺伝子にコードされるチトクローム P 450 水酸化酵素 (P 450 - 2)。

## 【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、DNA ポリメラーゼ 特異的阻害剤アフィディコリンの生合成に必要な各酵素をコードする遺伝子、及び該遺伝子にコードされるタンパク質等に関する。

背景技術

アフィディコリン (aphidicolin) は真核生物の複製で主要な役割を担う DNA ポリメラーゼ の特異的阻害剤である。阻害は可逆的なため、例えば、同調培養系の研究等の細胞周期を問題にする細胞生理学などの分野で必須の薬剤である。 30

しかしながら、本化合物は特殊な糸状菌でしか生産せずその株を保持した企業しか生産できない為に、現状では特定の試薬会社より高価な試薬として供給されている。該化合物を生産する糸状菌もほかに 5 種以上存在するが、生産量の向上は経験的な育種に頼るほかになく、実際にこれまでにはこのように生産菌の発酵法以外による生産例はない。

アフィディコリンのようなジテルペンと呼ばれる化合物群は、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) から環化酵素によりその複雑な炭素骨格が作られる。本物質を大量生産するためには GGDP の供給量を増大させる GGDP 合成酵素、環化酵素、3 段階の酸化を触媒する酵素の各遺伝子およびアフィディコリンの毒性に対する耐性遺伝子を見出す必要がある。次にこれら生合成遺伝子を培養法の確立した異種微生物で過剰発現することにより 40、アフィディコリンの大量生産が可能になる。

発明の開示

本発明者は鋭意研究の結果、アフィディコリン生産に必要な上記の各酵素をコードする遺伝子を見出すことに成功し、以下の発明を完成した。

即ち、本発明は、第一の態様として、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子に係る：

(a) 以下の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるアフィディコラン - 16 - オール (aphidicolan - 16 - ol) 合成酵素

(配列番号 1)

MVPISTRSEVQDGLIAQARSLITRIVHNSDDVYGFGLSCTVYDTAWVALVTK  
 HVNGIKHWLFPESFHYILASQCDDGTWCEDKTAQFDGVLNTIAGLLVLKRYR  
 RDPLQLKVDNRDLDSRIKLATSALHSLLEEDVSTTNNVGFEIIVPTMLDLLV  
 QBDP SLSFELKGREALTEIREAKMNRFPPELLYQGKMLTHTSLEALLGRID  
 YDNVARYTVKGSMFASPSSTAAYLMSASTWDDEAETYLRYTITASTGKGS GG  
 VPGVFPTTYFEYTWILSTLFRAGFQSSSELDSPELTAMTDLLKAFKAFSGAIG  
 LD SGIEPDVDDSAKI VTTLNMLGKPAHARYLCDNFVETHFRVYPRERDPSF  
 SANCNALAAFLHQPDVEVYSSQILKAASYLCERMWNADEKIDDKWNKSHLY  
 SSFLYTQVMTDLMAITEAGRLDGVFTRELLTRVCVTFQSCLRAMLKQSHDG  
 SWNQSLEETAYAILHLTEARRLCFFEQISEPLENSIYRGITFLTITDKPPMEYL  
 WSDKVSYGSAYLAETVYLAARRAAESTSVTNLVGSSIWKDNASTKMHKLVGL  
 FHRTPLLKALPKWELQASMIEASIQGLLQDARLEVLQRPKVDGGEYLSIIPF  
 TWTSCSNSARTNASASHLWELMALSFFTYQVDEFMBAVAGPAFKGRMTHLH  
 AIIDEAVHCSQNRERTPGECENTNHVTSELLQAVRFILDNPTVRKASPYDRNT  
 LLQELRIFLHAHVTQVEDNASFGRERLTGDKALTSYRSQLYRWVHTISSDHIA  
 GPFCFYATCLLGATLTAHPPNDCFPKSSQKYLA AATCRHLSMCRMYNDIG  
 SWNRDHREGNLNCLHPPEFSETTSDDAERKASLLTLAQYERKQWCNALQQ  
 LEKEMVHGASEPAAARLAKRRACLIDMFCKVTDLYGQIYVLRDVSSVIKDVV

10

20

30

RNGE ;

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、アフィディコラン - 16 - オール合成酵素活性を有するタンパク質。

本発明は更に、第二の態様として、以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子に係る :

(a) 以下の配列番号 2 に示される塩基配列 (2835bp の open reading frame を有する) からなる DNA

(配列番号2)

ATGGTTCCAATTTGACTCGTTCAGAAGTCCAGGATGGCTTAATCGCCCAAGCCAGATCCTTGATCACACGG  
ATCGTCCACAACCTCCGACGACGTTTACGGGTTTGAACACTAAGTTGCACCGTCTATGATACTGCTTGGGTG  
GCTTTGGTTACGAAACATGTCAATGGTATCAAGCATTGGCTGTTTCCTGAAAGCTTCCATTACATTCTCGCG  
TCACAGTGCGACGATGGGACTTGGTGCGAGGACAAAACAGCACAGTTGACGCGAGTTCTGAACACGATCGCT  
GGACTGCTTGTCTAAAACGGTACAGGAGAGACCCTCTTCAACTAAAAGTTGACAACAGAGATCTCGATTCT  
CGTATCAAACCTCGCAACCTCTGCGCTACATTCCCTGTTGGAAGAGTGGGACGTTTCGACAACGAACAATGTT  
GGCTTTGAGATCATCGTCCCAACCATGCTGGACCTGTTAGTCCAAGAAGATCCATCACTCTCCTTCGAGCTC  
AAGGGTCGTGAAGCATTGACAGAGATACGGGAGGCTAAGATGAATCGATTCCAGCCAGAACTTCTATACCAA  
GGAAAATTGATGACCTTGACCCACTCCTTGAAGCATTGCTTGGCAGAATAGACTACGACAATGTTGCTCGA  
TATACAGTTAAAGGCTCCATGTTTGCCTCACCTTCATCCACGGCGGCCTATTTGATGAGTGCCTTACATGG  
GATGACGAGGCCGAGACTTACCTACGGTACACCATCACTGCATCGACGGGGAAGGGAAGCGGTGGTGTTCCT  
GGCGTCTTCCCTACCACATACTTTGAGTACACATGGATTTTGTCTACACTGTTTCGAGCGGGATTCCAATCC  
TCAGAACTCGACTCTCCGAACTGACCGCAATGACCGATACACTGCTCAAAGCTTTCAAGGCATTTCAGCGGT  
GCGATCGGGCTAGATTCCGGGATCGAGCCAGATGTTGATGACAGTGCTAAAATTGTCACTACACTCAACATG  
CTGGGTAAGCCGGCTCATGCACGGTACTTATGTGATAACTTTGAGGTTGAGACCCATTTTCGCGTATACCCG  
AGGGAAAGAGACCCAAGCTTTAGCGCCAACGTAAACGCGCTTGTGCATTCTTACATCAACCTGACGTTGAG  
GTGTAATCATCACAGATACTCAAGGCAGCAAGCTATTTATGTGAGAGGATGTGGAACGCAGACGAGAAGATC  
GACGACAAATGGAACAAGAGCCACCTCTATTCAAGCTTCTCTACACTCAGGTAATGACGGACCTGATGGCA  
ATCACTGAGGCTGGAAGACTAGATGTTGTGTTTACCAGAGAGCTCTTGACCAGAGTCTGTGTGACCATCTTT  
CAAAGTTGCCTGAGGGCAATGTTGAAGCAGTACATGATGGGTGATGGAACCAATCTTTAGAGGAGACAGCC  
TACCGGATCTTGATCTGACGGAAGCACGCGGCTCTGCTTCTTTGAGCAAATTTGAGGACCATTTGGAGAAC  
TCCATCTATCGTGAATAACATTTCTTACAACCATTGACAAGCCACCAATGGAGTATCTCTGGTCTGACAAG  
GTCAGCTACGGCTCAGCCTATCTGGCAGAGACATATGTCTTAGCTGCCCGAAGGGCAGCAGAATCCACCTCA  
GTCACCAATCTTGTGCTTCCAGCATCTGGAAGGACAACGCTTCGACGAAGATGCACAAACTCGTTGGACTT  
TTTACCGGACACCCCTCCTCAAAGCACTTCTAAATGGGAGCTCCAAGCTTCCATGATAGAAGCTTCCATC

10

20

30

40

TATCAAGGCCTTCTGCAGGATGCACGATTAGAAGTACTGCAGAGACCCAAGGTAGATGGAGGCGAGTATCTT  
 TCCATCATTCCTTTACCTGGACAAGCTGTAGCAACAGTGCTCGTACAAATGCTTCTGCATCTCATTATGG  
 GAGTTGATGGCTTTGTCATTCTTTACATATCAGGTGGACGAGTTCATGGAAGCCGTGCGAGGACCAGCATT  
 AAAGGACGGATGACGCATCTTCATGCAATCATCGACGAAGCCGTACATTGTTGCGAGAACCGGAAAGAACA  
 CCAGGAGAGTGTGAAAATACCAATCACGTCACTTCCGAGCTTCTGCAAGCAGTTCGCTTCATACTAGACAAC  
 CCTACCGTCCGTAAGCCAGCCCGTATGACCGCAACACTTTGTTACAGGAGTTACGAATCTTCCTTCACGCA  
 CATGTAACACAAGFTGAGGATAACGCCAGCTTTGGAAGAGAGAGGTTGACAGGCGACAAGGCCCTTACAAGC  
 TATCGCAGTCAGCTCTACCGTTGGGTGCACACCATATCATCCGACCATATTGCCGGGCCTTTTTGCTTCTAT  
 TATGCAACCTGCTTGTGGGAGCTACCTTGACAGCACACCCTCCGAACGACTGCTTTCCCAAGTCATCGCAA  
 AAGTATCTGGCAGCAGCGACATGTCGACACTTGTCTGTATGTGTGCGCATGTACAACGACATCGGCTCGTGG  
 AATCGAGATCACCGCGAGGGCAATCTCAACTGCCTTCACTTCCCTGAATTCAGCGAAACGACCTCGGACGAT  
 GCTGAAAGAAAGGCTTCTCTACTTACTCTCGCTCAGTACGAGCGAAAGCAATGGTGCAATGCACTACAGCAG  
 CTTGAGAAAGAAATGGTACACGGGCATCGGAGCCTGCTGCAGCGAGGCTCGCGAAGCGTCGCGCATGTCTG  
 ATAGACATGTTTTGCAAAGTGACGGATCTCTATGGACAGATCTATGTTCTCCGCGATGTTTCCTCCGTCATC  
 AAGGATGTTGTTCCGGAACGGGAATAG ;

10

20

(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、アフィニコラン - 16 - オール合成酵素活性を有するタンパク質をコードする  
 DNA。

更に、本発明は、第三の態様として、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする  
 遺伝子に係る：

(a) 以下の配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるゲラニルゲラニルニリン酸合成  
 酵素

30

(配列番号 5)

MAYTVEPREHNSKNTTLPTVAMPPSPSSFSASFPPFRYDTKEVNFHDWTSTKEKVVT  
 GPYDYIAAKPGKEVRTLLLACFDEWLQVPPESEVIGQVVRMLHTASLLIDDIQDNSE  
 LRRGKPV AQNIFGTALTINSANYVYFLALEKLNLSLKNPNITDIFTELLRLHRGQAMD  
 LYWRDTLTCPTEEEFEMVANKTGGLFRLMYRMMKAESSMPIDLLPVVELLGVIFQ  
 VVDDYKNLCSREYKLGKGFEDLTEGKFSFPVIHSIRSNPEDLQLLHVLQKKSNEH  
 VKLYAIEIMESTGSLEYTKHVVENIVSIIQEIISTDEGQGRGKGLDLLHKITRLS ;

40

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加  
 されたアミノ酸配列からなり、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するタンパク  
 質。

本発明は更に、第四の態様として、以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子に係る  
 :

(a) 以下の配列番号 6 に示される塩基配列 (1032bp の open reading  
 frame を有する) からなる DNA

(配列番号 6)

ATGGCATATACGGTCGAACCCAGAGAACATTCTAAGAACCACCCTCCCAACGGTTGCCATGCCCCCTTCT  
 CCTCCAAGTAGCTTCTCCGCATCCTTTGGTCCTTTCCGCTACGATACGAAGGAAGTCAACTTTGACCACTGG  
 ACCTCGACAAAAGAGAAAAGTGGTGACTGGCCCGTACGATTATATTGCAGCCAAGCCCGGAAAGGAAGTACGT  
 ACGCTACTCCTGGCATGTTTTCGACGAATGGCTCCAAGTGCCACCAGAGTCTCTGGAGGTTATTGGCCAGGTT  
 GTTCGCATGCTACATACGGCTTCGCTACTCATCGACGACATCCAGGACAATTCAGAGTTACGACGAGGCAAA  
 CCTGTTGCACAAAACATCTTCGGCACAGCATTGACCATCAACTCAGCGAACTATGTCTACTTCCTCGCATTG  
 GAAAAGCTCAACTCTCTGAAGAATCCGAATATTACCGATATATTTACCGAAGAACTGCTTCGCCTACACCGA  
 GGCCAAGCTATGGATCTGTACTGGAGGGACACACTGACCTGCCCAACTGAAGAGGAATACTTTGAAATGGTC  
 GCAAACAAGACAGGCGGGCTGTTTTCGGCTGATGTACAGGATGATGAAGGCGGAGTCATCAATGCCCATGAC  
 CTCCTTCCCGTGGTGGAGCTCCTTGGCGTAATCTTTCAAGTAGTGGATGATTACAAGAACCTGTGCAGTCGG  
 GAATACGGCAAGCTGAAGGGTTTTGGGGAGGACCTGACTGAAGGCAAGTTCTCCTTTCCAGTAATTCATAGT  
 ATCAGGTCCAATCCCGAGGACTTACAACCTTCTGCACGTTCTGCAACAGAAGTCTCCAACGAACATGTCAAA  
 CTTTATGCTATCGAAATCATGGAGAGCACGGGGAGCCTTGAATATACAAAGCATGTTGTTGAAAACATAGTA  
 TCTCAGATACAAGAGATTATCTACTCGACCGATGAGGGTCAAGGAAGGGGAAAAGGAATACTTGATCTACTG  
 CATAAGATTACTAGGCTGTCGTAA

10

20

(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。  
 更に、本発明は、第五の態様として、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする  
 遺伝子に係る：

(a) 以下の配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるチトクローム P 4 5 0 水酸化酵  
 素 ( P 4 5 0 - 1 )  
 (配列番号 7)

30

MSHFLPTLILTSLLVAYVLARMIYNVYHPLSAFPGDAFFCATGLTKAYHMIAGDLQ  
 LKVKDMHDKYGSVVRIAPTELSFSYCSAWKDIYGSRGGRELSKPYDFYRVDEAMPQ  
 HIIISAGKAKHSILRRYLAHGFSNAMKAQEPVILDLVNLLMQRLREHAEEGARVVD  
 VNKWFNFATFEIIGKLTFGADLGNLRNRDWHPPVKGSANNNMVVGFMAAANSVG  
 LGPIIKWCISNEILPRQKYLDELAEMVQKRTGVTVERPDFIQGLLRDDVQLSNGEIVA  
 NVEALIGAGSESTATLLTGTVCALLQNPDLAKVIDEVRSTFRTEDEITLHSVQLDY  
 MLACLNETFRYPPVTNGMPRVTPKEGAIIGRLVPGNTVVAIWQWAI CHDPALWK  
 DPYTFRPERFLEAPEFSTDVREALNPFVSGTRNCIGRNL SYAETRLILARLFYFDLEL  
 ADPDQDWFQAQKAYLVWDAPALNMYLKPVVR

40

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加  
 されたアミノ酸配列からなり、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 ( P 4 5 0 - 1 ) 活性を  
 有するタンパク質。

本発明は更に、第六の態様として、以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子に係る

50

:

( a ) 以下の配列番号 8 に示される塩基配列 ( 1 4 6 1 b p の o p e n r e a d i n g f r a m e を有する ) からなる D N A ( 配列番号 8 )

ATGTCACACTTTCTACCTACATTAATCCTCACCTCTTTAACTTTGGTTGCGTATGTTCTCGCAAGAATGATA  
TATAACGTTTTCTATCATECTCTAAGCGCCTTTCTGGCGATGCTTTCTTTTGTGCCACGGGGCTTACCAAA  
CGGTACCACATGATCGCCGGGGATCTTCAACTCAAAGTCAAAGACATGCACGACAAGTATGGCTCAGTAGTA  
CGAATAGCTCCCACTGAATTGAGCTTTTCTATTGTTCCGCGTGGAAGGACATCTATGGAAGCCGCGGGGGT 10  
CGGAACTATCTAAATTTTACGACTTCTACCGGGTCGACGAAGCGATGCCGCAACACATCATATCGGCGGGA  
AAAGCAAAACACAGTATTCTACGACGTTATTTGGCGCATGGTTTCTCAGAGAACGCCATGAAAGCTCAGGAG  
CCTGTCATTCTTGACCTTGTGAATCTCCTAATGCAGCGTTTGGAGAGAACATGCAGAAGAGGGTGCACGAGTC  
GTGGATGTGAACAAATGGTTCAATTTTGTACCTTCGAAATCATTGGAAAACGACCTTCGGGGCTGATCTT  
GGAACTTAAGGAACCGTACTGGCATCCTTGGGTGAAAGGCAGTGCAAACAACAATATGGTGGTTGGTTTC  
ATGGCGGCCGCAAATAGCGTGGGACTTGGGCCATTATCAAATGGTGCATAAGCAACGAGATCCTTCCGAGA  
CAAAAATATCTTGATGAGCTGGCAGAAATGGTCCAAAAGCGTACGGGGTGACGGTCGAGCGTCCTGACTTC 20  
ATTCAAGGCCTTTTGCCTGACGATGTCCAGCTGTCAAACGGAGAGATCGTTGCAAATGTCGAAGCTCTCATT  
GGAGCAGGATCCGAATCAACAGCGACCTACTGACGGGCACCGTCTGCGCTCTTCTACAGAACCCCGACCAA  
CTGGCGAAGGTGATCGACGAGGTACGGTCAACCTTTGCGACCGAGGACGAAATCACTTTACACTCGGTTCAA  
CGCCTCGACTATATGCTTGCATGCTTGAACGAGACCTTCCGATATTACCCTCCAGTGACGAACGGTATGCCT  
AGGGTTACGCCTAAAGAAGGGGCAATCATAGGCGGACGCTTGGTGCCAGGAAATACAGTTGTCCGATTTGG  
CAATGGGCTATATGCCATGATCCTGCATTATGGAAAGATCCATACACATTCGACCTGAGAGATTTTGGAG 30  
GCCCCAGAGTTCTCAACAGATGTGCGCGAAGCTCTGAATCCATTAGTGTCGGCACGAGGAACTGTATTGGT  
AGAAATCTATCGTATGCTGAAACGCGCCTGATCCTCGCCCGTTTGTGTTTACTACTTCGACTTGGAATTGGCG  
GACCCTGATCAAGACTGGTTCGGAGCTCAGAAGGCTTATCTTGTATGGGACGCACCTGCGTTAAACATGTAT  
CTTAAGCCGGTTGTTTCGATGA ;

( b ) 塩基配列 ( a ) からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
且つ、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 ( P 4 5 0 - 1 ) 活性を有するタンパク質をコー  
ドする D N A 。

更に、本発明は、第七の態様として、以下の ( a ) 又は ( b ) のタンパク質をコードする 40  
遺伝子に係る :

( a ) 以下の配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるトランスポータータンパク質 ( T P )

(配列番号 9)

MHPDQADTAAMQQQTTECSDRSRPEKAEEGHAREHTVTRTCSREPEQTATATKPT  
 GLKLI CLTTAICLTIFLISVDFSILATAIPAITAEFKSVADIGWYGSSYLLTTASSQLLKG  
 CYTVFDLKWTFLLALLTFEVGSIICATAPSSVVLIIGRAIAGCGNAGLLSGALLILTHSV  
 PLEKRPLFMAMTGGTYGVAAGPPLGGVFTDKLSWRWCFWINLPICALTFLVIVFL  
 FKSPPRS GFDGSRSLAKVMRFDVGTLMFMPAII CVLLALQWGGTTHAWNSGIVV  
 ALLVVGVLVIAFGIVQWLMHDDATIPLRI IKKRTIWACAAYQFALGAFFVFIYFLPI  
 WFQGVQGASAIQSGVRTLPMLVGNIVATAVSGVLVTIIGYYAPFMILGTILASVGAGL  
 LLLFTPNVTAASWIGYQAIIVGLGIGFGWQQPFVAVQTVLDIKDVPIATATLSFAQTLGG  
 TLFVSVQAQTAFSTKL TQELVSQVPQLDPASILHEGGAELDKLVPEQYLPDVVLSYNN  
 SLLSAFFVATIMAIMSLVGCTFVEWNSVKGKKADAVPAA

10

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、トランスポーター (TP) 活性を有するタンパク質。本発明は更に、第八の態様として、以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子に係る

20

以下の配列番号 10 に示される塩基配列 (1695 bp の open reading frame を有する) からなる DNA (配列番号 10)

ATGCATCCAGATCAAGCCGACACTGCAGCGATGCAGCAGCAGACAACAACCGAATGCTCGGATCGATCCCGG  
 CCGGAGAAGGCTGAAGAAGGGCATGCTCGCGAGCATAACAGTCACCGGTACATGCTCTCGAGAACCGGAGCAA  
 ACAGCCACAGCGACCAAACCGACTGGCTTGAAACTCATCTGCTTGACGACAGCGATTTGTCTAACTATCTTT  
 CTGATCTCGGTTGACTTCTCGATACTTGCAACGGCCATCCCTGCGATTACAGCCGAGTTCAAGAGTGTGGCA  
 GACATTGGCTGGTATGGAAGTTCTTACTTGCTCACAACCTGCCTCCTCACAGCTTCTCCTCGGGAAGTGTTAC  
 ACCGTGTTGATCTCAAGTGGACCTTTCTGCTTGCTCTACTCACCTTGAAGTCGGGAGTATCATATGTGCA  
 ACTGCACCCAGCTCTGTGCTGCTCATAATTGGCCGCGCTATTGCTGGCTGTGGAATGCCGGGCTCCTGTCA  
 GGAGCCCTGCTCATCCTCACTCATAGCGTACCGCTGGAGAAACGCCCACTTTTCATGGCAATGACTGGCGGT  
 ACCTACGGAGTCGCCGCAATCGCGGACCACCGCTCGGTGGAGTCTTCACTGATAAGCTGTCGTGGCGGTGG  
 TGCTTCTGGATCAATCTTCCATTGGAGCGTTGACATTTTTGGTCATCGTCTTTCTTCAAAGCCCTCCG  
 AGAAGCGGATTTGACGGTTCCCGATCCTGGCTCGCTAAGGTCATGCGTTTTGATCCCGTCGGAACACTCATG  
 TTCATGCCTGCCATCATCTGCGTGCTCCTTGCGCTGCAATGGGAGGTACCACCCACGCTTGAATAGCGGC  
 ATAGTCGTCGCATTGCTGGTTGTTGGAGGTGTACTCGTTATTGCATTTGGCATCGTTCAATGGCTCATGCAT  
 GATGATGCCACTATACCCCTTCGCATCATCAAGAAGCGTACAATTTGGGCATGCGCTGCCTACCAATTTGCA  
 CTCGGTGCTGCCTTTTTTGTCTTTCATCTACTTCCCTTCCCATCTGGTTCCAGGGTGTGCAAGGAGCCAGCGCC

30

40

ATCCAGTCAGGAGTTCGAACACTTCCAATGCTCGTCGGAAACATCGTCGCTACAGCCGTATCTGGCGTCTCTG  
 GTCACCATTATTGGATATTACGCTCCTTTCATGATCCTCGGCACTATCCTCGCATCTGTGGGCGCCGGTCTC  
 CTATTGCTTTTCACCCCTAACGTGACTGCGGCTTCATGGATTGGGTATCAGGCCATAGTCGGCCTGGGTATA  
 GGATTTGGATGGCAGCAACCCTTTGTTGCTGTGCAAACAGTCCTCGATATCAAAGATGTACCGATCGCCACT  
 GCCACTTTGICTTTTCGCCAGACTCTCGGCGGTACTCTTTTCGTCAGCGTTGCGCAGACGGCTTTCTCCACC  
 AAGCTTACACAGGAGCTTGTAAGTCAAGTACCTCAACTGGATCCTGCCTCCATCTTACACGAAGGTGGTGCT  
 GCCGAGCTTGACAAGCTCGTTCCGGAACAATATCTTCCCGACGTTGTTCTGTGCATACAACAATAGCTTGCTT  
 AGCGCTTTCTTTGTTGCTACTATCATGGCGATTATGTCTCTCGTCGGCTGCACCTTCGTGGAATGGAACAGT  
 GTTAAGGGCAAGAAGGCTGATGCCGTGCCAGCTGCTTGA

10

(b) 塩基配列 (a) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、トランスポーター (TP) 活性を有するタンパク質をコードする DNA。  
 更に、本発明は、第九の態様として、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする  
 遺伝子に係る：

(a) 以下の配列番号 11 に示されるアミノ酸配列からなるチトクローム P 450 水酸化  
 酵素 (P 450 - 2)  
 (配列番号 11)

20

MIKHSLSDCCLADPDHLIRIKSYVEANVRFLGLSLVTLVLIQMFRALGSPLRLNKPLV  
 GRRSILEPRWLVLRFRTKGGRELLRQAYKKYKDEIFKVQCNDTEICVLPHPRYVBEELR  
 GLPASKVSSPQALYNKGLGSYTGLEVI VESH LHFQAIQGH LTPNLASALGIVLDELQD  
 ALKTVLPDCSDEWVPPDVHTVLSLVSRVSSRVFGGLELARNQWQIQLSTAYPRNAF  
 ACTMALRMVPRIIRPLLA AVLPTYWRTSNIRDAKRIVGGIITKRRADGATDMSAKE  
 HPCDLLQWMMNAAAGTETHADDLAHRLLFISDASVMTTSLLI SHCLYDLVAHPEAL  
 SCIREBVHNVLREGDNFQKTTLHKMRS LDSALKESQRLNPPFLMTFDRVVREPLLS  
 DGTQIPVGT HLAMP TDAMLQDSSLLPQGGVAPDQFDPFRYARAREDPENAQRFLA  
 TTEAKSLVFGHGKHACPGRFFASSEAKIILSHLLLLYDFRYPEGKGRPESWLFSENYA  
 IDPNARLLIKKRNDAAASNLAMLAKAL

30

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加  
 されたアミノ酸配列からなり、チトクローム P 450 水酸化酵素 (P 450 - 2) 活性を  
 有するタンパク質。

40

本発明は更に、第十の態様として、以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子に係る  
 :

(a) 以下の配列番号 12 に示される塩基配列 (1626 bp の open reading  
 frame を有する) からなる DNA

(配列番号 1 2)

ATGATCAAACACAGCCTTAGCGACTGTCTAGCTGACCCAGATCATCTGATCCGGATCAAGAGCTATGTGGAA  
 GCCAATGTTTCGATTTCTTGGTCTCTCCTTGGTTACCCTCCTTGTACCATCCAGATGTTTCGCGCCCTCGGC  
 TCGCCCTTGCCTCAACAAACCGTTGGTTGGACGTCGGTCGATCCTCGAACCGAGATGGTTGGTGGGACTG  
 CGTTTCACAAAGGGCGGCCGGGAGTTACTTCGCCAGGCATACAAAAAGTACAAAGATGAGATTTTCAAAGTA  
 CAATGCAATGACACTGAAATTTGTGTTCTTCCGCATAGATATGTGGAAGAGCTCCGCGGCTTGCCTGCAAGC  
 AAAGTGAGCTCTCCTCAGGCTCTCTATAACAAAGGCTTGGGAAGCTACACCGGTCTCGAGGTCATCGTGGAA  
 AGTCACCTTCACTTTCAGGCAATACAAGGCCACCTGACACCGAATCTCGCTTCGGCTCTTGGAAATTGTCTG  
 GACGAGTTGCAAGACGCATTGAAAACAGTCTGCGGATTGTTTCAGATGAATGGGTTCCATTTGACGTACAC  
 ACAGTACTTTCTGAATTAGTCAGTCGCCTCTCCTCGCGTGTCTTTGGAGGTCTCGAGCTTGTCTCGAAACCAA  
 CAATGGATACAACTGAGTACTGCTTATCCTAGGAACGCATTGCGCTGCACCATGGCTTTGCGCATGGTTCTT  
 CGTATCATTGCCCCACTCTTAGCTGCAGTCCTGCCTACTTACTGGCGTACGCGCAGCAACATAAGGGATGCC  
 AAACGCATTGTTGGTGGGATTATCACCAAGCGGCGTGCAGGATGAAGGAGCAACAGATATGAGCGCGAAAGAA  
 CATCCCTGTGATTTGCTGCAATGGATGATGAATGCCGCGGCAGGTACGGAAACCCACGCAGATGATTTAGCT  
 CACCGATTACTTTTCATCAGCGATGCTTCGGTCATGACCACGAGCCTGTTGATTTCCCATTTGCTTTACGAC  
 CTGGTCGCCCATCCCGAAGCTCTTTCATGCATTGCGGAGGAAGTACACAATGTCTTGC CGAAGGCGACAAC  
 TTTCAGAAAACCACTTCAAGATGCGCAGTTTGGATAGTGCTTTGAAGGAATCCAGAGGTTAAACCCA  
 CCATTCTTGATGACATTCGATCGCGTTGTGCGGGAGCCACTTCTTCTGTCCGATGGAACGCAAATCCCTGTA  
 GGGACGCATCTCGCTATGCCTACAGATGCAATGCTACAAGACTCAAGCCTCCTGCCTCAAGGCGGAGTTGCC  
 CCAGACCAATTGATCCGTTTCGTTATGCGCGGGCGCGCAAGATCCAGAAAATGCACAGCGCTTTCAATTG  
 GCTACAACGGAGGCAAAGAGCTTGGTATTTGGACATGGAAGCATGCATGCCCTGGTCGCTTCTTTGCTAGC  
 AGCGAGGCTAAGATAATCTTGAGTCACCTGTTACTTTTGTACGATTTTTCGGTATCCTGAGGGCAAGGGTCGT  
 CCCGAAAGTTGGCTCTTCTCGGAGAATGTTGCCATCGATCCTAATGCCAGATTGTTAATCAAGAAGCGAAAT  
 GACGCTGCAAGTAACCTAGCGATGCTAGCCAAGGCTTTGTAG ;

10

20

30

40

( b ) 塩基配列 ( a ) からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
 且つ、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素 ( P 4 5 0 - 2 ) 活性を有するタンパク質をコー  
 ドする DNA 。

本発明は又、以上のいずれかの DNA 及び遺伝子から成る群から選択される 2 以上の DNA  
 A 及び / 又は遺伝子を含むアフィニコリン合成遺伝子クラスタに係る。

本発明は、更に、これら遺伝子又は DNA にコードされる、アフィニコラン - 1 6 -  
 オール合成酵素、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素、チトクローム P 4 5 0 水酸化酵素  
 ( P 4 5 0 - 1 )、トランスポータータンパク質 ( TP ) 及びチトクローム P 4 5 0 水酸化  
 酵素 ( P 4 5 0 - 2 ) に係る。

発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子から推定されるアフィニコラン - 1 6 - オール合成酵素産物は、配列  
 番号 1 に示される 9 4 4 個のアミノ酸からなる蛋白質 ( 推定分子量 1 0 6 5 8 0 ) である

。

50

本明細書において、「アフィディコラン - 16 - オール合成酵素」とは、アフィディコラン - 16 - オール合成酵素活性を有するタンパク質を含み、「アフィディコラン - 16 - オール合成酵素活性」とは、本明細書中、以下に示したような酵素反応系において、基質であるゲラニルゲラニルニリン酸を実質的に環化することのできる活性、即ち、かかる反応系において該基質から有意な量のアフィディコラン - 16 - オール ( a p h i d i c o l a n - 16 - o l ) を合成することのできる活性を意味する。

尚、本発明のアフィディコラン - 16 - オール合成酵素はN末端側、C末端側と二つの機能の異なるドメインに分かれており、基質認識部位として前者はD X D D、後者はD E X X Eというモチーフを有する。両末端のアミノ酸残基の欠失は40個以内が許容でこれ以上の欠失は一方の活性を失うことがわかっている。置換に関しては上記モチーフが失われられない限り、かなり許容するものと思われる。類似酵素の詳細な実験データから前者はゲラニルゲラニルニリン酸から遊離しない中間体 s y n - コパリルニリン酸への環化を、後者は s y n - コパリルニリン酸からアフィディコラン - 16 - オール ( a p h i d i c o l a n - 16 - o l ) への環化を触媒するものと予想される。

従って、本発明の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる酵素をコードする遺伝子における1若しくは数個のアミノ酸の欠失又は置換は、ゲラニルゲラニルニリン酸を基質とする環化活性を有する上で、該アミノ酸配列のN末端及び/又はC末端から40個以内のアミノ酸残基に起こることが好ましい。

本発明の酵素のゲラニルゲラニルニリン酸を基質とする環化活性、又は、アフィディコラン - 16 - オール ( a p h i d i c o l a n - 16 - o l ) の合成活性を測定する反応系は、例えば、以下の条件で行うことができる。

即ち、部分精製酵素 ( 985  $\mu$ l、酵素濃度 10 - 1000 ng / ml )、1 M 塩化マグネシウム ( 5  $\mu$ l、最終濃度 5 mM )、ゲラニルゲラニルニリン酸 ( 10  $\mu$ l、1 mg / ml、シグマ社製 ) 30 にて12時間反応を行なうことができる。この後、反応液にヘキサン 1 ml を加え、抽出した後、窒素気流下溶媒を溜去する。これにヘキサン 100  $\mu$ l を加え溶解し、1  $\mu$ l を GC - MS 分析に供する。

GC - MS 分析は、Thermo Quest GC Q 装置にキャピラリーカラム DB - 1 ( J & W Scientific 社、内径 0.25 mm、長さ 30 m ) を用いて以下の条件で測定を行なう。スプリットレスモード、初期温度 100 ( 保持時間 2 分 )、昇温設定 5 / min、最終温度 280 ( 保持時間 2 分 )、ヘリウムガス流量 1 ml / min。マス測定条件：スキャン 1 秒 / スキャン、ソース温度 200、トランスファーライン温度 275、フルスキャンモード 40 - 450。酵素反応生成物保持時間：26分30秒。

本明細書において、「ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素」とは、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性を有するタンパク質を含み、「ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性」とは、本明細書中、基質であるジメチルアリルニリン酸あるいはファルネシルニリン酸とイソペンテニルニリン酸から有意な量のゲラニルゲラニルニリン酸を合成することのできる活性を意味する。

本明細書において、「チトクローム P 450 水酸化酵素 ( P 450 - 1 )」及び「チトクローム P 450 水酸化酵素 ( P 450 - 2 )」とは、チトクローム P 450 水酸化酵素活性を有するタンパク質を含み、「チトクローム P 450 水酸化酵素活性」とは、本明細書中、3位、17位および18位に水酸基を導入することのできる活性を意味する。

本明細書において、「トランスポータータンパク質 ( TP )」とは、トランスポーター ( TP ) 活性を有するタンパク質を含み、「トランスポーター ( TP ) 活性」とは、本明細書中、アフィディコリンを菌体外に排出することのできる活性を意味する。

アフィディコラン - 16 - オール合成酵素をコードする遺伝子又は DNA は以下の実施例に示すように、糸状菌由来の mRNA をテンプレートとした RT - PCR 等の方法によりクローニングし、その塩基配列を決定することによって調製することができる。かかる糸状菌の例としては、Phoma betae、Cephalosporium aphidicola ( Verticillium lecanii )、Nigrospora

10

20

30

40

50

sphaerica (Nigrospora oryzae)、Herziella entomophilla等を挙げることができる。

この中で、例えば、糸状菌Phoma betaeは、日本甜菜製糖(株)総合研究所(登録番号:PH-27)、及びAmerican Type Culture Collection(ATCC)(登録番号:6504、24635)等から入手することが出来る。

更に、こうして得られるアフィディコラン-16-オール合成酵素(アフィディコリン生合成中間体合成酵素(ACS)遺伝子)の配列をもとに染色体歩行を行なった結果得られた塩基配列をもとにデータベース上相同性検索を行ない、ACS遺伝子の上流にGGDP合成酵素遺伝子を、下流側に水酸化酵素(P450-1)、耐性(トランスポーター) 10

、水酸化酵素(P450-2)の各遺伝子を見出すことに成功した。  
或いは、本明細書で開示された配列情報に基づいて、当該技術分野における周知手段を用いた化学合成等によっても調製することが可能である。当業者であれば、特定のアミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加することも、当該技術分野における周知手段を用いて容易に実施することができる。

本明細書において、特定の遺伝子又はDNAは、当業者に周知の緩衝液中で、適当な温度及び塩濃度等の諸条件下のストリンジェントな条件でハイブリダイズさせることができる。

このようなストリンジェントな条件下で本発明の遺伝子又はDNAとハイブリダイズし、且つ、本発明の各酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAの例として、例えば、 20  
かかる遺伝子と相同性が70%以上、好ましくは90%以上であるようなDNAを挙げることができる。

本発明の遺伝子、DNA、又はアフィディコリン生合成遺伝子クラスタに、遺伝子組換え操作において当業者に公知である様々な配列、例えば、プロモーター及びエンハンサーなどの調節因子、制限酵素部位、並びに選択マーカー(マーカー酵素等)遺伝子等が適宜結合されたDNA分子も本発明の範囲である。

更に、本発明の遺伝子、DNA、アフィディコリン生合成遺伝子クラスタ又は上記DNA分子を含有する組換えベクター等の発現ベクター、及び該発現ベクターを含みそれによって形質転換された大腸菌等の細菌、真核細胞等の形質転換体は、当該技術分野における公知の手段によって、容易に調製することができる。 30

本発明の各酵素及びアフィディコリンは、上記の発現ベクター及び形質転換体等を培養し、その後、当該技術分野における公知手段を用いて回収及び精製等の操作を施すことによって、容易に製造することができる。

従って、以上に記載した、発現ベクター、形質転換体、及び本発明酵素及びアフィディコリンの製造方法も本発明に含まれる。

#### 実施例

以下に実施例に即して本発明を詳述するが、これら実施例は本発明の技術的範囲を如何なる意味でも何ら限定するものではない。

##### 実施例 1

以下に記載するように、アフィディコリン生合成中間体合成酵素遺伝子のcDNAをグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパクとして大腸菌で発現させ、実際に生合成中間体であるアフィディコラン-16-オール(aphidicolan-16-ol)の製造を確認した。 40

唯一知られていたカビのジテルペン環化酵素のアミノ酸配列に基づき、縮重プライマー(1:5'-GCITAG(T/C)GAG(T/C)ACIGCITGGGT-3'(配列番号3);2:5'-(A/G)AAIGCCATIGCIGT(A/G)TC(A/G)-TC-3'(配列番号4))を設計し、糸状菌Phoma betaeの菌体から抽出したmRNAをテンプレートとしてRT-PCRを行った。増幅された約1.1kbのDNA断片を基に3'-RACEおよび5'-RACE法を用いてcDNA全長の解析を行った。

10

20

30

40

50

ここで、RT-PCRからシーケンスまでの一連の遺伝子クローニングは全て、例えば、以下の引用文献に記載されているような、当業者に周知の一般的な方法を用いた。

Frohman, M. A., Dush, M. K., & Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(23), 8998-9002 (RACE法の文献)。Tabor, S., Struhl, K., Scharf, S. J., and Gelfand, D. H. (1991) in Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds), John Wiley & Sons, New York、あるいは Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

こうして得られた2.8 kbのORF全長をプラスミドpGEXに組み込み、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換菌は0.1%グルコースおよびAmpicillin(最終濃度100 µg/ml)添加LB培地(2.5 ml)を用いて30、12時間、2000 rpmにて攪拌下前培養を行った。これをAmpicillin(最終濃度100 µg/ml)添加2YT培地(500 ml)に移し、30、3時間、2000 rpmにて攪拌下培養を行った。培養液を氷上に30分放置した後、終濃度0.5 mMとなるようIPTG添加し、18、20時間、2000 rpmにて攪拌下培養を行った。培養液を4、30分間遠心(3000 rpm)し、上澄を捨て菌体を溶菌緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol) 60 mlに懸濁した。懸濁液を凍結させ、再溶解した後10分間超音波破碎を行った。得られた懸濁液を4、15分間遠心(12000 rpm)した。上澄に終濃度0.1 MとなるようにNaClを加えた後、あらかじめ緩衝液にて平衡化しておいたSepharose 4B glutathione affinity resin (Amersham Pharmacia) 3 mlを添加した。15、30分間攪拌して吸着させ、遠心後上澄を捨てる。1 mM濃度の還元型グルタチオンを添加した緩衝液を加え溶出した。必要に応じ、透析、限外ろ過により緩衝液交換および濃縮を行った。

こうして調製した酵素液を用いて、既に記載した反応条件下で、ゲラニルゲラニルニリン酸を基質として酵素反応を行ったところ、ガスクロマトグラフィー分析において合成により調製したアフィディコラン-16-オール(aphidicolan-16-ol)と同一の保持時間を有するピークを検出した。またこのピーク成分のマススペクトルは合成品のそれと完全に一致したことより、今回発現した酵素はアフィディコラン-16-オール合成酵素(ACS)であることを確認した。

## 実施例 2

アフィディコリン生産菌 *Phoma betae* の菌体から抽出したゲノムDNAを8種の制限酵素により切断した後、市販キット付属アダプター(GTAATACGACTCACTAATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT)をライゲーションした。このゲノムDNA断片をテンプレートにして、実施例1で得られたアフィディコラン-16-オール合成酵素遺伝子の塩基配列に基づき、プライマー(5'側 1. CCAACAGGGAATGTAGCGCAGAGGTTGCGA / 2. GTCACGCGATCGTGTTCAGAACTCCGTCG、3'側 1. CAAGCTATCGCAGTCAAGCTCTACCGTTGGG / 2. GTCGCATGTACAACGACATCGGCTCGTGG)を作成し、アダプタープライマー(1. GTAATACGACTCACTAATAGGGC / 2. ACTAATAGGGCACGCGTGGT)との間

で実施例 1 と同様の条件下で P C R を行った。

実際には、上記の 5' 側プライマー 1 とアダプタープライマー 1 との間で 1 回行った後、この反応液の一部を使って、5' 側プライマー 2 とアダプタープライマー 2 との間でもう 1 回 P C R を行うという手法を取った。2 段階の P C R によって得られた増幅断片の塩基配列を決定した。

A C S 遺伝子の上流および下流側の配列をこの手法を繰り返すことにより解析し、全長 15 k b からなる遺伝子クラスターの配列を得た。次いで解析された配列から以下に示した各種プライマーを設計し、同菌の m R N A をテンプレートとして実施例 1 と同様の条件下で 3' - R A C E および 5' - R A C E 法を用いて各 c D N A 全長の解析を行った。これにより G G D P 合成酵素 ( 3 4 3 a a )、P 4 5 0 - 1 ( 4 8 6 a a )、トランスポーター ( 5 6 4 a a )、及び P 4 5 0 - 2 ( 5 4 1 a a ) の各配列が明らかになった。

( 1 ) ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 :

5' 側 : GTCAACTTTGACCACTGGAC/CAGGATGAGGAAGGCCGAGT ;

3' 側 : AGATCAAGTATTCCTTTTCC/AGCCGAAACAGCCCGCCTGT/GGCTTGGCTGCAATATAATC ;

( 2 ) P 4 5 0 - 1 :

5' 側 : TCTCGCAAGAATGATATATA/GCCTCGACTATATGCTTGCATGCTT ;

3' 側 : CAGGTGCGTCCCATAACAAGA/CGGTGCGAAAGGTTGACCGTACCTC/TAGATAGTTCGCGACCC

CCGCGGCT ;

( 3 ) T P :

5' 側 : GACATTGGCTGGTATGGAAG ;

3' 側 : AGAGTACCGCCGAGAGTCTG ;

( 4 ) P 4 5 0 - 2 :

5' 側 : GGTGGTGGGACTGCGTTTC/TCCTCGCGTGTCTTTGGAGG/AGATGCGCAGTTTGGATAGT ;

3' 側 : TTCTGATTAACAATCTGGC/GGATGGGCGACCAGGTCGTA/GAAGCGAGATTCGGTGTCAG/G

TCCCTACAGGGATTGCGT。

#### 産業上の利用可能性

本発明によって、アフィディコリン生合成に必要なすべての酵素をコードする遺伝子を見いだすことができたので、これら生合成遺伝子を培養法の確立した異種微生物により発現することで、アフィディコリンの大量生産が可能になる。更に、本発明によってこの有用な薬剤の大量供給に道を開くことになる。

【配列表】

10

20

30

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Aphidicolin biosynthetic gene cluster

<130> JA900989

10

<150> JP2001-188465

<151> 2001-06-21

<160> 38

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 944

<212> PRT

<213> Phoma betae

30

<400> 1

Met Val Pro Ile Ser Thr Arg Ser Glu Val Gln Asp Gly Leu Ile Ala

1

5

10

15

Gln Ala Arg Ser Leu Ile Thr Arg Ile Val His Asn Ser Asp Asp Val

20

25

30

40

Tyr Gly Phe Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Tyr Asp Thr Ala Trp Val

35

40

45

Ala Leu Val Thr Lys His Val Asn Gly Ile Lys His Trp Leu Phe Pro

50

55

60

Glu Ser Phe His Tyr Ile Leu Ala Ser Gln Cys Asp Asp Gly Thr Trp

65

70

75

80

10

Cys Glu Asp Lys Thr Ala Gln Phe Asp Gly Val Leu Asn Thr Ile Ala

85

90

95

Gly Leu Leu Val Leu Lys Arg Tyr Arg Arg Asp Pro Leu Gln Leu Lys

100

105

110

20

Val Asp Asn Arg Asp Leu Asp Ser Arg Ile Lys Leu Ala Thr Ser Ala

115

120

125

Leu His Ser Leu Leu Glu Glu Trp Asp Val Ser Thr Thr Asn Asn Val

130

135

140

30

Gly Phe Glu Ile Ile Val Pro Thr Met Leu Asp Leu Leu Val Gln Glu

145

150

155

160

Asp Pro Ser Leu Ser Phe Glu Leu Lys Gly Arg Glu Ala Leu Thr Glu

165

170

175

40

Ile Arg Glu Ala Lys Met Asn Arg Phe Gln Pro Glu Leu Leu Tyr Gln

180

185

190

Gly Lys Leu Met Thr Leu Thr His Ser Leu Glu Ala Leu Leu Gly Arg

195

200

205

Ile Asp Tyr Asp Asn Val Ala Arg Tyr Thr Val Lys Gly Ser Met Phe

210

215

220

Ala Ser Pro Ser Ser Thr Ala Ala Tyr Leu Met Ser Ala Ser Thr Trp

225

230

235

240

10

Asp Asp Glu Ala Glu Thr Tyr Leu Arg Tyr Thr Ile Thr Ala Ser Thr

245

250

255

Gly Lys Gly Ser Gly Gly Val Pro Gly Val Phe Pro Thr Thr Tyr Phe

260

265

270

20

Glu Tyr Thr Trp Ile Leu Ser Thr Leu Phe Arg Ala Gly Phe Gln Ser

275

280

285

Ser Glu Leu Asp Ser Pro Glu Leu Thr Ala Met Thr Asp Thr Leu Leu

290

295

300

30

Lys Ala Phe Lys Ala Phe Ser Gly Ala Ile Gly Leu Asp Ser Gly Ile

305

310

315

320

Glu Pro Asp Val Asp Asp Ser Ala Lys Ile Val Thr Thr Leu Asn Met

325

330

335

40

340	345	350	
Glu Thr His Phe Arg Val Tyr Pro Arg Glu Arg Asp Pro Ser Phe Ser			
355	360	365	
Ala Asn Cys Asn Ala Leu Ala Ala Phe Leu His Gln Pro Asp Val Glu			10
370	375	380	
Val Tyr Ser Ser Gln Ile Leu Lys Ala Ala Ser Tyr Leu Cys Glu Arg			
385	390	395	400
Met Trp Asn Ala Asp Glu Lys Ile Asp Asp Lys Trp Asn Lys Ser His			20
405	410	415	
Leu Tyr Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Gln Val Met Thr Asp Leu Met Ala			
420	425	430	
Ile Thr Glu Ala Gly Arg Leu Asp Gly Val Phe Thr Arg Glu Leu Leu			30
435	440	445	
Thr Arg Val Cys Val Thr Ile Phe Gln Ser Cys Leu Arg Ala Met Leu			
450	455	460	
Lys Gln Ser His Asp Gly Ser Trp Asn Gln Ser Leu Glu Glu Thr Ala			40
465	470	475	480
Tyr Ala Ile Leu His Leu Thr Glu Ala Arg Arg Leu Cys Phe Phe Glu			
485	490	495	

Gln Ile Ser Glu Pro Leu Glu Asn Ser Ile Tyr Arg Gly Ile Thr Phe	
500	505 510
Leu Thr Thr Ile Asp Lys Pro Pro Met Glu Tyr Leu Trp Ser Asp Lys	
515	520 525
Val Ser Tyr Gly Ser Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Tyr Val Leu Ala Ala	10
530	535 540
Arg Arg Ala Ala Glu Ser Thr Ser Val Thr Asn Leu Val Gly Ser Ser	
545	550 555 560
Ile Trp Lys Asp Asn Ala Ser Thr Lys Met His Lys Leu Val Gly Leu	20
565	570 575
Phe His Arg Thr Pro Leu Leu Lys Ala Leu Pro Lys Trp Glu Leu Gln	
580	585 590
Ala Ser Met Ile Glu Ala Ser Ile Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Asp Ala	30
595	600 605
Arg Leu Glu Val Leu Gln Arg Pro Lys Val Asp Gly Gly Glu Tyr Leu	
610	615 620
Ser Ile Ile Pro Phe Thr Trp Thr Ser Cys Ser Asn Ser Ala Arg Thr	40
625	630 635 640
Asn Ala Ser Ala Ser His Leu Trp Glu Leu Met Ala Leu Ser Phe Phe	
645	650 655

Thr Tyr Gln Val Asp Glu Phe Met Glu Ala Val Ala Gly Pro Ala Phe  
                   660                  665                  670

Lys Gly Arg Met Thr His Leu His Ala Ile Ile Asp Glu Ala Val His  
                   675                  680                  685

Cys Ser Gln Asn Arg Glu Arg Thr Pro Gly Glu Cys Glu Asn Thr Asn  
                   690                  695                  700

His Val Thr Ser Glu Leu Leu Gln Ala Val Arg Phe Ile Leu Asp Asn  
 705                  710                  715                  720

Pro Thr Val Arg Lys Ala Ser Pro Tyr Asp Arg Asn Thr Leu Leu Gln  
                   725                  730                  735

Glu Leu Arg Ile Phe Leu His Ala His Val Thr Gln Val Glu Asp Asn  
                   740                  745                  750

Ala Ser Phe Gly Arg Glu Arg Leu Thr Gly Asp Lys Ala Leu Thr Ser  
                   755                  760                  765

Tyr Arg Ser Gln Leu Tyr Arg Trp Val His Thr Ile Ser Ser Asp His  
                   770                  775                  780

Ile Ala Gly Pro Phe Cys Phe Tyr Tyr Ala Thr Cys Leu Leu Gly Ala  
 785                  790                  795                  800

Thr Leu Thr Ala His Pro Pro Asn Asp Cys Phe Pro Lys Ser Ser Gln

10

20

30

40

	805	810	815	
Lys Tyr Leu Ala Ala Ala Thr Cys Arg His Leu Ser Cys Met Cys Arg				
	820	825	830	
Met Tyr Asn Asp Ile Gly Ser Trp Asn Arg Asp His Arg Glu Gly Asn				10
	835	840	845	
Leu Asn Cys Leu His Phe Pro Glu Phe Ser Glu Thr Thr Ser Asp Asp				
	850	855	860	
Ala Glu Arg Lys Ala Ser Leu Leu Thr Leu Ala Gln Tyr Glu Arg Lys				20
	865	870	875	
Gln Trp Cys Asn Ala Leu Gln Gln Leu Glu Lys Glu Met Val His Gly				
	885	890	895	
Ala Ser Glu Pro Ala Ala Ala Arg Leu Ala Lys Arg Arg Ala Cys Leu				30
	900	905	910	
Ile Asp Met Phe Cys Lys Val Thr Asp Leu Tyr Gly Gln Ile Tyr Val				
	915	920	925	
Leu Arg Asp Val Ser Ser Val Ile Lys Asp Val Val Arg Asn Gly Glu				40
	930	935	940	

<210> 2

<211> 2835

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phoma betae

&lt;400&gt; 2

atggitccaa tticgactcg tticagaagtc caggatggct taatcgccca agccagatcc 60  
 ttgatcacac ggatcgtcca caactceggac gacgtttacg ggtttiggaac actaagttgc 120  
 accgtctatg atactgcttg ggiggctttg gttacgaaac atgtcaatgg tatcaagcat 180  
 tggctgtttc ctgaaagctt ccattacatt ctccgctcac agtgcgacga tgggacttgg 240  
 tgcgaggaca aaacagcaca gticgacgga gttctgaaca cgatcgctgg actgcttgtc 300  
 ctaaaacggc acaggagaga cctcttcaa ctaaaagttg acaacagaga tctcgattct 360  
 cgtatcaaac tcgcaacctc tgcgctacat tccctgttgg aagagiggga cgittcgaca 420  
 acgaacaalg ttggcttga gatcatcgtc ceaaceatgc tggacctgtt agtccaagaa 480  
 gatccaacac tctccttcca gctcaagggt cgigaagcat tgacagagat acgggaggct 540  
 aagatgaatc gattccagcc agaacttcta taccaaggaa aattgatgac cttgacccac 600  
 tcccttgaag catlgttgg cagaatagac tacgacaatg ttgctcgata tacagttaaa 660  
 ggctccatgt ttgctcacc tteatccag geggcttatt tgatgagtgc gcttacctgg 720  
 gatgacgagg ccgagactta cctacggtae accatcactg catcgacggg gaagggaagc 780  
 ggtgggtgtc ctggcgtctt cctaccaca tactttgagt acacatggat tttgtctaca 840  
 ctgttctgag cgggallcca atctcagaa ctgactctc ccgaactgac cgcaatgacc 900  
 galacactgc tcaaagcttt caaggeatc agcgggtgca tccggctaga ttccgggatc 960  
 gagccagatg ttgatgacag tgctaaaatt gtcactacac tcaacatgct gggtlaagccg 1020  
 gctcatgcac ggtacttatg tgataacttt gaggttgaga cccattttcg cgtatacccg 1080  
 agggaaagag acccaagctt tagcgccaac tgtaacgcgc ttgctgcatt cttacatcaa 1140  
 cctgacgttg aggtgtactc atcacagata ctcaaggcag caagctatit atgtgagagg 1200  
 atgtggaacg cagacgagaa gatcgacgac aaatggaaca agagccacct ctattcaagc 1260  
 ttctctaca ctgaggtaat gacggacctg atggcaatca ctgaggctgg aagactagat 1320  
 ggltgttlla ccagagagct ctgaccaga gtctgtgtga ccatctttca aagttgcctg 1380  
 agggcaatgt tgaagcagtc acatgatggg tcatggaacc aatctttaga ggagacagcc 1440  
 tacgcatctt tgcactgac ggaagcacgc cggctctgct tctttgagca aatttcggag 1500

10

20

30

40

cca11ggaga ac1cca1cta tegt1ggaata acatt1ctta caaccattga caagccacca 1560  
 atggag1atc tc1ggtctga caagg1cagc tacggctcag cclatc1ggc agagacata1 1620  
 g1ct1tagctg cccgaagggc agcagaatcc acc1cag1ca ccaatcttgi cgg1tccagc 1680  
 atc1ggaagg acaacgcttc gacgaagatg cacaaactcg ttggactt1t1 tcaccggaca 1740  
 cccctcctca aagcacttcc taaatgggag ctccaagctt ccatgataga agcttccatc 1800  
 tatcaaggcc ttc1gcagga tgcacgatta gaagtactge agagacccaa ggtagatgga 1860  
 ggcgag1atc t1tccalcat tcc1ttcacc tggacaagct gtagcaacag tgc1cgtaca 1920 10  
 aatgct1ctg catctcatt1 atgggag1tg atggct1t1gt cattctt1ac atatcaggtg 1980  
 gacgag1tca tggaa1ccgt cgcaggacca gcattca1ag gacggatgac gcatcttcat 2040  
 gcaatcatcg acgaagccgt acattgttcg cagaaccggg aaagaacacc aggagag1gt 2100  
 gaaa1acca atcacgtcac t1ccgagctt ctgcaagcag t1cgc1tcat actagacaac 2160  
 cctaccgtcc g1aaagccag cccgtatgac cgcaacactt tgitacagga gttacgaatc 2220  
 t1cc1tcag cacatg1aac acaag1tgag gataacgcca gct1t1ggaag agagaggt1g 2280 20  
 acaggcgaca aggccct1ac aagctategc ag1cagctct accg1tgggt gcacaccata 2340  
 teatccgacc atattgccgg gcc1t1t1tgc t1ctat1atg caacctgctt gttgggagct 2400  
 acctgacag cacacectcc gaacgactgc t1t1cccaagt catcgcaaaa g1atctggca 2460  
 gcagcgacat gtcgacactt gtcc1gtatg tgtcgcatgt acaacgacat cggctcgtgg 2520  
 aatcgagatc accgcgaggc caatctcaac tgccttcact tccctgaatt cagcgaaacg 2580  
 acctcggacg atgctgaaag aaagcttct ctacttactc tgcctcagta cgagcgaaag 2640  
 caatgg1gca atgcactaca gcagct1gag aaagaaatgg tacacggggc atcggagcct 2700 30  
 gctgcagcga ggctcgcgaa gcgtcgcgca tgtctgatag acatgt1t1t1g caaagtgacg 2760  
 gatctctatg gacagatcta tgitctccgc galgt1t1cct ccgtcatcaa gga1gt1g1t 2820  
 cggaacgggg aatag 2835

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: degenerate primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (3). (12). (15)

<223> All of 'n' means i(inocine).

10

<400> 3

gcntaygaya cngcntgggt

20

<210> 4

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: degenerate primer

30

<220>

<221> primer\_bind

<222> (4). (10). (13)

<223> All of 'n' means i(inocine).

40

<400> 4

raangccatn gcngtrtert c

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 343

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phoma betae

&lt;400&gt; 5

Met Ala Tyr Thr Val Glu Pro Arg Glu His Ser Lys Asn Thr Thr Leu

10

1 5 10 15

Pro Thr Val Ala Met Pro Pro Ser Pro Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser

20 25 30

Phe Gly Pro Phe Arg Tyr Asp Thr Lys Glu Val Asn Phe Asp His Trp

20

35 40 45

Thr Ser Thr Lys Glu Lys Val Val Thr Gly Pro Tyr Asp Tyr Ile Ala

50 55 60

Ala Lys Pro Gly Lys Glu Val Arg Thr Leu Leu Leu Ala Cys Phe Asp

30

65 70 75 80

Glu Trp Leu Gln Val Pro Pro Glu Ser Leu Glu Val Ile Gly Gln Val

85 90 95

Val Arg Met Leu His Thr Ala Ser Leu Leu Ile Asp Asp Ile Gln Asp

40

100 105 110

Asn Ser Glu Leu Arg Arg Gly Lys Pro Val Ala Gln Asn Ile Phe Gly

115	120	125	
Thr Ala Leu Thr Ile Asn Ser Ala Asn Tyr Val Tyr Phe Leu Ala Leu			
130	135	140	
Glu Lys Leu Asn Ser Leu Lys Asn Pro Asn Ile Thr Asp Ile Phe Thr			10
145	150	155	160
Glu Glu Leu Leu Arg Leu His Arg Gly Gln Ala Met Asp Leu Tyr Trp			
	165	170	175
Arg Asp Thr Leu Thr Cys Pro Thr Glu Glu Glu Tyr Phe Glu Met Val			
	180	185	190
Ala Asn Lys Thr Gly Gly Leu Phe Arg Leu Met Tyr Arg Met Met Lys			
	195	200	205
Ala Glu Ser Ser Met Pro Ile Asp Leu Leu Pro Val Val Glu Leu Leu			
	210	215	220
Gly Val Ile Phe Gln Val Val Asp Asp Tyr Lys Asn Leu Cys Ser Arg			
	225	230	235
Glu Tyr Gly Lys Leu Lys Gly Phe Gly Glu Asp Leu Thr Glu Gly Lys			
	245	250	255
Phe Ser Phe Pro Val Ile His Ser Ile Arg Ser Asn Pro Glu Asp Leu			
	260	265	270
			40

Gln Leu Leu His Val Leu Gln Gln Lys Ser Ser Asn Glu His Val Lys  
 275 280 285

Leu Tyr Ala Ile Glu Ile Met Glu Ser Thr Gly Ser Leu Glu Tyr Thr  
 290 295 300

Lys His Val Val Glu Asn Ile Val Ser Gln Ile Gln Glu Ile Ile Tyr  
 305 310 315 320

10

Ser Thr Asp Glu Gly Gln Gly Arg Gly Lys Gly Ile Leu Asp Leu Leu  
 325 330 335

His Lys Ile Thr Arg Leu Ser  
 340

20

<210> 6

<211> 1032

<212> DNA

30

<213> Phoma betae

<400> 6

aiggcatata cggtcgaacc cagagaacat tctaagaaca ccaccctccc aacggttgcc 60  
 atgceccctt ctcctccaag tagcttctcc gcaccccttg gicctticeg ctacgatacg 120  
 aaggaagtca acttiggacca ctggacctcg acaaaagaga aagtggigac tggcccgtac 180  
 gattatattg cagccaagcc cggaaaggaa gtacgtacgc tactcctggc atgtttcgac 240  
 gaatggctcc aagtgccacc agagictctg gaggttatig gccaggttgi tgcgatgcta 300  
 catacggcct egctactcat cgacgacatc caggacaait cagagttacg acgaggcaaa 360  
 cctgttgcac aaaacatctt cggcacagca ttgacatca actcagcgaa ctatgcttac 420

40

ticcctcgcat tggaaaagct caactctctg aagaatecga atattaccga tatatttacc 480  
 gaagaactgc ttgcctaca cggaggccaa gctatggatc tgiactggag ggacacactg 540  
 accigcccaa cigaagagga atacittgaa atggctgcaa acaagacagg cgggcigtit 600  
 cggctgaigt acaggatgat gaaggcggag tcatcaatgc ccattgacct ccttcccgtg 660  
 gggagctcc tiggcgtaat ctitcaagta gggatgatt acaagaacct gtgcagtcgg 720  
 gaatacggca agctgaaggg ttttggggag gacctgactg aaggcaagtt ctccittcca 780  
 glaattcaat gtatcaggtc caatcccag gactiacaac ttctgcacgt tcigcaacag 840  
 aagtcctcca acgaacatgt caaactttat gctatcгаа tcatggagag cacggggagc 900  
 ctigaataa caaagcatgt tgttggaaaac atagiatctc agatacaaga gattatctac 960  
 tcgaccgatg agggctcaagg aaggggaaaa ggaatacttg aictactgca taagattact 1020  
 aggcigtcgt aa 1032

10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 486

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phoma betae

20

&lt;400&gt; 7

Met Ser His Phe Leu Pro Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Thr Leu Val  
 1 5 10 15

30

Ala Tyr Val Leu Ala Arg Met Ile Tyr Asn Val Phe Tyr His Pro Leu  
 20 25 30

Ser Ala Phe Pro Gly Asp Ala Phe Phe Cys Ala Thr Gly Leu Thr Lys  
 35 40 45

40

Ala Tyr His Met Ile Ala Gly Asp Leu Gln Leu Lys Val Lys Asp Met

50	55	60	
His Asp Lys Tyr Gly Ser Val Val Arg Ile Ala Pro Thr Glu Leu Ser			
65	70	75	80
Phe Ser Tyr Cys Ser Ala Trp Lys Asp Ile Tyr Gly Ser Arg Gly Gly			10
	85	90	95
Arg Glu Leu Ser Lys Phe Tyr Asp Phe Tyr Arg Val Asp Glu Ala Met			
	100	105	110
Pro Gln His Ile Ile Ser Ala Gly Lys Ala Lys His Ser Ile Leu Arg			20
	115	120	125
Arg Tyr Leu Ala His Gly Phe Ser Glu Asn Ala Met Lys Ala Gln Glu			
	130	135	140
Pro Val Ile Leu Asp Leu Val Asn Leu Leu Met Gln Arg Leu Arg Glu			30
	145	150	155
His Ala Glu Glu Gly Ala Arg Val Val Asp Val Asn Lys Trp Phe Asn			
	165	170	175
Phe Ala Thr Phe Glu Ile Ile Gly Lys Leu Thr Phe Gly Ala Asp Leu			40
	180	185	190
Gly Asn Leu Arg Asn Arg Asp Trp His Pro Trp Val Lys Gly Ser Ala			
	195	200	205

Asn	Asn	Asn	Met	Val	Val	Gly	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Asn	Ser	Val	Gly	
	210					215						220				
Leu	Gly	Pro	Ile	Ile	Lys	Trp	Cys	Ile	Ser	Asn	Glu	Ile	Leu	Pro	Arg	
225					230					235					240	
Gln	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	Leu	Ala	Glu	Met	Val	Gln	Lys	Arg	Thr	Gly	10
				245					250					255		
Val	Thr	Val	Glu	Arg	Pro	Asp	Phe	Ile	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Asp	
			260					265						270		
Val	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Val	Glu	Ala	Leu	Ile	20
		275					280					285				
Gly	Ala	Gly	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Thr	Leu	Leu	Thr	Gly	Thr	Val	Cys	
	290					295					300					
Ala	Leu	Leu	Gln	Asn	Pro	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Val	Ile	Asp	Glu	Val	30
305				310						315				320		
Arg	Ser	Thr	Phe	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	His	Ser	Val	Gln	
				325					330					335		
Arg	Leu	Asp	Tyr	Met	Leu	Ala	Cys	Leu	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Tyr	Tyr	40
			340					345					350			
Pro	Pro	Val	Thr	Asn	Gly	Met	Pro	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Gly	Ala	
		355					360						365			

Ile Ile Gly Gly Arg Leu Val Pro Gly Asn Thr Val Val Ala Ile Trp

370

375

380

Gln Trp Ala Ile Cys His Asp Pro Ala Leu Trp Lys Asp Pro Tyr Thr

385

390

395

400

Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Ala Pro Glu Phe Ser Thr Asp Val

10

405

410

415

Arg Glu Ala Leu Asn Pro Phe Ser Val Gly Thr Arg Asn Cys Ile Gly

420

425

430

Arg Asn Leu Ser Tyr Ala Glu Thr Arg Leu Ile Leu Ala Arg Leu Phe

20

435

440

445

Tyr Tyr Phe Asp Leu Glu Leu Ala Asp Pro Asp Gln Asp Trp Phe Gly

450

455

460

Ala Gln Lys Ala Tyr Leu Val Trp Asp Ala Pro Ala Leu Asn Met Tyr

30

465

470

475

480

Leu Lys Pro Val Val Arg

485

40

<210> 8

<211> 1461

<212> DNA

&lt;213&gt; Phoma betae

&lt;400&gt; 8

```

atgtcacact tictacctac attaatccctc accctctttaa ctttgggttgc gtaigtctctc 60
gcaagaatga tatataacgt tttctatcat cctctaagcg cctttccttgg cgatgctttc 120
ttttgtgcca eggggcttac caaagcgtac cacatgatcg ccgggggatct tcaactcaaa 180
gtcaaagaca tgcacgacaa gfatggctca giagiacgaa tagctccacac tgaattgagc 240
tttlectait gttccgcgig gaaggacatc tatggaagcc gcgggggctcg cgaactatct 300
aaattttacg acttctaccg ggtcgcagaa gcgatgccgc aacacatcat atcggcggga 360
aaagcaaac acagtattct acgacgttat ttggcgcgatg gtttctcaga gaacgccatg 420
aaagctcagg agcctgtcat tcttgacctt gigaatctcc taatgcagcg ttigagagaa 480
catgcagaag aggggtgcacg agtcgtggat gigaacaaat ggltcaatti tgcctacctc 540
gaaatcattg gaaaactgac cttcggggct gatcttggaa acttaaggaa ccgtgactgg 600
catccttggg tgaaggcag tgcacaac aatatggtgg ttggtticat ggccggccgca 660
aatagcglgg gacttgggccc cattatcaaa tgggtgcataa gcaacgagat ccttccgaga 720
caaaaatafc ttgatgagct ggcagaaaig gtccaaaagc gtacgggggt gacggctcag 780
cgtcctgact lcattcaagg cttttgcgt gacgatgtcc agctgtcaaa cggagagatc 840
gttgcaaatg tgaagctct cattggagca ggatccgaat caacagcgac cctactgacg 900
ggcaccgtct gegctcttct acagaacccc gaccaactgg cgaaggigtat cgacgaggta 960
cggtaacct ttcgcaccga ggacgaaatc actttacact cggttcaacg cctcgactat 1020
atgcttgcac gcttgaacga gaccttccga tattaccctc cagtgacgaa cggtatgcct 1080
agggttacgc ctaaagaagg ggcaatcata ggcggacgct tgggtgccagg aaatacagtt 1140
gtcgcgattt ggcaatgggc tatatgceat gatcctgcat tatggaaaga tccatacaca 1200
ttccgacctg agagattttt ggaggeccca gagttctcaa cagatgtgcg cgaagctctg 1260
aatccattca gtgtcggcac gaggaactgt attggtagaa atctatcgta tgcctgaaacg 1320
cgctgatecc tgccegtttt gtttiactac ttcgacttgg aattggcgga cctgatcaa 1380
gactggltcg gagctcagaa ggcttatctt giatgggacg cacctgcgtt aaacatgtat 1440
cttaagccgg ttgttcgatg a 1461

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 564

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phoma betae

&lt;400&gt; 9

Met His Pro Asp Gln Ala Asp Thr Ala Ala Met Gln Gln Gln Thr Thr 10

1 5 10 15

Thr Glu Cys Ser Asp Arg Ser Arg Pro Glu Lys Ala Glu Glu Gly His

20 25 30

Ala Arg Glu His Thr Val Thr Arg Thr Cys Ser Arg Glu Pro Glu Gln 20

35 40 45

Thr Ala Thr Ala Thr Lys Pro Thr Gly Leu Lys Leu Ile Cys Leu Thr

50 55 60

Thr Ala Ile Cys Leu Thr Ile Phe Leu Ile Ser Val Asp Phe Ser Ile 30

65 70 75 80

Leu Ala Thr Ala Ile Pro Ala Ile Thr Ala Glu Phe Lys Ser Val Ala

85 90 95

Asp Ile Gly Trp Tyr Gly Ser Ser Tyr Leu Leu Thr Thr Ala Ser Ser 40

100 105 110

Gln Leu Leu Leu Gly Lys Cys Tyr Thr Val Phe Asp Leu Lys Trp Thr

115	120	125	
Phe Leu Leu Ala Leu Leu Thr Phe Glu Val Gly Ser Ile Ile Cys Ala			
130	135	140	
Thr Ala Pro Ser Ser Val Val Leu Ile Ile Gly Arg Ala Ile Ala Gly			10
145	150	155	160
Cys Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ser Gly Ala Leu Leu Ile Leu Thr His			
	165	170	175
Ser Val Pro Leu Glu Lys Arg Pro Leu Phe Met Ala Met Thr Gly Gly			
	180	185	190
Thr Tyr Gly Val Ala Ala Ile Ala Gly Pro Pro Leu Gly Gly Val Phe			
195	200	205	
Thr Asp Lys Leu Ser Trp Arg Trp Cys Phe Trp Ile Asn Leu Pro Ile			
210	215	220	30
Gly Ala Leu Thr Phe Leu Val Ile Val Phe Leu Phe Lys Ser Pro Pro			
225	230	235	240
Arg Ser Gly Phe Asp Gly Ser Arg Ser Trp Leu Ala Lys Val Met Arg			
	245	250	255
Phe Asp Pro Val Gly Thr Leu Met Phe Met Pro Ala Ile Ile Cys Val			
260	265	270	40

Leu Leu Ala Leu Gln Trp Gly Gly Thr Thr His Ala Trp Asn Ser Gly  
           275                          280                          285

Ile Val Val Ala Leu Leu Val Val Gly Gly Val Leu Val Ile Ala Phe  
           290                          295                          300

Gly Ile Val Gln Trp Leu Met His Asp Asp Ala Thr Ile Pro Leu Arg  
 305                          310                          315                          320

Ile Ile Lys Lys Arg Thr Ile Trp Ala Cys Ala Ala Tyr Gln Phe Ala  
                                   325                          330                          335

Leu Gly Ala Ala Phe Phe Val Phe Ile Tyr Phe Leu Pro Ile Trp Phe  
                           340                          345                          350

Gln Gly Val Gln Gly Ala Ser Ala Ile Gln Ser Gly Val Arg Thr Leu  
           355                          360                          365

Pro Met Leu Val Gly Asn Ile Val Ala Thr Ala Val Ser Gly Val Leu  
           370                          375                          380

Val Thr Ile Ile Gly Tyr Tyr Ala Pro Phe Met Ile Leu Gly Thr Ile  
 385                          390                          395                          400

Leu Ala Ser Val Gly Ala Gly Leu Leu Leu Leu Phe Thr Pro Asn Val  
                           405                          410                          415

Thr Ala Ala Ser Trp Ile Gly Tyr Gln Ala Ile Val Gly Leu Gly Ile  
                           420                          425                          430

10

20

30

40

Gly Phe Gly Trp Gln Gln Pro Phe Val Ala Val Gln Thr Val Leu Asp

435

440

445

Ile Lys Asp Val Pro Ile Ala Thr Ala Thr Leu Ser Phe Ala Gln Thr

450

455

460

Leu Gly Gly Thr Leu Phe Val Ser Val Ala Gln Thr Ala Phe Ser Thr

465

470

475

480

10

Lys Leu Thr Gln Glu Leu Val Ser Gln Val Pro Gln Leu Asp Pro Ala

485

490

495

Ser Ile Leu His Glu Gly Gly Ala Ala Glu Leu Asp Lys Leu Val Pro

500

505

510

20

Glu Gln Tyr Leu Pro Asp Val Val Leu Ser Tyr Asn Asn Ser Leu Leu

515

520

525

Ser Ala Phe Phe Val Ala Thr Ile Met Ala Ile Met Ser Leu Val Gly

530

535

540

30

Cys Thr Phe Val Glu Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ala Asp Ala

545

550

555

560

Val Pro Ala Ala

40

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1695

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phoma betae

&lt;400&gt; 10

atgcatccag atcaagecga cactgcagcg atgcagcagc agacaacaac cgaatgctcg 60	10
gatgatccc ggccggagaa ggctgaagaa gggcatgctc gcgagcatac agtcacgcgt 120	
acatgcctc gagaaccgga gcaaacagcc acagcgacca aaccgactgg ctigaaactc 180	
atctgcttga cgacagcgat ttgtctaact atctttctga tctcggttga ctctcgata 240	
cttgaacgg ccatccctgc gattacagcc gattcaaga gttggcaga cattggctgg 300	
taiggaagtt ctacttgc cacaactgce tctcaecage ttctctdgg gaagtgttac 360	
accgigtteg atctcaagtg gaccittctg ctigtcttac tcaccttga agtcgggagt 420	20
atcataigt caactgcacc cagctctgtc gtgctcataa ttggccgcgc tattgctggc 480	
tgtggaaaig cggggtcct gtcaggagcc ctgctcatcc tcactcatag cgtaccgctg 540	
gagaaacgcc cacttttcat ggcaatgact ggcggtaact acggagtcgc cgcaatcgcg 600	
ggaccaccgc tcggtggagt ctcaactgat aagctgtcgt ggcggttggtg ctcttgatc 660	
aatcttcca ttggagcgtt gacattttg gtcactgtct ttctcttcaa aagccctccg 720	
agaagcggat ttgacggttc ccgatccctgg ctgctaagg tcaatcgctt cgatccctc 780	
ggaacactca ttttcaigcc tgccatcate tgcgtgcctc ttgctctgca atggggaggt 840	30
accaccacg ctiggaatag cggcatagtc gtcgcatgct tggttgttgg aggigtactc 900	
gttattgcat ttggcatcgt tcaatggctc atgcatgat atgccactat accccttgc 960	
atcatcaaga agcgtacaat ttgggcatgc gctgctacc aatttgact cgggtctgcc 1020	
tttttgtct tcaclactt ctctccate iggttccagg gttgcaagg agccagcgcc 1080	
atccagtcag gatttgaac acttccaatg ctctcggaa acatcgtcgc tacagccgta 1140	
tciggcgtcc tggtcacat tattggatat tacgctcctt tcatgatcct cggcactatc 1200	40
ctcgcactg tgggcgccgg tctctattg cttttcacc ctaacgtgac tgcggcttea 1260	
tggattgggt atcaggccat agtcggcctg ggtataggat ttggatggca gcaaccctt 1320	
gttctgtgc aaacagtcct cgatatcaaa gaigtaccga tgcctactgc cactttgtct 1380	

ttcgcccaga ctctcggcgg tactcttttc gtcagcgttg cgcagacggc ttctctccacc 1440  
 aagcttacac aggagcttgt aagtcagta ccicaactgg atcctgccic caicttacac 1500  
 gaaggiggtg ctgccgagct tgacaagctc gttccggaac aatacttcc cgacgttggt 1560  
 ctgicataca acaatagctt gcttagcgtt ttctttgttg ctactatcat ggcgattaig 1620  
 tctctcgtcg gctgcacctt cgtggaatgg aacagtgtta agggcaagaa ggctgatgcc 1680  
 gtgccagctg ctiga 1695

10

<210> 11

<211> 541

<212> PRT

<213> Phoma betae

20

<400> 11

Met Ile Lys His Ser Leu Ser Asp Cys Leu Ala Asp Pro Asp His Leu  
 1 5 10 15

Ile Arg Ile Lys Ser Tyr Val Glu Ala Asn Val Arg Phe Leu Gly Leu  
 20 25 30

30

Ser Leu Val Thr Leu Leu Val Thr Ile Gln Met Phe Arg Ala Leu Gly  
 35 40 45

Ser Pro Leu Arg Leu Asn Lys Pro Leu Val Gly Arg Arg Ser Ile Leu  
 50 55 60

40

Glu Pro Arg Trp Leu Val Gly Leu Arg Phe Thr Lys Gly Gly Arg Glu  
 65 70 75 80

Leu Leu Arg Gln Ala Tyr Lys Lys Tyr Lys Asp Glu Ile Phe Lys Val

85

90

95

Gln Cys Asn Asp Thr Glu Ile Cys Val Leu Pro His Arg Tyr Val Glu

100

105

110

Glu Leu Arg Gly Leu Pro Ala Ser Lys Val Ser Ser Pro Gln Ala Leu

115

120

125

10

Tyr Asn Lys Gly Leu Gly Ser Tyr Thr Gly Leu Glu Val Ile Val Glu

130

135

140

Ser His Leu His Phe Gln Ala Ile Gln Gly His Leu Thr Pro Asn Leu

145

150

155

160

20

Ala Ser Ala Leu Gly Ile Val Leu Asp Glu Leu Gln Asp Ala Leu Lys

165

170

175

Thr Val Leu Pro Asp Cys Ser Asp Glu Trp Val Pro Phe Asp Val His

180

185

190

30

Thr Val Leu Ser Glu Leu Val Ser Arg Leu Ser Ser Arg Val Phe Gly

195

200

205

Gly Leu Glu Leu Ala Arg Asn Gln Gln Trp Ile Gln Leu Ser Thr Ala

210

215

220

40

Tyr Pro Arg Asn Ala Phe Ala Cys Thr Met Ala Leu Arg Met Val Pro

225

230

235

240

Arg Ile Ile Arg Pro Leu Leu Ala Ala Val Leu Pro Thr Tyr Trp Arg

245

250

255

Thr Arg Ser Asn Ile Arg Asp Ala Lys Arg Ile Val Gly Gly Ile Ile

260

265

270

Thr Lys Arg Arg Ala Asp Glu Gly Ala Thr Asp Met Ser Ala Lys Glu

275

280

285

10

His Pro Cys Asp Leu Leu Gln Trp Met Met Asn Ala Ala Ala Gly Thr

290

295

300

Glu Thr His Ala Asp Asp Leu Ala His Arg Leu Leu Phe Ile Ser Asp

305

310

315

320

20

Ala Ser Val Met Thr Thr Ser Leu Leu Ile Ser His Cys Leu Tyr Asp

325

330

335

Leu Val Ala His Pro Glu Ala Leu Ser Cys Ile Arg Glu Glu Val His

340

345

350

30

Asn Val Leu Arg Glu Gly Asp Asn Phe Gln Lys Thr Thr Leu His Lys

355

360

365

Met Arg Ser Leu Asp Ser Ala Leu Lys Glu Ser Gln Arg Leu Asn Pro

370

375

380

40

Pro Phe Leu Met Thr Phe Asp Arg Val Val Arg Glu Pro Leu Leu Leu

385	390	395	400	
Ser Asp Gly Thr Gln Ile Pro Val Gly Thr His Leu Ala Met Pro Thr				
	405	410	415	
Asp Ala Met Leu Gln Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gln Gly Gly Val Ala				10
	420	425	430	
Pro Asp Gln Phe Asp Pro Phe Arg Tyr Ala Arg Ala Arg Glu Asp Pro				
	435	440	445	
Glu Asn Ala Gln Arg Phe Gln Leu Ala Thr Thr Glu Ala Lys Ser Leu				20
	450	455	460	
Val Phe Gly His Gly Lys His Ala Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Ser				
465	470	475	480	
Ser Glu Ala Lys Ile Ile Leu Ser His Leu Leu Leu Leu Tyr Asp Phe				30
	485	490	495	
Arg Tyr Pro Glu Gly Lys Gly Arg Pro Glu Ser Trp Leu Phe Ser Glu				
	500	505	510	
Asn Val Ala Ile Asp Pro Asn Ala Arg Leu Leu Ile Lys Lys Arg Asn				40
	515	520	525	
Asp Ala Ala Ser Asn Leu Ala Met Leu Ala Lys Ala Leu				
	530	535	540	

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1626

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phoma betae

&lt;400&gt; 12

aigatcaaac acagccttag cgactgtcta gctgaccag atcatctgat ccggatcaag	60	10
agctatgigg aagccaatgt tegtattcct ggctctcct tggttaccct ccttgtcacc	120	
atccagaigt ttctgcccci cggctcgcct ttcgctctca acaaaccgtt ggttggacgt	180	
cggctgatcc tcgaaccgag atggttgggt ggactgcgtt tcacaaaggc cggccgggag	240	
ttacttcgcc aggcatacaa aaagtacaaa gatgagattt tcaaagtaca atgcaatgac	300	
actgaaattt gtgtcttcc gcatagatat gtggaagage tccgcggtt gccctgcaagc	360	
aaagtgagct ctctcagcc tctciataac aaaggcttgg gaagctacac cggctctgag	420	20
gtcatcgtgg aaagtcacct tcaatttcag gcaatacaag gccacctgac accgaatctc	480	
gcttcggctc ttggaattgt cctggacgag ttgcaagacg cattgaaaac agtcctgccg	540	
gattgttcag atgaaatgggt tccatttgac gtacacacag tactttctga attagtcagt	600	
cgccctcct cgcgtgtctt tggaggctc gagcttgcct gaaaccaaca atggatacaa	660	
ctgagtactg citatcctag gaacgcattc gcctgcacca tggctttgcg catggttctt	720	
cgtatcattc gccacctctt agctgcagtc ctgcctactt actggcgtac gccagcaac	780	
ataagggatg ccaaacgat tgttgggtggg attatcacca agcggcgtgc ggaatgaagga	840	30
gcaacagata tgagcgcgaa agaacatccc tgtgatttgc tgcaatggat gatgaatgcc	900	
gcggcaggta cggaaacca cgcagatgat ttagctcacc gattacittt catcagcgat	960	
gcttcggctc tgaccacgag cctgttgatt tcccattgtc tttacgacct ggtcgcctat	1020	
cccgaagctc ttctatgcat tcgggaggaa gtacacaatg tcttgcgcga aggcgacaac	1080	
ttcagaaaa ccacactica caagatgcgc agtttggata gtgctttgaa ggaatcccag	1140	
aggttaaacc caccattctt gatgacattc gatcgcgttg tgcgggagcc acttctctctg	1200	40
tccgatggaa cgcaaatccc tgtagggacg catctcgtta tgcctacaga tgcaatgcta	1260	
caagactcaa gcctcttccc tcaaggcgga gtigccccag accaattcga tccgtttcgt	1320	

tatgcgcggg cgcgcgaaga tccagaaaat gcacagcgc t tccaattggc tacaacggag 1380  
 gcaaagagct tggatattgg acatggaaag caigcatgcc ctggtegctt ctttgctagc 1440  
 agcgaggcta agataatctt gagicaccig tiacitttgi acgatittcg giatectgag 1500  
 ggcaagggtc gicccgaaag ttggctcttc tgggagaatg ttgccatcga tccaatgcc 1560  
 agattgtaa tcaagaagcg aaatgacgct gcaagtaacc tagcgatgct agccaaggct 1620  
 ttgtag 1626

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20

&lt;400&gt; 13

gtaatacgac tcactatagg gcaecgctgg tcgacggccc gggctggt 48

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

30

&lt;400&gt; 14

ccaacagga atgtagcga gaggttgcga 30

40

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

gtccagcgat cgtgttcaga aciccgtcg

29

<210> 16

10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

caagctatcg cagtcagctc taccgttggg

30

20

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 17

gtcgcgatgta caacgacatc ggctcgtgg

29

<210> 18

40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<400> 19

actatagggc acgcgtggt

19

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gtcaactttg accactggac

20

30

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<400> 21

caggatgagg aaggcggagt

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<400> 22

agatcaagia ttccitttcc

20

<210> 23

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

agccgaaaca gcccgcctgt

20

30

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<400> 24

ggcttggctg caatataatc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

tctcgcaaga atgatatata

20

10

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<400> 26

gcctcgacta tatgcttgca tgcct

25

<210> 27

30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

caggtgcgtc ccatacaaga

20

40

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

cggtagcgaaa ggttgaccgt accic

25

10

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<400> 29

tagatagttc gcgacccccg cggct

25

<210> 30

<211> 20

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

gacattggct ggtatggaag

20

40

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

agagtaccgc cgagagtcig

20

<210> 32

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

ggttggtggg actgcgttc

20

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 33

tcctcgcgtg tctttggagg

20

<210> 34

40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

agatgcgag ttggatagt

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<400> 35

ticttgatta acaatciggc

20

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

ggatgggcga ccaggtcgta

20

30

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<400> 37

gaagcgagat tcggtgtcag

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

gtccctacag ggatttgcgt

20

10

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/04381
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/52, C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02, C12N1/21, C12N9/00, C12N9/10, C12N15/54  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) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/52, C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02, C12N1/21, C12N9/00, C12N9/10, C12N15/54  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tomonobu TOYOMASA et al., Cloning of a Full-length cDNA Encoding ent-Kaurene Synthase from <i>Gibberella fujikuroi</i> : Functional Analysis of a Bifunctional Diterpene Cyclase. <i>Biosci.Biotechnol.Biochem.</i> 2000, Vol.64, No.3, pages 660 to 664	1-3, 12-20
A	Hideaki OIKAWA et al., Diversity of diterpene hydrocarbons in fungus <i>Phoma betae</i> . <i>Tetrahedron Letters</i> . Mar.2001, Vol.42, No.12, pages 2329 to 2332	1-3, 12-20
A	Alessandra CARATTOLIT et al., The <i>Neurospora crassa</i> Carotenoid Biosynthetic Gene (Albino 3) Reveals Highly Conserved Regions among Prenyltransferases. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . 1991, Vol.266, No.9, pages 5854 to 5859	4, 5, 12-19, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"I" 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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 06 June, 2002 (06.06.02)		Date of mailing of the international search report 18 June, 2002 (18.06.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer:
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/04381

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hideaki OIKAWA et al., Biosynthesis of Diterpenoid Aphidicolin: Isolation of Intermediates from P-450 Inhibitor Treated Mycelia of <i>Phoma betae</i> . <i>Tetrahedron</i> . 1999, Vol.55, No.24, pages 7541 to 7554	6,7,10-19, 22,24
A	Mark J. ACKLAND et al., Studies in Terpenoid Biosynthesis. Part35. Biosynthetic Sequences leading to the Diterpenoid Aphidicolin in <i>Cephalosporium aphidicola</i> . <i>J.Chem.Soc Perkin Trans. I</i> . 1988, No.6, pages 1477 to 1480	1-24
A	JP 58-220690 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 22 December, 1983 (22.12.83), (Family: none)	1-24
P,X	Hideaki OIKAWA et al., Cloning and Functional Expression of cDNA Encoding Aphidicolan-16 $\beta$ -ol Synthase: A Key Enzyme Responsible for Formation of an Unusual Di Terpene Skeleton in Biosynthesis of Aphidicolin. <i>J.Am.Chem.Soc.</i> 2001, Vol.123, No.21, pages 5154 to 5155	20-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/04381

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: It is recognized that the inventions as set forth in claims 1 to 3 and 12 to 20 pertain to aphidicolin-18 $\beta$ -ol synthase. It is recognized that the inventions as set forth in claims 4, 5 and 21 pertain to geranylgeranyl diphosphate synthase. It is recognized that the inventions as set forth in claims 6, 7 and 22 pertain to cytochrome P450 hydroxylase (P450-1). It is recognized that the inventions as set forth in claims 8, 9 and 23 pertain to proteins having a transporter activity. It is recognized that the inventions as set forth in claims 10, 11 and 24 pertain to cytochrome P450 hydroxylase (P450-2).	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP02/04381
---

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

It is considered that there is no technical relevancy involving any special technical feature among these groups of inventions as set forth in the above claims.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/04381
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/52, C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02, C12N1/21, C12N9/00, C12N9/10, C12N15/54		
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. <sup>7</sup> C12N15/52, C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02, C12N1/21, C12N9/00, C12N9/10, C12N15/54		
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		
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) SwissProt/PIR/Geneseq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
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 請求の範囲の番号
A	Tomonobu TOYOMASA et al. Cloning of a Full-length cDNA Encoding ent-Kaurene Synthase from Gibberella fujikuroi: Functional Analysis of a Bifunctional Diterpene Cyclase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000, Vol. 64, No. 3, p. 660-664	1-3, 12-20
A	Hideaki OIKAWA et al. Diversity of diterpene hydrocarbons in fungus Phoma betae. Tetrahedron Letters. Mar. 2001, Vol. 42, No. 12, p. 2329-2332	1-3, 12-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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	06.06.02	国際調査報告の発送日 18.06.02
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) 高永 みどり	4N 9152 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/04381
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 請求の範囲の番号
A	Alessandra CARATTOLIT et al. The Neurospora crassa Carotenoid Biosynthetic Gene (Albino 3) Reveals Highly Conserved Regions among Prenyltransferases. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1991, Vol. 266, No. 9, p. 5854-5859	4, 5, 12-19, 21
A	Hideaki OIKAWA et al. Biosynthesis of Diterpenoid Aphidicolin: Isolation of Intermediates from P-450 Inhibitor Treated Mycelia of Phoma betae. Tetrahedron. 1999, Vol. 55, No. 24, p. 7541-7554	6, 7, 10-19, 22, 24
A	Mark J. ACKLAND et al. Studies in Terpenoid Biosynthesis. Part 35. Biosynthetic Sequences leading to the Diterpenoid Aphidicolin in Cephalosporium aphidicola. J. CHEM. SOC PERKIN TRANS. I. 1988, No. 6, p. 1477-1480	1-24
A	JP 58-220690 A (旭化成工業株式会社) 1983. 12. 22 (ファミリーなし)	1-24
P X	Hideaki OIKAWA et al. Cloning and Functional Expression of cDNA Encoding Aphidicolan-16 $\beta$ -ol Synthase: A Key Enzyme Responsible for Formation of an Unusual Diterpene Skeleton in Biosynthesis of Aphidicolin. J. Am. Chem. Soc. 2001, Vol. 123, No. 21, p. 5154-5155	20-24

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/04381
<p><b>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</b>  <b>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</b></p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p><b>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</b></p>	
<p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>請求の範囲1-3、12-20は、アフィディオラン-18β-オール合成酵素に関連する発明群と認められる。          請求の範囲4、5、21は、グラニルグラニルニリン合成酵素に関連する発明群と認められる。          請求の範囲6、7、22は、チトクロームP450水酸化酵素 (P450-1) に関連する発明群と認められる。          請求の範囲8、9、23は、トランスポーター活性を有するタンパク質に関連する発明群と認められる。          請求の範囲10、11、24はチトクロームP450水酸化酵素 (P450-2) に関連する発明群と認められる。          それぞれの請求の範囲に係る発明群は、特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるものとは認められない。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02 C
//(C 1 2 N 9/00	C 1 2 N 9/00
C 1 2 R 1:645 )	C 1 2 R 1:645

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。