

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-530879
(P2015-530879A)

(43) 公表日 平成27年10月29日(2015.10.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4	
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 B 0 5 0	
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 B 0 6 4	
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 B 0 6 5	
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 1	4 H 0 4 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 176 頁) 最終頁に続く				
(21) 出願番号	特願2015-527987 (P2015-527987)	(71) 出願人	508020155 ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピ ア B A S F S E ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフ エン (番地なし) D-67056 Ludwigshaf e n, Germany	
(86) (22) 出願日	平成25年8月13日 (2013.8.13)	(71) 出願人	512050151 エボルバ エス アー イスラエル スイス国 ライナハ シーエイチ-415 3 ダギンガーシュトラーセ 23	
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月15日 (2015.4.15)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔	
(86) 國際出願番号	PCT/IB2013/056604			
(87) 國際公開番号	W02014/030096			
(87) 國際公開日	平成26年2月27日 (2014.2.27)			
(31) 優先権主張番号	61/691,848			
(32) 優先日	平成24年8月22日 (2012.8.22)			
(33) 優先権主張国	米国(US)			
(31) 優先権主張番号	12181388.5			
(32) 優先日	平成24年8月22日 (2012.8.22)			
(33) 優先権主張国	歐州特許庁(EP)			
(31) 優先権主張番号	13159444.2			
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)			
(33) 優先権主張国	歐州特許庁(EP)			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】クラビン類アルカロイドを製造するための遺伝子およびプロセス

(57) 【要約】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビン、およびカノクラビンアルデヒドなどのクラビン類アルカロイドを、組換え技術により製造するための微生物およびプロセス、ならびに、クラビン類アルカロイドを製造するための方法に適用することができるポリペプチド、ポリヌクレオチド、およびそうしたポリヌクレオチドを含有するベクターを提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a) 少なくとも1つのEasH活性、または
- b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD活性、または
- c) 少なくとも1つのEasHおよびEasA活性、または
- d) 少なくとも1つのEasH、EasD、およびEasA活性、または
- e) 少なくとも1つのEasHおよびEasD、EasAレダクターゼおよびEasG活性、または
- f) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasA、およびEasG活性、または
- g) 少なくとも1つのEasD、EasA、およびEasG活性、または
- h) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- j) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性、または
- k) a)～j)のうち少なくとも2つの組み合わせを含む、組換え微生物であって、その組換え微生物が、天然麦角アルカロイド生産生物ではない、前記組換え微生物。

【請求項2】

DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasA、およびEasG活性からなる一群の活性から選択される、少なくとも1つのアップレギュレートされた活性を有する、組換え型天然麦角アルカロイド生産生物であって、このEasA活性が、EasAレダクターゼであるか、EasAイソメラーゼであるか、またはEasAレダクターゼおよびEasAイソメラーゼ活性である、前記組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項3】

- 請求項2に記載の組換え型天然麦角アルカロイド生産生物であって、少なくとも1つのアップレギュレートされた活性が、
- a) 少なくとも1つのEasH活性、または
 - b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD、または
 - c) 少なくとも1つのEasHおよびEasAレダクターゼ活性、または
 - d) 少なくとも1つのEasH、EasD、およびEasA活性、または
 - e) 少なくとも1つのEasH、およびEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
 - f) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasA、およびEasG活性、または
 - g) 少なくとも1つのEasD、EasA、およびEasG活性、または
 - h) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
 - i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
 - j) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性の1つもしくは複数のグループの活性から選択される、前記組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項4】

EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性からなる一群から選択される、少なくとも1つのダウンレギュレートされた活性を有する、請求項2または3に記載の組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項5】

DMAPPの供給拡大、および/またはMe-DMATの供給拡大を含み、好ましくは、少なくとも1つのダウンレギュレートされたERG9もしくはERG20活性、または少なくとも1つのアップレ

10

20

30

40

50

ギュレートされたHMG-CoAレダクターゼ活性を含み、あるいは、少なくとも1つのダウンギュレートされたERG9もしくはERG20活性、および少なくとも1つのアップギュレートされたHMG-CoAレダクターゼ活性を含む、請求項1～4のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項6】

- a) 少なくとも1つのEasH活性、または
- b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD活性、または
- c) 少なくとも1つのEasAレダクターゼ、もしくは少なくとも1つのEasAイソメラーゼ活性、または
- d) 少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- e) 少なくとも1つのEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- f) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- g) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- h) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性、または
- j) a) からi) までのうち少なくとも2つの組み合わせ

をコードする少なくとも1つの組換えポリヌクレオチドを含有する、請求項1～5のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項7】

- a) 少なくとも1つのEasH活性、または
- b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD活性、または
- c) 少なくとも1つのEasAレダクターゼ、もしくは少なくとも1つのEasAイソメラーゼ活性、または
- d) 少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- e) 少なくとも1つのEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- f) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- g) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- h) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性、または
- j) a) からi) までのうち少なくとも2つの組み合わせ

をコードする組換えポリヌクレオチド。

【請求項8】

- DmaW活性が、
- a) 配列番号145および146に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
 - b) 配列番号147および/または190に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
 - c) 配列番号1、19、20、179、および/または180に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
 - d) 配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27、および/または28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
 - e) 配列番号102、122、123に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
 - f) 配列番号129および/または137に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
 - g) 配列番号102、122、123、129、および/または137に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド

チド、または

- h) ストリンジエントな条件下で配列番号102、122、123、129、および/または137とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- i) a) からh) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともb) およびc) に記載のポリペプチド、または
- j) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からi) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1～6のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項9】

EasF活性が

- a) 配列番号154に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号6、75、および/または76に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、および/または85に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号107および/または120に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号134および/または142に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号107、120、134、および/または142に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- g) ストリンジエントな条件下で配列番号107、120、134、および/または142とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または
- i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1～6、もしくは8のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項10】

EasE活性が

- a) 配列番号153、185、および/または191に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、好ましくは配列番号191に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号5および/または64に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号5、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、および/または74に対して少なくとも90%の配列同一性を有するか、もしくは配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73、および/または178に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号106に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号133および/または141に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号106、133、もしくは141に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド

配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号106、133、もしくは141とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1～6、もしくは8、もしくは9のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

10

【請求項 1 1】

EasC活性が

- a) 配列番号151および/または192に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号3および/または41に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号3、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、および/または52に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号104に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号131および/または139に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号104、131、および/または139に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- g) ストリンジエントな条件下で配列番号104、131、および/または139とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

20

- h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または
- i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

30

によるものである、請求項1～6、もしくは8～10のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項 1 2】

EasD活性が

- a) 配列番号152に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号4および/または53に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62、および/または63に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号105に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号132および/または140に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号105、132、および/または140に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのP

40

50

CRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号105、132、および/または140とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1～6、もしくは8～11のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

10

【請求項13】

EasH活性が

a) 配列番号156に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号8および/または95に対して少なくとも60%の配列同一性を有し、配列番号156に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号8および/または95に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

20

d) 配列番号109および/または157に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

e) 配列番号109、136、144、および/または157に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号109、136、144、および/または157に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号109、136、144、および/または157とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

30

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または、

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1～6、もしくは8～12のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項14】

EasAレダクターゼ活性が

a) 配列番号148、149、および150に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸18位にチロシンを有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

40

b) 配列番号193、194、および195に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号194のアミノ酸18位にチロシンを有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号2および/または31に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39、および/または40に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

e) 配列番号103に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

50

- f) 配列番号130および/または138に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- g) 配列番号103、130および/または138に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- h) ストリンジエントな条件下で配列番号103、130および/または138とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- i) a) からh) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともb) およびc) に記載のポリペプチド、または
- j) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からi) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1~6、もしくは8~13のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

EasAイソメラーゼ活性が

- a) 配列番号148、149、および150に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸18位にフェニルアラニンを有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号193、194、および195に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号194のアミノ酸18位にチロシンを有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号2および/または31に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39、および/または40に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- e) 配列番号103に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号130および/または138に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- g) 配列番号103、130、および/または138に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- h) ストリンジエントな条件下で配列番号103、130、および/または138とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- i) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または
- j) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1~6、もしくは8~14のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

EasG活性が

- a) 配列番号155および/または183に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、好ましくは配列番号183に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号7および/または86に対して少なくとも39%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

- c) 配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93、および/または94に対して少なくとも70%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号108に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号135および/または143に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号108、135、および/または143に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連續したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- g) ストリンジエントな条件下で配列番号108、135、および/または143とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または、
- i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、請求項1～6、もしくは8～15のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項17】

組換え微生物が酵母であって、以下の発現力セットを含有する、すなわち

- a) 配列番号8および/または95に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、EasH活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号8および/または95に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ配列番号156に対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasH活性を有するポリペプチドであって、さらにより好ましくは、配列番号8および/または95に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ図8に示すアラインメントにおいて100%保存されているすべてのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現力セット、
- b) 配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39、および/または40に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、EasAレダクターゼ活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39、および/または40に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ配列番号148、149、および150に対して少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、しかも配列番号149のアミノ酸18位にチロシンを有するアミノ酸配列を含有する、前記EasAレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現力セット、
- c) 配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93、および/または94に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、EasG活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93、および/または94に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の

10

20

30

40

50

配列同一性を有し、かつ配列番号183に対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasG活性を有するポリペプチドであって、さらにより好ましくは、配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93、および/または94に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ図10a～10cに示すアラインメントにおいて100%保存されているすべてのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasG活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現力セット、

d) 配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62、および/または63に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、EasD活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62、および/または63に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ配列番号152に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasD活性を有するポリペプチドであって、さらにより好ましくは、配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62、および/または63に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ図7a～7bに示すアラインメントにおいて100%保存されているすべてのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現力セット、

e) 配列番号3、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、および/または52に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、EasC活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号3、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、および/または52に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ配列番号192に対して少なくとも85%、好ましくは少なくとも87%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasC活性を有するポリペプチドであって、さらにより好ましくは、配列番号3、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、および/または52に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ図6a～6dに示すアラインメントにおいて100%保存されているすべてのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasC活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現力セット、

f) 配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73、および/または178に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、EasE活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73、および/または178に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ配列番号191に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも73%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasE活性を有するポリペプチドであって、さらにより好ましくは、配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73、および/または178に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ図5a～5eに示すアラインメントにおいて100%保存されているすべてのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasE活性を有するポ

リペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現カセット、
 g) 配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、および/または85に対して、
 少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、
 94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有
 する、EasF活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号6、75、76、77、78
 、79、80、81、82、83、84、および/または85に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%
 、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%
 、もしくは100%の配列同一性を有し、かつ配列番号154に対して少なくとも75%、好ましく
 は少なくとも79%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasF活性を有する
 ポリペプチドであって、さらにより好ましくは、配列番号6、75、76、77、78、79、80、8
 1、82、83、84、および/または85に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%
 、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは10
 0%の配列同一性を有し、かつ図4a～4cに示すアラインメントにおいて100%保存されている
 すべてのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記EasF活性を有するポリペプチド
 をコードするポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現カセット、
 h) 配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27、および/または28に対して、少な
 くとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%
 、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有す
 る、DmaW活性を有するポリペプチドであるが、好ましくは配列番号1、19、20、21、22、2
 3、24、25、26、27、および/または28に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、8
 0%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしく
 は100%の配列同一性を有し、かつ配列番号190に対して少なくとも85%、好ましくは少な
 くとも89%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する、前記DmaW活性を有するポリペ
 ッチドであって、さらにより好ましくは、配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、2
 7、および/または28に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86
 %、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一
 性を有し、かつ図3a～3dに示すアラインメントにおいて100%保存されているすべてのアミ
 ノ酸を有するアミノ酸配列を含有する、前記DmaW活性を有するポリペプチドをコードする
 ポリヌクレオチドを含有する、少なくとも1つの発現カセット、

を含有する、請求項1～6、もしくは8～16のいずれか1つに記載の組換え微生物。 30

【請求項18】

ERG9活性が、配列番号9に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものである、請求項5～6または8～17のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項19】

ERG20活性が、配列番号10に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものである、請求項5～6または8～17のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項20】

HMG-CoAレダクターゼ活性が、配列番号11に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものである、請求項5～6または8～17のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項21】

ERG9、ERG20、およびHMG-CoAレダクターゼ活性のうち少なくとも2つが、配列番号9、10、または11に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものである、請求項20に記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項22】

ERG9、ERG20、およびHMG-CoAレダクターゼ活性が、配列番号9、10、および11に対して 50

少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものである、請求項21に記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項23】

- a) シクロクラビン
- b) フェスツクラビン
- c) アグロクラビン
- d) カノクラビンアルデヒド、および
- e) カノクラビンI

からなる化合物群から選択される、少なくとも1つの化合物を含有する組換え微生物であって、その組換え微生物が天然麦角アルカロイド生産生物ではない、前記組換え微生物。

10

【請求項24】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、およびカノクラビンIからなる一群から選択される化合物の少なくとも1つを、同一条件下で増殖させたときに、非組換え野生型生物より大量に含有および/または生産する、組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

【請求項25】

- a) シクロクラビン
- b) フェスツクラビン
- c) アグロクラビン
- d) カノクラビンアルデヒド、および
- e) カノクラビンI

からなる化合物群から選択される少なくとも1つの化合物を含有する、請求項1～6のいずれか1つ、または請求項8～22のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物。

20

【請求項26】

請求項7～16のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現するための少なくとも2つの発現カセットを含有する、組換えポリヌクレオチド、好ましくはベクター。

【請求項27】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを生産するための方法であって、

30

- a) 請求項1～6のいずれか1つ、または請求項8～25のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を、その組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物においてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を可能にする条件下で培養すること；ならびに
- b) 組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、および/または培養培地から、前記シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIを取得すること

を含む前記方法。

40

【請求項28】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを生産するための方法であって、

- a) 請求項1～6のいずれか1つ、または請求項8～25のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を、その組換え微生物または組換え型天然麦角アルカロイド生産生物においてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、カノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を可能にする条件下で培養すること；

b) 前記組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物に、培養培地を介して、IPP、トリプトファン、DMAPP、DMAT、Me-DMAT、またはカノクラビンIからなる一群

50

から選択される少なくとも1つの化合物を与えること；ならびに

c) 前記シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIを、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、および/またはその培養培地から取得することを含む前記方法。

【請求項 29】

シクロクラビンが生産および取得される、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 30】

カノクラビンアルデヒドが培地に提供され、シクロクラビンが生産および取得される、請求項27～29のいずれか1つに記載の方法。 10

【請求項 31】

カノクラビンIが培地に提供され、シクロクラビンが生産および取得される、請求項27～30のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 32】

Me-DMATが培地に提供され、シクロクラビンが生産および取得される、請求項27～31のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 33】

DMATが培地に提供され、シクロクラビンが生産および取得される、請求項27～32のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 34】

組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、10から40の間の温度で培養される、請求項27～33のいずれか1つに記載の方法。 20

【請求項 35】

組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、10から32の間の温度で培養される、請求項27～34のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 36】

組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、最初に25から40、好ましくは25から35、の間の温度で培養され、続いて10から25、好ましくは15から25、の間の温度で培養されるか、または、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、最初に10から25、好ましくは15から25、の間の温度で培養され、続いて25から40、好ましくは25から35、の間の温度で培養される、請求項27～35のいずれか1つに記載の方法。 30

【請求項 37】

生産されたシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが、抽出によって取得される、請求項27～36のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 38】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが、酢酸エチル(EA)、tertブチルメチルエーテル(TBME)、クロロホルム(CHCl₃)、およびジクロロメタン(DCM)からなる一群から選択される化合物による抽出を含む、抽出法によって取得される、請求項27、28、または37に記載の方法。 40

【請求項 39】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが、pH=10における酢酸エチルによる液/液抽出、好ましくは、pHをNaOHで調製したpH=10における酢酸エチルによる液/液抽出を含む、抽出法によって取得される、請求項27、28、37、または38に記載の方法。

【請求項 40】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが、好ましくは、HLB樹脂(pH=3)、ダイヤイオ 50

ン樹脂 (pH=3) 、Amberlite 1180樹脂 (pH=3) 、Amberlite 1180樹脂 (pH=10) 、Amberlite 16N樹脂 (pH=3) 、またはAmberlite 16N樹脂 (pH=10) からなる一群から選択される、シリカ系樹脂材を用いた固相抽出による抽出を含む、抽出法によって取得される、請求項27、28、37、38、または39に記載の方法。

【請求項41】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を目的とする、請求項1~6のいずれか1つ、もしくは請求項8~25のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7~16のいずれか1つに記載の組換えポリヌクレオチド、または請求項26に記載のベクターの使用。

10

【請求項42】

請求項27~40のいずれか1つに記載の方法における、請求項1~6のいずれか1つ、もしくは請求項8~25のいずれか1つに記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または請求項7~16のいずれか1つに記載の組換えポリヌクレオチド、または請求項26に記載のベクターの使用。

【請求項43】

請求項27~40のいずれか1つに記載の方法によって生産される、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンI。

【請求項44】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを含有するが、他の麦角アルカロイドはまったく、または小量しか含まない、請求項27~40のいずれか1つに記載の方法で生じる培養培地。

20

【請求項45】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを含有するが、他の麦角アルカロイドはまったく、または小量しか含まない、培養培地。

【請求項46】

- a) 配列番号129、130、131、132、133、134、135、もしくは136に示すヌクレオチド配列を有する核酸配列；
- b) 配列番号20、31、41、53、64、75、86、95、もしくは180に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；
- c) 配列番号129、130、131、132、133、134、135、もしくは136に示す核酸配列に対して少なくとも70%同一である核酸配列であって、前記核酸配列がDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有するポリペプチドをコードする、前記核酸配列；
- d) DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有し、かつ配列番号20、31、41、53、64、75、86、もしくは180に示すアミノ酸配列に対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドをコードする核酸配列；ならびに
- e) ストリンジエントな条件下で、a) からd) のいずれか1つとハイブリダイズすることができる核酸配列であって、前記核酸配列が、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有するポリペプチドをコードする、前記核酸配列

30

からなる一群から選択される、1つもしくは複数の核酸配列を含有するポリヌクレオチド。

40

【請求項47】

- a) 配列番号175、176、177、もしくは178に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；
- b) EasE活性を有し、かつ配列番号175、176、177、もしくは178に示すアミノ酸配列に対

50

して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドをコードする核酸配列；

c) 配列番号181に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；ならびに

d) DmaW活性を有し、かつ配列番号181に示すアミノ酸配列に対して少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドをコードする核酸配列；

からなる一群から選択される、1つもしくは複数の核酸配列を含有するポリヌクレオチド。

10

【請求項 4 8】

請求項46または47に記載のポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが、請求項8～17のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする核酸配列を追加して含有する、前記ポリヌクレオチド。

【請求項 4 9】

請求項46もしくは47に記載のポリヌクレオチドを含有するか、または請求項48に記載のポリヌクレオチドを含む発現カセットを含有する、ベクターまたは発現カセット。

【請求項 5 0】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項49に記載のベクター。

20

【請求項 5 1】

請求項46～48のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド、または請求項49もしくは50に記載のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 5 2】

前記宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、または酵母細胞である、請求項51に記載の宿主細胞。

【請求項 5 3】

前記宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、または酵母細胞、好ましくは*Aspergillus japonicus*、*Aspergillus fumigatus*、*Claviceps purpurea*、*Claviceps paspali*、*Claviceps africana*、または酵母細胞である、請求項51または52に記載の宿主細胞。

30

【請求項 5 4】

DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有し、かつ配列番号20、31、41、53、64、75、86、もしくは180に示すアミノ酸配列に対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを過剰発現する、および/または

EasE活性を有し、かつ配列番号175、176、177、もしくは178に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および/または

DmaW活性を有し、かつ配列番号181に示すアミノ酸配列に対して少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを過剰発現する、*Paecilomyces divaricatus*。

40

【請求項 5 5】

請求項46もしくは47に記載のポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを製造するための方法であって、

a) 前記ポリペプチドの生産を可能にする条件下で、請求項51～53のいずれか1つに記載の宿主細胞、または*Paecilomyces divaricatus*を培養すること；ならびに

b) ステップa)の宿主細胞もしくは*Paecilomyces divaricatus*からポリペプチドを取得すること

50

を含む、前記方法。

【請求項 5 6】

請求項46もしくは47に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、または請求項55に記載の方法によって得られる、ポリペプチド。

【請求項 5 7】

請求項56に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 5 8】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIを製造するための、またはこれらを組み合わせて製造するための方法であって、

- a) 請求項51～53のいずれか1つに記載の宿主細胞、または*Paecilomyces divaricatus*、または請求項54に記載の*Paecilomyces divaricatus*を、前記宿主細胞においてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を可能にする条件下で培養すること；ならびに
b) 前記宿主細胞もしくは*Paecilomyces divaricatus*細胞、または培養培地から、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを取得すること

を含む前記方法。

【請求項 5 9】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、およびカノクラビンIからなる1群から選択される少なくとも1つの化合物を製造するための、請求項46もしくは47に記載のポリヌクレオチド、または請求項49もしくは50に記載のベクター、または請求項51、52、もしくは53に記載の宿主細胞、または*Paecilomyces divaricatus*の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本明細書は、出願番号US 61/691848、EP 12181388.5、US 61/786841、EP 13159444.2、およびEP 13178008.2の優先権を主張するものであり、上記はすべて、その全体を参考として本明細書に含めるものとする。

【0 0 0 2】

本発明は、原則として、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビン、およびカノクラビンアルデヒドなどのクラビン類アルカロイドの、組換え技術による製造の分野に関する。本発明は、クラビン類アルカロイドを製造するための微生物およびプロセス、ならびに、クラビン類アルカロイドの製造方法に適用することができるポリペプチド、ポリヌクレオチド、およびそうしたポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

麦角アルカロイドは、多様な構造および生物活性を有する、複雑なインドール誘導体群であって (Flieger 1997, *Folia Microbiol (Praha)* 42:3-30; Schadl 2006, *Chem Biol* 63:45-86)、バッカクキン科 (Clavicipitaceae) (たとえば、バッカクキン属 (Claviceps) およびネオティホディウム属 (Neotyphodium) もしくはエピクロエ属 (Epichloe)) およびトリココマ科 (Trichocomaceae) (アスペルギルス属 (Aspergillus) およびペニシリウム属 (Penicillium) など) の真菌によって産生される。重要な天然の生産菌は、バッカクキン属 (Claviceps)、ペニシリウム属 (Penicillium)、およびアスペルギルス属 (Aspergillus) の真菌であるが (Flieger 1997, *loc cit.*; Schadl *loc cit.*)、*Sphaerelia*属、*Balansia*属、または*Periglandula*属にも見いだされる (Pazoutova, S. et al., 2008, *Fungal Diversity*, 31: 95-110 and Steiner, U. 2011, *Mycologia*, 103(5):1133-1145)。天然麦角アルカロイドおよびそれらの半合成誘導体はいずれも、現代医学に

10

20

30

40

50

において広く用いられており、子宮収縮作用、血圧調整、下垂体ホルモンの分泌制御、偏頭痛予防、ならびにドーパミン作動性および神経遮断性の作用を含めて、広範囲の薬理作用を示す (de Groot 1998, Drugs 56:523-535; Haarmann 2009, Mol Plant Pathol 10:563-577; Schardl 2006, loc cit.). 麦角アルカロイドは、構造的特徴によって2つの種類、すなわちD-リゼルギン酸のアミド誘導体、およびクラビン類アルカロイド、に分けることができる (Flieger 1997, loc cit.) Groger 1998, Alkaloids Chem Biol 50:171-218)。第1のグループのメンバーは、通常、リゼルギン酸およびペプチド部分からなる。それらはエルゴペプチド (ergopeptine) とも呼ばれる。エルゴペプチドの重要なメンバーは、たとえば、エルゴタミンおよびエルゴバリンである。クラビン類アルカロイド、たとえば、シクロクラビン、アルゴクラビン、フミガクラビン、および類似物質、エリモクラビン、ピロクラビン、コスタクラビン、もしくはエピコスタクラビンなど、ならびにそれらの前駆体、カノクラビン-Iおよびカノクラビンアルデヒドは、エルゴペプチドと同様に、同一の、または類似した、三環系もしくは四環系でのみ構成されており、ペプチド部分を欠いている。しかしながら、クラビン類アルカロイドは、追加の置換基を含んでいてよいので、上記のクラビン類アルカロイドに限定されない。このような誘導体の例は、フミガクラビンA、B、もしくはC、イソフミガクラビンAもしくはB、または9-デアセチルフミガクラビンのような、フミガクラビン類であって (Wallwey, C. and Li, S.M. 2011, Nat. Prod. Rep., 28:496-510)、これらは基本構造をフェスツクラビンと共有しているが、追加の置換基を含んでいる。フミガクラビン類は、たとえば、ペニシリウム属およびアスペルギルス属、例としてはA. fumigatus (A. fumigatus) (Flieger 1997, loc cit.) によって産生される。しかしながら、バッカクキン科の真菌、たとえばC. purpurea (Flieger 1997, loc cit.) は、エルゴペプチドを産生する能力を有しており、エルゴペプチドはリゼルギン酸の誘導体と見なすことができるので、エルゴペプチドの前駆体の一つは、クラビン類アルカロイド、アグロクラビンである。エルゴペプチド前駆体とクラビン類アルカロイドを比較すると、それらの生合成経路の初期段階は非常に類似しており、たとえば、A. fumigatusとC. purpureaとおそらく共有されているが、経路の後の段階は二つの菌種で異なることが示された (Li 2006, Chembiochem 7:158-164; Panaccione 2005, FEMS Microbiol Lett 251:9-17; Schardl 2006, loc cit.).

【0004】

クラビン類アルカロイドおよび麦角アルカロイドの発酵生産は一般に、天然の麦角アルカロイド生産菌が大規模に培養し難い傾向があるという問題に対処しなければならない。この理由の1つは、液内培養で糸状菌を発酵させることに関する技術的な問題である。一部の天然麦角アルカロイド生産菌は、サツマイモ属 (Ipomoea)、Turbina、Argyreia、およびStrictocardiaのような植物属の内生植物 (たとえば、Periglandula属の各種)、またはドクムギ属 (Lolium)、モロコシ属 (Sorghum)、もしくはウシノケグサ属 (Festuca) のような特定の草種の内生植物 (たとえば、ネオティホディウム属およびエピクロエ属の各種) である。さらに、多くの天然麦角アルカロイド生産菌は、上記アルカロイドを、特定の条件下または一定の発達段階でのみ生産するが、その場合にも、通常は低い生産率で産生する。多くの天然麦角アルカロイド生産菌は、さまざまな麦角アルカロイドの一群を産生するので、そのことが、所定のアルカロイドを費用効果の高い方法で単離するという問題を引き起こし、目的とする特定のアルカロイドの生産をさらに低下させる。

【0005】

麦角アルカロイドの化学的な全合成は、比較的複雑でないクラビン類アルカロイドの化学的全合成であっても、これまでのところ、依然として大きな挑戦であり、通常はラセミ混合物の合成に終わっている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Flieger 1997, Folia Microbiol (Praha) 42:3-30;

【非特許文献2】Schardl 2006, Chem Biol 63:45-86

10

20

30

40

50

【非特許文献3】Pazoutova, S. et al, 2008, *Fungal Diversity*, 31: 95-110

【非特許文献4】Steiner, U. 2011, *Mycologia*, 103(5):1133-1145

【非特許文献5】de Groot 1998, *Drugs* 56:523-535;

【非特許文献6】Haarmann 2009, *Mol Plant Pathol* 10:563-577

【非特許文献7】Groger 1998, *Alkaloids Chem Biol* 50:171-218

【非特許文献8】Wallwey, C. and Li, S.M. 2011, *Nat. Prod. Rep.*, 28:496-510

【非特許文献9】Li 2006, *Chembiochem* 7:158-164;

【非特許文献10】Panaccione 2005, *FEMS Microbiol Lett* 251:9-17

【発明の概要】

【0007】

これらの問題を克服するために、本発明は、組換え微生物、および組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、ならびにポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクターを提供し、加えて、上記の組換え微生物、および組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、ならびにポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびベクターを使用してクラビン類アルカロイドを生産するための方法を提供する。

【0008】

本発明は、

- a) 少なくとも1つのEasH活性、または
- b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD活性、または
- c) 少なくとも1つのEasHおよびEasAレダクターゼ活性、または
- d) 少なくとも1つのEasH、EasD、およびEasA活性、または
- e) 少なくとも1つのEasH、およびEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- f) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasA、およびEasG活性、または
- g) 少なくとも1つのEasD、EasA、およびEasG活性、または
- h) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または
- j) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性、

k) a) からj) までのうち少なくとも2つの組み合わせを含む組換え微生物を提供するが、

この組換え微生物は天然の麦角アルカロイド生産生物ではない。

【0009】

本発明はさらに、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasA、およびEasG活性からなる活性の一群から選択される、少なくとも1つのアップレギュレートされた活性を有する組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を与えるが、このEasA活性は、EasAレダクターゼ活性、EasAイソメラーゼ活性、またはEasAレダクターゼおよびEasAイソメラーゼ活性である。

【0010】

組換え型天然麦角アルカロイド生産生物は、

- a) 少なくとも1つのEasH活性、または
- b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD、または
- c) 少なくとも1つのEasHおよびEasAレダクターゼ活性、または
- d) 少なくとも1つのEasH、EasD、およびEasA活性、または
- e) 少なくとも1つのEasH、およびEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または
- f) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasA、およびEasG活性、または
- g) 少なくとも1つのEasD、EasA、およびEasG活性、または
- h) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性

10

20

30

40

50

、または

i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性
、または

j) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性

の1つもしくは複数のグループの活性から選択される、少なくとも1つのアップレギュレートされた活性を含む。

【0011】

さらに、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性からなる一群から選択される、少なくとも1つのダウンレギュレートされた活性を有する、上記のような組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が与えられる。本発明のもう1つの実施形態は、DMAPPの供給増加、および/またはMe-DMATの供給増加を含み、好ましくは、少なくとも1つのダウンレギュレートされたERG9もしくはERG20活性、または少なくとも1つのアップレギュレートされたHMG-CoAレダクターゼ活性を含み、あるいは、少なくとも1つのダウンレギュレートされたERG9もしくはERG20活性、および少なくとも1つのアップレギュレートされたHMG-CoAレダクターゼ活性を含む、本明細書に記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物である。

10

【0012】

本発明の他の実施形態は、

a) 少なくとも1つのEasH活性、または

b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD活性、または

c) 少なくとも1つのEasAレダクターゼ、もしくは少なくとも1つのEasAイソメラーゼ活性
、または

d) 少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または

e) 少なくとも1つのEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または

f) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性
、または

g) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または

h) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または

i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性

20

j) a) からi) までのうち少なくとも2つの組み合わせ

30

をコードする少なくとも1つの組換えポリヌクレオチドを含有する、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を含んでなる。

【0013】

本発明はまた、

a) 少なくとも1つのEasH活性、または

b) 少なくとも1つのEasHおよびEasD活性、または

c) 少なくとも1つのEasAレダクターゼ、もしくは少なくとも1つのEasAイソメラーゼ活性
、または

d) 少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または

e) 少なくとも1つのEasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または

f) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性
、または

40

g) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAレダクターゼ、およびEasG活性、または

h) 少なくとも1つのEasH、EasD、EasAイソメラーゼ、およびEasG活性、または

i) 少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、およびEasC活性

j) a) からi) までのうち少なくとも2つの組み合わせ

をコードする組換えポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

さらに、DmaW活性が、

a) 配列番号145および146に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含

50

有するポリペプチド、または

b) 配列番号147もしくは190に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号1、19、20、179、もしくは180に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27、もしくは28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

e) 配列番号102、122、もしくは123に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号129もしくは137に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

g) 配列番号102、122、もしくは123に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連續したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

h) ストリンジエントな条件下で配列番号102、122、もしくは123とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

i) a) からh) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともb) およびc) に記載のポリペプチド、または天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からi) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドが与えられる。

【0015】

さらに他の実施形態は、EasF活性が

a) 配列番号154に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号6、75、もしくは76に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、もしくは85に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号107もしくは120に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

e) 配列番号134もしくは142に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号107もしくは120に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連續したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号107もしくは120とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、本明細書に記載の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを含んでなる。

【0016】

本発明は他に、EasE活性が

a) 配列番号153、185、もしくは191に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、好ましくは配列番号191に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号5もしくは64に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

10

20

30

40

50

- c) 配列番号5、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73もしくは74に対して少なくとも90%の配列同一性を有するか、または配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73、もしくは178に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号106に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号133もしくは141に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号106、133、もしくは141に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- g) ストリンジエントな条件下で配列番号106、133、もしくは141とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または
- i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを、その一部として含んでなる。

【0017】

- また他に、EasC活性が
- a) 配列番号151もしくは192に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号3もしくは41に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号3、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、もしくは52に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号104に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- e) 配列番号131もしくは139に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- f) 配列番号104、131、もしくは139に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または
- g) ストリンジエントな条件下で配列番号104、131、もしくは139とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または
- h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または、天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを、その一部として含んでなる。

【0018】

- 本発明はさらに、EasD活性が
- a) 配列番号152に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- b) 配列番号4もしくは53に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- c) 配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62、もしくは63に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または
- d) 配列番号105に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによって

10

20

30

40

50

コードされるポリペプチド、または

e) 配列番号132もしくは140に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号105、132、もしくは140に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連續したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号105、132、もしくは140とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または、天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを含んでなる。

【0019】

本発明は他に、EasH活性が

a) 配列番号156に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号8および/または95に対して少なくとも60%の配列同一性を有し、配列番号156に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号8および/または95に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号109および/または157に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

e) 配列番号109、136、144、および/または157に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号109、136、144、および/または157に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連續したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号109、136、144、および/または157とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つに記載のポリペプチド、または、

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを、その一部として含んでなる。

【0020】

また他の実施形態は、EasAレダクターゼ活性が

a) 配列番号148、149、および150に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸の18位にチロシンを有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号2もしくは31に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは40に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号103に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

e) 配列番号130もしくは138に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号103に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なく

10

20

30

40

50

とも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号103とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを含んでなる。

10

【0021】

別の実施形態は、EasAイソメラーゼ活性が

a) 配列番号148、149、および150に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸の18位にフェニルアラニンを有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号2もしくは31に対して少なくとも40%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは40に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号103に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

e) 配列番号130もしくは138に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号103に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なくとも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号103とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

20

30

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを含んでなる。

【0022】

さらに他の実施形態は、EasG活性が

a) 配列番号155もしくは183に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、好ましくは配列番号183に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

b) 配列番号7もしくは86に対して少なくとも39%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

c) 配列番号7、86、87、88、89、90、91、92、93、もしくは94に対して少なくとも70%の配列同一性を有し、好ましくは、配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93、もしくは94に対して少なくとも70%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、または

d) 配列番号108に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

e) 配列番号135もしくは143に対して少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

f) 配列番号108に記載の配列の一群から選択されるポリヌクレオチド配列の中の、少なく

40

50

とも15個の連続したヌクレオチドをそれぞれ含有する、2つのPCRプライマーによって得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) ストリンジエントな条件下で配列番号108とハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または

h) a) からg) までのうち少なくとも2つ、好ましくは少なくともa) およびb) に記載のポリペプチド、または、

i) 天然麦角アルカロイド生産生物から得られる、a) からh) までのうち少なくとも1つに記載のポリペプチド

によるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを含んでなる。

10

【0023】

本発明は、さらに、ERG9活性が、配列番号9に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものであり、または、ERG20活性が、配列番号10に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものであり、または、HMG-CoAレダクターゼ活性が、配列番号11に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものであり、または、ERG9、ERG20、およびHMG-CoAレダクターゼ活性が、配列番号9、10、もしくは11に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものであり、または、ERG9、ERG20、およびHMG-CoAレダクターゼ活性が、配列番号9、10、および11に対して少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドによるものである、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、または上記の組換えポリヌクレオチドを提供する。他の実施形態は、

20

- a) シクロクラビン、
- b) フェスツクラビン、
- c) アグロクラビン、
- d) カノクラビンアルデヒド、
- e) カノクラビンI、

からなる化合物群から選択される、少なくとも1つの化合物を含有する組換え微生物を含んでなるが、この組換え微生物は天然の麦角アルカロイド生産生物ではない。

30

【0024】

本発明はまた、同一条件で増殖させたときに非組換え野生型の生物よりも大量に、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、およびカノクラビンIからなる一群から選択される、少なくとも1つの化合物を含有および/または生産する、組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を提供する。さらに他の実施形態は、

- a) シクロクラビン、
- b) フェスツクラビン、
- c) アグロクラビン、
- d) カノクラビンアルデヒド、
- e) カノクラビンI、

40

からなる化合物群から選択される少なくとも1つの化合物を含有する、上記の本発明の一部および実施形態のいずれか1つに記載の、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を含んでなる。

【0025】

本発明は他に、本発明の一部および実施形態のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現させるための組換え発現カセット、またはそうした発現カセットの少なくとも1つを含有するポリヌクレオチドを、その一部として含んでなる。さらに本発明の一部をなすのは、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを生産するための方法であって、その方法は、

- a) 上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物においてシクロ

50

クラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を可能にする条件下で、その組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を培養すること；ならびに

b) 組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、および/またはその培養培地から、前記のシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIを取得（採取）することを含む。

【0026】

本発明の他の方法は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を提供するものであって、それは、

a) 上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物においてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、カノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を可能にする条件下で、その組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を培養すること；

b) 前記組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物に、培養培地を介して、IPP、トリプトファン、DMAPP、DMAT、Me-DMAT、またはカノクラビンIからなる一群から選択される少なくとも1つの化合物を与えること；ならびに

c) 前記シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIを、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物、および/またはその培養培地から取得することを含む。

【0027】

前記方法の一部変更された形は、シクロクラビンが生産および取得される方法、またはフェスツクラビンが生産および取得される方法、またはアグロクラビンが生産および取得される方法、またはカノクラビンIが培地に与えられてカノクラビンが生産および取得される方法、またはカノクラビンIが生産および取得される方法、またはカノクラビンアルデヒドが生産および取得される方法を含む。上記方法はさまざまな培養温度を採用することができる。したがって、本発明のさらに他の一部をなすのは、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、10 から40 の間、好ましくは15 から35 の間、より好ましくは18 から32 の間、さらにもっと好ましくは20 から30 の間の温度で培養される方法である。その方法は、10 から32 の間、13 から32 の間、15 から32 の間、16 から32 の間、17 から32 の間、18 から32 の間、19 から32 の間、20 から32 の間、15 から31 の間、15 から30 の間、15 から29 の間、15 から28 の間、15 から27 の間、15 から26 の間、15 から25 の間の温度で培養された、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物を用いてもよい。本方法の一部変更された形は、培養温度の変化を含む。したがって、本発明は、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、最初に25 から40 の間、好ましくは25 から35 の間の温度で培養され、続いて10 から25 の間、好ましくは15 から25 の間の温度で培養される上記の方法、または、組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物が、最初に10 から25 の間、好ましくは15 から25 の間の温度で培養され、続いて25 から40 の間、好ましくは25 から35 の間の温度で培養される上記の方法を提供する。本発明はまた、生産されたシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが抽出によって得られる、上記の方法を提供する。これらの方法は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが、酢酸エチル (EA)、tert ブチルメチルエーテル (TBME)、クロロホルム (CHCl₃)、およびジクロロメタン (DCM) からなる一群から選択される化合物による抽出を含む、抽出法によって得られるような方法、ならびに、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのう

10

20

30

40

50

ち少なくとも1つが、pH = 10における酢酸エチルによる液/液抽出、好ましくは、pHをNaOHで調製したpH = 10における酢酸エチルによる液/液抽出を含む、抽出法によって得られるような方法を含んでなる。これらの方法のさらに変更された形は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つが、好ましくは、HLB樹脂 (pH=3)、ダイヤイオン樹脂 (pH=3)、Amberlite 1180樹脂 (pH=3)、Amberlite 1180樹脂 (pH=10)、Amberlite 16N樹脂 (pH=3)、またはAmberlite 16N樹脂 (pH=10) からなる一群から選択される、シリカ系樹脂材を用いた固相抽出による抽出を含む、抽出法によって得られるような方法を含んでなる。本発明のさらに他の一部をなすのは、上記の任意の方法で、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIからなる一群から選択される少なくとも1つの化合物を生産するための、上記の組換え微生物もしくは組換え型天然麦角アルカロイド生産生物の使用、または、上記の組換えポリヌクレオチドもしくは上記のベクターの使用である。本発明はさらに、上記の任意の方法により生産された、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIを含んでなる。他に本発明の一部をなすのは、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを含有するが、他の麦角アルカロイドをまったく、もしくは小量しか含まない、上記の方法で作製された培養培地であり、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを含有するが、他の麦角アルカロイドをまったく、もしくは小量しか含まない培養培地である。本発明はさらに、上記の本発明の部分および実施形態のいずれにおいても使用することができる、追加のポリヌクレオチドを提供する。

10

20

30

40

50

【0028】

したがって、本発明は、

- a) 配列番号129もしくは130、131、132、133、134、135、もしくは136に示すヌクレオチド配列を有する核酸配列；
- b) 配列番号20、31、41、53、64、75、86、もしくは95に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；
- c) 配列番号129もしくは130、131、132、133、134、135、もしくは136に示す核酸配列に對して少なくとも70%同一である核酸配列であって、前記核酸配列がDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有するポリペプチドをコードする、前記核酸配列；
- d) DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有し、配列番号20、31、41、53、64、75、86、もしくは95に示すアミノ酸配列に對して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドをコードする核酸配列；ならびに
- e) ストリンジエントな条件下で、a) からd) のうちいずれか1つとハイブリダイズすることができる核酸配列であって、前記核酸配列が、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAレダクターゼ、EasAイソメラーゼ、またはEasG活性を有するポリペプチドをコードする、前記核酸配列

からなる一群から選択される、1つもしくは複数の核酸配列を含有するポリヌクレオチドを含んでなる。

【0029】

本発明はまた他に、上記のポリヌクレオチドを含んでなるが、当該ポリヌクレオチドは、上記の本発明の中で任意の部分もしくは実施形態に記載のポリペプチドをコードする、少なくとも1つの核酸配列を追加して含有する。本発明のさらに他の実施形態は、上記ポリヌクレオチドを含有するベクターもしくは発現力セット、ならびにこれらの発現力セットを含有する、および/または本発明に記載のポリペプチドのうちいずれか1つのための発現力セットを含有する、ベクターを含んでなる。さらに本発明に含まれるのは、本発明に含まれるポリペプチドのうちいずれか1つを発現させるための発現ベクター、ならびに、

こうしたベクターを含有する、または上記の少なくとも1つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する、宿主細胞である。こうした宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、特に糸状菌細胞、または酵母細胞とすることができます。本発明はさらに、上記のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの製造方法を提供するが、その方法は、
 a) 上記宿主細胞、または*Paecilomyces divaricatus*細胞を、前記ポリペプチドの生産を可能にする条件下で培養すること；ならびに
 b) ステップa) の宿主細胞からポリペプチドを取得すること
 を含んでなる。

【0030】

したがって、本発明は、上記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または、そのようなポリペプチドを生産するための方法によって得ることができるポリペプチドを含んでなる。本発明の他の部分は、上記のポリペプチドに特異的に結合する抗体を含んでなる。本発明の他の実施形態は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIを製造するための方法、またはこれらを組み合わせて製造するための方法を含んでなるが、その方法は、

a) 上記宿主細胞、または*Paecilomyces divaricatus*細胞を、前記宿主細胞においてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つの生産を可能にする条件下で培養すること；ならびに
 b) 前記宿主細胞もしくは*Paecilomyces divaricatus*細胞、または培養培地から、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIのうち少なくとも1つを取得すること
 を含む。

【0031】

本発明はまた、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIからなる1群から選択される少なくとも1つの化合物を製造するための、上記ポリヌクレオチド、または上記ベクター、または上記宿主細胞、または*Paecilomyces divaricatus*細胞の使用を含む。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】シクロクラビン、または経路の他の分岐上のアグロクラビンおよび/もしくはフェスツクラビンをもたらす代謝経路の様々なステップの略図である。経路の分岐点は、カノクラビンIが合成された後に位置し、次いで、EasH、EasD、EasAおよびEasG活性の組合せによってシクロクラビンをもたらすようにさらに改変されるか、またはカノクラビンIがEasD活性によりカノクラビンアルデヒドに変換され、存在するEasA活性に応じて、EasAとEasG活性の組合せによりアグロクラビンおよび/もしくはフェスツクラビンにさらに改変される。EasA活性は、アグロクラビンの場合はEasAイソメラーゼ活性、またはフェスツクラビンの場合はEasAリダクターゼ活性であってもよい。

【図2】カノクラビンIから、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性の組合せによりシクロクラビンをもたらすか、またはカノクラビンから、EasD活性によりカノクラビンアルデヒドをもたらし、カノクラビンアルデヒドから、「EasA(Tyr176)」により媒介されるEasGおよびEasAリダクターゼ活性の組合せによりフェスツクラビンをもたらすか、またはカノクラビンアルデヒドから、「EasA(Phe176)」により媒介されるEasGおよびEasAイソメラーゼ活性の組合せによりアグロクラビンをもたらす代謝経路のステップに含まれる様々なステップおよび様々なEas活性の略図である。図2はまた、クラビン型アルカロイドを産生するいくつかの例示的な天然麦角産生生物の名称を挙げる。そのような天然麦角産生生物は、シクロクラビンの場合はアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*(*A. japonicus*))、アグロクラビンの場合はクラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*(*C. purpurea*))およびフェスツクラビンの場合はアスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*(*A. fumigatus*))である。

【図3a】図3a～図3dは、DmaW活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus*

10

20

30

40

50

japonicus)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アランメントの連続部分を表す。アミノ酸は、標準的な一文字アミノ酸コードに従って表される。異なる配列の名称は、これらの相同体ポリペプチドを得ることができる生物の名称、ならびにこれらの配列が配列表に列挙される配列番号を含む。アミノ酸配列アランメントは、この配列群において保存された、あまり保存されていない、およびさらにより保存されていないアミノ酸も示し、黒色の影付きのアミノ酸位置は強い保存、すなわち、10%保存されていることを表し、灰色の影付きのアミノ酸位置はあまり保存されていないことを表し、白色の背景を有するアミノ酸はさらにより保存されていないアミノ酸位置を表す。アランメント中のアミノ酸配列における短線は、特定の配列中に含まれないアミノ酸位置を表す。アミノ酸位置群の上または下にある黒色のバーは、保存された配列モチーフである強い配列保存の領域を示す。アランメントは、対応するアミノ酸位置で高度に保存されたアミノ酸を同定するための、この遺伝子群のコンセンサス配列(配列番号190)も含む。このアミノ酸配列アランメントにより与えられる保存されたアミノ酸およびあまり保存されていないアミノ酸に関する情報を用いて、アミノ酸配列アランメントによって含まれないアミノ酸配列がアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)のポリペプチドの真の相同体であるかどうかを決定することができる。潜在的な相同体または天然に存在するか、もしくは人工的に生成された突然変異体のアミノ酸配列は、Dmav活性を有する可能性が最も高く、より保存されたアミノ酸位置は問題のアミノ酸配列によって含まれるであろう。

10

20

30

40

50

【図3b】図3aの続きである。

【図3c】図3aの続きである。

【図3d】図3aの続きである。

【図4a】図4a～図4cは、EasF活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アランメントの連続部分を表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付きまたはコンセンサス配列(配列番号154)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。

【図4b】図4aの続きである。

【図4c】図4aの続きである。

【図5a】図5a～図5eは、EasE活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アランメントの連続部分を表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付きまたは(配列番号191)に記載のコアコンセンサスを含むコンセンサス配列(配列番号185)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。

【図5b】図5aの続きである。

【図5c】図5aの続きである。

【図5d】図5aの続きである。

【図5e】図5aの続きである。

【図6a】図6a～図6dは、EasC活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アランメントの連続部分を表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付きまたはコンセンサス配列(配列番号151)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。

【図6b】図6aの続きである。

【図6c】図6aの続きである。

【図6d】図6aの続きである。

【図7a】図7a～図7bは、EasD活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アランメントの連続部分を表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付

きまたはコンセンサス配列(配列番号152)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。図7a中の4個の黒色の矢印および図7b中の2個の黒色の矢印は、EasD活性を有するタンパク質のコファクター結合モチーフTGxxxGxG(配列番号188)の保存されたアミノ酸および活性部位モチーフYxxxK(配列番号198)の保存されたアミノ酸を示す(Kavanagh 2008, Cell Mol Life Sci 65: 3895-3906)。

【図7b】図7aの続きである。

【図8】EasH活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)のポリペプチドに対する相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アラインメントを表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付きまたはコンセンサス配列(配列番号183)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。

【図9a】図9a～図9dは、EasA活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アラインメントの連続部分を表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付きまたはコンセンサス配列(配列番号184)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。図9bは、アミノ酸チロシンを表すY、またはアミノ酸フェニルアラニンを表すFを含むアミノ酸位置を示すさらなる黒色の矢印を含む。この位置にYを有するアミノ酸配列はEasAリダクターゼ活性を有するポリペプチドを表すが、この位置にFを有するアミノ酸配列はEasAイソメラーゼ活性を有するポリペプチドを表す。これらの活性は、それぞれ、EasAリダクターゼおよびEasAイソメラーゼ活性について、EasA(Tyr176)およびEasA(Phe176)とも記載され、番号176は、それぞれ、EasAリダクターゼまたはEasAイソメラーゼ活性を有する、アスペルギルス・ジャポニカスのポリペプチド中のYまたはFを有する対応するアミノ酸位置を指す(Chengら、2010, J. AM. C HEM. SOC., 132: p12835-12837)。

【図9b】図9aの続きである。

【図9c】図9aの続きである。

【図9d】図9aの続きである。

【図10a】図10a～図10cは、EasG活性を有するアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)のポリペプチドに対するいくつかの相同体ポリペプチドのアミノ酸配列アラインメントの連続部分を表す。配列の名称および記号、例えば、黒色もしくは灰色の影付きまたはコンセンサス配列(配列番号183)は、図3a～図3dで用いられた配列の名称および記号について説明されたものと同じ意味を有する。

【図10b】図10aの続きである。

【図10c】図10aの続きである。

【図11】上から下に向かって、酵母株の上清のクロマトグラム：EYS1849全イオンクロマトグラム；m/z=239.1543+/-0.01DaのEYS1849抽出イオンクロマトグラム；m/z=241.1699+/-0.01DaのEYS1849抽出イオンクロマトグラム；EYS1851全イオンクロマトグラム；m/z=239.1543+/-0.01DaのEYS1851抽出イオンクロマトグラム；m/z=241.1699+/-0.01DaのEYS1851抽出イオンクロマトグラムを示す図である。

【図12】LC-MSにより分析された、CEY2871およびCEY3631株の上清の分析を示す図である。カノクラビンIの質量(m/z=257.164+/-0.01Da)を、CEY2871中には存在しないCEY3631において2.0min +/-0.1minの保持時間でピークを示すTIC(全イオンクロマトグラム)から抽出した。

【図13】LC-MSにより分析された、CEY3631およびCEY3645株の上清の分析を示す図である。カノクラビンIの質量(m/z=257.164+/-0.01Da)を、CEY3631およびCEY3645の両方において2.0min +/-0.1minの保持時間でピークを示すTIC(全イオンクロマトグラム)から抽出した。EY3631と比較してCEY3645中のカノクラビンIの増加を示すピーク下面積を組込んだ(挿入した)。

【図14】LC-MSにより分析されたCEY2557およびCEY2625株を示す図である。両方の株において、7.8min +/-0.2minの保持時間にピークが見られ、Me-DMATの予測された質量(m/z=

10

20

30

40

50

287.175 +/- 0.01Da)を有していた。同一性を、NMRにより確認した。CEY2557と比較してCEY2625におけるMe-DMATの2倍を超える増加を示すピーク下面積を組込んだ。

【図15】LC-MSにより分析されたCEY2557およびCEY2625株を示す図である(図6を参照されたい)。CEY2557と比較してCEY2625におけるMe-DMATの2倍を超える増加を示すピーク下面積を組込んだ。DMATの面積も示す。

【図16】LC-MSにより分析されたCEY2557、CEY2563およびCEY2575株を示す図である。全ての株において、7.8min +/- 0.2minの保持時間にピークが見られ、Me-DMATの予測された質量(m/z=287.175 +/- 0.01Da)を有していた。3つ全ての株において同様のレベルの化合物(挿入)を示すピーク下面積を組込んだ。化合物の同一性を、NMRにより確認した。

【図17】ERG20遺伝子への組込みのために用いられるPCR産物、および酵母ゲノム中の標的領域の概略を示す図である。HR1およびHR2はゲノム配列と相同であり、NatR-ScKex2プロモーター構築物の、相同組換えによる組込み、およびそれにより、天然ERG20プロモーターの破壊を可能にする。

【図18】LC-MSにより分析されたEYS1538およびEYS1926株を示す図である。EYS1538と比較してEYS1926においてMe-DMATの2倍を超える増加を示すピーク下面積を組込んだ。

【図19】EYS2098およびEYS2099株により產生される、カノクラビンIおよびシクロクラビンの相対量(曲線下面積)を示す、これらの株からの培養上清の分析を示す図である。

【図20】図20aおよび図20bは、EYS2055およびEYS2056におけるDMATおよびMe-DMATの產生を示す図である。両方ともMe-DMATに向かう2ステップの異種経路を発現する。さらに、EYS2056は、追加の、Scldi1の構成的に発現されたコピーを含有する。

【図21】EYS1934(対照)およびEYS2206(EasC)におけるシクロクラビン(CCL)およびフェスツクラビン(MW241)の產生を分析したところ、遺伝子AjEasCのさらなるコピーの発現に起因してEYS2206における產生の増加を示した。

【図22】EYS2124(A. japonicus由来EasE)およびEYS2125(N. loli由来EasE)株により產生される、シクロクラビンおよびフェスツクラビン(MW241)の相対量(曲線下面積)を示す、これらの株からの培養上清の分析を示す図である。

【図23】それぞれ、異なるDNAコドン使用のEasE遺伝子を有するが、全てA. japonicusに由来する対応する酵素をコードする、完全長シクロクラビン経路を含む酵母株からの培養上清の分析を示す図である。異なるコドン使用は、これらの株により產生されるシクロクラビンおよびフェスツクラビン(MW241)の量の変化(曲線下面積として示される)をもたらす。

【図24】EYS2006を、それぞれ、2.5%、5%および10%のグリセロールと共に増殖させたか、またはそれを用いずに増殖させた(対照)図を示す。シクロクラビンおよびフェスツクラビン(MW241)の產生は、グリセロール濃度の増加と共に増加した。

【図25】EYS2209と比較したEYS1934(左)、およびEYS2297と比較したEYS2209におけるシクロクラビンの產生を示す図である。

【図26】フェドバッチ式発酵におけるCCLおよびFCLの產生を示す図である。化合物の濃度(mg/L)、および測定されたOD600を、発酵期間にわたって示す。

【図27】様々な遺伝子背景(表58を参照されたい)を有する7つの酵母株サッカロミセス・セレビジア(Saccharomyces cerevisiae)におけるCCLおよびFCLの產生を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

(一般的定義)

用語「シクロクラビン」は、式(1)：

【0034】

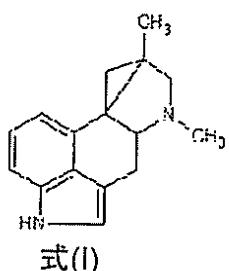
10

20

30

40

【化 1 】



の化合物を意味する。

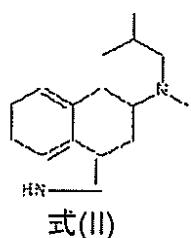
10

〔 0 0 3 5 〕

用語「フェスツクラビン」は、式(11)：

〔 0 0 3 6 〕

【化 2】



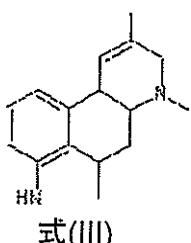
の化合物を意味する。

〔 0 0 3 7 〕

用語「アグロクラビン」は、式(111)：

〔 0 0 3 8 〕

【化 3】



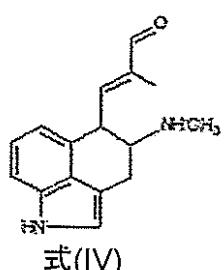
の化合物を意味する。

〔 0 0 3 9 〕

用語「カノクラビンアルデヒド」は、式(IV)：

【 0 0 4 0 】

【化 4】



の化合物を意味する。

【 0 0 4 1 】

10

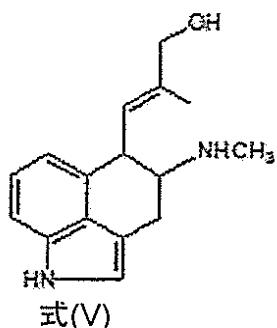
20

30

40

50

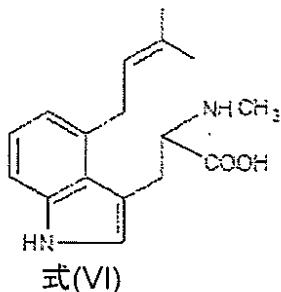
用語「カノクラビン」は、式(V)：
 【0042】
 【化5】



10

の化合物を意味する。

【0043】
 用語「ME-DMAT」は、式(VI)：
 【0044】
 【化6】

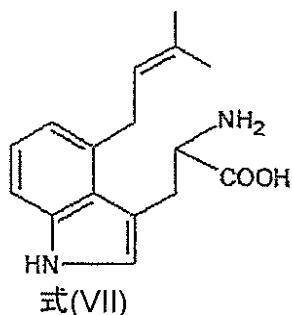


20

の化合物を意味する。

【0045】
 用語「DMAT」は、式(VII)：
 【0046】
 【化7】

30

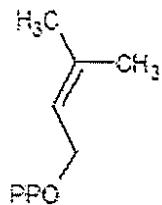


40

の化合物を意味する。

【0047】
 用語「DMAPP」は、式(VIII)：
 【0048】

【化8】



式(VIII)

10

の化合物を意味する。

【0049】

用語「トリプトファン」は、アミノ酸トリプトファン、好ましくは、L-トリプトファン、またはその塩の1つを意味する。

【0050】

用語「IPP」は、イソペンチルピロリン酸、式(IX)の化合物またはその塩の1つを意味する。

【0051】

用語「DmaW活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号1のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、ジメチルアリルトリプトファン合成酵素活性を有し、位置C4でのL-トリプトファンのプレニル化を触媒し、4-ジメチルアリルトリプトファン((S)-4-(3-メチル-2-ブテニル)-トリプトファン、またはDMAT)の形成をもたらす能力を意味する。

20

【0052】

用語「EasF活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号6のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、N-メチルトランスフェラーゼ活性を有し、DMATからMe-DMATへのメチル化を触媒する能力を意味する。

【0053】

用語「EasE活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号5のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、EasC活性も存在する場合、Me-DMATからカノクラビンIへの変換を触媒する能力を意味する。

30

【0054】

用語「EasC活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号3のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、EasE活性も存在する場合、Me-DMATからカノクラビンIへの変換を触媒する能力を意味する。

【0055】

用語「EasD活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号4のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、オキシドリダクターゼ活性を有し、カノクラビンIからカノクラビンアルデヒドへの変換を触媒する能力を意味する。

40

【0056】

用語「EasH活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号8のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、EasD、EasAおよびEasG活性も存在する場合、カノクラビンIからシクロクラビンへの変換を触媒する能力を意味する。

【0057】

用語「EasAリダクターゼ活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号2のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、EasG活性が存在する場合、リダクターゼ活性を有し、カノクラビンアルデヒドからフェ

50

スツクラビンへの変換を触媒する能力を意味する。

【0058】

用語「EasAイソメラーゼ活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号37のポリペプチド(*C.purpurea*のEasA)と同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、EasG活性が存在する場合、イソメラーゼ活性を有し、カノクラビンアルデヒドからアグロクラビンへの変換を触媒する能力を意味する。

【0059】

用語「EasA活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号2または37のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、EasAリダクターゼもしくはEasAイソメラーゼ活性のいずれかを有するか、または例えば、配列番号149の位置18にYからFへの突然変異を含む、配列番号33のネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lollii*)のポリペプチドとして、両方の活性を有する能力を意味する。
10

【0060】

用語「EasG活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、配列番号7のポリペプチドと同じか、または類似する機能を満たす、すなわち、存在するEasA活性に応じて、オキシドリダクターゼ活性を有し、カノクラビンアルデヒドからアグロクラビンおよび/もしくはフェスツクラビンへの変換を触媒する、ならびに/またはEasA、EasDおよびEasH活性も存在する場合、カノクラビンIからシクロクラビンへの変換を触媒する能力を意味する。

【0061】

用語「ERG9活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、2つのファルネシルピロリン酸(FPP)部分を連結して、ステロール生合成経路におけるスクアレンを形成する能力を意味する。ERG9活性は通常、スクアレン合成酵素によって提供される。
20

【0062】

用語「ERG20活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、イソプレノイドおよびステロール生合成のためのC15ファルネシルピロリン酸単位の形成を触媒する能力を意味する。

【0063】

用語「HMG-CoAリダクターゼ活性」は、ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む微生物が、HMG-CoAからメバロネートへの変換を触媒する能力を意味する。
30

【0064】

本明細書で用いられる用語「約」は、およそ、大まかに、周囲、または領域を意味する。用語「約」が数値範囲と共に用いられる場合、それは、記載の数値より上および下の境界を延長することによってその範囲を修飾する。一般に、本明細書で用いられる用語「約」は、20%上方または下方(より高いか、またはより低い)、好ましくは15%、より好ましくは10%および最も好ましくは5%の変動によって、記述された値の上および下の数値を修飾する。

【0065】

用語「ゲノム」または「ゲノムDNA」は、宿主生物の遺伝性の遺伝子情報を言う。前記ゲノムDNAは、核のDNA(染色体DNA)、染色体外DNA、およびオルガネラDNA(例えば、ミトコンドリアの)などの、細胞または生物の全遺伝物質を含む。好ましくは、用語ゲノムまたはゲノムDNAは、核の染色体DNAを言う。
40

【0066】

用語「染色体DNA」または「染色体DNA配列」は、細胞周期状態と無関係な細胞核のゲノムDNAと理解されるべきである。従って、染色体DNAは、染色体または染色分体中で編成されてもよく、それらは凝縮しているか、または非コイル状であってもよい。染色体DNAへの挿入を、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析、サザンプロット分析、蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)、*in situ* PCRおよび次世代配列決定(NGS)などの当業界で公知の様々な方法によって証明および分析することができる。
50

【0067】

用語「プロモーター」とは、mRNAを生成するように構造遺伝子の転写を指令するポリヌクレオチドを指す。典型的には、プロモーターは、構造遺伝子の開始コドンに近接する、遺伝子の5'領域に位置する。プロモーターが誘導的プロモーターである場合、転写の速度は誘導剤に応答して増大する。対照的に、プロモーターが構成的プロモーターである場合、転写の速度は、誘導剤により調節されない。

【0068】

用語「エンハンサー」とは、ポリヌクレオチドを指す。エンハンサーは、転写の開始部位と関連するエンハンサーの距離または向きに関係なく、特定の遺伝子がmRNAに転写される効率を増大させることができる。通常、エンハンサーは、プロモーター、5'非翻訳配列に近いところに、またはイントロン中に位置する。

10

【0069】

ポリヌクレオチド配列は、それが外来種を起源とする場合、生物もしくは第2のポリヌクレオチド配列に対して「異種」であり、または同じ種に由来する場合、その起源となる形態から改変される。例えば、異種コード配列に機能し得る形で連結されたプロモーターは、そのプロモーターが誘導される種とは異なる種に由来するコード配列、または同じ種に由来する場合、そのプロモーターと自然では会合しないコード配列(例えば、遺伝子操作されたコード配列または異なる生態型もしくは多様性に由来する対立遺伝子)を指す。

【0070】

「トランスジーン」、「トランスジェニック」または「組換え」とは、人によって操作されたポリヌクレオチドまたは人によって操作されたポリヌクレオチドのコピーもしくは相補体を指す。例えば、第2のポリヌクレオチドに機能し得る形で連結されたプロモーターを含むトランスジェニック発現カセットは、その発現カセットを含む単離された核酸の人による操作(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989)またはCurrent Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)に記載の方法による)の結果として、第2のポリヌクレオチドに対して異種であるプロモーターを含んでもよい。別の例では、組換え発現カセットは、ポリヌクレオチドが自然に見出される可能性が極端に低いような方法で組合わされたポリヌクレオチドを含んでもよい。例えば、人によって操作された制限部位またはプラスミド配列は、第2のポリヌクレオチドにフランкиングするか、またはそれからプロモーターを分離してもよい。当業者であれば、ポリヌクレオチドを多くの方法で操作することができ、上記の例に限定されないことを認識できる。用語「組換え」が生物または細胞、例えば、微生物を特定するように用いられる場合、それは、生物または細胞が、通常は後に特定される少なくとも1つの「トランスジーン」、「トランスジェニック」または「組換え」ポリヌクレオチドを含むことを表すために用いられる。

20

【0071】

個々の生物に対して「外因性」であるポリヌクレオチドは、性的交雑以外の任意の手段によって生物中に導入されるポリヌクレオチドである。

30

【0072】

用語「機能し得る形での連結」または「機能し得る形で連結された」は、遺伝子制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサーまたはターミネーターが、それに機能し得る形で連結されるポリヌクレオチド、例えば、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関してその機能を発揮することができる配置を意味すると一般に理解される。機能とは、この文脈においては、例えば、核酸配列の発現、すなわち、転写および/または翻訳の制御を意味してもよい。制御は、この文脈においては、例えば、発現、すなわち、転写および必要に応じて、翻訳を開始させること、増加させること、支配すること、または抑制することを包含する。制御することは、同様に、例えば、組織特異的および/または時間特異的であってもよい。それはまた、例えば、特定の化学物質、ストレス、病原体などにより誘導できるものであってもよい。好ましくは、機能し得る形での連結は、例えば、それ

40

50

10 それの調節エレメントが、核酸配列が発現される時にその機能を実行することができるような方法での、プロモーター、発現させようとする核酸配列、および必要に応じて、例えば、ターミネーターなどのさらなる調節エレメントの連続的配置を意味するものと理解される。機能し得る形での連結は、化学的な意味での直接の結合を必要とするとは限らない。例えば、エンハンサー配列などの遺伝子制御配列はまた、機能し得る形で連結されたポリヌクレオチドと離れて位置する位置に由来する標的配列に対してその機能を発揮することもできる。好ましい配置は、発現させようとする核酸配列がプロモーターとして作用する配列の後に位置し、2つの配列が互いに共有的に連結されるものである。発現カセット中のプロモーター配列と、核酸配列との距離は、好ましくは、200塩基対未満、特に好ましくは、100塩基対未満、非常に特に好ましくは、50塩基対未満である。当業者であれば、そのような発現カセットを得るための様々な方法に精通している。しかしながら、例えば、相同組換えまたは他に無作為の挿入により、発現させようとする核酸配列が内因性遺伝子制御エレメント、例えば、内因性プロモーターの制御下に置かれるような方法で、発現カセットを構築することもできる。そのような構築物も同様に、本発明の目的のための発現カセットであると理解される。

【0073】

20 用語「発現カセット」は、発現させようとするポリヌクレオチド配列が、その発現(すなわち、転写および/または翻訳)を可能にするか、または調節する少なくとも1つの遺伝子制御エレメントに機能し得る形で連結された構築物を意味する。発現は、例えば、安定的または一過的、構成的または誘導的であってもよい。

【0074】

30 用語「発現する」、「発現すること」、「発現された」および「発現」とは、遺伝子産物(例えば、本出願で定義および記載される経路または反応の遺伝子の生合成酵素)の、このタンパク質の得られる酵素活性がコードするレベルでの発現、または経路もしくは反応がこの遺伝子/経路が発現される生物中でのこの経路もしくは反応を介する代謝流動を可能にすることを指す経路もしくは反応の発現を指す。発現を、出発生物として用いられる微生物の遺伝子変化により行うことができる。いくつかの実施形態においては、微生物を遺伝子変化させて(例えば、遺伝子操作して)、出発生物により、または変化させなかつた同等の微生物中で産生されるレベルと比較して増大したレベルで遺伝子産物を発現させることができる。遺伝子変化としては、限定されるものではないが、特定の遺伝子の発現と関連する調節配列もしくは部位の変化もしくは改変(例えば、強力なプロモーター、誘導的プロモーターもしくは複数のプロモーターの付加による、または発現が構成的であるよう調節配列を除去することによる)、特定の遺伝子の染色体での位置の改変、リボソーム結合部位もしくは転写ターミネーターなどの特定の遺伝子に隣接する核酸配列の変化、特定の遺伝子のコピー数の増加、特定の遺伝子の転写および/もしくは特定の遺伝子産物の翻訳に関するタンパク質(例えば、調節タンパク質、サブレッサー、エンハンサー、転写アクチベーターなど)の改変、または当業界で日常的な方法を用いる特定の遺伝子の発現を脱調節させる任意の他の従来の手段(限定されるものではないが、例えば、リプレッサータンパク質の発現を遮断するためのアンチセンス核酸分子の使用)が挙げられる。

【0075】

40 いくつかの実施形態においては、微生物を物理的または環境的に変化させて、未変化の微生物の遺伝子産物の発現レベルと比較して増大したか、またはそれより低いレベルで遺伝子産物を発現させることができる。例えば、微生物を、特定の遺伝子の転写および/または特定の遺伝子産物の翻訳を増加させることができると知られるか、または疑われる薬剤で処理するか、またはその存在下で培養して、転写および/または翻訳を増強するか、または増加させることができる。あるいは、微生物を、特定の遺伝子の転写および/または特定の遺伝子産物の翻訳を増加させるように選択された温度で培養して、転写および/または翻訳を増強するか、または増加させることができる。

【0076】

用語「脱調節する」、「脱調節された」および「脱調節」とは、微生物中の少なくと

も1つの遺伝子の変化または改変を指し、変化または改変は、その変化または改変の非存在下での產生と比較して微生物中の所与の化合物の產生の効率の増加をもたらす。いくつかの実施形態においては、変化または改変された遺伝子は、微生物中の生合成酵素のレベルまたは活性が変化もしくは改変されるか、または輸送特異性もしくは効率が変化もしくは改変されるような、生合成経路における酵素、または輸送タンパク質をコードする。いくつかの実施形態においては、生合成経路における酵素、すなわち、生合成経路における特異的活性、例えば、EasH活性をもたらすポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子は、酵素のレベルまたは活性が、未変化の遺伝子または野生型遺伝子の存在下でのレベルと比較して増強されるか、または増加するように変化または改変される。脱調節はまた、例えば、フィードバック耐性であるか、またはより高いか、もしくはより低い特異的活性を有する酵素を得るために、1つ以上の遺伝子のコード領域を変化させることも含む。また、脱調節は、酵素または輸送タンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する転写因子(例えば、アクチベーター、リプレッサー)をコードする遺伝子の遺伝子変化をさらに包含する。用語「脱調節する」、「脱調節された」および「脱調節」は、存在する脱調節の種類に関してさらに特定することができる。特定の活性、例えば、EasH活性が、酵素のレベルまたは活性が未変化の遺伝子または野生型遺伝子の存在下でのレベルと比較して増強されるか、または増加するように変化または改変される場合、用語「上方調節」が用いられる。特定の活性、例えば、ERG9活性が、酵素のレベルまたは活性が未変化の遺伝子または野生型遺伝子の存在下でのレベルと比較して低下するか、または減少するように変化または改変される場合、用語「下方調節」が用いられる。

【0077】

用語「過剰発現する」、「過剰発現すること」、「過剰発現された」および「過剰発現」とは、遺伝子産物の発現、特に、出発微生物の遺伝子変化より以前に存在したものよりも高いレベルで遺伝子産物の発現を増強することを指す。いくつかの実施形態においては、微生物を遺伝子変化させて(例えば、遺伝子操作して)、出発微生物により產生されるレベルと比較して増大したレベルで遺伝子産物を発現させることができる。遺伝子変化としては、限定されるものではないが、特定の遺伝子の発現と関連する調節配列もしくは部位の変化もしくは改変(例えば、強力なプロモーター、誘導的プロモーターもしくは複数のプロモーターの付加による、または発現が構成的であるように調節配列を除去することによる)、特定の遺伝子の染色体での位置の改変、リボソーム結合部位もしくは転写ターミネーターなどの特定の遺伝子に隣接する核酸配列の変化、特定の遺伝子のコピー数の増加、特定の遺伝子の転写および/もしくは特定の遺伝子産物の翻訳に関与するタンパク質(例えば、調節タンパク質、サブレッサー、エンハンサー、転写アクチベーターなど)の改変、または当業界で日常的な方法を用いる特定の遺伝子の発現を脱調節させる任意の他の従来の手段(限定されるものではないが、例えば、リプレッサータンパク質の発現を遮断するためのアンチセンス核酸分子の使用)が挙げられる。遺伝子産物を過剰発現させる別の方法は、その寿命を増加させるために遺伝子産物の安定性を増強することである。

【0078】

用語「脱調節された」は、微生物の操作より以前に、または操作されていない同等の微生物において発現されたものよりも低いか、または高いレベルでの遺伝子産物の発現を含む。一実施形態においては、微生物を遺伝子操作して(例えば、遺伝子工学的に操作して)、微生物の操作より以前に、または操作されていない同等の微生物において発現されたものよりも低いか、または高いレベルで遺伝子産物のレベルを発現させることができる。遺伝子操作としては、限定されるものではないが、特定の遺伝子の発現と関連する調節配列もしくは部位の変化もしくは改変(例えば、強力なプロモーター、誘導的プロモーターもしくは複数のプロモーターを除去することによる)、特定の遺伝子の染色体での位置の改変、リボソーム結合部位もしくは転写ターミネーターなどの特定の遺伝子に隣接する核酸配列の変化、特定の遺伝子のコピー数の減少、特定の遺伝子の転写および/もしくは特定の遺伝子産物の翻訳に関与するタンパク質(例えば、調節タンパク質、サブレッサー、エンハンサー、転写アクチベーターなど)の改変、または当業界で日常的な特定の遺伝子の

10

20

30

40

50

発現を脱調節させる任意の他の従来の手段(限定されるものではないが、例えば、アンチセンス核酸分子の使用、または標的タンパク質の発現をノックアウトもしくは遮断するための他の方法)が挙げられる。用語「脱調節された遺伝子活性」はまた、例えば、1コピー以上の、組換え遺伝子、例えば、異種遺伝子を、好ましくは遺伝子工学的操作により微生物中に導入することによって、対応する遺伝子活性、例えば、リシンデカルボキシラーゼ活性が以前に観察されていない微生物中に、遺伝子活性を導入することを意味する。

【0079】

語句「脱調節された経路または反応」とは、生合成経路または反応における酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子が、少なくとも1つの生合成酵素のレベルまたは活性が変化または改変されるように変化または改変される生合成経路または反応を指す。語句「脱調節された経路」は、2つ以上の遺伝子が変化または改変され、それによって、対応する遺伝子産物/酵素のレベルおよび/または活性を変化させた生合成経路を含む。いくつかの場合、微生物中の経路を「脱調節する」(例えば、所与の生合成経路において2つ以上の遺伝子を同時に脱調節する)能力は、2つ以上の酵素(例えば、2つまたは3つの生合成酵素)が、「クラスター」または「遺伝子クラスター」と呼ばれる遺伝物質の連續片上に互いに隣接して存在する遺伝子によりコードされる、生物の特定の現象から生じる。他の場合、経路を脱調節するために、いくつかの遺伝子を、一連の連續的操作ステップにおいて脱調節しなければならない。

10

【0080】

本発明による脱調節された遺伝子を発現させるために、ポリペプチドをコードするDNA配列を、発現ベクター中の転写発現を制御する調節配列に機能し得る形で連結した後、いずれかの微生物に導入しなければならない。プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列に加えて、発現ベクターは、翻訳調節配列および発現ベクターを担持する細胞の選択にとって好適であるマーカー遺伝子を含んでもよい。

20

【0081】

本明細書で用いられる場合、「実質的に純粋なタンパク質」または化合物は、所望の精製されたタンパク質または化合物が、ポリアクリルアミド-ドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動(SDS-PAGE)後に単一のバンドによってタンパク質について示されるように、夾雜する細胞成分を本質的に含まないことを意味する。用語「実質的に純粋」は、当業者によって用いられる1つ以上の純度または均一性特性によって均一である分子を記述することをさらに意味する。例えば、実質的に純粋なタンパク質または化合物は、以下のもの：分子量、クロマトグラフィー移動度、アミノ酸組成、アミノ酸配列、遮断されたか、または遮断されていないN末端、HPLC溶出プロファイル、生物活性、および他のそのようなパラメータなどのパラメータに関する標準的な実験偏差内の一定の再現性のある特性を示す。しかしながら、この用語は、タンパク質の人工もしくは合成変異体または2つ以上の選択された化合物の人工的な混合物を排除することを意味するものではない。特に、この用語は、組換え宿主から単離された融合タンパク質、例えば、親和性精製のためのタグとのタンパク質の融合物を排除することを意味するものではない。

30

【0082】

2つの核酸配列間の用語「配列同一性」は、それぞれ、プログラムアルゴリズムGAP(Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA)を援用して、以下のパラメータ：ギャップ重量:12、長さ重量:4、平均一致:2,912、平均不一致:-2,003に設定するアラインメントにより算出される全配列長にわたる核酸配列の同一性パーセントを意味すると理解される。

40

【0083】

2つのアミノ酸配列間の用語「配列同一性」は、それぞれ、プログラムアルゴリズムGAP(Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA)を援用して、以下のパラメータ：ギャップ重量:8、長さ重量:2、平均一致:2,912、平均不一致:-2,003に設定するアラインメントにより算出される全配列長にわたるアミノ酸配列の同一性パーセントを意味すると理解される。

50

【0084】

用語「ドメイン」とは、進化的に関連するタンパク質の配列のアラインメントに沿って特定の位置で保存されたアミノ酸のセットを指す。他の位置のアミノ酸は相同体間で変化してもよいが、特定の位置で高度に保存されたアミノ酸は、タンパク質の構造、安定性または機能において必須である可能性が高いことを示す。タンパク質相同体のファミリーの整列された配列中でその高い程度の保存によって同定されたら、問題のポリペプチドが以前に同定されたポリペプチドファミリーに属するかどうかを決定するための識別子としてそれらを用いることができる。

【0085】

用語「モチーフ」または「コンセンサス配列」または「シグナチャー」とは、進化的に関連するタンパク質の配列中の短い保存された領域を指す。モチーフはドメインの高度に保存された部分であることが多いが、ドメインの一部のみを含むか、または保存されたドメインの外側に位置してもよい(モチーフの全てのアミノ酸が規定のドメインの外側にある場合)。

【0086】

ドメインの同定のための専門家用データベース、例えば、SMART(Schultzら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864; Letunicら(2002) Nucleic Acids Res 30, 242-244)、InterPro (Mulderら(2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315-318)、Prosite (Bucher and Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D.(編)、pp53-61, AAAI Press, Menlo Park; Huloら、Nucl. Acids. Res. 32:D134-D137, (2004))、またはPfam (Batemanら、Nucleic Acids Research 30(1): 276-280 (2002) & The Pfam protein families database: R.D. Finn, J. Mistry, J. Tate, P. Coggill, A. Heger, J.E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunesekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman Nucleic Acids Research (2010) Database Issue 38:D211-222)が存在する。タンパク質配列のin silico分析のためのツールのセットが、ExPASyプロテオミクスサーバー(Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteigerら、ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003))上で利用可能である。ドメインまたはモチーフを、配列アラインメントなどによる日常的な技術を用いて同定することもできる。

【0087】

比較のための配列のアラインメントのための方法は当業界で周知であり、そのような方法としては、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTAが挙げられる。GAPは、一致数を最大化し、ギャップ数を最小化する2つの配列の全体的(すなわち、完全な配列に及ぶ)アラインメントを発見するためのNeedlemanおよびWunschのアルゴリズム((1970)J Mol Biol 48:443-453)を用いる。BLASTアルゴリズム(Altschulら(1990) J Mol Biol 215: 403-10)は、配列同一性パーセントを算出し、2つの配列間の類似性の統計分析を行うものである。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Centre for Biotechnology Information(NCBI)を介して公共的に利用可能である。例えば、ClustalW多配列アラインメントアルゴリズム(バージョン1.83)を、デフォルトペアワイズアラインメントパラメータ、パーセンテージにおけるスコアリング方法と共に用いて、相同体を容易に同定することができる。類似性および同一性の全体的なパーセンテージを、MatGATソフトウェアパッケージ(Campanellaら、BMC Bioinformatics. 2003 Jul 10;4:29. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences)中で利用可能な方法の1つを用いて決定することもできる。当業者には明らかであるように、少しの手動での編集を行って、保存されたモチーフ間のアラインメントを最適化することができる。さらに、相同体の同定のために完全長配列を用いる代わりに、特定のドメインを用いることもできる。配列同一性の値を、核酸もしくはアミノ酸配列全体にわたって、または

10

20

30

40

50

選択されたドメインもしくは保存されたモチーフにわたって、デフォルトパラメータを用いる上記のプログラムを用いて決定することができる。部分的アラインメントについては、Smith-Watermanのアルゴリズムが特に有用である(Smith TF, Waterman MS (1981) J. Mol. Biol. 147(1);195-7)。

【0088】

典型的には、これは、公共的に利用可能なNCBIデータベースなどの任意の配列データベースに対して問い合わせ配列をBLASTすることを含む第1のBLASTを含む。ヌクレオチド配列から出発する場合、BLASTNまたはTBLASTX(標準的なデフォルト値を用いる)が、タンパク質配列から出発する場合、BLASTPまたはTBLASTN(標準的なデフォルト値を用いる)が一般に用いられる。BLASTの結果は、場合によりフィルタリングしてもよい。次いで、フィルタリングされた結果またはフィルタリングされていない結果の完全長配列を、問い合わせ配列が誘導される生物に由来する配列に対して戻ってBLASTを行う(第2のBLAST)。次いで、第1および第2のBLASTの結果を比較する。第1のBLASTからの高順位ヒットが、問い合わせ配列が誘導されるのと同じ種に由来し、次いで、戻りBLASTが理想的には最も高いヒットの間で問い合わせ配列をもたらす場合、パラログが同定される; 第1のBLAST中の高順位ヒットが、問い合わせ配列が誘導されるのと同じ種に由来せず、好ましくは、戻りBLASTの際に、最も高いヒットの間で問い合わせ配列をもたらす場合、オルトログが同定される。

【0089】

高順位ヒットは、低いE値を有するものである。E値が低くなるほど、スコアはより有意になる(または換言すれば、ヒットが偶然見出される機会が少なくなる)。E値の計算は当業界で周知である。E値に加えて、比較はまた、同一性パーセンテージによってスコア化される。同一性パーセンテージとは、特定の長さにわたる2つの比較される核酸(またはポリペプチド)配列間の同一のヌクレオチド(またはアミノ酸)の数を指す。大きいファミリーの場合、ClustalWを用いた後、隣接結合樹を用いて、関連する遺伝子のクラスタリングを可視化するのを助け、オルトログおよびパラログを同定することができる。

【0090】

本明細書で定義される用語「ハイブリダイゼーション」は、実質的に相同な相補的ヌクレオチド配列が互いにアニーリングするプロセスである。ハイブリダイゼーションプロセスは、全て溶液中で行ってもよい、すなわち、両方の相補的核酸は溶液中にある。ハイブリダイゼーションプロセスは、相補的核酸の一方を磁気ビーズ、セファロースビーズまたは任意の他の樹脂などのマトリックスに固定して行ってもよい。ハイブリダイゼーションプロセスはさらに、相補的核酸の一方をニトロセルロースもしくはナイロン膜などの固相支持体に固定するか、または例えば、シリカガラス支持体へのフォトリソグラフィーにより固定して行ってもよい(後者は核酸アレイもしくはマイクロアレイまたは核酸チップとして知られる)。ハイブリダイゼーションを起こさせるために、一般には核酸分子を熱的または化学的に変性させて、二本鎖を2つの一本鎖に融解させる、および/または一本鎖核酸からヘアピンもしくは他の二次構造を除去する。

【0091】

用語「ストリンジエンシー」とは、ハイブリダイゼーションが起こる条件を指す。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、温度、塩濃度、イオン強度およびハイブリダイゼーションバッファー組成などの条件によって影響される。一般に、低ストリンジエンシー条件は、規定のイオン強度およびpHで特定の配列の融点(T_m)よりも約30℃低いように選択される。中ストリンジエンシー条件は、温度が T_m より20℃下である場合であり、高ストリンジエンシー条件は、温度が T_m より10℃下である場合である。高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件は、典型的には、標的核酸配列に対する高い配列類似性を有するハイブリダイズする配列を単離するために用いられる。しかしながら、核酸は、遺伝子コードの縮重性のため、配列において外れていてもよく、さらに実質的に同一のポリペプチドをコードしてもよい。従って、中ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件が、そのような核酸分子を同定するために必要となることもあってよい。

10

20

30

40

50

【0092】

T_m は、標的配列の50%が完全に一致したプローブにハイブリダイズする、規定のイオン強度およびpHの下での温度である。 T_m は、溶液条件および塩基組成およびプローブの長さに依存する。例えば、より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションの最大速度は、 T_m より約16℃から32℃下で得られる。ハイブリダイゼーション溶液中の一価陽イオンの存在は、2つの核酸鎖間の静電反発力を低下させ、それによって、ハイブリッド形成を促進する；この効果は、最大0.4Mのナトリウム濃度で可視的である（より高い濃度については、この効果は無視され得る）。ホルムアミドは、DNA-DNAおよびDNA-RNA二本鎖の融点を、それぞれのホルムアミドのパーセントあたり0.6～0.7

低下させ、50%ホルムアミドの添加により30～45℃でハイブリダイゼーションを行うことができるが、ハイブリダイゼーションの速度は低下する。塩基対の不一致は二本鎖のハイブリダイゼーション速度および熱安定性を低下させる。平均して、および大きいプローブについて、 T_m は塩基不一致の1%あたり約1℃低下する。 T_m は、ハイブリッドの型に応じて、以下の式を用いて算出することができる：

1) DNA-DNAハイブリッド (MeinkothおよびWahl, Anal. Biochem., 138: 267-284, 1984)

：

$$T_m = 81.5 + 16.6 \times \log_{10} [Na^+]^a + 0.41 \times \%[G/C^b] - 500 \times [L^c]^{-1} - 0.61 \times \% \text{ホルムアミド}$$

2) DNA-RNAまたはRNA-RNAハイブリッド：

$$T_m = 79.8 + 18.5 (\log_{10} [Na^+]^a) + 0.58 (\%G/C^b) + 11.8 (\%G/C^b)^2 - 820/L^c$$

3) オリゴ-DNAまたはオリゴ-RNA^dハイブリッド：

20個未満のヌクレオチドについて： $T_m = 2 (l_n)$

20～35個のヌクレオチドについて： $T_m = 22 + 1.46 (l_n)$

^a または他の一価陽イオンについて、0.01～0.4Mの範囲でのみ正確である

^b 30%～75%の範囲でのみ%GCについて正確である

^c L = 塩基対中の二本鎖の長さ

^d オリゴ、オリゴヌクレオチド； l_n = 有効なプライマーの長さ = 2ラ (G/C数)+(A/T数)

。

【0093】

例えば、タンパク質を含有する溶液を用いる膜の遮断、ハイブリダイゼーションバッファーへの異種RNA、DNAおよびSDSの添加、ならびにRnaseを用いる処理などのいくつかの公知の技術のいずれか1つを用いて、非特異的結合を制御することができる。非相同的プローブのために、一連のハイブリダイゼーションを、

(i) アニーリング温度を次第に低下させること（例えば、68℃から42℃へ）または

(ii) ホルムアミド濃度を次第に低下させること（例えば、50%から0%へ）

の1つを変化させることにより実施することができる。

【0094】

当業者であれば、ハイブリダイゼーションの間に変化させることができ、ストリンジエンサー条件を維持するか、または変化させる様々なパラメータを知っている。ハイブリダイゼーション条件の他に、ハイブリダイゼーションの特異性は、典型的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄の回数にも依存する。非特異的ハイブリダイゼーションの結果生じるバックグラウンドを除去するために、試料を希釈した塩溶液で洗浄する。そのような洗浄の重要な因子としては、最終的な洗浄溶液のイオン強度および温度が挙げられる：塩濃度が低く、洗浄温度が高くなるほど、洗浄のストリンジエンサーは高くなる。洗浄条件は、典型的には、ハイブリダイゼーションのストリンジエンサーで、またはそれより下で行われる。陽性のハイブリダイゼーションは、バックグラウンドのシグナルの少なくとも2倍のシグナルを与える。一般に、核酸ハイブリダイゼーションアッセイまたは遺伝子増幅検出手順のための好適なストリンジエンター条件は、上記の通りである。より高いか、またはより低いストリンジエンター条件を選択することもできる。当業者であれば、洗浄の間に変化させることができ、ストリンジエンサー条件を維持するか、または変化させる様々なパラメータを知っている。例えば、50ヌクレオチドよりも長いDNAハイブリッドのための

10

20

30

40

50

典型的な高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、1x SSC中65 または1x SSCおよび50%ホルムアミド中42 でのハイブリダイゼーション、次いで、0.3x SSC中65 での洗浄を包含する。50ヌクレオチドよりも長いDNAハイブリッドのための中ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の例は、4x SSC中50 または6x SSCおよび50%ホルムアミド中40 でのハイブリダイゼーション、次いで、2x SSC中50 での洗浄を包含する。ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズする核酸の予測される長さである。既知の配列の核酸がハイブリダイズされる場合、ハイブリッドの長さは、配列を整列させ、本明細書に記載の保存された領域を同定することにより決定することができる。1x SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸ナトリウムである；ハイブリダイゼーション溶液および洗浄溶液は、5x Denhardt試薬、0.5~1.0%SDS、100 μg/ml変性断片化サケ精子DNA、0.5%ピロリン酸ナトリウムをさらに含んでもよい。ストリンジエンシーハイブリダイゼーションのレベルを規定するために、Sambrookら(2001) Molecular Cloning: a laboratory manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, New YorkまたはCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989および毎年のアップデート)を参照することができる。

10

【0095】

タンパク質の「相同体（ホモログ）」は、問題の非改変タンパク質と比較したアミノ酸置換、欠失および/または挿入を有し、それらが誘導される非改変タンパク質と類似する生物活性および機能的活性を有するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質および酵素を包含する。

20

【0096】

欠失とは、タンパク質からの1個以上のアミノ酸の除去を指す。

【0097】

挿入とは、タンパク質中の所定の部位に導入される1個以上のアミノ酸残基を指す。挿入は、N末端および/またはC末端融合物ならびに1個または複数のアミノ酸の配列内挿入を含んでもよい。一般に、アミノ酸配列内の挿入は、約1~10残基のオーダーのNまたはC末端融合物よりも小さい。NまたはC末端融合タンパク質またはペプチドの例としては、酵母2ハイブリッド系において用いられる転写アクチベーターの結合ドメインまたは活性化ドメイン、ファージ外被タンパク質、(ヒスチジン)-6-タグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ-タグ、プロテインA、マルトース-結合タンパク質、ジヒドロ葉酸リダクターゼ、Tag・100エピトープ、c-mycエピトープ、FLAG(登録商標)-エピトープ、lacZ、CMP(カルモジュリン-結合ペプチド)、HAエピトープ、プロテインCエピトープおよびVSVエピトープが挙げられる。

30

【0098】

置換とは、タンパク質のアミノ酸の、類似する特性(類似する疎水性、親水性、抗原性、-ヘリックス構造または-シート構造を形成または破壊する傾向など)を有する他のアミノ酸による置き換えを指す。アミノ酸置換は、典型的には単一の残基のものであるが、ポリペプチドに置かれた機能的制約に応じてクラスターであってもよく、1~10個のアミノ酸であってもよい；挿入は通常、約1~10アミノ酸残基のオーダーのものである。アミノ酸置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換である。保存的置換表は当業界で周知である(例えば、Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company(編)および以下の表1を参照されたい)。

40

【0099】

【表1】

表1:保存的アミノ酸置換の例

残基	保存的置換	残基	保存的置換
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

10

20

30

40

50

本明細書における「内因性」遺伝子に対する参照は、その天然形態で生物中に見出される(すなわち、いかなる人による介入も存在しない)問題の遺伝子を指すだけでなく、微生物中にその後(再)導入される単離された形態の同じ遺伝子(または実質的に相同な核酸/遺伝子)(トランスジーン)も指す。例えば、そのようなトランスジーンを含有するトランスジェニック微生物は、トランスジーン発現の実質的な減少および/または内因性遺伝子の発現の実質的な減少に遭遇し得る。単離された遺伝子は、生物から単離されたものであるか、または例えば、化学合成による人造のものであってもよい。

【0100】

用語「オルトログ」および「パラログ」は、遺伝子の先祖関係を記述するために用いられる進化概念を包含する。パラログは、先祖遺伝子の複製により生じた同じ種内の遺伝子である; オルトログは、種形成により生じた異なる生物に由来する遺伝子であり、共通の先祖遺伝子からも誘導される。

【0101】

本明細書で用いられる用語「スプライス変異体(スプライスバリエント)」は、選択されたイントロンおよび/またはエクソンが切り出された、置き換えられた、取り替えられた、もしくは付加された、またはイントロンが短縮もしくは伸長された核酸配列の変異体を包含する。そのような変異体は、タンパク質の生物活性が実質的に保持されるものである; これは、タンパク質の機能的セグメントを選択的に保持することによって達成することができる。そのようなスプライス変異体は、自然に見出されるものであるか、または人造のものであってもよい。そのようなスプライス変異体を予測し、単離するための方法は、当業界で周知である(例えば、FoissacおよびSchiex (2005) BMC Bioinformatics 6: 25を参照されたい)。

【0102】

対立遺伝子(アレル)または対立遺伝子変異体(アレルバリエント)は、同じ染色体位置に位置する、所与の遺伝子の代替形態である。対立遺伝子変異体は、単一ヌクレオチド多型(SNP)、ならびに小挿入/欠失多型(INDEL)を包含する。INDELのサイズは通常、100bp未満である。SNPおよびINDELは、多くの生物の自然に存在する多型株において最大のセットの配列変異体を形成する。

(好みしい実施形態の詳細な説明)

第1の態様において、本発明は、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性の群から選択される活性の少なくとも1つを含む組換え微生物であって、EasA活性がEasAリダクターゼもしくはEasAイソメラーゼ活性であってもよく、またはEasAリダクターゼおよびEasAイソメラーゼ活性であってもよく、組換え微生物が天然麦角アルカロイド産

生生物ではない、上記組換え微生物を提供する。

【0103】

好ましくは、組換え微生物は、少なくとも1つのEasHおよびEasD活性を含むか、または少なくとも1つのEasHおよびEasAリダクターゼ活性を含むか、または少なくとも1つのEasH、EasAリダクターゼ活性およびEasD活性を含むか、または少なくとも1つのEasHおよびEasD、EasAおよびEasG活性、さらにより好ましくは少なくとも1つのEasH、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性を含む。

【0104】

別の実施形態においては、組換え微生物は、少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性、好ましくは少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性を含む。

【0105】

さらなる実施形態においては、組換え微生物は、少なくとも1つのEasD、EasAおよびEasG活性、または少なくとも1つのEasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性、または少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性、または少なくとも1つのEasD、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性を含む。

【0106】

組換え微生物はまた、少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性、または1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性、または少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性を含んでもよい。

【0107】

さらなる実施形態においては、組換え微生物は、少なくとも1つのDmaW、EasF、EasEおよびEasC活性、または少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasCおよびEasD活性を含む。

【0108】

一実施形態において、組換え微生物は、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性の群から選択される活性の少なくとも2つを含み、ここでEasA活性はEasAリダクターゼもしくはEasAイソメラーゼ活性であってもよく、またはEasAリダクターゼおよびEasAイソメラーゼ活性であってもよく、これらの活性は、同じか、または異なる天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができるポリペプチドによって媒介され、例えば、一実施形態においては、組換え微生物は、1種の天然麦角アルカロイド產生生物または異なる天然麦角アルカロイド產生生物から得られる少なくともEasHおよびEasD、または少なくともEasHおよびEasA、または少なくともEasH、EasDおよびEasA活性を含む。さらなる例示的な実施形態においては、組換え生物は、1種の天然麦角アルカロイド產生生物から得られる少なくともEasFおよびEasE、または少なくともEasFおよびEasC、または少なくともEasF、EasEおよびEasC活性を含む。

【0109】

天然麦角アルカロイド產生生物は、自然に存在し、少なくとも1種の麦角アルカロイドを產生する能力を有する生物である。天然麦角アルカロイド產生生物は、クラビシピタセア(Clavicipitaceae)、アルトロデルマタセア(Arthrodemataceae)およびトリココマセア(Trichocomaceae)、特に、アルトロデルマ・ベンハミア(Arthroderra benhamiae)、クラビケプス(Claviceps)種、ネオティフォジウム(Neotyphodium)種、エピクロエ(Epichloee)種、スファセリア(Sphacelia)種、バランシア(Balansia)種またはペリグランデュラ(Periglandula)種、アスペルギルス(Aspergillus)種およびペニシリウム(Penicillium)種、ペシロミセス(Paecylomyces)種、トリコフィトン(Trichophyton)種、アルトデルマ(Arthroderra)種、メタリジウム(Metarrhizium)種、ハイポクレア(Hypocreale)種、アジェロミセス(Ajellomyces)種、ニューロスpora(Neurospora)種、パラコクシジオイデス(Paracoccidioides)種、ボトリオチニア(Botryotinia)種に属する。天然麦角アルカロイド產生生物の個々の種の例は、本発明の開示を通して記載される。

【0110】

10

20

30

40

50

天然麦角アルカロイド產生生物ならびに麦角アルカロイド產生のための遺伝子クラスターに関する情報は、例えば、Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva Kら(2013) Plant-Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the Clavicipitaceae Reveals Dynamics of Alkaloid Loci. PLoS Genet 9(2): e1003323. doi:10.1371/journal.pgen.1003323、およびSchardl CLら、「The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses」、Curr Opin Plant Biol (2013), 16:1-9に見出すことができる。

【0111】

好ましくは、前記組換え微生物は、天然麦角アルカロイド產生生物ではない、細菌、酵母、放線菌、または糸状菌である。そのような糸状菌は、子囊菌、不完全菌類、または担子菌であってもよく、好ましい種は、シゾフィルム・コミュン(*Schizophyllum commune*)である。

10

【0112】

本発明の宿主細胞として用いられる好ましい細菌は、大腸菌(*Escherichia coli*)およびバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)からなる群より選択される。

【0113】

好ましい酵母は、クルイベロミセス(*Kluyveromyces*)、サッカロミセス(*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス(*Schizosaccharomyces*)、ヤロウイア(*Yarrowia*)およびピチア(*Pichia*)からなる群より選択される。

20

【0114】

より好ましいのは、クルイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)およびピチア・スチピテス(*Pichia stipites*)からなる群より選択される組換え微生物である。

【0115】

さらにより好ましくは、組換え微生物は、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)である。

【0116】

本発明は、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性からなる群より選択される少なくとも1つの上方調節された活性を有する組換え天然麦角アルカロイド產生生物も包含する。

30

【0117】

一実施形態において、組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも上方調節されたEasHおよびEasD、EasAおよびEasG活性、さらにより好ましくは、上方調節されたEasH、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性を含む。

【0118】

別の実施形態においては、組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性、好ましくは少なくとも上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性を含む。

40

【0119】

さらなる実施形態においては、組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも上方調節されたEasD、EasAおよびEasG活性、または少なくとも上方調節されたEasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性、または少なくとも上方調節されたEasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性、または少なくとも上方調節されたEasD、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性を含む。

【0120】

組換え天然麦角アルカロイド產生生物はまた、少なくとも上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性、または上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性、または上方調節されたDmaW、Ea

50

sF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性を含んでもよい。

【0121】

さらなる実施形態において、組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、少なくとも上方調節されたDmaW、EasF、EasEおよびEasC活性、または上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasCおよびEasD活性を含む。

【0122】

さらなる実施形態において、組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性の群から選択される少なくとも1つの下方調節された活性を含む。

10

【0123】

一実施形態においては、組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性の群から選択される少なくとも1つの上方調節された活性を含み、EasA活性はEasAリダクターゼもしくはEasAイソメラーゼ活性であってもよく、またはEasAリダクターゼおよびEasAイソメラーゼ活性であってもよく、これらの活性は、同じか、または異なる天然麦角アルカロイド産生生物から得られるポリペプチドにより媒介され、例えば、一実施形態においては、組換え微生物は、1種の天然麦角アルカロイド産生生物または異なる天然麦角アルカロイド産生生物から得られる少なくともEasHおよびEasD、または少なくともEasHおよびEasA、または少なくともEasH、EasDおよびEasA活性を含む。さらに例示的な実施形態においては、組換え生物は、1種の天然麦角アルカロイド産生生物または異なる天然麦角アルカロイド産生生物から得られる少なくともEasFおよびEasE、または少なくともEasFおよびEasC、または少なくともEasF、EasEおよびEasCを含む。

20

【0124】

好みしくは、組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、クラビシピタセア(*Clavicipitaceae*)、アルトロデルマタセア(*Arthrodemataceae*)およびトリココマセア(*Trichocomaceae*)、特に、アルトロデルマ・ベンハミア(*Arthroderra benhamiae*)、クラビケプス(*Claviceps*)種、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種、エピクロエ(*Epichloee*)種、スファセリア(*Sphacelia*)種、バランシア(*Balansia*)種もしくはペリグランデュラ(*Periglandula*)種、アスペルギルス(*Aspergillus*)種およびペニシリウム(*Penicillium*)種、ペシロミセス(*Paecylomyces*)種、トリコフィトン(*Trichophyton*)種、アルトデルマ(*Arthoderma*)種、メタリジウム(*Metarrhizium*)種、ハイポクレア(*Hypocreae*)種、アジェロミセス(*Ajellomyces*)種、ニューロスボラ(*Neurospora*)種、パラコクシジオイデス(*Paracoccidioides*)種、ボトリオチニア(*Botryotinia*)種の群から選択されるか、またはアスペルギルス属、特に、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・アクレアタス(*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・ケシエルス(*Aspergillus caesiellus*)、アスペルギルス・カンジダス(*Aspergillus candidus*)、アスペルギルス・カルネウス(*Aspergillus carneus*)、アスペルギルス・クラバタス(*Aspergillus clavatus*)、アスペルギルス・デフレクタス(*Aspergillus deflectus*)、アスペルギルス・フィシェリアヌス(*Aspergillus fischerianus*)、アスペルギルス・フラバス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・グラウカス(*Aspergillus glaucus*)、アスペルギルス・オクラセウス(*Aspergillus ochraceus*)、アスペルギルス・パラシチクス(*Aspergillus parasiticus*)、アスペルギルス・ペニシロイデス(*Aspergillus penicilloides*)、アスペルギルス・レストリクタス(*Aspergillus restrictus*)、アスペルギルス・ソジャエ(*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・タマリ(*Aspergillus tamari*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス・ウスタス(*Aspergillus ustus*)、アスペルギルス・ベルシコロル(*Aspergillus versicolor*)からなる群より選択される；より好みしくは、組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergill*

30

40

50

50

us fumigatus)、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)およびアスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)からなる群より選択されるか、または

ペニシリウム(Penicillium)属、例えば、ペニシリウム・オーランティオグリセウム(Penicillium aurantiogriseum)、ペニシリウム・ビライエ(Penicillium bilaiae)、ペニシリウム・カメンベルティ(Penicillium camemberti)、ペニシリウム・カンジダム(Penicillium candidum)、ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum)、ペニシリウム・クラビフォルム(Penicillium claviforme)、ペニシリウム・コミュン(Penicillium commune)、ペニシリウム・シトリナム(Penicillium citrinum)、ペニシリウム・コリロフィナム(Penicillium corylophinum)、ペニシリウム・コミュン(Penicillium comune)、ペニシリウム・フェルタナム(Penicillium fellutanum)、ペニシリウム・ワクスマニ(Penicillium waksmanii)、ペニシリウム・クルストサム(Penicillium crustosum)、ペニシリウム・ジギタタム(Penicillium digitatum)、ペニシリウム・エクスパンサム(Penicillium expansum)、ペニシリウム・フニクロサム(Penicillium funiculosum)、ペニシリウム・グラブラム(Penicillium glabrum)、ペニシリウム・グラウカム(Penicillium glaucum)、ペニシリウム・イタリカム(Penicillium italicum)、ペニシリウム・ラクサルミエンティ(Penicillium lacussarmientei)、ペニシリウム・マルネフェイ(Penicillium marneffei)、ペニシリウム・ブルブロゲナム(Penicillium purpurogenum)、ペニシリウム・ロケフォルティ(Penicillium roqueforti)、ペニシリウム・ストロニフェルム(Penicillium stoloniferum)、ペニシリウム・ウライエンス(Penicillium ulaiense)、ペニシリウム・ベルコサム(Penicillium verrucosum)、ペニシリウム・ビリジカタム(Penicillium viridicatum);
または

クラビケプス(Claviceps)属、例えば、クラビケプス・アフリカーナ(Claviceps africana)、クラビケプス・ギガンテア(Claviceps gigantea)、クラビケプス・グロヒイ(Claviceps grohii)、クラビケプス・シペリ(Claviceps cyperi)、クラビケプス・フシフォルミス(Claviceps fusiformis)、クラビケプス・ヒルテラ(Claviceps hirtella)、クラビケプス・ニグリカンス(Claviceps nigricans)、クラビケプス・パスパリ(Claviceps paspali)、クラビケプス・ブルプレア(Claviceps purpurea)、クラビケプス・ソルギ(Claviceps sorghi)、クラビケプス・ジザニア(Claviceps zizaniae)、好ましくは、クラビケプス・アフリカーナ(Claviceps africana)、クラビケプス・パスパリ(Claviceps paspali)、もしくはクラビケプス・ブルプレア(Claviceps purpurea)、または
ペシロミセス(Paecilomyces)属、例えば、ペシロミセス・ジバリカタス(Paecilomyces di varicatus)、アルトロデルマ(Arthrodlerma)属、例えば、アルトロデルマ・ベンハミア(Arthrodlerma benhamiae)、もしくはトリコフィトン(Trichophyton)属、例えば、トリコフィトン・ベルコサム(Trichophyton verrucosum)、もしくはミクロスボルム(Microsporum)属、例えば、ミクロスボルム・カニス(Microsporum canis)からなる群より選択される。

〔 0 1 2 5 〕

さらにより好ましいのは、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなる群より、好ましくは、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)

aviceps purpurea)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなる群より選択される組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0126】

組換え天然麦角アルカロイド產生生物を用いて、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、またはカノクラビンIの少なくとも1つを產生させることができる。より多くのシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIを提供するために活性を上方調節および/または下方調節するべきであることに関するさらなる指針は、図1および図2に含まれる。

10

【0127】

例えば、組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、上方調節されたEasH活性を有する、好ましくは、上方調節されたEasHおよびEasAリダクターゼ活性ならびに下方調節されたEasAイソメラーゼ活性を有する、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・プルプレア(*Claviceps purpurea*)、またはクラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)の細胞である。

【0128】

上記の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物は全て、好ましくは、トリプトファンおよび/もしくはDMAPPの拡大された細胞内供給ならびに/またはMe-DMATの拡大された細胞内供給を含む。DMAPPおよび/またはMe-DMATのこの拡大された細胞内供給を、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物のメバロネット経路の遺伝子またはポリペプチドの活性を上方調節することによって提供することができる。サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)のメバロネット経路の遺伝子およびポリペプチドの例は、配列番号12、13、14、15、16、17、または18により記載される。これらの遺伝子の相同体およびその配列変異体は、当業者には容易に利用可能である。

20

【0129】

例えば、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、ERG9、およびERG20活性の群より選択される少なくとも1つの下方調節された活性を含んでもよく、または少なくとも1つの上方調節されたHMG-CoAリダクターゼ活性を含んでもよい、またはERG9およびERG20活性の群より選択される少なくとも1つの下方調節された活性ならびに少なくとも1つの上方調節されたHMG-CoAリダクターゼ活性を含んでもよい。

30

【0130】

従って、本発明は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドに加えて、本明細書に記載されるクラビン型アルカロイドの合成のための出発材料としてのトリプトファンの合成に必要とされるか、またはそれを容易にするポリヌクレオチドを含む組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物を想定する。より好ましくは、そのような酵素は、トリプトファン合成酵素である。トリプトファンの生合成に関するさらなる詳細は、例えば、Radwanski 1995, *Plant Cell* 7(7): 921-934に見出すことができる。

【0131】

本発明の一実施形態においては、上記の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも1つのEasH活性をコードする、または少なくとも1つのEasHおよびEasD活性をコードする、または少なくとも1つのEasAリダクターゼもしくは少なくとも1つのEasAイソメラーゼ活性をコードする、または少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasH、EasD、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasH、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasH、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも2つの上記の代替物をコードする、少なくとも1つの組換えポリヌクレオチドを含む。

40

50

【0132】

従って、本発明のさらなる実施形態は、少なくとも1つのEasH活性をコードする、または少なくとも1つのEasHおよびEasD活性をコードする、または少なくとも1つのEasAリダクターゼもしくは少なくとも1つのEasAイソメラーゼ活性をコードする、または少なくとも1つのEasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasH、EasD、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも1つのEasH、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性をコードする、または少なくとも2つの上記の代替物をコードする、組換えポリヌクレオチドである。

10

【0133】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのDmaW活性は、好ましくは、

a)配列番号145および146に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号147および/または190に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号1、19、20、179および/または180に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

e)配列番号102、122および/または123に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

f)配列番号129および/または137に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

g)配列番号102、122、123、129および/または137により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

h)配列番号102、122、123、129および/または137にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

i) a) ~ h)の少なくとも2つに記載の、好ましくは少なくともb)およびc)に記載のポリペプチド、ならびに

j)天然麦角アルカロイド産生生物から得られるa) ~ i)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

20

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

40

【0134】

DmaW活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド産生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Clavice*

50

ps hirtella)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コミュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペニシリウム・パリタンス(*Penicillium palitans*)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはアルトロデルマ・ベンタミア(*Arthroderra benthamiae*)、アルトロデルマ・オタ(*Arthroderra otae*)、エピクロエ・プラキエリトリ(*Epichloe brachyelytri*)、エピクロエ・フェスツカエ(*Epichloe festucae*)、エピクロエ・グリセリア(*Epichloe glyceriae*)、エピクロエ・ティフィナ(*Epichloe typhina*)、マルブランシェア・オーランティアカ(*Malbrancheda aurantiaca*)、ミクロスボルム・カニス(*Microsporum canis*)、メタリジウム・アクリダム(*Metarrhizium acridum*)、メタリジウム・ロベルトシ(*Metarrhizium robertsii*)、ペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)、トリコフィトン・エクイナム(*Trichophyton equinum*)、およびトリコフィトン・トンスランス(*Trichophyton tonsurans*)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド產生生物から得られる。

【0135】

DmaW活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本明細書に開示されるDmaW活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する配列情報により提供される配列情報に基づいて設計された、PCRプライマーを用いるPCR法を介してゲノム断片またはcDNA断片を増幅することにより、上記に列挙された生物から取得することができる。通常、これらの方法において用いられるPCRプライマーのセットは、DmaW活性を有し、本明細書に開示されるポリペプチドをコードする配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、28個であるが、100、90、80、70、60、50、40または30個未満の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーからなる。好ましくは、PCRプライマーは、増幅されるポリヌクレオチドの配列に、ヌクレオチドの不一致なく結合する。同じ方法は、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの、対応する活性を有するポリペプチドに関する本明細書で提供される配列情報を用いた増幅にも適用される。

【0136】

好ましくは、DmaW活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表2に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。

【0137】

10

20

30

40

50

【表2】

表2:DmaW活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号:	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
A. japonicus 配列番号: 19		66%	67%	66%	64%	62%	62%	61%	58%	56%
P. divaricatus 配列番号: 20			66%	65%	65%	64%	64%	65%	62%	60%
T. equinum 配列番号: 21				62%	60%	58%	61%	59%	57%	58%
A. fumigatus 配列番号: 22					63%	61%	61%	62%	57%	56%
E. brachyelytri 配列番号: 23						67%	70%	92%	66%	66%
M. robertsii 配列番号: 24							75%	67%	68%	67%
P. ipomoeae 配列番号: 25								67%	76%	75%
N. coenop. 配列番号: 26									64%	65%
B. obtecta 配列番号: 27										69%

10

20

30

40

50

好ましくは、DmaW活性を有するポリペプチドは、以下に記載のDmaWシグナチャ配列の少なくとも1つを含むか、またはそれらはDmaWコンセンサス配列を含む。好ましくは、それらは両方のDmaWシグナチャ配列を含み、さらにより好ましくは、それらは両方のDmaWシグナチャ配列およびDmaWコンセンサス配列を含む。DmaWシグナチャ配列およびコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表2で特定され、図3a～図3dに示される配列のDmaW配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。

【0138】

DmaWシグナチャ配列1(配列番号124) :

IXTQNKLALDLXXXFXXXKXYXYPXLKXXTG。

【0139】

DmaWシグナチャ配列2(配列番号125) :

RLXSCDLXXPXRKXKIYXXEXXVXLXXXEDLWTXGGXXXDXXTXGLXXLRELWXLXXXXXXXXXPXXXLXXGXXPXXEXLPXMXNXTXXH。

【0140】

DmaWコンセンサス配列(配列番号126) :

MXXXNXXXXVYXTLSXXFDXXXXQXLWWHSTAPMFAXMLQTAXYXXHXQYXHLGIYKKXXIPFLGVYPTXXXRWLSILTRYGTPFEISLNCXSXSXRVTYEPINAATGTXKDPFNTXAIWXSLXXLXXXQXGIDLEWFXYFKXXLTXXXESAYLXXNNXLVXXQIKTQNKLALDLKGXXFVLKTYIYPALKSXATGKSXHELXFGSVRLSXXXPSIXXPLXXLEXYVXSRGXXXXXXXSTXSPRLLSCDLXDPXKSRVKIYLLERMVSLXAMEDLWTLGGRRXDXSTLXGLEMIRELWXLXXLPXGLXXYPYXLXLGXIPXEQPLMANYTLHHDXDPXPEPQVYFTXFGMNDXXXXXALTFFERRGWXXMAXXYKXXLXXXYPHDXEXLYLHAYISFSYRXNKPYLSVYLHSFETGDWPXXXXXXFXXXR。

【 0 1 4 1 】

DmaWコンセンサス配列2(配列番号190) :

MXTXNXSXXEVYXTLSXXFDFPNXDQXLWWHSTAPMFAXMLQTANYXXHQYXHLGIYKKHVIPFLGVYPTXXKXRWLSILTRYGTPFELSLNCSXSXVRYTYEPINAATGTXKDPFNTXAIXWSLQLXXXQXGIDLEWFXYFKXELTLXXXESAYLXXNNXLVXXQIKTQNKLALDLKGXXFVLKTYIYPALKSXATGKSIHELFSGSVXRLSXXXPSIRXPLXXLEXYVXSRNXXXXXXXLSPRLLSCDLXDPXKSRVKIYLLERMVSLXAMEDLWTLGGRRDXSTXXGLXMIRELWXLLXXPXGLXXYPXPYLPLGXIPXEQLPSMANYTLHHDXDPXPEPQVYFTVFGMNDMXVXDALTFFERRGWXXMAXKYKAXLXXSYPHXDHEXLNYLHAYISFSYRXNKPYLSVYLHSFETGDW。

【 0 1 4 2 】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのDmaW活性は、

a)配列番号19に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号19に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号190に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも89%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図3に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号180に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号180に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号190に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも89%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図3に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

e)天然麦角アルカロイド産生生物から得られるa)~d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 4 3 】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasF活性は、好ましくは、

a)配列番号154に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号6、75および/もしくは76に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

c)配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/もしくは85に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号107および/もしくは120に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

10

20

30

40

50

e) 配列番号134および/もしくは142に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

f) 配列番号107、120、134および/もしくは142により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g) 配列番号107、120、134および/もしくは142にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

h)a) ~ g)の少なくとも2つに記載の、好ましくは少なくともa)およびb)に記載のポリペプチド、ならびに

i) 天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa) ~ h)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0144】

EasF活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コミュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophilum*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペニシリウム・パリタンス(*Penicillium palitans*)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces di varicatus*)からなるか、またはアルトロデルマ・ベンタミア(*Arthroderma benthamiae*)、アルトロデルマ・ジブセウム(*Arthroderma gypseum*)、アルトロデルマ・オタ(*Arthroderma otae*)、エピクロエ・ブラキエリトリ(*Epichloe brachyelytri*)、エピクロエ・フェスツカエ(*Epichloe festucae*)、エピクロエ・グリセリア(*Epichloe glyceriae*)、エピクロエ・ティフィナ(*Epichloe typhina*)、マルブランシェア・オーランティアカ(*Malbrancheda aurantiaca*)、ミクロスボルム・カニス(*Microsporum canis*)、メタリジウム・アクリダム(*Metarhizium acridum*)、メタリジウム・ロベルトシ(*Metarhizium robertsii*)、ペリグランドュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)、トリコフィトン・エクイナム(*Trichophyton equinum*)、トリコフィトン・ルブルム(*Trichophyton rubrum*)、トリコフィトン・トン

10

20

30

40

50

スランス(*Trichophyton tonsurans*)およびトリコフィトン・ベルコサム(*Trichophyton verrucosum*)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルプレア(*Claviceps purpurea*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド産生生物から得られる。

【0145】

好ましくは、EasF活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表3に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。

10

【0146】

【表3】

表3:EasF活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号:	75	76	77	78	79	80	82	81	83	84	85
Aspergillus japonicus 配列番号: 6	65%	67%	68%	67%	61%	61%	56%	58%	57%	56%	53%
Paecilomyces divaricatus 配列番号: 75		67%	72%	71%	63%	64%	60%	62%	60%	60%	59%
Aspergillus fumigatus 配列番号: 76			65%	64%	61%	61%	58%	57%	55%	54%	54%
Arthroderra otae 配列番号: 77				88%	66%	66%	63%	62%	58%	60%	60%
Trichophyton equinum 配列番号: 78					66%	66%	62%	62%	57%	58%	58%
Epichloe brachyelytri 配列番号: 79						95%	64%	66%	60%	61%	63%
Neotyphodium lolii 配列番号: 80							64%	66%	60%	60%	62%
Periglandula ipomoeae 配列番号: 82								74%	68%	74%	76%
Metarrhizium robertsii 配列番号: 81									64%	72%	69%
Claviceps paspali 配列番号: 83										65%	68%
Claviceps purpurea 配列番号: 84											73%
Claviceps fusiformis 配列番号: 85											

20

30

40

好ましくは、EasF活性を有するポリペプチドは、EasFコンセンサス配列を含む。EasFコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表3で特定され、図4a～図4cに示される配列のEasF配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有

50

するアミノ酸を表す。

【0147】

EasFコンセンサス配列(配列番号154) :

MXXPVIDIRXSXFEDSIPDQVIXGLXSXPKTPALLFYSNEGLXHWNHHSHQPDFYPRHQEIXILKXXKAXEMAASIAXN
SVVVVLDGSASLDKV1HLLEALEAQXKXVTYYALDLASQLXSTLXA1PTXQXFRHVRFAGLHGTFFDGLXWLXETPE1RD
LPHCVLLFGLT1GNFSRPNAAFLRN1AXHALXGXSSXQSS1LLSLDSCKVPTQVLRAYTAEGVVPFALQSLTYANTLFX
XKXXXXXXXXXXXXVNPDDWYYLSEWNFVLGRHEASL1PRSKD1XLGAPLDX1VVRKDEKVRFGCSYKYDXXERXELFX
AAGLKDEXXWSXEGCDVAFYQLKL。

【0148】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasF活性は、

a)配列番号6に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号6に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号154に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも79%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図4に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号75に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号6に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号154に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも83%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図4に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

e)配列番号76に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

f)配列番号76に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号154に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも78%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図4に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、ならびに

g)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)~f)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0149】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasE活性は、好ましくは、

a)配列番号153、185および/もしくは191に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、好ましくは、配列番

10

20

30

40

50

号191に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号5および/もしくは64に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号5、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73および/もしくは74に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するか、または配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/もしくは178に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号106に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

e)配列番号133および/もしくは141に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

f)配列番号106、133および/もしくは141により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

g)配列番号106、133および/もしくは141にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

h)a)～g)の少なくとも2つに記載の、好ましくは少なくともa)およびb)に記載のポリペプチド、ならびに

i)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)～h)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0150】

好ましくは、コードされるポリペプチドは、小胞体への選別シグナルとして機能することができるN末端配列を有する。

【0151】

EasE活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balanisia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフィオジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフィオジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフィオジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コミュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペニシリウム・パリタンス(*Penicillium palitans*)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus*

10

20

30

40

50

fumigatus)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスピリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium felutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはアルトロデルマ・ベンタミア(*Arthroderma benthamiae*)、アルトロデルマ・ジブセウム(*Arthroderma gypseum*)、アルトロデルマ・オタ(*Arthroderra otiae*)、エピクロエ・ブラキエリトリ(*Epichloe brachyelytri*)、エピクロエ・フェスツカエ(*Epichloe festucae*)、エピクロエ・グリセリア(*Epichloe glyceriae*)、エピクロエ・ティフィナ(*Epichloe typhina*)、マルブランシェア・オーランティアカ(*Malbranchea aurantiaca*)、ミクロスボルム・カニス(*Microsporum canis*)、メタリジウム・アクリダム(*Metarhizium acridum*)、メタリジウム・ロベルトシ(*Metarhizium robertsii*)、ペリグランドュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)、トリコフィトン・エクイナム(*Trichophyton equinum*)、トリコフィトン・ルブルム(*Trychophyton rubrum*)、トリコフィトン・トンスラヌス(*Trichophyton tonsurans*)およびトリコフィトン・ベルコサム(*Trichophyton verrucosum*)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド産生生物から得られる。
10
20

【0152】

好ましくはEasE活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表4に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。

【0153】

【表4】

表4:EasE活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号	64	175	66	67	68	69	176	71	177	73	178
Aspergillus japonicus 配列番号 5	56%	53%	46%	48%	46%	48%	54%	46%	52%	48%	49%
Paecilomyces divaricatus 配列番号 64		56%	54%	50%	54%	50%	54%	50%	57%	48%	57%
Arthroderra otae 配列番号 175			76%	48%	78%	48%	51%	48%	79%	48%	79%
Trichophyton tonsurans 配列番号 66				47%	90%	47%	49%	47%	83%	47%	5%
Epichloe brachyelytri 配列番号 67					47%	94%	49%	55%	50%	52%	50%
Trichophyton verrucosum 配列番号 68						47%	49%	46%	85%	46%	97%
Neotyphodium lolii 配列番号 69							50%	54%	49%	50%	49%
Aspergillus fumigatus 配列番号 176								51%	50%	49%	50%
Periglandula ipomoeae 配列番号 71									49%	73%	48%
Arthroderra gypseum 配列番号 177										49%	87%
Claviceps purpurea 配列番号 73											48%
Arthroderra benhamiae 配列番号 178											

好ましくは、EasE活性を有するポリペプチドは、EasEコンセンサス配列を含む。EasEコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表4で特定され、図5a～図5eに示される配列のEasE配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。

【0154】

EasEコンセンサス配列(配列番号153)：

MXXLVXXXXXXXXXXXXXXXCRCPWEXCWPSSXXWSXNXSIDGXLXXLRPIAXVCHXPXFDSACXXLLXLS
RDSGRASNPGLQDWVWEAGXTANESCPVGSXRXXSXXXSCHQGRIPLYSAAVESTXQVQXAVRFARRHNLRLVIRNTG
HDXAGRSSAPDSFQIHTHRLQEIXFHXNFRLXGSXXXXTSLGXPATVGAGVMMGELYAXGARXGYMLGGECPTVGVVG
GFLQGGGVSSFLSFXXGLAVDNVLEYEVVTAXGELVVANAHQNQDLFWALRGGGGTFGVVTRATMRVFPDVVVSEIL
LXAXXAXSSFWTXGLSXLLTALQSLNQDNVGGQLVIXXXXXKDAVQASIXLFFLNMTEXAXIDXRMKPXLTXLSXXIXYT
XSSKXLPXXSSXLRXXPDIHPDNXYGILXSSVLISQXLFXSSEGPKVAXXLAXLPMSPXDLLFTSNLGGRVIANGXXEL
AETSMHPAWRSAAQLINYVRTVXEPSIEGKAXALELTXNQMPILYAIDPXFKLSSYRNLGDPNEKDFQQVYWGDXNXYGRL
SXIKKKWDPDDLFFSKLGVGSEWDSEGMCRKXXXXQXXLXQXLXXLXS.

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

EasEコンセンサス配列2(配列番号153) :

LLTXGLVALLSWIYTXXTXXXSCRCPWESCPWPSEEXWXLNTSIDGXLVRLRPIAHVCHGPXFDXSACDNLLXLSRDS
GWRASNPGLQDWVWEAGXTANECPVGSXRXXSXXXSCHQGRIPLYSAAVESTXQVQXAVRFARRHNLRLVIRNTGHDX
AGRSSAPDSFQIHTHRLQEIXFHXNFRLXGSXXXXTSLGXPATVVGAGVMMGELYAXGARXGYMVLGGECPTEGVVGGFL
QGGGVSSFLSFXXGLAVDNVLEYEVVTAXGELVVANAHQNQDLFWALRGGGGGTGFVVTATMRVFPDVPVVSEILLXA
XXAXSSFWTXGLSLLTALQSLNQDNVGGQLVIXXXXKDAVQASIXLFFLNMTEXAXIDXRMPXLTXLSSXNIXYTXSS
KXLPXXSSXLXXPDIHPDNXYGILXSSVLISQXLFXSSEGPXKVAXXLAXLPMSPXDLFTSNLGGRVIANGXXELAET
SMHPAWRSAAQLINYVRTVXEPSIEGKAXALEXLTNXQMPILYAIDPXFKLSYRNLDGPNEKDFQQVYWGDXNXYGRLSX
KKKWDPPDDLFSSKLGVGSEXDSEGMCRKXXXXQXXLXQXLXXLXS.

10

【 0 1 5 6 】

EasEコアコンセンサス配列(配列番号191) :

CRCPWESCPWPSEEXWXLNTSIDGXLVRLRPIAHVCHGPXFDXSACDNLLXLSRDSGWRASNPGLQDWVWEAGXTANE
SCPVGSXRXXXXSCHQGRIPLYSAAVESTXQVQXAVRFARRHNLRLVIRNTGHDXAGRSSAPDSFQIHTHRLQEIXFH
XNFRLXGSXXXXTSLGXPATVVGAGVMMGELYAXGARXGYMVLGGECPTEGVVGGFLQGGGVSSFLSFXXGLAVDNVLEY
EVVTAXGELVVANAHQNQDLFWALRGGGGGTGFVVTATMRVFPDVPVVSEILLXAXXAXSSFWTXGLSLLTALQSLN
QDNVGGQLVIXXXXKDAVQASIXLFFLNMTEXAXIDXRMPXLTXLSSXNIXYTXSSXLPXXSSLRXXPDIHPDNXYG
ILXSSVLISQXLFXSSEGPXKVAXXLAXLPMSPXDLFTSNLGGRVIANGXXELAETSMHPAWRSAAQLINYVRTVXEPS
IEGKAXALEXLTNXQMPILYAIDPXFKLSYRNLDGPNEKDFQQVYWGDXNXYGRLSXKKKWDPPDDLFSSKLGVGSEXD
EGMCRK.

20

【 0 1 5 7 】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのEasE活性は、

a)配列番号5に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号5に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号191に対する少なくとも70%、好ましくは少なくとも73%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図5に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号64に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号64に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号191に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも79%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図5に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

e)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)~d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

30

【 0 1 5 8 】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasC活性は、好ましくは、

40

50

a)配列番号151および/もしくは192に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

b)配列番号3および/もしくは41に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

c)配列番号3もしくは41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/もしくは52に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

d)配列番号104に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

e)配列番号131もしくは139に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

f)配列番号104、131および/もしくは139により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g)配列番号104、131および/もしくは139にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

h)a)～g)の少なくとも2つに記載の、好ましくは少なくともa)およびb)に記載のポリペプチド、ならびに

i)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)～h)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0159】

EasC活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフィオジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフィオジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフィオジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コムニュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペニシリウム・パリタンス(*Penicillium palitans*)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリ

10
20
30
40
50

ロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium felutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフオルティ(*Penicillium roqueforti*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはアルトロデルマ・ベンタミア(*Arthroderma benthamiae*)、アルトロデルマ・ジプセウム(*Arthroderma gypseum*)、アルトロデルマ・オタ(*Arthroderma otae*)、エピクロエ・プラキエリトリ(*Epichloe brachyelytri*)、エピクロエ・フェスツカエ(*Epichloe festucae*)、エピクロエ・グリセリア(*Epichloe glyceriae*)、エピクロエ・ティフィナ(*Epichloe typhina*)、メタリジウム・アクリダム(*Metarhizium acridum*)、メタリジウム・ロベルトシ(*Metarhizium robertsii*)、ペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)、トリコフィトン・エクイナム(*Trichophyton equinum*)、トリコフィトン・ルブルム(*Trychophyton rubrum*)およびトリコフィトン・ベルコサム(*Trichophyton verrucosum*)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・ブルプレア(*Claviceps purpurea*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド產生生物から得られる。
10

【0160】

好ましくはEasC活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表5に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。
20

【0161】

【表5】

表5:EasC活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Aspergillus japonicus 配列番号 3	72%	76%	63%	62%	58%	58%	54%	59%	57%	48%	48%	48%
Paecilomyces divaricatus 配列番号 41		73%	68%	66%	58%	59%	54%	60%	58%	49%	50%	50%
Aspergillus fumigatus 配列番号 42			65%	64%	58%	61%	51%	59%	56%	45%	45%	46%
Trichophyton rubrum 配列番号 43				92%	58%	59%	51%	58%	57%	45%	44%	44%
Arthroderma otae 配列番号 44					60%	59%	50%	58%	58%	43%	42%	43%
Periglandula ipomoeae 配列番号 45						74%	47%	79%	79%	42%	43%	42%
Epichloe festucae 配列番号 46							49%	74%	70%	43%	42%	43%
Hypocrea atroviridis 配列番号 47								47%	47%	48%	50%	48%
Metarhizium robertsii 配列番号 48									73%	45%	45%	45%
Claviceps purpurea 配列番号 49										42%	43%	44%
Aspergillus terreus 配列番号 50											85%	84%
Penicillium marneffei 配列番号 51												86%
Ajellomyces dermatitidis 配列番号 52												

好ましくは、EasC活性を有するポリペプチドは、EasCコンセンサス配列を含む。EasCコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表5で特定され、図6a～図6dに示される配列のEasC配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。

【0162】

EasCコンセンサス配列(配列番号151)：

AXXXSXXYTTSGCPVXXPEGXXXXGXXXLXLDXHLIDXLAHFNREKIPERAVHAKGAGAYGEFEVTXDISDICXIDM
LLGVGKKTXCVTRFSTTGLERGSADSVRDLKGMAVKFYTXEGNWDWVXLNXPMFFIRDPSKFPXLIAHQRRDPQTNLXNP
SMFWDFVTXNHEALHVMVMQFSDFGTMFXYRSMSGYVGHAYKWVMPDGSKFYVHIFLSSDQGPNFXXGXXAXXIAXXDPD
XATRDLYEIAERGEYPSWTANVQVVDPEDAXKLGFIIDLVTKHWNLGXYPXDLXXIPSRXFGKLTLNKNPXYFAEIEQL
AFSPSHLVPGVEPSEDPILQARLFAYPDAQRYRLGXNHXXIPVNXXXKXXFXPXXRDGXXXXXGNYGAXPXYXSXXXXMXF
AXXKSXXXPEHXXWLSXVXSXSWXXXEXDYKFAREFWXXLPXXRXQEFQDXMVXNMAXSVAQXXXELRKVYXTFXLVA

10

20

30

40

50

XDLAXRVKXGTEXLVA。

【 0 1 6 3 】

EasCコンセンサスコア配列(配列番号192) :

LAHFNREKIPERAVHAKGAGAYGEFVTXDISD1CXIDM1LGVGKKTCVTRFSTTGLERGSADSVRDLKGMAVKFYTXE
GNWDWVXLNXPMFF1RDPSKFPXL1HAQRRDPQTNLXNPSMFWDFTXNHEALHMVMXQFSDFGTMFXYRMSGYVGHAY
KWVMPDGSKYVH1FLSSDQGPNFXXXXXXXXXXDPDXATRDLYEA1ERGEYPSWTANVQVVDPEDAXKLGFN1LDVT
KHWNLGXYXPDLXX1PSRXFGKLTNLNPXNYFAE1EQLAFSPSHLVPGEVPSEDP1LQARLFAYPDAQRYRLG。

【 0 1 6 4 】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのEasC活性は、

a)配列番号3に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号3に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号192に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも87%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図6に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号41に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号41に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号192に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図6に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

e)天然麦角アルカロイド産生生物から得られるa)~d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 6 5 】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasD活性は、好ましくは、

a)配列番号152に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

b)配列番号4および/もしくは53に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

c)配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/もしくは63に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

d)配列番号105に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

e)配列番号132および/もしくは140に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%

10

20

30

40

50

、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

f)配列番号105、132および/もしくは140により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

g)配列番号105、132および/もしくは140にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

h)a)～g)の少なくとも2つに記載の、好ましくは少なくともa)およびb)に記載のポリペプチド、ならびに

i)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)～h)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0166】

EasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コミニュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペニシリウム・パリタンス(*Penicillium palitans*)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・プルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces di varicatus*)からなるか、またはアルトロデルマ・ベンタミア(*Arthroderma benthamiae*)、アルトロデルマ・ジプセウム(*Arthroderma gypseum*)、アルトロデルマ・オタ(*Arthroderma otae*)、エピクロエ・ブラキエリトリ(*Epichloe brachyelytri*)、エピクロエ・フェスツカエ(*Epichloe festucae*)、エピクロエ・グリセリア(*Epichloe glyceriae*)、エピクロエ・ティフィナ(*Epichloe typhina*)、ミクロスボルム・カニス(*Microsporum canis*)、メタリジウム・アクリダム(*Metarrhizium acridum*)、メタリジウム・ロベルトシ(*Metarrhizium robertsii*)、ペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)、トリコフィトン・エクイナム(*Trichophyton equinum*)、トリコフィトン・ルブルム(*Trichophyton rubrum*)、トリコフィトン・トンスランス(*Trichophyton tonsurans*)、トリコフィトン・ベルコサム(*Trichophyton verrucosum*)およびトリコデルマ・ビレンス(*Trichoderma virens*)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギル

10

20

30

40

50

ス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・ブルプレア(*Claviceps purpurea*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド產生生物から得られる。

【0167】

好ましくはEasD活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表6に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。

【0168】

【表6】

表6:EasD活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Aspergillus japonicus 配列番号 4	74%	66%	64%	63%	64%	64%	63%	62%	61%	62%	65%
Paecilomyces divaricatus 配列番号 53		74%	68%	68%	72%	70%	68%	70%	65%	65%	70%
Aspergillus fumigatus 配列番号 54			70%	69%	66%	68%	67%	65%	66%	66%	70%
Arthroderra gypseum 配列番号 55				89%	63%	65%	65%	62%	81%	60%	90%
Trichophyton tonsurans 配列番号 56					64%	64%	65%	63%	88%	60%	965
Epichloe typhnia 配列番号 57						72%	74%	77%	59%	71%	66%
Claviceps purpurea 配列番号 58							85%	76%	61%	80%	65%
Periglandula ipomoeae 配列番号 59								78%	62%	81%	67%
Metarhizium robertsii 配列番号 60									58%	73%	63%
Trichophyton verrucosum 配列番号 61										58%	89%
Claviceps fusiformis 配列番号 62											62%
Arthroderra benhamiae 配列番号 63											

好ましくは、EasD活性を有するポリペプチドは、EasDコンセンサス配列を含む。EasDコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表6で特定され、図7a～図7bに示される配列のEasD配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。

【0169】

10

20

30

40

50

EasDコンセンサス配列(配列番号152) :

MASVSSK1FAITGGASGIGAATCRLLAXRGAAVICVGDVSSXNFXSLXKS1KE1NPSTKVHCTVLDVSSSEVDXWLXDI1STFGDLHGAANVAG1AQGAGLQRQPT1LEEXDXEWXR1FXVNLDGVFYSTRAQVRAMKDLPLXXXGXDRS1VNVAS1AAFSHMPDVYAYGTSKAACAYFTTXCVAADVFPXG1RVNXVSPGX1TNTPLLPQFXPXA1KSLDEVXEXYKKEGFSV1EADDVART1VWLLEDSPVYGAN1NVGACMP。

【 0 1 7 0 】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのEasD活性は、

a)配列番号4に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号4に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号152に対する少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図7に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号53に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号53に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号152に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図7に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

e)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa) ~ d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 7 1 】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasH活性は、好ましくは、

a)配列番号156に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

b)配列番号8および/もしくは95に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号156に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

c)配列番号8および/もしくは95に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

d)配列番号109および/もしくは157に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

e)配列番号109、136もしくは144および/もしくは157に対する少なくとも70%、72%、74%

10

20

30

40

50

、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

f)配列番号109、136、144および/もしくは157により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g)配列番号109、136、144および/もしくは157にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

h)a)～g)の少なくとも2つに記載のポリペプチド、ならびに

i)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)～h)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0172】

EasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなる群より選択される天然麦角アルカロイド產生生物から得られる。

【0173】

EasH活性を有するさらなるポリペプチドは、Stauffacher D.ら(1969)Tetrahedron Vol. 25: p5879-5887に開示されたようなイポメア・ヒルデブランディ(*Ipomoea hildebrandtii*)Vatkeの種子に含まれる内生植物に含まれる。

【0174】

好ましくは、EasH活性を有するポリペプチドは、EasHコンセンサス配列を含む。EasHコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは配列番号8および95により記載され、図8に示される配列のEasH配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。

【0175】

EasHコンセンサス配列(配列番号156)：

MTXTXTSKPXLRRXPXSAGXXAIFQVLQEDGVXXIEGFXXXXQVXXFNEXDPHXKXWELGQXSXQEXYLAXMXQLSSLP
LFSKXFRDXLMNXXLLHGXCXXFGPXSGDYWLTTSSVLETXPGYXGQXLHREHDGIPICCTLGRXSPEXMLNFLTALTD
FTXENGATRVLPGSHLWEDXSXXXXXXDXAIPAXMNPNGDAVLFXGKTLHGAGKNXXXDFLRRGFPLIMQSCQFTPVEASV
AXPRXLVETMTPLAQKMVGWRVXSAKGVXIWTYDLKDLAXGXXLK。

【0176】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのEasH活性は、

a)配列番号8に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号8に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号156に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図8に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号95に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポ

10

20

30

40

50

リペプチド、

d)配列番号95に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号156に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図8に示されるアラインメントにおいて100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

e)天然麦角アルカロイド産生生物から得られるa)～d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

10

【0177】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasA活性は、好ましくは、

a)配列番号148、149および150に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

b)配列番号193、194および195に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号194の位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

c)配列番号2および/もしくは31に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

d)配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39および/もしくは40に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

e)配列番号103に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

f)配列番号130および/もしくは138に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g)配列番号103、130および/もしくは138により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または(配列表に含まれる相同体)

h)配列番号103、130および/もしくは138にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

i)a)～h)の少なくとも2つに記載の、好ましくは少なくともb)およびc)に記載のポリペプチド、ならびに

j)天然麦角アルカロイド産生生物から得られるa)～i)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

40

【0178】

EasA活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド産生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォル

50

ミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コミュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペニシリウム・パリタンス(*Penicillium palitans*)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィナム(*Penicillium corylophinum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)、ペニシリウム・ワクスマニ(*Penicillium waksmanii*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド產生生物から得られる。

【0179】

好ましくはEasA活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表7に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。

【0180】

10

20

30

【表7】

表7:EasA活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Aspergillus japonicus 配列番号 2	62%	65%	58%	56%	54%	53%	50%	52%	51%	51%
Paecilomyces divaricatus 配列番号 31		66%	58%	57%	56%	55%	54%	55%	51%	54%
Aspergillus fumigatus 配列番号 32			57%	58%	57%	53%	54%	53%	52%	52%
Neotyphodium lolii 配列番号 33				75%	72%	53%	70%	52%	50%	50%
Periglandula ipomoeae_ 配列番号 34					79%	51%	80%	49%	49%	51%
Claviceps fusiformis 配列番号 35						51%	74%	49%	46%	49%
Penicillium chrysogenum 配列番号 36							48%	69%	60%	56%
Claviceps purpurea 配列番号 37								47%	47%	45%
Aspergillus flavus 配列番号 38									60%	58%
Neurospora tetrasperma 配列番号 39										54%
Aspergillus terreus 配列番号 40										

10

20

30

40

好ましくは、EasA活性を有するポリペプチドは、少なくとも1つの以下に記載のEasAシグナチャーアレジメントを含む。好ましくは、それらは、少なくとも2つのEasAシグナチャーアレジメントを含み、さらにより好ましくは、それらは3つ全部のEasAシグナチャーアレジメントを含む。

【0181】

EasAシグナチャーアレジメントおよびコンセンサスアレジメントは、連続するアミノ酸アレジメントを記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表7で特定され、図9a～図9dに示されるアレジメントのEasAアレジメントアラインメントの少なくとも1つのアミノ酸アレジメント中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。さらにより好ましくは、EasA活性を有するポリペプチドは、図9a、9bおよび9cにおいて黒色のバーで印を付けられる完全なアミノ酸アレジメントを含み、図9bにおいて黒色の矢印で印を付けられるアミノ酸位置にフェニルアラニン(F)またはチロシン(Y)のいずれかを含む。

【0182】

EasAシグナチャーアレジメント1.1(配列番号148)：

YXQRXXXGTLLXXXAXXIXXXXXGXXXXPXXXXXXXXXXXXWXXXXXXVHXXXXXIXXQLXXXGR。

【0183】

EasAシグナチャーアレジメント2.1(配列番号149)：

AXXXXFDGXEXHXXANGXLXDXQFXQXXNXRDXGXXGGXXXXRXRF。

【0184】

50

EasAシグナチャー配列3.1(配列番号150) :

GRXXXSXPDLPF。

【 0 1 8 5 】

EasAシグナチャー配列1.2(配列番号193) :

YAQRASVPGTLLITEATXISPRAGGFPNVPGIWXEAQIAAWKXVVDNAVHAKGSIFLQLWATGR。

【 0 1 8 6 】

EasAシグナチャー配列2.2(配列番号194) :

AVXAGXFDGVEIHGANGYLIDQFTQXSCNXRTDXWGGSIENRARF。

【 0 1 8 7 】

EasAシグナチャー配列3.2(配列番号195) :

GRHFISNPDLPF。

【 0 1 8 8 】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのEasA活性は、

a)配列番号2に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号2に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号148、149および150に対する少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号31に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号31に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号148、149および150に対する少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、ならびに

e)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)~d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 8 9 】

EasAリダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、好ましくは、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フラブス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hi*
rtella)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces div*
aricatus)からなる群より選択される天然麦角アルカロイド產生生物群から得られる。

【 0 1 9 0 】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasAイソメラーゼ活性は、好ましくは、

a)配列番号148、149および150に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にフェニルアラニンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

b)配列番号193、194および195に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号194のアミノ酸位置18にフ

10

20

30

40

50

エニルアラニンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

c)配列番号2および/もしくは31に対する少なくとも40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

d)配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39および/もしくは40に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、または

e)配列番号103に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

f)配列番号130および/もしくは138に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

g)配列番号103、130および/もしくは138により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

h)配列番号103、130および/もしくは138にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または

i) a) ~ h)の少なくとも2つに記載のポリペプチド、ならびに

j)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa) ~ i)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 9 1 】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのEasA活性は、

a)配列番号2に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にフェニルアラニンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号2に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号148、149および150に対する少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にフェニルアラニンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c)配列番号31に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にフェニルアラニンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号31に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号148、149および150に対する少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にフェニルアラニンを有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、ならびに

e)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa) ~ d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 9 2 】

EasAイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、好ましくは、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニ

10

20

30

40

50

ス(Balansia andropogonis)、バランシア・シペリ(Balansia cyperi)、バランシア・オブテクタ(Balansia obtecta)、クラビケプス・ブルプレア(Claviceps purpurea)、クラビケプス・ヒルテラ(Claviceps hirtella)、クラビケプス・フシフォルミス(Claviceps fusiformis)、クラビケプス・パスパリ(Claviceps paspali)、クラビケプス・ジザニア(Claviceps zizaniae)、スファセリア・エリオクロア(Sphacelia eriochloae)、スファセリア・テキセンシス(Sphacelia texensis)、スファセリア・ロベレッシ(Sphacelia lovelessii)、ネオティフォジウム(Neotyphodium)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(Neotyphodium coenophialum)、ネオティフォジウム・ロリ(Neotyphodium lolii)、ペニシリウム・シトリナム(Penicillium citrinum)、ペニシリウム・コミューン(Penicillium commune)、ペニシリウム・コリロフィルム(Penicillium corylophillum)、ペニシリウム・フェルタナム(Penicillium fellutanum)およびペリグランデュラ・イポメア(Periglandula ipomoeae)からなるか、またはクラビケプス・ブルプレア(Claviceps purpurea)、クラビケプス・フシフォルミス(Claviceps fusiformis)、ネオティフォジウム・ロリ(Neotyphodium lolii)およびペリグランデュラ・イポメア(Periglandula ipomoeae)からなる群より選択される天然麦角アルカロイド產生生物群から得られる。

【0193】

本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物または組換えポリヌクレオチドのいずれか1つのEasG活性は、好ましくは、

a)配列番号155および/または183に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、好ましくは、配列番号183に対する少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号7および/または86に対する少なくとも39%、40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド

c)配列番号7、86、87、88、89、90、91、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号108に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

e)配列番号135および/または143に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

f)配列番号108、135および/または143により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

g)配列番号108、135および/または143にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

h)a)～g)の少なくとも2つに記載のポリペプチド、好ましくは、少なくともa)およびb)に記載のポリペプチド、ならびに

i)天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa)～h)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【0194】

EasG活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、原理的には、本明細書に記載の任意の天然麦角アルカロイド產生生物から取得することができる。一実施形態においては、前記ポリヌクレオチドは、アスペルギルス・テレウス(Aspergillus terreus)、バランシア・アンドロポゴニス(Balansia andropogonis)、バランシア・シペリ(Balan

10

20

30

40

50

sia cyperi)、バランシア・オブテクタ(Balansia obtecta)、バランシア・ピルラフォルミス(Balansia pilulaeformis)、クラビケプス・アフリカーナ(Claviceps africana)、クラビケプス・フシフォルミス(Claviceps fusiformis)、クラビケプス・ヒルテラ(Claviceps hirtella)、スファセリア・エリオクロア(Sphacelia eriochloae)、スファセリア・テキセンシス(Sphacelia texensis)、スファセリア・ロベレッシ(Sphacelia lovelessii)、ネオティフォジウム(Neotyphodium)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(Neotyphodium coenophialum)、ネオティフォジウム・ロリ(Neotyphodium lolii)、ペニシリウム・シトリナム(Penicillium citrinum)、ペニシリウム・コミュン(Penicillium commune)、ペニシリウム・コリロフィルム(Penicillium corylophilum)、ペニシリウム・クルストサム(Penicillium crustosum)、ペニシリウム・フェルタナム(Penicillium fellutanum)およびペニシリウム・パリタンス(Penicillium palitans)からなる群より選択される、またはアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・オリザエ(Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ニデュランス(Aspergillus nidulans)、アスペルギルス・フミガタス(Aspergillus fumigatus)、クラビケプス・プルブレア(Claviceps purpurea)、クラビケプス・フシフォルミス(Claviceps fusiformis)、クラビケプス・パスパリ(Claviceps paspali)、クラビケプス・ジザニア(Claviceps zizaniae)、ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum)、ペニシリウム・シトリナム(Penicillium citrinum)、ペニシリウム・コリロフィナム(Penicillium corylophinum)、ペニシリウム・フェルタナム(Penicillium fellutanum)、ペニシリウム・ワクスマニ(Penicillium waksmanii)、ペニシリウム・ロケフォルティ(Penicillium roqueforti)およびペシロミセス・ジバリカタス(Paecilomyces divaricatus)からなるか、またはエピクロエ・フェスツカエ(Epichloe festucae)、エピクロエ・グリセリア(Epichloe glyceriae)、メタリジウム・アクリダム(Metarrhizium acridum)、メタリジウム・ロベルトシ(Metarrhizium robertsii)およびトリコフィトン・ベルコサム(Trichophyton verrucosum)からなるか、またはアスペルギルス・ジャポニカス(Aspergillus japonicus)、アスペルギルス・フミガタス(Aspergillus fumigatus)、クラビケプス・プルブレア(Claviceps purpurea)、およびペシロミセス・ジバリカタス(Paecilomyces divaricatus)からなるか、またはこれらの群のいずれか1つの組合せである群からなる、天然麦角アルカロイド產生生物から得られる。

【0195】

好ましくは、EasG活性を有する少なくとも1つのポリペプチドは、表8に列挙される配列、またはこれらのものに対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリペプチドから選択される。

【0196】

10

20

30

【表8】

表8:EasG活性を有する例示的ポリペプチドの同一性%の表

配列番号	7	86	87	88	89	90	181	92	93	94
Aspergillus japonicus 配列番号 7		58%	62%	47%	46%	45%	44%	45%	39%	43%
Paecilomyces divaricatus 配列番号 86			64%	54%	48%	53%	51%	48%	44%	46%
Aspergillus fumigatus 配列番号 87				50%	48%	50%	50%	48%	45%	47%
Paracoccidioides brasiliensis 配列番号 88					48%	52%	54%	47%	43%	48%
Claviceps fusiformis 配列番号 89						59%	58%	64%	60%	61%
Epichloe glyceriae 配列番号 90							93%	56%	54%	61%
Neotyphodium lolii 配列番号 181								57%	53%	61%
Claviceps paspali 配列番号 92									58%	62%
Claviceps purpurea 配列番号 93										55%
Metarhizium robertsii 配列番号 94										

10

20

30

40

50

好ましくは、EasG活性を有するポリペプチドは、EasGコンセンサス配列を含む。EasGコンセンサス配列は、連続するアミノ酸配列を記述し、ここで、それぞれ個々のアミノ酸は、当業界で用いられる一文字アミノ酸コードに従って特定される。「X」で特定されるアミノ酸は、任意のアミノ酸を表し、好ましくは、それは表8で特定され、図10a～図10bに示される配列のEasG配列アラインメントの少なくとも1つのアミノ酸配列中の同じ位置を有するアミノ酸を表す。

【0197】

EasGコンセンサス配列(配列番号155) :

XMTI LLTGGGRGKTASHIASLLXXAXXXVPFIVASRSSSSXXXSPYRXXXFDWLDEXTYGNXLSXXDXXXXXGMXPISAVWLVXPPIXDLAPPIMKFIDFARSKGVKRFVLLSASTIEKGGPAMGXIAHLDLSLXEGIXYXVLRPTWF MENFSXXXELQWI XIRXENKIYSATGDGKIPFISVXDIAARVAFRALTDEXSXNTXDYVLLGPELLTYDDVXXXXXXXXXXXXXXAEILSTVLGRKITHVKLTEAELAXKLXXEXGMPXDDAXMLASMDTXVKXGAERLNXXXVKXVTGXXPRTFLDFASXEKXXWL。

【0198】

好ましくは、本発明のために記載された組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物または組換えポリヌクレオチドのEasG活性は、

a)配列番号7に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

b)配列番号7に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、ま

たは100%の配列同一性を有し、配列番号183に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図10に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c) 配列番号86に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d) 配列番号86に対する少なくとも60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号183に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有し、さらにより好ましくは、図10に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、ならびに

e) 天然麦角アルカロイド產生生物から得られるa) ~ d)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドまたは少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの活性に起因するものである。

【 0 1 9 9 】

本明細書に記載の全ての組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、好ましくは、上記のように、トリプトファンおよび/もしくはDMAPPの拡大された細胞内供給ならびに/またはMe-DMATの拡大された細胞内供給を含む。拡大された細胞内供給を提供するために、多くの場合、それぞれの組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物の内因性遺伝子を脱調節することが必要である。

【 0 2 0 0 】

組換え微生物が酵母、好ましくは、サッカロミセス種から選択される場合、さらにより好ましくは、組換え微生物がサッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)である場合、配列番号9に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、この組換え微生物の内因性ポリペプチドを下方調節することにより、ERG9活性(EC2.5.1.21)を下方調節することが、本発明の1つの好ましい実施形態である。

【 0 2 0 1 】

あるいは、またはそれに加えて、酵母、好ましくは、サッカロミセス種、さらにより好ましくは、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞のDMAPPの内部供給を、EGR20活性(EC2.5.1.1/2.5.1.10)を有するポリペプチド、特に、配列番号10に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを下方調節することにより拡大することができる。

【 0 2 0 2 】

さらに、酵母、好ましくは、サッカロミセス種、さらにより好ましくは、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞のDMAPPの内部供給を、この生物のメバノレート経路の遺伝子を上方調節することにより、例えば、配列番号11に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドに起因するものであるHMG-CoAリダクターゼ活性を調節することにより拡大することもできる。

【 0 2 0 3 】

細胞中のクラビン型アルカロイドの前駆体の内部供給を拡大するための別の手法は、培地中へのMe-DMATの輸出を制限することである。これは、メバロネート経路の細胞内因性ポリペプチドの活性を上方調節することにより達成することができる。組換え微生物が酵母、好ましくは、サッカロミセス種、さらにより好ましくは、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)細胞である場合、これを、配列番号12、13、14、15または

10

20

30

40

50

16に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む1つまたは複数のポリペプチドの活性を下方調節することにより達成することができる。

【0204】

本発明は、麦角アルカロイドを產生する能力を有さない生物を、本発明のポリヌクレオチド、発現カセットおよび/またはベクターで形質転換することにより、新しい麦角アルカロイド產生生物、特に、クラビン型アルカロイドを產生することができる新しい麦角アルカロイド產生生物を作出する可能性を提供する。

【0205】

多くの場合、組換え発現されるポリペプチドの適切な発現、折畳みおよび安定性を、対応する組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物中のこれらの機能を支援する遺伝子の過剰発現により支援することも有利である。

【0206】

これらの機能を支援することができる遺伝子は、例えば、Scldi1(配列番号158)、ScPdi1(配列番号166)およびScFad1(配列番号167)である。

【0207】

従って、さらなる実施形態は、本明細書に記載のシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドまたはカノクラビンIの產生のためのポリペプチドを発現し、それに加えて、配列番号158、166または167に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの上方調節された活性を含む、好ましくは、配列番号166および167に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの上方調節された活性を有する、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0208】

一実施形態においては、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、シクロクラビンの產生のために、本明細書に記載のように、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性が上方調節された、ならびに/またはフェスツクラビンもしくはアグロクラビンの少なくとも1つの產生のために、本明細書に記載のように、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性が上方調節された、酵母、好ましくはサッカロミセス・セレビジア(*S.cerevisiae*)である。好ましくは、この組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、上記のように、DMAPPの拡大された内部供給も有する。

【0209】

本発明のさらなる実施形態は、シクロクラビンの產生のために、本明細書に記載のように、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性が上方調節され、ならびに/またはフェスツクラビンもしくはアグロクラビンの少なくとも1つの產生のために、本明細書に記載のように、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性が上方調節され、ならびに配列番号158、166および/もしくは167に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの活性が上方調節され、好ましくは、配列番号166および167に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの活性が上方調節された、組換えサッカロミセス・セレビジア(*S.cerevisiae*)である。

【0210】

10

20

30

40

50

好ましくは、シクロクラビン、フェスツクラビンおよび/またはアグロクラビンの產生のために、本明細書に記載のように、少なくともEasE活性が上方調節されたサッカロミセス・セレビジア(*S.cerevisiae*)はまた、配列番号187に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの上方調節された活性を有し、好ましくは、配列番号187に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドは、配列番号186に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによりコードされる。
10

【0211】

好ましくは、この組換えサッカロミセス・セレビジア(*S.cerevisiae*)はまた、好ましくは、配列番号9もしくは10に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む内因性ポリペプチドを下方調節することにより、または配列番号9に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む内因性ポリペプチドを下方調節し、配列番号10に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む内因性ポリペプチドを下方調節することにより、上記のように、DMAPPの内部供給が拡大されている。
20

【0212】

従って、本発明のさらなる実施形態は、
a)シクロクラビン、
b)フェスツクラビン、
c)アグロクラビン、
d)カノクラビンアルデヒド、および
e)カノクラビンI

の化合物の群より選択される少なくとも1つの化合物を含む組換え微生物であって、天然麦角アルカロイド產生生物ではない、上記組換え微生物である。
30

【0213】

好ましくは、前記組換え微生物は、天然麦角アルカロイド產生生物ではない、細菌、酵母、放線菌、または糸状菌である。そのような糸状菌は、子囊菌、不完全菌類、または担子菌であってもよい。

【0214】

本発明の宿主細胞として用いられる好ましい細菌は、大腸菌(*Escherichia coli*)および枯草菌(*Bacillus subtilis*)からなる群より選択される。

【0215】

好ましい組換え微生物は、以下からなる群より選択される。好ましい酵母は、クルイベロミセス(*Kluyveromyces*)、サッカロミセス(*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス(*Schizosaccharomyces*)、ヤロウイア(*Yarrowia*)およびピチア(*Pichia*)からなる群より選択される。
40

【0216】

より好ましくは、クルイベロミセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)およびピチア・スチピテス(*Pichia stipites*)からなる群より選択される組換え微生物である。

【0217】

10

20

30

40

50

さらにより好ましくは、組換え微生物は、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)である。これらの生物の様々な株が、当業者には容易に入手可能であり、例えば、公共の株収集物に寄託されている。サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)の好適な株は、例えば、限定されるものではないが、BY4742、cGY 1585、エタノールレッド、CEN.PK 111-61A、FY1679-06C、BMA64 (W303)、SEY 6210である。

【0218】

組換え微生物が細菌、特に、大腸菌である場合、メバロネット経路の遺伝子を過剰発現させることが有利であり得る。メバロネット経路の上方調節された遺伝子を含む大腸菌は当業界で公知であり、例えば、US7172886、US7192751、US7667017、US7622282、US7736882、US7622283、US7915026、およびUS8288147に記載されている。

10

【0219】

シクロクラビンを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれ、より好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

【0220】

フェスツクラビンを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

20

【0221】

アグロクラビンを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

【0222】

カノクラビンアルデヒドを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasCおよびEasD活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

【0223】

カノクラビンIを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaW、EasF、EasEおよびEasC活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

30

【0224】

Me-DMATを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaWおよびEasF活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

【0225】

DMATを含む組換え微生物は、好ましくは、DmaW活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む。

【0226】

また、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、もしくはカノクラビンIまたはこれらの化合物の少なくとも2つの組合せを含むが、トリプトファンおよびDMAPPの細胞内プールから対応する化合物または複数の化合物を生成するのに必要なものよりも低い活性を有する組換え微生物を製造することもできる。失われる活性は、他の手段により組換え微生物に必要な前駆体を提供することにより、例えば、増殖培地に前駆体を提供することにより、補うことができる。

40

【0227】

従って、本発明の一実施形態は、DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれ、より好ましくは、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、シクロクラビンを含む組換え微生物である。

【0228】

さらなる実施形態は、Me-DMATと共に提供され、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれ、より好ましくは、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよ

50

びEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、シクロクラビンを含む組換え微生物である。

【0229】

さらなる実施形態は、カノクラビンIと共に提供され、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれ、より好ましくは、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、シクロクラビンを含む組換え微生物である。

【0230】

さらなる実施形態は、DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え微生物。 10

【0231】

Me-DMATと共に提供され、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え微生物。

【0232】

カノクラビンIと共に提供され、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え微生物。

【0233】

カノクラビンアルデヒドと共に提供され、EasAリダクターゼおよびEasG活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え微生物。 20

【0234】

DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え微生物。

【0235】

Me-DMATと共に提供され、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え微生物。 30

【0236】

カノクラビンIと共に提供され、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え微生物。

【0237】

カノクラビンアルデヒドと共に提供され、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え微生物。

【0238】

DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasCおよびEasD活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンアルデヒドを含む組換え微生物。

【0239】

Me-DMATと共に提供され、EasE、EasCおよびEasD活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンアルデヒドを含む組換え微生物。 40

【0240】

カノクラビンIと共に提供され、EasD活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンアルデヒドを含む組換え微生物。

【0241】

DMATと共に提供され、EasF、EasEおよびEasC活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンIを含む組換え微生物。

【0242】

Me-DMATと共に提供され、EasEおよびEasC活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンIを含む組換え微生物。 50

【0243】

細胞により含まれるさらなる活性に応じて、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドもしくはカノクラビンIまたはこれらの化合物の少なくとも2つの組合せの含量は低いか、または高くてもよい。

【0244】

例えば、アグロクラビンを含むが、生成物、例えば、エリモクラビンもしくはセトクラビンを生成する遊離体としてアグロクラビンを用いる活性をも含むか、または周囲の培地へのアグロクラビンの輸出を容易にする活性を含む組換え微生物は、低含量のアグロクラビンを含んでもよい。

【0245】

同様に、フェスツクラビンを含むが、生成物、例えば、フミクラビンB、AもしくはCを生成するか、またはジヒドロ麦角アルカロイドを生成する遊離体としてフェスツクラビンを用いる活性をも含むか、または周囲の培地へのフェスツクラビンの輸出を容易にする活性を含む組換え微生物は、低含量のフェスツクラビンを含んでもよい。

【0246】

カノクラビンアルデヒドを含むが、生成物、例えば、フェスツクラビンもしくはアグロクラビンを生成する遊離体としてカノクラビンアルデヒドを用いる活性をも含むか、または周囲の培地へのカノクラビンアルデヒドの輸出を容易にする活性を含む組換え微生物は、低含量のカノクラビンアルデヒドを含んでもよい。

【0247】

カノクラビンIを含むが、生成物、例えば、シクロクラビン、カノクラビンアルデヒドもしくは6,7-セコリエルギンを生成する遊離体としてカノクラビンIを用いる活性をも含むか、または周囲の培地へのカノクラビンIの輸出を容易にする活性を含む組換え微生物は、低含量のカノクラビンIを含んでもよい。

【0248】

しかしながら、対応する化合物を遊離体として用いるか、または周囲の培地へのこの化合物の輸出を容易にする活性が下方調節される場合、組換え微生物中の化合物の含量は高くてもよい。

【0249】

本発明は、その非組換え形態と比較した場合、1つ以上の麦角アルカロイドの產生が増強された組換え天然麦角アルカロイド產生生物を作出する可能性をさらに提供する。また、麦角アルカロイド產生のための内因性遺伝子を下方調節するか、または本明細書に開示されるDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性の1つ以上を導入することにより、通常は天然麦角アルカロイド產生生物により產生される麦角アルカロイドの種類を変化させる、特に、天然麦角アルカロイド產生生物により產生されるクラビン型アルカロイドの產生を変化させることもできる。

【0250】

1つ以上の麦角アルカロイドの產生の増強は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドの発現を欠き、好ましくは、組換え天然麦角アルカロイド產生生物を構築するのに用いたものと同じ種、好ましくは同じ株の野生型生物、すなわち、非組換え生物である対照生物と比較した場合、また、対照生物として用いた場合、組換え天然麦角アルカロイド產生生物と同じ条件下で増殖させた場合、統計的に有意である。

【0251】

増加が有意であるかどうかを、例えば、Studentのt検定などの当業界で周知の統計学的検定によって決定することができる。より好ましくは、増加は、前記対照生物と比較して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%または少なくとも30%の対応する麦角アルカロイドの量の増加である。麦角アルカロイドの量を測定するための好適なアッセイは、添付の実施例に記載されており、当業界で公知である。

【0252】

従って、本発明のさらなる実施形態は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロク

10

20

30

40

50

ラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/またはカノクラビンIの化合物の群から選択される少なくとも1つの化合物を含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物であって、この化合物を自然では產生しない天然麦角アルカロイド產生生物の種のものである、上記組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0253】

それに加えて、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性の群から選択される活性の少なくとも1つが上方調節されたか、または少なくとも1つが下方調節されたか、または少なくとも1つが上方調節され、少なくとも1つが下方調節された、組換え天然麦角アルカロイド產生生物を作出することにより、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、天然麦角アルカロイド產生生物のシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/またはカノクラビンIの產生を増強することもできる。

10

【0254】

従って、本発明のさらなる実施形態は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/もしくはカノクラビンIの群から選択される少なくとも1つの化合物を、同じ条件下で増殖させた場合に非組換え野生型生物と比較してより多い量で含む、および/または產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0255】

比較のために用いられる対応する野生型生物は、好ましくは、対応する組換え天然麦角アルカロイド產生生物を作出するのに用いられたものと同じ種のものであり、好ましくは、同じ株のものである。

20

【0256】

シクロクラビンを含むか、またはシクロクラビンを產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも1つの上方調節されたEasH活性を含み、好ましくは、少なくとも1つの上方調節されたEasH活性ならびに少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAおよび/もしくはEasG活性を含み、より好ましくは、少なくとも1つの上方調節されたEasH活性ならびに少なくとも1つのDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよび/もしくはEasG活性を含み、さらにより好ましくは、少なくとも1つの上方調節されたEasH活性ならびに少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよび/もしくはEasG活性ならびに少なくとも1つの下方調節されたEasAイソメラーゼ活性を含む。

30

【0257】

フェスツクラビンを含むか、またはフェスツクラビンを產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼまたはEasG活性、好ましくは少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼまたはEasG活性ならびに/または少なくとも1つの下方調節されたEasAイソメラーゼおよび/もしくはEasH活性を含む。

【0258】

アグロクラビンを含むか、またはアグロクラビンを產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよび/もしくはEasG活性、好ましくは少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよび/もしくはEasG活性ならびに少なくとも1つの下方調節されたEasAリダクターゼおよび/もしくはEasH活性を含む。

40

【0259】

カノクラビンアルデヒドを含むか、またはカノクラビンアルデヒドを產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasCおよび/もしくはEasD活性または少なくとも1つの下方調節されたEasA、EasGおよび/もしくはEasH活性を含み、好ましくは少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasCおよび/もしくはEasD活性ならびに少なくとも1つの下方調節されたEasA、EasGおよび/もしくはEasH活性を含む。

50

【0260】

カノクラビンIを含むか、またはカノクラビンIを産生する組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasEおよび/もしくはEasC活性、または少なくとも1つの下方調節されたEasD、EasA、EasGおよび/もしくはEasH活性を含むか、または少なくとも1つの上方調節されたDmaW、EasF、EasEおよび/もしくはEasC活性ならびに少なくとも1つの下方調節されたEasD、EasA、EasGおよび/もしくはEasH活性を含む。

【0261】

また、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、カノクラビンIまたはこれらの化合物の少なくとも2つの組合せを含む、および/または産生するが、トリプトファンおよびDMAPPの細胞内プールから対応する化合物または複数の化合物を生成するのに必要なものよりも低い活性を有する組換え天然麦角アルカロイド産生生物を製造することもできる。失われる活性は、他の手段により組換え天然麦角アルカロイド産生生物に必要な前駆体を提供することにより、例えば、増殖培地に前駆体を提供することにより、補うことができる。

10

【0262】

従って、本発明の一実施形態は、DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれのため、より好ましくは、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、シクロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物である。

20

【0263】

さらなる実施形態は、Me-DMATと共に提供され、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれのため、より好ましくは、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、シクロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物である。

【0264】

さらなる実施形態は、カノクラビンIと共に提供され、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性のそれぞれのため、より好ましくは、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、シクロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物である。

30

【0265】

さらなる実施形態は、DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物である。

【0266】

Me-DMATと共に提供され、EasE、EasC、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物。

【0267】

カノクラビンIと共に提供され、EasD、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物。

40

【0268】

カノクラビンアルデヒドと共に提供され、EasAリダクターゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、フェスツクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物。

【0269】

DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のそれぞれのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド産生生物。

50

【0270】

Me-DMATと共に提供され、EasE、EasC、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のそれそのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。

【0271】

カノクラビンIと共に提供され、EasD、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のそれそのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。

【0272】

カノクラビンアルデヒドと共に提供され、EasAイソメラーゼおよびEasG活性のそれそのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、アグロクラビンを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。 10

【0273】

DMATと共に提供され、EasF、EasE、EasCおよびEasD活性のそれそのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンアルデヒドを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。

【0274】

Me-DMATと共に提供され、EasE、EasCおよびEasD活性のそれそのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンアルデヒドを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。 20

【0275】

カノクラビンIと共に提供され、EasD活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンアルデヒドを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。

【0276】

DMATと共に提供され、EasF、EasEおよびEasC活性のそれそのための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンIを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。

【0277】

Me-DMATと共に提供され、EasEおよびEasC活性のための少なくとも1つのポリペプチドを含む、カノクラビンIを含む組換え天然麦角アルカロイド產生生物。

【0278】

好ましくは、組換え天然麦角アルカロイド產生生物は、アスペルギルス属、例えば、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・アクレアタス(*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・ケシエルス(*Aspergillus caesiellus*)、アスペルギルス・カンジダス(*Aspergillus candidus*)、アスペルギルス・カルネウス(*Aspergillus carneus*)、アスペルギルス・クラバタス(*Aspergillus clavatus*)、アスペルギルス・デフレクタス(*Aspergillus deflectus*)、アスペルギルス・フィシェリアヌス(*Aspergillus fischerianus*)、アスペルギルス・フラバス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・グラウカス(*Aspergillus glaucus*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・オクラセウス(*Aspergillus ochraceus*)、アスペルギルス・パラシチクス(*Aspergillus parasiticus*)、アスペルギルス・ペニシロイデス(*Aspergillus penicilloides*)、アスペルギルス・レストリクタス(*Aspergillus restrictus*)、アスペルギルス・ソジャエ(*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・タマリ(*Aspergillus tamari*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス・ウスタス(*Aspergillus ustus*)、アスペルギルス・ベルシコロル(*Aspergillus versicolor*)；

ペニシリウム属、例えば、ペニシリウム・オーランティオグリセウム(*Penicillium aurantiogriseum*)、ペニシリウム・ビライエ(*Penicillium biliaiae*)、ペニシリウム・カメンベルティ(*Penicillium camemberti*)、ペニシリウム・カンジダム(*Penicillium candidum*)、 40

50

20

30

40

50

ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・クラビフォルム(*Penicillium claviforme*)、ペニシリウム・コミュン(*Penicillium commune*)、ペニシリウム・クルストサム(*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・ジギタタム(*Penicillium digitatum*)、ペニシリウム・エクスパンサム(*Penicillium expansum*)、ペニシリウム・フニクロサム(*Penicillium funiculosum*)、ペニシリウム・グラブラム(*Penicillium glabrum*)、ペニシリウム・グラウカム(*Penicillium glaucum*)、ペニシリウム・イタリカム(*Penicillium italicum*)、ペニシリウム・ラクサルミエンティ(*Penicillium lacussarmientei*)、ペニシリウム・マルネフェイ(*Penicillium marneffei*)、ペニシリウム・ブルブログナム(*Penicillium purpurogenum*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)、ペニシリウム・ストロニフェルム(*Penicillium stoloniferum*)、ペニシリウム・ウライエンス(*Penicillium ulaiense*)、ペニシリウム・ベルコサム(*Penicillium verrucosum*)、ペニシリウム・ビリジカタム(*Penicillium viridicatum*)；

クラビケプス属、例えば、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・ソルギ(*Claviceps sorghi*)、クラビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)；ペシロミセス属、例えば、ペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)からなる群より選択される。

【0279】

さらにより好ましくは、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザエ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、ペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)、ペニシリウム・ロケフォルティ(*Penicillium roqueforti*)からなる群より選択される組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0280】

本発明のさらなる実施形態は、シクロクラビンを含む、および/または產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物であって、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)種もしくはペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)種のものではないか、またはアスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)種、もしくはクラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)種のものである、上記組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0281】

本発明のさらなる実施形態は、フェスツクラビンを含む、および/または產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物であって、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フラバス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)の種のものではないか、

またはアスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、ビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオ

10

20

30

40

50

ティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)の種のものであるか、またはクラビケプス・ブルプレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)およびペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)からなる、上記組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0282】

本発明のさらなる実施形態は、アグロクラビンを含む、および/または產生する組換え天然麦角アルカロイド產生生物であって、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、バランシア・アンドロポゴニス(*Balansia andropogonis*)、バランシア・シペリ(*Balansia cyperi*)、バランシア・オブテクタ(*Balansia obtecta*)、バランシア・ピルラフォルミス(*Balansia pilulaeformis*)、クラビケプス・ブルプレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、ビケプス・ジザニア(*Claviceps zizaniae*)、スファセリア・エリオクロア(*Sphacelia eriochloae*)、スファセリア・テキセンシス(*Sphacelia texensis*)、スファセリア・ロベレッシ(*Sphacelia lovelessii*)、ネオティフォジウム(*Neotyphodium*)種Lp1、ネオティフォジウム・コエノフィアルム(*Neotyphodium coenophialum*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)、ペニシリウム・シリナム(*Penicillium citrinum*)、ペニシリウム・コリロフィルム(*Penicillium corylophillum*)、ペニシリウム・フェルタナム(*Penicillium fellutanum*)およびペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)の種のものではないか、またはクラビケプス・ブルプレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)、ネオティフォジウム・ロリ(*Neotyphodium lolii*)およびペリグランデュラ・イポメア(*Periglandula ipomoeae*)からなるか、またはアスペルギルス・ジヤポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フラバス(*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、クラビケプス・ヒルテラ(*Claviceps hirtella*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*)、およびペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)の種のものである、上記組換え天然麦角アルカロイド產生生物である。

【0283】

好みしくは、上記の組換え天然麦角アルカロイド產生生物のいずれか1つの少なくとも1つの上方調節された、または下方調節されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasH、EasD、EasAまたはEasG活性は、

a)配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、20、31、41、53、64、75、86、および/もしくは95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、

d)配列番号102、122もしくは123、129、130、131、132、133、134、135および/もしくは136に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドまたは

e)配列番号102、122、123、129、130、131、132、133、134、135および/もしくは136により記載される配列群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドをそれぞれ含む、2つのPCRプライマーを用いて得られるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドまたは

f)配列番号102、122もしくは123、123、129、130、131、132、133、134、135および/もしくは136にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドならびに

10

20

30

40

50

g)アスペルギルス・ジャボニカス(*Aspergillus japonicus*)もしくはペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)から得られるa)~f)の少なくとも1つに記載のポリペプチド

の群から選択される、少なくとも1つのポリペプチド、または少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドにより提供される。

【0284】

表9~14は、対応するDmaW、EasF、EasE、EasC、EasA、EasG、EasDまたはEasH活性を有し、表中に記載の生物源により含まれるポリペプチド配列に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、列挙されたDmaW、EasF、EasE、EasC、EasA、EasG、EasDまたはEasH活性を有するポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの組合せの例示的な非限定例を列挙する。表中のXはそれぞれ、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物により含まれる1コピーの組換えポリヌクレオチドを表す。

10

【0285】

【表9】

表9:組換え天然麦角アルカロイド産生生物 *A.japonicus*、*A.fumigatus*、*P.divaricatus*、*C.paspali* 中でのシクロクラビン産生

20

実施形態番号	起源生物	DmaW	EasF	EasE	EasC	EasA	EasG	EasD	EasH
1	<i>A. japonicus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
2	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
3	<i>A. japonicus</i>					X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X				
4	<i>A. japonicus</i>	X				X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>				X				
	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X			X	X	
5	<i>A. japonicus</i>								XX
	<i>A. fumigatus</i>	X							
	<i>P. divaricatus</i>					X	X	X	X
	<i>C. purpurea</i>	X	X	X	X				

30

【0286】

【表10】

表10:組換え天然麦角アルカロイド産生生物 *A.japonicus*、*A.fumigatus*、*P.divaricatus*、*C.paspali* 中でのフェスツクラビン産生

実施形態番号	起源生物	DmaW	EasF	EasE	EasC	EasA	EasG	EasD	EasH
1	<i>A. japonicus</i>	X	X	X	X	X	X	X	
2	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	
3	<i>A. japonicus</i>					X	X	X	
	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X				
4	<i>A. japonicus</i>	X				X	X	X	
	<i>A. fumigatus</i>					X			
	<i>P. divaricatus</i>		X	X	X			X	
5	<i>A. japonicus</i>								
	<i>A. fumigatus</i>	X							
	<i>P. divaricatus</i>					X	X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X	X	X	X				

10

20

30

40

【0287】

【表11】

表11:組換え天然麦角アルカロイド産生生物 *A.japonicus*、*A.fumigatus*、*P.divaricatus*、*C.paspali* 中でのアグロクラビン産生

実施形態番号	起源生物	DmaW	EasF	EasE	EasC	EasA	EasG	EasD	EasH
1	<i>A. japonicus</i>	X	X	X	X		X	X	
	<i>C. purpurea</i>					X			
2	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X		X	X	
	<i>C. purpurea</i>				X	X			
3	<i>A. japonicus</i>						X	X	
	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X				
4	<i>A. japonicus</i>	X					X	X	
	<i>C. purpurea</i>				X	X			
	<i>P. divaricatus</i>		X	X	X			X	
5	<i>A. japonicus</i>				XX				
	<i>A. fumigatus</i>	X							
	<i>P. divaricatus</i>						X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X	X	X	X	XX			

【0288】

【表12】

表12: *Saccharomyces*、*Yarrowia* または *Pichia* 種などの組換え非天然麦角アルカロイド産生生物中のシクロクラビン産生

実施形態番号	起源生物	DmaW	EasF	EasE	EasC	EasA	EasG	EasD	EasH
1	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
2	<i>A. japonicus</i>	X		X	X	X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>		X						
3	<i>A. japonicus</i>					X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X				
4	<i>A. japonicus</i>				X				X
	<i>C. purpurea</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
5	<i>A. japonicus</i>	X			X	X	X	X	X
	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X	X				X
6	<i>A. japonicus</i>	X			X	X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>			X	X		X	X	
7	<i>A. japonicus</i>	X							XX
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>					X	X	X	X
	<i>C. purpurea</i>	X		X	X				
8	<i>A. japonicus</i>	X		X	XX				XX
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>					X	X	X	X
	<i>C. purpurea</i>	X		X	X				
9	<i>A. japonicus</i>	XX		XX	XXX	X	X	X	XXX
	<i>A. fumigatus</i>	X							
10	<i>A. japonicus</i>	X		XX	X	X	X	X	XX
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>				X				
	<i>C. purpurea</i>	X			X				X

*S.cerevisiae*においては、同様に内因性 *ScPdi1*、*ScFad1* および/または *ScEro1* を過剰発現させることが有利である

【0289】

10

20

30

【表13】

表13: *Saccharomyces*、*Yarrowia* または *Pichia* 種などの組換え非天然麦角アルカロイド產生生物中のフェヌツクラビン產生

実施形態番号	起源生物	DmaW	EasF	EasE	EasC	EasA	EasG	EasD	EasH
1	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
2	<i>A. japonicus</i>	X		X	X	X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>		X						
3	<i>A. japonicus</i>					XX	X	X	
	<i>A. fumigatus</i>	X	X	X	X				
4	<i>A. japonicus</i>				X				
	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
5	<i>A. japonicus</i>	X			XXX	X	X	X	X
	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X		X			
6	<i>A. japonicus</i>	X			X	X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>			X	X				X
7	<i>A. japonicus</i>	X			X	X			
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>					X	X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X		X	X				
8	<i>A. japonicus</i>	X		X	XX				
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>					X	X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X		X	X				
9	<i>A. japonicus</i>	XX		XX	XXX	X	X	X	
	<i>A. fumigatus</i>	X							
10	<i>A. japonicus</i>	X		XX	X	X	X	X	X
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>				X				
	<i>C. purpurea</i>	X			X				

*S.cerevisiae*においては、同様に内因性 *ScPdi1*、*ScFad1* および/または *ScEro1* を過剰発現させることが有利である

【0290】

10

20

30

【表14】

表14: *Saccharomyces*、*Yarrowia* または *Pichia* 種などの組換え非天然麦角アルカロイド産生生物中のアグロクラビン産生

実施形態番号	起源生物	DmaW	EasF	EasE	EasC	EasA	EasG	EasD	EasH
1	<i>A. japonicus</i>	X	X	X	X		X	X	
	<i>C. purpurea</i>					X			
2	<i>A. japonicus</i>	X		X	X		X	X	
	<i>C. purpurea</i>		X			X			
3	<i>A. japonicus</i>						X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X	X	X	X	X			
4	<i>P. divaricatus</i>	X	X	X	X		X	X	
	<i>C. purpurea</i>				X	X			
5	<i>A. japonicus</i>	X			X		X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X	X	X	X	X			
6	<i>A. japonicus</i>	X			X		X		
	<i>P. divaricatus</i>		X	X	X	X			X
	<i>C. purpurea</i>	X	X			X	X	X	
7	<i>A. japonicus</i>	X							
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>						X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X		X	X	XX			
8	<i>A. japonicus</i>	X		X	XX				
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>						X	X	
	<i>C. purpurea</i>	X		X	X	XX			
9	<i>A. japonicus</i>	XX		XX	XXX		X	X	
	<i>C. purpurea</i>		X			X			
10	<i>A. japonicus</i>	X		X	XX		X	X	
	<i>A. fumigatus</i>		X						
	<i>P. divaricatus</i>			X	X				
	<i>C. purpurea</i>	X			X	XX			

*S.cerevisiae*においては、同様に内因性 *ScPdi1*、*ScFad1* および/または *ScEro1* を過剰発現させることが有利である

当業者であれば、表9～14に列挙されたものと類似するさらなる実施形態を作出することができる。

【0291】

特定の好ましい実施形態は、酵母、好ましくは、*S.cerevisiae*、およびシクロクラビンの産生のための組換え微生物としてのその使用であり、ここで、酵母、好ましくは、*S.cerevisiae*は、

a)配列番号8および/または95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号8および/または95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号156に対する

10

20

30

40

50

る少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、さらにより好ましくは、配列番号8および/または95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図8に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

b)配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39および/または40に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39および/または40に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号148、149および150に対する少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含む、EasAリダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

c)配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号183に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図10に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasG活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

d)配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/または63に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/または63に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号152に対する少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/または63に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図7に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

e)配列番号3または41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/または52に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号3または41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/または52に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号192に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも87%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号3もしくは41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/または52に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図6に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有

10

20

30

40

50

するアミノ酸配列を含む、EasC活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

f)配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/または178に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/または178に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号191に対する少なくとも70%、好ましくは少なくとも73%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/または178に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図5に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasE活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

g)配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/または85に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/または85に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号154に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも79%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/または85に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図4に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasF活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

h)配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号190に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも89%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、さらにより好ましくは、配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図3に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、DmaW活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセットを含む。

【0292】

好ましくは、EasE活性を提供するポリペプチドは、酵母中で小胞体への選別シグナルとして機能することができるN末端配列を有する。組換え微生物がS.cerevisiaeである場合、EasE活性を提供するポリペプチドは、好ましくは、S.cerevisiae中で小胞体への選別シグナルとして機能することができるN末端配列を含む。

【0293】

好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼおよび/またはEasG活性を提供するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然麦角アルカロイド産生生物から得ることができるポリヌクレオチド配列を有する。これらの酵母の好まし

10

20

30

40

50

い変異体は、表12に記載の実施形態である。

【0294】

これらの酵母のさらなる変異体を用いて、アグロクラビン、フェスツクラビンを産生させることができる。これらの酵母は、好ましくは、EasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含まない。

【0295】

これらの酵母の好ましい変異体は、表13および表14に記載の実施形態である。

【0296】

これらの酵母のさらなる変異体を用いてカノクラビンIを産生させることができるが、これはEasH、EasA、EasGまたはEasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含まない。

10

【0297】

これらの酵母のさらなる変異体は、EasH、EasA、EasGおよびEasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含むが、DmaW、EasF、EasEまたはEasC活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含まない。これらの酵母を用いて、カノクラビンIと共に提供した場合、シクロクラビンを産生させることができる。

【0298】

これらの酵母のさらなる変異体は、EasA、EasGおよびEasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含むが、DmaW、EasF、EasE、EasCまたはEasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含まない。これらの酵母を用いて、カノクラビンIと共に提供した場合、フェスツクラビンまたはアグロクラビンを産生させることができる。

20

【0299】

特定の好ましい実施形態は、酵母、好ましくは、*S.cerevisiae*、およびシクロクラビンの産生のための組換え微生物としてのその使用であり、ここで、酵母、好ましくは、*S.cerevisiae*は、

a)配列番号8および/または95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号8および/または95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号156に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、さらにより好ましくは、配列番号8および/または95に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図8に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現力セット、

30

b)配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39および/または40に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号2、31、32、33、34、35、36、37、38、39および/または40に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号148、149および150に対する少なくとも95%、好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号149のアミノ酸位置18にチロシンを有するアミノ酸配列を含む、EasAリダクター活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現力セット、

40

c)配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは

50

、配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号183に対する少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号7、86、87、88、89、90、181、92、93および/または94に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図10に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasG活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

d)配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/または63に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/または63に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号152に対する少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号4、53、54、55、56、57、58、59、60、62および/または63に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図7に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

e)配列番号3または41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/または52に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号3または41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/または52に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号192に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも87%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号3もしくは41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51および/または52に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図6に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasC活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

f)配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/または178に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/または178に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号191に対する少なくとも70%、好ましくは少なくとも73%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号5、64、175、66、67、68、69、176、71、177、73および/または178に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図5に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasE活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現カセット、

g)配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/または85に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好

ましくは、配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/または85に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号154に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも79%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号6、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84および/または85に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図4に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasF活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現力セット。

h)配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、配列番号190に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも89%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号1、19、20、21、22、23、24、25、26、27および/または28に対する少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有し、図3に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、DmaW活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現力セットを含む。

【0300】

好ましくは、これらの酵母は、

a)配列番号28に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号28に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号190に対する少なくとも85%、好ましくは少なくとも89%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号28に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、図3に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、DmaW活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現力セットおよび/または

b)配列番号76に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、好ましくは、配列番号76に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、配列番号154に対する少なくとも75%、好ましくは少なくとも79%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、より好ましくは、配列番号76に対する少なくとも80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有し、図4に示されるアラインメント中で100%保存された全てのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む、EasF活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの発現力セット

を含む。

【0301】

これらの酵母のさらなる変異体を用いて、アグロクラビン、フェヌツクラビンを産生させることができる。これらの酵母は、好ましくは、EasH活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現力セットを含まない。

10

20

30

40

50

【0302】

これらの酵母のさらなる変異体を用いて、カノクラビンIを産生させることができるが、これはEasH、EasA、EasGまたはEasD活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含まない。

【0303】

本明細書に開示される組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物を、当業界で用いられる標準的な形質転換および/または突然変異プロトコールにより作製することができる。それぞれ対応する種のための最も効率的な方法が、文献中で、例えば、Turgeon (2010) *Molecular and cell biology methods for fungi*, p3-9、Koushki, MMら(2011), *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* Vol.10 (41): p7939-7948、Coyleら(2010) *Appl Environ Microbiol* 76:3898-3903、*Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 13. Ausubel F.M.ら(編)Wiley & Sons, U.K.、および*Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cloning Systems*. Volume 3. Birren B, Green ED, Klapholz S, Myers RM, Reithman H, Roskams J.(編) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999:297-565で容易に利用可能である。
10

【0304】

これらの方法は、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAまたはEasG活性の少なくとも1つを含むポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを含む。これらのポリヌクレオチドを、目的の微生物の既に存在する発現カセット中に組込むように標的化するか、または対応する微生物中のポリヌクレオチドの転写および翻訳を可能にする組換え発現カセット中に含有させることができる。発現カセットは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAおよびEasG活性を提供するポリペプチドの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドに機能し得る形で連結されたプロモーターおよびターミネーターを含む。ポリペプチドの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドは、好ましくは、対応する微生物のコドン使用に適合させることができる。プロモーター、ターミネーターおよび特定の微生物のために用いられるのに好適なコドン使用に関する情報は、当業者には公知である。
20

【0305】

酵母のための好適な構成的プロモーターは、実施例に列挙されるものに加えて、特に、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)のためのものであり、例えば、trpC、gpdA、tub2およびTef1プロモーターである。
30

【0306】

酵母、特に、サッカロミセス・セレビジア(*Saccharomyces cerevisiae*)のための好適な誘導的プロモーターは、例えば、Gal1、Gal10、Cup1、Pho5、およびMet25プロモーターである。

【0307】

さらなるプロモーターおよびターミネーター、ならびにクローニング戦略は、例えば、Shaoら(2009) *Nucleic Acids Research*, Vol. 37, No. 2 e16 (10 pages)に記載されている。

【0308】

上記の発現カセットは、形質転換のために用いることができるか、またはあるゲノム遺伝子座への、もしくはその近くでのいくつかの構築物の標的化された組込みにより作出することができる、より大きいポリヌクレオチドを含んでも、または含まなくてもよい。これらのより大きいポリヌクレオチドは、同じ活性を提供する1つ以上のポリペプチドのための発現カセットを含んでもよく、もしくは異なる活性を提供する1つ以上のポリペプチドのための発現カセットを含み、異なる活性を提供する1つ以上のポリペプチドのための発現カセットを含んでもよい。あるいは、または上記の方法およびポリヌクレオチドに加えて、組換え微生物を数回形質転換するか、または同時にいくつかの異なるポリヌクレオチドで形質転換し、かくして、組換え微生物のゲノム中の2つ以上の遺伝子座に発現
40

カセットを含んでもよい。

【0309】

かくして、本発明のさらなる実施形態は、上記の実施形態のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドおよび上記の実施形態のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現のための発現カセットおよびそのようなポリヌクレオチドまたは発現カセットの少なくとも1つを含む、発現および形質転換ベクターなどのベクターである。

【0310】

上記の実施形態のいずれかに記載の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物を、本発明によって含まれるシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、Iおよびカノクラビンの少なくとも1つの産生のために用いることができる。かくして、さらなる実施形態は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つの産生のための方法であって、

a)組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物中のシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つの産生を可能にする条件下で、上記の実施形態のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物を培養すること；ならびに

b)前記組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド産生生物および/または培養培地から、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つを取得することを含む、上記方法を含む。

【0311】

本発明の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物を、意図される目的に適合する、表面培養、液内培養、固体状態培養、腐栄養性培養中で、振とうフラスコ培養中で、または任意の他の方法で増殖させることができる。好ましくは、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、液内培養で培養される。

【0312】

組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物のための増殖条件および増殖培地は、当業者には公知であり、例えば、非組換え微生物および天然麦角産生生物を培養するために用いられる条件を適用することができる。そのようなプロトコールおよび方法は、例えば、Bacon CW (1985) *Mycologia* Vol 77:418-423、Schulz Bら (1993) *Mycol Res* 97:1447-1450、Banksら (1974) *Journal of General Microbiology* Vol 82: p345-361、Flieger, M.ら (1997) *Folia Microbiologica* Vol. 42: p3-30、Pazoutova, S.ら (1981) *Journal of Natural Products* Vol. 44: p225-235に開示されている。

【0313】

培養方法および天然麦角アルカロイド産生生物による麦角アルカロイドの産生を誘導または増強するための方法は、例えば、Keller, U.およびTudzynski, P. (2002) in: Osiewacz, H.D. (編), *The Mycota*, Vol. X. 「Industrial Applications」、Springer, Berlin, pp. 157-181、Haarmann, T.ら (2005), *Phytochemistry* Vol. 66, p1312-1320、またはFuruta, T.ら (1982) *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol 46 (7): p1921-1922、Tudzynski P.ら (2001) *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 57 (5-6) p593-605、Kantorova, M.ら (2002) *Journal of Natural Products*, Vol. 65 (7): p1039-1040、Kozlovsky, A. G.; (2010) *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 46 (5): p525-529、Kozlovsky, A. G.; (1999) *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 35 (5): p477-485、Narayan V.およびRao K.K., (1982) *Biotechnology Letters* Vol. 4 (3): p193-196、Rehacek, Z.ら (1970) *Folia Microbiologica* Vol 15 (3): p210-213、Narayan V.およびRao K.K., (1982) *Biotechnology Letters* Vol. 4 (3): p193-196、Rehacek, Z.ら (1971) *Folia Microbiologica* Vol 15 (3): p35-40、Janardhanan K.およびHusain A. (1990) *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 28(11): p1054-1057、Herna

10

20

30

40

50

ndesz M. ら (1992) Letters in Applied Microbiology Vol. 15(4):p 156-159、Hernandes z M. ら (1993) Process Biochemistry Vol. 28(1): p23-27、Sarkisova M. ら (1991) Antibiotiki i Khimioperapiya Vol 36(12): p8-10、Samdani G ら (1998) Asian Journal of Chemistry Vol.10(2): p373-374に開示されている。

【0314】

例えば、クラビケプス・プルプレア(*Claviceps purpurea*)による麦角アルカロイドの产生を、好ましくは、高浸透圧および低リン酸レベルを有する増殖培地に前駆体および誘導因子としてトリプトファンを添加することにより改善することができる。

【0315】

さらに、感染したライムギの穂上で増殖したクラビケプス・プルプレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・フシフォルミス(*Claviceps fusiformis*)またはクラビケプス・パスピリ(*Claviceps paspali*)による麦角アルカロイドの产生を、麦角アルカロイド前駆体を添加することにより改善することができる。

【0316】

麦角アルカロイドの产生のためにクラビケプス・プルプレア(*Claviceps purpurea*)を用いる方法に関するさらなる指針を、Hulvova H. ら、「Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids」、Biotechnology Advances 31 (2013) 79-89に見出すことができる。

【0317】

組換え微生物および組換え天然麦角アルカロイド产生生物を、例えば、培養培地のための炭素源としてグルコース、スクロース、ハチミツ、デキストリン、デンプン、グリセロール、糖蜜、動物油または植物油などを用いて培養することができる。さらに、大豆粉末、小麦胚芽、コーンスティーピリカ、綿実くず、肉エキス、ポリペプトン、モルトエキス、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素などを、窒素源として用いることができる。必要に応じて、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸(リン酸水素二カリウムなど)、硫酸(硫酸マグネシウムなど)および他のイオンを生成することができる無機塩の添加も有効である。さらに、チアミン(塩酸チアミンなど)などの様々なビタミン、グルタミン(グルタミン酸ナトリウムなど)、アスパラギン(DL-アスパラギンなど)などのアミノ酸、ヌクレオチドなどの微量栄養素、および抗生物質などの選択薬剤を必要に応じて添加してもよい。さらに、有機物質および無機物質を好適に添加して、生物の増殖を支援し、麦角アルカロイドの产生、特に、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの产生を促進することができる。培養培地のpHは、例えば、pH5.5 ~ pH8のオーダーである。培養を、好気的条件下での固体培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法または深好気的培養法などの方法を用いて実行することができるが、深好気的培養法が最も好適である。培養のための適切な温度は、10 ~ 40 であるが、多くの場合、増殖は22 ~ 30 の範囲で起こる。シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの产生は、培養培地および培養条件、または用いられる宿主に応じて異なるが、いずれの培養法を用いた場合でも、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの产生の蓄積は、一般に2 ~ 10日で最大に達するが、それよりかなり長い時間、例えば、15、20、25、30、40、50日またはさらに長く続けてもよい。培養は、培養物中のシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの产生の量がその最高レベルに達した時に停止され、標的材料は培養物から単離され、培養材料からそのシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの产生生物を単離するために精製される。シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの产生生物を単離するために用いられる標的材料は、任意の有用な材料、例えば、全生物もしくは生物により產生される胞子のみもしくは生物の任意の他の部分であってもよい生物自体、または生物を培養するのに用いられる培養培地で

10

20

30

40

50

あってもよい。例えば、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物に、前駆体が好ましくは、IPP、トリプトファン、DMAPP、DMAT、Me-DMATおよびカノクラビンIの群から選択される、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの1つ以上の前駆体を提供することにより、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、および/またはカノクラビンIの產生を増強するために培養条件を適合させることができる。

【0318】

かくして、本発明のさらなる実施形態は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒド、およびカノクラビンIの少なくとも1つの產生のための方法であって、

a)組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物中のシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つの產生を可能にする条件下で、上記の実施形態のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物を培養すること；

b)前記組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物に、培養培地を介してIPP、トリプトファン、DMAPP、DMAT、Me-DMATまたはカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つを提供すること；ならびに

c)前記組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド產生生物および/または培養培地から、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つを取得することを含む、上記方法である。

【0319】

上記方法は、好ましくは、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つを取得するために用いられる。好ましくは、この方法は、シクロクラビンを取得するために用いられる。

【0320】

しかしながら、特に、組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物が、ピロクラビン、フミクラビンAもしくはC、またはエルゴタミンなどの、他の麦角アルカロイドの產生のための遊離体として、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドまたはカノクラビンIの少なくとも1つを用いるさらなる遺伝子を含む場合、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIを取得する方法ステップを省略してもよい。次いで、生物または培養培地からこれらの化合物を取得することが有利であり得る。例えば、組換え天然麦角アルカロイド產生生物がアスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)である場合、フミガクラビンB、フミガクラビンAまたはフミガクラビンなどの麦角アルカロイドを產生および取得することが可能である。さらに、組換え天然麦角アルカロイド產生生物がクラビケプス種、好ましくは、クラビケプス・ブルプレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)またはクラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)である場合、エリモクラビン、パスパル酸、リゼルギン酸、エルゴペプタムおよびエルゴペプチジンの群から選択される化合物の1つ以上を產生および取得することが可能である。同じ原理は、1つ以上の麦角アルカロイドを產生し、その產生のための前駆体としてフェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドまたはカノクラビンIの少なくとも1つを用いる他の組換え天然麦角產生生物にも適用される。好ましくは、天然麦角アルカロイド產生生物は、対応する天然麦角アルカロイド產生生物を作出するために用いられたのと同じ種および株と比較した場合、より多い量で、より高い速度で、これらの他の麦角アルカロイドの少なくとも1つを產生する。より高い速度、またはより多い量とは、両方とも同じ条件下で培養された場合、対応する天然麦角アルカロイド產生生物を作出するために用いられたのと同じ種および株と比較した場合、少なくとも5%、10%、15%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または少なくとも100%多いか、または速いことを意味する。

10

20

30

40

50

【0321】

培養条件は、用いられる組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物に関して変化してもよい。好適な増殖条件または酵母、特に、サッカロミセス・セレビジア(*S. accharomyces cerevisiae*)は、実施例に提供される。しかしながら、これらの増殖条件をさらに適合させることができる。例えば、増殖温度を、生物の遅いか、または速い増殖のために適合させることができる。従って、本発明は、組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド産生生物が、10 ~ 40 、好ましくは、15 ~ 35 、より好ましくは、18 ~ 32 、さらにより好ましくは、20 ~ 30 の温度で培養されるか、または組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド産生生物が10 ~ 32 、13 ~ 32 、15 ~ 32 、16 ~ 32 、17 ~ 32 、18 ~ 32 、19 ~ 32 、20 ~ 32 、15 ~ 31 、15 ~ 30 、15 ~ 29 、15 ~ 28 、15 ~ 27 、15 ~ 26 、15 ~ 25 の温度で培養されるか、または組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド産生生物が、25 ~ 40 、好ましくは25 ~ 35 の温度で最初に培養された後、10 ~ 25 、好ましくは15 ~ 25 の温度で培養されるか、または組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド産生生物が、10 ~ 25 、好ましくは15 ~ 25 の温度で最初に培養された後、25 ~ 40 、好ましくは25 ~ 35 の温度で培養される、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つの産生のための方法を包含する。10

【0322】

通常、増殖条件は、対応する組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物の選択性に従って選択されるが、しかしながら、それから逸脱することが有利であり得る。例えば、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/またはカノクラビンIの産生のために、15 ~ 25 、好ましくは20 の温度で*S. cerevisiae*を増殖させることが有利であってもよい。20

【0323】

いくつかの実施形態においては、対応する組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物、例えば、*S. cerevisiae*の増殖条件は、増殖を遅くするように選択される。これは、例えば、グリセロール、トリメチルアミンN-オキシド(TMAO)またはプロリン、例えば、2.5%、5%もしくは10%の濃度のグリセロール、250mMもしくは500mMの濃度のTMAOまたは200mMの濃度のプロリンを増殖培地に添加することにより達成することができる。30

【0324】

さらに好ましい実施形態は、高い細胞密度を生成する、および/または発酵を延長するために用いることができる、供給バッチ式培養条件を用いる。

【0325】

本明細書に記載の方法により産生されるシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/またはカノクラビンIは、好ましくは、抽出により得られるが、原理的には、他の方法により得ることもできる。

【0326】

一実施形態においては、抽出は、酢酸エチル(EA)、*tert*-ブチルメチルエーテル(TBME)、クロロホルム(CHCl₃)およびジクロロメタン(DCM)の群から選択される化合物を用いる抽出により行われる。40

【0327】

好ましくは、抽出方法は、pH=10の酢酸エチルを用いる液体/液体抽出、より好ましくは、pHがNaOHを用いて調整される、pH=10の酢酸エチルを用いる液体/液体抽出を含む。

【0328】

しかしながら、好ましくはpH=3のHLB樹脂、pH=3のDiaion樹脂、好ましくはpH=3のAmberlite 1180樹脂、好ましくはpH=10のAmberlite 1180樹脂、好ましくはpH=3のAmberlite 16N樹脂またはpH=10のAmberlite 16N樹脂の群から好ましく選択される、シリカに基づく樹脂材料を用いる固相抽出を用いる抽出を含む抽出方法により、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/またはカノクラビンIを取得50

することもできる。

【0329】

シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/もしくはカノクラビンI、または他のクラビン型アルカロイドもしくは他の麦角アルカロイドを取得するのに好適な方法は、当業者には公知である。例えば、シクロクラビンを取得するための方法は、Furutaら(1982), Agricultural and Biological Chemistry Vol. 46 (7): p1921-1922またはStauffacher D.ら(1969) Tetrahedron Vol.25: p5879-5887に開示されている。

【0330】

麦角アルカロイドを分析するための方法は、例えば、Flieger, M.ら(1997) Folia Microbiologica, Vol. 42 (1) p 3-29およびHalada, P.ら(1998) Chemicke Listy Vol.92 (7) p538-547に記載されている。

10

【0331】

本発明は、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つの產生のための、または上記方法のいずれか1つにおける、上記実施形態のいずれか1つに記載の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物、組換えポリヌクレオチド、ベクターの使用を含む。

【0332】

本発明のさらなる実施形態は、上記方法のいずれか1つにより產生されたシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよび/またはカノクラビンIならびに本発明の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物の培養により產生されるシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つを含む培養培地を含む。

20

【0333】

好ましくは、培養培地は、シクロクラビンを含むが、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つを含有しないか、または比較的低い含量で含む。同様に好ましくは、培養培地は、フェスツクラビンを含むが、シクロクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つを含有しないか、または比較的低い含量で含む。同様に好ましくは、培養培地は、アグロクラビンを含むが、シクロクラビン、フェスツクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの少なくとも1つを含有しないか、または比較的低い含量で含む。また同様に好ましくは、培養培地は、カノクラビンアルデヒドを含むが、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビンおよびカノクラビンIの少なくとも1つを含有しないか、または比較的低い含量で含む。また同様に好ましくは、培養培地は、カノクラビンIを含むが、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビンおよびカノクラビンアルデヒドの少なくとも1つを含有しないか、または比較的低い含量で含む。

30

【0334】

比較的低い含量とは、問題の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物の対応する対照生物を培養することによって產生された培養培地中の含量と比較した場合、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、100%低い対応する化合物の含量を意味する。

40

【0335】

本発明はさらに、上記の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物を作出するために用いることができる、ペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)から単離されたポリヌクレオチドおよびその配列変異体を含む。

【0336】

従って、本発明の一実施形態は、

a)配列番号129、130、131、132、133、134、135または136に示されるヌクレオチド配列を有する核酸配列；

50

b)配列番号20、31、41、53、64、75、86、95または180に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

c)配列番号129、130、131、132、133、134、135または136に示される核酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である核酸配列であって、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼまたはEasG活性を有するポリペプチドをコードする上記核酸配列；

d)DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼまたはEasG活性を有し、配列番号20、31、41、53、64、75、86、95または180に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；および

e)a)～d)のいずれか1つにストリングエントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列であって、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼまたはEasG活性を有するポリペプチドをコードする上記核酸配列からなる群より選択される1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドである。

【0337】

本発明のさらなる実施形態は、上記の組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド產生生物を作出するために用いることができる、ポリペプチドおよびその配列変異体を含む。

【0338】

従って、本発明の一実施形態は、

a)配列番号175、176、177または178に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

b)EasE活性を有し、配列番号175、176、177または178に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

c)配列番号181に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；および

d)DmaW活性を有し、配列番号181に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列からなる群より選択される1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドである。

【0339】

ペシロミセス・ジバリカタス(Paecilomyces divaricatus)から単離されたこれらのポリヌクレオチドおよびその配列変異体ならびにEasEまたはDmaW活性を有し、配列番号175、176、177、178、または181に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドのいずれか1つ、好ましくは、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼまたはEasG活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと組合わせることができる。

【0340】

ポリヌクレオチドをさらにプロモーターおよびターミネーター配列と機能し得る形で連結して、コードされたポリペプチドの転写および翻訳のための発現カセットを作出することができる。さらに、これらのポリヌクレオチドおよび発現カセットを、形質転換および/または発現ベクター中に導入し、例えば、本発明の組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド產生生物を作出するため、および例えば、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼもしくはEasG活性を有するコードされたポ

10

20

30

40

50

リペプチドを認識する抗体を製造するため、もしくはそのようなポリペプチドのタンパク質結晶を製造するためのさらなる精製のために、これらのポリペプチドを產生させるために用いることができるか、または *in vitro* 試験および製造方法のために前記ポリペプチドを用いることができる。従って、本発明は、そのようなポリヌクレオチドを含む原核および真核宿主細胞を包含する。好ましくは、そのような宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、または酵母細胞である。本発明のさらなる実施形態は、a) DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼもしくはEasG活性を有し、配列番号20、31、41、53、64、75、86、もしくは95に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列のための発現カセットを含む宿主細胞を培養すること、または前記ポリペプチドの產生を可能にする条件下でペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)細胞を培養すること；およびb)ステップa)の宿主細胞またはペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)細胞からポリペプチドを取得することを含む、ポリペプチドの製造のための方法である。

10

【0341】

また、a)シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドまたはカノクラビンIの產生を可能にする条件下でペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)細胞を培養すること；ならびにb)ペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)細胞および/または培養培地から、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドまたはカノクラビンIの少なくとも1つを取得することを含む、シクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドもしくはカノクラビンI、またはこれらの組合せの製造のための方法も、本発明により包含される。

20

【0342】

本発明の他の部分は、

a)配列番号129、130、131、132、133、134、135もしくは136に示されるヌクレオチド配列を有する核酸配列；

b)配列番号20、31、41、53、64、75、86もしくは95に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

30

c)配列番号129、130、131、132、133、134、135もしくは136に示される核酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列であって、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼもしくはEasG活性を有するポリペプチドをコードする上記核酸配列；

d)DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼもしくはEasG活性を有し、配列番号20、31、41、53、64、75、86もしくは95に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；および

40

e)a)～d)のいずれか1つにストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列であって、DmaW、EasF、EasE、EasC、EasD、EasH、EasAリダクターゼ、EasAイソメラーゼもしくはEasG活性を有するポリペプチドをコードする上記核酸配列からなる群より選択される1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドの使用、またはシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つの製造のため、もしくは前駆体としてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つを用いることにより產生される少なくとも1つの麦角アルカロイドの製造のための、これらのポリヌクレオチドを含むベクター、もしくは宿主細胞もしくはペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces*

50

divaricatus)細胞の使用である。

【0343】

本発明の他の部分は、

a)配列番号175、176、177もしくは178に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

b)EasE活性を有し、配列番号175、176、177もしくは178に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

c)配列番号181に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；
および

d)DmaW活性を有し、配列番号181に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列からなる群より選択される1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドの使用、

またはシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つの製造のため、もしくは前駆体としてシクロクラビン、フェスツクラビン、アグロクラビン、カノクラビンアルデヒドおよびカノクラビンIの群から選択される化合物の少なくとも1つを用いることにより産生される少なくとも1つの麦角アルカロイドの製造のため、これらのポリヌクレオチドを含むベクター、もしくは組換え微生物もしくは組換え天然麦角アルカロイド産生生物、好ましくは、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、ペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)もしくは酵母細胞の使用を含む。

【0344】

本発明のさらなる実施形態は、

a)配列番号175、176、177または178に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

b)EasE活性を有し、配列番号175、176、177または178に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

c)配列番号181に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；および

d)DmaW活性を有し、配列番号181に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド

からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドを発現する組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物を指す。

【0345】

好ましくは、そのようなポリペプチドを発現する組換え微生物または組換え天然麦角アルカロイド産生生物は、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フミガタス(*Aspergillus fumigatus*)、ペシロミセス・ジバリカタス(*Paecilomyces divaricatus*)、クラビケプス・ブルブレア(*Claviceps purpurea*)、クラビケプス・パスパリ(*Claviceps paspali*)、クラビケプス・アフリカーナ(*Claviceps africana*)または酵母細胞である。

(実施例)

【実施例1】

【0346】

パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)におけるシクロクラビンの生産

材料および方法：

10

20

30

40

50

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：

CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例1で使用した遺伝子を表15に示す：

【0 3 4 7】

【表15】

本実験に使用した遺伝子の一覧表

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	A. japonicus
Af_EasF	107	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子を作製した。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102-108）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

【0 3 4 8】

1つもしくは2つのカセットを指定の組込み型ベクター（配列番号114-118）にサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、このベクターは、酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた。2つの発現カセットの場合、クローニングの方向は、ヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された（配列番号114-118）。相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マーカーを含有する、完全な組込み型構築物は、組込み型ベクターをNotIおよびSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のCreリコンビナーゼを発現するプラスミドによる細胞の形質転換後に、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターの配列番号、およびその組込み型構築物を表16aおよび表16bに示す。

【0 3 4 9】

10

20

30

40

【表16-a】

組込み型構築物およびゲノム標的部位を有する組込み型ベクター

構築物名	配列番号	カセット1			カセット2		
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター	プロモーター	遺伝子	ターミネーター
pEVE2294	114	ScPgk1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1
pEVE2312	115	ScPgk1	AjEasC	ScAdh1	ScGpd1	AjEasE	ScCyc1
pEVE2342	116	ScPgk1	Aj EasD	ScAdh1			
pEVE2343	117	ScPgk1	Aj EasD	ScAdh1	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1
pEVE2344	118	ScPgk1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1

【0350】

【表16-b】

組込み型構築物およびゲノム標的部位を有する組込み型ベクター

構築物名	配列番号		
		マーク	目的領域
pEVE2294	114	KanMX	YORWΔ17
pEVE2312	115	HygR	YPRCΔ15
pEVE2342	116	BleR	YORWΔ22
pEVE2343	117	BleR	YORWΔ22
pEVE2344	118	NatR	YPRCτ3

経路の構築(アセンブリ) :

完全なシクロクラビン経路、またはEasH遺伝子を欠いた経路のいずれかをEYS1456に組み込むことによって、2つの酵母菌株を調製した。EYS1849は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、およびpEVE2344(表16aおよび16b)に由来する構築物を組み込むことによって調製されたが、EYS1851は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2342、およびpEVE2344(表16aおよび16b)由来の構築物を組み込むことによって調製された。こうして得られた菌株は、以下の遺伝子の発現カセットを含有した:

EYS1849: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、およびAjEasH

EYS1851: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、およびAjEasG

増殖条件 :

改变酵母菌株EYS1849およびEYS1851は、2%グルコースを含有する標準的なSCプロス(Ford Medium, Hunstanton, U.K.)中で増殖させた。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で20 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順 :

サンプル調製 : 酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。これ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)と連動させたUPLC-TOF (Waters Acquity(商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相:カラムは、Acquity UPLC(登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法:移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B:アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件:

【0351】

【表17】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

10

PDAパラメーター：レンジ：210 nm～500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80～1000 m/z。

調製手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。10 M NaOHを用いて上清をpH=10に調整し、等量の酢酸エチルで液液抽出により抽出した。粗抽出物を真空下で乾燥し、100 mg/mlの濃度が得られるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶液に戻した。それを次に調製用HPLCシステム(Waters, Milford, Mass, USA)で精製した。固定相：カラムは、XBridge(商標名) preparative C18、5 μm、19x250 mmカラムとした。

20

【0352】

液体クロマトグラフィー法：移動相A：H₂O + 0.1%トリフルオロ酢酸。移動相B：アセトニトリル+ 0.1%トリフルオロ酢酸。溶出条件：

【0353】

【表18】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	14.00	99.0	1.0
41.50	14.00	70.0	30.0
42.00	14.00	0.0	100.0
46.00	14.00	0.0	100.0
46.10	14.00	99.0	1.0
56.00	14.00	99.0	1.0

30

ESIパラメーター：イオン源電圧：キャピラリ-：3.00 kV。コーン：30 V。エクストラクタ：3 V。RFレンズ：0.1 V。

40

イオン源温度：150 。脱溶媒和温度：350 。

結果：

EYS1849、EYS1851、およびEYS1456は、上記のように20 で増殖させた。上清をLC-MSで分析し、EYS1849のシクロクラビン予想質量の抽出クロマトグラム(m/z=239.1543 +/- 0.01Da)は、保持時間5.5分(+/- 0.2)のピークを示したが、EYS1851株にはそれは見られなかった(EYS1456にも見られなかったが、データは示さない)。もう1つ顕著なピークが、EYS1849およびEYS1851に存在し、それは保持時間5.91分においてm/z=241.1699 +/- 0.01Daの質量を有していた(図11を参照されたい)。

【0354】

50

保持時間5.49分におけるピークは、上記のように精製し、LC-MSおよびNMR分光法で分析して、構造が解明され、その化合物がシクロクラビンであるという同一性を確認した。

【0355】

EYS1849の上清中の、5.49分に溶出された精製化合物のNMRデータ：¹H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-d) · ppm 0.70 (d, J=6.02 Hz, 1 H) 1.72 (s, 3 H) 1.81 (d, J=5.83 Hz, 1 H) 2.83 (br. s., 3 H) 3.02 (d, J=10.40 Hz, 1 H) 3.09 - 3.17 (m, 1 H) 3.27 (d, J=13.69 Hz, 1 H) 3.63 (d, J=11.67 Hz, 1 H) 3.99 (t, J=9.60 Hz, 1 H) 6.76 (d, J=7.20 Hz, 1 H) 6.88 (br. s., 1 H) 7.05 (t, J=7.65 Hz, 1 H) 7.19 (d, J=8.71 Hz, 1 H) 11.79 - 12.55 (m, 1 H)。

【実施例2】

10

【0356】

A. fumigatusEasF、およびA. japonicus DmaW_altC、EasE、およびEasCを用いたパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) におけるカノクラビンIの生産

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：
CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

遺伝子配列：

実施例2で使用した遺伝子を表19に示す。

【0357】

20

【表19】

実施例2に使用した遺伝子

遺伝子名	配列番号	配列の起源
AjDmaW_altC	102	<i>A. japonicus</i>
AfEasF	107	<i>A. fumigatus</i>
AjEasE	106	<i>A. japonicus</i>
AjEasC	104	<i>A. japonicus</i>

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子を作製した。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102、107、106、および104）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTT AAAを与える、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

30

【0358】

40

AjDmaW_altC（配列番号102）およびAfEasF（配列番号107）を含有する遺伝子発現カセットを、組込み型ベクターpEVE2294（配列番号114）へのサブクローニングのために使用したが、このベクターは、酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた（表16aおよび16bを参照されたい）。2つの発現カセットの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された。ゲノム相同配列が隣接して配置された、発現カセットおよび選択マーカーを含有する、完全な組込み型構築物は、NotIおよびSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、

50

Sauer, 1987に記載のCreリコンビナーゼを発現するプラスミドによる細胞の形質転換後に、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型構築物および配列番号を表16aおよび表16bに示す（実施例1を参照されたい）。

【0359】

遺伝子AjEasE（配列番号106）およびAjEasC（配列番号104）をPAおよびGC発現カセット（それぞれ、配列番号110および111）にクローニングした後、それぞれ、酵母ベクターpRS315およびpRS313の骨格に挿入して、ベクター-pCCL254およびpCCL256が与えられた。pRSベクター-pRS315およびpRS313は、マルチクローニング部位リンカー（配列番号113）をこれらの元のベクターのPvuII部位間に挿入することによって、すでに改変されていたので、このリンカーのAscI部位に発現カセットをクローニングすることが可能であった。pRSベクターはSikorski, 1989によって記載されている。

10

経路の構築：

酵母菌株は、カノクラビンIの生合成経路をEYS1456に導入することによって調製した。初めに、pEVE2294（配列番号114）から得られる構築物をEYS1456に組み込むことによって、中間的な菌株を調製した（実施例1の表16aおよび16bを参照されたい）。得られた菌株をさらに、空のベクター-pRS315およびpRS313の両方で形質転換してCEY2871が与えられ、ベクター-pCCL254およびpCCL256で形質転換してCEY3631が与えられた。その結果得られた2つの菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

CEY2871: AjDmaW_a1tC、およびAfEasF

20

CEY3631: AjDmaW_a1tC、AfEasF、AjEasE、およびAjEasC

増殖条件：

改変酵母菌株CEY2871およびCEY3631は、2%グルコースを含有し、Leu（ロイシン）およびHis（ヒスチジン）を除いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）中で増殖させた。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で30 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 × gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。これ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)と連動させたUPLC-TOF (Waters Acquity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1×100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

30

【0360】

【表20】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
5.00	0.400	0.0	100.0
6.00	0.400	0.0	100.0
6.10	0.400	99.0	1.0
7.50	0.400	99.0	1.0

40

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 °。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 °。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

50

調製手順 :

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。10 M NaOHを用いて上清をpH=10に調整し、等量の酢酸エチルで液液抽出により抽出した。粗抽出物を真空下で乾燥し、100 mg/mlの濃度が得られるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶液に戻した。それを次に調製用HPLCシステム(Waters, Milford, Mass, USA)で精製した：固定相：カラムは、XBridge(商標名) preparative C18、5 μm、19x250 mmカラムとした。

【0361】

液体クロマトグラフィー法：移動相A：H₂O + 0.1%トリフルオロ酢酸。移動相B：アセトニトリル+ 0.1%トリフルオロ酢酸。溶出条件：

10

【0362】

【表21】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	14.00	99.0	1.0
21.00	14.00	70.0	50.0
27.00	14.00	0.0	100.0
31.00	14.00	0.0	100.0
31.10	14.00	99.0	1.0
41.00	14.00	99.0	1.0

20

ESIパラメーター：イオン源電圧：キャピラリ-：3.00 kV。コーン：30 V。エクストラクタ：3 V。RFレンズ：0.1 V。

イオン源温度：150 °C。脱溶媒和温度：350 °C。

結果：

CEY2871およびCEY3631の上清をLC-MSで分析した。カノクラビンI予想質量の抽出クロマトグラム(m/z= 257.164 +/- 0.01Da)は、CEY3631株では保持時間4.4分(+/- 0.2)のピークを示したが、CEY2871株にはそれは見られなかった(図12を参照されたい)。

30

【0363】

保持時間4.4分におけるピークを、上記のように精製し、LC-MSおよびNMR分光法で分析した。対応する化合物の構造が解明され、その化合物がカノクラビンであるという同一性を確認した。

【0364】

CEY3631から得られた、4.4分+/- 0.2分に溶出される精製化合物のNMRデータ：¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) ppm 1.82 (s, 3 H) 2.67 (t, J=5.22 Hz, 3 H) 3.11 (dd, J=15.65, 7.79 Hz, 1 H) 3.32 (dd, J=15.58, 4.00 Hz, 1 H) 3.54 (m, J=7.20, 3.60, 3.60 Hz, 1 H) 3.95 (s, 2 H) 4.25 (dd, J=9.39, 7.60 Hz, 1 H) 5.36 (dd, J=9.74, 0.89 Hz, 1 H) 6.71 (d, J=7.11 Hz, 1 H) 7.08 (t, J=7.60 Hz, 1 H) 7.16 (s, 1 H) 7.25 (d, J=8.09 Hz, 1 H) 8.48 (br. s., 1 H) 8.73 (br. s., 1 H) 11.01 (s, 1 H)。

40

【実施例3】

【0365】

A. fumigatusのEasF、およびA. japonicusのDmaW_altCおよびEasC、ならびにA. japonicusのEasEもしくはSUMO-EasEのいずれか一方を用いたカノクラビンIの生産
材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：

CEN.PK 111-61A (MAT α MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

遺伝子配列：

実施例3で使用した遺伝子を表22に示す。

【0366】

50

【表22】

実施例3に使用した遺伝子

遺伝子名	配列番号	配列の起源
AjDmaW_altC	102	<i>A. japonicus</i>
AfEasF	107	<i>A. fumigatus</i>
AjEasE	106	<i>A. japonicus</i>
AjEasE_SUMO	119	<i>A. japonicus</i>
AjEasC	104	<i>A. japonicus</i>

10

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子を作製した。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102、107、106、119、および104）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

20

【0367】

AjDmaW_altC（配列番号102）およびAfEasF（配列番号107）を含有する遺伝子発現カセットを、組込み型ベクターpEVE2294（配列番号114）にサブクローニングするために使用したが、このベクターは、酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた（実施例1の表16aおよび16bを参照されたい）。2つの発現カセットの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された。ゲノム相同配列が隣接して配置された、発現カセットおよび選択マーカーを含有する、完全な組込み型構築物は、NotIおよびSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のCreリコンビナーゼを発現するプラスミドで細胞を形質転換した後、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型構築物および配列番号を表16aおよび表16bに示す（実施例1を参照されたい）。

30

【0368】

遺伝子AjEasE（配列番号106）およびAjEasC（配列番号104）をPAおよびGC発現カセット（それぞれ、配列番号110および111）にクローニングした後、それぞれ、酵母ベクターpRS315およびpRS313の骨格に挿入して、ベクター-pCCL254およびpCCL256が与えられた。SUMOタグを含有し、したがってEasE酵素のN末端SUMO化型を与える、合成DNA配列（配列番号119）を、ベクター-pCCL254の唯一のHindIII部位に挿入することによって、ベクター-pCCL255が作製された。SUMOタグの使用は、たとえばPeroutka, 2008に記載されている。pRSベクター-pRS315およびpRS313は、マルチクローニング部位リンカー（配列番号113）をこれらの元のベクターのPvuII部位間に挿入することによって、すでに改変されていたので、このリンカーのAscl部位に発現カセットをクローニングすることが可能であった。pRSベクターはSikorski, 1989によって記載されている。

40

経路の構築：

50

酵母菌株は、カノクラビンIの生合成経路をEYS1456に導入することによって調製した。pEVE2294（配列番号114）から得られる構築物をEYS1456に組み込むことによって、中間的な菌株を調製した。得られた菌株をさらに、ベクターpCCL254およびpCCL256で形質転換してCEY3631が与えられ、ベクターpCCL254およびpCCL255で形質転換してCEY3645が与えられた。その結果得られた2つの菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現力セットを含有した：

CEY3631: AjDmaW_a1tC、AfEasF、AjEasE、およびAjEasC

CEY3645: AjDmaW_a1tC、AfEasF、SUMO-AjEasE、およびAjEasC

増殖条件：

改变酵母菌株CEY3631およびCEY3645は、2%グルコースを含有し、LeuおよびHisを除いた標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）中で増殖させた。培養物は、培地5 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で30にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。これ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acuity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acuity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0369】

【表23】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
5.00	0.400	0.0	100.0
6.00	0.400	0.0	100.0
6.10	0.400	99.0	1.0
7.50	0.400	99.0	1.0

10

20

30

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果：

CEY3631およびCEY3645の上清をLC-MSで分析した。カノクラビンIの質量 (m/z= 257.164 +/- 0.01Da) は、TIC (全イオンクロマトグラム) から抽出された。以前に (実施例2を参照されたい) 解明されたカノクラビンIに相当する、保持時間2.0分 (+/- 0.1) を有するピークが検出された (図13を参照されたい)。

【0370】

カノクラビンIに相当するピーク下の面積を積分で求めると、非SUMO化型を有する菌株 (CEY3631) と比べて、SUMO化型のEasEを有する菌株 (CEY3645) では約27%の増加が示されたが、それについては図13の挿入図を参照されたい。

【実施例4】

【0371】

A. fumigatusまたはA. japonicus由来のEasFと組み合わせてAjDmaW_a1tCを使用するMe-DMA-Tの生産

40

50

材料および方法 :

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：

CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例4で使用した遺伝子を表24に示す :

【0 3 7 2】

【表 2 4】

実施例4に使用した遺伝子

遺伝子名	配列番号	配列の起源
AjDmaW_altC	102	A. japonicus
AfEasF	107	A. fumigatus
AjEasF	120	A. japonicus

10

遺伝子のクローニング :

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102、107、および120）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母Cup1プロモーターおよびAdh1ターミネーターを含有する酵母CA発現力セット（配列番号121）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現力セット（配列番号121）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現力セットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

20

【0 3 7 3】

遺伝子AjDmaW_altC（配列番号102）をCA発現力セット（配列番号121）にクローニングした後、酵母ベクターpRS316の骨格に挿入して、ベクターpCCL100が与えられた。遺伝子AfEasF（配列番号107）およびAjEasF（配列番号120）をCA発現力セット（配列番号121）にクローニングした後、個別に、酵母ベクターpRS315の骨格に挿入して、ベクターpCCL98およびpCCL91がそれぞれ与えられた。pRSベクターpRS316およびpRS315は、マルチクローニング部位リンカー（配列番号113）をこれらの元のベクターのPvuII部位間に挿入することによって、すでに改変されていたので、このリンカーのAscl部位に発現力セットをクローニングすることが可能であった。pRSベクターはSikorski, 1989によって記載されている。

30

経路の構築 :

酵母菌株は、Me-DMATの生合成経路をEYS1456に導入することによって調製した。EYS1456を、ベクター-pCCL100およびpCCL98で形質転換してCEY2557が与えられ、ベクター-pCCL100およびpCCL91で形質転換してCEY2625が与えられた。その結果得られた2つの菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現力セットを含有した：

40

CEY2557: AjDmaW_altCおよびAjEasF

CEY2625: AjDmaW_altCおよびAfEasF

増殖条件 :

改変酵母菌株CEY2557およびCEY2625は、2%グルコースを含有し、Leu（ロイシン）およびUra（ウラシル）を除いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）中で増殖させた。硫酸銅を終濃度200 μMとなるよう添加した。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で30 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

40

分析手順 :

サンプル調製：酵母培養物は、1000 × gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。これ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acuity (商標名) Ultra Performance LC, Wat

50

ers, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC (登録商標) B ridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μ m 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A : H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B:アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0374】

【表25】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 °。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 °。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

調製手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。10 M NaOHを用いて上清をpH=10に調整し、等量の酢酸エチルで液液抽出により抽出した。粗抽出物を真空下で乾燥し、100 mg/mlの濃度が得られるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶液に戻した。それを次に調製用HPLCシステム(Waters, Milford, Mass, USA)で精製した：固定相：カラムは、XBridge (商標名) preparative C18、5 μ m、19x250 mmカラムとした。

【0375】

液体クロマトグラフィー法：移動相A : H₂O + 0.1% トリフルオロ酢酸。移動相B : アセトニトリル + 0.1% トリフルオロ酢酸。溶出条件：

【0376】

【表26】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	14.00	99.0	1.0
21.00	14.00	70.0	50.0
27.00	14.00	0.0	100.0
31.00	14.00	0.0	100.0
31.10	14.00	99.0	1.0
41.00	14.00	99.0	1.0

ESIパラメーター：

イオン源電圧：キャピラリ-：3.00 kV。コーン：30 V。エクストラクタ：3 V。RFレンズ：0.1 V。

イオン源温度：150 °。脱溶媒和温度：350 °。

結果：

CEY2557およびCEY2625の上清をLC-MSで分析した。Me-DMATの予想質量の抽出クロマトグラム (m/z=287.175 +/- 0.01Da) は、保持時間7.8 +/- 0.2分にピークを示した (図14を参

10

20

30

40

50

照されたい)。このピークを上記のように精製し、LC-MSおよびNMR分光法で分析して、構造が解明され、その化合物がMe-DMATであるという同一性を確認した。

【0377】

Me-DMATに相当するピーク下の面積を積分で求めると、*A. japonicus*型を有する菌株(CEY2557)と比べて、*A. fumigatus*型のEasFを有する菌株(CEY2625)では2倍を超える増加が示されたが、それについては図15を参照されたい。

【0378】

CEY2557上清中の、5.49分に溶出される精製化合物のMe-DMAT; ; NMRデータ: 1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) ppm 1.61 (s, 3 H) 1.63 (s, 3 H) 2.45 (s, 3 H) 3.19 (dd, J=16.2 Hz, 8, 8.33 Hz, 1 H) 3.42 (dd, J=16.00, 4.94 Hz, 1 H) 3.57 - 3.63 (m, 3 H) 5.13 - 5.21 (m, 1 H) 6.74 (d, J=7.15 Hz, 1 H) 6.98 (t, J=7.50 Hz, 1 H) 7.14 (s, 1 H) 7.16 - 7.21 (m, 1 H)。 10

【実施例5】

【0379】

*A. fumigatus*由来EasFをCpDmaW、AjDmaW_altC、またはAjDmaW_trcCとともに使用するMe-DMATの生産

材料および方法:

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した:

CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例5で使用した遺伝子を表27に示す: 20

【0380】

【表27】

実施例5に使用した遺伝子

遺伝子名	配列番号	配列の起源
AjDmaW_altC	102	<i>A. japonicus</i>
AjDmaW_trcC	122	<i>A. japonicus</i>
CpDmaW	123	<i>C. purpurea</i>
AfEasF	107	<i>A. fumigatus</i>

遺伝子のクローニング:

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子。遺伝子は、アミノ酸配列(配列番号102~107および配列番号122~123)に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGGGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母Cup1プロモーターおよびAdh1ターミネーターを含有する酵母CA発現カセット(配列番号121)に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAsci制限部位を有した。遺伝子発現カセット(配列番号121)は、pUC18に基づくプラスミドベクター(配列番号112)上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAsci部位を提供するために、リンカー(配列番号113)が挿入されていた。 40

【0381】

遺伝子AjDmaW_altC(配列番号102)、AjDmaW_trcC(配列番号122)、およびCpDmaW(配列番号123)をCA発現カセット(配列番号121)にクローニングした後、酵母ベクターpRS316の骨格に挿入して、それぞれベクターpCCL100、pCCL99、およびpCCL95が与えられた。遺伝子AfEasFをCA発現カセット(配列番号121)にクローニングした後、酵母ベクターpRS315の骨格に挿入して、ベクターpCCL98が与えられた。pRSベクターpRS316およびpRS315は、マルチクローニング部位リンカー(配列番号113)をこれらの元のベクターのPvuII部位間に挿入することによって、すでに改変されていたので、このリンカーのAsci部位に発現カセットをクローニングすることが可能であった。pRSベクターはSikorski, 1989によつ 50

て記載されている。

経路の構築：

酵母菌株は、Me-DMATの生合成経路をEYS1456に導入することによって調製した。EYS1456を、ベクターpCCL100およびpCCL98で形質転換してCEY2557が与えられ、ベクターpCCL99およびpCCL98で形質転換してCEY2563が与えられ、またはベクターpCCL95およびpCCL98で形質転換してCEY2575が与えられた。その結果得られた3つの菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現力セットを含有した：

CEY2557: AjDmaW_altCおよびAfEasF

CEY2563: AjDmaW_trccおよびAfEasF

CEY2575: CpDmaWおよびAfEasF

10

増殖条件：

変形酵母菌株CEY2557、CEY2563およびCEY2575は、2%グルコースを含有し、Leu(ロイシン)およびUra(ウラシル)を除いた、標準的なSCプロス(ForMedium, Hunstanton, U.K.)中で増殖させた。硫酸銅を終濃度200 μMとなるよう添加した。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で30 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。これ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF(Waters Acquity(商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC(登録商標)Bridged Ethyl Hybrid(BEH) C18 1.7 μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

20

【0382】

【表28】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

30

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 ℃。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 ℃。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

40

調製手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。10 M NaOHを用いて上清をpH=10に調整し、等量の酢酸エチルで液液抽出により抽出した。粗抽出物を真空下で乾燥し、100 mg/mlの濃度が得られるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶液に戻した。それを次に調製用HPLCシステム(Waters, Milford, Mass, USA)で精製した：固定相：カラムは、XBridge(商標名) preparative C18、5 μm、19x250 mmカラムとした。

【0383】

液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% トリフルオロ酢酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% トリフルオロ酢酸。溶出条件：

50

【0384】

【表29】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	14.00	99.0	1.0
21.00	14.00	70.0	50.0
27.00	14.00	0.0	100.0
31.00	14.00	0.0	100.0
31.10	14.00	99.0	1.0
41.00	14.00	99.0	1.0

10

ESIパラメーター :

イオン源電圧 : キャピラリ - : 3.00 kV。コーン : 30 V。エクストラクタ : 3 V。RFレンズ : 0.1 V。

イオン源温度 : 150 。脱溶媒和温度 : 350 。

結果 :

CEY2557、CEY2563、およびCEY2575の上清をLC-MSで分析した。抽出イオンクロマトグラムのピークは、Me-DMATの予想質量を有する化合物を示した (m/z= 257.164 +/- 0.01Da) (図16を参照されたい)。保持時間7.8分におけるこのピークを上記のように精製し、LC-MSおよびNMR分光法で分析して、構造が解明され、その化合物がMe-DMATであるという同一性を確認した。Me-DMATに相当するピーク下の面積を積分で求めると (図16、挿入図)、3つの菌株のすべてについて同様のレベルのMe-DMAT生産が示された。

20

【実施例6】

【0385】

ピロリン酸ファルネシルシンターゼ活性が低下した宿主菌株においてA. japonicus由来のDmaW_altCおよびA. fumigatus由来EasFを用いたMe-DMATの生産材料および方法 :

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した :

CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

30

実施例6で使用した遺伝子を表30に示す :

【0386】

【表30】

実施例6に使用した遺伝子

遺伝子名	配列番号	配列の起源
AjDmaW_altC	102	A. japonicus
AfEasF	107	A. fumigatus

遺伝子のクローニング :

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子は、GeneArt AG, Regensburg, Germanyにより製造された。遺伝子は、アミノ酸配列 (配列番号102および107) に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。AjDmaW (配列番号102) は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母Pgk1プロモーターおよびAdh2ターミネーターを含有する酵母PA発現力セット (配列番号110) に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。AfEasFは、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母Tef1プロモーターおよびEno2ターミネーターを含有する酵母TE発現力セット (配列番号124) に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。2つのカセットはいずれも

40

50

両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および124）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンク（配列番号113）が挿入されていた。

【0387】

遺伝子AjDmaWおよびAfEasFを、その後、ベクターpESC-Ura (Agilent Technologies (Schweiz) AG, Basel, Switzerland)に基づく単一の2 μMベクターにクローニングした：Pgk1プロモーターおよびAfEasFコード配列を含有する、PA発現カセットのBgl II / Sac II断片を、Bgl IIおよびSac IIで消化したpESC-Uraに挿入した。これはAdh2ターミネーターをpESC-UraのCyc1ターミネーターに置き換えている。得られたベクターをBgl IIおよびSac Iで消化し、そのベクター骨格を、TE発現カセット由来のTef1プロモーターを含有する、同様に消化したPCR産物に連結した。PCR産物は、PCRプライマーを用いて、5'末端にBgl II部位を、3'末端にAar I、Pme I、およびSac Iの3つの部位を組み込んで、調製された。最終的に、得られたベクターをAar IおよびPme Iで消化した。Aar Iは、Bgl II消化された配列と適合するオーバーハングを残すようにデザインされていたが、Pme Iは平滑末端を残す。AjDmaW_a1tCを有するTE発現カセットを次にSac IIで消化し、これをT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端とした後、Bgl IIで消化した。この断片は、Tef 1 プロモーターおよびAjDmaW_a1tCコード配列を含んでいるが、これを次に、上記のAar IおよびPme Iで消化した骨格に連結した。これはEno2ターミネーターをpESC-UraのAdh1ターミネーターに置き換えている。pEVE2075と名付けられた最終的なベクター（配列番号125）は、Tef1プロモーターとAdh1ターミネーターの間にAjDmaWを、Pgk1プロモーターとCyc1ターミネーターの間にAfEasFを含有する。

ERG20活性の低下した酵母宿主の調製

ERG20制御領域の一部を欠失させて、それを、ScKex2遺伝子の比較的弱い構成的な天然プロモーターで置き換えることによって、酵母菌株EYS1456を改変した。初めに、ベクターpEVE2049（配列番号126）を調製したが、これは選択可能なNourseothricin耐性マーカー遺伝子NatRに統いてScKex2プロモーターを含有する。NatR-ScKex2断片を次に、2つのプライマー、配列番号127および128を用いてPCRで増幅した。配列番号127の5'末端は、ERG20翻訳開始部位と関連する768位から724位までの酵母宿主のゲノム配列と同一であり（図17のHR1）、3'末端は、NatR選択可能マーカーの上流のpEVE2049内の配列と同一である。配列番号128の5'末端は、ERG20コード配列の逆向きの相補配列と一致し（図17のHR2）、3'末端は、ScKex2プロモーターの3'末端の逆向きの相補配列と同じである。PCR産物を用いてEYS1456を形質転換し、ERG20プロモーター領域がScKEX2プロモーターで置き換えられる結果となった。NatR選択可能マーカーを用いて、組込みに成功したクローンを選択した。図17は、組込み型構築物およびゲノム標的領域の概略を示す。このクローン、およびEYS1456を、プラスミドpEVE2075でさらに形質転換して、菌株EYS1538（天然ERG20プロモーター領域を有する対照菌株）およびEYS1926を作製したが、これは天然ERG20プロモーターをScKex2プロモーターで置き換えたものである。

経路の構築

プラスミドpEVE2075を保有する2つの酵母菌株EYS1538およびEYS1926は、上記のように調製され、いずれにおいてもMe-DMATの生合成経路を与えた。その結果得られた菌株は、したがって、2つとも以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

EYS1538およびEYS1926: AjDmaW_a1tCおよびAfEasF

増殖条件：

改変酵母菌株EYS1538およびEYS1926は、2%グルコースを含有し、Ura（ウラシル）を除了いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）中で増殖させた。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で30 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 × gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。

10

20

30

30

40

50

それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acuity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acuity UPLC (登録商標) B ridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1×100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A : H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B:アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0388】

【表31】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 °。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 °。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果：

EYS1538およびEYS1926の上清をLC-MSで分析した。抽出イオンクロマトグラムは、Me-DMATの予想質量に相当するピーク (m/z = 257.164 +/- 0.01Da)を、保持時間7.8分に示した。

このピークを、すでに精製された化合物と対照してMe-DMATと同定した（実施例4を参照されたい）。Me-DMATに相当するピーク下の面積を積分で求めると、EYS1538と比べてEYS1926では2倍を超えるMe-DMATの増加が示された（図18を参照されたい）。この増加は、EYS1926におけるプロモーターの置き換えに起因するとみなされ、それがERG20のダウンレギュレーションをもたらし、したがって、Me-DMAT生合成のためのDMAPPの利用可能性を高めた。

【実施例7】

【0389】

P. divaricatus Eashを含む8段階異種経路の発現によるパン酵母 (Saccharomyces cerevisiae) におけるシクロクラビンの生産

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：

CEN.PK 111-61A (MAT α MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例7で使用した遺伝子を表32に示す：

【0390】

10

20

30

40

【表32】

実施例7に使用した遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	<i>A. japonicus</i>
Af_EasF	107	<i>A. fumigatus</i>
Aj_EasE	106	<i>A. japonicus</i>
Aj_EasC	104	<i>A. japonicus</i>
Aj_EasD	105	<i>A. japonicus</i>
Aj_EasH	109	<i>A. japonicus</i>
Pd_EasH	157	<i>P. divaricatus</i>
Aj_EasA	103	<i>A. japonicus</i>
Aj_EasG	108	<i>A. japonicus</i>

10

20

30

40

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子は、DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USAまたはGeneArt AG, Regensburg, Germanyにより製造された。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102～109および157）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いて、クローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをさらにクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

【0391】

指定の組込み型ベクター（配列番号114～118）中に1つもしくは2つのカセットをサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、このベクターは酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた。2つの発現カセットの場合、クローニングの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された（配列番号114～118）。ゲノム相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マーカーを含有する、完全な組込み型構築物は、組込み型ベクターをSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のようにCreリコンビナーゼを発現するプラスミドで細胞を形質転換した後、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物の配列番号を表33に示す。

【0392】

【表33】

実施例7で使用した組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物

構築物名	配列番号	カセット1			カセット2			マーカー	目的領域
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター	プロモーター	遺伝子	ターミネーター		
pEVE2294	114	ScPgK1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1	KanMX	YorWΔ17
pEVE2312	115	ScPgK1	AjEasC	ScAdh1	ScGpd1	AjEasE	ScCyc1	HygR	YPRCΔ15
pEVE2342	116	ScPgK1	AjEasD	ScAdh1				BleR	YORWA22
pEVE2344	118	ScPgK1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1	NatR	YPRCt3

さらに、2つのプラスミドを構築したが、これは*Aspergillus japonicus*遺伝子由来のAjEasH遺伝子（配列番号109）または*Paecilomyces divaricatus*由来のPdEasH遺伝子（配列番号028）のいずれか一方を含有しており、発現カセット（配列番号111）を備えたpR315ベクターにクローニングされたものであって、それにはGPD1プロモーターおよびCYC1ターミネーターが使用されている。クローニングは実施例2に記載のように実施された。

経路の構築：

酵母菌株EYS1851は、EYS1456に、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2342、およびpEVE2344（表33）から構築物を組み込むことによって調製した。2つの菌株、EYS2098およびEYS2099は、EYS1851を、それぞれPdEasHまたはAjEasHを含有するpRSベクター（上記を参照されたい）で形質転換することによって調製した。その結果得られた菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

EYS2098: AjDmaW_altC, AfEasF, AjEasE, AjEasC, AjEasD, AjEasA, AjEasG, PdEasH
EYS2099: AjDmaW_altC, AfEasF, AjEasE, AjEasC, AjEasD, AjEasA, AjEasG, AjEasH

増殖条件：

変形酵母菌株EYS2098およびEYS2099は、2%グルコースを含有し、ロイシンを除いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）中で増殖させた。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で20にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acuity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acuity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0393】

【表34】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート

10

20

30

40

50

： 5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果：

EYS2098およびEYS2099から得られた上清は、LC-MSで分析し、カノクラビンI（微量）およびシクロクラビンの生産を、純粋化合物を基準として評価した（化合物同定については実施例1および2を参照されたい）。2つの菌株におけるシクロクラビンの生産はいずれも（図19を参照されたい）、親株EYS1851がシクロクラビンを生産しない（実施例1を参照されたい）ので、*P. divaricatus*もしくは*A. japonicus*に由来するEasH遺伝子がいずれもこの化合物の生産をもたらしうることを示す。

10

【実施例8】

【0394】

イソペンテニルニリン酸：ジメチルアリルニリン酸イソメラーゼ活性 (Idi1) が増加した宿主菌株において *A. japonicus* 由来の DmaW_altC および *A. fumigatus* 由来 EasF を用いた Me-D MAT 生産の増加

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：
CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

20

実施例8で使用した遺伝子を表35に示す：

【0395】

【表35】

実施例8で使用した遺伝子

遺伝子名	配列番号	配列の起源
AjDmaW_altC	102	<i>A. japonicus</i>
AfEasF	107	<i>A. fumigatus</i>
ScIdi1	158	<i>S. cerevisiae</i>

30

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された2つの合成遺伝子は、GeneArt AG, Regensburg, Germanyにより製造されたが、これらの遺伝子は、翻訳終止コドンを含めて、AjDmaW_altC（配列番号102）およびAfEasF（配列番号107）のアミノ酸配列をコードするものである。ScIdi1（イソペンテニルニリン酸：ジメチルアリルニリン酸イソメラーゼ）をコードする遺伝子（配列番号158）を、テンプレートとして*S. cerevisiae*のゲノムDNAを用いたPCRによって増幅した。合成（AjDmaW_altCおよびAfEasF）の際に、または、PCR増幅（ScIdi1）の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTT AAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。

40

【0396】

遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーター（Gpd1、Tef1、およびTef2）およびターミネーター（それぞれCyc1、Eno2、およびPgi1）を含有する酵母発現カセット（それぞれ配列番号110、124、および159）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセットは、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。最終的に、遺伝子を含有する発現カセットを、Ascl断片として、それぞれ酵母ベクターpRS316、pRS315、およびpRS313の骨格にクローニングした。pRSベクターpRS316、pRS315、およびpRS313は、これらの元のベクターのPvuII部位間にマルチクローニング部位リンカー（配列番号113）を

50

挿入することによって、すでに改変済みであったので、このリンカーのAscl部位に発現力セットをクローニングすることが可能であった。pRSベクターはSikorski, 1989により記載されている。

経路の構築：

酵母菌株EYS2055は、EYS1456に、遺伝子AjDmaW_altCおよびAfEasFを含有する上記pRSベクターを用いて、Me-DMATの生合成経路を導入することによって調製した。この菌株をさらに、Scldi1遺伝子を含有する第3のpRSベクターで形質転換して、菌株EYS2056を作製した。その結果得られた2つの菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現力セットを含有した：

EYS2055: AjDmaW_altC、およびAfEasF

EYS2056: AjDmaW_altC、AfEasF、およびScldi1

増殖条件：

改変酵母菌株EYS2055およびEYS2056は、2%グルコースを含有し、His(ヒスチジン)、Leu(ロイシン)、およびUra(ウラシル)を除いた、標準的なSCプロス(ForMedium, Histon, U.K.)中で増殖させた。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で20または30にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acquity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0397】

【表36】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果：

EYS2055およびEYS2056の上清をLC-MSで分析した。DMAT (m/z=273.159 +/- 0.01Da) およびMe-DMAT (m/z=287.175 +/- 0.01Da) の予想質量のイオンクロマトグラムを抽出し、ピーク下の面積を積分で求めた。その結果(図20aおよび20bを参照されたい)、2つの温度のどちらでも、EYS2055株と比べて、EYS2056株ではMe-DMAT生産が増加することが示された。この増加は、通常の野生型のEYS2055の発現レベルと比較して、Scldi1の過剰発現に相当するものであった。

【実施例9】

【0398】

10

20

30

40

50

全長異種経路の遺伝子の追加コピーの発現によるシクロクラビン生産の増加
材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：

CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例9で使用した遺伝子を表37に示す：

【0 3 9 9】

【表 3 7】

実施例9で使用した遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	A. japonicus
Af_EasF	107	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus

10

20

30

40

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子は、DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA、またはGeneArt AG, Regensburg, Germanyにより製造された。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102～109）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

【0 4 0 0】

指定の組込み型ベクター（配列番号114、115、117、118、および160）中に1つもしくは2つのカセットをサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、このベクターは酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた。クローニングの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された。相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マーカーを含有する、最終的な組込み型構築物（配列番号114、115、117、118、および160）は、組込み型ベクターをSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のようにCreリコンビナーゼを発現するプラスミドで細胞を形質転換した後、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物の配列番号を表38に示す。

【0 4 0 1】

【表38】

実施例9で使用した組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物

構築物名	配列番号	カセット1			カセット2			マーカー	目的領域
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター	プロモーター	遺伝子	ターミネーター		
pEVE2294	114	ScPgK1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1	KanMX	YorWΔ17
pEVE2312	115	ScPgK1	AjEasC	ScAdh1	ScGpd1	AjEasE	ScCyc1	HygR	YPRCΔ15
pEVE2343	117	ScPgK1	AjEasD	ScAdh1	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1	BleR	YORWΔ22
pEVE2344	118	ScPgK1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1	NatR	YPRCΔ3
pEVE2656	160	ScGpd1	AjEasC	ScCyc1				KanMX	YERΔ8

経路の構築：

2つの酵母菌株は、EYS1456に、完全なシクロクラビン経路のシングルコピーを組み込むことによって(EYS1934)、または完全な経路に加えて遺伝子AjEasCの追加コピーを組み込むことによって(EYS2206)、調製した。EYS1934は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、およびpEVE2344(表38)から構築物を組み込むことによって調製されたのに対して、EYS206は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、pEVE2344、およびpEVE2656(表38)から構築物を組み込むことによって調製された。その結果得られた菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

EYS1934: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、およびAjEasH

EYS2206: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、2 x AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、およびAjEasH

増殖条件：

変形酵母菌株EYS1934およびEYS2206は、2%グルコースを含有する標準的なSCプロス(FordMedium, Hunstanton, U.K.)中で増殖させた。培養物は、培地25mlを入れた250ml振盪フラスコ内で30にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF(Waters Acquity(商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC(登録商標)Bridged Ethyl Hybrid(BEH) C18 1.7μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0402】

【表39】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート

10

20

30

40

50

： 5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果：

EYS1934およびEYS2206は30 で上記のように増殖させた。上清をLC-MSで分析し、シクロクラビンの予想質量 (m/z=239.1543 +/- 0.01Da) のイオンクロマトグラムを抽出した。また、約241のm/z (m/z=241.1699 +/- 0.01Da) にちなんでMW241と名付けられた、その経路の第2産物のクロマトグラムも抽出した。ピーク下の面積を積分して求め、その結果を比較すると、EYS1934に比べてEYS2206では、シクロクラビン(CCL)生産も、フェスツクラビン(MW241)生産も、増加していることが示された。図21を参照されたいが、この増加は、EYS1934に比べてEYS2206において、AjEasCの追加コピーが発現されていることの影響であると見なされた。

10

【実施例 10】

【0 4 0 3】

N. lolii EasEを含む8段階異種経路の発現によるパン酵母 (Saccharomyces cerevisiae) におけるシクロクラビンの生産

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：
CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

20

実施例10で使用した遺伝子を表40に示す：

【0 4 0 4】

【表 4 0】

実施例 10 で使用した遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	A. japonicus
Af_EasF	107	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
NI_EasE	161	N. lolii
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus

30

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102 ~ 109および161）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGGCGGを与えた。遺伝子（配列番号102、107、105、109、103、および108）は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンクマー（配列番号113）が挿入されていた。

40

50

【0405】

指定の組込み型ベクター（配列番号114、117、および118）中にカセットを対にしてサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、このベクターは酵母の選択可能マークー遺伝子も含有していた。クローニングの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マークーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された。相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マークーを含有する、完全な組込み型構築物（配列番号114、117、および118）は、組込み型ベクターをSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のようにCreリコンビナーゼを発現するプラスミドで細胞を形質転換した後、選択マークーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物の配列番号を表41に示す。

10

【0406】

【表41】

実施例10で使用した組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物

構築物名	配列番号	カセット1			カセット2			マークー	目的領域
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター	プロモーター	遺伝子	ターミネーター		
pEVE2294	114	ScPgK1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1	KanMX	YorWΔ17
pEVE2343	117	ScPgK1	AjEasD	ScAdh1	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1	BleR	YORWΔ22
pEVE2344	118	ScPgK1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1	NatR	YPRCτ3

20

さらに、3つのプラスミドを構築した：1つは、pRS313にクローニングされたAjEasC遺伝子（配列番号104）を含有した。pR313はすでに、C/A発現カセット（配列番号121）を備えており、それは天然の酵母Cup1プロモーターおよびAdh1ターミネーターを含有する。他の2つのプラスミドは、*Aspergillus japonicus*由来AjEasE遺伝子（配列番号106）または*Neotyphodium lolii*由来NIEasE遺伝子（配列番号161）のいずれか一方を含有するものであって、それぞれの遺伝子を、やはりC/A発現カセット（配列番号121）を備えたpRS315ベクターにクローニングすることによって調製された。クローニングは実施例2に記載のように実施された。

30

経路の構築：

酵母菌株EYS1937は、EYS1456に、pEVE2294、pEVE2343、およびpEVE2344から構築物を組み込むことによって調製した（表41）。2つの菌株、EYS2124およびEYS2125は、その後、EYS1937を、それぞれAjEasEまたはNIEasEのいずれか一方とともにAjEasCを含有するpRSベクター（上記参照）で形質転換することにより調製した。その結果得られた菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

40

EYS2124: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

EYS2125: AjDmaW_altC、AfEasF、NIEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

増殖条件：

改変酵母菌株EYS2124およびEYS2125は、2%グルコースを含有し、ロイシン、およびヒスチジンを除いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）中で増殖させた。硫酸銅を、終濃度200 μMとなるよう添加した。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で20 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

50

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 × gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acquity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1×100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0407】

【表42】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm～500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 °。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 °。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80～1000 m/z。

結果：

EYS2124およびEYS2125の上清をLC-MSで分析し、シクロクラビンの予想質量 (m/z=239.1 543 +/- 0.01Da) のイオンクロマトグラムを抽出した。また、約241のm/z (m/z=241.1699 +/- 0.01Da) にちなんでMW241と名付けられた、フェスツクラビンである、その経路の第2産物のクロマトグラムも抽出した。ピーク下の面積を積分して求めたが、その結果の比較は、2つの菌株においてシクロクラビン (CCL) およびフェスツクラビンがともに生産されることを示し、生産レベルは、EYS2125よりもEYS2124で高かった（図22を参照されたい）。このことは、使用した条件下では、A. japonicus由来EasE遺伝子のほうが、N. lolii由来EasEよりも効率的であるが、2つのEasEホモログはいずれも、機能的であって、結果的にCCLおよびMW241の生産をもたらすことを示している。

【実施例11】

【0408】

異なるコドンを使用した合成EasE遺伝子を含む8段階異種経路の発現によるパン酵母 (Saccharomyces cerevisiae) におけるシクロクラビンの生産

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：
CEN.PK 111-61A (MAT α MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例11で使用した遺伝子を表43に示す：

【0409】

10

20

30

40

【表43】

実施例11で使用した遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	A. japonicus
Af_EasF	107	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
Aj_EasE	162	A. japonicus
Aj_EasE	163	A. japonicus
Aj_EasE	164	A. japonicus
Aj_EasE	165	A. japonicus
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus

10

20

30

40

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102～109および162～165）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子（配列番号102、107、105、109、103、および108）は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現力セット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

【0410】

指定の組込み型ベクター（配列番号114、117、および118）中にカセットを対にしてサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、このベクターは酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた。クローニングの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された。相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マーカーを含有する、完全な組込み型構築物（配列番号114、117、および118）は、組込み型ベクターをSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のようにCreリコンビナーゼを発現するプラスミドで細胞を形質転換した後、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物の配列番号を表44に示す。

【0411】

【表44】

実施例11で使用した組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物

構築物名	配列番号	カセット1			カセット2			マーカー	目的領域
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター	プロモーター	遺伝子	ターミネーター		
pEVE2294	114	ScPgK1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1	KanMX	YorWΔ17
pEVE2343	117	ScPgK1	AjEasD	ScAdh1	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1	BleR	YORWΔ22
pEVE2344	118	ScPgK1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1	NatR	YPRCt3

さらに、6つのプラスミドを構築した：1つは、pRS313にクローニングされたAjEasC遺伝子（配列番号104）を含有する。pRS313はすでに、C/A発現カセット（配列番号121）を備えていたが、それは天然の酵母Cup1プロモーターおよびAdh1ターミネーターを含有する。他の5つは、5つの代替可能なコドン使用で合成された*Aspergillus japonicus*由来AjEasE遺伝子のバリエント（配列番号106および162～165）を含有するものであって、やはりC/A発現カセット（配列番号121）を備えたpRS315ベクターにクローニングすることによって調製された。クローニングは実施例2に記載のように実施された。

経路の構築：

酵母菌株EYS1937は、EYS1456に、pEVE2294、pEVE2343、およびpEVE2344から構築物を組み込むことによって調製した（表44）。5つの菌株、EYS2124、EYS2127、EYS2147、EYS2148、およびEYS2149は、その後、EYS1937を、それぞれ1つの型のAjEasE遺伝子とともにAjEasCを含有するpRSベクター（上記参照）で形質転換することにより調製した。その結果得られた菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

EYS2124: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE（配列番号106）、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

EYS2127: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE（配列番号162）、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

EYS2147: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE（配列番号163）、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

EYS2148: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE（配列番号164）、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

EYS2149: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE（配列番号165）、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH

増殖条件：

変形酵母菌株EYS2124、EYS2127、EYS2147、EYS2148、およびEYS2149は、2%グルコースを含有し、ロイシンおよびヒスチジンを除いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Histonstan, U.K.）中で増殖させた。硫酸銅を、終濃度200 μMとなるよう添加した。培養物は、培地25 mlを入れた250 ml振盪フラスコ内で30 ℃にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 × gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroOTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF (Waters Acquity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1×100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0412】

【表45】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

10

PDAパラメーター：レンジ：210 nm～500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80～1000 m/z。

結果：

EYS2124、EYS2127、EYS2147、EYS2148、およびEYS2149の上清をLC-MSで分析し、シクロクラビンの予想質量 (m/z=239.1543 +/- 0.01Da) のイオンクロマトグラムを抽出した。また、約241のm/z (m/z=241.1699 +/- 0.01Da) にちなんでMW241と名付けられた、その経路の第2産物のクロマトグラムも抽出した。ピーク下の面積を積分して求めたが、その結果は、5つすべての菌株においてシクロクラビン (CCL) およびフェスツクラビン (MW241) がいずれもさまざまなレベルで生産されることを示した（図23を参照されたい）。検討したすべての型のEasE遺伝子は、同じアミノ酸配列をコードしているので、化合物生産レベルのばらつきは、これらの合成EasE遺伝子で使用されるDNAコドン選択の相違を反映している。

20

【実施例12】

【0413】

パン酵母 (Saccharomyces cerevisiae) における8段階異種経路の発現によるシクロクラビン生産の増加ならびにオスモライト存在下での酵母の増殖

30

場合によっては、オスモライトの存在がタンパク質の正確なフォールディングを増進することが示されている (Bandyopadhyay 2012, Burkewitz 2012)。ここで、本発明者らは、オスモライトであるグリセロールが、酵母での異種発現経路に基づくシクロクラビン生産を向上させることができることを示す。

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：

CEN.PK 111-61A (MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

実施例12で使用した遺伝子を表46に示す：

【0414】

40

【表46】

実施例12で使用した遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	A. japonicus
Af_EasF	107	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus

10

20

30

40

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子は、DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA、またはGeneArt AG, Regensburg, Germanyにより製造された。遺伝子は、アミノ酸配列（配列番号102～109）に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット（配列番号110および111）に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット（配列番号110および111）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー（配列番号113）が挿入されていた。

【0415】

指定の組込み型ベクター（配列番号114、115、117、および118）中に2つのカセットをそれぞれサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、このベクターは酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた。クローニングの方向はヘッドトゥーヘッドであって、それは、プロモーターが逆方向の翻訳を可能にすることを意味する。マーカーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同性を有する配列が隣接して配置された。相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マーカーを含有する、最終的な組込み型構築物（配列番号114、115、117、および118）は、組込み型ベクターをSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証し、Sauer, 1987に記載のようにCreリコンビナーゼを発現するプラスミドで細胞を形質転換した後、選択マーカーをloxP部位で組換えて除去した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物の配列番号を表47に示す。

【0416】

【表47】

実施例12で使用した組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物

構築物 名	配列 番号	カセット1			カセット2			マーカー	目的領域
		プロ モーター	遺伝子	ターミ ネーター	プロ モーター	遺伝子	ターミ ネーター		
pEVE2294	114	ScPgK1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1	KanMX	YorWΔ17
pEVE2312	115	ScPgK1	AjEasC	ScAdh1	ScGpd1	AjEasE	ScCyc1	HygR	YPRCΔ15
pEVE2343	117	ScPgK1	AjEasD	ScAdh1	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1	BleR	YORWΔ22
pEVE2344	118	ScPgK1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1	NatR	YPRCτ3

経路の構築：

酵母菌株(EYS2006)は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、およびpEVE2344由来の構築物(表47)を用いて、完全なシクロクラビン経路のシングルコピーをEYS1456に組み込むこと、ならびにそれに加えて、3つの空のプラスミドpRS313、pRS315、およびpRS316(上記)を導入することによって、調製した。その結果得られた菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

EYS2006: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、およびAjEasH

増殖条件：

改変酵母菌株EYS2006は、2%グルコースを含有し、ロイシン、ヒスチジン、およびウラシルを除いた、標準的なSCプロス(ForMedium, Hunstanton, U.K.)中で増殖させた。EYS2006の培養物は、グリセロールなし、または2.5%、5%、および10%グリセロールありで増殖させた。0.8 mLの培養物を、30℃にて72時間、BioLector発酵槽(M2P-labs, Baesweiler, Germany)で培養した。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF(Waters Acquity(商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC(登録商標)Bridged Ethyl Hybrid(BEH) C18 1.7 μm 2.1 x 100 mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0417】

【表48】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相A	% 移動相B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80℃。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。

10

20

30

40

50

ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 °C。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果：

EYS2006は上記のように30 °Cにて増殖させた。その上清をLC-MSで分析し、シクロクラビンの予想質量 (m/z=239.1543 +/- 0.01Da) のイオンクロマトグラムを抽出した。また、約241のm/z (m/z=241.1699 +/- 0.01Da) に帰すべき、その経路の第2産物、フェスツクラビン (MW241) のクロマトグラムも抽出した。ピーク下の面積を積分して求め、比較した (図24を参照されたい)。対照 (グリセロールなしで増殖したEYS2006) と比較すると、グリセロールありで増殖させた培養物は、より多くのシクロクラビンおよびフェスツクラビンを生産した。検討した条件下で、化合物の生産レベルは、グリセロール濃度の増加について増大し、最高の生産レベルは10%グリセロールで得られた。

10

【実施例 13】

【0 4 1 8】

異種CCL経路由来遺伝子の複数コピーの発現ならびに宿主Pdi1およびFad1の過剰発現によるシクロクラビン生産の増加

材料および方法：

本実験に使用した基本の酵母菌株EYS1456は、以下の遺伝子型を有した：
CEN.PK 111-61A (MAT α MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52)

20

実施例13で使用した遺伝子を表49に示す：

【0 4 1 9】

【表 4 9】

実施例 13 で使用した遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Aj_DmaW_altC	102	A. japonicus
Af_EasF	107	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus
Sc_Pdi1	166	S. cerevisiae
Sc_Fad1	167	S. cerevisiae

30

遺伝子のクローニング：

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子。遺伝子は、アミノ酸配列 (配列番号102 ~ 109) に加えて、翻訳終止コドンをコードする。天然の酵母 (S. cerevisiae) 遺伝子Pdi1 (配列番号166) およびFad1 (配列番号167) をゲノムDNAから増幅した。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット (配列番号110、111、159、および168) に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscl制限部位を有した。遺伝子発現カセット (配列番号110、111、159、および168) は、pUC18に基づくプラスミドベクター (配列番号112) 上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンカー (配列番号113) が挿入されていた。

40

【0 4 2 0】

50

指定の組込み型ベクター（配列番号114、115、117、118、160、169、170、および171）中に、1、2、または3つのカセットをサブクローニングするために、遺伝子発現カセットを使用したが、これらのベクターは酵母の選択可能マーカー遺伝子も含有していた。マーカーおよび1つもしくは複数の発現カセットには、宿主のゲノムDNAに対して相同意を有する配列が隣接して配置された。相同配列が隣接して配置された、1つもしくは複数の発現カセットおよび選択マーカーを含有する、最終的な組込み型構築物（配列番号114、115、117、118、160、169、170、および171）は、組込み型ベクターをSbfI制限酵素で消化することによって、pUC18に基づく骨格から切り離され、酵母の形質転換のために使用された。標準的な酢酸リチウム形質転換プロトコールを使用した（Current Protocols; Chapter 13）。正しい組込みをPCRで検証した。組込みの標的部位はFlagfeldt, 2009によって記載されている。組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物の配列番号を表50aおよび50bに示す。

10

20

30

【0421】
【表50-a】

組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物パート1

構築物名	配列番号	カセット1			カセット2		
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター	プロモーター	遺伝子	ターミネーター
pEVE2294	114	ScPgK1	AfEasF	ScAdh1	ScGpd1	AjDmaW_altC	ScCyc1
pEVE2312	115	ScPgK1	AjEasC	ScAdh1	ScGpd1	AjEasE	ScCyc1
pEVE2343	117	ScPgK1	AjEasD	ScAdh1	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1
pEVE2344	118	ScPgK1	AjEasA	ScAdh1	ScGpd1	AjEasG	ScCyc1
pEVE2656	160	ScGpd1	AjEasC	ScCyc1			
pEVE2658	169	Pyk1	ScPdi1	Tef1	Gpd1	ScFad1	ScCyc1
pEVE2682	170	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1	Pyk1	AjDmaW_altC	ScAdh1
pEVE2723	171	ScGpd1	AjEasH	ScCyc1	Pyk1	AjEasC	ScAdh1

【0422】
【表50-b】

組込み型ベクターおよびそれらの組込み型構築物パート2

構築物名	配列番号	カセット3			マーカー	目的領域
		プロモーター	遺伝子	ターミネーター		
pEVE2294	114				KanMX	YorWΔ17
pEVE2312	115				HygR	YPRCΔ15
pEVE2343	117				BleR	YORWΔ22
pEVE2344	118				NatR	YPRCτ3
pEVE2656	160				KanMX	YERA8
pEVE2658	169				BleR	YHRCΔ14
pEVE2682	170				HygR	YMRWΔ15
pEVE2723	171	Tef2	AjEasE	Pgi1	NatR	YNRCAΔ9

経路の構築：

3つの酵母菌株は、EYS1456に、完全なシクロクラビン経路のシングルコピーを組み込む

50

ことによって(EYS1934)、または完全な経路に加えてCCL経路遺伝子および宿主遺伝子の追加コピーを組み込むことによって調製した。したがって、EYS1934は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、およびpEVE2344(表50)由来の構築物を組み込むことによって調製され、EYS2209は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、pEVE2344、pEVE2656、およびpEVE2658(表50aおよび50b)由来の構築物を組み込むことによって調製され、EYS2297は、pEVE2294、pEVE2312、pEVE2343、pEVE2344、pEVE2656、pEVE2658、pEVE2682、およびpEVE2723(表50aおよび50b)由来の構築物を組み込むことによって調製された。EYS1934は、その選択マークーがCreリコンビナーゼ(Sauer, 1987に記載)の発現により、LoxP部位で組換えて除去されており、EYS2209およびEYS2297を調製するための中間体としての役割を果たした。その結果得られた菌株は、したがって、以下の遺伝子の発現カセットを含有した：

EYS1934: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、およびAjEasH

EYS2209: AjDmaW_altC、AfEasF、AjEasE、2 x AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、AjEasH、ScPdi1、およびScFad1

EYS2325: 2 x AjDmaW_altC、AfEasF、2 x AjEasE、3 x AjEasC、AjEasD、AjEasA、AjEasG、3 x AjEasH、ScPdi1、およびScFad1

増殖条件 :

改变酵母菌株EYS1934およびEYS2209は、2%グルコースを含有する標準的なSC+allプロス(ForMedium, Hunstanton, U.K.)中で、BioLector(M2P labs, Baesweiler, Germany)において増殖させた。増殖期を延ばすために、増殖培地に10%グリセロールを添加した。培養物は、30にて72時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。その後、EYS2209およびEYS2297を同一条件で増殖させた。

分析手順 :

サンプル調製：酵母培養物は、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germanyと連動させたUPLC-TOF(Waters Acuity(商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA)に注入した。固定相：カラムは、Acuity UPLC(登録商標)Bridged Ethyl Hybrid(BEH) C18 1.7 μm 2.1 x 100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B:アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0 4 2 3】

【表51】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

結果 :

EYS1934およびEYS2209の培養上清をLC-MSで分析し、シクロクラビンの予想質量(m/z=39.1543 +/- 0.01Da)のイオンクロマトグラムを抽出した。ピーク下の面積を積分して求

10

20

30

40

50

め、その結果を比較すると、EYS1934と比べてEYS2209では、シクロクラビン生産が増加し、上記の条件下では約12 mg/Lの力値に達したことが示された。この増加は、EYS1934と比べてEYS2209では、Aj_EasC、Sc_Pdi1、およびSc_Fad1の追加コピーが発現されることの影響であると見なされた。

【0424】

同一の増殖条件、ならびに抽出および分析法を用いて、EYS2209およびEYS2297を比較したが、これは、EYS2209と比べてEYS2297では、CCL力値が22 mg/Lへとさらに増加することを示した（図25、右）。この増加は、EYS2209と比べてEYS2297では、Aj_DmaW_aItC、Aj_EasC、Aj_EasE、およびAj_EasH (x2) の追加コピーが発現されることの影響であると見なされた。

10

【実施例14】

【0425】

グルコースの連続供給によるシクロクラビン生産の増加

材料および方法：

本実験に使用した酵母菌株EYS2325は、以下の遺伝子型を有した：

MAT MAL2-8C SUC2 his3 1 leu2-3_112 ura3-52 YERC 8::AjEasC/KanMX YHRC 14::ScP di1/ ScFad1/BleR YMRW 15::AjEasH/AjDmaW/HygR YNRC 9::AjEasH/AjEasC/AjEasE/Nat YORW 17::AjDmaW/AfEasF YORW 22::AjEasH/AjEasD YPRCt3::AjEasG/AjEasA YPRC 15:: AjEasE/AjEasC [ARS/CEN/URA3] [ARS/CEN/HIS3] [ARS/CEN/LEU2]

この菌株は、菌株EYS2297（実施例3に記載）を原栄養株にするために、その菌株を3つの空のプラスミドpRS313、pRS315、およびpRS316 (Sikorski, 1989)で形質転換することによって調製された。

20

【0426】

EYS2325株によるCCL生産は、生物体量の生産に連関する（社内での観察）ので、生物体量の高生産を目指す流加培養発酵プロセスを設定した。従来の流加法を選択し、通気および攪拌法は、発酵代謝を回避し、グルコースの蓄積ならびにエタノールおよび/または酢酸の形成を最小限にすることを目指した。

【0427】

プロセスは、合成完全培地（SC）を用いた回分培養として開始し、その後、グルコース、塩類、ビタミン類、微量金属、およびアミノ酸を含有する流加を開始した。記載されている発酵プロセスのために使用された基本システムは、最大作業容量1 Lの容器を用いたMultifors 2 (Infors AG, Bottmingen, Switzerland製)である。出発容量は0.32 Lとし、流加段階の間に、全部で435.6 mLの供給を、所定の指數的流加方式を用いて添加した結果、発酵プロセスの最終容量は約755 mLとなった。

30

シード培養

発酵槽の植菌の前に、2段階シードトレインを選択した。最初のシード培養は、新たに増殖させたプレートから始め、4つのバッフル（くぼみ）を有する500 mL振盪フラスコ内の培地100 mLに植菌することによって、調製された。培地は、20 g/L グルコースを含有するSC-His-Leu-Ura培地（ForMedium, Hunstanton, U.K.）からなるものとした。振盪フラスコを30°にて160 rpmの振盪台に載せた。OD600が約0.5になるまで、細胞を対数期へと増殖させたが、それはグルコースが消費しつくされるより前であった。この最初のシード培養物を用いて、次に第2の100 mL SC-His-Leu-Ura培地シード培養を、初発OD600が0.025に達するのに十分な接種菌液により、4つのバッフル（くぼみ）を有する500 mL振盪フラスコ内で調製した。細胞は、OD600が3.2に達するまで、対数期へと増殖させたが、それはグルコースが消費しつくされるより前であった。

40

発酵の回分培養段階

発酵は、最大作業容量1 LのMultifors 2発酵槽（Infors AG, Bottmingen, Switzerland）で行った。発酵槽は、2つのRushton 6枚ブレードおよび4つのバッフルを備えていた。空気は、発酵槽を曝気するために使用した。温度、pH、攪拌、および通気速度は、培養中終始、管理された。温度は20°に維持した。pHは5M NH₄OHもしくは0.5M HClの自動添加によ

50

リ5.85に保持された。スターラー速度は、800 rpmに設定し、通気速度は1 vvm [L 気体/(L 液体 × 分)]に保持した。発酵は、開始容量0.32 L SC-His-Leu-Ura、20 g/Lグルコース、および0.01% 消泡剤溶液(AF204, Sigma)で、38時間の回分培養として開始された。植菌の前に、発酵槽内の培地10 mLを取り出した。次に、第2段階シード培養(上記参照)の一部10 mLを用いて発酵槽に植菌し、最終容量0.32 Lとした。したがって、植菌率は3 % (v/v)となり、初発OD600 = 0.1を与えた。

流加組成物および一般的な条件

38時間の回分培養発酵時間の後、グルコース、ビタミン類、微量元素、および塩類からなり、さらにアミノ酸で強化された混合物を用いて流加を開始した(表52、53、および54を参照されたい)。

10

20

30

40

【0428】

【表52】

窒素源としてNH₄OHを含む、流加培養発酵で使用された流加混合物の組成

成分	濃度 (g/l)
全炭素源	600
グルコース * H ₂ O	660
YNB w/o アミノ酸およびアンモニウム	10.2
SC ドロップアウトミックス (-His-Leu-Met-Trp-Ura)	3.9735
L-メチオニン	0.2568
L-トリプトファン	0.2568
KH ₂ PO ₄	10.8
MgSO ₄ * 7H ₂ O	6.12
K ₂ SO ₄	4.2
Na ₂ SO ₄	0.336
微量元素原液(表53参照)	15 (ml)
ビタミン原液(表54参照)	15 (ml)

【0429】

【表53】

微量元素原液

化合物	濃度 (g/l)
Na ₂ EDTA+2H ₂ O	15
ZnSO ₄ *7H ₂ O	4.5
FeSO ₄ *7H ₂ O	3
CaCl ₂ *2H ₂ O	3
MnCl ₂ *4H ₂ O	1
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.32
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.3
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0.4
H ₃ BO ₃	1
KI	0.1

【0430】

【表54】

ビタミン原液

化合物	濃度 (g/l)
D-ビオチン	0.1
Ca-パントテン酸	2
チアミン-HCl	2
ピリドキシン-HCl	2
ニコチン酸	2
p-アミノ安息香酸	2
m-イノシトール	0.05

10

20

30

前記の流加段階の間、水酸化アンモニウム (5M NH₄OH) は、窒素源としても、pH調整用の塩基としても使用された。pH調整用の酸は0.5M HClとした。空気を用いてバイオリアクターを曝気した。温度、pH、搅拌、および通気速度は、培養中終始、管理された。温度は20℃に維持した。pHは5M NH₄OHもしくは0.5M HClの自動添加により5.85に保持された。スター速度は、最初に800 rpmに設定し、通気速度は最初は1.0 vvmに設定した。スター速度は、工程（下記参照）にしたがって、手動で次第に高速化し、最大1200 rpmに達した。通気は、容量および生物体量の増加中、十分な通気速度を維持するように、手動で次第に増加させた（下記参照）。通気および搅拌の管理は、溶存酸素（DO）が10 - 20 %を下回らないことを目指した。流加培養段階の間の全般的な運転条件は、液体量：0.32 - 0.755 L、温度20℃、pH 5.85、搅拌速度800-1200 rpm、ならびに気流速度1-2 vvmであった。

【0431】

以下に概説する流加方式によれば、予想される流加追加分の合計は72時間で435.6 mLであった。ガスホールドアップは過大ではなかったが、それでも実量を10%も増加させると予想された。気泡形成およびガスホールドアップは、流加培養の最初の回分培養段階で使用される「SC-His-Leu-Ura」培地への消泡剤の添加によって制御された。サンプルを1日2回抜き取って、CCL生産について分析した。生物体量の増加はおもにOD600の増加により追跡した。

流加方式

流加段階に所定の指数的流加法を用いたが、これは溶存酸素その他のいかなる種類の設定値によっても制御されなかった。指数的流加プロファイルを表55に示し、搅拌および通気速度を表56に示す。

【0432】

【表55】

流加培養の流加段階における供給プロファイル

時間	F(t)	F(t)	時間	F(t)	F(t)	時間	F(t)	F(t)
t (h)	mL/h	mL/min	t (h)	mL/h	mL/min	t (h)	mL/h	mL/min
38	0.6	0.01	62	2.1	0.035	86	6.9	0.115
39	0.7	0.011	63	2.2	0.037	87	7.3	0.121
40	0.7	0.012	64	2.3	0.038	88	7.6	0.127
41	0.7	0.012	65	2.4	0.04	89	8	0.134
42	0.8	0.013	66	2.5	0.042	90	8.4	0.141
43	0.8	0.013	67	2.7	0.045	91	8.9	0.148
44	0.8	0.014	68	2.8	0.047	92	9.3	0.156
45	0.9	0.015	69	3	0.049	93	9.8	0.164
46	0.9	0.016	70	3.1	0.052	94	10.3	0.172
47	1	0.016	71	3.3	0.054	95	10.8	0.181
48	1	0.017	72	3.4	0.057	96	11.4	0.19
49	1.1	0.018	73	3.6	0.06	97	12	0.2
50	1.1	0.019	74	3.8	0.063	98	12.6	0.21
51	1.2	0.02	75	4	0.067	99	13.2	0.221
52	1.3	0.021	76	4.2	0.07	100	13.9	0.232
53	1.3	0.022	77	4.4	0.074	101	14.6	0.244
54	1.4	0.023	78	4.6	0.077	102	15.4	0.257
55	1.5	0.024	79	4.9	0.081	103	16.2	0.27
56	1.5	0.026	80	5.1	0.085	104	17	0.284
57	1.6	0.027	81	5.4	0.09	105	17.9	0.298
58	1.7	0.028	82	5.7	0.094	106	18.8	0.313
59	1.8	0.03	83	6	0.099	107	19.8	0.329
60	1.9	0.031	84	6.3	0.104	108	20.8	0.346
61	2	0.033	85	6.6	0.11	109	21.8	0.364

【0433】

10

20

30

【表56】

流加培養の流加段階に関する運転条件

培養 (h)	流加	攪拌速度および通気の変更
37.99	開始	
68.56		攪拌機を 800 から 1000 rpm に高速化
68.57		流量を 0.32 から 0.5 NL/min に増加
69.06		攪拌機を 1000 から 1100 rpm に高速化
92.89		流量を 0.5 から 1 NL/min に増加
92.9		攪拌機を 1100 から 1200 rpm に高速化
97.89		流量を 1 から 1.5 NL/min に増加
109.99	終了	
116.31		発酵終了

10

分析手順：

サンプル調製：発酵中に採取された酵母サンプルは、1000 x gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicrOTOF-Q II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) と連動させたUPLC-TOF (Waters Acquity (商標名) Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA) に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC (登録商標) Bridged Ethyl Hybrid (BEH) C18 1.7 μm 2.1x100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A: H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B: アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

20

【0434】

【表57】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

30

PDAパラメーター：レンジ：210 nm ~ 500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 °。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 °。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80 ~ 1000 m/z。

40

結果：

CCLおよびフェスツクラビン (FCL) の生産を測定し、化合物濃度 / 時間を細胞密度 (OD 600) に対してプロットした (図26を参照されたい)。細胞量の増加に相関して2つの化合物がいずれも増加することが示された。生物体量の増加は、Ultrospec 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences において係数0.49を掛けてOD600を細胞乾重量 (CDW) に変換することにより見積もられた。

【0435】

このプロセスによって得られたCCLの濃度は、清澄化されたプロスで (すなわち細胞除

50

去後に)測定され、約789 mg/Lであった(図26を参照されたい)。CCLのごく一部は細胞内で同様に検出されたが、それでも清澄化プロセスからCCLの大部分を単離することが出来た。それに加えて、約114 mg/LのFCLが生産された。

【0436】

要約すると、結果は、管理された流加培養発酵プロセス中のEYS2325の細胞量の増加が、CCLおよびFCLの生産を増大させることを示している。

【実施例15】

【0437】

さまざまな遺伝的背景を有する酵母菌株におけるシクロクラビンの生産

材料および方法:

10

この実験に使用した酵母菌株を表58に示す:

【0438】

【表58】

2つのプラスミドHRT1およびHRT5で形質転換された、さまざまな遺伝的背景を有する7つの菌株を本実験で分析した

菌株	説明	親株
EYS2387	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 HRT1 HRT5	BY 4742
EYS2393	MAT α leu2-3_112 ura3-52 pep4-3 ssc1-1 ssc2-1 HRT1 HRT5	CGY 1585
EYS2395	MAT α Δ his3 Δ leu2 Δ ura3 (x2) HRT1 HRT5	Ethanol Red
EYS2396	MAT α MAL1-8C SUC2 his3 Δ 1 leu2-3_112 ura3-52 HRT1 HRT5	CEN.PK 111-61A
EYS2397	MAT α his3 Δ 200 leu2 Δ 1 trp Δ 63 ura3-52 GAL2 HRT1 HRT5	FY1679-06C
EYS2398	MAT α ade2-1 his3-11 leu2-3_112 trp1 Δ -2 ura3-52 can1-100 HRT1 HRT5	BMA64 (W303)
EYS2399	MAT α suc2 Δ 9 his3 Δ 200 leu2-3_112 lys2-801 trp Δ 901 ura3-52 GAL HRT1 HRT5	SEY 6210

20

実施例15で使用された遺伝子を表59に示す:

【0439】

【表59】

30

実施例15で使用された遺伝子のリスト

遺伝子名	配列番号	配列の起源
Cp_DmaW	123	C. purpurea
Af_EasF	102	A. fumigatus
Aj_EasE	106	A. japonicus
Aj_EasC	104	A. japonicus
Aj_EasD	105	A. japonicus
Aj_EasH	109	A. japonicus
Aj_EasA	103	A. japonicus
Aj_EasG	108	A. japonicus

40

遺伝子のクローニング:

酵母での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子。遺伝子は、アミノ酸配列(配列番号123および102~109)に加えて、翻訳終止コドンをコードする。合成の際に、すべての遺伝子に、5'末端においてHindIII制限認識部位を含むDNA配列AAGCTTAAAを与え、3'末端においてSacII認識部位を含むDNA配列CCGCGGを与えた。遺伝子は、HindIIIおよびSacIIを含む多重クローニング部位で隔てられた、天然の酵母プロモーターおよびターミネーターを含有する酵母発現カセット(配列番号110、111、124、および172)に、HindIIIおよびSacIIを用いてクローニングされた。すべてのカセットは両端にAscI制限部位を有した

50

。遺伝子発現カセット（配列番号110、111、124、および172）は、pUC18に基づくプラスミドベクター（配列番号112）上に含まれたが、このベクター中には、発現カセットをクローニングするためのAscl部位を提供するために、リンクマーク（配列番号113）が挿入されていた。

【0440】

遺伝子発現カセットは、pUC18に基づく組換えベクターにサブクローニングしたが、それらはそれぞれ、120 bp相同組換えタグ（HRT）配列を有しており、その両側にAscl部位が配置され、中央にMluI部位を有した。これらのHRTは、第1のタグの後半が第2のタグの前半と同一であり、他も同様であるようにデザインされた。

【0441】

3つのヘルパー断片を用いて2つのプラスミドを構築したが、これらは完全なCCL経路を合わせて含有した：1つのヘルパー断片は、酵母の栄養要求性マークター、および細菌のpMB1複製開始点を含有した。第2のヘルパー断片は、酵母での複製のためのARS4/CEN6配列、および細菌のクロラムフェニコール耐性マークターを含有した。いずれの断片も隣接するHRTを有した。第3の断片は、HRTが短い1600 bpスペーサー配列で隔てられることだけを考慮してデザインされた。すべてのヘルパー断片は、大腸菌（*E. coli*）での増幅のために、pUC18に基づく骨格にクローニングされていた。すべての断片は、それらを切り出すことが出来るAscl部位にクローニングされた。

【0442】

2つのプラスミド、CCL-HRT1およびCCL-HRT5（配列番号173および174）を調製するために、3つのヘルパープラスミド由来のプラスミドDNAを、CCL-HRT1についてはCpDmaW、AfEasF、AjEasE、およびAjEasCを含有するプラスミドDNAと混合し、CCL-HRT5についてはAjEasD、AjEasG、AjEasH、およびAjEasAを含有するプラスミドDNAと混合した。プラスミドDNAの混合物をAsclで消化した。これはプラスミド骨格からすべての断片を切り離し、末端にHRTを有する断片を作り出すが、これらの断片は順を追って次の断片のHRTと部分的に重複する。酵母菌株EYS1456を、消化された混合物のそれぞれで形質転換し、プラスミドCCL-HRT1およびCCL-HRT5はin vivoで、Shao 2009により記載のように、相同組換えによって構築された。2つのプラスミドは酵母形質転換体から単離され、プラスミドDNAの容易な増幅および精製を可能にする大腸菌（*E. coli*）に戻して形質転換した。2つのプラスミドCCL-HRT1およびCCL-HRT5を、リストに挙げた酵母菌株（表58）に、同時形質転換した。

増殖条件：

2つのベクターCCL-HRT1およびCCL-HRT5を含有する改変酵母菌株は、2%グルコースを含有し、ロイシンおよびウラシルを除いた、標準的なSCプロス（ForMedium, Hunstanton, U.K.）3 mL中で増殖させた。培養物は20 ℃にて96b時間、一定の振盪を加えながら増殖させた。

分析手順：

サンプル調製：酵母培養物は、1000 × gで10分間遠沈した。ペレットと上清を分離した。それ以上精製することなく、上清5 μlをmicroTOF-Q II（Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany）と連動させたUPLC-TOF（Waters Acquity（商標名）Ultra Performance LC, Waters, Milford, Mass., USA）に注入した。固定相：カラムは、Acquity UPLC（登録商標）Bridged Ethyl Hybrid（BEH）C18 1.7 μm 2.1×100mmとした。液体クロマトグラフィー法：移動相A：H₂O + 0.1% ギ酸。移動相B：アセトニトリル + 0.1% ギ酸。溶出条件：

【0443】

10

20

30

40

【表 60】

時間(分)	流量(mL/分)	% 移動相 A	% 移動相 B
T = 0	0.400	99.0	1.0
12.00	0.400	50.0	50.0
15.00	0.400	0.0	100.0
17.00	0.400	0.0	100.0
17.10	0.400	99.0	1.0
19.00	0.400	99.0	1.0

10

PDAパラメーター：レンジ：210 nm～500 nm。解像度：1.2 nm。サンプリングレート：5ポイント/秒。ELSDパラメーター：ゲイン：50、ガス圧：40 psi、ネプライザーモード：加熱、パワーレベル：80%、ドリフトチューブ：80 。TOFパラメーター：イオン源：エンドプレートオフセット：-500 V。キャピラリー：-4500 V。ネプライザー：1.6 bar。ドライガス流量：8.0 L/分。ドライガス温度：180 。スキャンモード：MSスキャン。質量範囲：80～1000 m/z。

結果：

全菌株の培養上清をLC-MSで分析し、シクロクラビンの予想質量 (m/z=239.1543 +/- 0.01Da) およびフェスツクラビンの予想質量 (m/z=241.1699 +/- 0.01 Da) のイオンクロマトグラムを抽出した。ピーク下の面積を積分して求め、CCLおよびFCLの生産を内部標準に基づいて算出した。CCLおよびFCLの量を比較すると(図27)、すべての菌株において2つの化合物がともに生産されるが量にはらつきがあることが判明した。こうした結果は、CCLおよびFCL生産が *S. cerevisiae* の特定の菌株にも遺伝子型にも依存しないことを示している。

References:

Bandyopadhyay A, Saxena K, Kasturia N, Dalal V, Bhatt N, Rajkumar A, Maity S, Se ngupta S, Chakraborty K. Chemical chaperones assist intracellular folding to buffer mutational variations.

Nat Chem Biol. 2012 Jan 15;8(3):238-45.

20

30

Burkewitz K, Choe KP, Lee EC, Deonarine A, Strange K. Characterization of the proteostasis roles of glycerol accumulation, protein degradation and protein synthesis during osmotic stress in *C. elegans*. PLoS One. 2012;7(3):e34153. Epub. 2012 Mar 28.

Cheng JZ, Coyle CM, Panaccione DG, O'Connor SE. Controlling a structural branch point in ergot alkaloid biosynthesis. J Am Chem Soc. 2010 Sep 22;132(37):12835-7

40

Current Protocols in Molecular Biology, Eds Ausubel F.M. et al. Wiley & Sons, U.K.

Flagfeldt DB, Siewers V, Huang L, Nielsen J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2009 Oct;26(10):545-51.

Fleetwood DJ, Scott B, Lane GA, Tanaka A, Johnson RD. A complex ergovaline gene cluster in epichloë endophytes of grasses. Appl Environ Microbiol. 2007 Apr;73(8):2571-9.

50

Goetz KE, Coyle CM, Cheng JZ, O'Connor SE, Panaccione DG. Ergot cluster-encoded catalase is required for synthesis of chanoclavine-I in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet*. 2011 Jun;57(3):201-11.

Lorenz N, Olsovská J, Sulc M, Tudsínský P. Alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine I. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Mar;76(6):1822-30.

10

Matuschek M, Wallwey C, Xie X, Li SM. New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. *Org Biomol Chem*. 2011 Jun 7;9(11):4328-35.

Peroutka RJ, Elshourbagy N, Piech T, Butt TR. Enhanced protein expression in mammalian cells using engineered SUMO fusions: secreted phospholipase A2. *Protein Sci*. 2008 Sep;17(9):1586-95.

20

Rigbers O, Li SM. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. Overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyl-tryptophan N-methyltransferase. *J Biol Chem*. 2008 Oct 3;283(40):26859-68.

Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987 Jun;7(6):2087-96.

Shao Z, Zhao H, Zhao H. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(2):e16

30

Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1989 May;122(1):19-27.

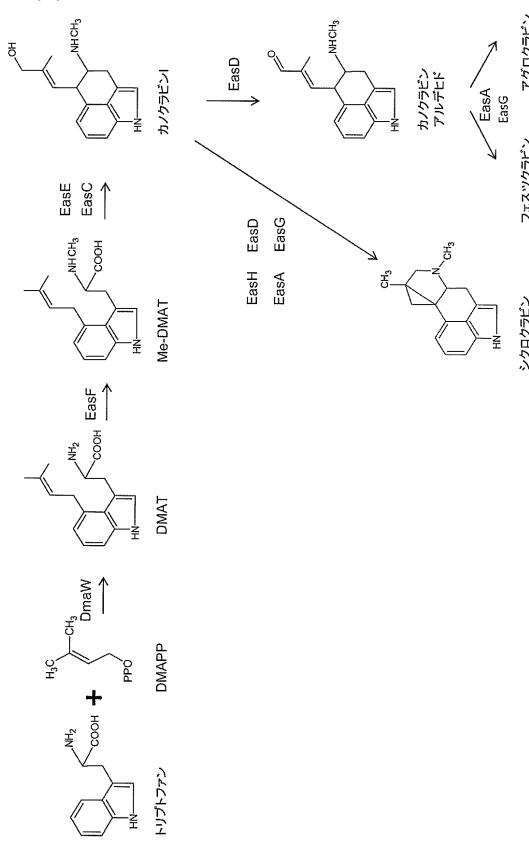
Unsoeld IA, Li SM. Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethyl-allyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*. 2005 May;151(Pt 5):1499-505.

Wallwey C, Matuschek M, Li SM. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Arch Microbiol*. 2010 Feb;192(2):127-34.

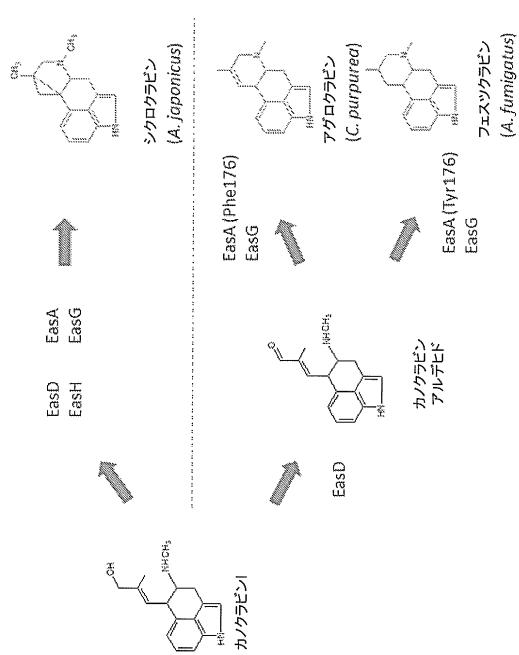
40

Wallwey C, Li SM. Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat Prod Rep*. 2011 Mar;28(3):496-510.

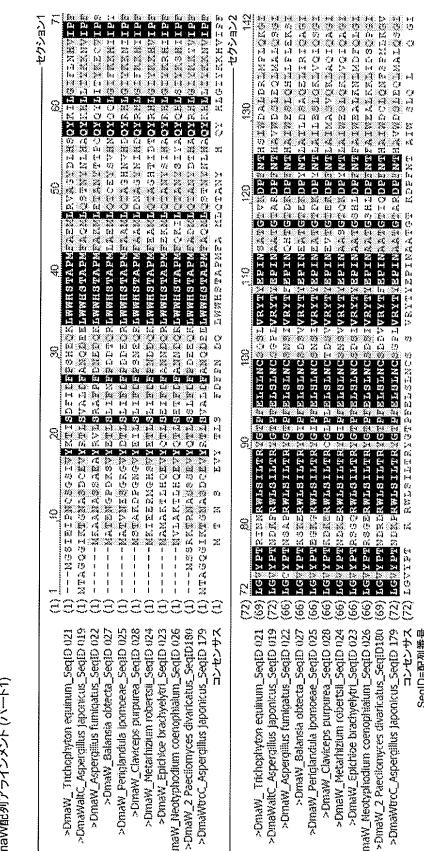
〔 図 1 〕



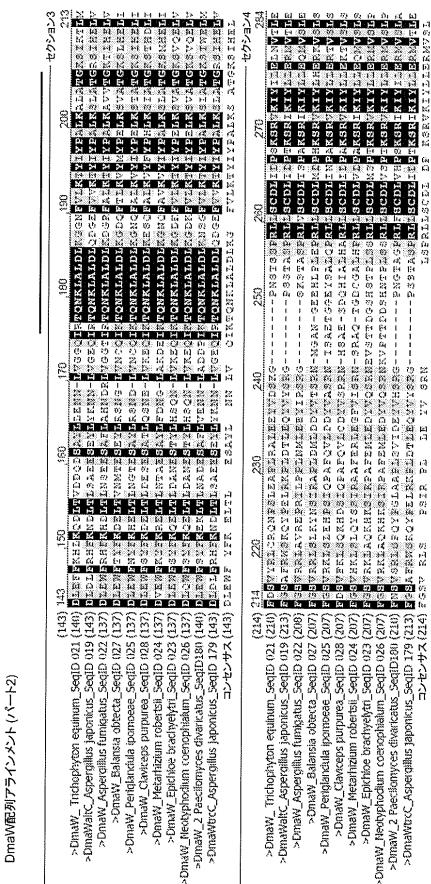
〔 図 2 〕



【 図 3 a 】



【 図 3 b 】



【 図 3 c 】

DMA配列アライメント(バイト3)

【図4b】

〔 図 3 c 〕

【図3d】

【図4c】

EasF配列アライメント(パート3)

Easley配列アランメント(パート3)

【 図 5 b 】

EasF配列アライメント(19-ト3)

- >EafF: *Altithroderma* data
- >EafG: *Thiophyton* equinum
- >EafH: *Pseudolycoperdon* daturicavum
- >EafI: *Aspergillus* fumigatus A253
- >EafJ: *Aspergillus* fumigatus A253
- >EafK: *Aspergillus* fumigatus A253
- >EafL: *Aspergillus* fumigatus A253
- >EafM: *Enickeomyces* heveicola
- >EafN: *Neotyphodium* tellum
- >EafO: *Claviceps paspali*
- >EafP: *Penicillium* rostratum
- >EafQ: *Claviceps purpurea*
- >EafR: *Claviceps* (isofom)
- >EafS: *Penicillium* luteum

EasE配列アライメント(パート1)

セシヨン1		セシヨン2	
10	1	1	1
20	1	1	1
30	1	1	1
40	1	1	1
50	1	1	1
60	1	1	1
70	1	1	1
80	1	1	1
90	1	1	1
100	1	1	1
110	1	1	1
120	1	1	1
130	1	1	1
140	1	1	1
150	1	1	1
160	1	1	1
170	1	1	1
180	1	1	1
190	1	1	1
200	1	1	1
210	1	1	1
220	1	1	1
230	1	1	1
240	1	1	1
250	1	1	1
260	1	1	1
270	1	1	1
280	1	1	1
290	1	1	1
300	1	1	1
310	1	1	1
320	1	1	1
330	1	1	1
340	1	1	1
350	1	1	1
360	1	1	1
370	1	1	1
380	1	1	1
390	1	1	1
400	1	1	1
410	1	1	1
420	1	1	1
430	1	1	1
440	1	1	1
450	1	1	1
460	1	1	1
470	1	1	1
480	1	1	1
490	1	1	1
500	1	1	1
510	1	1	1
520	1	1	1
530	1	1	1
540	1	1	1
550	1	1	1
560	1	1	1
570	1	1	1
580	1	1	1
590	1	1	1
600	1	1	1
610	1	1	1
620	1	1	1
630	1	1	1
640	1	1	1
650	1	1	1
660	1	1	1
670	1	1	1
680	1	1	1
690	1	1	1
700	1	1	1
710	1	1	1
720	1	1	1
730	1	1	1
740	1	1	1
750	1	1	1
760	1	1	1
770	1	1	1
780	1	1	1
790	1	1	1
800	1	1	1
810	1	1	1
820	1	1	1
830	1	1	1
840	1	1	1
850	1	1	1
860	1	1	1
870	1	1	1
880	1	1	1
890	1	1	1
900	1	1	1
910	1	1	1
920	1	1	1
930	1	1	1
940	1	1	1
950	1	1	1
960	1	1	1
970	1	1	1
980	1	1	1
990	1	1	1
1000	1	1	1
1010	1	1	1
1020	1	1	1
1030	1	1	1
1040	1	1	1
1050	1	1	1
1060	1	1	1
1070	1	1	1
1080	1	1	1
1090	1	1	1
1100	1	1	1
1110	1	1	1
1120	1	1	1
1130	1	1	1
1140	1	1	1
1150	1	1	1
1160	1	1	1
1170	1	1	1
1180	1	1	1
1190	1	1	1
1200	1	1	1
1210	1	1	1
1220	1	1	1
1230	1	1	1
1240	1	1	1
1250	1	1	1
1260	1	1	1
1270	1	1	1
1280	1	1	1
1290	1	1	1
1300	1	1	1
1310	1	1	1
1320	1	1	1
1330	1	1	1
1340	1	1	1
1350	1	1	1
1360	1	1	1
1370	1	1	1
1380	1	1	1
1390	1	1	1
1400	1	1	1
1410	1	1	1
1420	1	1	1
1430	1	1	1
1440	1	1	1
1450	1	1	1
1460	1	1	1
1470	1	1	1
1480	1	1	1
1490	1	1	1
1500	1	1	1
1510	1	1	1
1520	1	1	1
1530	1	1	1
1540	1	1	1
1550	1	1	1
1560	1	1	1
1570	1	1	1
1580	1	1	1
1590	1	1	1
1600	1	1	1
1610	1	1	1
1620	1	1	1
1630	1	1	1
1640	1	1	1
1650	1	1	1
1660	1	1	1
1670	1	1	1
1680	1	1	1
1690	1	1	1
1700	1	1	1
1710	1	1	1
1720	1	1	1
1730	1	1	1
1740	1	1	1
1750	1	1	1
1760	1	1	1
1770	1	1	1
1780	1	1	1
1790	1	1	1
1800	1	1	1
1810	1	1	1
1820	1	1	1
1830	1	1	1
1840	1	1	1
1850	1	1	1
1860	1	1	1
1870	1	1	1
1880	1	1	1
1890	1	1	1
1900	1	1	1
1910	1	1	1
1920	1	1	1
1930	1	1	1
1940	1	1	1
1950	1	1	1
1960	1	1	1
1970	1	1	1
1980	1	1	1
1990	1	1	1
2000	1	1	1
2010	1	1	1
2020	1	1	1
2030	1	1	1
2040	1	1	1
2050	1	1	1
2060	1	1	1
2070	1	1	1
2080	1	1	1
2090	1	1	1
2100	1	1	1
2110	1	1	1
2120	1	1	1
2130	1	1	1
2140	1	1	1
2150	1	1	1
2160	1	1	1
2170	1	1	1
2180	1	1	1
2190	1	1	1
2200	1	1	1
2210	1	1	1
2220	1	1	1
2230	1	1	1
2240	1	1	1
2250	1	1	1
2260	1	1	1
2270	1	1	1
2280	1	1	1
2290	1	1	1
2300	1	1	1
2310	1	1	1
2320	1	1	1
2330	1	1	1
2340	1	1	1
2350	1	1	1
2360	1	1	1
2370	1	1	1
2380	1	1	1
2390	1	1	1
2400	1	1	1
2410	1	1	1
2420	1	1	1
2430	1	1	1
2440	1	1	1
2450	1	1	1
2460	1	1	1
2470	1	1	1
2480	1	1	1
2490	1	1	1
2500	1	1	1
2510	1	1	1
2520	1	1	1
2530	1	1	1
2540	1	1	1
2550	1	1	1
2560	1	1	1
2570	1	1	1
2580	1	1	1
2590	1	1	1
2600	1	1	1
2610	1	1	1
2620	1	1	1
2630	1	1	1
2640	1	1	1
2650	1	1	1
2660	1	1	1
2670	1	1	1
2680	1	1	1
2690	1	1	1
2700	1	1	1
2710	1	1	1
2720	1	1	1
2730	1	1	1
2740	1	1	1
2750	1	1	1
2760	1	1	1
2770	1	1	1
2780	1	1	1
2790	1	1	1
2800	1	1	1
2810	1	1	1
2820	1	1	1
2830	1	1	1
2840	1	1	1
2850	1	1	1
2860	1	1	1
2870	1	1	1
2880	1	1	1
2890	1	1	1
2900	1	1	1
2910	1	1	1
2920	1	1	1
2930	1	1	1
2940	1	1	1
2950	1	1	1
2960	1	1	1
2970	1	1	1
2980	1	1	1
2990	1	1	1
3000	1	1	1
3010	1	1	1
3020	1	1	1
3030	1	1	1
3040	1	1	1
3050	1	1	1
3060	1	1	1
3070	1	1	1
3080	1	1	1
3090	1	1	1
3100	1	1	1
3110	1	1	1
3120	1	1	1
3130	1	1	1
3140	1	1	1
3150	1	1	1
3160	1	1	1
3170	1	1	1
3180	1	1	1
3190	1	1	1
3200	1	1	1
3210	1	1	1
3220	1	1	1
3230	1	1	1
3240	1	1	1
3250	1	1	1
3260	1	1	1
3270	1	1	1
3280	1	1	1
3290	1	1	1
3300	1	1	1
3310	1	1	1
3320	1	1	1
3330	1	1	1
3340	1	1	1
3350	1	1	1
3360	1	1	1
3370	1	1	1
3380	1	1	1
3390	1	1	1
3400	1	1	1
3410	1	1	1
3420	1	1	1
3430	1	1	1
3440	1	1	1
3450	1	1	1
3460	1	1	1
3470	1	1	1
3480	1	1	1
3490	1	1	1
3500	1	1	1
3510	1	1	1
3520	1	1	1
3530	1	1	1
3540	1	1	1
3550	1	1	1
3560	1	1	1
3570	1	1	1
3580	1	1	1
3590	1	1	1
3600	1	1	1
3610	1	1	1
3620	1	1	1
3630	1	1	1
3640	1	1	1
3650	1	1	1
3660	1	1	1
3670	1	1	1
3680	1	1	1
3690	1	1	1
3700	1	1	1
3710	1	1	1
3720	1	1	1
3730	1	1	1
3740	1	1	1
3750	1	1	1
3760	1	1	1
3770	1	1	1
3780	1	1	1
3790	1	1	1
3800	1	1	1
3810	1	1	1
3820	1	1	1
3830	1	1	1
3840	1	1	1
3850	1	1	1
3860	1	1	1
3870	1	1	1
3880	1	1	1
3890	1	1	1
3900	1	1	1
3910	1	1	1
3920	1	1	1
3930	1	1	1

【図4c】

【図5a】

〔 図 5 d 〕

EasE配列アランメント(パート4)

EasC配列アライメント(パート1)

〔 図 5 e 〕

EasE配列アライメント(パート5)

【図 6c】

EasC配列アライアンメント(パート3)

EasD配列アライメント(パート1)

【図 6 d】

EasC配列アランメント(バート4)

234

〔 四 8 〕

Eash配列アライメント

【図 9 b】

EsaA配列アランメント(パート2)

【 図 9 a 】

EasA配列アラインメント(パート1)

【 図 9 c 】

EasA配列アライメント(パート3)

(図 9 d)

セクション7

EasA配列アライメント(18-14)

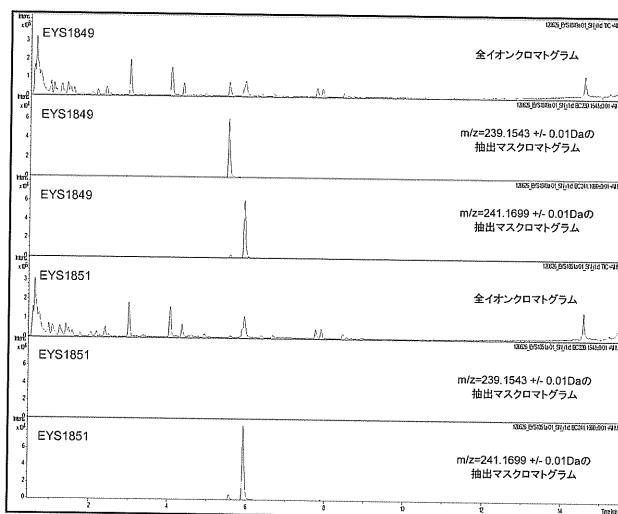
EasG配列アライメント(パート2)

classG配列アライメント(バート3)

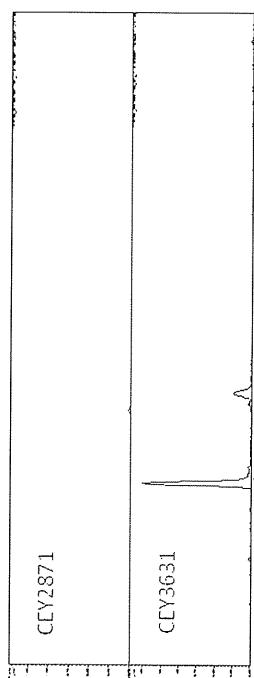
EasG配列アライメント(パート1)

(図 1 0 a)

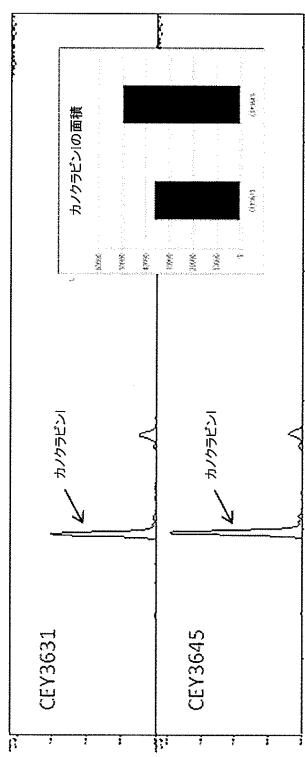
【図 1 1】



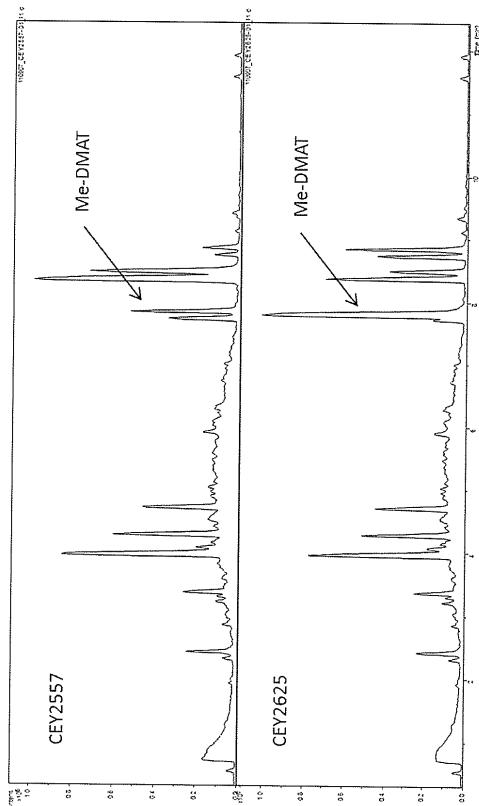
【図 1 2】



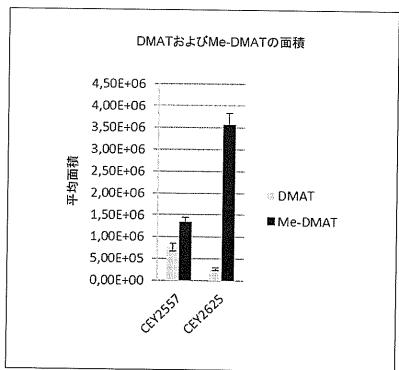
【図 1 3】



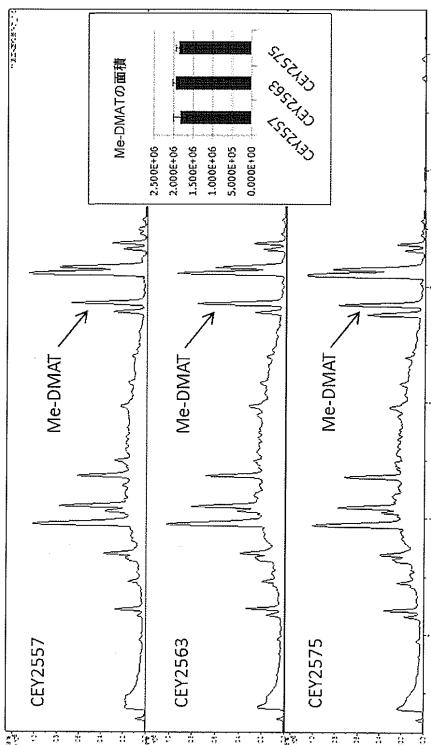
【図 1 4】



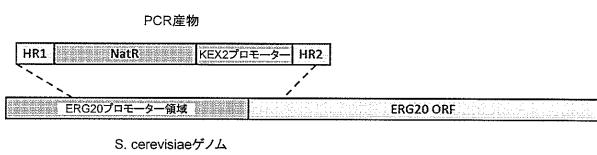
【図15】



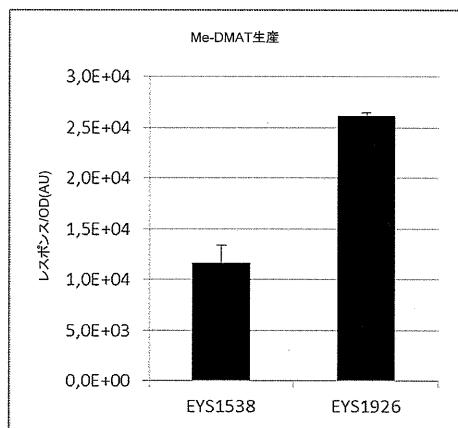
【図16】



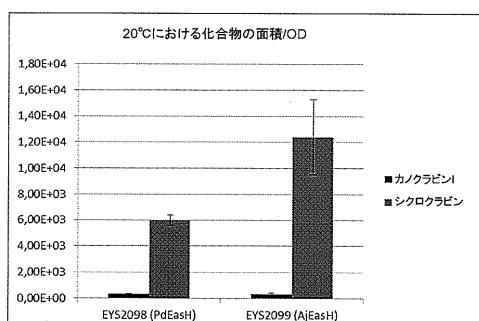
【図17】



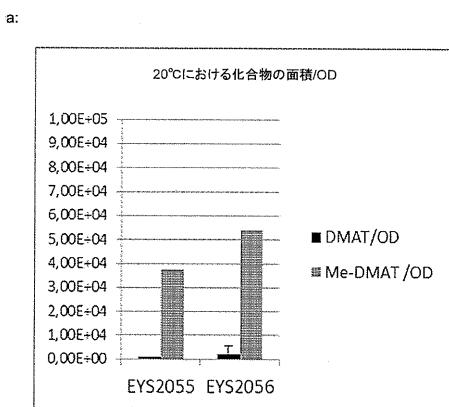
【図18】



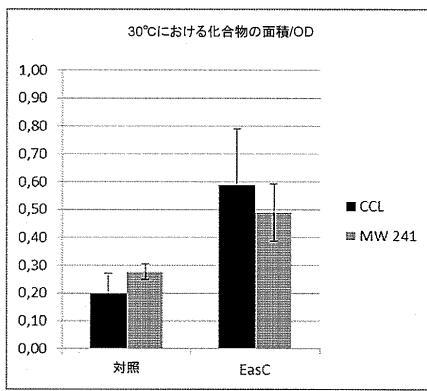
【図19】



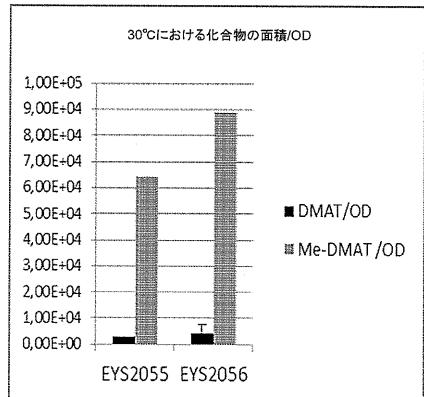
【図 2 0】



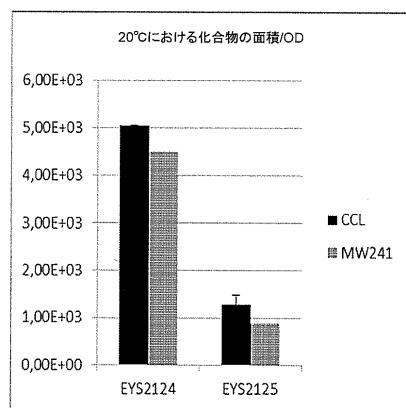
【図 2 1】



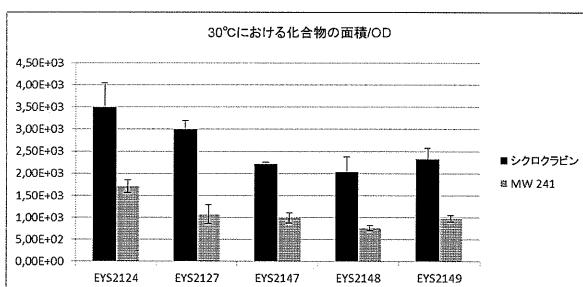
b:



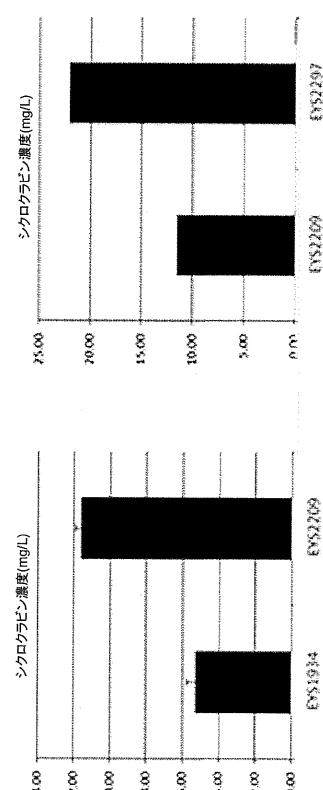
【図 2 2】



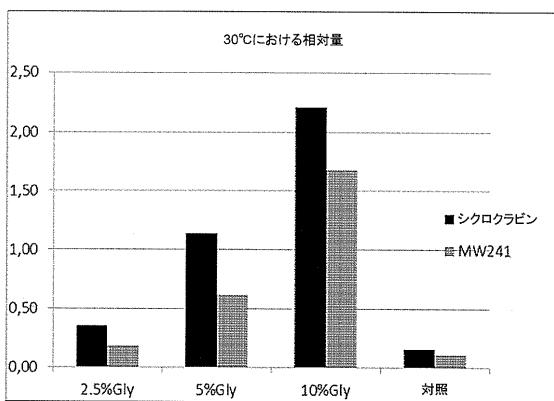
【図 2 3】



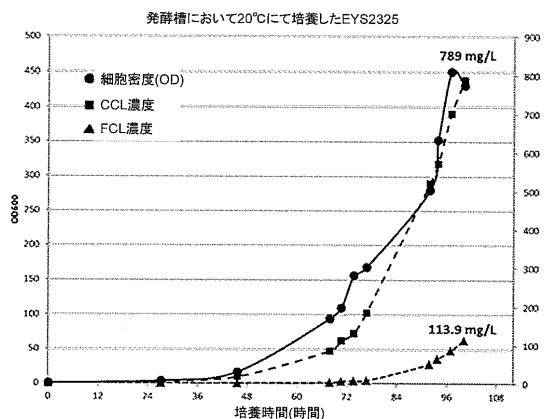
【図 2 5】



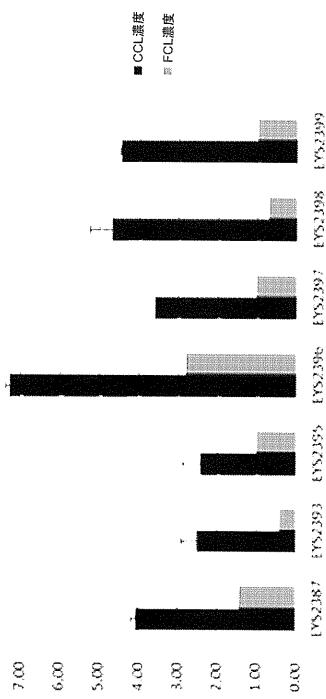
【図 2 4】



【図26】



【図27】



【配列表】

2015530879000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2013/056604
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <p style="text-align: center;">See the extra sheet</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>IPC: C12N, C12P, A61K, C07K</p>		
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) DATABASES: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ SEARCH TERMS: EasH, EAS, microorganism, organism, ergot alkaloid synthesis, ergot alkaloid, polynucleotide, sequence search on the sequence of SEQ ID NO: 8		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Simona Florea, TOWARDS ELIMINATION AND GENETIC MANIPULATION OF ERGOT ALKALOID PRODUCTION IN FUNGAL ENDOPHYTES, University of Kentucky Doctoral Dissertations. Paper 803, http://uknowledge.uky.edu/gradschool_diss/803 , 31 December 2009 (31.12.2009), see chapters 4-5, figures 4.1-4.3, table 4.1	43 (partially)
X	Nicole Lorenz et al., Comparison of Ergot Alkaloid Biosynthesis Gene Clusters in Claviceps Species Indicates Loss of Late Pathway Steps in Evolution of C. fusiformis, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 73, no. 22, pages 7185-7191, 30 November 2007 (30.11.2007), see RESULTS AND DISCUSSION	43 (partially)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 27 December 2013 (27.12.2013)		Date of mailing of the international search report 06 Feb. 2014 (06.02.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer YU, Na Telephone No. (86-10)62089160

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2013/056604
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. JN182233.1, Florea,S. et al., <i>Claviceps fusiformis</i> strain SD58 putative oxygenase (easH) gene, complete cds; and EF-hand 1 calcium binding protein pseudogene, complete sequence, 07 December 2011 (07.12.2011), see the whole document	7, 26 (all partially)
A	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. AEV21243.1, Florea,S. et al., putative oxygenase [<i>Claviceps fusiformis</i>], 07 December 2011 (07.12.2011), see the whole document	7, 26 (all partially)
A	DATABASE Genbank [Online], Database accession no. FJ594412.1, Machado,C. et al., <i>Neotyphodium coenophialum</i> putative oxygenase (easI) gene, complete cds, 04 February 2009 (04.02.2009), see the whole document	7, 26 (all partially)
A	Damien J. Fleetwood et al., A Complex Ergovaline Gene Cluster in <i>Epichloe</i> Endophytes of Grasses, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 73, no. 8, pages 2571-2579, 30 April 2007 (30.04.2007), see the whole document	1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)
A	CN 101238208 A(BOHAC J et al.), 06 August 2008 (06.08.2008) , see the whole document	1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2013/056604
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>See the extra sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of 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 checked="" 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.: 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially) related to SEQ ID NO: 8; <p>Remark on protest</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. 		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21 (2006.01) i
 C12N 1/15 (2006.01) i
 C12N 1/16 (2006.01) i
 C12N 15/80 (2006.01) i
 C12N 15/81 (2006.01) i
 C12N 15/31 (2006.01) i
 C12N 15/52 (2006.01) i
 C12P 1/00 (2006.01) i
 C12P 17/10 (2006.01) i
 C07K 14/195 (2006.01) i
 C07K 14/37 (2006.01) i
 A61K 31/48 (2006.01) i
 C07K 16/00 (2006.01) i

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

This Authority Searching Authority found 16277669599 groups of inventions in this international application, as follows:

Group 1: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 8; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 2: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 95; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 3: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and 95; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide; a method for the production of at least one of

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 4: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 5: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 6: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 95 and having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 7: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and 95 and having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 8: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 109; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 9: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 157; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 10: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 109 and 157; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 11: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO:136; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 12: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO:144; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 13: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:109; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 14: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:136; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 15: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:144; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 16: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:157; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 17: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:109; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 18: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:136; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 19: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:144; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Group 20: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:157; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I produced by such method; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 21-7200: claims 1-7, 13, 17-22, 25-43 (all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH activity, wherein the EasH activity is due to a polypeptide according to at least two of the following a) to g): a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 60% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and/or 95 and having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and/or 95, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 109 and/or 157, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 109, 136 or 144 and/or 157, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:109,136,144 and/or 157, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:109,136,144 and/or 157; a recombinant polynucleotide coding such polypeptide; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 7201-7405: claims 1-7, 12, 13, 17-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH and EasD activity, wherein the EasH activity is due to: a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 60% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and/or 95 and having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 156, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 8 and/or 95, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 109 and/or 157, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 109, 136 or 144 and/or 157, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:109,136,144 and/or 157, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:109,136,144 and/or 157; h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism;

wherein the EasD activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 152, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 4 and/or 53, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:4,53,54,55,56,57,58,59,60,62 and/or 63, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 105, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 132 and/or 140, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:105, 132 and/or 140, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:105,132 and/or 140, h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism; ;

a recombinant polynucleotide coding for above EasH and EasD polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 7406-7622: claims 1-7, 13, 14, 17-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH and EasA reductase activity,

wherein the EasH activity is due to the EasH activity of groups 7201-7405; wherein the EasA reductase activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 148,149 and 150 and having tyrosine at amino acid position 18 of SEQ ID NO:149, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 193,194 and 195 and having tyrosine at amino acid position 18 of SEQ ID NO:149, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 2 and/or 31, or d) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2,31,32,33,34,35,36,37,38,39 and/or 40, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 103, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 130 and/or 138, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:103,130 and/or 138, or h) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:103,130 and/or 138, h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism;

a recombinant polynucleotide coding for above EasH and EasA reductase polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 7623-11295: claims 1-7, 13-15, 17-22, 25-43(all partially)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH, EasD and EasA activity,

wherein the EasH and EasD activity is due to the EasH and EasD activity of groups 7201-7405; wherein the EasA activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 148,149 and 150 and having tyrosine at amino acid position 18 of SEQ ID NO:149, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 193,194 and 195 and having tyrosine at amino acid position 18 of SEQ ID NO:149, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 2 and/or 31, or d) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2,31,32,33,34,35,36,37,38,39 and/or 40, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 103, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 130 and/or 138, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:103,130 and/or 138, or h) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:103,130 and/or 138, h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism;

a recombinant polynucleotide coding for above EasH, EasD and EasA polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 11296-77391: claims 1-7, 12-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasH and EasD, EasA reductase and EasG activity,

wherein the EasH and EasD activity is due to the EasH and EasD activity of groups 7201-7405; the EasA reductase activity is due to the EasA reductase activity of groups 7406-7622; the EasG activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 155 and/or 183, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 39% sequence identity to SEQ ID NO: 7 and/or 86, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 7,86,87,88,89,90,181,92,93 and/or 94, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 108, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 135 and/or 143, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:108,135 and/or 143, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO: 108,135 and/or 143, or h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism;

a recombinant polynucleotide coding for above EasH and EasD, EasA reductase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

Groups 77392-13951026208: claims 1-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasH, EasA and EasG activity,

wherein the EasH and EasD activity is due to the EasH and EasD activity groups 7201-7405; the EasA activity is due to the EasA activity of groups 7623-11295; the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391; the DmaW activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 145 and 146, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 147 and/or 190, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 1,19,20,179, and/or 180, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1,19,20,21,22,23,24,25,26,27, and/or 28, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 102,122,123, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 129 and/or 137, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:102,122,123,129 and/or 137, or h) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO: 102,122,123,129 and/or 137, or i) a polypeptide according to at least two of a) to g), or j) a polypeptide according to at least one of a) to i) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism; the EasF activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 154, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 6,75 and/or 76, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:6,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84 and/or 85, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 107 and/or 120 or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 134 and/or 142, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:107,120,134 and/or 142, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO: 107,120,134 and/or 142, h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism; the EasE activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:153,185 and/or 191, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 5 and/or 64, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:5,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73 and/or 74, or having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:5,64,175,66,67,68,69,176,71,177,73 and/or 178 or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 106, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 133 and/or 141, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:106,133 or 141, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO: 106,133 or 141, h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism; the EasC activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 151 and/or 192, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 3 and/or 41, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:3,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51 and/or 52, or d) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 104, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 131 and/or 139, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:108,131 and/or 139, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO: 104,131 and/or 139, or h) a polypeptide according to at least two of a) to g); i) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism;

a recombinant polynucleotide coding for above DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasH, EasA and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 13951026209-13951031716: claims 1-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one EasD, EasA and EasG activity, wherein the EasD activity is due to the EasD activity groups 7201-7405; the EasA activity is due to as the EasA activity of groups 7623-11295; the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above EasD, EasA and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 13951031717-15113610785: claims 1-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasA reductase and EasG activity, wherein the DmaW, EasF, EasE, EasC activity is due to the DmaW, EasF, EasE, EasC activity of groups 77392-13951026208; the EasD activity is due to the EasD activity of groups 7201-7405; the EasA reductase activity is due to the EasA reductase activity of groups 7406-7622; the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasA reductase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 15113610786-16276189854: claims 1-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasA isomerase and EasG activity,

wherein the DmaW, EasF, EasE, EasC activity is due to the DmaW, EasF, EasE, EasC activity of groups 77392-13951026208; the EasD activity is due to the EasD activity of groups 7201-7405; the EasA isomerase activity is due to a) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 148,149 and 150 and having tyrosine at amino acid position 18 of SEQ ID NO:149, or b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 193,194 and 195 and having tyrosine at amino acid position 18 of SEQ ID NO:149, or c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 40% sequence identity to SEQ ID NO: 2 and/or 31, or d) a polypeptide comprising

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2,31,32,33,34,35,36,37,38,39 and/or 40, or e) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 103, or f) a polypeptide encoded by a polynucleotide having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 130 and/or 138, or g) a polypeptide encoded by a polynucleotide obtainable with two PCR-Primers, each comprising at least 15 consecutive nucleotides of a polynucleotide sequence selected from the group of sequences described by SEQ ID NO:103,130 and/or 138, or h) a polypeptide encoded by a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to SEQ ID NO:103,130 and/or 138, or i) a polypeptide according to at least two of a) to g), or j) a polypeptide according to at least one of a) to h) which is obtainable from a natural ergot alkaloid producer organism; the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasA isomerase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16276189855-16276400926: claims 1-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one DmaW, EasF, EasE and EasC activity, wherein the DmaW, EasF, EasE, EasC activity is due to the DmaW, EasF, EasE, EasC activity of groups 77392-13951026208;

a recombinant polynucleotide coding for above DmaW, EasF, EasE and EasC polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16276400927-16276400945: claims 6-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one recombinant polynucleotide coding for at least one EasA reductase, wherein the EasA reductase activity is due to the EasA reductase activity of groups 7406-7622;

a recombinant polynucleotide coding for above EasA reductase polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16276400946-16276400964: claims 6-22,25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one recombinant polynucleotide coding for at least one EasA isomerase activity, wherein the EasA isomerase activity is due to the EasA isomerase activity of groups 15113610786-16276189854;

a recombinant polynucleotide coding for above EasA isomerase polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16276400965-16276400973: claims 6-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one recombinant polynucleotide coding for at least one EasD, EasA reductase and EasG activity, wherein the EasD activity is due to the EasD activity of groups 7201-7405; the EasA reductase activity is due to the EasA reductase activity of groups 7406-7622; the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above EasD, EasA reductase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16276400974-16276413751: claims 6-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one recombinant polynucleotide coding for at least one EasD, EasA isomerase and EasG activity, wherein the EasD activity is due to the EasD activity of groups 7201-7405; the EasA isomerase activity is due to the EasA isomerase activity of groups 15113610786-16276189854; the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above EasD, EasA reductase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16276413752-16277603480: claims 6-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one recombinant polynucleotide coding for at least one EasH, EasD, EasA reductase, EasA isomerase and EasG activity, wherein the EasH, EasD activity are due to the EasH, EasD activity of groups 7201-7405, the EasA reductase activity is due to the EasA reductase activity of groups 7406-7622, the EasA isomerase activity is due to the EasA isomerase activity of groups 15113610786-16276189854, the EasG activity is due to the EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above EasH, EasD, EasA reductase, EasA isomerase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide ; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16277603481-16277669577: claims 6-22, 25-43(all partially)

related to a recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism comprising at least one recombinant polynucleotide coding for at least one EasH, EasD, EasA isomerase and EasG activity, wherein the EasH, EasD activity are due to the EasH, EasD activity of groups 7201-7405, the EasA isomerase activity is due to the EasA isomerase activity of groups 15113610786-16276189854, the EasG activity is due to the

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

EasG activity of groups 11296-77391;

a recombinant polynucleotide coding for above EasH, EasD, EasA isomerase and EasG polypeptides; a vector comprising such recombinant polynucleotide; a method for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I by using the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism; uses of the above recombinant microorganism or recombinant natural ergot alkaloid producer organism, or the above recombinant polynucleotide or vector for the production of at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde or Chanoclavine I;

Groups 16277669578-16277669582: Claim23

related to a recombinant microorganism comprising at least one compound selected from the group of compounds consisting of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde, and Chanoclavine I, wherein the recombinant microorganism is not a natural ergot alkaloid producer organism

Groups 16277669583-16277669587: Claim24

related to a recombinant natural ergot alkaloid producer organisms comprising and/or producing at least one of the compounds selected from the group of: Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde, and Chanoclavine I at or to a higher amount as compared to the non-recombinant wild-type organism when grown under the same conditions

Group 16277669588: Claim 44

related to a culture medium produced in a method as claimed in any one of claims 27 to 40, comprising at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde, or Chanoclavine I, but no or a low content of other ergot alkaloids

Group 16277669589: Claim 45

related to a culture medium comprising at least one of Cycloclavine, Festuclavine, Agroclavine, Chanoclavine aldehyde, or Chanoclavine I, but no or a low content of other ergot alkaloids

Groups 16277669590-16277669594: claim 46; 48-57(partially)

related to a polynucleotide comprising one or more nucleic acid sequences selected from the group consisting of: a) a nucleic acid sequence having a nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO :129, 130, 131, 132, 133, 134, 135 or 136; b) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NOs:20,31,41,53,64,75,86,95 or 180; c) a nucleic acid sequence being at least 70% identical to the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO: 129,130,131,132,133,134,135 or 136, wherein said nucleic acid sequence encodes a polypeptide having DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasH, EasA reductase, EasA isomerase or EasG activity; d) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide having DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasH, EasA reductase, EasA isomerase or EasG activity and having an amino acid sequence which is at least 70% identical to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NOs: 20,31,41,53,64,75,86, or 180; e) a nucleic acid sequence which is capable of hybridizing under stringent conditions to any one of a) to d), wherein said nucleic acid sequence encodes a polypeptide having DmaW, EasF, EasE, EasC, EasD, EasH, EasA reductase, EasA isomerase or EasG activity;

a vector or expression cassette comprising such polynucleotide; a host cell comprising above polynucleotide or vector; Paecilomyces divaricatus overexpressing such polynucleotide; a method for the manufacture of the polypeptide encoded by above polynucleotide; a polypeptide encoded by the above polynucleotide; an antibody which specifically binds to the above polypeptide;

Groups 16277669595-16277669604: claim 47; 48-57(partially)

related to a polynucleotide comprising one or more nucleic acid sequences selected from the group consisting of:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2013/056604

a) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NOs: 175,176,177 or 178; b) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide having EasE activity and having an amino acid sequence which is at least 70% identical to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NOs: 175,176,177 or 178; c) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:181; d) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide having DmaW activity and having an amino acid sequence which is at least 70% identical to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 181;
a vector or expression cassette comprising such polynucleotide; a host cell comprising above polynucleotide or vector; *Paecilomyces dvaricatus* overexpressing such polynucleotide; a method for the manufacture of the polypeptide encoded by above polynucleotide; a polypeptide encoded by the above polynucleotide; an antibody which specifically binds to the above polypeptide;

The nucleotide sequences of the nucleic acids of the groups 1-16277669604 are different, and the structure units among them are also different. That is to say, groups 1-16277669604 do not have the same or corresponding special technical feature, and do not linked by a single general inventive concept. Therefore, they do not meet the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IB2013/056604

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101238208 A	06.08.2008	WO 2007051651 A1	10.05.2007
		US 2007117198 A1	24.05.2007
		EP 1831347 A1	12.09.2007
		INDELNP 200802700 E	25.07.2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 17/18 (2006.01)	C 1 2 P 17/18	B
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 N 9/90 (2006.01)	C 1 2 N 9/90	

- (31) 優先権主張番号 61/786,841
 (32) 優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 13178008.2
 (32) 優先日 平成25年7月25日(2013.7.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

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

- (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (74) 代理人 100169971
 弁理士 菊田 尚子
 (74) 代理人 100182992
 弁理士 江島 孝毅
 (72) 発明者 ゼルダー, オスカー
 ドイツ連邦共和国 6 7 3 4 6 シュパイヤー, セイント - クララ - クロスター - ヴェーク 6 2
 ベー
 (72) 発明者 ヘナー, シュテファン
 ドイツ連邦共和国 6 7 3 4 6 シュパイヤー, コルンガッセ 2 8
 (72) 発明者 シュレーダー, ハルトヴィッヒ
 ドイツ連邦共和国 6 9 2 2 6 ヌスロッホ, ベンツシュトラーセ 4
 (72) 発明者 ホフ, ビルジット
 ドイツ連邦共和国 6 4 3 1 9 ブフングシュタット, マルクトパッサーゲ 1 0
 (72) 発明者 モルト, アンドレア
 ドイツ連邦共和国 6 9 4 6 9 ヴァインハイム, ウィンターガッセ 4 6
 (72) 発明者 ディトリッヒ, クラウス
 ドイツ連邦共和国 6 7 1 6 1 ゲーンハイム, ヘルマン - ジンスハイマー - ヴェーク 1 1
 (72) 発明者 プロイアー, ミヒヤエル
 ドイツ連邦共和国 6 4 2 8 5 ダルムシュタット, ニーベルガルヴェーク 3 0

(72)発明者 ハルトマン , ホルガー
　　ドイツ連邦共和国 6 8 7 2 3 シュヴェツィンゲン , マンハイマー シュトラーセ 1 0 0

(72)発明者 ケルバー , カルステン
　　ドイツ連邦共和国 6 9 2 1 4 エッペルハイム , ヒンテレ リスゲヴァン 2 6

(72)発明者 ネスピー , ミヒヤエル
　　スイス国 ツェーハー - 4 0 5 1 バーゼル , シュタットハウスガッセ 1 8

(72)発明者 シュワブ , マルクス
　　ドイツ連邦共和国 7 9 5 4 1 レラハ , タウベナッカー 2 6

(72)発明者 ニールセン , クルト アイム フリス
　　スイス国 ツェーハー - 4 1 5 3 ライナハ , ブルーダーホルツシュトラーセ 6 0

(72)発明者 フォーリー , クリストフ
　　スイス国 ツェーハー - 4 0 5 7 バーゼル , クララマットヴェーク 1 0

(72)発明者 ハッシュ , アネル
　　フランス国 エフ - 6 7 8 2 0 ヴィッティスハイム , リュ デュ スタード , 1 4

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA07 CA06 DA12 EA04 FA01 GA11 HA01 HA06
　　4B050 CC04 DD03 EE03 KK03 LL05
　　4B064 AE57 AG01 CA19 CC24 CE08 DA16
　　4B065 AA60Y AA80X AB01 AC14 BA02 BC03 BD16 CA18 CA60
　　4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50 FA71