

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7369741号
(P7369741)

(45)発行日 令和5年10月26日(2023.10.26)

(24)登録日 令和5年10月18日(2023.10.18)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 7/54 (2006.01)

C 0 7 K 7/54

Z N A

C 1 2 P 21/04 (2006.01)

C 1 2 P 21/04

A 0 1 P 3/00 (2006.01)

A 0 1 P 3/00

A 0 1 N 63/25 (2020.01)

A 0 1 N 63/25

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

E

請求項の数 29 外国語出願 (全84頁)

(21)出願番号 特願2021-117799(P2021-117799)

(22)出願日 令和3年7月16日(2021.7.16)

(62)分割の表示 特願2017-549787(P2017-549787)
の分割

原出願日 平成28年3月23日(2016.3.23)

(65)公開番号 特開2021-169507(P2021-169507
A)

(43)公開日 令和3年10月28日(2021.10.28)

審査請求日 令和3年7月16日(2021.7.16)

(31)優先権主張番号 62/232,205

(32)優先日 平成27年9月24日(2015.9.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/138,765

(32)優先日 平成27年3月26日(2015.3.26)

最終頁に続く

(73)特許権者 507124988

バイエル クロップサイエンス エルピー
BAYER CROPSCIENCE LP
アメリカ合衆国63167ミズーリ州セ
ントルイス、ノース・リンドバーグ・ブ
ールバード800番

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

最終頁に続く

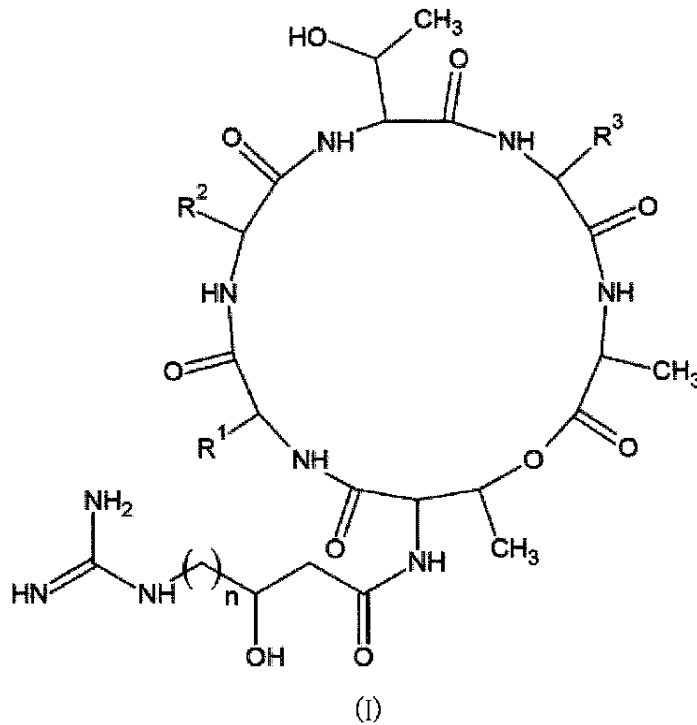
(54)【発明の名称】 新規なパエニバチルス(PAENIBACILLUS)株、抗真菌化合物、およびそれらの使用のための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

構造(I):

【化 1】



(I)

(式中、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立して $-CH(CH_3)_2$ または $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ であり、

R^3 は $-CH_2C(O)NH_2$ または $-(CH_2)_2C(O)NH_2$ であり、

n は 1 4 または 1 6 の整数である)

を有する化合物であって、その塩、水和物、溶媒和物、多形体、光学異性体、幾何異性体、鏡像異性体、ジアステレオマー、非環式類似体、およびこれらの混合物を包含する化合物を含む組成物。

【請求項 2】

請求項 1 の化合物。

【請求項 3】

10

20

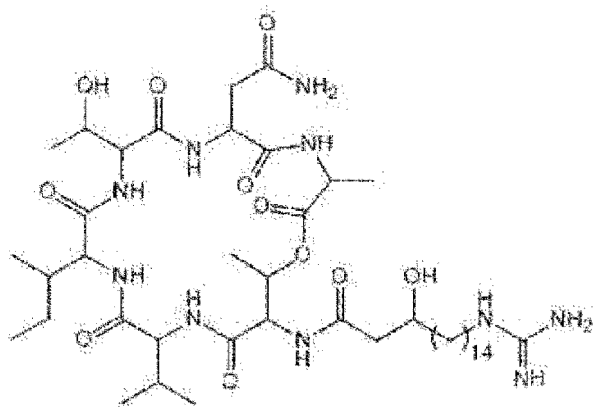
30

40

50

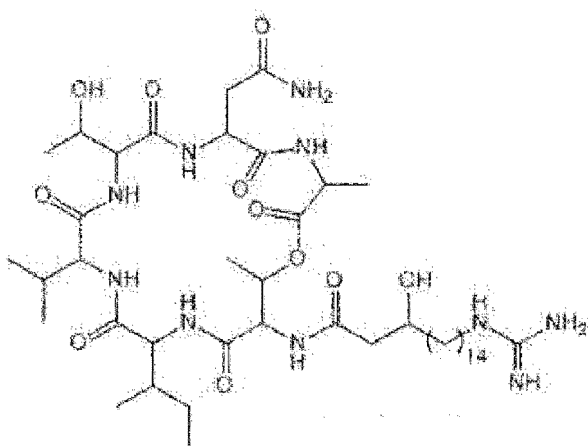
【化 2】

(Ia)



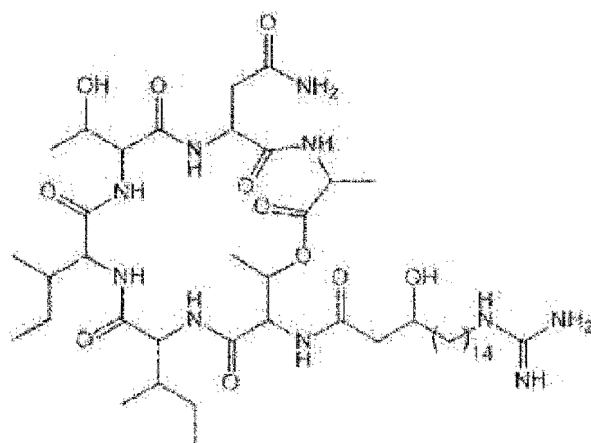
10

(Ib)



20

(Ic)

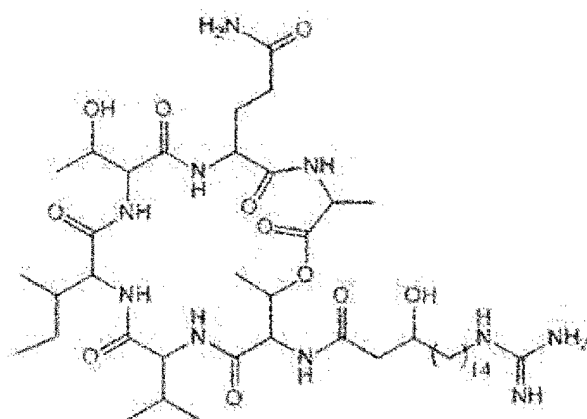


30

40

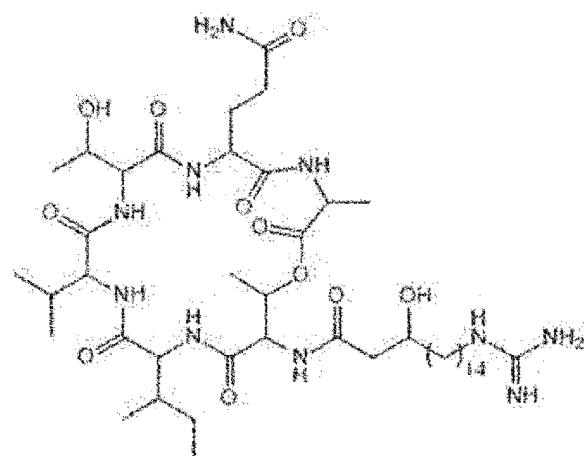
50

(Id)



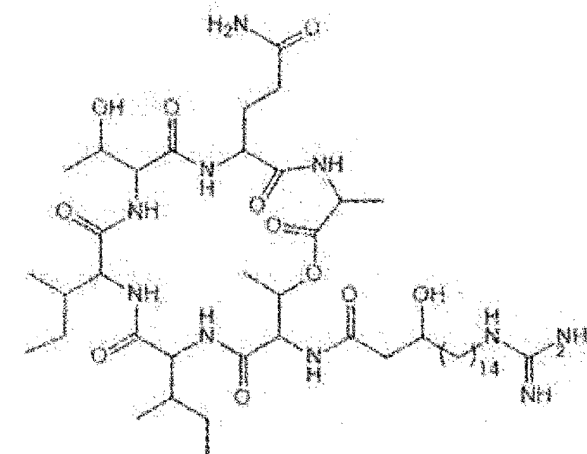
10

(Ie)



20

(If)

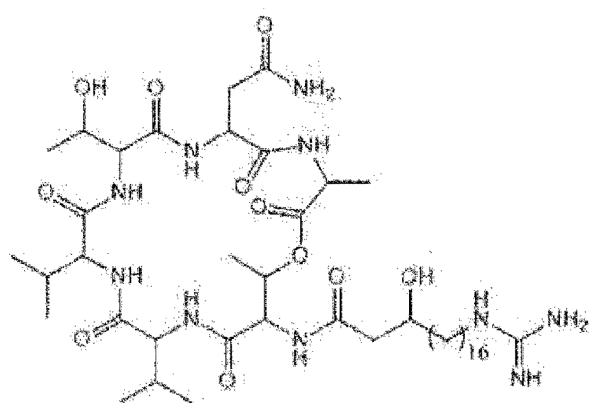


30

40

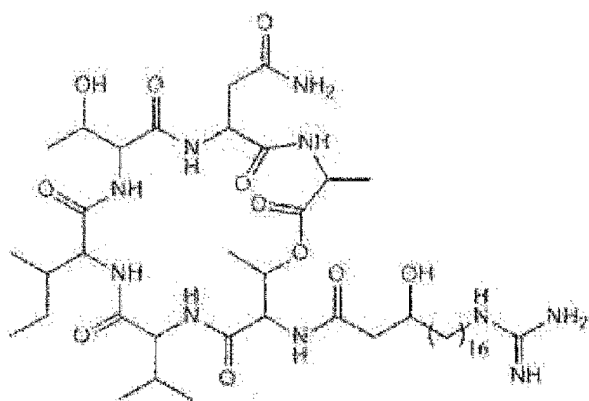
50

(Ig)



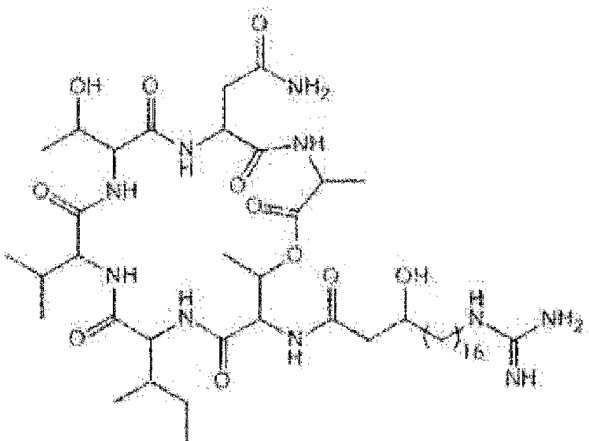
10

(Ih)



20

(Ii)

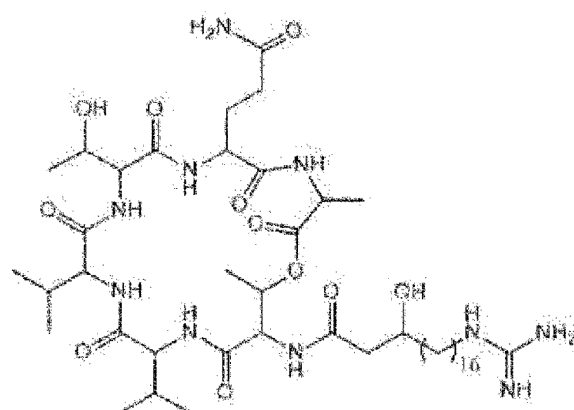


30

40

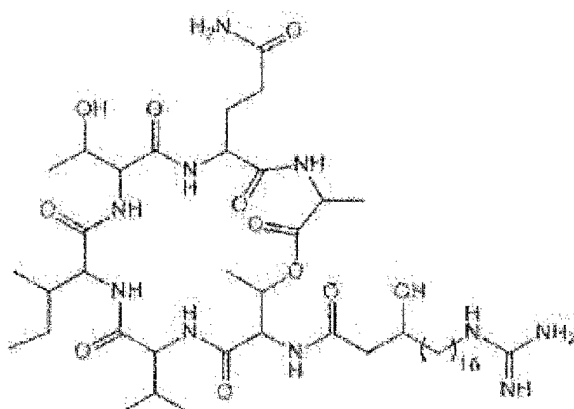
50

(Ij)



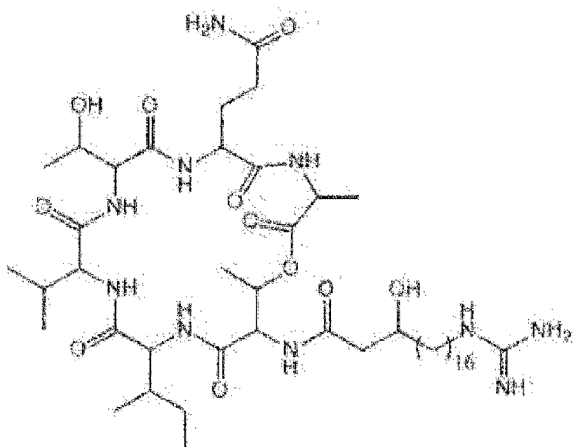
10

(Ik)



20

(Il)

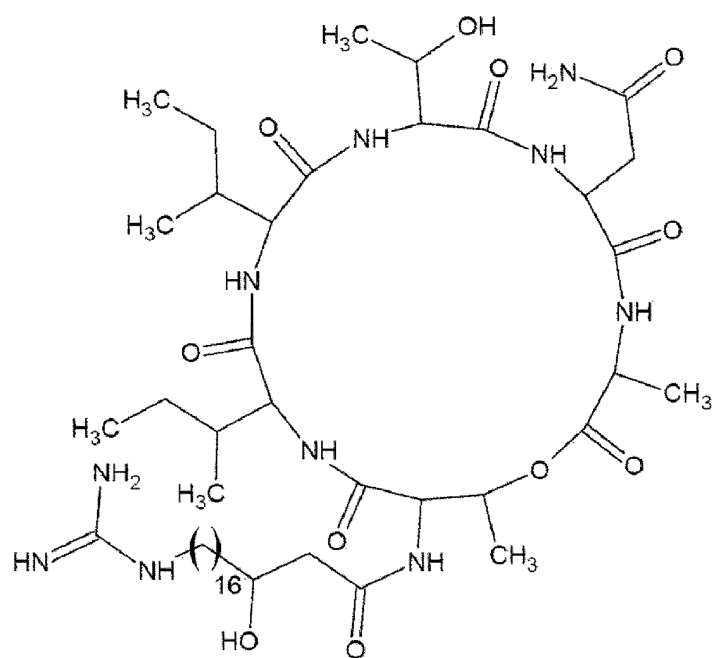


30

40

50

(Im)

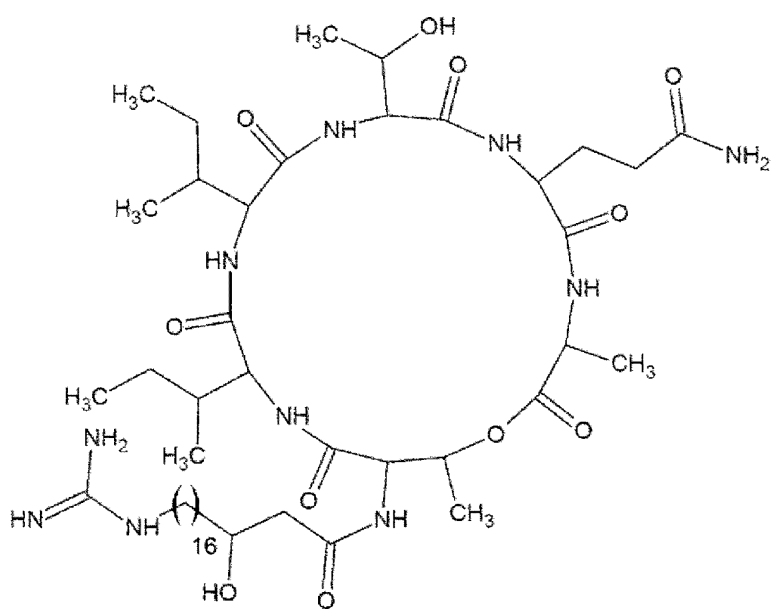


10

20

または

(In)



30

40

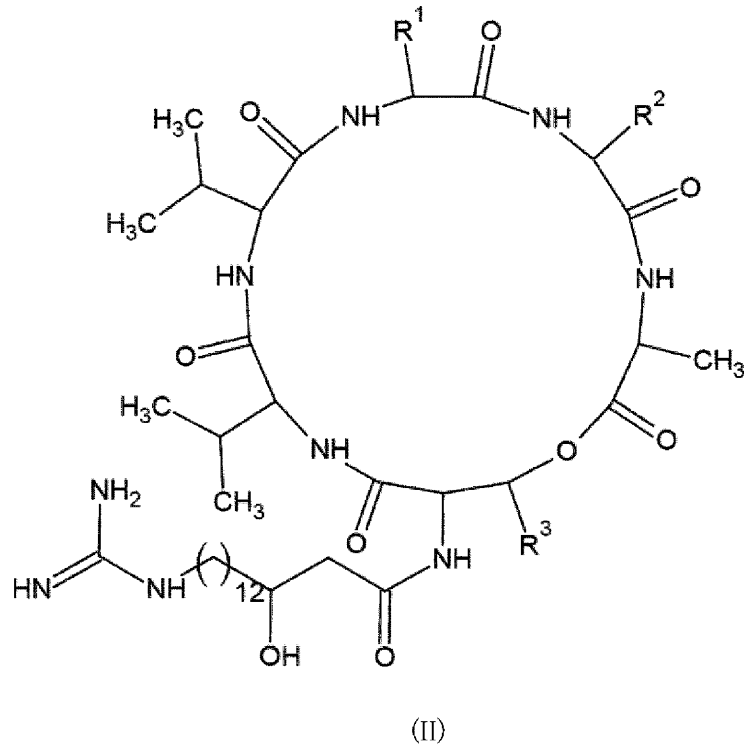
である、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

構造 (II)

50

【化 3】



(式中、

R¹は、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ または $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ であり、

R²は、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ または $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ であり、ならびに

R³は、Hまたは CH_3 であり、

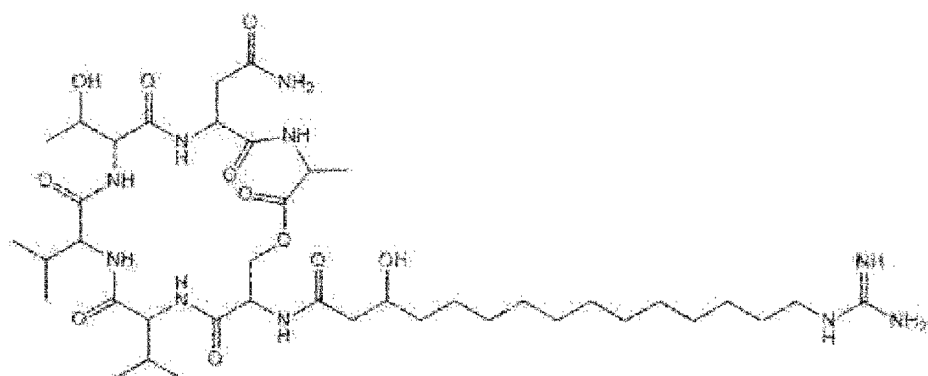
ただし、R¹が $-\text{CH}_2\text{OH}$ であり、R²が $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ である場合、R³はHである)

を有する化合物であって、その塩、水和物、溶媒和物、多形体、光学異性体、幾何異性体、鏡像異性体、ジアステレオマー、非環式類似体、およびこれらの混合物を包含する化合物をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

構造(II)を有する化合物が、

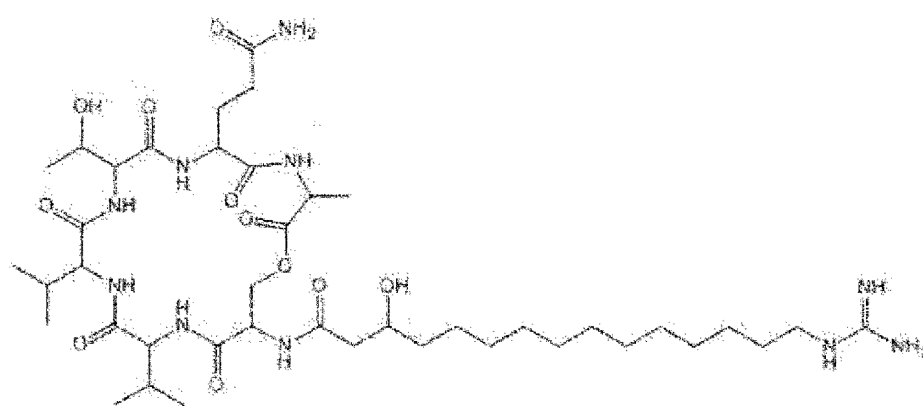
(IIa)



;

10

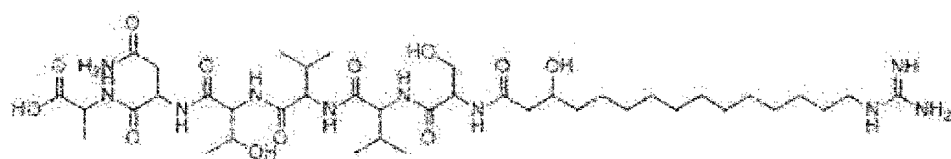
(IIb)



;

20

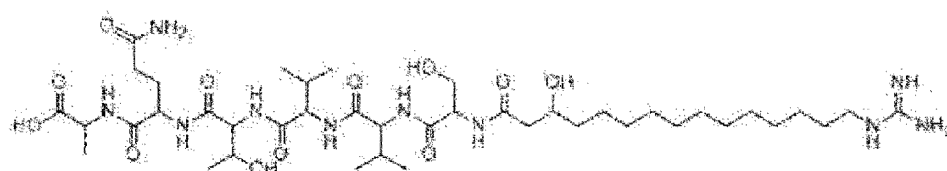
(IIc)



;

30

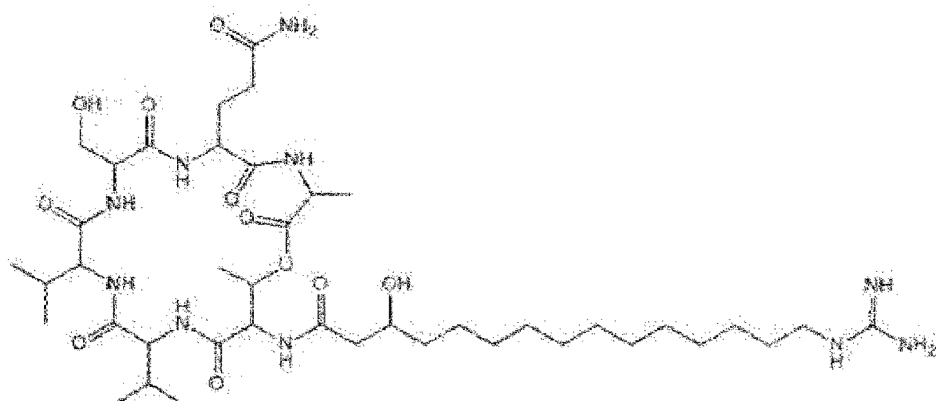
(IIId)



;

40

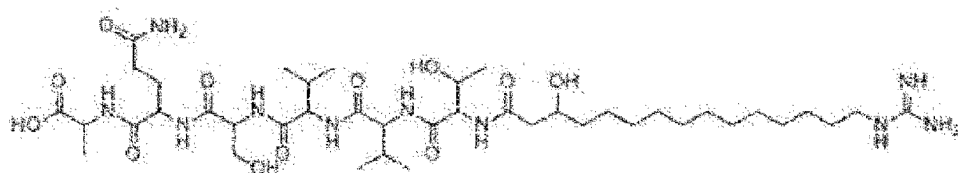
50



(IIf)

10

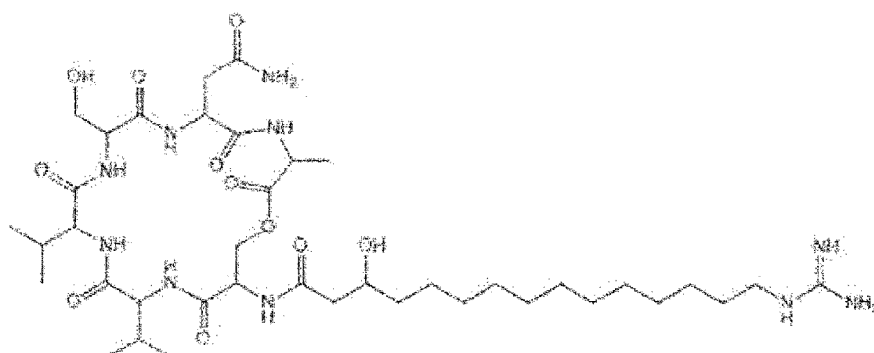
;



(IIh)

20

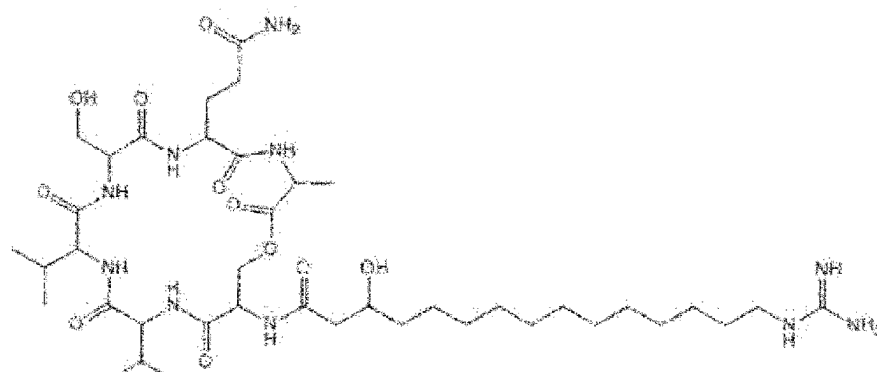
;



(IIIi)

30

;



(IIj)

40

;

のいずれかである、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

農業上許容される担体を含む、請求項 1、4 及び 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

化合物が少なくとも 0.001 mg/mL の濃度で溶液中に存在する、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

少なくとも 1 種のフサリシジンをさらに含む請求項 1 又は請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 9】

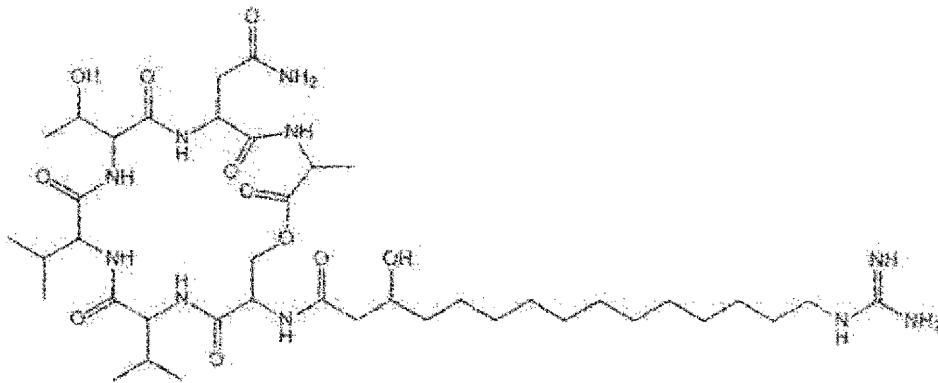
50

前記フサリシジンがフサリシジン A である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

構造 (II) を有する請求項 4 の化合物が

(IIa)



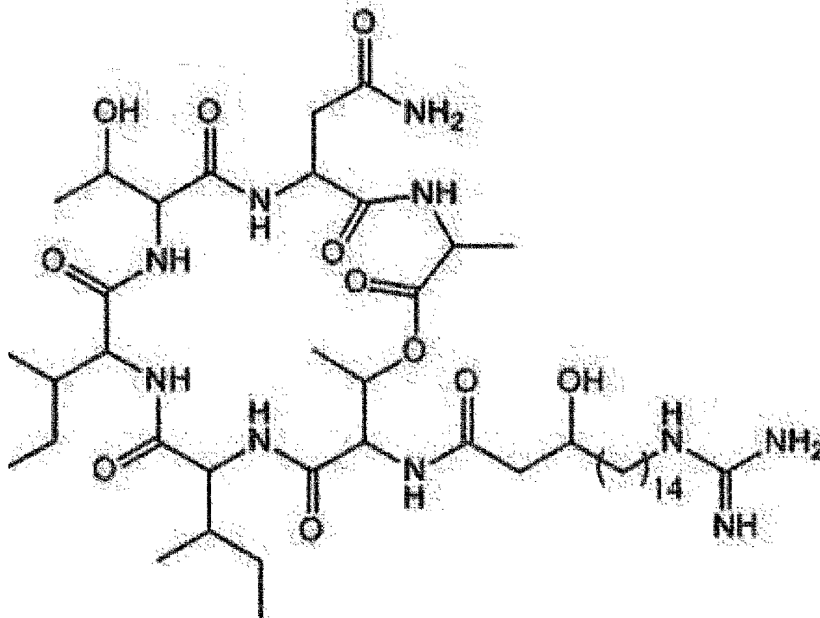
10

である、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

構造 (I) を有する請求項 1 の化合物が、

(Ic)



20

30

である、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

植物を処理して植物病害を防除する方法であって、請求項 1 及び 4～11 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を、前記植物、前記植物の一部および／または前記植物の場所に施用することを含む、方法。

【請求項 13】

前記組成物が、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株、パエニバチルス種 NRRL B-67129 株、またはこれらの殺真菌性突然変異株の発酵産物である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記組成物を葉の植物部分に施用することを含む、請求項 12 または 13 に記載の方法。

40

50

【請求項 15】

前記組成物が、約 1×10^{10} ～ 約 1×10^{12} コロニー形成単位 (CFU) / ヘクタールのパエニバチルス種 NRRL B-50972 株、パエニバチルス種 NRRL B-67129 株、またはこれらの殺真菌性突然変異株で施用される、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記組成物が、約 0.5 kg ～ 約 5 kg の発酵固形物 / ヘクタールで施用される、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記植物病害が真菌により引き起こされる、請求項 12 から 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記植物病害が、かび病またはさび病である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記かび病がうどんこ病またはべと病である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記さび病が、コムギ葉さび病、オオムギの葉さび病、ライムギの葉さび病、赤さび病、冠さび病および黒さび病からなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記真菌が、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、アルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*)、ボトリティス・シネリア (*Botrytis cinerea*)、コレトリカム・ラゲナリウム (*Colletotrichum lagenarium*)、フサリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、ファエオスフェリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*)、ジモセプトリア・トリシチ (*Zymoseptoria tritici*)、フィトフトラ・クリプトゲア (*Phytophthora cryptogea*)、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、ピシウム・ウルティムム (*Pythium ultimum*)、マグネポルテ・オリゼ (*Magnaporthe oryzae*)、タナテフォルス・ククメリス (*Thanatephorus cucumeris*)、ウスチラゴ・セゲツム変種 アベナエ (*Ustilago segetum* var. *avenae*)、ウロミセス・アペンジクラツス (*Uromyces appendiculatus*) およびプッキニア・トリシチナ (*Puccinia triticina*) からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記組成物または単離化合物が、前記植物、前記植物の一部および / 前記植物の場所への施用後、少なくとも 5 日、少なくとも 10 日、または少なくとも 15 日、前記真菌の防除をもたらす残留活性を有する、請求項 17 から 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記植物病害が細菌によって引き起こされる、請求項 12 から 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 24】

前記細菌が、キサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*)、シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) およびエルウィニア・カロトボーラ (*Erwinia carotovora*) からなる群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

有用植物において植物病原性生物を防除するための、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 26】

50

前記組成物が、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株、パエニバチルス種 NRRL B-67129 株、またはこれらの殺真菌性突然変異株の発酵産物を含む、請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

前記植物病原性生物が、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、アルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*)、ボトリティス・シネリア (*Botrytis cinerea*)、コレトリカム・ラゲナリウム (*Colletotrichum lagenarium*)、フサリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、ファエオスフェリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*)、ジモセプトリア・トリシチ (*Zymoseptoria tritici*)、フィトフトラ・クリプトゲア (*Phytophthora cryptogea*)、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、ピシウム・ウルティムム (*Pythium ultimum*)、マグネポルテ・オリゼ (*Magnaporthe oryzae*)、タナテフォルス・ククメリス (*Thanatephorus cucumeris*)、ウスチラゴ・セゲツム変種アベナエ (*Ustilago segetum var. avenae*)、ウロミセス・アベンジクラツス (*Uromyces appendiculatus*) および プッキニア・トリシチナ (*Puccinia triticina*) からなる群から選択される、請求項 25 または 26 に記載の使用。

【請求項 28】

前記植物病原性生物が、キサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*)、シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) およびエルウィニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) からなる群から選択される、請求項 25 または 26 に記載の使用。

【請求項 29】

前記有用植物が、リンゴ、バナナ、柑橘類、キウイ、メロン、桃、洋なし、パイナップル、仁果類、ザクロ、キャベツ、カリフラワー、キュウリ、ウリ科植物、トマト、ジャガイモ、コムギ、米および大豆からなる群から選択される、請求項 25 から 28 のいずれか 1 項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015 年 3 月 26 日に提出された米国仮特許出願第 62/138,765 号および 2015 年 9 月 24 日に提出された米国仮特許出願第 62/232,205 号に対する優先権を主張するものであり、当該特許出願の内容は両方とも、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提出された配列リストの参照

配列リストの公式コピーは、2016 年 3 月 21 日に作成された、68 キロバイトのサイズを有するファイル「BCS159002WO__ST25.txt」を ASCII フォーマットの配列リストとして EFS-Web を介して電子的に提出され、本明細書と同時に提出される。この ASCII フォーマットの文書に含まれる配列リストは、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、細菌株および植物病害を防除するそれらの能力に関する。特に、本発明は、比較的高レベルの広域スペクトル抗真菌活性を有するパエニバチルス種 (*Paenibacillus* sp.) 株を対象とする。

【背景技術】

【0004】

殺真菌剤は、作物保護；食品、飼料、および化粧品防腐剤として；ヒトおよび獣医学の両方のための治療剤としての使用を含む無数の用途を有する。先進国と発展途上国の両方において、作物収量の減少、ヒトおよび動物両方の食物媒介性疾患および真菌感染症が問題となっている。

【0005】

合成殺虫剤または殺真菌剤は、しばしば非特異的であり、したがって、他の天然に存在する有益な生物を含む、標的以外の生物に作用し得る。それらの化学的性質のために、合成殺虫剤または殺真菌剤は毒性で非生分解性でもあり得る。世界中の消費者は、特に食品中の残留化学物質に関連する潜在的な環境および健康問題をますます意識している。このため、化学的（すなわち、合成）農薬の使用または少なくとも量を減らすための消費者の圧力が高まっている。したがって、効果的な有害生物防除を可能にしながら、食物連鎖の要件を管理する必要がある。

10

【0006】

合成殺虫剤または殺真菌剤の使用に伴って生じるさらなる問題は、殺虫剤または殺真菌剤の繰り返しおよび排他的な施用がしばしば耐性病原性微生物の選択につながることである。通常、このような菌株は、同じ作用様式を有する他の活性成分に対しても交差耐性である。前記活性化化合物による病原体の効果的な防除は、この場合もはや不可能である。しかし、新しい作用機序を有する活性成分は開発が困難で高価である。

【0007】

病原体集団における耐性発生のリスクと環境およびヒトの健康上の懸念から、植物病害を管理するための合成殺虫剤および殺真菌剤の代替品の特定に関心が高まっている。生物学的防除剤の使用も1つの選択肢である。

20

【0008】

フサリシジンなどの非リボソームペプチドは、それらの抗菌特性に関して十分に認識されており、作物保護の分野で使用されている。それらの作用様式のために、非リボソームペプチドはまた、バイオ医薬品および他のバイオテクノロジー用途において潜在的用途を有する。フサリシジンは、パエニバチルス種から単離することができ、15-グアニジノ-3-ヒドロキシペンタデカン酸に加えて6個のアミノ酸残基を含む環構造を有する。パエニバチルス・ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) から単離されたフサリシジンは、LI-F03、LI-F04、LI-F05、LI-F07およびLI-F08を含み (Kurusu K, Ohba K, Arai T and Fukushima K., *J. Antibiotics*, 40:1506-1514, 1987)、さらなるフサリシジンA、B、CおよびDが報告されている (Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49:129-135, 1996; Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50:220-228, 1997)。

30

【0009】

特定のフサリシジンは、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) およびペニシリウム・トミイ (*Penicillium thomii*) などの植物病原性真菌に対して殺菌活性を有することが知られている。いくつかのフサリシジンはまた、スタフィロコッカス・オーレウス (*Staphylococcus aureus*) を含むグラム陽性細菌に対して殺菌活性を有する (Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49:129-135, 1996; Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50:220-228, 1997)。さらに、特定のフサリシジンは、キャノーラの黒色根腐れ病を引き起こすレプトスファエリア・マ克蘭ス (*Leptosphaeria maculans*) に対する抗真菌活性を有することが見出された (Beatty PH and Jensen SE., *Can. J. Microbiol.*, 48:159-169, 2002)。フサリシジン化

40

50

合物をさらに特徴付け、比較的低い施用量で広域スペクトルの抗真菌活性を提供するこれらのフサリシジンを産生するパエニバチルス種の菌株を同定する必要性が存在する。

【0010】

フサリシジンおよび他の抗真菌代謝産物は、パエニバチルス種の発酵によって得ることができる。しかし、多くのパエニバチルス種株は、ポリミキシンとして知られる抗生物質もまた産生する。ポリミキシンは、グラム陰性細菌に対して選択的に毒性であり、ヒト患者に投与された場合、神経毒性または腎毒性効果を有し得る。抗菌剤耐性の促進およびポリミキシンの相対毒性というグローバルな問題は、これらの抗生物質の慎重な使用と投与を要求する。この理由のために、農業で使用するために開発されたパエニバチルス種株は、比較的高レベルのフサリシジンを発現し、検出可能なポリミキシンは発現しないことが非常に望ましい。このような菌株は、研究者および消費者にリスクをほとんど、または全く与えないと思われる。さらに、広域スペクトルの活性を示すパエニバチルス種株を同定する必要がある。既存の殺真菌剤、特に真菌耐性の発生を受けにくい殺真菌剤の効力の改善が非常に望ましい。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【文献】Kurusu K, Ohba K, Arai T and Fukushima K., J. Antibiotics, 40:1506-1514, 1987

Kajimura Y and Kaneda M., J. Antibiotics, 49:129-135, 1996

20

Kajimura Y and Kaneda M., J. Antibiotics, 50:220-228, 1997

Beatty PH and Jensen SE., Can. J. Microbiol., 48:159-169, 2002

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、第3モジュール(FusA-A3)において機能的アデニル化ドメインを欠く変異型フサリシジンシンテターゼを含む殺真菌性パエニバチルス種株の生物学的に純粋な培養物を含む組成物に関し、機能的FusA-A3の欠損は、野生型フサリシジンシンテターゼを含むパエニバチルス種株によるフサリシジンの合成と比較して、アミノ酸残基(3)においてチロシンまたはフェニルアラニンを含むフサリシジンの合成を阻害する。特定の態様において、変異型フサリシジンシンテターゼは、FusA-A3において基質特異性を決定するアミノ酸残基の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10個の欠失を含む。他の態様において、このアミノ酸残基は、Asp235、Ala236、Ser239、Thr278、Leu299、Ala301、Ala/Gly322、Val330、Cys331、Lys517、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

30

40

【0013】

一実施形態において、このアミノ酸残基は、配列番号11の3203、3204、3207、3246、3267、3269、3290、3298、3299および／または3486位に位置する。別の実施形態において、変異型フサリシジンシンテターゼは、FusA-A3においてAsp235、Ala236、Ser239、Thr278、Leu299、Ala301、Ala/Gly322、Val330、およびCys331の欠失を含む。いくつかの実施形態において、変異型フサリシジンシンテターゼは、配列番号10を含む。

【0014】

本発明はまた、殺真菌性パエニバチルス種株の生物学的に純粋な培養物または少なくとも

50

も1種のパエニセリン (Paeniserine) および少なくとも1種のパエニプロリキシン (Paeniprolixin) を含むこれらの無細胞抽出物を含む組成物を提供する。

【0015】

特定の態様において、少なくとも1つのパエニセリン は、パエニセリン A1、パエニセリン A2、パエニセリン A3、パエニセリン A4、パエニセリン B1、パエニセリン B2、パエニセリン B3、パエニセリン B4、パエニセリン C1、パエニセリン C2およびパエニセリン C3からなる群から選択される。

【0016】

他の態様において、少なくとも1種のパエニプロリキシンは、パエニプロリキシン A1、パエニプロリキシン A2、パエニプロリキシン B1、パエニプロリキシン B2、パエニプロリキシン C1、パエニプロリキシン D1、パエニプロリキシン E1、パエニプロリキシン E2、パエニプロリキシン F1、パエニプロリキシン F2、パエニプロリキシン G1およびパエニプロリキシン G2からなる群から選択される。

【0017】

特定の実施形態において、組成物は、フサリシジンA、LiF08a、パエニセリン A1、パエニセリン B1、パエニプロリキシン A2およびパエニプロリキシン B2を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、組成物は、LiF03a、LiF03b、LiF03c、LiF03d、LiF07a、LiF07b、LiF07cおよび／またはLiF07dを含まない。他の実施形態において、組成物は、相乗的有效量で、パエニセリン A1、パエニセリン B1、パエニプロリキシン A2およびパエニプロリキシン B2を含む。

【0019】

ある態様において、本発明は、パエニバチルス種株が、パエニバチルス種NRRL B-50972株、パエニバチルス種NRRL B-67129株、またはこれらの殺真菌性突然変異株である組成物に関する。組成物は、パエニバチルス種NRRL B-50972株、パエニバチルス種NRRL B-67129株、またはこれらの殺真菌性突然変異株の発酵産物を含むことができる。

【0020】

いくつかの実施形態において、殺真菌性突然変異株は、パエニバチルス種NRRL B-50972に対して約90%を超える配列同一性を有するゲノム配列を有する。他の実施形態において、殺真菌性突然変異株は、パエニバチルス種NRRL B-50972と同等またはそれ以上の殺真菌活性ならびに／またはフサリシジン、パエニセリンおよび／もしくはパエニプロリキシンのレベルを有する。さらに他の実施形態において、発酵産物はポリミキシンを含まない。

【0021】

いくつかの態様において、発酵産物は液体製剤である。液体製剤は、懸濁濃縮液または油分散液であってもよい。一実施形態において、組成物は、少なくとも約 1×10^4 CFUの菌株/mL液体製剤を含む。別の実施形態において、組成物は約1%～約25%の発酵固形物を含む。

【0022】

他の態様において、本発明は、a) 少なくとも1種のフサリシジン；b) 少なくとも1種のパエニセリンまたは少なくとも1種のパエニプロリキシンを、相乗的有效量で含む。一実施形態において、パエニセリンは、パエニセリン A1、パエニセリン A2、パエニセリン A3、パエニセリン A4、パエニセリン B1、パエニセリン B2、パエニセリン B3、パエニセリン B4、パエニセリン C1、パエニセリン C2およびパエニセリン C3の少なくとも1つである。別の実施形態において、パエニプロリキシンは、パエニプロリキシン A1、パエニプロリキシン A2、パエニプロリキシン B

10

20

30

40

50

1、パエニプロリキシン B 2、パエニプロリキシン C 1、パエニプロリキシン D 1、パエニプロリキシン E 1、パエニプロリキシン E 2、パエニプロリキシン F 1、パエニプロリキシン F 2、パエニプロリキシン G 1およびパエニプロリキシン G 2の少なくとも1つである。

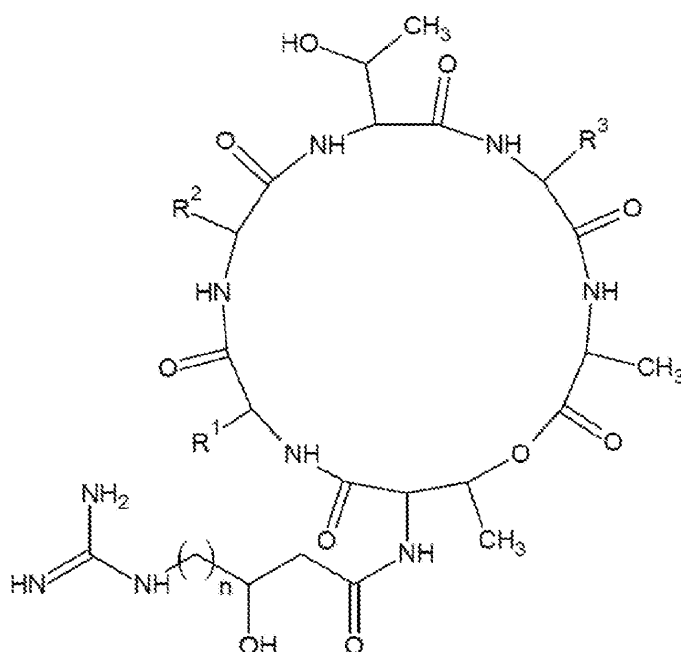
【0023】

特に、一実施形態において、少なくとも1種のフサリシジンと少なくとも1種のパエニセリンまたは少なくとも1種のパエニプロリキシンとの相乗比は、1：1000～1000：1の範囲、好ましくは1：500～500：1、より好ましくは1：250～250：1の範囲である。別の実施形態において、少なくとも1種のフサリシジンと少なくとも1種のパエニセリンまたは少なくとも1種のパエニプロリキシンとの相乗重量比は、1：100～100：1の範囲、好ましくは1：100～10：1の範囲またはさらに1：50～25：1の範囲である。一態様において、フサリシジンはフサリシジンAである。別の態様において、パエニセリンはパエニセリン A 1である。さらに別の態様において、パエニプロリキシンは、パエニプロリキシン C 1である。

【0024】

他の態様において、本発明は、構造 (I)：

【化1】



【0025】

(式中、

R¹およびR²はそれぞれ独立して-CH(CH₃)₂または-CH(CH₃)CH₂CH₃であり、

R³は-CH₂C(O)NH₂または-(CH₂)₂C(O)NH₂であり、
nは13～20の整数である)

を有する単離化合物、ならびにこれらの塩、水和物、溶媒和物、多形体、光学異性体、幾何異性体、鏡像異性体、ジアステレオマー、非環式類似体、および混合物に関する。

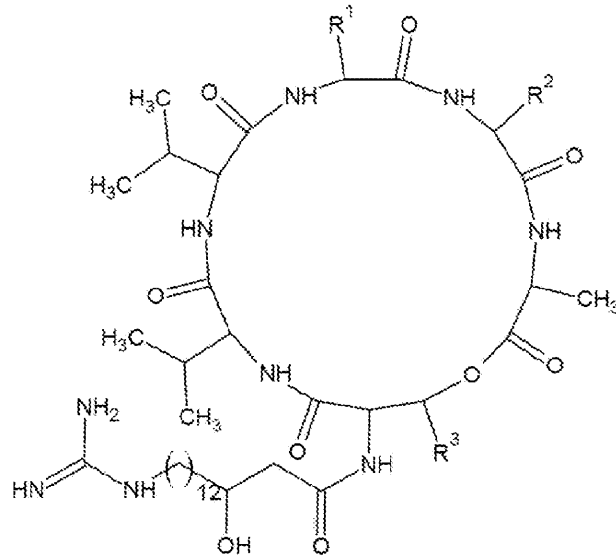
【0026】

いくつかの実施形態において、R³は-CH₂C(O)NH₂である。他の実施形態において、R³は-(CH₂)₂C(O)NH₂である。一態様において、R¹は-CH(CH₃)₂である。別の態様において、R¹は-CH(CH₃)CH₂CH₃である。一態様において、R²は-CH(CH₃)₂である。さらに別の態様において、R²は-CH(CH₃)CH₂CH₃である。

【0027】

さらに他の態様において、本発明は、構造（ⅠⅠ）：
【化２】

(Ⅱ)



【００２８】

（式中、

R^1 は、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ または $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ であり、

R^2 は、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ または $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ であり、ならびに

R^3 は、 H または CH_3 であり、

ただし、 R^1 が $-\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 R^2 が $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ である場合、 R^3 は H である）

を有する単離化合物ならびにこれらの塩、水和物、溶媒和物、多形体、光学異性体、幾何異性体、鏡像異性体、ジアステレオマー、非環式類似体、および混合物に関する。

【００２９】

いくつかの実施形態において、 R^3 は CH_3 である。他の実施形態において、 R^3 は H である。一態様において、 R^1 は $-\text{CH}_2\text{OH}$ である。別の態様において、 R^1 は $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ である。一態様において、 R^2 は $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ である。さらに別の態様において、 R^2 は $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ である。

【００３０】

一実施形態において、本発明は、本明細書に開示される単離化合物および農業上許容される担体を含む組成物に関する。

【００３１】

特定の実施形態において、本発明は、構造（Ⅰ）の化合物を、少なくとも 0.001 mg/mL 、少なくとも 0.01 mg/mL 、または少なくとも 0.1 mg/mL の濃度で含む溶液を対象とする。別の実施形態において、本発明は、構造（ⅠⅠ）の化合物を、少なくとも 0.001 mg/mL 、少なくとも 0.01 mg/mL 、または少なくとも 0.1 mg/mL の濃度で含む溶液を対象とする。特定の態様において、開示の溶液は、農業上許容される担体をさらに含む。

【００３２】

さらに別の実施形態において、本発明は、病害を防除するための植物の処理方法であって、有効量の本明細書に開示の組成物を、植物、植物の一部および／または植物の場所に施用することを含む方法に関する。特定の態様において、本組成物は、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株、パエニバチルス種 NRRL B-67129 株、またはこれらの殺真菌性突然変異株の発酵産物である。他の態様において、本方法は、組成物を葉

の植物部分に施用することを含む。さらに他の態様において、組成物は、約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{12} コロニー形成単位 (CFU) / ヘクタールのパエニバチルス種 NRRL B-50972 株、パエニバチルス種 NRRL B-67129 株、またはこれらの殺真菌性突然変異株で施用される。一実施形態において、組成物は、約 0.5 kg ~ 約 5 kg の発酵固形物 / ヘクタールで施用される。

【0033】

いくつかの態様において、植物病害は真菌によって引き起こされる。他の態様において、植物病害は、かびまたはさび病である。一実施形態において、かび病は、うどんこ病またはべと病である。別の実施形態において、さび病は、コムギ葉さび病、オオムギの葉さび病、ライムギの葉さび病、赤さび病、冠さび病および黒さび病からなる群から選択される。

10

【0034】

いくつかの実施形態において、真菌は、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、アルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*)、ボトリティス・シネリア (*Botrytis cinerea*)、コレトトリカム・ラゲナリウム (*Colletotrichum lagenarium*)、フサリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、ファエオスフェリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*)、ジモセプトリア・トリシチ (*Zymoseptoria tritici*)、フィトフトラ・クリプトゲア (*Phytophthora cryptogea*)、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、ピシウム・ウルティムム (*Pythium ultimum*)、マグネポルテ・オリゼ (*Magnaporthe oryzae*)、タナテフォルス・ククメリス (*Thanatephorus cucumeris*)、ウスチラゴ・セゲツム変種アベナエ (*Ustilago segetum var. avenae*)、ウロミセス・アペンジクラツス (*Uromyces appendiculatus*) およびプッキニア・トリシチナ (*Puccinia triticina*) からなる群から選択される。

20

【0035】

他の実施形態において、植物病害は細菌によって引き起こされる。一態様において、細菌は、キサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*)、シュドモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) およびエルウィニア・カロトボーラ (*Erwinia carotovora*) からなる群から選択される。

30

【0036】

本発明はまた、有用植物において植物病原性生物を防除するための開示組成物の使用に関する。特定の態様において、植物病原性生物は、アルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、アルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*)、ボトリティス・シネリア (*Botrytis cinerea*)、コレトトリカム・ラゲナリウム (*Colletotrichum lagenarium*)、フサリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、ファエオスフェリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*)、ジモセプトリア・トリシチ (*Zymoseptoria tritici*)、フィトフトラ・クリプトゲア (*Phytophthora cryptogea*)、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、ピシウム・ウルティムム (*Pythium ultimum*)、マグネポルテ・オリゼ (*Magnaporthe oryzae*)、タナテフォルス・ククメリス (*Thanatephorus cucumeris*)、ウスチラゴ・セゲツム変種アベナエ (*Ustilago segetum var. avenae*)、ウロミセス・アペンジクラツス (*Uromyces appendiculatus*) およびプッキニア・トリシチナ (*Puccinia triticina*) からなる群から選択される。他の態様において、植物病原性生物は、キサントモ

40

50

ナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*)、シュドモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) およびエルウィニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) からなる群から選択される。

【0037】

さらに他の態様において、有用植物は、リンゴ、バナナ、柑橘類、キウイ、メロン、桃、洋なし、パイナップル、仁果類、ザクロ、キャベツ、カリフラワー、キュウリ、ウリ科植物、トマト、ジャガイモ、コムギ、米および大豆からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】トマト疫病 (PHYTIN)、灰色かび病 (BOTRCI)、およびコムギ葉さび病 (PUCCRT) に対するパエニバチルス種株の全ブロスの植物体殺真菌活性を示す。

10

【図2】アルテルナリア・アルテルナータ (ALTEAL)、ボトリティス・シネリア (BOTRCI)、フサリウム・クルモルム (FUSACU)、ファエオスフェリア・ノドラム (LEPTNO)、ジモセプトリア・トリシチ (SEPPTR)、フィトフトラ・クリプトゲア (PHYTCR)、フィトフトラ・インフェスタンス (PHYTIN)、ピシウム・ウルティムム (PYTHUL) マグネボルテ・オリゼ (PYRIOR)、タナテフォルス・ククメリス (RHIZSO)、ウスチラゴ・セゲツム変種アベナエ (*Ustilago segetum* var. *avenae*) (USTIAV)、およびウロミセス・アペンジクラツス (UROMAP) に対するパエニバチルス種株の全ブロス由来フサリシジン抽出物のインビトロ抗真菌活性を示す。

20

【図3】非環式類似体、LiF04cを生成するためのLiF04a (フサリシジンAとしても知られている) の環構造の開裂を示す。フサリシジンおよびフサリシジン様化合物の各々の非環式類似体も同様の様式で生じる。

【図4A】位置 (1)、(4) および (6) において保存されたアミノ酸が同定され、アミノ酸の変化がAA (アミノ酸) として示されている公知のフサリシジンの構造を概説する図を示す。15-グアニジノー-3-ヒドロキシペンタデカン酸 (GHPD) 尾部は、位置 (1) のL-スレオニンのN末端とアミド結合を形成する。位置 (6) のD-アラニンのC末端は、「O」を指し示す矢印で示される位置 (1) のL-スレオニンのヒドロキシル基とエステル結合を形成する。

【図4B】公知のフサリシジンが同定されているパエニバチルス種の細胞抽出物のHPLC/MS TOFクロマトグラムを示す。

30

【図4C】パエニバチルス種NRRL B-50972株および／またはこれから誘導された株由来の細胞抽出物において検出可能な公知のフサリシジンを示す。

【図5A】パエニセリンの構造を概説する図を示す。この種の化合物は、位置 (1) および位置 (4) の保存スレオニンの一方または両方がセリンで置換されていることを除いて、前記フサリシジンと同様である。

【図5B】パエニバチルス種NRRL B-50972株および／またはこれから誘導された、その中にパエニセリンが同定された株由来の細胞抽出物のHPLC/MS TOFクロマトグラムを示す。

【図5C】パエニバチルス種NRRL B-50972株および／またはこれから誘導された株由来の細胞抽出物において検出可能なパエニセリンを示す。検出されたすべての化合物について、m/z値および保持時間 (RT) を示す。

40

【図6A】図6Bに示されるUPLC/MS Triple TOFスペクトルから誘導されたパエニセリン A1の化学構造を示す。

【図6B】UPLC/MS Triple TOFスペクトルを示す。

【図7A】図7Bに示されるUPLC/MS Triple TOFスペクトルから誘導されたパエニセリン B1の化学構造を示す。

【図7B】UPLC/MS Triple TOFスペクトルを示す。

【図8A】パエニプロリキシンの構造を概説する図を示す。この種の化合物は、GHPD尾部の長さが-(CH₂)₁₂-から-(CH₂)₁₄-または-(CH₂)₁₆-に伸長

50

される以外は、フサリシジンと同様である。

【図 8 B】パエニバチルス種 NRRL B-50972 株および／またはこれから誘導された、その中にパエニプロリキシンが同定された株由来の細胞抽出物の HPLC/MS TOF クロマトグラムを示す。

【図 8 C】パエニバチルス種 NRRL B-50972 株および／またはこれから誘導された株由来の細胞抽出物において検出可能なパエニプロリキシンを示す。検出されたすべての化合物について、 m/z 値および保持時間 (RT) を示す。

【図 9 A】図 9 B に示される UPLC/MS Triple TOF スペクトルから誘導されたパエニプロリキシン C1 の化学構造を示す。

【図 9 B】UPLC/MS Triple TOF スペクトルを示す。

【図 10 A】図 10 B に示される UPLC/MS Triple TOF スペクトルから誘導されたパエニプロリキシン D1 の化学構造を示す。

【図 10 B】UPLC/MS Triple TOF スペクトルを示す。

【図 11】フサリシジン A および B (「AB」)、パエニセリン A1 および B1 (「868」)、パエニプロリキシン A2 および B2 (「938」)、または 868 および 938 の組み合わせを寒天プレート上全体に拡がったコレトリカム・ラゲナリウム (COLLILA) の胞子に適用した、Kirby-Bauer 抗生物質ディスク拡散アッセイを示す。真菌増殖の阻害ゾーンを有する各ディスクの直径は、ミリメートルで示される。

【図 12】図 12 A は、フサリシジン A の化学構造およびこの構造の単純化された描写を示す。図 12 B ~ 12 E は、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株およびこれから誘導された株によって産生されたフサリシジン、パエニセリンおよび／またはパエニプロリキシンの組み合わせの単純化された描写を示す。これらの組み合わせは、相乗的抗真菌効果を生じ、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株およびそれから誘導された株で観察される比較的高い効力および広域スペクトルの抗真菌活性に関与する。

【図 13】以下のパエニバチルス種株：パエニバチルス、ペオリエ (*Paenibacillus peoriae*) A (配列番号 1)；パエニバチルス・ポリミキサ A (配列番号 2)；パエニバチルス・ポリミキサ PKB1 (GenBank ABQ96384.2；配列番号 3)；パエニバチルス・ポリミキサ E681 (GenBank ADM67985.1；配列番号 4)；パエニバチルス・ポリミキサ B (配列番号 5)；パエニバチルス・ポリミキサ SQR (GenBank AHM63812.1；配列番号 6)；パエニバチルス・ポリミキサ C (配列番号 7)；パエニバチルス・ポリミキサ M1 (GenBank CCC83015.1；配列番号 8)；パエニバチルス・ポリミキサ SC2 (GenBank ACA09733.2；配列番号 9)；パエニバチルス種 NRRL B-50972 株 (配列番号 10)；およびパエニバチルス種 A 株 (配列番号 11) によって発現される FusA フサリシジンシンテターゼのセグメントの多重配列アライメントを示す。基質特異性を決定するアミノ酸残基は、黒色の輪郭で識別される (表 1 も参照されたい)。これらのアミノ酸残基は、配列番号 1 ~ 5 および 11 の 3203、3204、3207、3246、3267、3269、3290、3298、3299 および 3486 位、ならびに配列番号 6 ~ 9 の 3204、3205、3208、3247、3268、3270、3291、3299、3300、および 3487 位に位置する。

【図 14】パエニバチルス種 NRRL B-50972 株およびパエニバチルス種 A 株 (「A 株」) におけるフサリシジン遺伝子クラスターを示す。矢印は、クラスター内の個々の遺伝子を表す (すなわち、fusG は矢印「G」で表され、fusF は矢印「F」によって表されるなど)。最大の矢印は、以下の略号および記号を有する fusA フサリシジンシンテターゼ遺伝子を表す：A = アデニル化ドメイン (基質認識および活性化)；C = 縮合ドメイン (ペプチド結合形成)；E = エピマー化ドメイン (基質ラセミ化)；TE = チオエステラーゼドメイン (生成物放出)；文字のない楕円形 = チオール化 (T) ドメイン (ペプチドキャリアアタンパク質)。fusA 遺伝子は、各遺伝子クラスターの上または下のボックスに示されるアミノ酸を組み込む役割を果たす 6 つのモジュールを有する。A 株は典型的なフサリシジン遺伝子クラスターを有するが、パエニバチルス種 NRRL B-

50972株フサリシジン遺伝子クラスターは、モジュール3において機能的Aドメインを欠いている。結果として、パエニバチルス種NRRL B-50972株によって産生されるフサリシジンは、位置(3)にチロシンおよびフェニルアラニンを欠き、バリンまたはイソロイシンのみを組み込む。

【図15】パエニバチルス種NRRL B-50972株(配列番号12)およびパエニバチルス種NRRL B-67129株(配列番号13)におけるspo0A遺伝子の配列アライメントを示す。

【図16】パエニバチルス種NRRL B-67129株コード配列におけるヌクレオチド変化が、保存領域において単一のアミノ酸置換をもたらすことを示す、内生孢子形成細菌由来のSpo0Aオルソログの配列アライメントを示す。アライメントされたSpo0Aオルソログ配列は：パエニバチルス・テラエ(*Paenibacillus terrae*) Spo0A(配列番号14)、パエニバチルス種NRRL B-50972株 Spo0A(配列番号15)、パエニバチルス種NRRL B-67129株 Spo0A(配列番号16)、パエニバチルス・ポリミキサ Spo0A(配列番号17)、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*) Spo0A(配列番号18)、バチルス・セレウス(*Bacillus cereus*) Spo0A(配列番号19)およびクロストリジウム・パステリアヌム(*Clostridium pasteurianum*) Spo0A(配列番号20)である。

【図17】真菌病原体アルテルナリア・ソラニ(ALTESO)およびコレトリカム・ラゲナリウム(COLLILA)を用いたいくつかのフサリシジン、パエニセリンおよびパエニプロリキシンの80%最小発育阻止濃度(MIC80)値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本発明は、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこれから誘導される殺真菌性突然変異体(菌株)を提供する。パエニバチルス種NRRL B-50972株は、植物病原体に対して広域スペクトルの活性を有することが見出された。

【0040】

本明細書に記載される微生物および特定の株は、特に断らない限り、すべて自然から分離され、振盪フラスコ培養において、または例えば生物活性代謝産物の生産を最大化するためにバイオリアクターなどのスケールアップされた製造プロセスなどによって人工的条件下で増殖される。このような条件下での増殖は、菌株の「順化」をもたらす。一般に、このような「順化」株は、天然環境で見出される選択圧に曝されず、むしろ人為的選択圧に曝される均質な集団として培養されるという点で、自然界に見られるその対応物とは異なる。

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「単離された」は、全ブロスまたは発酵産物に富んだまたは濃縮されているか、または全ブロスまたは発酵産物から部分的にまたは実質的に精製された化合物を指す。

【0042】

一実施形態において、パエニバチルス種NRRL B-50972株の突然変異株が提供される。用語「突然変異体」は、パエニバチルス種NRRL B-50972株から誘導された遺伝子変異体を指す。一実施形態において、突然変異体は、パエニバチルス種NRRL B-50972株の1または複数またはすべての識別(機能的)特徴を有する。特定の例では、突然変異体またはこの発酵産物は、(識別機能的特徴として)真菌、卵菌類および/または細菌を少なくともパエニバチルス種NRRL B-50972株と同様に防除する。このような突然変異体は、パエニバチルス種NRRL B-50972株と約85%超、約90%超、約95%超、約98%超または約99%超の配列同一性を有するゲノム配列を有する遺伝子変異体であり得る。突然変異体は、パエニバチルス種NRRL B-50972株の細胞を、化学物質または放射線照射で処理することによって、またはパエニバチルス種NRRL B-50972株の細胞集団から自発的突然変異体(フ

アージ耐性または抗生物質耐性突然変異体など）を選択することによって、または当業者に周知の他の手段によって得ることができる。

【0043】

パエニバチルス種NRRL B-50972株およびこの突然変異体は、広範囲の植物病原体に対して活性を有する。一態様において、この菌株は、キュウリ炭疽病、キュウリうどんこ病、コムギ葉さび病、オオムギうどんこ病およびボトリティス病などの真菌；トマト疫病、キュウリべと病およびアブラナ属べと病などの卵菌類；および／またはシュードモナス（*Pseudomonas*）、キサントモナス（*Xanthomonas*）およびエルウィニア（*Erwinia*）などの細菌に対する活性を有する。

【0044】

特定の態様において、パエニバチルス種株は、配列番号10と少なくとも75%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、または少なくとも99%の配列同一性を示すDNA配列を含む。

【0045】

特定の態様において、本発明は、フサリシジン、パエニセリン、および／またはパエニプロリキシンを産生するパエニバチルス種株を含む発酵産物を対象とする。フサリシジンは、15-グアニジノ-3-ヒドロキシペンタデカン酸（GHPD）尾部およびこれらの線形対応物を有するデプシペプチドのファミリーである。フサリシジンの特異的保存特性は、このGHPD尾部、ならびに配列中の6つのアミノ酸のうちの3つ、すなわち（1）スレオニン、（4）スレオニンおよび（6）アラニンである。

【0046】

元々は1970年代半ばにNakajimaら（*J. Antibiot.* 1972, 25, 243-247）によって最初に発見されたが特徴付けられておらず、フサリシジンは1980年代後半にKurusuら（*J. Antibiot.*, 1987, 40, 1506-1514）によって記載された。フサリシジンは1990年代半ばから2000年代初頭にかけて、Kajimuraら（*J. Antibiot.*, 1996, 49, 129-135; *J. Antibiot.*, 1997, 50, 220-228）、Kurodaraら（*Heterocycles*, 2000, 53, 1533-1549; *J. Mass Spectrom.*, 2001, 36, 30-37）およびBeattyら（*Can. J. Microbiol.*, 2002, 48, 159-169）によってさらに研究された。この重厚な調査期間中、これらの化合物は著者に応じて数回改名された（フサリシジンAはLiF04a、Gatavalin、またはKT-6291Aとしても知られている）。この話題には多くの刊行物が存在するが、24の公知のフサリシジンの同じ群からの選択化合物が毎回記述されている。

【0047】

この話題に関してしばらくの沈黙期間があった後、Vaterら（*J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2015, 26, 1130-1141）は、質量分析によるフサリシジンの構造解明について記載し、そのファミリーのいくつかの類似体を記載した。Vaterらは、7アミノ酸（すなわち、ペプチド配列中の（4）スレオニン残基に連結された余分なアラニン）を有する新規なクラスのパエニセリン様化合物を同定した。本明細書で使用する用語「非環式類似体」は、フサリシジンまたはフサリシジン様化合物（例えば、パエニセリンまたはパエニプロリキシン）に対応するが、エステル結合を欠き、線形構造を生じる化合物を指す。

【0048】

フサリシジンのアミノ酸鎖は、非リボソームペプチドシンテターゼ（NRPS）によって1つに連結または改変される。マルチドメインNRPSは、最大15,000個のアミノ酸からなり、したがって、事実上最も長いタンパク質の1つであると考えられている（Schwarzer et al., (2003) *Nonribosomal Pept*

10

20

30

40

50

ides: From Genes to Products. Nat. Prod. Rep. 20, 275–287)。NRPS取り込みは、リボソームによって翻訳される21個の標準アミノ酸に限定されず、この乱雑さは、非リボソームペプチドの大きな構造的多様性および生物活性に寄与する(Li and Jensen, (2008))。パエニバチルス・ポリミキサPKB1によるフサリシジンの非リボソーム生合成は、d-アミノ酸の直接活性化を伴う(Chem. Biol. 15, 118–127)。

【0049】

P. ポリミキサE68では、フサリシジン生合成遺伝子クラスター(fusGFEDCBA)が特徴付けられ、クラスター中の最大のコードDNA配列(CDS)であるNRPSコード配列が6モジュールペプチドをコードすることが観察された(Choi et al., Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of Paenibacillus polymyxa E681. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365, 89–95; Li and Jensen, Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of Paenibacillus polymyxa E681. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365, 89–95; Li et al., (2013). Promoter Analysis and Transcription Regulation of fus Gene Cluster Responsible for Fusaricidin Synthesis of Paenibacillus polymyxa SQR-21. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 9479–9489)。生合成クラスターは、脂質部分の生合成を担う他のCDSを含むが、トランスポーター遺伝子を含まない(Li and Jensen, (2008). Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by Paenibacillus polymyxa PKB1 Involves Direct Activation of a d-amino acid. Chem. Biol. 15, 118–127)。P. ポリミキサでは、fusオペロンのプロモーターが同定され、これまでの研究により孢子形成の調節因子として関与する転写リプレッサー(AbrB)によって結合されることが示されており、このことは、フサリシジンが孢子形成中に合成され、微生物の二次代謝をそのライフサイクルで調整することが観察されたので興味深い(Li et al., (2013). Promoter Analysis and Transcription Regulation of fus Gene Cluster Responsible for Fusaricidin Synthesis of Paenibacillus polymyxa SQR-21. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 9479–9489)。

【0050】

対立遺伝子多様性は、典型的には化学的多様性の発生に関与していると考えられている。しかし、fusクラスターの興味深い特徴は、組み込まれたアミノ酸(Tyr、Val、Ile、allo-Ile、Phe)が異なる多様なフサリシジンがfusAの単一の対立遺伝子によって産生され得ることであり、根底にある機序は、アミノ酸の認識に関与するNRPS Aドメインが基質特異性を緩和したことである(Han et al., (2012). Site-Directed Modification of the Adenylation Domain of the Fusaricidin Nonribosomal Peptide Synthetase for Enhanced Production of Fusaricidin Analogs. Biotechnol. Lett. 34, 1327–1334; Mousa et al., (2015) Biodiversity of Genes Encoding Anti-Microbial Traits within Plant Associat

10

20

30

40

50

ed Microbes, Front Plant Sci. 2015;6:231)。
【0051】

fusA遺伝子における基質認識および活性化を担うAドメインの構造は、X線結晶学を用いてGrsAから決定され、基質特異性を決定する10個のアミノ酸残基(Asp235, Ala236, Trp239, Thr278, Ile299, Ala301, Ala322, Ile330, Cys331およびLys517)が同定されている(Challis et al., (2000) Predictive, Structure-Based Model of Amino Acid Recognition by Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domains. Chem Biol 7:211-224; Stachelhaus et al., (1999) The Specificity Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases. Chem Biol 6:493-505)。これらの10個のシグネチャー残基は、基質結合部位内のそれらの機能に基づいて3つのサブグループに分類することができる。Asp235およびLys517はそれぞれ基質のカルボキシル末端およびアミノ末端と相互作用し、配列分析によりNRPSのAドメインにおけるそれらの位置が不変であることが明らかにされた。Ala236、Ala301およびIle330は、脂肪族側鎖を有するアミノ酸基質に特異的なAドメイン内で中程度に可変である。Trp239、Thr278、Ile299、Ala322およびCys331は非常に位置可変であり、異なる基質の識別および選択において重要であると考えられている(Challis et al., (2000) Predictive, Structure-Based Model of Amino Acid Recognition by Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domains. Chem Biol 7:211-224; Stachelhaus et al., (1999) The Specificity Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases. Chem Biol 6:493-505)。Ile299は、基質特異性を付与する配列内のすべてのうちで最も位置可変性であった(Stachelhaus et al., (1999) The Specificity Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases. Chem Biol 6:493-505)。

【0052】

フサリシジンシンテターゼにおける基質特異性を決定する10個のアミノ酸残基を表1に示す。シンテターゼの6つのモジュールの各々のアデニル化ドメイン(Aドメイン)は、第1のモジュールのFusA-A1、第2のモジュールのFusA-A2、第3のモジュールのFusA-A3として知られている。これらの10個のアミノ酸残基は、図13に示す種々のバエニバチルス種株由来のFusAの多重配列アラインメントにおいても同定されている。

10

20

30

40

50

【表 1】

	基質認識に関与する残基の位置										
A ドメイン	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	フサリジジン中の 対応する残基
FusA-A1	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	L-Thr
FusA-A2	D	A	F	W	L	G	C	T	F	K	D-Val, D-allo-Ile, またはD-Ile
FusA-A3	D	A	S	T	L	A	G	V	C	K	L-Tyr, L-Phe, L- Val, L-Ile, またはL-allo-Ile
FusA-A4	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	D-allo-Thr
FusA-A5	D	L	T	K	I	G	E	V	G	K	D-AsnまたはD-Gln
FusA-A6	D	F	P	N	F	C	I	V	Y	K	D-Ala

【0053】

特定の態様において、殺真菌性パエニバチルス種株は、FusA-A3において基質特異性を決定するアミノ酸残基の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10個すべての欠失を含む変異型フサリジジンシンターゼを発現する。他の態様において、殺真菌性パエニバチルス種株は、FusA-A3においてAsp235、Ala236、Ser239、Thr278、Leu299、Ala301、Ala/Gly322、Val330、Cys331、Lys517およびこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失を有するフサリジジンシンターゼを発現する。

【0054】

本明細書に開示されたFusA-A3における欠失は、フサリジジンまたはフサリジジン様化合物中のペプチド環のアミノ酸位置(3)に特異的アミノ酸を組み込むためのフサリジジンシンターゼの能力に影響を及ぼす。例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株は、FusA-A3に欠失を含み、アミノ酸位置(3)にチロシニアミノ酸またはフェニルアラニンアミノ酸を有するフサリジジン化合物を産生することができない。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、FusA-A3における欠失は、代謝を古典的なフサリジジンの生合成から離して、パエニセリンおよびパエニプロリキシンなどのフサリジジン様化合物の生合成にシフトさせることができる。

【0055】

特定の実施形態において、本発明は、第3モジュールの機能的アデニル化ドメイン(FusA-A3)を欠く変異型フサリジジンシンターゼを含み、少なくとも1種のパエニセリンおよび少なくとも1種のパエニプロリキシンをさらに含む殺真菌性パエニバチルス種株の生物学的に純粋な培養物を含む組成物を対象とする。特定の態様において、少なくとも1種のパエニセリンおよび少なくとも1種のパエニプロリキシンは、組成物中で単離または濃縮される。

【0056】

いくつかの実施形態において、単離された化合物またはパエニプロリキシンは以下ものである

10

20

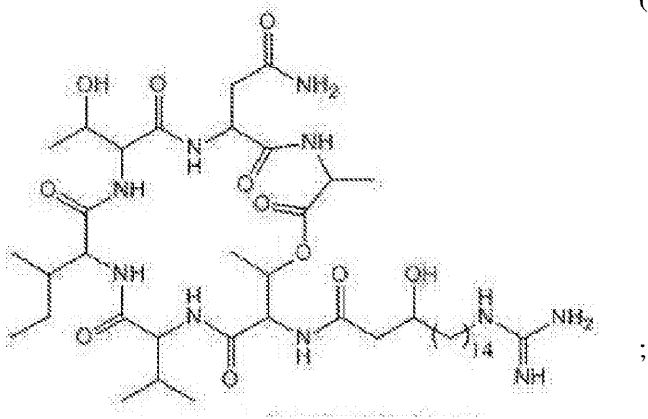
30

40

50

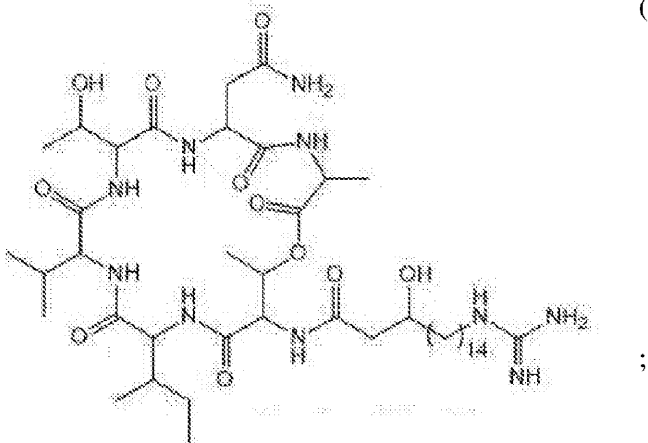
【化 3】

(Ia)



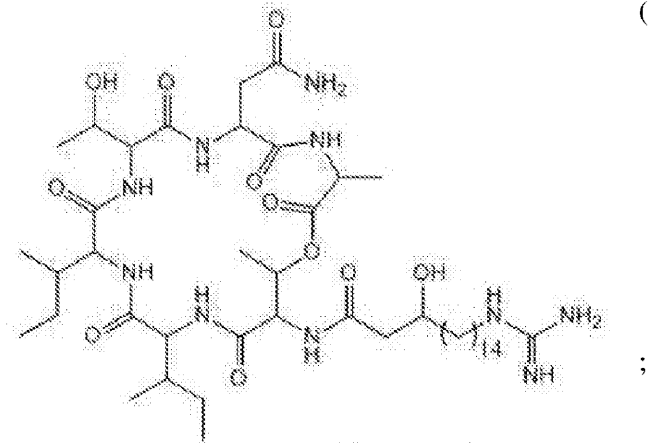
10

(Ib)



20

(Ic)

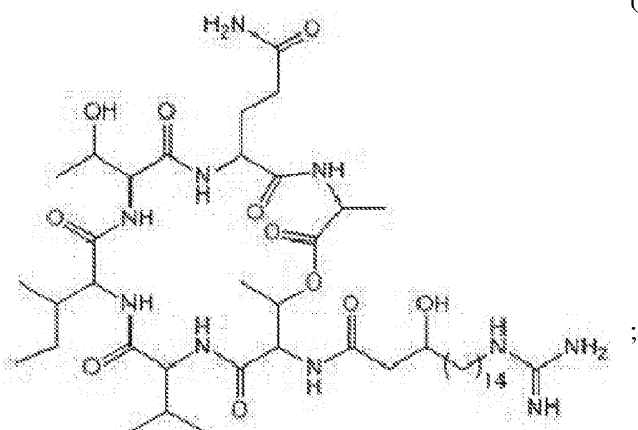


30

40

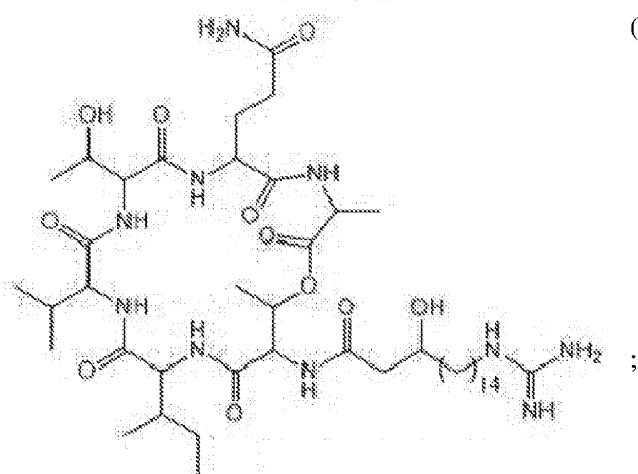
50

(Id)



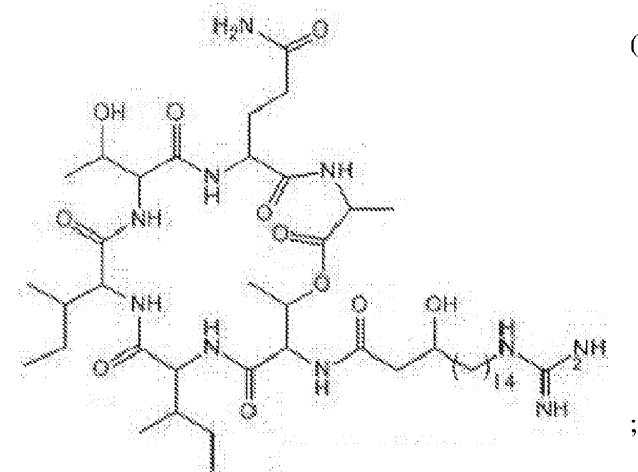
10

(Ie)



20

(If)

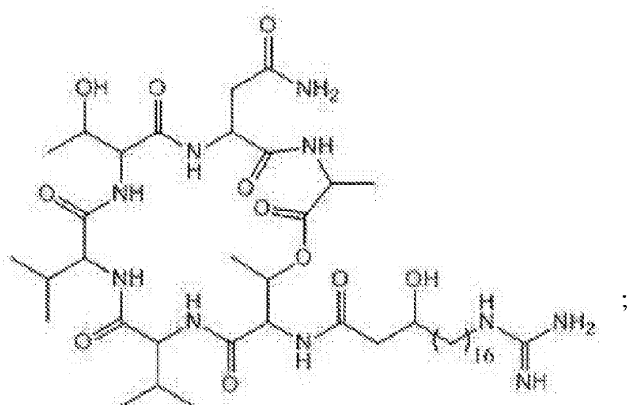


30

40

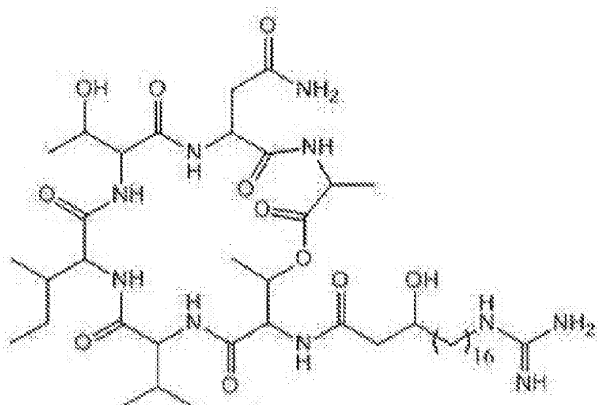
50

(Ig)



10

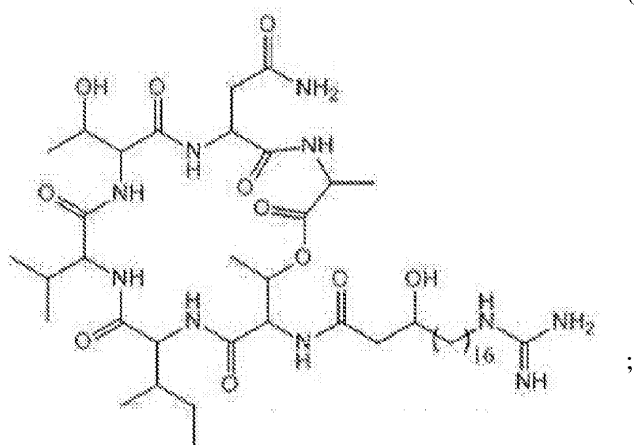
(Ih)



20

;

(Ii)



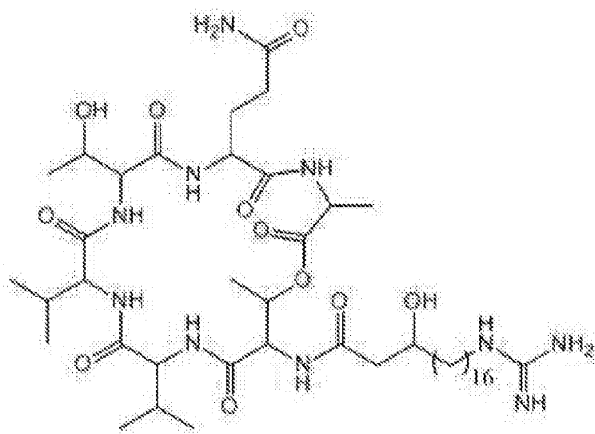
30

;

40

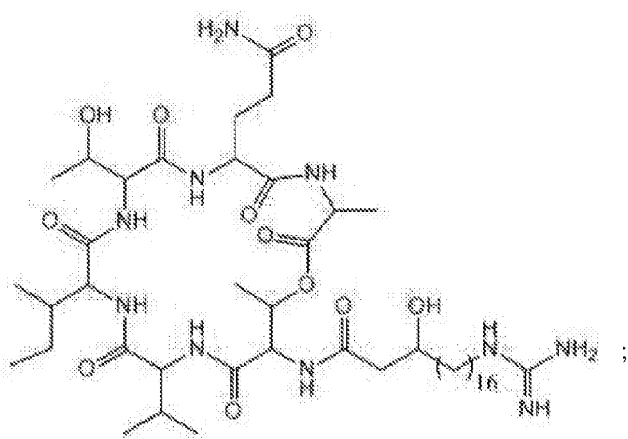
50

(Ij)



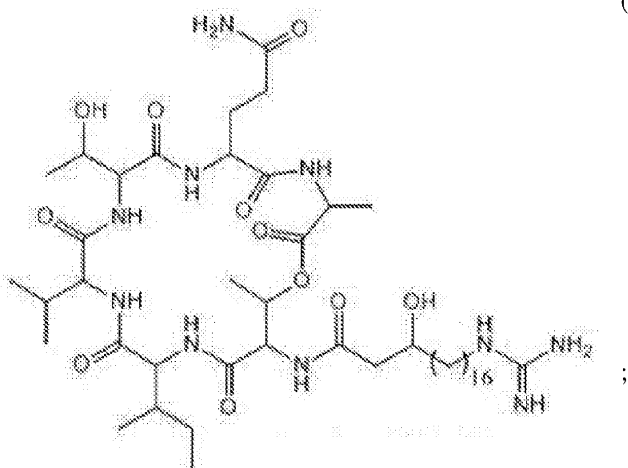
10

(Ik)



20

(II)

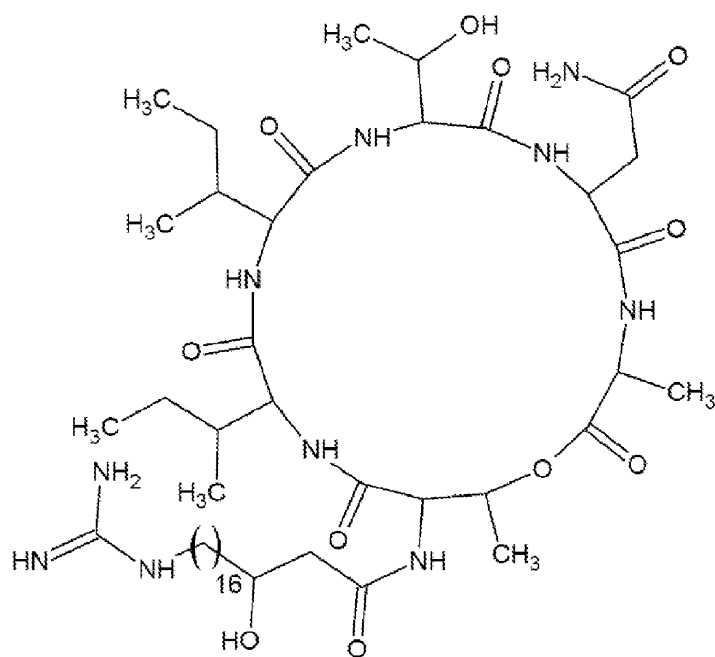


30

40

50

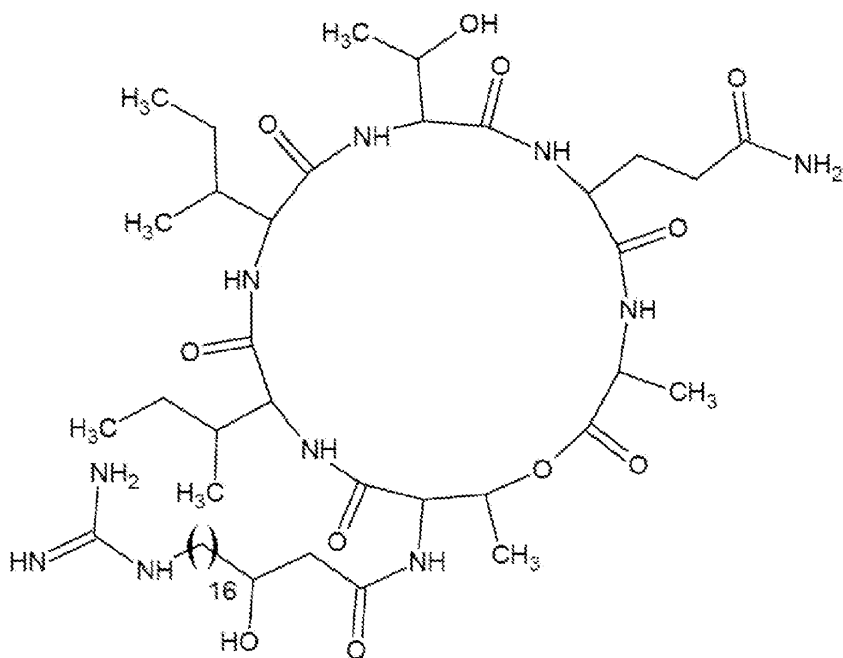
(Im)



10

20

; または
(In)



30

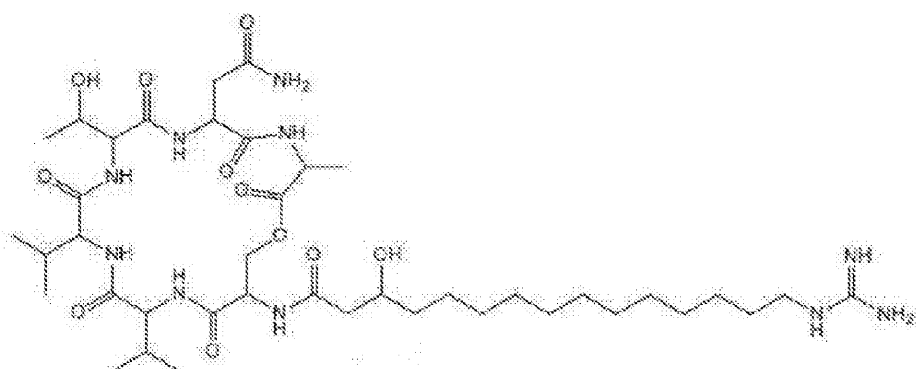
40

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態において、単離された化合物またはパエニセリンは以下のものである、

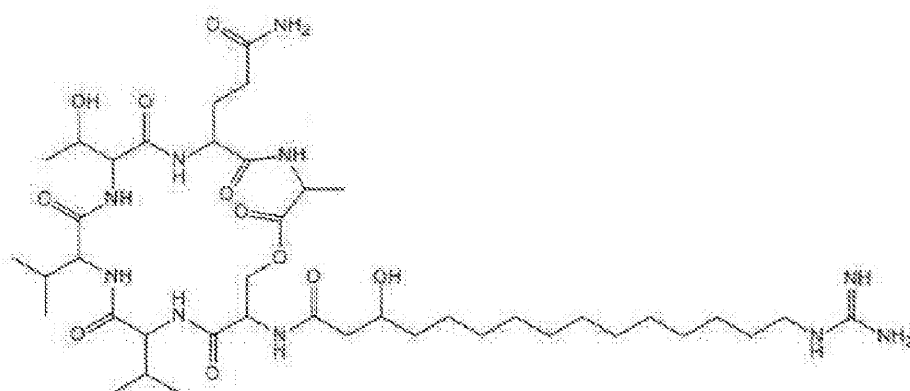
50

【化 4】



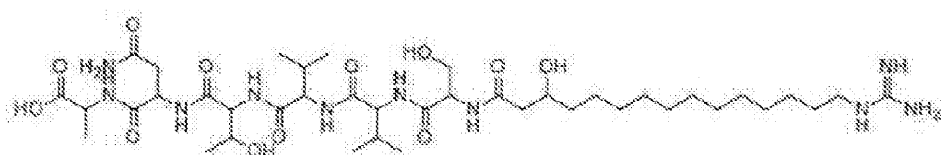
(IIa)

10



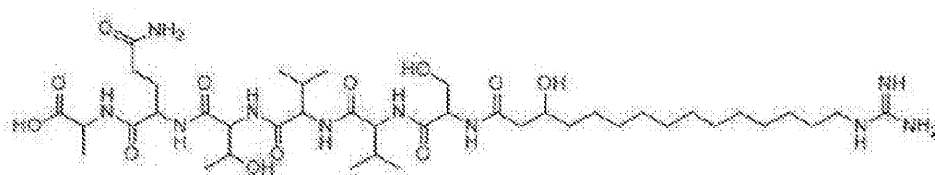
(IIb)

20



(IIc)

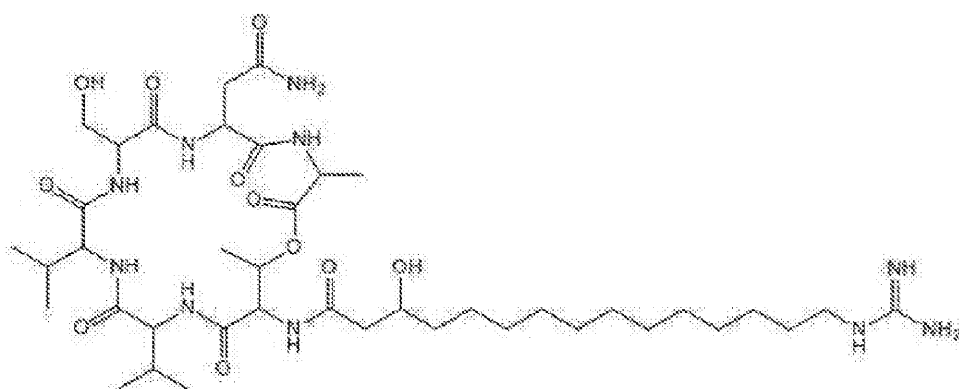
30



(IIId)

40

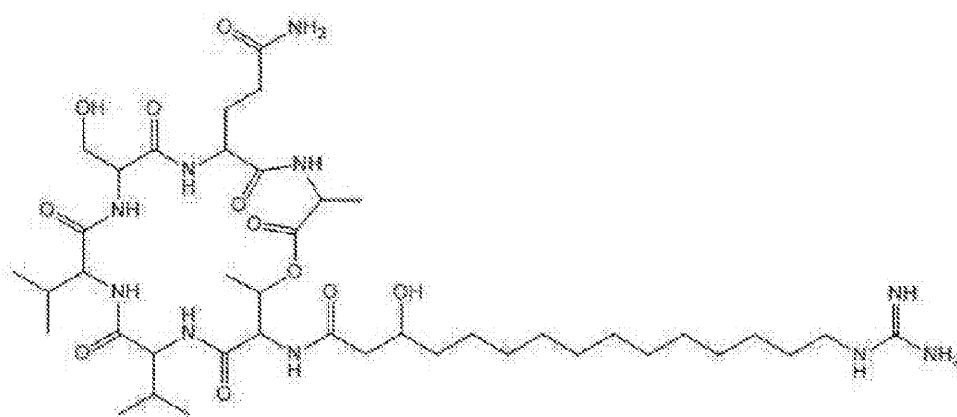
50



(IIe)

;

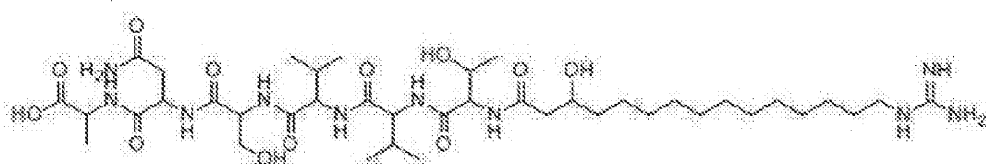
10



(IIf)

;

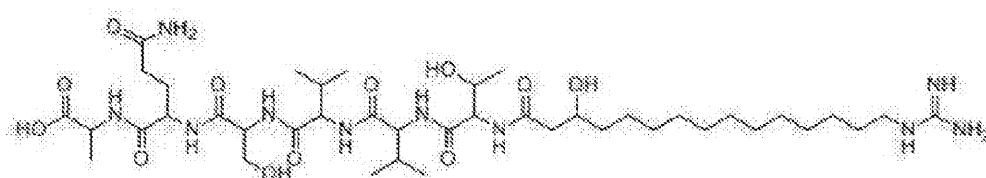
20



(IIg)

;

30



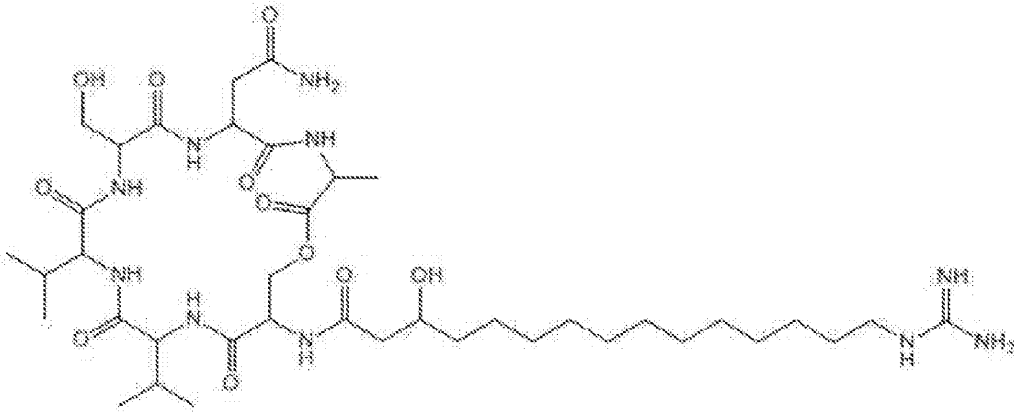
(IIh)

;

40

50

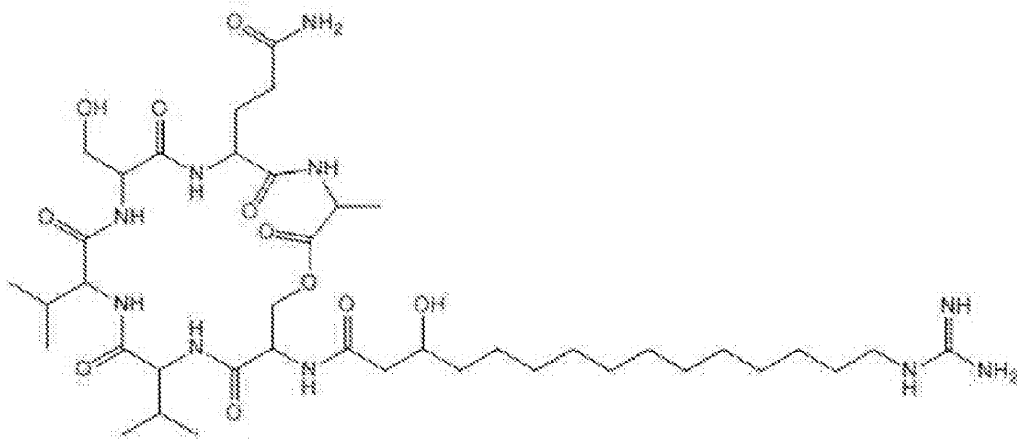
(Iii)



;

10

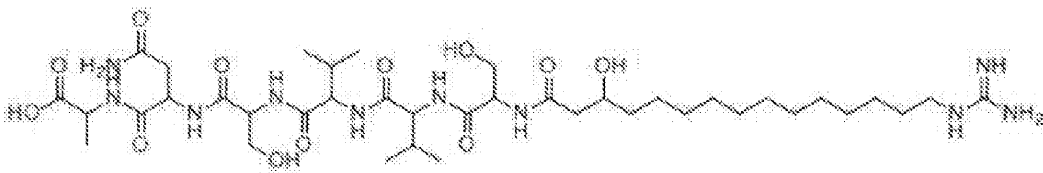
(Iij)



;

20

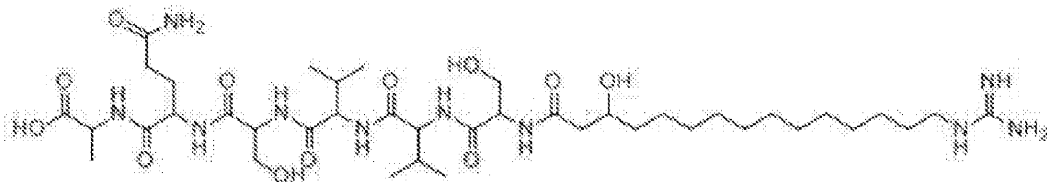
(Iik)



; または

30

(III)



40

【 0 0 5 8 】

他の態様において、本発明は、殺真菌性パエニバチルス種株を同定する、および／または対応する発酵産物を産生する方法に関する。この方法は、変異型フサリシジンシンテターゼを特徴付け、パエニバチルス種株の殺真菌活性をアッセイするための、パエニバチルス種株における F u s A - A 3 の配列決定を含む。特定の態様において、F u s A - A 3 は、図 1 3 に示される 1 または複数の配列に基づくプライマー（すなわち、配列番号 1 ～ 1 1）を用いて配列決定される。いくつかの実施形態において、スクリーニングの前に、細胞を増殖させ、以下の特徴の 1 または複数を含む細胞を選択する：野生型フサリシジンシンテターゼを含む参照パエニバチルス種株（すなわち、機能的 F u s A - A 3 を発現

50

する)において定量されたフサリシジンと比較した、アミノ酸残基(3)にチロシンまたはフェニルアラニンを有するフサリシジン(例えば、L i F 0 3 a、L i F 0 3 b、L i F 0 3 c、L i F 0 3 d、L i F 0 7 a、L i F 0 7 b、L i F 0 7 c、および/またはL i F 0 7 d)のレベルの低減または検出不能;および/または野生型フサリシジンシンテターゼを含む参照パエニバチルス種株(すなわち、機能的F u s A - A 3を発現する)において定量されたものと比較した、パエニセリン(例えば、パエニセリン A 1および/またはパエニセリン B 1)および/またはパエニプロリキシンのレベルの増大。

【0059】

一態様において、本発明は、広域スペクトル抗真菌活性を有する発酵産物を産生するための方法であって、変異型フサリシジンシンテターゼを有するパエニバチルス種株を培養して、孢子形成させることを含む方法を包含する。

【0060】

別の実施形態において、本発明は、広域スペクトルの抗真菌活性を有する殺真菌性パエニバチルス種株を同定する方法であって、a)パエニバチルス種株におけるF u s A - A 3を配列決定して、変異型フサリシジンシンテターゼを特徴付けること; b)変異型フサリシジンシンテターゼを有するパエニバチルス種株の殺真菌活性をアッセイすること; ならびにc)パエニバチルス種株が、変異型フサリシジンシンテターゼを含み、野生型フサリシジンシンテターゼを含む参照パエニバチルス種株と比較して殺真菌活性の増加を示す場合、広域スペクトルの抗真菌活性を有する殺真菌性パエニバチルス種株を選択すること、を含む方法に関する。この方法は、パエニバチルス種株によって産生されたパエニセリンおよび/またはパエニプロリキシンを定量すること、ならびにパエニバチルス種株が、野生型フサリシジンシンテターゼを含む参照パエニバチルス種株と比較して増加レベルのパエニセリンおよび/またはパエニプロリキシンを産生する場合、広域スペクトルの抗真菌活性を有するパエニバチルス種株を選択すること、をさらに含む。別の態様において、この方法は、殺真菌性パエニバチルス種株を培養して、殺真菌性発酵産物を産生することをさらに含む。

【0061】

一実施形態において、本発明は、広域スペクトルの抗真菌活性を有する殺真菌性パエニバチルス種株を含む抗真菌発酵(fermentation)を産生する方法であって、a)パエニバチルス種株におけるF u s A - A 3を配列決定して、変異型フサリシジンシンテターゼを特徴付けること; b)変異型フサリシジンシンテターゼを有するパエニバチルス種株の殺真菌活性をアッセイすること; c)パエニバチルス種株が、変異型フサリシジンシンテターゼを含み、野生型フサリシジンシンテターゼを含む参照パエニバチルス種株と比較して殺真菌活性の増加を示す場合、広域スペクトルの抗真菌活性を有する殺真菌性パエニバチルス種株を選択すること、ならびにd)殺真菌性パエニバチルス種株を培養して、殺真菌性発酵産物を産生すること、を含む方法に関する。

【0062】

いくつかの実施形態において、変異型フサリシジンシンテターゼは、F u s A - A 3において基質特異性を決定するアミノ酸残基の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10個すべての欠失を含む。他の態様において、変異型フサリシジンシンテターゼは、F u s A - A 3において、A s p 2 3 5、A l a 2 3 6、S e r 2 3 9、T h r 2 7 8、L e u 2 9 9、A l a 3 0 1、A l a / G l y 3 2 2、V a l 3 3 0、C y s 3 3 1、L y s 5 1 7およびこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失を含む。

【0063】

本発明はまた、パエニバチルス種N R R L B - 5 0 9 7 2株またはこの突然変異体もしくはこの無細胞調製物もしくは代謝産物を、葉、茎、花、果実、根、または種子などの植物もしくは植物部分に投与することによって、または植物または植物部分が生育する場所、例えば土壌に施用することによって、植物を処理して、植物病病害防除する方法も包

10

20

30

40

50

含する。

【0064】

本発明による方法において、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異体を含む組成物は、植物を成長させるために使用される任意のタイプの培地（例えば、土壌、パーミキュライト、細断された厚紙および水）において成長した任意の植物もしくは任意の植物の任意の部分に施用するか、または蘭やビカクシダなどの空気中で増殖する植物もしくは植物の部分に施用することができる。組成物は、例えば、噴霧（spraying）、霧化（atomizing）、気化（vaporizing）、散布（scattering）、散粉（dusting）、散水（watering）、吹きかけ（squirting）、振りかけ（sprinkling）、注ぎ（pouring）または燻蒸（fumigating）によって施用することができる。既に上述したように、農業、園芸、森林、プランテーション、果樹園、苗床、有機的に栽培された作物、芝草および都市環境など、目的の植物が位置する任意の所望の場所で施用を行うことができる。

10

【0065】

本発明の組成物は、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこれから誘導される殺真菌性突然変異体（株）を、以下の実施例に記載されている培地および他の方法を使用することを含む当分野において周知の方法により培養することによって得ることができる。従来の大規模な微生物培養プロセスには、液中発酵、固相発酵または液体表面培養が含まれる。発酵の終わりに向かって、栄養素が枯渇すると、細胞は増殖期から孢子形成期への移行を開始し、発酵の最終産物は主に孢子、代謝産物および残留発酵培地である。孢子形成は、パエニバチルスの自然ライフサイクルの一部であり、一般に、栄養制限に応答して細胞によって開始される。発酵は、高レベルのコロニー形成単位を獲得し、孢子形成を促進するように構成される。発酵から生じる培養培地中の細菌細胞、孢子および代謝産物は、直接使用するか、または遠心分離、接線流濾過、深層濾過、および蒸発などの従来の工業的方法によって濃縮することができる。

20

【0066】

本発明の組成物は、発酵産物を含む。いくつかの実施形態において、濃縮発酵ブロス、例えば、透析濾過プロセスを介して洗浄して、残留発酵ブロスおよび代謝産物を除去する。本明細書で使用される用語「ブロス濃縮液」は、上記のような従来の工業的方法によって濃縮されたが、液体形態のままである全ブロス（発酵ブロス）を指す。本明細書で使

30

用される用語「発酵固形物」は、発酵ブロスが乾燥した後に残る固体物質を指す。本明細書で使

用される用語「発酵産物」は、全ブロス、ブロス濃縮物および／または発酵固形物を指す。本発明の組成物は、発酵産物を含む。

【0067】

発酵ブロスまたはブロス濃縮物は、噴霧乾燥、凍結乾燥、トレイ乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥、または蒸発などの従来の乾燥プロセスまたは方法を使用して、担体の添加の有無にかかわらず乾燥させることができる。

【0068】

得られた乾燥生成物は、粉碎または顆粒化などによりさらに加工して、特定の粒径または物理的フォーマットを達成することができる。以下に記載する担体は、乾燥後に添加することもできる。

40

【0069】

本発明の菌株の発酵ブロスの無細胞調製物は、発酵ブロスの抽出、遠心分離および／または濾過のような当技術分野で公知の任意の手段によって得ることができる。当業者であれば、いわゆる無細胞調製物は、細胞を欠いていなくてもよく、むしろ、細胞を除去するために使用される技術（例えば、遠心分離の速度）に応じて、ほとんど無細胞または本質的に無細胞であることを認識するであろう。得られた無細胞調製物は、乾燥および／または植物または植物成長培地への施用を助ける成分と配合することができる。発酵ブロスのための上記の濃縮方法および乾燥技術は、無細胞調製物にも適用可能である。

50

【0070】

一実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^4 コロニー形成単位（CFU）の微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^5 コロニー形成単位（CFU）の微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^6 CFUの微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。さらに別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^7 CFUの微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^8 CFUの微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^9 CFUの微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^{10} CFUの微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。別の実施形態において、発酵産物は、少なくとも約 1×10^{11} CFUの微生物（例えば、パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株）／mLブロスを含む。

10

【0071】

本発明の組成物は、その特定の物理的および／または化学的性質に応じて、それらの配合物の形態またはこれらから調製される使用形態、例えば、エアロゾル、カプセル懸濁液、冷煙霧濃厚剤（cold-fogging concentrate）、温煙霧濃厚剤（warm-fogging concentrate）、カプセル化顆粒、細粒、種子処理のための流動性濃縮物、即時使用可能な溶液、散粉剤、乳剤、水中油型乳剤、油中水型乳剤、顆粒剤、微粒剤、油分散性散剤、油混和性流動性濃縮物、油混和性液剤、ガス剤（加圧下）、ガス発生剤、フォーム、ペースト、殺虫剤被覆種子、懸濁濃縮物、油性分散物、サスポエマルジョン濃縮物、可溶性濃縮物、懸濁液、湿潤散剤、可溶性散剤、粉剤および顆粒剤、水溶性および水分散性の顆粒または錠剤、種子処理用の水溶性および水分散性の散剤、湿潤散剤、活性成分に含浸させた天然生成物および合成物質、ならびに種子のためのポリマー物質およびコーティング材料中のマイクロカプセル化、ならびにULV冷煙霧および温煙霧製剤で使用する事ができる。

20

30

【0072】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は液体製剤である。液体製剤の非限定的な例としては、懸濁濃縮液および油分散液が挙げられる。他の実施形態において、本発明の組成物は固形製剤である。液体製剤の非限定的な例としては、凍結乾燥粉末および噴霧乾燥粉末が挙げられる。

【0073】

本発明の組成物は、効力、安定性および有用性を改善するために、および／または加工、包装および最終用途への適用を容易にするために、細胞、無細胞調製物または代謝産物を含む組成物に添加された製剤用不活性成分（formulation inert）を含み得る。このような製剤用不活性成分および成分は、個々にまたは組み合わせて添加可能な担体、安定剤、栄養素、または物理的特性改変剤を含み得る。いくつかの実施形態において、担体としては、水、油、および他の有機または無機溶媒などの液体材料、ならびに生物学的または化学合成によって誘導された無機物、ポリマーまたはポリマー複合体などの固体材料を挙げることができる。いくつかの実施形態において、担体は、種子または根などの植物部分への組成物の付着を促進する結合剤または接着剤である。例えば、Taylor, A. G., et al., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments", Annu. Rev. Phytopathol. 28:321-339 (1990)を参照されたい。安定

40

50

剤は、固結防止剤、抗酸化剤、乾燥剤、保護剤または防腐剤を含み得る。栄養素としては、糖、多糖、油、タンパク質、アミノ酸、脂肪酸およびリン酸などの炭素、窒素、およびリン源を挙げることができる。物理的特性改変剤としては、増量剤、湿潤剤、増粘剤、pH調整剤、レオロジー調節剤、分散剤、アジュバント、界面活性剤、不凍剤または着色剤を挙げることができる。いくつかの実施形態において、発酵により生成された細胞、無細胞調製物または代謝産物を含む組成物は、希釈剤として水と共に、または水なしで、任意の他の製剤調製をせずに直接使用することができる。いくつかの実施形態において、製剤用不活性成分は、発酵ブロス濃縮した後、および乾燥中および／または乾燥後に添加される。

【0074】

すべての植物および植物部分は、本発明に従って処理することができる。本文脈では、植物は、所望および望ましくない野生植物または作物植物（天然に存在する作物植物を含む）などの、すべての植物および植物集団を意味すると理解される。作物植物は、伝統的な育種および最適化法によって、またはバイオテクノロジーおよび組換え法、またはこれらの方法の組み合わせによって得られ得る植物であり、トランスジェニック植物および植物品種改良者の権利によって保護され得るまたはされない植物種を含む。植物部分は、苗条、葉、花および根などの植物の空中および地下の部分および器官のすべてを意味するものとして理解され、例としては、葉、針葉、花軸、莖、花、子実体、果実および種子ならびに根、塊茎および根茎を挙げることができる。植物部分はまた、作物材料および栄養繁殖材料および生殖繁殖材料、例えば、切穂、塊茎、根茎、接ぎ穂および種子を含む。

【0075】

既に上述したように、すべての植物およびこれらの部分は、本発明に従って処理することができる。好ましい実施形態において、野生株またはハイブリッド形成もしくはプロトプラスト融合などの伝統的な生物学的育種法によって得られる植物種および植物品種、およびそれらの部分が処理される。さらに好ましい実施形態において、適切であれば伝統的な方法（遺伝子組換え生物）と組み合わせて、組換え法によって得られたトランスジェニック植物および植物品種ならびにそれらの部分が処理される。「部分」または「植物の部分」または「植物部分」という用語は、本明細書に上述してある。いずれの場合も市販されているか、または使用中である植物品種の植物は、本発明に従って特に好ましく処理される。植物品種は、伝統的な育種、突然変異誘発または組換えDNA技術のいずれかによって育種された新規な形質を有する植物を意味すると理解される。これらは品種、種属、生物型、遺伝子型の形をとっている。

【0076】

本発明による組成物による植物および植物部分の処理は、直接または慣用の処理方法、例えば浸漬、噴霧、霧化、ミスト化、気化、散粉、煙霧、散布、発泡、塗布、拡散、注入、灌注、液滴灌漑、などによって環境、生息場所または貯蔵空間に作用することによって行われ、繁殖材料の場合、特に種子の場合にはさらに、乾燥種子処理方法、湿式種子処理方法、スラリー処理方法、皮殻形成によって、1つまたは複数のコーティングなどでコーティングすることによって行われる。さらに、超低容量法によって活性物質を施用すること、または活性物質調製物または活性物質自体を土壌に注入することが可能である。

【0077】

植物の好ましい直接処理は、葉塗布処理であり、すなわち、本発明による組成物を葉に施用し、処理頻度および施用量を問題の病原体の感染圧に合わせることが可能である。

【0078】

全身的に活性な化合物の場合、本発明による組成物は、根系を介して植物に到達する。この場合、植物の処理は、本発明による組成物を植物の環境に作用させることによって行うことができる。これは、例えば土壌または栄養溶液に組み込む灌注、すなわち植物の位置（例えば土壌または水耕栽培システム）に本発明による組成物の液体形態を含浸させることによって、または土壌施用、すなわち、本発明による組成物を、固体形態（例えば、顆粒の形態）で植物の位置に組み込むことによって行うことができる。水稻栽培の場合、

これは、本発明による組成物を固体使用形態（例えば、顆粒の形態）で浸水した水田に計量することによって行うこともできる。

【0079】

好ましい植物は、有用植物、観賞植物、芝、公共および家庭内で観賞植物として用いられる一般に使用される樹木、および森林樹木の群からの植物である。森林樹木は、木材、セルロース、紙および木の一部分から作られた製品の生産のための木を含む。

【0080】

本文脈において使用される用語「有用植物」は、食料、飼料、燃料を得るための、または工業目的のための植物として使用される作物植物を指す。

【0081】

本発明の組成物および方法で処理および／または改良することができる有用植物としては、例えば、以下のタイプの植物を挙げることができる：芝、ブドウ、穀物、例えばコムギ、オオムギ、ライムギ、オートムギ、米、トウモロコシおよびキビ／ソルガム；ビート、例えばテンサイおよび飼料ビート；果実、例えば、仁果類、核果および軟質果実、例えば、リンゴ、ナシ、プラム、桃、アーモンド、サクランボおよびベリー類、例えば、イチゴ、ラズベリー、ブラックベリーなど；豆科植物、例えば、豆類、レンズ豆、エンドウ豆および大豆；油糧種子、例えば、ナタネ、マスタード、ケシ、オリーブ、ヒマワリ、ココナッツ、ヒマシ油植物、カカオおよびピーナッツ；ウリ科植物、例えば、カボチャ／スカッシュ、キュウリおよびメロン；繊維植物、例えば綿、亜麻、麻およびジュート；柑橘類、例えば、オレンジ、レモン、グレープフルーツおよびタンジェリン；野菜類、例えば、ハウレンソウ、レタス、アスパラガス、キャベツ種、ニンジン、タマネギ、トマト、ジャガイモおよびピーマン；クスノキ科、例えば、アボカド、シナモン、樟脳、またはタバコ、ナッツ、コーヒー、ナス、サトウキビ、茶、コショウ、ブドウ、ホップ、バナナ、ラテックス植物および観賞植物、例えば花、低木、落葉樹および針葉樹などの他の植物。この列挙は限定的ではない。

【0082】

以下の植物は、本発明の組成物および方法を適用するための特に適切な標的作物であると考えられる：綿、ナス、芝、仁果類、核果、軟質果実、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、キュウリ、タバコ、ブドウ、米、穀類、ナシ、豆類、大豆、アブラナ、トマト、ピーマン、メロン、キャベツ、ジャガイモおよびリンゴ。

【0083】

本発明の方法に従って改良することができる樹木の例は、モミ属種 (*Abies* sp.)、ユーカリ属種 (*Eucalyptus* sp.)、トウヒ属種 (*Picea* sp.)、マツ属種 (*Pinus* sp.)、トチノキ属種 (*Aesculus* sp.)、スズカケノキ属種 (*Platanus* sp.)、シナノキ属種 (*Tilia* sp.)、カエデ属種 (*Acer* sp.)、ツガ属種 (*Tsuga* sp.)、トリネコ属種 (*Fraxinus* sp.)、ナナカマド属種 (*Sorbus* sp.)、カバノキ属種 (*Betula* sp.)、サンザシ属種 (*Crataegus* sp.)、ニレ属種 (*Ulmus* sp.)、コナラ属種 (*Quercus* sp.)、ブナ属種 (*Fagus* sp.)、ヤナギ属種 (*Salix* sp.) ハコヤナギ属種 (*Populus* sp.) である。

【0084】

本発明の方法に従って改良することができる好ましい樹木は、樹木種トチノキ属 (*Aesculus*) 由来：A. ヒッポカスタヌム (*A. hippocastanum*)、A. パリフロラ (*A. pariflora*)、A. カルネア (*A. carnea*)；樹木種スズカケノキ属 (*Platanus*) 由来：P. アセリフロラ (*P. aceriflora*)、P. オクシデンタリス (*P. occidentalis*)、P. ラセモア (*P. racemosa*)；樹木種トウヒ属 (*Picea*) 由来：P. アビエス (*P. abies*)；樹種マツ属 (*Pinus*) 由来：P. ラジアータ (*P. radiata*)、P. ポンデローサ (*P. ponderosa*)、P. コントルタ (*P. contorta*)、P. シ

10

20

30

40

50

ルヴェストル (*P. sylvestre*)、*P. エリオッティ* (*P. elliottii*)、*P. モンチコラ* (*P. montecola*)、*P. アルビカウリス* (*P. albicaulis*)、*P. レジノーサ* (*P. resinosa*)、*P. パルストリス* (*P. palustris*)、*P. テーダ* (*P. taeda*)、*P. フレキシリス* (*P. flexilis*)、*P. ジェフレギ* (*P. jeffregii*)、*P. バクシアナ* (*P. baksiana*)、*P. ストロブス* (*P. strobilus*)；樹木種ユーカリ属 (*Eucalyptus*) 由来：*E. グランディス* (*E. grandis*)、*E. グロブルス* (*E. globulus*)、*E. カマデンチス* (*E. camadensis*)、*E. ニテンス* (*E. nitens*)、*E. オブリクア* (*E. obliqua*)、*E. レグナンス* (*E. regnans*)、*E. ピルラルス* (*E. pilularis*) から得ることができる。

10

【0085】

本発明の方法に従って改良することができる特に好ましい樹木は、樹木種マツ属 (*Pinus*) 由来：*P. ラジオタ*、*P. ポンデローサ*、*P. コントルタ*、*P. シベレス*、*P. ストロバス*；樹木種ユーカリ属 (*Eucalyptus*) 由来：*E. グランディス*、*E. グロブルス*、*E. カマデンチス*である。

【0086】

本発明の方法に従って改善することができる非常に特に好ましい樹木は、セイヨウトチノキ、スズカケノキ科 (*Platanaceae*)、菩提樹、楓である。

【0087】

本発明は、寒地型芝草および暖地型芝草を含む任意の芝草に施用することもできる。寒地型芝草の例としては、ケンタッキーブルーグラス (ポア・プラテンシス *L. (Poa pratensis L.)*)、オオスズメノカタビラ (ポア・トリビアルリス *L. (Poa trivialis L.)*)、カナダブルーグラス (ポア・コンプレッサ *L. (Poa compressa L.)*)、スズメノカタビラ (ポア・アンヌア *L. (Poa annua L.)*)、アップランドブルーグラス (ポア・グラウカンタ ガウジン (*Poa glauantha Gaudin*))、ウッドブルーグラス (ポア・ネモラリス *L. (Poa nemoralis L.)*) およびバルバスブルーグラス (ポア・ブルボサ *L. (Poa bulbosa L.)*) などのブルーグラス類 (ポア属種 (*Poa spp.*))；クリーピングベントグラス (アグロスティス・パルストリス *Huds. (Agrostis palustris Huds.)*)、コロニアルベントグラス (アグロスティス・テヌイス *Sibth. (Agrostis tenuis Sibth.)*)、ベルベットベントグラス (アグロスティス・カニナ *L. (Agrostis canina L.)*)、サウスジャーマンミックスドベントグラス (アグロスティス・テニウス *Sibth. (Agrostis tenuis Sibth.)*)、アグロスティス・カニナ *L. (Agrostis canina L.)* およびアグロスティス・パルストリス *Huds. (Agrostis palustris Huds.)*) を含むアグロスティス属種 (*Agrostis spp.*)、およびコヌカグサ (アグロスティス・アルバ *L. (Agrostis alba L.)*) などのベントグラス類 (アグロスティス属種 (*Agrostis spp.*))；

20

30

レッドフェスク (フェストウカ・ルブラ *L. 属種ルブラ (Festuca rubra L. spp. rubra)*)、クリーピングフェスク (フェストウカ・ルブラ *L. (Festuca rubra L.)*)、チューイングスフェスク (フェストウカ・ルブラ・コミユタタ *Gaud. (Festuca rubra commutata Gaud.)*)、シープフェスク (フェストウカ・オビナ *L. (Festuca ovina L.)*)、ハードフェスク (フェストウカ・ロンギホリア *Thuill. (Festuca longifolia Thuill.)*)、ヘアフェスク (フェストウカ・カピラタ *Lam. (Festuca capillata Lam.)*)、トールフェスク (フェストウカ・アルンジナセア *Schreb. (Festuca arundinacea Schreb.)*) およびメドウフェスク (フェストウカ・エラノル *L. (Festuca elanor L.)*) などのウシノケグサ類 (フェストウカ属種 (*Festuca*

40

50

spp.)) ;

ネズミムギ（ロリウム・マルチフロラム Lam. (*Lolium multiflorum* Lam.))、ホソムギ（ロリウム・ペレン L. (*Lolium perenne* L.)) およびイタリアンライグラス（ロリウム・マルチフロラム Lam. (*Lolium multiflorum* Lam.)) などのドクムギ類（ロリウム属種 (*Lolium* spp.)) ;

ならびにフェアウェイウィートグラス（アグロピュロン・クリスタツム (L.) Gaertn. (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.))、クレステッドウィートグラス（アグロピュロン・デセルトルム (Fisch.) Schult. (*Agropyron desertorum* (Fisch.) Schult.)) およびウェスタンウィートグラス（アグロピュロン・スミチイ Rydb. (*Agropyron smithii* Rydb.)) などのカモジグサ類（アグロピュロン属種 (*Agropyron* spp.)) である。

【0088】

さらなる寒地型芝草の例は、ビーチグラス（アンモフィラ・ブレビリグラタ Fern. (*Ammophila breviligulata* Fern.))、スムーズブロムグラス（ブロムス・イネルミス Leyss. (*Bromus inermis* Leyss.))、オオアワガエリ（プレウム・プラテンシス L. (*Phleum pratense* L.))、サンドカットテイル（プレウム・スブラツム L. (*Phleum subulatum* L.))、カモガヤ（ダクチルリス・グロメラタ L. (*Dactylis glomerata* L.))、アレチタチドジョウツナギ（プッシネリア・ジスタンシス (L.) Parl. (*Puccinellia distans* (L.) Parl.)) およびクシガヤ（シノスルス・クリスタツス L. (*Cynosurus cristatus* L.)) などのガマである。

【0089】

暖地型芝草の例は、ギョウギシバ（キュノドン属種 L. C. Rich (*Cynodon* spp. L. C. Rich))、ノシバ（ゾイシア属種 Willd. (*Zoysia* spp. Willd.))、イヌシバ（ステノタフルム・セクンダツム・ワルト・クントズ (*Stenotaphrum secundatum* Walt Kuntze))、センチピードグラス（エレモクロア・オフィウロイデス・ムンロ Hack. (*Eremochloa ophiuroides* Munro Hack.))、カーペットグラス（アキシノプス・アフィニス・カーゼ (*Axonopus affinis* Chase))、バヒアグラス（パスパルム・ノタツム・フルッグ (*Paspalum notatum* Flugge))、キクユグラス（ペンニセツム・クランデスチヌム Hochst. ex Chiov. (*Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov.))、バッファローグラス（ブクロ・ダクチルオイドス (Nutt.) Engelm. (*Buchloe dactyloids* (Nutt.) Engelm.))、メダカスケ（ボウテロウア・グラシリシ (H. B. K.) Lag. ex グリフィトス (*Bouteloua gracilis* (H. B. K.) Lag. ex Griffiths))、シーショアパスパラム（パスパルム・バギナツム・スワルトズ (*Paspalum vaginatum* Swartz)) およびアゼガヤモドキ（ボウテロウア・クルチペンズラ (Michx. Torr.) (*Bouteloua curtipendula* (Michx. Torr.)) である。寒地型芝草は概して、本発明による使用に好ましい。特に好ましいのは、ブルーグラス、ベントグラスおよびコヌカグサ、ウシノケグサ類およびドクムギ類である。ベントグラスが特に好ましい。

【0090】

本発明の組成物は、強力な殺菌活性を有し、作物保護および材料の保護における望ましくない微生物、例えば、真菌および細菌の防除に使用することができる。

【0091】

本発明はまた、本発明の組成物が、植物病原性真菌、植物病原性細菌および／またはこ

10

20

30

40

50

これらの生息地に施用されることを特徴とする、望ましくない微生物を防除する方法に関する。

【0092】

殺真菌剤は、植物病原性真菌の防除のための作物保護に使用することができる。それらは、特に、ネコブカビ類 (*Plasmodiophoromycetes*)、ペロノスポラミセテス (*Peronosporomycetes*) (異名卵菌類)、ツボカビ類 (*Chytridiomycetes*)、接合菌類 (*Zygomycetes*)、子囊菌類 (*Ascomycetes*)、担子菌類 (*Basidiomycetes*) および不完全菌類 (*Deuteromycetes*) (異名 *Fungi imperfecti*) のメンバーである土壌媒介性病原体を含む、広域スペクトルの植物病性真菌に対する傑出した効力により特徴付けられる。いくつかの殺真菌剤は、全身的に活性であり、葉面、種子粉衣または土壌殺真菌剤として植物保護に使用することができる。さらに、それらはとりわけ木材または植物の根に蔓延する真菌との戦いに適している。

10

【0093】

殺菌剤は、シュードモナス科 (*Pseudomonadaceae*)、ツツジ科 (*Rhizobiaceae*)、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*)、コリネバクテリア科 (*Corynebacteriaceae*) およびストレプトミセス科 (*Streptomycetaceae*) の防除のための作物保護に使用することができる。

【0094】

本発明に従って処理することができる真菌病害の病原体の非限定的な例には以下のものが含まれる：

20

うどんこ病病原体により引き起こされる病害、例えば、ブルメリア属種 (*Blumeria species*)、例えばブルメリア・グラミニス (*Blumeria graminis*)；ポドスパエラ属種 (*Podosphaera species*)、例えばポドスパエラ・レウコトリカ (*Podosphaera leucotricha*)；スパエロテカ属種 (*Sphaerotheca species*)、例えばスパエロテカ・フリギネア (*Sphaerotheca fuliginea*)；ウンキヌラ属種 (*Uncinula species*)、例えばウンキヌラ・ネカトル (*Uncinula necator*)；

30

さび病病原体により引き起こされる病害、例えば、ギュムノスポランギウム属種 (*Gymnosporangium species*)、例えばギュムノスポランギウム・サビナエ (*Gymnosporangium sabinae*)；ヘミレイア属種 (*Hemileia species*)、例えばヘミレイア・ワスタトリクス (*Hemileia vastatrix*)；パコブソラ属種 (*Phakopsora species*)、例えばパコブソラ・パキユリジ (*Phakopsora pachyrhizi*) およびパコブソラ・メイボミアエ (*Phakopsora meibomiae*)；プッキニア属種 (*Puccinia species*)、例えばプッキニア・レコンジタ (*Puccinia recondite*)、*P. トリチシナ* (*P. trititcina*)、*P. グラミニス* (*P. graminis*) または *P. ストリフォルミス* (*P. striiformis*)；ウロミセス属種 (*Uromyces species*)、例えばウロミセス・アペンジクラツス (*Uromyces appendiculatus*)；

40

卵菌類の群由来の病原体により引き起こされる病害、例えば、アルブゴ属種 (*Albugo species*)、例えばアルブゴ・カンディダ (*Albugo candida*)；ブレミア属種 (*Bremia species*)、例えばブレミア・ラクトウカエ (*Bremia lactucae*)；ペロノスポラ属種 (*Peronospora species*)、例えばペロノスポラ・ピシ (*Peronospora pisi*) または *P. ブラシカエ* (*P. brassicae*)；フィトフトラ属種 (*Phytophthora species*)、例えばフィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)；プラスモパラ属各種 (*Plasmopara spec*

50

ies)、例えばプラスモパラ・ビチコラ (*Plasmopara viticola*) ; シュードペロノスポラ属種 (*Pseudoperonospora species*) 、例えばシュードペロノスポラ・フムリ (*Pseudoperonospora humuli*) またはシュードペロノスポラ・クベンシス (*Pseudoperonospora cubensis*) ; ピシウム属種 (*Pythium species*)、例えばピシウム・ウルティムム (*Pythium ultimum*) ;

例えば以下のものより引き起こされる斑点病および葉萎凋病、アルテルナリア属種 (*Alternaria species*)、例えばアルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*) ; セルコスボラ属種 (*Cercospora species*)、例えばセルコスボラ・ベティコラ (*Cercospora beticola*) ; クラジオスポリウム属各種 (*Cladosporium species*)、例えばクラジオスポリウム・ククメリナム (*Cladosporium cucumerinum*) ; コクリオボラス属種 (*Cochliobolus species*)、例えばコクリオボラス・サティバス (*Cochliobolus sativus*) (分生子形態: ドレクスレラ (*Drechslera*)、異名: ヘルミントスポリウム (*Helminthosporium*))、コクリオボラス・ミヤベアヌス (*Cochliobolus miyabeanus*) ; コレトトリカム属種 (*Colletotrichum species*)、例えばコレトトリカム・リンデムタニウム (*Colletotrichum lindemuthianum*) ; シクロコニウム属種 (*Cycloconium species*)、例えばシクロコニウム・オレアギナム (*Cycloconium oleaginum*) ; ディアポルテ属種 (*Diaporthe species*)、例えばディアポルテ・シトリ (*Diaporthe citri*) ; エルシノエ属種 (*Elsinoe species*)、例えばエルシノエ・ファウセッチイ (*Elsinoe fawcettii*) ; グロエオスポリウム属種 (*Gloeosporium species*)、例えばグロエオスポリウム・ラエチコロール (*Gloeosporium laeticolor*) ; グロメラ属種 (*Glomerella species*)、例えばグロメラ・シングラータ (*Glomerella cingulata*) ; グイグナルディア属種 (*Guignardia species*)、例えばグイグナルディア・ビドウェリ (*Guignardia bidwelli*) ; レプトスファエリア属種 (*Leptosphaeria species*)、例えばレプトスファエリア・マクランズ (*Leptosphaeria maculans*)、レプトスファエリア・ノドラム (*Leptosphaeria nodorum*) ; マグナポルテ属種 (*Magnaporthe species*)、例えばマグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) ; マルソニア属種 (*Marssonina species*)、例えばマルソニア・コロナリア (*Marssonina coronaria*) ; ミクロドキウム属種 (*Microdochium species*)、例えばミクロドキウム・ニバレ (*Microdochium nivale*) ; ミコスフェレラ属種 (*Mycosphaerella species*)、例えばミコスフェレラ・グラミニコラ (*Mycosphaerella graminicola*)、M. アラキジコラ (*M. arachidicola*) および M. フィジエンシス (*M. fijiensis*) ; ファエオスフェリア属種 (*Phaeosphaeria species*)、例えばファエオスフェリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*) ; ピレノフォラ属種 (*Pyrenophora species*)、例えばピレノフォラ・テレス (*Pyrenophora teres*)、ピレノフォラ・トリチシ・リペンティス (*Pyrenophora tritici repentis*) ; ラムラリア属種 (*Ramularia species*)、例えばラムラリア・コロージグニ (*Ramularia collo-cygni*)、ラムラリア・アレオラ (*Ramularia areola*) ; リンコスポリウム属種 (*Rhynchosporium species*)、例えばリンコスポリウム・セカリス (*Rhynchosporium secalis*) ; セプトリア属種 (*Septoria species*)、例えばセプトリア・アピイ (*Septoria api*)、セプト

10

20

30

40

50

リア・リコベルシイ (*Septoria lycopersii*) ; チフラ属種 (*Typhula species*)、例えばチフラ・インカルナタ (*Typhula incarnata*) ; ベンツリア属種 (*Venturia species*)、例えばベンツリア・イナエカリス (*Venturia inaequalis*) ;

例えば以下のものにより引き起こされる根および茎の病害、コルシキウム属種 (*Corticium species*)、例えばコルシキウム・グラミネアルム (*Corticium graminearum*) ; フサリウム属種 (*Fusarium species*)、例えばフサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) ; ゲウマノミセス属種 (*Gaeumannomyces species*)、例えばゲウマノミセス・グラミニス (*Gaeumannomyces graminis*) ; リゾクトニア属種 (*Rhizoctonia species*)、例えばリゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*) ; 例えばサロクラジウム・オリゼ (*Sarocladium oryzae*) により引き起こされるサロクラジウム病 ; 例えばスクレロチウム・オリゼ (*Sclerotium oryzae*) により引き起こされるスクレロチウム病 ; タペシア属種 (*Tapesia species*)、例えばタペシア・アクフォルミス (*Tapesia acuformis*) ; チエラビオブシス属種 (*Thielaviopsis species*)、例えばチエラビオブシス・バシコラ (*Thielaviopsis basicola*) ;

例えば以下のものに引き起こされる穂および円錐花序の病害 (トウモロコシ穂軸を含める。) 、アルテルナリア属種 (*Alternaria species*) 例えば、アルテルナリア種 (*Alternaria spp.*) ; アスペルギルス属種 (*Aspergillus species*)、例えばアスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*) ; クラドスポリウム属種 (*Cladosporium species*)、例えばクラドスポリウム・クラドスポリオイデス (*Cladosporium cladosporioides*) ; クラビセプス属種 (*Claviceps species*)、例えばクラビセプス・プルプレア (*Claviceps purpurea*) ; フサリウム属種 (*Fusarium species*)、例えばフサリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*) ; ジベレラ属種 (*Gibberella species*)、例えばジベレラ・ゼアエ (*Gibberella zeae*) ; モノグラフェラ属種 (*Monographella species*)、例えばモノグラフェラ・ニバリス (*Monographella nivalis*) ; セプトリア属種 (*Septoria species*)、例えばセプトリア・ノドルム (*Septoria nodorum*) ;

例えば以下のものなどの黒穂菌類により引き起こされる病害、スファセロテカ属種 (*Phacelotheca species*)、例えばスファセロテカ・レイリアナ (*Phacelotheca reiliana*) ; チレチア属種 (*Tilletia species*)、例えばチレチア・カリエス (*Tilletia caries*)、*T. controversa* ; ウロシスティス属種 (*Urocystis species*)、例えばウロシスティス・オックルタ (*Urocystis occulta*) ; ウスティラゴ属種 (*Ustilago species*)、例えばウスティラゴ・ヌダ (*Ustilago nuda*)、*U. nuda tritici* ;

例えば以下のものにより引き起こされる果実腐敗、アスペルギルス属種 (*Aspergillus species*)、例えばアスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*) ; ボトリティス属種 (*Botrytis species*)、例えばボトリティス・シネリア (*Botrytis cinerea*) ; ペニシリウム属種 (*Penicillium species*)、例えばペニシリウム・エキスパンスム (*Penicillium expansum*) および *P. purpurogenum* ; スクレロチニア属種 (*Sclerotinia species*)、例えばスクレロチニア・スクレロチオラム (*Sclerotinia scleroti*

10

20

30

40

50

orum) ; パーティシリウム属種 (Verticillium species)、例えばパーティシリウム・アルボアトルム (Verticillium alboatrum) ;

例えば以下のものにより引き起こされる種子および土壌媒介性の腐敗、カビ、萎凋、腐敗および苗立ち枯れ病、アルテルナリア属種 (Alternaria species)、例えばアルテルナリア・ブラシキコラ (Alternaria brassicicola) ; アファノミセス属種 (Aphanomyces species)、例えばアファノミセス・エウテイケス (Aphanomyces euteiches) により引き起こされる ; アスコキタ属種 (Ascochyta species)、例えばアスコキタ・レンティス (Ascochyta lentis) により引き起こされる ; アスペルギルス属種 (Aspergillus species)、例えばアスペルギルス・フラブス (Aspergillus flavus) により引き起こされる ; クラドスポリウム属種 (Cladosporium species)、例えばクラドスポリウム・ヘルバルム (Cladosporium herbarum) により引き起こされる ; コクリオボルス属種 (Cochliobolus species)、例えばコクリオボルス・サチブス (Cochliobolus sativus)、(分生子形態: ドレクスレラ (Drechslera)、ビポラリス (Bipolaris) 異名: ヘルミントスポリウム (Helminthosporium)) により引き起こされる ; コレトトリカム属種 (Colletotrichum species)、例えばコレトトリカム・コッコデス (Colletotrichum coccodes) により引き起こされる ; フサリウム属種 (Fusarium species)、例えばフサリウム・クルモルム (Fusarium culmorum) により引き起こされる ; ジベレラ属種 (Gibberella species)、例えばジベレラ・ゼアエ (Gibberella zeae) により引き起こされる ; マクロフォミナ属種 (Macrophomina species)、例えばマクロフォミナ・ファゼオリナ (Macrophomina phaseolina) により引き起こされる ; モノグラフェラ属種 (Monographella species)、例えばモノグラフェラ・ニバリス (Monographella nivalis) により引き起こされる ; ペニシリウム属種 (Penicillium species)、例えばペニシリウム・エキスパンスム (Penicillium expansum) により引き起こされる ; フォーマ属種 (Phoma species)、例えばフォーマ・リンガム (Phoma lingam) により引き起こされる ; フォモプシス属種 (Phomopsis species)、例えばフォモプシス・ソイヤエ (Phomopsis sojae) により引き起こされる ; フィトフトラ属種 (Phytophthora species)、例えばフィトフトラ・カクトルム (Phytophthora cactorum) により引き起こされる ; ピュレノフォラ属種 (Pyrenophora species)、例えばピュレノフォラ・グラミネア (Pyrenophora graminea) により引き起こされる ; ピリクラリア属種 (Pyricularia species)、例えばピリクラリア・オリゼ (Pyricularia oryzae) により引き起こされる ; ピシウム属種 (Pythium species)、例えばピシウム・ウルティムム (Pythium ultimum) により引き起こされる ; リゾクトニア属種 (Rhizoctonia species)、例えばリゾクトニア・ソラニ (Rhizoctonia solani) により引き起こされる ; リゾプス属種 (Rhizopus species)、例えばリゾプス・オリゼ (Rhizopus oryzae) により引き起こされる ; スクレロチウム属種 (Sclerotium species)、例えばスクレロチウム・ロルフシイ (Sclerotium rolfii) により引き起こされる ; セプトリア属種 (Septoria species)、例えばセプトリア・ノドルム (Septoria nodorum) により引き起こされる ; テュブラ属各種 (Typhula species)、例えばテュブラ・インカルナタ (Typhula incarnata) により引き起こされる ; ウェルティキッリウム属各種 (Verticillium species)、例え

10

20

30

40

50

ばウェルティキッリウム・ダリアエ (*Verticillium dahliae*) により引き起こされる；

例えばネクトリア属種 (*Nectria species*)、例えばネクトリア・ガリゲナ (*Nectria galligena*) により引き起こされるがん腫病、虫こぶおよびてんぐ巣病、；

例えばモニリニア属種 (*Monilinia species*)、例えばモニリニア・ラクサ (*Monilinia laxa*) により引き起こされる萎凋、；

例えば、エクソバシディウム属種 (*Exobasidium species*)、例えばエクソバシディウム・ベクサンス (*Exobasidium vexans*) により引き起こされる葉のブリストーまたはリーフカール病害、；

タフリナ属種 (*Taphrina species*)、例えばタフリナ・デフォルマンズ (*Taphrina deformans*) ；

例えば以下のものにより引き起こされる木本植物の衰退性病害、例えばパエモニエラ・クラミドスポラ (*Phaemoniella clamydospora*)、パエオアクレモニウム・アレオピルム (*Phaeoacremonium aleophilum*) およびフォミチポリア・メジテラネア (*Fomitiporia mediterranea*) により引き起こされるエスカ病；ユーティパ・ラタ (*Eutypa lata*) によって引き起こされるユーティパダイバック (*Eutypa dyeback*) ；ガノデルマ・ボニネン (*Ganoderma boninense*) によって引き起こされる霊芝病；例えばリジドポルス・リグノサス (*Rigidoporus lignosus*) によって引き起こされるリジドポラス病；

例えばボトリティス属種 (*Botrytis species*)、例えばボトリティス・シネリア (*Botrytis cinerea*) により引き起こされる花および種子の病害、；

例えば以下のものにより引き起こされる塊茎の病害、リゾクトニア属種 (*Rhizoctonia species*)、例えばリゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*) ；ヘルミントスポリウム属種 (*Helminthosporium species*)、例えばヘルミントスポリウム・ソラニ (*Helminthosporium solani*) ；

例えば、プラスモディオフォラ属種 (*Plasmodiophora species*)、例えば、プラスモディオフォラ・ブラシカエ (*Plasmodiophora brassicae*) により引き起こされる根こぶ、；

例えば以下のものなどの細菌性病原体により引き起こされる病害、キサントモナス属種 (*Xanthomonas species*)、例えばキサントモナス・カンペストリス・パソバー・オリゼ (*Xanthomonas campestris pv. oryzae*) ；シュードモナス属種 (*Pseudomonas species*)、例えばシュードモナス・シリング・パソバー・ラクリマンズ (*Pseudomonas syringae pv. lachrymans*) ；エルウィニア属種 (*Erwinia species*)、例えばエルウィニア・アミロボーラ (*Erwinia amylovora*) 。

【0095】

以下の大豆の病害を優先的に防除することができる：

例えば、以下のものにより引き起こされる、葉、莖、さやおよび種子における真菌性病害、アルテルナリア斑点病 (アルテルナリア属種アトランス・テヌイシマ (*Alternaria spec. atrans tenuissima*))、炭疽病 (コレトリカム・グロエオスポロイデス・デマチウム変種トルンカツム (*Colletotrichum gloeosporoides dematium var. truncatum*))、褐斑病 (セプトリア・グリシネス (*Septoria glycines*))、紫斑病 (セルコスポラ・キクチイ (*Cercospora kikuchii*))、コアネフォラ葉枯病 (コアネフォラ・インフンディブリフェラ・トリスポラ (*Choaneph*

10

20

30

40

50

ora infundibulifera trispora) (異名))、ダクツリオ
 フォラ斑点病 (ダクツリオフォラ・グリシネス (*Dactuliophora glycines*))、べと病 (ペロノスポラ・マンスリカ (*Peronospora manshurica*))、ドレクスレラ胴枯病 (ドレクスレラ・グリシニ (*Drechslera glycinii*))、斑点病 (セルコスボラ・ソイナ (*Cercospora sojae*))、そばかす病 (レプトスファエルリナ・トリフォリイ (*Leptosphaerulina trifolii*))、灰星病 (フィロスチクタ・ソジャエコラ (*Phyllosticta sojaecola*))、黒点病 (フォモプシス・ソジャエ (*Homopsis sojae*))、うどんこ病 (ミクロスファエラ・ディフサ (*Microsphaera diffusa*))、ピレノカエタ斑点病 (ピレノカエタ・グリシネス (*Pyrenochaeta glycines*))、葉腐病 (リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*))、さび病 (ファコプソラ・パキリジ (*Phakopsora pachyrhizi*))、ファコプソラ・メイボミアエ (*Phakopsora meibomiaae*))、黒星病 (スファセロマ・グリシネス (*Sphaceloma glycines*))、ステムフィリウム葉枯病 (ステムフィリウム・ボトリオスム (*Stemphylium botryosum*))、褐色輪紋病 (コリネスボラ・カッシコラ (*Corynespora cassiicola*))。

【0096】

例えば以下のものに引き起こされる根および茎基部における真菌性病害、黒根腐病 (カ
 ロネクトリア・クロタラリアエ (*Calonectria crotalariae*))、炭腐病 (マクロフォミナ・ファゼオリナ (*Macrophomina phaseolina*))、赤かび病 (フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*))、フサリウム・オルトセラ (*Fusarium orthoceras*)、フ
 サリウム・セミテクタム (*Fusarium semitectum*)、フサリウム・エ
 クイセチ (*Fusarium equiseti*)、ミコレプトジスクス根腐病 (ミュ
 コレプトジスカス・テレストリス (*Mycoleptodiscus terrestris*))、根腐病 (ネオコスモスポラ・バシンフェクタ (*Neocosmospora vasinfecta*))、黒点病 (ディアポルテ・パセオロルム (*Diaporthe phaseolorum*))、茎腐爛病 (ディアポルテ・ファセオロルム・変種カウリ
 ボラ (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*))、茎疫病 (フィトフトラ・メガスペルマ (*Phytophthora megasperma*))、落葉病 (ピアロファオラ・グレガタ (*Phialophora gregata*))、根茎腐敗病 (ピシウム・アフアニデルマトム (*Pythium aphanidermatum*))、ピシウム・イッレグラレ (*Pythium irregulare*)、ピシウム・デバリアヌム (*Pythium debaryanum*)、ピシウム・ミリオチルム (*Pythium myriotylum*)、ピシウム・ウルティムム (*Pythium ultimum*))、リゾクトニア根腐病 (リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*))、菌核病 (スクレロチニア・スクレロチオルム (*Sclerotinia sclerotiorum*))、スクレロチニアサウザンブライ
 ト病 (スクレロチニア・ロールフシイ (*Sclerotinia rolfsii*))、チエ
 ラビオプシス根腐病 (ティエラウィオプシス・バシコラ (*Thielaviopsis basicola*))。

【0097】

本発明の殺真菌性組成物は、植物病原性真菌の治癒的または防御的／予防的防除に使用
 することができる。したがって、本発明はまた、種子、植物もしくは植物部分、果実また
 は植物が成長する土壤に施用される本発明の組成物の使用によって植物病原性真菌を防除
 するための治癒的および防御的方法に関する。

【0098】

組成物が、植物病害を防除するために必要な濃度で植物に十分耐容されているという事
 実、植物の地上部分、繁殖ストックおよび種子および土壤の処理を可能にする。

【0099】

本発明によれば、栽培品種および植物品種（植物品種または植物育種者の権利によって保護可能であるか否かにかかわらず）を含む、すべての植物および植物部分を処理することができる。栽培品種および植物品種は、倍加半数体、プロトプラスト融合体、ランダムおよび指向性突然変異誘発、分子または遺伝子マーカーの使用による、または生物工学および遺伝子工学による、1または複数のバイオテクノロジー方法によって支援または補完できる従来の増殖および育種法によって得られる植物であり得る。

【0100】

特定の態様において、本発明の組成物は、約 1×10^8 ～約 1×10^{14} コロニー形成単位（CFU）の殺真菌性パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株／ヘクタールで施用される。他の態様において、本発明の組成物は、約 1×10^9 ～約 1×10^{13} コロニー形成単位（CFU）の殺真菌性パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株／ヘクタールで施用される。さらに他の態様において、本発明の組成物は、約 1×10^{10} ～約 1×10^{12} コロニー形成単位（CFU）の殺真菌性パエニバチルス種NRRL B-50972株またはこの殺真菌性突然変異株／ヘクタールで施用される。

【0101】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、約0.1kg～約10kgの発酵固形分／ヘクタールで施用される。他の実施形態において、本発明の組成物は、約0.25kg～約7.5kgの発酵固形分／ヘクタールで施用される。さらに他の実施形態において、本発明の組成物は、約0.5kg～約5kgの発酵固形分／ヘクタールで施用される。本発明の組成物は、約1kgまたは約2kgの発酵固形分／ヘクタールで施用することもできる。

【0102】

本発明の組成物は、植物が良好な耐容性を示す場合、好都合な恒温毒性を有し、環境に十分認容性であり、植物および植物器官を保護し、収穫高を向上させ、収穫した材料の品質を改善するのに適している。本発明の組成物は、好ましくは、作物保護組成物として使用することができる。それらは、通常の高感受性の高い種および耐性の種に対して、ならびに発達の全段階またはいくつかの段階に対して活性である。

【0103】

本発明に従って処理可能な植物としては、下記の主要な作物が挙げられる：トウモロコシ、大豆、アルファルファ、綿、ヒマワリ、ブラシカ・ナプス（*Brassica napus*）（例えばキャノーラ、ナタネ）、ブラシカ・ラパ（*Brassica rapa*）、B.ジャンクア（*B. juncea*）例えば、（菜の花、カラシナ）およびブラシカ・カリナタ（*Brassica carinata*）などのアブラナ属（*Brassica*）油種子、ヤシ科種（*Arecaceae* sp.）（アブラヤシ、ココナッツ）、米、コムギ、テンサイ、サトウキビ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、キビおよびモロコシ、ライコムギ、亜麻、ナッツ、ブドウおよびブドウの木および種々の植物分類群、例えば、ロサケアエ属種（*Rosaceae* sp.）からのさまざまな果実および野菜（例えば、リンゴおよびナシのような仁果類だけでなく、アンズ、サクランボ、アーモンド、プラムおよび桃などの核果類、ならびにイチゴ、ラズベリー、レッドカーラントラントおよびブラックカーラントならびにグーズベリーなどのベリー果実）、リベシオイダエ属種（*Ribesioideae* sp.）、ユグランダセアエ属種（*Juglandaceae* sp.）、ベトウラセアエ属種（*Betulaceae* sp.）、アナカルディアセアエ属種（*Anacardiaceae* sp.）、ファガセアエ属種（*Fagaceae* sp.）、モラセアエ属種（*Moraceae* sp.）、オレアセアエ属種（*Oleaceae* sp.）（例えばオリーブの木）、アクティニダケアエ属種（*Actinidaceae* sp.）、ラウラセアエ属種（*Lauraceae* sp.）（例えばアボカド、シナモン、ショウノウ）、ムサセアエ属種（*Musaceae* sp.）（例えば、バナナの木およびバナナプランテーション）、ルビアセアエ属種（*Rubiaceae* sp.）（例えば、コーヒーの木）。

eae sp.) (例えば、コーヒー)、テアセアエ属種 (Theaceae sp.) (例えば茶)、ステルクリセアエ属種 (Sterculiaceae sp.)、ルタセアエ属種 (Rutaceae sp.) (例えば、レモン、オレンジ、マンダリンおよびグレープフルーツ) ; ソラナセアエ属種 (Solanaceae sp.) (例えば、トマト、ジャガイモ、ペッパー、トウガラシ、ナス、タバコ)、リリアセアエ属種 (Liliaceae sp.)、コンポジタエ属種 (Compositae sp.) (例えば、レタス、アーティチョークおよびチコリ、例えばルートチコリ、エンダイブおよび一般的チコリ)、ウムベリフェラエ属種 (Umbelliferae sp.) (例えば、ニンジン、パセリ、セロリおよび根用セロリ)、ククルビタケアエ属種 (Cucurbitaceae sp.) (例えば、キュウリ、例えば、ガーキン、カボチャ、スイカ、ヒョウタンおよびメロン)、アッリアケアエ属種 (Alliaceae sp.) (例えば、ニラネギおよびタマネギ)、クルキフェラエ属種 (Cruciferae sp.) (白キャベツ、赤キャベツ、ブロッコリ、カリフラワー、芽キャベツ、チンゲンサイ、コールラビ、ダイコン、ホースラディッシュ、クレスおよびハクサイ)、レグミノサエ属種 (Leguminosae sp.) (例えば、ピーナッツ、エンドウ豆、レンズ豆および豆類、例えばインゲン豆およびソラ豆)、ケノポディアケアエ属種 (Chenopodiaceae sp.) (例えば、スイス・チャード、飼料用ビート、ハウレンソウ、ビートルート)、亜麻科 (Linaceae sp.) (例えば麻)、アサ科 (Cannabaceae sp.) (例えば大麻)、アオイ科 (Malvaceae sp.) (例えばオクラ、ココア)、パパビリセワエ (Papaveraceae) (例えばケシ)、アスパラガセアエ (Asparagaceae) (例えば、アスパラガス) ; および芝草、芝生、草を含む庭および森林の有用植物および観賞植物およびステビア・レバウディアナ (Stevia rebaudiana) ; ならびにいずれの場合もこれらの植物の遺伝子改変型。

【0104】

特定の態様において、発酵産物は、さらに、製剤成分を含む。製剤成分は、湿潤剤、増量剤、溶媒、自発性促進剤、乳化剤、分散剤、霜防止剤、増粘剤、および／またはアジュバントであってよい。一実施形態において、製剤成分は湿潤剤である。他の態様において、発酵産物は、凍結乾燥粉末または噴霧乾燥粉末である。

【0105】

本発明の組成物は、回復、効力または物理的特性を改善するために、および／または加工、包装および投与を助けるために、本発明の組成物に添加される製剤成分を含み得る。このような製剤成分は、個別にまたは組み合わせて添加することができる。

【0106】

製剤成分は、効力、安定性および物理的特性、有用性を改善するために、および／または加工、包装および最終用途への適用を容易にするために、細胞、無細胞調製物、単離化合物および／または代謝産物を含む組成物に添加することができる。このような製剤成分は、農業的に許容される担体、不活性成分、安定剤、防腐剤、栄養素または物理的特性改変剤を含み得、個別にまたは組み合わせて添加することができる。いくつかの実施形態において、担体としては、水、油、および他の有機または無機溶媒などの液体材料、ならびに生物学的または化学合成によって誘導された無機物、ポリマーまたはポリマー複合体などの固体材料を挙げることができる。いくつかの実施形態において、製剤成分は、葉、種子、または根などの植物部分への組成物の付着を促進する結合剤、アジュバント、または接着剤である。例えば、Taylor, A. G., et al., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments," Annu. Rev. Phytopathol., 28:321-339 (1990) を参照されたい。安定剤は、固結防止剤、抗酸化剤、沈降防止剤、消泡剤、乾燥剤、保護剤または防腐剤を含み得る。栄養素は、糖、多糖、油、タンパク質、アミノ酸、脂肪酸およびリン酸などの炭素、窒素、およびリン源を含むことができる。物理的特性改変剤としては、増量剤、湿潤剤、増粘剤、pH調整剤、レオロジー調整剤、分散剤、アジ

ュバント、界面活性剤、フィルム形成剤、ヒドロトロップ、ビルダー、不凍剤または着色剤を挙げることができる。いくつかの実施形態において、発酵により製造された細胞、無細胞調製物および／または代謝産物を含む組成物は、他の製剤調製なしに希釈剤として水と共にまたは水なしで直接使用することができる。特定の実施形態において、凍結乾燥粉末または噴霧乾燥粉末などの発酵固形物に、湿潤剤または分散剤が添加される。湿潤剤は、拡散特性および浸透特性を増加させ、または分散剤は、それが表面に適用されたときに活性成分（一度希釈された）の分散性および溶解性を増加させる。例示的な湿潤剤は、当業者に公知であり、MULTIWET（商標）MO-70R（Croda Inc.、Edison、NJ）などのスルホコハク酸塩および誘導体；BREAK-THRU（登録商標）（Evonik、Germany）などのシロキサン；ATLOX（商標）4894（Croda Inc.、Edison、NJ）などの非イオン性化合物；TERWET（登録商標）3001（Huntsman International LLC、The Woodlands、Texas）などのアルキルポリグルコシド；TERGITOL（登録商標）15-S-15（The Dow Chemical Company、Midland、Michigan）などのC12-C14アルコールエトキシレート；RHODAFAC（登録商標）BG-510（Rhodia、Inc.）などのリン酸エステル；ならびにEMULSOGEN（商標）LS（Clariant Corporation、North Carolina）などのアルキルエーテルカルボキシレートが挙げられる。

【0107】

寄託情報

本発明のパエニバチルス種株の試料は、米国農業研究センター（National Center for Agricultural Utilization Research、Agricultural Research Service、U. S. Department of Agriculture（NRRL）、1815 North University Street、Peoria、IL 61604、USA）にある農業研究サービスカルチャーコレクションに寄託され、2014年8月28日にブダペスト条約の下、以下の受託番号：NRRL B-50972を割り当てられている。

【0108】

安定したコロニー形態を示すパエニバチルス種NRRL B-50972株由来のパエニバチルス種の試料は、米国農業研究センター（National Center for Agricultural Utilization Research、Agricultural Research Service、U. S. Department of Agriculture（NRRL）、1815 North University Street、Peoria、IL 61604、USA）にある農業研究サービスカルチャーコレクションに寄託され、2015年9月1日にブダペスト条約の下で寄託され、以下の受託番号：NRRL B-67129が割り当てられている。

【0109】

パエニバチルス種株は、本特許出願の係属中に、特許商標庁の長官が37 C. F. R. § 1.14および35 U. S. C. § 122に基づき権利を有すると決定したもののへのアクセスが確保されることを保証する条件下で寄託されている。しかし、寄託物の入手可能性は、政府の行為によって付与された特許権を逸脱して本発明を実施するためのライセンスを構成するものではないことを理解されたい。

【0110】

以下の実施例は、単に本発明の例示的かつ非限定的な目的のために提供される。

【0111】

[実施例]

実施例1. パエニバチルス種NRRL B-50972の選択

いくつかのパエニバチルス種株のゲノムを配列決定した。ゲノムデータを分析して、フサリジニン生合成遺伝子クラスターを有するが、ポリミキシンシンテターゼ遺伝子クラス

10

20

30

40

50

ターを欠く菌株を同定した。フサリシジン生合成に関与する遺伝子クラスター (fusA) は、以前にポリミキシンシンテターゼ遺伝子クラスターを有することが同定され、特徴付けられていた。例えば、Li et al., "Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 Involves Direct Activation of a D-Amino Acid," *Chemistry & Biology*, 15:118-127 (2008); Li et al., "Promoter Analysis and Transcription Regulation of fus Gene Cluster Responsible for Fusaricidin Synthesis of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21," *Applied Microbiol Biotechnol*, 97:9479-9489 (2013); and Choi et al., "Identification of a Polymyxin Synthetase Gene Cluster of *Paenibacillus polymyxa* and Heterologous Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*," *Journal of Bacteriology*, 191(10):3350-3358 (2009) を参照されたい。

【0112】

この分析で同定された菌株をさらに評価して、フサリシジン産生を確認した。簡潔に述べると、各菌株を大豆ベースの培地で培養し、ブロス全体の親油性画分を抽出した。全ブロス抽出物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析し、フサリシジンAの存在を、フサリシジンAを含有する標準試料で生成されたHPLCプロファイルに基づいて同定した。

【0113】

実施例2. 植物体におけるパエニバチルス種株の全ブロスの抗真菌活性

パエニバチルス種NRRL B-50972株を含む選択されたパエニバチルス種株を、大豆ベースの培地中で増殖させて、全ブロス培養物を生成した。蒸留水を全ブロスの各々に添加して10%最終希釈液を作製した。

【0114】

希釈された全ブロスを若い植物の葉に施用し、次いでトマト疫病 (PHYTIN)、灰色かび病 (BOTRCI)、またはコムギ葉さび病 (PUCCRT) の真菌接種物に曝露した。各アッセイにおいて比較の目的で、未処理対照を含めた。真菌接種物に曝露して数日後、各植物を、未処理の対照植物と比較して病原体の防除パーセントについてスコア化した。各処理を3回反復して、図1に示される各パエニバチルス種株の全ブロスを用いて平均防除パーセントを評価した。

【0115】

PHYTIN、BOTRCIおよびPUCCRTに対する抗真菌活性について試験した23株のうち、パエニバチルス種NRRL B-50972株は、3種すべての真菌病原体に対して比較的高いレベルの活性を有する数少ない菌株の1つであった。

【0116】

実施例3. パエニバチルスNRRL B-50972株のフサリシジン抽出物のインビトロにおける生物学的効力

パエニバチルス種NRRL B-50972を含むいくつかのパエニバチルス種株の全ブロス培養物を、大豆ベースの培地を用いて調製した。フサリシジンを含む親油性画分を全ブロスから抽出した。さまざまなフサリシジンおよび抗真菌代謝産物を含有する3つの別々の画分 (すなわち、画分1、画分2および画分3) を、最初のパエニバチルス種株由来の全ブロスから抽出した。パエニバチルス種NRRL B-50972株由来の抽出物はさらには分離しなかった。

【0117】

各菌株由来のフサリシジン含有画分を以下の12種の真菌病原体に対して試験した：ア

ルテルナリア・アルテルナータ (ALTEAL)、ボトリティス・シネリア (BOTRCI)、フサリウム・クルモルム (FUSACU)、ファエオスフェリア・ノドラム (LEPTNO)、ジモセプトリア・トリシチ (SEPPTR)、フィトフトラ・クリプトゲア (PHYTCR)、フィトフトラ・インフェスタンス (PHYTIN)、ピシウム・ウルティムム (PYTHUL) マグネポルテ・オリゼ (PYRIOR)、タナテフォルス・ククメリス (RHIIZSO)、ウスチラゴ・セゲツム変種アベナエ (Ustilago segetum var. avenae) (USTIAV)、およびウロミセス・アペンジクラツス (UROMAP)。さまざまな画分による真菌細胞増殖の阻害を、大豆ベースの培地で評価し、未処理対照の増殖と比較した。各画分の8回の投与量を0.005 ppm～100 ppmの範囲で試験した。50%阻害 (ED₅₀) および80%阻害 (ED₈₀) を生じる有効用量を図2の表に報告する。

10

【0118】

パエニバチルス種NRRL B-50972株のフサリシジン含有画分は、他のパエニバチルス種株由来の画分では観察されなかった、12のアッセイにわたる広域スペクトルの抗真菌活性を示した。パエニバチルス種NRRL B-50972株の画分もまた、他のパエニバチルス種株由来の画分で観察されたものよりも、このアッセイにおいてはるかに大きな活性を示した (図2参照)。

【0119】

実施例4. フィトフトラに感染したトマトのインビトロ予防試験

この植物病原体温室アッセイでは、パエニバチルス種NRRL B-50972株の発酵産物を試験し、先のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した他の3種のパエニバチルス種と比較した。この化合物の適切な調製物を製造するために、大豆培地中で培養した各菌株由来の全ブロスの噴霧乾燥粉末1重量部を、水および0.1重量部の乳化剤 (アルキルアリアルポリグリコールエーテル) と混合し、続いて水で希釈して所望の濃度にした。

20

【0120】

予防活性を試験するために、若い植物に化合物調製物を記載された施用率で噴霧した。噴霧コーティングを乾燥させた後、植物にフィトフトラ・インフェスタンス (Phytophthora infestans) の水性孢子懸濁液を接種した。次いで、植物を約20℃および相対大気湿度100%のインキュベーションキャビネットに置いた。

30

【0121】

接種の3日後に試験を評価した。0%は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は、病害が観察されないことを意味する。

【表2】

表2: フィトフトラ (トマト) に対するインビボ予防試験

化合物	全ブロスの施用量 ppm	効力 %
パエニバチルス種 NRRL B-50972	10,000	70
パエニバチルス種X株	10,000	63
パエニバチルス種Y株	10,000	70
パエニバチルス種Z株	10,000	68

40

【0122】

実施例5. プラスモパラ (Plasmopara) に感染したブドウの木のインビボ予防試験

この植物病原体温室アッセイでは、パエニバチルス種NRRL B-50972株の発酵産物を試験し、先のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した他

50

の3種のパエニバチルス種と比較した。この化合物の適切な製剤を製造するために、実施例5に記載のように調製した噴霧乾燥粉末1重量部を、水および0.1重量部の乳化剤（アルキルアリアルポリグリコールエーテル）と混合し、続いて水で希釈して所望の濃度にした。

【0123】

予防活性を試験するために、若い植物に化合物調製物を記載された施用率で噴霧した。噴霧コーティングを乾燥させた後、プラスモパラ・ビチコラ（*Plasmopara viticola*）の水性孢子懸濁液を植物に接種し、次いで約20℃および相対大気湿度100%のインキュベーションキャビネット内に1日間放置した。続いて、植物を約21℃および相対大気湿度約90%の温室内に4日間置いた。次いで、植物に霧を吹きかけ、インキュベーションキャビネット中に1日間置いた。

【0124】

接種6日後に試験を評価した。0%は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は、病害が観察されないことを意味する。

【表3】

表3: プラスモパラ (*Plasmopara*) に対するインビボ予防試験 (ブドウの木)

化合物	全ブロスの施用量 ppm	効力 %
パエニバチルス種 NRRL B-50972	10,000	93
パエニバチルス種X株	10,000	46
パエニバチルス種Y株	10,000	62
パエニバチルス種Z株	10,000	78

【0125】

実施例6. ウロミセスに感染した豆に対するインビボ予防試験

この植物病原体温室アッセイでは、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株の発酵産物を試験し、先のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した他の3種のパエニバチルス種と比較した。この化合物の適切な製剤を製造するために、実施例5に記載のように調製した噴霧乾燥粉末1重量部を、水および0.1重量部の乳化剤（アルキルアリアルポリグリコールエーテル）と混合し、続いて水で希釈して所望の濃度にした。

【0126】

予防活性を試験するために、若い植物に化合物調製物を記載された施用率で噴霧した。噴霧コーティングを乾燥させた後、植物にマメさび病の原因物質（ウロミセス・アペンジクラツス（*Uromyces appendiculatus*））の水性孢子懸濁液を接種し、約20℃および相対大気湿度100%のインキュベーションキャビネット内に1日間放置した。

【0127】

次いで、植物を約21℃および相対大気湿度約90%の温室内に置いた。

【0128】

接種の10日後に試験を評価した。0%は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は、病害が観察されないことを意味する。

10

20

30

40

50

【表 4】

表4:ウロミセス (Uromyces) (豆)に対するインビボ予防試験

化合物	全ブロスの施用量 ppm	効力 %
パエニバチルス種 NRRL B-50972	10,000	85
パエニバチルス種X株	10,000	50
パエニバチルス種Y株	10,000	40
パエニバチルス種Z株	10,000	40

10

【 0 1 2 9 】

実施例 7. うどんこ病菌 (スパエロテカ・フリギネア (Sphaerotheca fuliginea)) に感染したズッキーニ野外試験におけるパエニバチルス属株の比較
 スパエロテカ・フリギネアを人工的に接種したズッキーニの 2 回の野外試験を実施した。
 5 回の処理は、大豆ベースの培地で培養した各パエニバチルス種株由来の全ブロスの噴霧乾燥粉末を水に再懸濁し、1000 L / ha の施用量で、表 6 に概略を示したように、
 BBCH 59 ~ BBCH 72 の成長段階で 4 ~ 8 日間隔で 7 月 15 日 ~ 8 月 8 日の間植物
 に施用した。表 5 に示されている病害防除パーセントは、最終施用の 10 日後に行われた
 、病害症状を肉眼で観察した最後の評価の結果である。0 % は、未処置対照の効力に相当
 する効力を意味し、100 % の効力は、病害が観察されないことを意味した。

20

【表 5】

製品	投薬量 kg/ha	施用記号	病害防除 % 2 回の試験の平均
未処理対照			0
パエニバチルス種 NRRL B-50972	4	ABCDE	100
パエニバチルス種 NRRL B-50972	2	ABCDE	92
パエニバチルス種X株	4	ABCDE	59
パエニバチルス種X株	2	ABCDE	29
パエニバチルス種Y株	4	ABCDE	66
パエニバチルス種Y株	2	ABCDE	46
パエニバチルス種Z株	4	ABCDE	29
パエニバチルス種Z株	2	ABCDE	18

30

【表 6】

施用記号	施用日	成長段階
A	7月15日	59
B	7月23日	65
C	7月30日	71
D	8月4日	72
E	8月8日	72

40

50

【0130】

表4の結果は、パエニバチルス種NRRL B-50972株の観察された活性が、以前のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した、この野外試験で試験した他の菌株と比較して優れていることを明らかに示している。

【0131】

実施例8．うどんこ病（ウンシヌラ・ネクトル（*Uncinula Necator*））に感染したブドウの木の野外試験におけるパエニバチルス株の比較

ウンシヌラ・ネクトルに自然感染したブドウの木による2回の野外試験が実施された。6回の処理は、実施例8に記載の噴霧乾燥粉末を水に再懸濁し、1000L/haの施用量で、6月3日～7月1日の間にBBCH57～BBCH75の成長段階で5～7日間隔で表8に示したように植物に施用した。表7に示されている病害防除パーセントは、最終施用の15日後に行われた、病害症状を肉眼で観察した最後の評価の結果である。0％は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100％の効力は、病害が観察されないことを意味した。

【表7】

製品	投薬量 kg/ha	施用記号	病害防除 % 2回の試験の平均
未処理対照			0
パエニバチルス種 NRRL B-50972	4	ABCDEF	100
パエニバチルス種 NRRL B-50972	2	ABCDEF	100
パエニバチルス種X株	4	ABCDEF	45
パエニバチルス種X株	2	ABCDEF	28
パエニバチルス種Y株	4	ABCDEF	66
パエニバチルス種Y株	2	ABCDEF	60
パエニバチルス種Z株	4	ABCDEF	36
パエニバチルス種Z株	2	ABCDEF	25

【表8】

施用記号	施用日	成長段階
A	6月3日	57
B	6月10日	60
C	6月16日	64
D	6月21日	71
E	6月26日	73
F	7月1日	75

【0132】

表7の結果は、パエニバチルス種NRRL B-50972株の観察された活性が、以前のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した、この野外試験で試験した他の菌株と比較して優れていることを明らかに示している。

【0133】

実施例9．夏疫病（アルテルナリア・ソラニ（*Alternaria solani*））に感染したトマトの野外試験におけるパエニバチルス株の比較

アルテルナリア・ソラニを人工的に接種したトマト植物を用いた2回の野外試験を行った。3回の処理は、実施例8に記載の噴霧乾燥粉末を水に再懸濁し、1000L/haの施用量で、6月26日～7月10日の間にBBCH51～BBCH59の成長段階で6～8日間隔で表10に示したように植物に施用した。表9に示されている病害防除パーセントは、最終施用の8日後に行われた、病害症状を肉眼で観察した最後の評価の結果である。0%は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は、病害が観察されないことを意味した。

【表9】

製品	投薬量 kg/ha	施用記号	病害防除 % 2回の試験の平均
未処理対照			0
パエニバチルス種 NRRL B-50972	4	ABC	84
パエニバチルス種 NRRL B-50972	2	ABC	68
パエニバチルス種X株	4	ABC	36
パエニバチルス種X株	2	ABC	20
パエニバチルス種Y株	4	ABC	44
パエニバチルス種Y株	2	ABC	19
パエニバチルス種Z株	4	ABC	40
パエニバチルス種Z株	2	ABC	11

【表10】

施用記号	施用日	成長段階
A	6月26日	51
B	7月2日	53
C	7月10日	59

【0134】

表9の結果は、パエニバチルス種NRRL B-50972株の観察された活性が、以前のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した、この野外試験で試験した他の菌株と比較して優れていることを明らかに示している。

【0135】

実施例10．夏疫病（アルテルナリア・ソラニ（*Alternaria solani*））に感染したジャガイモの野外試験におけるパエニバチルス株の比較

アルテルナリア・ソラニを人工的に接種したジャガイモ植物を用いた1回の野外試験を行った。5回の処理は、実施例8に記載の噴霧乾燥粉末を水に再懸濁し、500L/haの施用量で、6月26日～7月19日の間にBBCH37～BBCH55の成長段階で4～8日間隔で表12に示したように植物に施用した。表11に示されている病害防除パーセントは、最終施用の6日後に行われた、病害症状を肉眼で観察した最後の評価の結果である。0%は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は、病害が観察されないことを意味した。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

製品	投薬量 kg/ha	施用記号	病害防除 %
未処理対照			0
パエニバチルス種 NRRL B-50972	4	ABCDE	80
パエニバチルス種 NRRL B-50972	2	ABCDE	71
パエニバチルス種X株	4	ABCDE	71
パエニバチルス種X株	2	ABCDE	41
パエニバチルス種Y株	4	ABCDE	61
パエニバチルス種Y株	2	ABCDE	41
パエニバチルス種Z株	4	ABCDE	41
パエニバチルス種Z株	2	ABCDE	32

10

【表 1 2】

施用記号	施用日	成長段階
A	6月26日	37
B	7月2日	47
C	7月10日	51
D	7月15日	55
E	7月19日	55

20

【0 1 3 6】

表 1 1 の結果は、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株の観察された活性が、以前のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した、この野外試験で試験した他の菌株と比較して優れていることを明らかに示している。

30

【0 1 3 7】

実施例 1 1 . 夏疫病（アルテルナリア・ソラニ（*Alternaria solani*））に感染したジャガイモの野外試験におけるパエニバチルス株の比較

アルテルナリア・ソラニを人工的に接種したジャガイモ植物を用いた 1 回の野外試験を行った。3 回の処理は、実施例 8 に記載の噴霧乾燥粉末を水に再懸濁し、500 L / ha の施用量で 7 月 24 日～8 月 5 日の間に BBCH 37～BBCH 51 の成長段階において 6 日間隔で表 1 4 に示したように植物に施用した。表 1 3 に示されている病害防除パーセントは、最終施用の 6 日後に行われた、病害症状を肉眼で観察した最後の評価の結果である。0 % は、未処置対照の効力に相当する効力を意味し、100 % の効力は、病害が観察されないことを意味した。

40

【表 1 3】

製品	投薬量 kg/ha	施用記号	病害防除 %
未処理対照			0
パエニバチルス種 NRRL B-50972	4	ABC	100
パエニバチルス種 NRRL B-50972	2	ABC	100
パエニバチルス種X株	4	ABC	74
パエニバチルス種X株	2	ABC	48
パエニバチルス種Y株	4	ABC	74
パエニバチルス種Y株	2	ABC	61
パエニバチルス種Z株	4	ABC	74
パエニバチルス種Z株	2	ABC	61

10

【表 1 4】

施用記号	施用日	成長段階
A	7月24日	37
B	7月30日	40
C	8月5日	51

20

【0 1 3 8】

表 1 3 の結果は、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株の観察された活性が、以前のスクリーニングアッセイにおいて比較的高い抗真菌活性を示した、この野外試験で試験した他の菌株と比較して優れていることを明らかに示している。

【0 1 3 9】

実施例 1 2 . パエニバチルス種 NRRL B-50972 株における fusA 変異の同定

30

パエニバチルス種 NRRL B-50972 株をさらに特徴付けるために、FusA フサリジンシンテターゼをコードする fusA 遺伝子のゲノム配列を標準的な配列決定法で決定し、関連するアミノ酸配列を同定した。パエニバチルス種 NRRL B-50972 株によって発現される FusA 由来のアミノ酸配列を、以下の刊行物に記載されているものを含むいくつかの他のパエニバチルス株のそれと比較した: Li S., et al., (2014). "Complete Genome Sequence of Paenibacillus polymyxa SQR-21, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Antifungal Activity and Rhizosphere Colonization Ability," Genome Announc, 2 (2): HASH (0x743db288); Niu B., et al., (2011). "The Genome of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Paenibacillus polymyxa M-1 Contains Nine Sites Dedicated to Nonribosomal Synthesis of Lipopeptides and Polyketides," J. Bacteriol. 193 (20): 5862-3; Ma M., et al., (2011) "Complete Genome Sequence of Paenibacillus polymyxa SC2, A Strain of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with B

40

50

road-Spectrum Antimicrobial Activity, " J. Bacteriol. 193 (1) : 311-2; and Li and Jensen, (2008). Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by Paenibacillus polymyxa PKB1 Involves Direct Activation of a d-amino Acid. Chem. Biol. 15, 118-127.

【0140】

図13に示すアラインメントは、パエニバチルス種NRRL B-50972によって発現される変異型FusAフサリシジンシンテターゼにおける有意な欠失を明らかにした。第1の欠失は、パエニバチルス種A株の対応する配列（配列番号11）の3009位から3037位に及ぶ。第2の欠失は、パエニバチルス種A株の対応する配列（配列番号11）の3047位から3317位に及ぶ。両方の欠失は、FusAフサリシジンシンテターゼの第3モジュールのAドメイン（すなわち、FusA-A3）内に入る。

10

【0141】

上に説明したように、Aドメインの各々は、基質認識および活性化に関与する10個の保存されたアミノ酸残基を含む（表1参照）。これらの保存されたアミノ酸残基を、図13に示されたアラインメントに概説する。パエニバチルス種NRRL B-50972株によって発現される変異型FusAフサリシジンシンテターゼにおいて同定された欠失は、最後の保存されたアミノ酸残基（すなわち、配列番号11の3486位のLys517）以外のすべてを除去する。

20

【0142】

変異型FusAフサリシジンシンテターゼにおけるこれら2つの欠失は、本明細書においてパエニバチルス種NRRL B-67129株と命名された安定なコロニー形態を有する変異株を含むパエニバチルス種NRRL B-50972株由来の菌株に存在する。野生型FusA-A3への復帰は広範囲に及ぶ欠失の性質のためにまず起こり得ないので、パエニバチルス種NRRL B-50972株に由来するランダム突然変異株は変異型FusA-A3においてこの欠失を一般に維持すると思われる。

【0143】

実施例13. パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種A株におけるフサリシジン産生の比較

30

変異型FusA-A3の効果を決定するために、フサリシジンおよびパエニセリンのパネルを、実施例14に記載の方法を用いてパエニバチルス種NRRL B-50972株（変異型FusA-A3を発現する）およびパエニバチルス種A株（野生型FusA-A3を発現する）で定量した。各化合物の同一性は、その固有の保持時間および質量によって決定した。スペクトルにおける各ピークの相対シグナル強度を表15に示す。精製された標準物質がない場合、絶対定量は不可能であった。しかし、同様の量の各細胞抽出物を注入し、化合物の相対量を得られたシグナル強度から推定することができる。

40

【表 15】

化合物	RT	質量	NRRL B-50972	A株
フサリシジンC	10.35	946.6	0	226457229
フサリシジンD	10.43	960.6	0	116424723
パエニセリン A1	11.00	868.5	208029	0
パエニセリン B1	11.22	868.5	871001	317056
フサリシジンB	13.23	896.6	9840703	461022017
フサリシジンA	13.27	882.6	28024006	794055383
LiF05b	16.56	910.6	9978253	145941253
LiF05a	16.64	896.6	33071793	280586192
LiF06a	17.96	896.6	6594451	11862306
LiF06b	17.99	910.6	1600867	7441646
LiF07b	18.10	944.6	0	263137626
LiF07a	18.12	930.6	0	522229025
LiF08b	19.68	924.6	3546312	47167630
LiF08a	19.71	910.6	20378028	75820378

10

20

【0144】

野生型 *FusA* フサリシジンシンテターゼにおいて、*FusA-A3* はアミノ酸位置（3）のフサリシジン化合物に *L-Tyr*、*L-Phe*、*L-Val*、*L-Ile* または *L-allo-Ile* を組み込む役割を果たす（表1参照）。パエニバチルス種 NRRL B-50972 株における変異型 *FusA-A3* は、検出可能なフサリシジンC、フサリシジンD、*LiF07a*、または *LiF07b* を含まない抽出物をもたらした。フサリシジンCおよびフサリシジンDは両方ともアミノ酸位置（3）にチロシンを有し、*LiF07a* および *LiF07b* は両方ともアミノ酸位置（3）にフェニルアラニンを有する。これらの実験データは、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株によって発現される *FusA-A3* の遺伝子変異が、アミノ酸位置（3）にチロシンまたはフェニルアラニンを有するフサリシジンの生合成を阻害することを示す（図14参照）。

30

【0145】

したがって、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株およびパエニバチルス種 NRRL B-50972 株由来の変異株は、アミノ酸位置（3）にチロシンまたはフェニルアラニンを有する検出可能な量のフサリシジンまたはフサリシジン様化合物（例えば、フサリシジンCおよびDまたは *LiF07a* および *LiF07b*）を生成することができない。パエニバチルス種 NRRL B-50972 株における変異型 *FusA-A3* の分析は、この菌株およびその変異体が、アミノ酸位置（3）にチロシンアミノ酸またはフェニルアラニンアミノ酸を含むペプチド環を有するフサリシジンまたはフサリシジン類似体を遺伝的に産生することができないことを示す。

40

【0146】

分析した2種のパエニセリンのうち、パエニバチルス種A株に検出可能なものは1種だけであり、そのシグナル強度は、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株抽出物で観察された対応するシグナル強度の半分未満であった。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、*FusA-A3* における最初の9個の保存されたアミノ酸（すなわち、*Asp235*、*Ala236*、*Ser239*、*Thr278*、*Leu299*、*Ala301*、*Ala/Gly322*、*Val330*、および *Cys331*）の1または複数は、フサリシジン化合物の位置（3）のチロシンおよびフェニルアラニンの認識および活性化を担う。さらに、パエニバチルス種 NRRL B-50972 株によって発現される変異型 *F*

50

u s A - A 3 は、代謝中間体を特定のフサリシジンの産生から、より広い範囲のフサリシジン様化合物（例えば、パエニセリン）の生合成にシフトさせることができる。

【 0 1 4 7 】

実施例 1 4 . パエニバチルス種 NRRL B - 5 0 9 7 2 株およびパエニバチルス種 A 株の生物活性の比較

パエニバチルス種 NRRL B - 5 0 9 7 2 株（変異型 F u s A - A 3 を発現する）およびパエニバチルス種 A 株（野生型 F u s A - A 3 を発現する）を大豆ベースの培地で培養して、全ブロスを生じた。全ブロスを、水と有機溶媒の混合物で 1 0 %、5 %、2 . 5 %、および 1 . 2 5 % の濃度に希釈した。希釈した全ブロスを、若い植物に施用し、続いてプッキニア・トリシチナ（P U C C R T）、ボトリティス・シネリア（B O T R C I）、またはフィトフトラ・インフェスタンス（P H Y T I N）の接種物に曝露した。植物病原菌の接種物に曝露して数日後、各植物を、未処理の対照植物と比較して病原体の防除パーセントについてスコア化した。各処置を 3 回反復して評価し、平均防除パーセントを記録した（表 1 6 ～ 1 8 参照）。

【 0 1 4 8 】

各アッセイにおいて、パエニバチルス種 NRRL B - 5 0 9 7 2 株はパエニバチルス種 A 株を上回る優れた防除を示した。これらの実験データは、変異型フサリシジンシンターゼならびにその結果生じるフサリシジンおよびフサリシジン様化合物の生合成における変化が、パエニバチルス種 NRRL B - 5 0 9 7 2 による植物病原体の防除の強化をもたらすことを示唆している。

【表 1 6】

表 16. パエニバチルス種 NRRL B-50972 株およびパエニバチルス種 A 株により、希釈率 10%、5%、2. 5% および 1. 25% において達成されたプッキニア・トリシチナ (PUCCRT) の防除。

処理	施用量	平均防除パーセント
パエニバチルス種 NRRL B-50972	10%	98
	5%	88
	2.5%	58
	1.25%	0
パエニバチルス種 A 株	10%	82
	5%	33
	2.5%	0
	1.25%	0

【表 17】

表17. パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種A株により、希釈率10%、5%、2.5%および1.25%において達成されたボトリティス・シネリア (BOTRCI) の防除。

処理	施用量	平均防除パーセント
パエニバチルス種 NRRL B-50972	10%	100
	5%	100
	2.5%	98
	1.25%	42
パエニバチルス種A株	10%	97
	5%	83
	2.5%	17
	1.25%	0

10

【表 18】

表18. パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種A株により、希釈率10%、5%、2.5%および1.25%において達成されたフィトフトラ・インフェスタンス (PHYTIN) の防除。

処理	施用量	平均防除パーセント
パエニバチルス種 NRRL B-50972	10%	100
	5%	99
	2.5%	99
	1.25%	90
パエニバチルス種A株	10%	97
	5%	87
	2.5%	67
	1.25%	33

20

30

【0149】

実施例 15. パエニバチルス種の細胞抽出物におけるフサリシジンの同定

パエニバチルス種NRRL B-50972株および／またはそれに由来する株を大豆ベースの培地中で定常期に達するまで増殖させ、その時点で全ブロス培養物を収穫し、有機溶媒で抽出して細胞抽出物を生成した。

【0150】

高速液体クロマトグラフィー／質量分析法飛行時間型 (HPLC/MS TOF) を用いたクロマトグラフィー法を開発し、多くのフサリシジン様分子を細胞抽出物から分離した：カラム：YMC (商標) Basic 4.6×250mm、5 μm；水 (0.1% F A) およびアセトニトリル (0.1% ギ酸 (F A))；勾配 (% B)：0～9分 28～30%；9～14分 30～33%；14～34分 33～50%；洗浄

40

公知のフサリシジンが同定されている細胞抽出物からのクロマトグラムを図 4 B に示す。フサリシジンの一般構造を図 4 A に示す。各環式フサリシジンは、対応する非環式類似体を有する。

【0151】

細胞抽出物中の検出可能なすべてのフサリシジンは、それらの保持時間および m/z 値

50

に基づき同定された（図 4 C 参照）。興味深いことに、位置（3）のアミノ酸がチロシンまたはフェニルアラニンであるフサリシジン C および D ならびに他のフサリシジンは、細胞抽出物中で検出されなかった。

【0152】

実施例 16．パエニバチルス種細胞抽出物中のパエニセリン s の特徴付け

パエニバチルス種 NRRL B-50972 株および／またはこれに由来する菌株の細胞抽出物中の他の化合物を同定するために、超高速液体クロマトグラフィー／質量分析トリプル飛行時間型（UPLC／MS Triple TOF）を用いたクロマトグラフィー法を開発して、多数のフサリシジン様分子を断片化した：カラム：ZORBAX（商標）Eclipse Plus、2.1×100mm、1.8 μm；水（0.1%FA）およびアセトニトリル（0.1%FA）。勾配（%B）：0～5分10～95%；洗浄。

10

【0153】

この方法を用いて、本出願人は、AB SCIEX TRIPLE TOF（登録商標）質量分析計から得られた質量断片化パターンを調べることによって、ならびに公開された文献とスペクトルを比較することによって、フサリシジンの新規なパエニセリンファミリーを特徴付けた。出願人はこの新しいファミリーをパエニセリン（Paeniserine）と名付けた。パエニセリン A1 およびパエニセリン B1 の代表的な UPLC／MS Triple TOF 断片化パターンおよび対応する化学構造をそれぞれ図 5 および 6 に示す。同様の分析を、細胞抽出物中に検出された各パエニセリンについて行った。

20

【0154】

パエニセリンは、1 または複数のセリン置換を有するフサリシジン骨格からの重要な出発のためにこのように命名した（図 5 A 参照）。歴史的には、フサリシジンは、（1）スレオニン、（4）スレオニン、および（6）アラニンの 3 つの保存されたアミノ酸を含むペプチド配列であると考えられる。しかし、パエニセリンは、（1）および（4）のスレオニン残基の一方または両方がセリンで置き換えられた、新しい置換を示す。出願人が特徴付けしたパエニセリンにおいて、位置（2）および（3）のアミノ酸はいずれもバリンである。パエニセリンに対応するピークが同定されたクロマトグラムを図 5 B に示す。

【0155】

出願人はまた、細胞抽出物中のセリン置換されたフサリシジン様化合物のファミリーを、それらの保持時間および m/z 値に基づいて特徴付けた（図 5 C 参照）。パエニセリン C4 は検出できなかったが、以前に特徴付けられたフサリシジンの構造に基づいて產生されると予想することが合理的である。フサリシジンと同様に、各環式パエニセリンは、対応する非環式類似体を有する。

30

【0156】

出願人が特徴付けたパエニセリンは、（2）および（3）残基にバリンアミノ酸を有するが、それらの位置に変異を有する化合物が存在する可能性があることに留意することが重要である。これらの潜在的な変異は、（2）および（3）残基としてイソロイシン、フェニルアラニンおよびチロシンなどのアミノ酸を有するフサリシジン／LiF 類似体と同様であると思われる。さらに、GHPD の尾部を上に記載しているが、尾部の長さにパエニプロリキシンファミリーと同様の变化を有する化合物が存在する可能性が高い（実施例 17 参照）。

40

【0157】

実施例 17．パエニバチルス種細胞抽出物中のパエニプロリキシンの特徴付け

パエニバチルス種の NRRL B-50972 株および／またはこれに由来する株細胞抽出物を、実施例 14 に記載のクロマトグラフィー法でさらに分析した。フサリシジンの新しいファミリーを、AB SCIEX TRIPLE TOF（登録商標）質量分析計から得られた質量断片化パターンを調べることによって、ならびに公開された文献とスペクトルを比較することによって特徴付けた。出願人はこの新しいファミリーパエニプロリキシン（Paeniprolixin）と名付けた。パエニプロリキシン C1 およびパエニプロリキシン D1 の代表的な UPLC／MS Triple TOF 断片化パター

50

ンおよび対応する化学構造をそれぞれ図 8 および 9 に示す。同様の分析を、細胞抽出物中に検出された各パエニプロリキシンについて行った。

【0158】

パエニプロリキシンは、脂肪族尾部におけるフサリシジン骨格からの別の重要な出発点に起因するラテン語の *prolix*（長いを意味する）から命名された。すなわち、パエニプロリキシンは、フサリシジンより長い尾部を有する。歴史的に、フサリシジンは、特有の GHPD 尾部を有することが観察されているに過ぎない。これは、本件に関する最新の出版物（例えば、Vater et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2015, 26, 1130–1141）においても一貫していることが示されており、この著者らは、「GHPD の尾部は厳密に保存されている」というこの発見は、文献に報告されている他の多くのリポペプチドとは対照的であり、脂肪酸部分はサーファクチン、イタリン、フェンギシンなどの構造変化の主な標的である」と主張している。出願人は、パエニバチルス種 NRRL B-50972 の細胞抽出物中のより長い尾部（すなわち、17-グアニジノ-3-ヒドロキシヘプタデカン酸または $GHPD + 2CH_2$ および 19-グアニジノ-3-ヒドロキシノナデカン酸または $GHPD + 4CH_2$ ）フサリシジン様化合物のファミリーを同定した（図 8A 参照）。パエニセリンとは異なり、パエニプロリキシンは、位置（1）に L-スレオニン、位置（4）に D-α-スレオニンの保存されたアミノ酸残基を維持する。

10

【0159】

出願人が特徴付けたパエニプロリキシンは、（2）および（3）残基にバリンまたはイソロイシンのいずれかのアミノ酸を有するが、それらの位置に変異を有する化合物が存在する可能性があることに留意することが重要である。これらの潜在的な変異は、（2）および（3）残基としてバリン、イソロイシン、またはフェニルアラニンおよびチロシンなどの他のアミノ酸の他の組み合わせなどのフサリシジン／LiF 類似体と同様であると思われる。さらに、より長い長さの尾部を有する上記のパエニセリンとのハイブリッドの組み合わせが存在する可能性がある。

20

【0160】

パエニプロリキシンに対応するピークが同定されたクロマトグラムを図 8B に示す。より長い GHPD 尾部を有するフサリシジン様化合物のこのファミリーも、これらの保持時間および m/z 値に基づいて特徴付けた（図 8C 参照）。パエニプロリキシン C2 および D2 は検出できなかったが、以前に特徴付けられたフサリシジンの構造に基づいて産生されると予想することが合理的である。フサリシジンの場合と同様に、各環式パエニプロリキシンは、対応する非環式類似体を有する。

30

【0161】

実施例 18. パエニセリン、パエニプロリキシン、およびその他のフサリシジンの抗真菌性生物活性プロファイル

表 19 に示す試料は、パエニバチルス種細胞から単離した。発酵全ブ罗斯を遠心分離して上清を除去した。次いで、得られたペレットをメタノールで抽出した。得られた抽出物を逆相中圧液体クロマトグラフィーを用いて分画した。次いで、分画を、逆相分取高圧液体クロマトグラフィーを用いてさらに精製した。

40

【表 19】

試料コード	名称	説明
試料1	パエニセリン	パエニセリン A1, A2, B1, およびB2
試料2	フサリシジンA	フサリシジンA (LiF04a)、純度85+%
試料3	LiF Asn 類似体	LiF05aおよびLiF06a
試料4	LiF Asn/Gln組み合わせ	LiF05a、LiF06a、LiF05b、およびLiF06b
試料5	LiF08s	LiF08aおよびLiF08b
試料6	パエニプロリキシン	パエニプロリキシン A1、A2、B1、B2、E1およびF1

10

【0162】

インビトロ抗真菌96ウェルプレートアッセイは、真菌増殖の指標としてレサズリンベースの細胞生存性試薬PRESTOBLUE（登録商標）を利用する。真菌孢子から出発して、このアッセイは、真菌孢子の発芽および／または真菌細胞の増殖を阻害するための試料の効力を測定する。このアッセイは、3種の農業関連真菌性病害、すなわちアルテルナリア・ソラニ（ALTESO）、コレトリカム・ラゲナリウム（COLLLA）およびボトリティス・シネリア（BOTRCI）を用いて調製した。

【0163】

表19に概説されているすべての試料は、農業関連の真菌性病害に対して活性であることが証明されている（表20の各試料に関する100万分の1（ppm）単位の80%最小発育阻害濃度（MIC80）値を参照）。興味深いことに、ある種の化合物は特定の病害に対してさまざまな活性を有すると思われる。例えば、試料3のアスパラギン類似体はALTESOを防除する上で重要であると思われるが、試料4の同種の化合物のグルタミン対応物はCOLLLAの防除により多く関与していた。試料6のより長い尾部の類似体は、COLLLAの最も強力な阻害剤であった。このことは、すべてが自ら活性である一方、これらの化学物質の組み合わせは、最終製品の病害防除の最終効力およびスペクトルにとって重要であることを示唆している。

20

【表 20】

試料コード	名称	MIC80 (in ppm)		
		ALTESO	BOTRCI	COLLLA
試料1	パエニセリン	75	38	49
試料2	フサリシジンA	1.6	1.5	6.3
試料3	LiF Asn類似体	6.3	2.5	37
試料4	LiF Asn/Gln組み合わせ	55	19	9.3
試料5	LiF08s	3.0	9.4	9.4
試料6	パエニプロリキシン	75	80	5.0

30

40

【0164】

実施例19．パエニセリン、パエニプロリキシン、および他のフサリシジンの抗菌生理活性プロファイル

インビトロ抗真菌96ウェルプレートアッセイは、細菌増殖の指標として吸光度を使用する。このアッセイは、未処理のウェルの吸光度を試料ウェルと比較することによって、細菌増殖を阻害する試料の効力を測定する。細菌の増殖を阻害する最終希釈／濃度をMIC（最小発育阻害濃度（minimum inhibitory concentration））と呼び、この値を用いて異なる試料の効力を比較することができる。アッセイは

50

、キサントモナス・カンペストリス（XANTAV）、シュードモナス・シリング（PSDMTM）、およびエルウィニア・カロトボラ（ERWICA）の3種の農業関連細菌性病害を用いて評価した。

【0165】

表19に概要を示した試料を抗菌アッセイに適用して、各細菌病原体によるMIC80値を測定した。アッセイの結果を表21に示す。試料1～5は、農業関連の細菌性病害に対して活性であることが判明した。興味深いことに、ある種の化合物は特定の病害に対してさまざまな活性を有すると思われる。例えば、パエニセリンは、フサリシジンAの弱点であるPSDMTMを防除することができるという点で、フサリシジンAを補完する。一方、フサリシジンAは、パエニセリンで観察されるERWICAの防除における弱点を補う。真菌アッセイと同様に、このことは、すべてがそれ自体で有効である一方、これらの化学物質の組み合わせは、最終製品の最終的な効力および病害防除のスペクトルにとって重要であることを示唆している。

【表21】

試料コード	名称	MIC80 (in ppm)		
		PSDMTM	XANTAV	ERWICA
試料1	パエニセリン	99	44	NDR*
試料2	フサリシジンA	NDR*	24	75
試料3	LiF Asn類似体	101	12.4	62.5
試料4	LiF Asn/Gln組み合わせ	88	44	150
試料5	LiF08s	125	23	49
試料6	パエニプロリキシン	--**	--**	--**

*NDR: 検出可能結果なし(すなわち、試験した最高濃度において細菌増殖の阻害がない)

**' 試料は微生物培地に不溶性であり、試験することができなかった。

【0166】

実施例20. Kirby-Bauer抗生物質のディスク拡散アッセイによる相乗効果の示唆

フサリシジン様化合物のさまざまなクラス間の相乗作用の初期評価を得るために、植物病原体COLLLAを用いてバイオアッセイを実施した。バイオアッセイは、寒天上の古典的なKirby-Bauer抗生物質ディスク拡散アッセイであった(Bauer, A. W., et al., 1966 Am. J. Clin. Pathol. 36:493-496)。簡潔には、COLLLA胞子の芝生を接種したペトリ皿上に、同様の量の種々の試料を負荷したブランク無菌ディスクを置いた。このペトリ皿をインキュベートし、各ディスクの周りに示された阻害ゾーンの直径の大きさとして活性を記録した。結果を図11に示す。

【0167】

この予備アッセイの結果は、特定のパエニセリンおよびパエニプロリキシンと一緒に施用すると、相乗効果が生じることを示唆している。別々に施用されたパエニセリン A1およびB1(「868」)またはパエニプロリキシン A2およびB2(「938」)は、このアッセイにおいて比較的小さな阻害ゾーンを示す。しかし、それらの組み合わせ(「868/938」)は、868、938またはフサリシジンAおよびB(「AB」)の適用で得られた結果を超える阻害の最大かつ最も明確なゾーンを示す。AB、868、および938の試料について、約0.1mgの全材料を各無菌ディスクに適用した。868および938の両方の試料を含むディスクは、868/938ディスク上の材料の総量が約0.1mgであるように、各試料を約0.05mg含有した。

【0168】

このアッセイの限界は、フサリシジン化合物を真菌の増殖を阻害するために寒天に拡散しなければならないという要件である。相乗効果のこの初期の指標を、液体培地中のインビトロ抗真菌アッセイを利用してさらに評価した。

【0169】

実施例21．フサリシジンの組み合わせの相乗作用を実証するためのインビトロ抗真菌アッセイ

実施例17に概説したフサリシジンの組合せに加えて、液体培地中のインビトロ抗真菌アッセイを実施して、図12に示すフサリシジンおよび／またはフサリシジン様化合物の組み合わせの適用から生じる提案された相乗効果を実証する。図12に示すグループの各々を、最初に構造特性を評価するために個別に評価し、次に相乗効果に対処するために組み合わせで評価する。二成分混合物と三元混合物の両方を評価する。

10

【0170】

個々の化合物は殺真菌活性に関して弱点を示すかもしれないが、組み合わせは活性の単純な添加を上回る活性を有するであろう。

【0171】

殺真菌剤の相乗効果は、活性化合物の組み合わせの殺真菌活性が、個別に適用された場合の活性化合物の活性の合計を超える場合、常に存在する。

【0172】

2つまたは3つの活性化合物の所与の組合せについての予想される活性は、以下のよう
に計算することができる (Colby, S. R., "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations, Weeds 1967, 15, 20-22)
)。

20

【0173】

Xは、活性化合物Aをm ppm (またはg/h a) の施用量で施用した場合の効力であり、

Yは、活性化合物Bを施用量n ppm (またはg/h a) で施用した場合の効力であり、

Zは、活性化合物Bを施用量r ppm (またはg/h a) で施用した場合の効力であり、

30

E₁は、活性化合物AおよびBを施用量mおよびn ppm (またはg/h a) で施用した場合の抗力であり、

E₂は、活性化合物A、BおよびCをそれぞれ施用量m、nおよびr ppm (またはg/h a) で施用した場合の効力であり、

この場合、二成分混合物に関しては：

【数1】

$$E_1 = X + Y - \frac{X \cdot Y}{100}$$

40

【0174】

であり、および三成分混合物に関しては：

【数2】

$$E_2 = X + Y + Z - \left(\frac{X \cdot Y + X \cdot Z + Y \cdot Z}{100} \right) + \frac{X \cdot Y \cdot Z}{10000}$$

【0175】

である。

【0176】

50

効力の程度は%で表される。0%は対照の効力に相当する効力を意味し、100%の効力は病害が観察されないことを意味する。

【0177】

実際の殺真菌活性が計算値を超える場合、組み合わせの活性は超相加的であり、すなわち相乗効果が存在する。この場合、実際に観察された効力は、上記の式から計算された予想効力(E)の値よりも大きくなければならない。

【0178】

相乗効果を実証するためのさらなる方法は、Tammesの方法である(“Isoboles, A Graphic Representation of Synergism in Pesticides” in Neth. J. Plant Path., 1964, 70, 73-80参照)。

10

【0179】

実施例22. パエニバチルス種NRRL B-50972株の変異株の選択

標準的な実験室条件下では、パエニバチルス種NRRL B-50972株は、固体寒天培地上で複数のコロニー形態を産生する。いくつかの形態学的に異なるコロニーを同定し、-80℃でグリセロールストックとして保存した。液体培地培養物は、異なるコロニー表現型に由来するストックを用いて接種し、液体培地中で数ラウンド増殖させた後、固体寒天培地上に再接種した。ここから、試験された条件下で安定なコロニー表現型を有し、耐熱孢子およびフサリシジン化学物質を依然として産生することができる、1つの単離株を同定した。安定なコロニー形態を有する単離株は、さらなる株の改良のために望ましい(実施例23参照)。この単離株は、2015年9月1日にNRRLに寄託され、受託番号NRRL B-67129が割り当てられている。

20

【0180】

実施例23. 改善されたパエニバチルス種突然変異体を生成するランダム突然変異誘発化学的突然変異誘発

パエニバチルス種NRRL B-67129株の遺伝的に多様な単離株のプールを作製するために、菌株の液体培養培養物を遠心分離によりペレット化し、1-メチル-3-ニトロ-1-ニトログアニジン(NTG)を含有する緩衝液中に最終濃度400μg/mLで再懸濁した。参照として、NTGを含まない第2の試料を調製した。試料を30℃および220rpmにおいて1時間インキュベートした。1時間後、試料を遠心分離によってペレット化し、NTGを含有しない緩衝液で洗浄し、最後に同じ容量の新鮮な緩衝液に再懸濁した。希釈されていない培養物のアリコートでグリセロールストックとして-80℃で凍結させた。試料を希釈して、寒天プレート上にプレーティングしてコロニー形成単位を決定し、ゲノムあたりの突然変異度の基準として死滅率を決定した。第1ラウンドのスクリーニングから選択された改良された単離株を、上記のように1または複数回のNTG処理に付し、フサリシジン産生のさらなる改善についてスクリーニングした。フサリシジン産生は、フサリシジンA(LiF04aまたは「FusA」としても知られている)；LiF08a；パエニセリンA1およびB1(「M868」または「868」としても知られている)；パエニプロリキシンA2およびB2(「M938」または「938」としても知られている)を含むいくつかの化合物の相対量によって決定した。

30

40

【0181】

高スループットスクリーニングと分離特性

NTG処理した試料を希釈し、寒天プレート上にプレーティングして単一のコロニーを得た。単一コロニーを、種培地を含む96ウェルディープウェルブロックに接種し、30℃において2日間振盪しながらインキュベートした。ここから、大豆ベースの生産培地を含む新しい96ウェルディープウェルブロックに接種し、30℃において5日間振盪しながらインキュベートした。5日後、個々のウェル中の各試料からグリセロールストックを調製し、-80℃で保存し、試料を上記で特定した4種のフサリシジンバイオマーカーの化学分析に供した。この一次スクリーニングにおいて、個々の単離株は、それらの「総フサリシジン値」(すなわち、野生型の値の平均に対する4つの分析されたフサリシジンバ

50

イオマーカーの合計)が野生型値の平均よりも野生型値の標準偏差の3倍高かった場合にヒットとみなした。この基準に基づいて選択された各単離株の8つの複製物を上記のように増殖させて分析した。確認されたフサリシジン過剰産生体を次に250mLの振盪フラスコ中で50mL容量にスケールアップし、胞子形成、フサリシジン産生および生物活性について特徴付けた。優先単離株をバイオリアクターにさらにスケールアップし、胞子形成、粘性、フサリシジン産生、および生物活性について特徴付けた。NTG処理およびスクリーニングの第2ラウンドからいくつかの突然変異株が得られ、優れたフサリシジンバイオマーカー産生および生物活性を有することが判明した。

【0182】

実施例24. パエニバチルス種NRRL B-50972株の抗生物質感受性の特徴付け

パエニバチルス種NRRL B-50972株を、典型的な濃度の抗生物質を補充した固形sLB寒天培地およびsLB寒天培地に接種した。寒天プレートで30℃においてインキュベートし、増殖を24時間後、48時間後および72時間後に評価した。それぞれの被験抗生物質に対するパエニバチルス種NRRL B-50972株の感受性を表22に示す。

【表22】

表22. パエニバチルス種NRRL B-50972株の抗生物質感受性

抗生物質(最終濃度)	感受性/耐性
クラムフェニコール (5 µg/mL)	耐性
エリスロマイシン (5 µg/mL)	感受性
カナマイシン (10 µg/mL)	感受性
リンコマイシン (25 µg/mL)	耐性
ナジグナス酸 (25 µg/mL)	感受性
ホリスキンB (10 µg/mL)	耐性
スベチチマイシン (100-250 µg/mL)	耐性(増殖はしたが、48および72のインキュベーションの後で減少した)
テトラサイクリン(5 µg/mL)	感受性

【0183】

実施例25. パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種NRRL B-67129株におけるspo0Aの特徴付け

パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種NRRL B-67129株のゲノムを配列決定した。2つのゲノム配列の比較により、2つの菌株におけるspo0A遺伝子の特徴的な相違を同定した。図15の配列アラインメントに示されるように、パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種NRRL B-67129株は、spo0A遺伝子の3'末端に向かって1ヌクレオチド異なる。単一ヌクレオチドの相違を同定して、図15の配列の下に赤い矢印で示した。spo0A遺伝子の第1のヌクレオチドに対するヌクレオチド番号は、配列の上に示される。

【0184】

内生胞形成細菌由来のSpo0Aオルソログのアライメントは、パエニバチルス種NRRL B-67129株コード配列におけるヌクレオチド変化が、保存領域において単一のアミノ酸置換をもたらすことを示した。(図16参照)。パエニバチルス・テラエ由来のSpo0Aアミノ酸配列(NCBI参照配列:WP_044647644.1)、パエニバチルス・ポリミキサSQR-21(GenBank:AHM66630.1)、バチルス・ズブチリス亜種ズブチリス株168(NCBI Reference Seque

nce: NP_390302.1)、バチルス・セレウスE33L (GenBank: AJ126924.1)、およびクロストリジウム・パステリアヌムDSM 525 (GenBank: AAA18883.1)を、パエニバチルス種NRRL B-50972株およびパエニバチルス種NRRL B-67129株由来のSp00Aアミノ酸配列とアライメントさせた。図16中の矢印は、パエニバチルス種NRRL株B-67129株由来のSp00Aにおける単一のアミノ酸置換を示す。

【0185】

実施例26. フサリシジン、パエニセリン、パエニプロリキシンとの構造活性関係研究
実施例16に記載のインビトロアッセイを用いて、いくつかの精製されたフサリシジン、パエニセリンおよびパエニプロリキシンの構造活性関係を調べた。第1の実験において、最も一般的なフサリシジンの対を比較した。これらのフサリシジンの変異は、アスパラギンまたはグルタミンのいずれかを有する環／鎖のアミノ酸位置(5)で生じる。この研究において、植物病原体アルテルナリア・ソラニ(ALTESO)に対してフサリシジンAをフサリシジンBと比較し、LiF08aをLiF08bと比較した。どちらの場合においても、アスパラギン類似体は、その対応物のグルタミンより2倍以上強力であった(図17参照)。

【0186】

別の実験において、環式対非環式形態のフサリシジンを比較した。フサリシジンの非環式形態が最終化合物の前駆体または分解生成物であるかどうかは不明であるが、それらはパエニバチルス種NRRL B-50972株の発酵ブロス中に偏在しており、この発酵ブロス由来の精製フサリシジンに共通の混入物質である。フサリシジンAの抗真菌活性を、植物病原体ALTESOを用いたインビトロアッセイにおいて、LiF04cおよびLiF04d(フサリシジンAおよびBの非環式類似体)の混合物と比較した。エステル結合におけるペプチド開環の重要な影響がある。非環式類似体は、試験した最高濃度で不活性であった(図17参照)。これは構造的情報に関して重要であり、そうでなければ精製されたフサリシジン中で典型的に混入物質を構成するこれらの化合物が、抗真菌活性に寄与しない可能性が高いことを実証する。

【0187】

環／鎖のアミノ酸位置(2)および(3)におけるアミノ酸置換もまた調査した。類似体フサリシジンA、LiF05a、LiF06a、およびLiF08aは、それらの位置にバリンまたはイソロイシンのいずれかの組み合わせを有することで異なる。これらを、植物病原体ALTESOを用いたインビトロアッセイで試験した。2つの最も強力な類似体は、フサリシジンA(バリン／バリン)およびLiF08a(イソロイシン／イソロイシン)であった。バリン／イソロイシンの混合物を含む他の2つの類似体は、1／3未満の効力を有していた(図17参照)。

【0188】

新規パエニセリンとの抗真菌活性の違いも調査した。この場合もまたALTESOに対して試験し、環／鎖のアミノ酸位置(1)および(4)の違いを評価した。古典的なフサリシジンは、これらの位置がスレオニンに限定され、一方、パエニセリンはスレオニンとセリンの間で交替することができる。パエニセリンは、このアッセイにおいてフサリシジンAと同様の抗真菌活性を示した(図17参照)。

【0189】

真菌病原体ALTESOおよびコレトリカム・ラゲナリウム(COLLA)に対するインビトロアッセイを用いて、パエニプロリキシン(すなわち、異なる側鎖長を有する類似体)の抗真菌活性も調査した。古典的なフサリシジンは、15-グアニジノ-3-ヒドロキシペンタデカン酸側鎖を含む。パエニプロリキシンは、鎖中に4つの追加のメチレン基のうちの2つを有することが示されている。側鎖長は生物活性に顕著な効果を示し、異なる真菌病原体には差異を示した。ALTESOに対して、長さの変化がないGHPDが最も強力であり、メチレン基が追加されるたびに低下していった。COLLAに対して、最も強力な長さはGHPD+2CH₂であった(図17参照)。

【 0 1 9 0 】

実施例 27．フサリシジン A とパエニセリン A1 またはパエニプロリキシン C1 との混合物による相乗的抗真菌活性

レザズリンベースの細胞生存性試薬 PRESTOBLUE（登録商標）（実施例 18 参照）を用いたインビトロ抗真菌 96 ウェルプレートアッセイを用いて、フサリシジン、パエニセリン、およびパエニプロリキシンの単独または双方向の組み合わせにおける抗真菌活性を評価した。抗真菌活性は、以下の式を用いて未処理対照値との関連で計算した：

効力 = (100 - 未処理対照に対する相対的増殖)

100%効力は、未処理対照と比較して真菌増殖がないことを示し、0%効力は、未処理対照と比較して真菌増殖の阻害がないことを示す。

【 0 1 9 1 】

表 23 および 24 は、本発明による活性化合物の組合せの観察された活性が、計算された活性よりも大きい、すなわち相乗効果が存在したことを明確に示している。

【表 23】

表23: フサリシジンA単独、パエニセリン A1単独、およびフサリシジンA+パエニセリン A1のアルテルナリア・ソラニに対する抗真菌活性

活性化合物	活性化合物の 施用量 (mg/mL)	効力 %	
		found*	calc.**
フサリシジンA	0.25	39.0	
パエニセリン A1	0.0083	0.5	
フサリシジンA+パエニセリン A1	0.25 + 0.0083	48.2	39.3

* found = 活性が見出された

** calc. = コルビーの式を用いて計算した活性

【表 24】

表24: フサリシジンA単独、パエニプロリキシン単独、およびフサリシジンA+パエニプロリキシン C1のアルテルナリア・ソラニに対する抗真菌活性

活性化合物	活性化合物の 施用量 (mg/mL)	効力 %	
		found*	calc.**
フサリシジンA	0.25	42.0	
パエニプロリキシン C1	0.0083	25.4	
フサリシジンA+パエニプロリキシン C1	0.25 + 0.025	68.1	56.7

* found = 活性が見出された

** calc. = コルビーの式を用いて計算した活性

【 0 1 9 2 】

他に定義されない限り、本明細書におけるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。引用されたすべての刊行物、特許および特許公報は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 9 3 】

開示された発明は、記載された特定の方法論、プロトコルおよび材料に限定されず、変

更可能であると理解される。また、本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を説明する目的のみのものであり、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解される。

【 0 1 9 4 】

当業者は、本明細書に記載された本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を、日常的な実験のみを用いて認識または確認することができると思われる。このような等価物は、添付の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

10

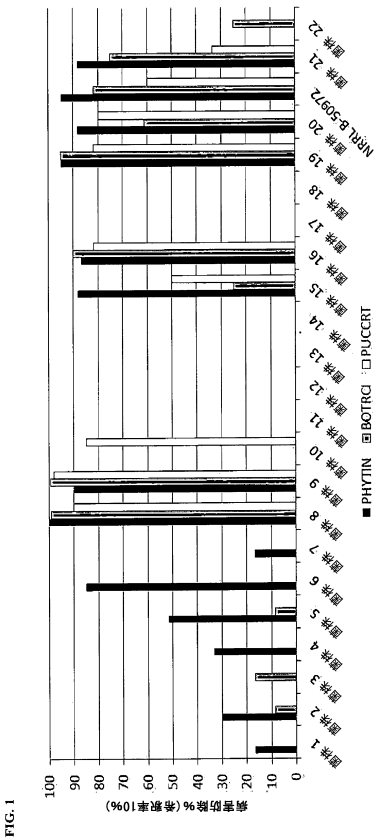
20

30

40

50

【図面】
【図 1】

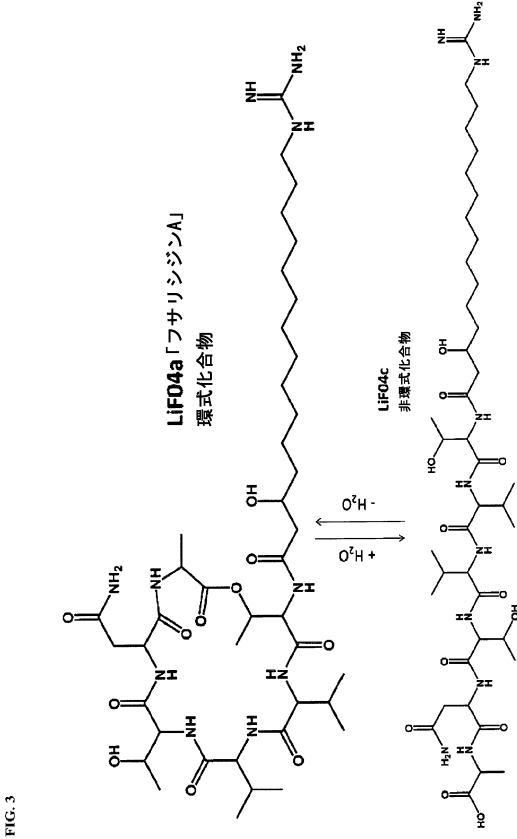


【図 2】

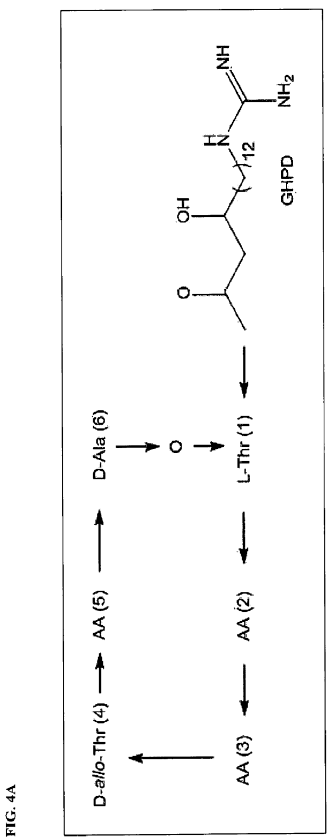
FIG. 2

菌株	ALTE	AL	ROTR	FUSA	LEPTN	SEPT	PHYT	PHYT	PHYT	PYTH	PYTH	RHIZ	USTI	UROMA
菌株 1	ED ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
菌株 2	ED ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
菌株 3	ED ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
菌株 4	ED ₅₀	1.5	3.2	4.4	2.2	4.7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
菌株 5	ED ₅₀	4.5	9.8	>100	>100	2.4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
菌株 6	ED ₅₀	1.2	1.2	3.3	1.6	1.4	1.6	0.1	1.5	3.5	0.7	2.5	0.9	0.9
菌株 7	ED ₅₀	2.4	1.7	4.2	6.4	1.6	2.1	0.2	1.6	7	1.5	2.8	1.2	1.2

【図 3】



【図 4 A】



10

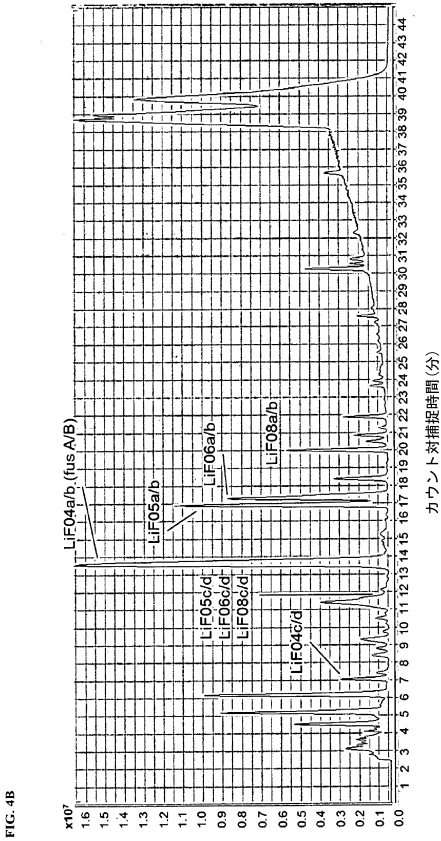
20

30

40

50

【図 4 B】

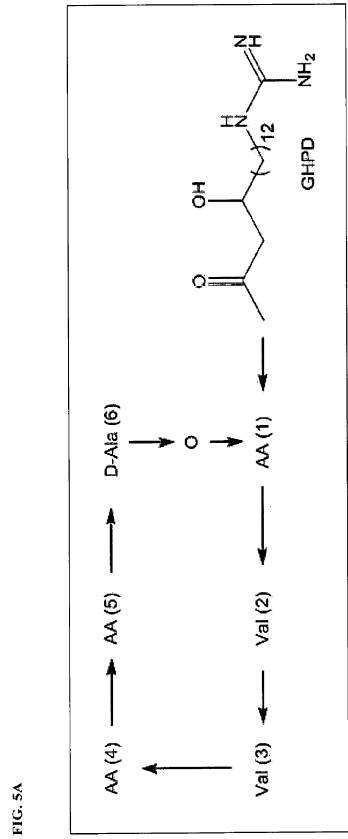


【図 4 C】

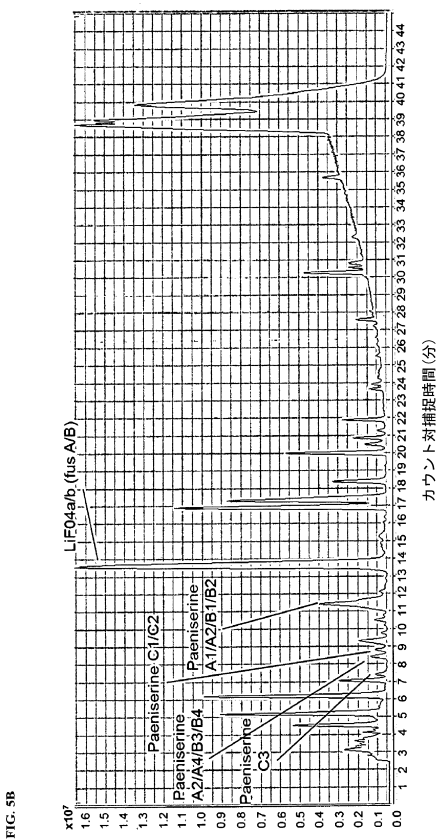
FIG. 4C

化合物	環式 または 非環式	分子式	AA (2)	AA (3)	AA (5)	m/z	RT (分)
“C” - LiF03a	環式	C ₄₅ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Val	Tyr	Asn	検出なし	
“D” - LiF03b	環式	C ₄₆ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂	Val	Tyr	Gln	検出なし	
LiF03c	非環式	C ₄₅ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃	Val	Tyr	Asn	検出なし	
LiF03d	非環式	C ₄₆ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₃	Val	Tyr	Gln	検出なし	
“A” - LiF04a	環式	C ₄₁ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₁	Val	Val	Asn	883.5	13.64
“B” - LiF04b	環式	C ₄₂ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₁	Val	Val	Gln	897.6	13.57
LiF04c	非環式	C ₄₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂	Val	Val	Asn	901.6	9.33
LiF04d	非環式	C ₄₂ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₂	Val	Val	Gln	915.6	9.35
LiF05a	環式	C ₄₂ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₁	Val	Ile	Asn	897.6	16.99
LiF05b	環式	C ₄₃ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₁	Val	Ile	Gln	911.6	16.90
LiF05c	非環式	C ₄₂ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₂	Val	Ile	Asn	915.6	12.12
LiF05d	非環式	C ₄₃ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₂	Val	Ile	Gln	929.6	12.11
LiF06a	環式	C ₄₂ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Val	Asn	897.6	17.30
LiF06b	環式	C ₄₃ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Val	Gln	911.6	17.35
LiF06c	非環式	C ₄₂ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₂	Ile	Val	Asn	915.6	12.12
LiF06d	非環式	C ₄₃ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₂	Ile	Val	Gln	929.6	12.11
LiF07a	環式	C ₄₅ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₁	Val	Phe	Asn	検出なし	
LiF07b	環式	C ₄₆ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₁	Val	Phe	Gln	検出なし	
LiF07c	非環式	C ₄₅ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂	Val	Phe	Asn	検出なし	
LiF07d	非環式	C ₄₆ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₂	Val	Phe	Gln	検出なし	
LiF08a	環式	C ₄₃ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Ile	Asn	911.6	19.99
LiF08b	環式	C ₄₄ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Ile	Gln	925.6	20.02
LiF08c	非環式	C ₄₃ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₂	Ile	Ile	Asn	929.6	12.11
LiF08d	非環式	C ₄₄ H ₈₂ N ₁₀ O ₁₂	Ile	Ile	Gln	943.6	12.11

【図 5 A】



【図 5 B】



10

20

30

40

50

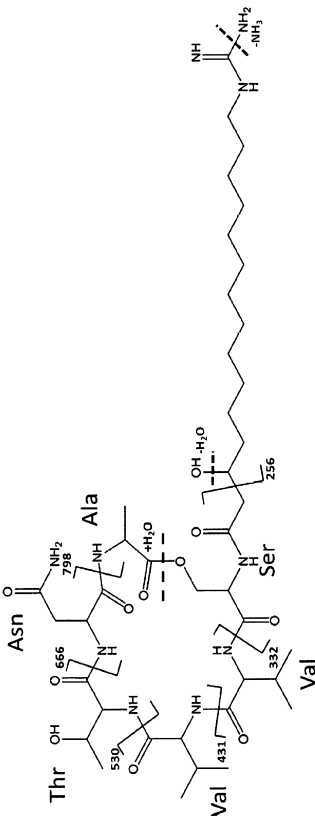
【図 5 C】

FIG. 5C

化合物	環式 または 非環式	分子式	AA (1)	AA (4)	AA (5)	m/z	RT (分)
Paeniserine A1	環式	C ₄₀ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₁	Ser	Thr	Asn	869.5	11.26
Paeniserine A2	環式	C ₄₁ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₁	Ser	Thr	Gln	883.5	11.12
Paeniserine A3	非環式	C ₄₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Ser	Thr	Asn	887.5	8.38
Paeniserine A4	非環式	C ₄₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂	Ser	Thr	Gln	901.6	8.41
Paeniserine B1	環式	C ₄₀ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₁	Thr	Ser	Asn	869.5	11.67
Paeniserine B2	環式	C ₄₁ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₁	Thr	Ser	Gln	883.5	11.16
Paeniserine B3	非環式	C ₄₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Thr	Ser	Asn	887.5	8.79
Paeniserine B4	非環式	C ₄₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂	Thr	Ser	Gln	901.6	8.67
Paeniserine C1	環式	C ₃₉ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₁	Ser	Ser	Asn	855.5	8.81
Paeniserine C2	環式	C ₄₀ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₁	Ser	Ser	Gln	869.5	8.62
Paeniserine C3	非環式	C ₃₉ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	Ser	Ser	Asn	873.5	7.22
Paeniserine C4	非環式	C ₄₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	Ser	Ser	Gln	検出なし	

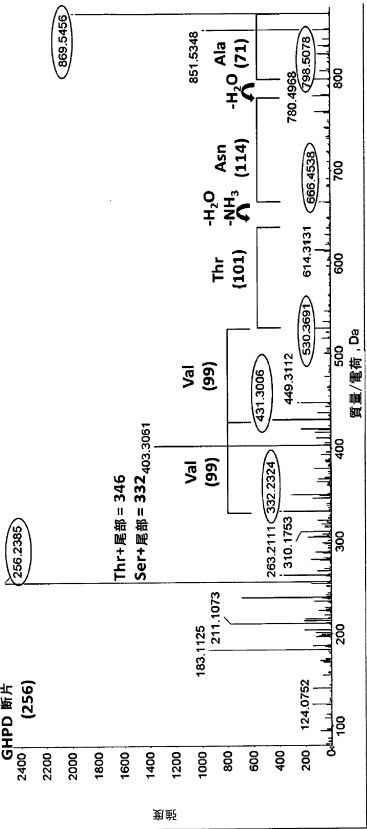
【図 6 A】

FIG. 6A



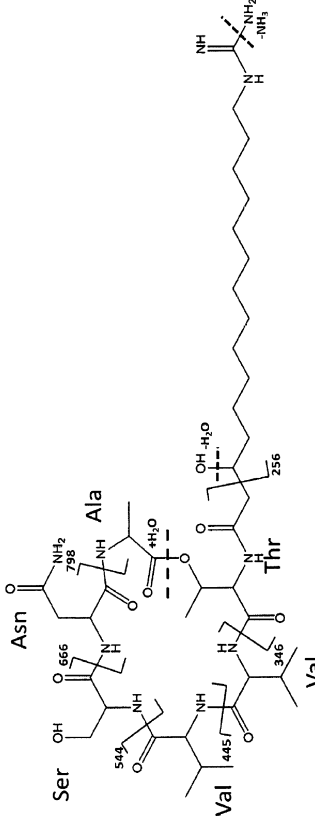
【図 6 B】

FIG. 6B



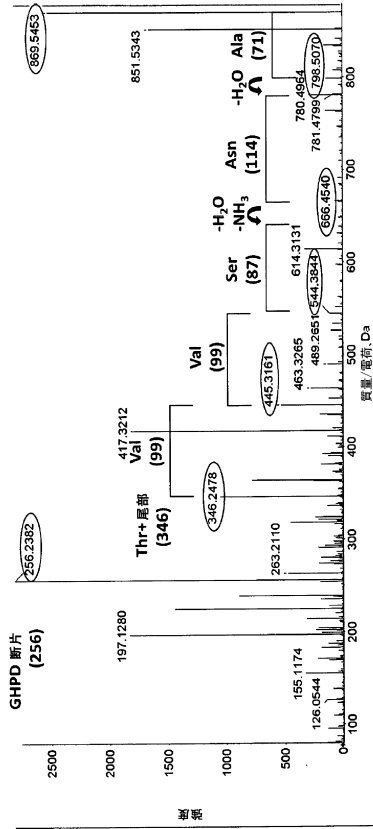
【図 7 A】

FIG. 7A



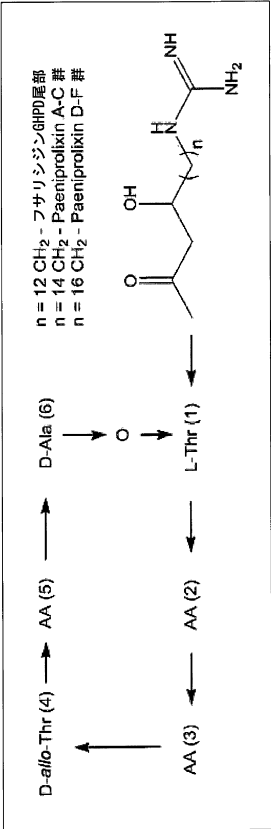
【図 7 B】

FIG. 7B



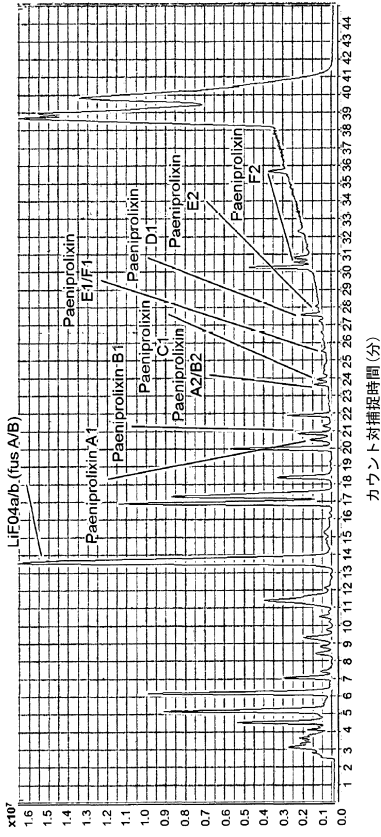
【図 8 A】

FIG. 8A



【図 8 B】

FIG. 8B



【図 8 C】

FIG. 8C

化合物	分子式	AA (2)	AA (3)	AA (5)	尾部	m/z	RT (分)
Paeniprolxin A1	C ₄₄ H ₉₀ N ₁₀ O ₁₁	Val	Ile	Asn	GHPD+2CH ₂	925.6	20.87
Paeniprolxin A2	C ₄₅ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₁	Val	Ile	Gln	GHPD+2CH ₂	939.6	23.63
Paeniprolxin B1	C ₄₄ H ₉₀ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Val	Asn	GHPD+2CH ₂	925.6	21.88
Paeniprolxin B2	C ₄₅ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Val	Gln	GHPD+2CH ₂	939.6	23.92
Paeniprolxin C1	C ₄₅ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Ile	Asn	GHPD+2CH ₂	939.6	24.56
Paeniprolxin C2	C ₄₅ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Ile	Gln	GHPD+2CH ₂	検出なし	
Paeniprolxin D1	C ₄₅ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₁	Val	Val	Asn	GHPD+4CH ₂	939.6	27.22
Paeniprolxin D2	C ₄₅ H ₉₂ N ₁₀ O ₁₁	Val	Val	Gln	GHPD+4CH ₂	検出なし	
Paeniprolxin E1	C ₄₆ H ₉₄ N ₁₀ O ₁₁	Val	Ile	Asn	GHPD+4CH ₂	953.6	25.54
Paeniprolxin E2	C ₄₇ H ₉₆ N ₁₀ O ₁₁	Val	Ile	Gln	GHPD+4CH ₂	967.6	28.60
Paeniprolxin F1	C ₄₆ H ₉₄ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Val	Asn	GHPD+4CH ₂	953.6	26.17
Paeniprolxin F2	C ₄₇ H ₉₆ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Val	Gln	GHPD+4CH ₂	967.6	30.26
Paeniprolxin G1	C ₄₇ H ₉₆ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Ile	Asn	GHPD+4CH ₂	966.6	31.02
Paeniprolxin G2	C ₄₈ H ₉₈ N ₁₀ O ₁₁	Ile	Ile	Gln	GHPD+4CH ₂	検出なし	

10

20

30

40

50

【図 9 A】

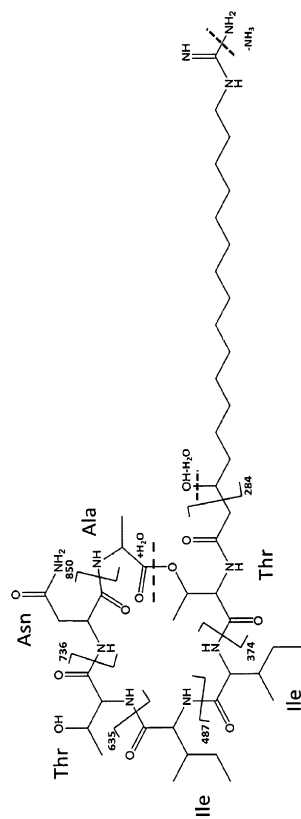


FIG. 9A

【図 9 B】

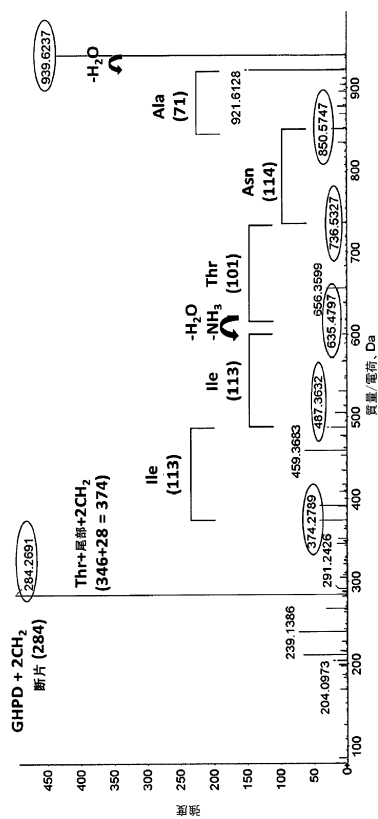


FIG. 9B

【図 10 A】

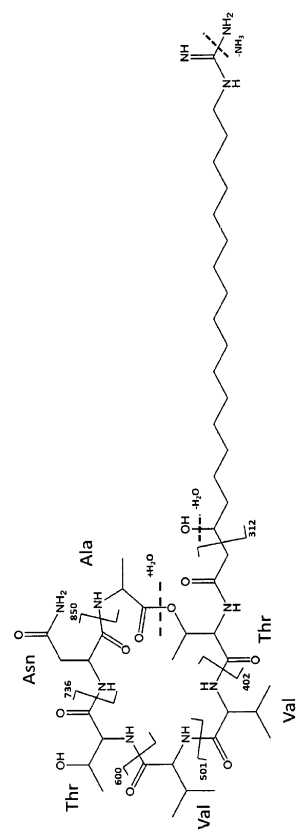


FIG. 10A

【図 10 B】

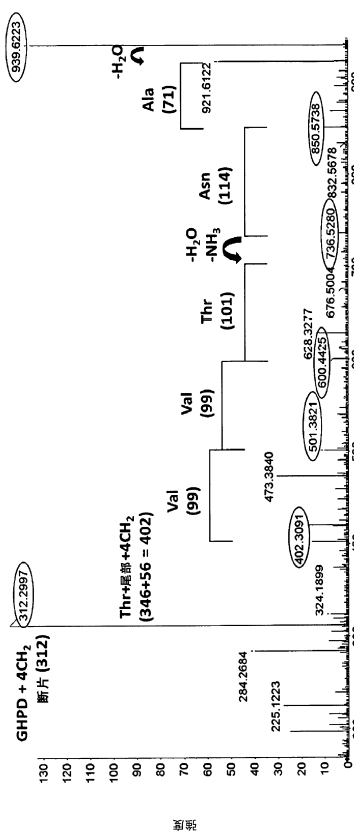
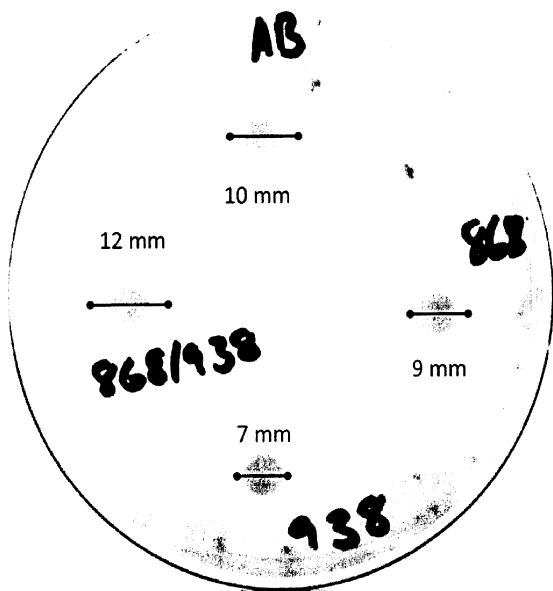


FIG. 10B

【図 1 1】

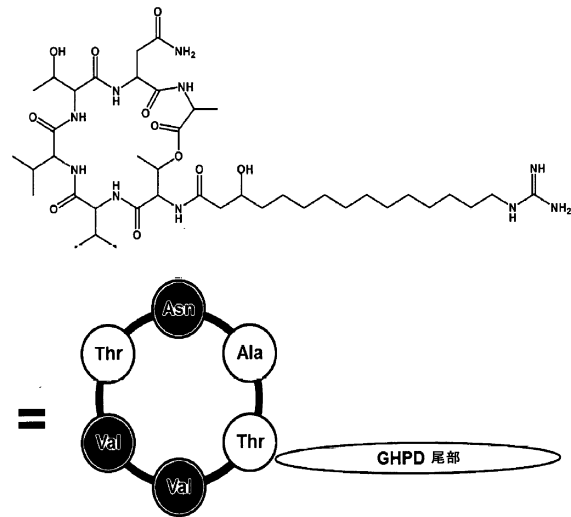
FIG. 11



試料コード	名称	COLLA
AB	フサリシジンAおよびB	10 mm
868	Paeniserines A1およびB1	9 mm
938	Paeniprolxin A2およびB2	7 mm
868/938	868と938との組み合わせ	12 mm

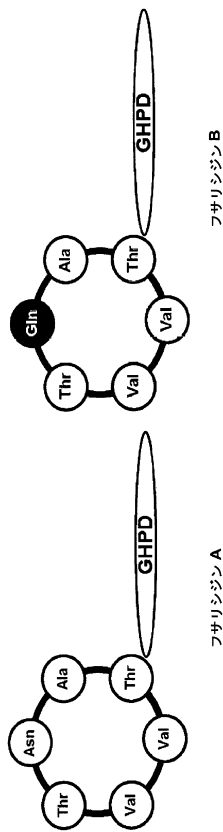
【図 1 2 A】

FIG. 12A



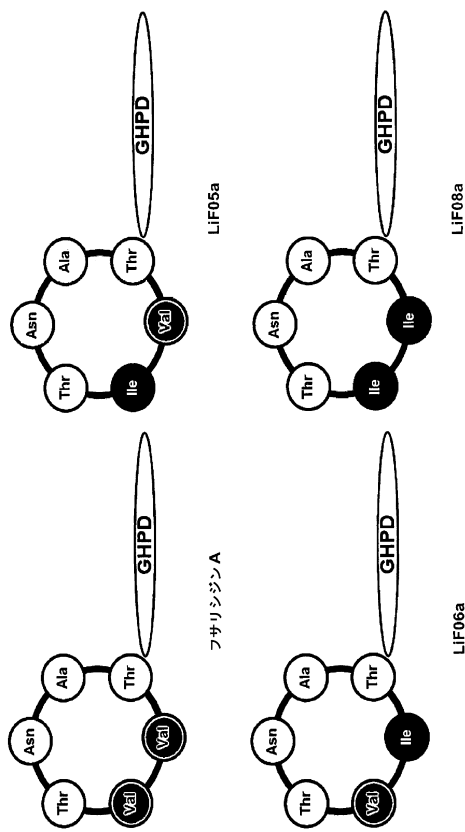
【図 1 2 B】

FIG. 12B



【図 1 2 C】

FIG. 12C



10

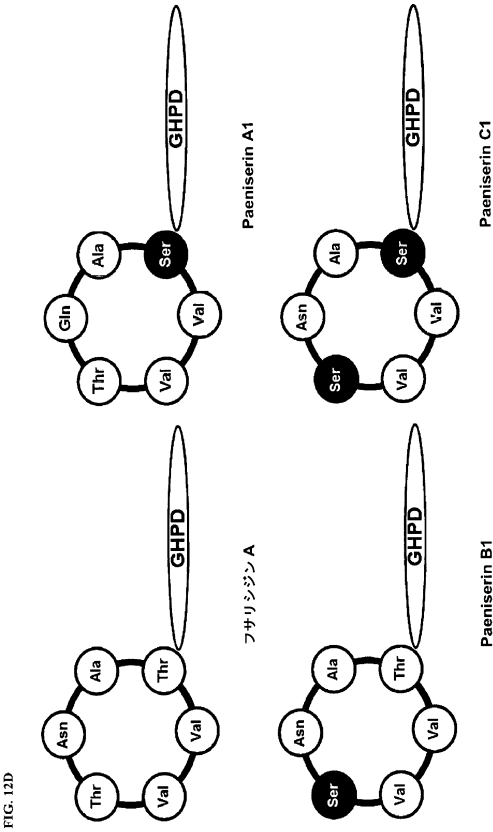
20

30

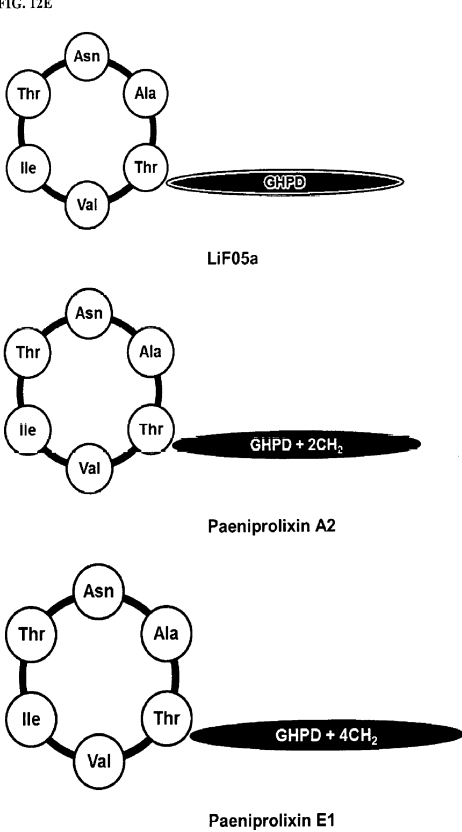
40

50

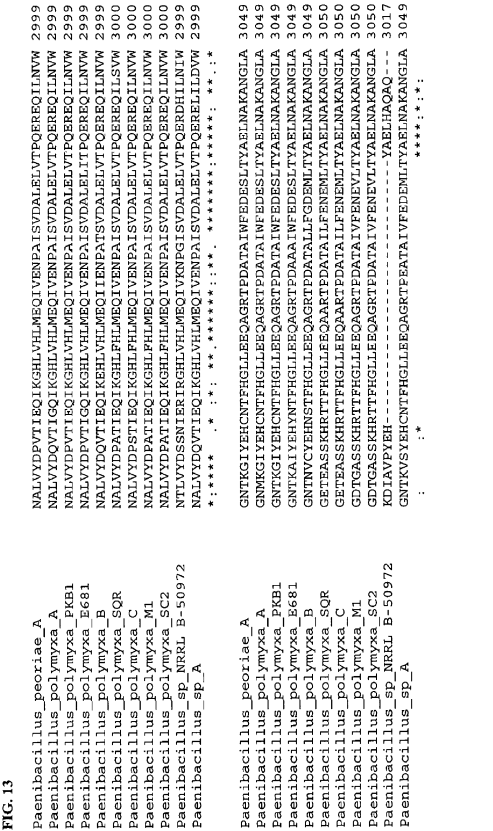
【図 1 2 D】



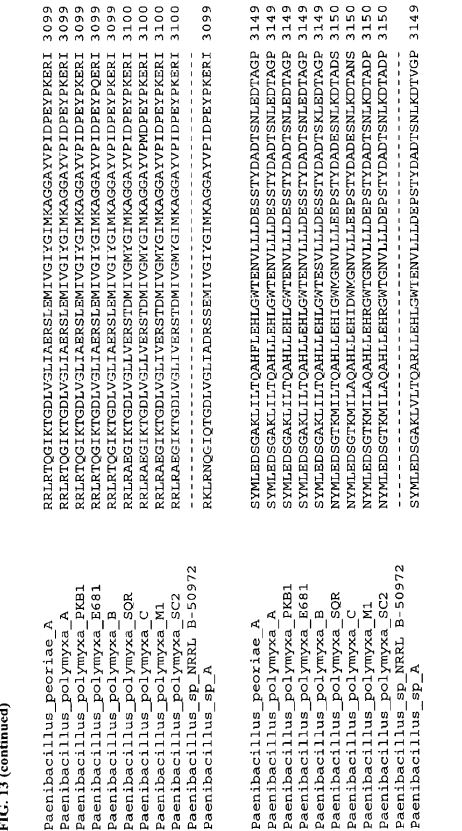
【図 1 2 E】



【図 1 3 - 1】



【図 1 3 - 2】



【図 14】

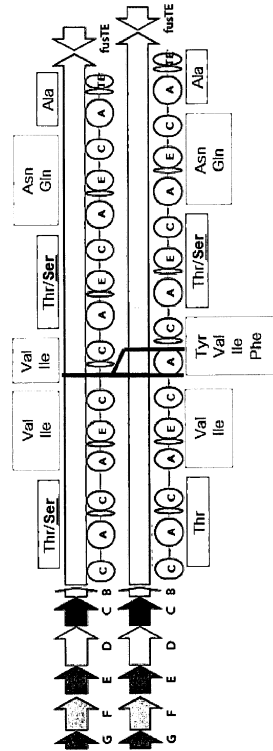


FIG. 14

【図 15-1】

NRRL B-50972	TTGCAAAA	TTGAGTATT	TTGGCTGAT	GACAACCGG	AATTTACGAA	TCTGCTTGGC	60
NRRL B-67129	TTGCAAAA	TTGAGTATT	TTGGCTGAT	GACAACCGG	AATTTACGAA	TCTGCTTGGC	60
NRRL B-50972	GAATATATT	CCGATCAGGA	GGATATGGA	GTTACAGGAA	TGCGCTATAA	TGSGTGAAGA	120
NRRL B-67129	GAATATATT	CCGATCAGGA	GGATATGGA	GTTACAGGAA	TGCGCTATAA	TGSGTGAAGA	120
NRRL B-50972	GTGCTCCAAC	ACATCGCGAGA	ATCCCGCAAC	GTACCTGATG	TACTTATTTT	AGATATTATC	180
NRRL B-67129	GTGCTCCAAC	ACATCGCGAGA	ATCCCGCAAC	GTACCTGATG	TACTTATTTT	AGATATTATC	180
NRRL B-50972	ATGCTCATC	TGSGATG3TCT	CGCGGTATTG	GAGCGCTTGA	GAGAATGAA	CCTGTCTCCA	240
NRRL B-67129	ATGCTCATC	TGSGATG3TCT	CGCGGTATTG	GAGCGCTTGA	GAGAATGAA	CCTGTCTCCA	240
NRRL B-50972	CAGCGGAAAA	TCATTATGCT	GACTGCATTC	GTCAAGAAA	ATATTACGCA	AAGAGCCGTA	300
NRRL B-67129	CAGCGGAAAA	TCATTATGCT	GACTGCATTC	GTCAAGAAA	ATATTACGCA	AAGAGCCGTA	300
NRRL B-50972	CAGCTCGGGG	CATCTTTATTA	TATTTTGAAG	CCGTTTGACA	TGGAAGTGTCT	TGCAACCGGT	360
NRRL B-67129	CAGCTCGGGG	CATCTTTATTA	TATTTTGAAG	CCGTTTGACA	TGGAAGTGTCT	TGCAACCGGT	360
NRRL B-50972	GTTCGTCAT	TGGTGGGACC	ACAAATTAGT	AGCAGCAGTC	CGGTGACGGT	TTCTTCGATT	420
NRRL B-67129	GTTCGTCAT	TGGTGGGACC	ACAAATTAGT	AGCAGCAGTC	CGGTGACGGT	TTCTTCGATT	420

FIG. 15

【図 15-2】

[illegible]

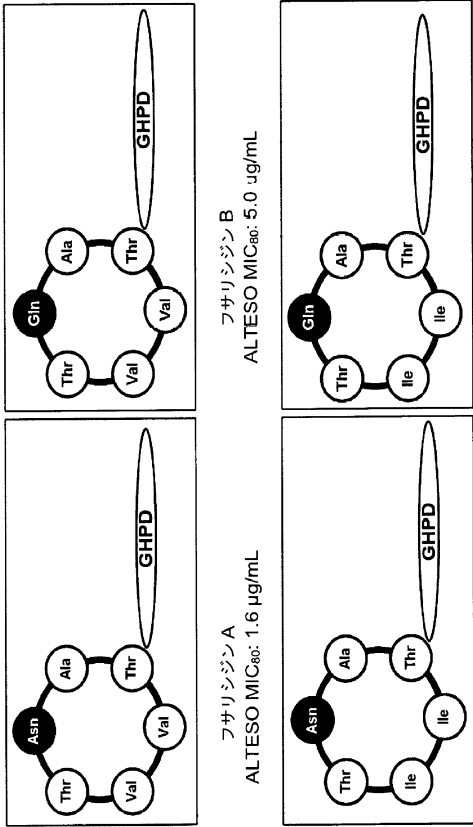
FIG. 15 (continued)

【図 16】

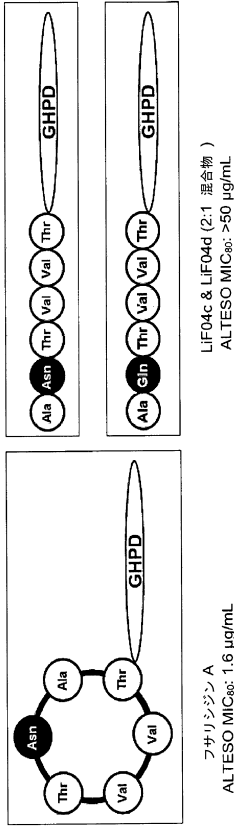
[illegible]

FIG. 16

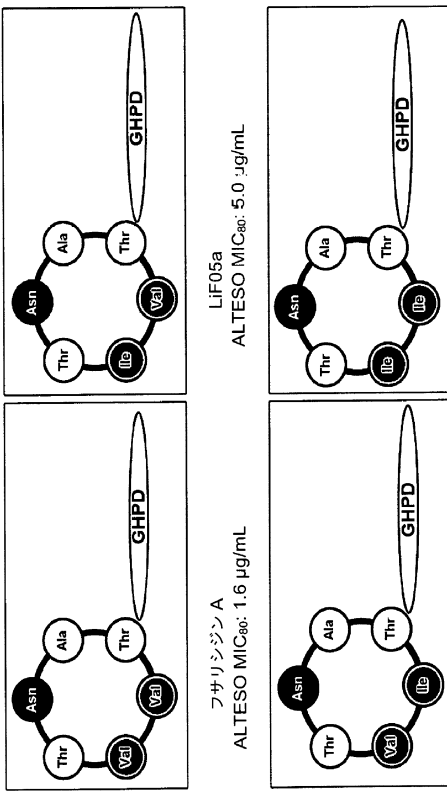
【図 17-1】



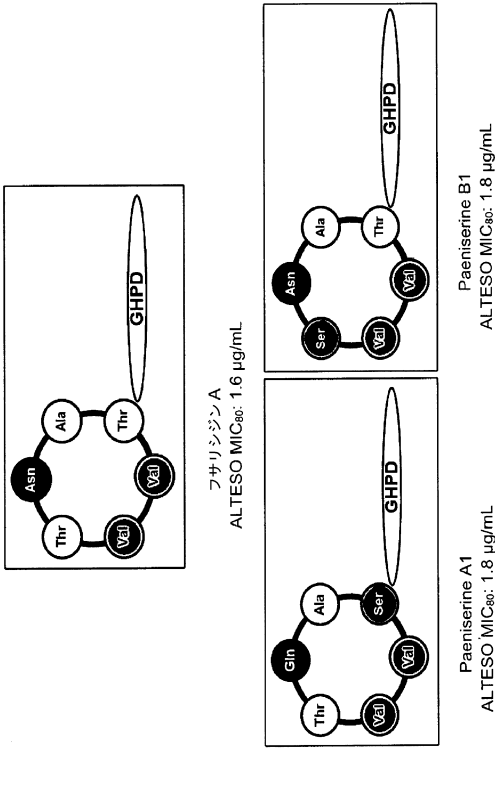
【図 17-2】



【図 17-3】

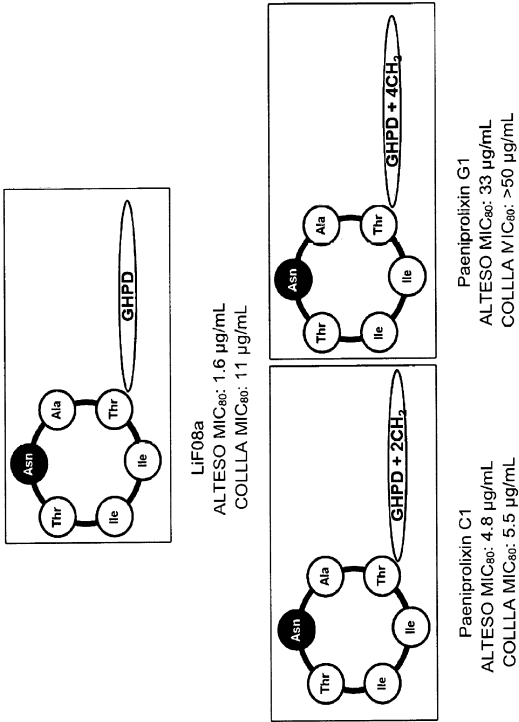


【図 17-4】



【 1 7 - 5 】

FIG. 17 (continued)



【配列表】
0007369741000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

微生物の受託番号 NRRL NRRL B-50972

NRRL NRRL B-67129

前置審査

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ボー, ジェレミー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95618、デイヴィス、エスタバン・コート・1306

(72)発明者 ジョー, ダニエル・エム

アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27601、ローリー、ファイエットビル・ストリート・301、ユニット・3204

(72)発明者 シュヴィーンテック, パトリック

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95618、デイヴィス、ラミータ・テラス・3652

(72)発明者 テイラー, コリーン・エス

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95630、フォルソム、ケナー・ウェイ・112

(72)発明者 トラーク, ビョルン・エー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・95616、デイヴィス、ルス・プレイス・138

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2006/016558 (WO, A1)

国際公開第2007/086645 (WO, A1)

Phytoparasitica, 2013年, Vol.41, pp.49-58

Tetrahedron, 2001年, Vol.57, pp.1189-1195

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

CAplus/REGISTRY (STN)

Google/Google Scholar