

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4765032号
(P4765032)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 H 17/08 (2006.01)	C O 7 H 17/08 Z
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00
C 1 2 P 19/62 (2006.01)	C 1 2 P 19/62

請求項の数 4 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-569801 (P2003-569801)	(73) 特許権者	390039192
(86) (22) 出願日	平成15年2月19日 (2003.2.19)		ダウ・アグロサイエンス・エル・エル・シ
(65) 公表番号	特表2005-520500 (P2005-520500A)		ー
(43) 公表日	平成17年7月14日 (2005.7.14)		D o w A g r o S c i e n c e s L L
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004998		C
(87) 国際公開番号	W02003/070908		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003.8.28)		6 8 インディアナポリス ザイオンズビ
審査請求日	平成18年1月27日 (2006.1.27)		ル ロード9 3 3 0
(31) 優先権主張番号	60/358,075	(74) 代理人	110000741
(32) 優先日	平成14年2月19日 (2002.2.19)		特許業務法人小田島特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	バーンズ, レスリー・エス
微生物の受託番号	NRRL NRRL 30539		イギリス・ケンブリッジシャー シービー
微生物の受託番号	NRRL NRRL 30540		1 1エルエイ・ケンブリッジ・ウイロー
微生物の受託番号	NRRL NRRL 30541		ウオーク2 6
微生物の受託番号	NRRL NRRL 30542		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規スピノシンを産生するポリケチド合成酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 伸長モジュールと作動可能に会合されており配列番号 8 および配列番号 11 からなる群から選択される核酸配列によってコードされている異種負荷モジュールを含んでなる、生物学的に活性のスピノシンを産生するように土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 中で機能することが可能であるハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 8 の負荷モジュールをコードする核酸配列を含んでなる、請求項 1 記載のハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号 11 の負荷モジュールをコードする核酸配列を含んでなる、請求項 1 記載のハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

NRRL 30539、
NRRL 30540、
NRRL 30541、および
NRRL 30542

から選択される土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) の

生物学的に純粋な培養物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規ハイブリッドポリケチド合成酵素（PKS）、こうしたPKSをコードするDNA、ハイブリッドポリケチド合成酵素DNAを組み込むベクター、ハイブリッドポリケチド合成酵素DNAで形質転換された限定されるものでないが土壌放線菌（*Saccharopolyspora spinosa*）株を挙げることができる宿主生物体、スピノシン産生株により作成される産物を変えるためのハイブリッドポリケチド合成酵素DNAの使用法、およびこれらの操作により生成される新規の生物学的に活性の化合物

10

【背景技術】

【0002】

特許文献1に開示されるとおり、醗酵産物A83543は土壌放線菌（*Saccharopolyspora spinosa*）により産生される関連化合物の1ファミリーである。以前に単離されている天然のスピノシン化合物のファミリーが、多様な昆虫防除アッセイにおけるそれらの活性と一緒に特許文献2および特許文献3に記述されている。多数の半合成スピノシン類似物もまた特許文献4に記述されており、ここでスピノシン分子の化学的に接近可能な領域が多様な方法で成功裏に置換された。

【0003】

20

このファミリーの既知のメンバーは因子もしくは成分と称されており、そしてそれぞれが識別文字呼称を与えられている。これらの化合物は下でスピノシンA、Bなどと称する。スピノシン化合物は、クモ形類動物、線虫類および昆虫類、とりわけ鱗翅目（*Lepidoptera*）および双翅目（*Diptera*）種の防除に有用であり、また、それらは極めて環境に優しく、そして魅力的な毒物学的特徴を有する。商業的製品スピノサッド（*Spinosad*）はスピノシンAおよびDの混合物である（非特許文献1）。

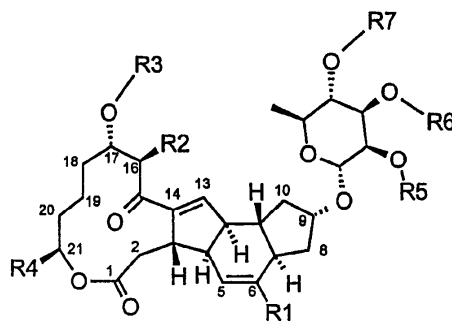
【0004】

表1および2は数種の既知のスピノシン化合物の構造を同定する：

【0005】

【表 1】

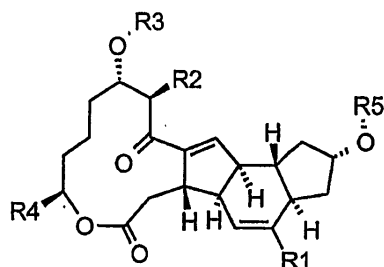
表 1



因子	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
スピノシン A	H	CH ₃	 (a)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン B	H	CH ₃	 (b)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン C	H	CH ₃	 (c)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン D	CH ₃	CH ₃	(a)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン E	H	CH ₃	(a)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン F	H	H	(a)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン A 17-Psa	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン D 17-Psa	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン E 17-Psa	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
スピノシン F 17-Psa	H	H	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃

【表 2】

表 2



因子	R1	R2	R3	R4	R5
スピノシン A 9-Psa	H	CH ₃	 (a)	C ₂ H ₅	H
スピノシン D 9-Psa	CH ₃	CH ₃	(a)	C ₂ H ₅	H
スピノシン A アグリコン	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	H
スピノシン D アグリコン	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	H

【0007】

天然で産生されるスピノシン化合物は12員の大環状ラクトンに縮合された5, 6, 5-三環系、中性糖（ラムノース）およびアミノ糖（ホロサミン）よりなる（非特許文献2を参照されたい）。アミノ糖が存在しない場合、該化合物はA、Dなどのプソイドアグリコンと称され、また、中性糖が存在しない場合には、該化合物はA、Dなどの逆プソイドアグリコンと称される。より好ましい一命名法は、プソイドアグリコンをスピノシンA 17-Psa、スピノシンD 17-Psaなど、また、逆プソイドアグリコンをスピノシンA 9-Psa、スピノシンD 9-Psaなどと称することである。

【0008】

天然で産生されるスピノシン化合物は、培養物NRRL 18395、18537、18538、18539、18719、18720、18743および18823からの醗酵を介して製造されうる。これらの培養物は寄託されかつ米国農務省農業研究部門中西部地域北部地方研究センター（the Midwest Area Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture）、1815 North University Street, Peoria, IL 61604のストック培養物コレクションの一部をなしている。

【0009】

特許文献1および対応する特許文献5はスピノシンA、B、C、D、E、F、G、HおよびJを開示する。これらの化合物は、NRRL 18395、NRL 18537、N

R R L 18538およびNRRL 18539から選択される新規微生物、土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) のある株を培養することにより産生されるとして開示されている。

【0010】

特許文献6はスピノシンL、M、N、Q、R、SおよびTを開示する。その中にはまた2種のスピノシンJ産生株すなわちNRRL 18719およびNRRL 18720、ならびにスピノシンQ、R、SおよびTを産生する株すなわちNRRL 18823もまた開示される。

【0011】

特許文献7および特許文献8はスピノシンK、O、P、U、V、WおよびYならびにそれらの誘導体を開示する。スピノシンK産生株NRRL 18743もまた開示される。

【0012】

特許文献3は、サッカロポリスポラ属 (*Saccharopolyspora*) 種LW107129 (NRRL 30141) を培養することにより産生されるスピノシン類似物を開示する。

【0013】

特許文献9および特許文献10は、土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) からのスピノシン生合成遺伝子を開示する。

【0014】

スピノシン生合成に関与する遺伝子の性質は、前駆体取り込みの以前の研究 (非特許文献3) と一緒に、ポリケチド (環化されかつ架橋される) を生成させる2-炭素および3-炭素のカルボン酸の段階的縮合によりスピノシンが産生されることを示す。これらの反応の四環性アグリコン産物はラムノシル残基の付加によりプソイドアグリコンに転化され、そして、ジ-N-メチル化糖ホロサミンの付加により合成が完了する。いくつかの局面において、この過程は、(抗生物質エリスロマイシン、駆虫薬アベルメクチンおよび免疫抑制剤ラバマイシンのような) 他のマクロライドが産生される生合成経路に類似である。とりわけ、ポリケチド核は、I型ポリケチド合成酵素 (spn PKS) である非常に大きな多機能タンパク質により集成される。このポリペプチド複合体は1個の負荷モジュール (loading module) および10個の伸長モジュールを含んでなり、各モジュールは、成長するポリケチド鎖への特定のアシル-CoA前駆体の付加およびβ-ケトカルボニル基の還元程度の双方の原因である。各モジュールは該ポリペプチドの特定のドメインにより実施される数種の生化学反応を実施する。全部の伸長モジュールは、前駆体からのアシル基をアシル担体タンパク質 (ACP) ドメインに供与するアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメイン、および脱カルボキシル的縮合により新規アシル-ACPに既存のポリケチド鎖を付加するβ-ケト合成酵素 (KS) ドメインを含有する。付加的なドメインが数種の伸長モジュール中に存在する。すなわち、β-ケト還元酵素 (KR) ドメインはβ-ケト基をヒドロキシルに還元し、脱水素酵素 (DH) ドメインはヒドロキシルを除去して二重結合を残し、また、エノイル還元酵素 (ER) ドメインは二重結合を還元して飽和炭素を残す。spn PKSの負荷モジュールは、それがバリエーションKSドメイン (KSq) ならびにATおよびACPドメインを含有するために伸長モジュールと異なる。数種の他のI型PKS負荷モジュール (しかし全部ででない) 中でもまた見出されるKSqドメインは、ACPに結合したアシル鎖の脱カルボキシル化により、不可欠の開始体 (starter) ユニットを提供すると考えられている (非特許文献4)。末端の伸長モジュールは、PKSからポリケチド鎖を遊離させるチオエステラーゼ/シクラゼ (TE) ドメインを含有する。

【0015】

スピノシンPKSのDNA領域は、他のマクロライド産生細菌中のPKS ORFに類似の数個のACPドメインの末端にインフレームの終止コドンをもつ5個のORFよりなる。該5種のスピノシンPKS遺伝子は、エリスロマイシンPKS遺伝子AIとAIIとの間に見出される挿入要素のようないかなる介在する非PKS機能も伴わずに頭-尾結合

10

20

30

40

50

で配置される（非特許文献5）。それらは *spnA*、*spnB*、*spnC*、*spnD* および *spnE* と称される。該5種のスピノシンPKS遺伝子のそれぞれのヌクレオチド配列および対応するポリペプチドは特許文献10および非特許文献6に同定されている。PKS遺伝子の予測される翻訳産物、ならびにドメインおよびモジュールの境界もまたこれらの出典にて同定されている。

【0016】

それが合成された後に、スピノシンポリケチド前駆体は縮合して大環状ラクトン（下でポリケチド核と称される）を形成する。殺虫活性スピノシンの産生はポリケチド核の付加的なプロセッシングを必要とする。最初に、C3とC14、C4とC12およびC7とC11との間で炭素-炭素架橋が形成されてアグリコン中間体を生成させなければならない。これらの異常な反応についての可能な機構が示唆されている（非特許文献6）が、しかしそれらが起こるために必要とされるポリケチド基質の構造的特徴は知られていない。第二に、トリ-O-メチルラムノースがC9に取り込まれてプソイドアグリコンを生成させなければならない。ラムノースがアグリコンへのその付加前もしくは後に通常メチル化されるかどうかは知られていないが、しかし土壌放線菌（*S. spinosa*）は、ラムノース部分がアグリコンに複合化した後にメチル基を付加することが可能である（非特許文献3）。メチル化は特定の順序（2'、その後3'、その後4'）で起こらなければならないか、もしくはそれらの全部が起こらなくてもよいことができ、メチルトランスフェラーゼが非常に特異的な基質要件を有することを示す。第三のプロセッシング段階すなわちC17でのホロサミンの付加は最も活性のスピノシンを生じるのに必要とされる。この段階に關与する酵素もまた厳格な基質要件を有する。すなわち、ホロサミニルトランスフェラーゼは基質としてアグリコンを使用しないことができ、また、N-メチルトランスフェラーゼはホロサミンがプソイドアグリコンに結合された後にそれに作用しないことができる。後の生合成酵素のこの基質特異性は、多様な化学構造をもつ前駆体からの新規の生物学的に活性のスピノシンの産生に対する障壁となりうる。

【0017】

ある場合には、ポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子は新規ポリケチドを提供するという目的を伴って以前に操作されている。エリスロマイシン産生（*ery*）PKSのモジュール5中のKRドメインの一部をコードするDNAのインフレーム欠失は、エリスロマイシン類似物すなわち5,6-ジデオキシ-3 α -ミカロシル-5-オキシエリスロノリドBおよび5,6-ジデオキシ-5-オキシエリスロノリドBの形成につながることを示されている（非特許文献5）。同様に、対応するPKSをコードするDNAの遺伝子操作およびサッカロポリスポラ エリトレア（*Saccharopolyspora erythraea*）へのその導入による*ery* PKSのモジュール4のERドメイン中の活性部位残基の変更は、6,7-アンヒドロエリスロマイシンCの産生に至った（非特許文献5）。特許文献11は、変えられたポリケチドを産生することが可能である*ery* PKS遺伝子の付加的な型の遺伝子操作を記述している。

【0018】

特許文献12は、多様な開始体ユニットを取り込んで新規エリスロマイシン類似物を作成するハイブリッドのI型PKS遺伝子を製造するためのアベルメクチン（*ave*）PKSからの負荷モジュールでの*ery* PKSの負荷モジュールの置換を開示する。

【0019】

しかしながら、PKS遺伝子の全部の操作が標的を定められた新規類似物を生じるわけでないこともまた見出されている。Donadioら（非特許文献5）が*ery* PKSのERドメインを不活性化した場合、生じるアンヒドロ誘導体は完全にプロセッシングされ得なかった。それはもはやミカロース-O-メチルトランスフェラーゼの基質でなかったためである。ポリケチド開始体ユニットの変更は、アミコラトプシス メディテラネイ（*Amycolatopsis mediterranei*）中でのリファマイシン類似物の完全な伸長および同化（*elaboration*）を妨げた（非特許文献7）。殺虫活性のスピノシンを生成させるのに必要とされる包括的な基質特異的プロセッシングを考えれ

ば、スピノシンポリケチドの構造を変える遺伝子改変が、有用な生物学的活性をもつ完全にプロセシングされた分子の合成を可能にすることは明白なことではない。しかしながら、こうした類似物を作成することができかつそれらが異なる範囲の殺虫活性を有する場合は、既知のスピノシンは全害虫を防除するわけではないため、それらは高度に望ましいであろう。

【特許文献1】米国特許第5,362,634号明細書

【特許文献2】米国特許第6,274,350 B1号明細書

【特許文献3】第WO 01/19840号明細書

【特許文献4】米国特許第6,001,981号明細書

【特許文献5】欧州特許出願第375316 A1号明細書

10

【特許文献6】第WO 93/09126号明細書

【特許文献7】第WO 94/20518号明細書

【特許文献8】米国特許第5,670,486号明細書

【特許文献9】第WO 99/46387号明細書

【特許文献10】米国特許第6,143,526号明細書

【特許文献11】第WO 93/13663号明細書

【特許文献12】第WO 98/01546号明細書

【非特許文献1】Pesticide Manual、第11版、p.1272

【非特許文献2】Kirstin(1991) "A83543A-D, unique fermentation-derived tetracyclic macrolide s." Tetrahedron Letts 32:4839-4842

20

【非特許文献3】Broughtonら、1991、"Biosynthesis of the macrolide insecticidal compound A83543 by Saccharopolyspora spinosa." Proceedings of Amer. Soc. Microbiol., ワシントンDC。

【非特許文献4】Bisangら、1999 "A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases." Nature 401:502-505

【非特許文献5】Donadioら、1993 "Recent developments in the genetics of erythromycin formation." In Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics. (Baltz, RH., Hegeman, GD. と Skatrud, PL. 編)、pp.257-265。アメリカ微生物学会(Amer. Soc. Microbiol.)、ワシントンDC

30

【非特許文献6】Waldronら、2001 "Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of Saccharopolyspora spinosa." Chem. Biol. 8:487-499

【非特許文献7】Hunzikerら、1998 "Primer unit specificity in rifamycin biosynthesis principally resides in the later stages of the biosynthetic pathway." J. Am. Chem. Soc. 120:1092-1093

40

【発明の開示】

【0020】

[発明の要約]

その局面の一において、本発明は生物学的に活性のスピノシンを産生させるように土壌放線菌(Saccharopolyspora spinosa)中で機能することが可能であるハイブリッドのスピノシンポリケチド合成酵素を提供し、前記ハイブリッドポリ

50

ケチド合成酵素は、複数の土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) の伸長体 (*extender*) モジュールと作動可能に会合した異種負荷モジュールを含んでなる。好ましい態様において、スピノシンの負荷ドメインはエリスロマイシン P K S もしくはアベルメクチン P K S の負荷ドメインで置換される。a v e および e r y 負荷ドメインは、それらが多様な開始体ユニットを受容するためにとりわけ興味深い。異種負荷モジュールがラパマイシン (シクロヘキセンカルボン酸) もしくはミクサチアゾール (3 - メチル絡酸) の負荷モジュールのような普通ではない開始体ユニットを取り込むハイブリッド P K S 遺伝子もまた有用である。必要とされる前駆体、例えばシクロヘキセンカルボン酸もしくは 3 - メチル絡酸は培地中に提供しうるか、もしくはそれらが内因的に合成されるようにそれらの生合成酵素をコードする遺伝子を生物体に工作してもよい。

10

【 0 0 2 1 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、生物学的に活性の 6 - エチルスピノシン化合物、16 - エチルスピノシン化合物、18 - エチルスピノシン化合物もしくは 20 - エチルスピノシン化合物を産生するように土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 中で機能することが可能であるハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素を提供し、前記ハイブリッドポリケチド合成酵素は、スピノシン P K S 中のそれぞれモジュール 8、3、2 もしくは 1 の A T ドメインの D N A がエチルマロニル - C o A を通常に取り込む A T ドメインの D N A で置換されるように改変されているスピノシンの生合成 D N A により産生される産物である。好ましい態様において、関連するスピノシン A T ドメインをコードする D N A は、タイロシン P K S のモジュール 5 もしくはモネンシン P K S のモジュール 5 の A T ドメインをコードする D N A で置換されている。好ましい態様において、ストレプトミセス シナモネンシス (*Streptomyces cinnamonensis*) のクロトニル - C o A 還元酵素が共発現される。

20

【 0 0 2 2 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、生物学的に活性の 18 - メチルスピノシン化合物もしくは 20 - メチルスピノシン化合物を産生するように土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 中で機能することが可能であるハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素を提供し、前記ハイブリッドポリケチド合成酵素は、スピノシン P K S 中のそれぞれモジュール 2 もしくは 1 の A T ドメインの D N A がメチルマロニル - C o A を通常に取り込む A T ドメインの D N A で置換されるように改変されているスピノシンの生合成 D N A により産生される産物である。

30

【 0 0 2 3 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、生物学的に活性の 16 - デスメチルスピノシン化合物を産生するように土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 中で機能することが可能であるハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素を提供し、前記ハイブリッドポリケチド合成酵素は、スピノシン P K S 中のモジュール 3 の A T ドメインの D N A がマロニル - C o A を通常に取り込む A T ドメインの D N A で置換されるように改変されているスピノシンの生合成 D N A により産生される産物である。好ましい態様において、モジュール 3 の A T ドメインはラパマイシン P K S のモジュール 2 の A T ドメインをコードする D N A で置換される。

40

【 0 0 2 4 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、スピノシン生合成経路とともにクロトニル - C o A 還元酵素を共発現するトランスジェニック宿主生物体を培養することを含んでなる、6 - エチルスピノシン化合物、21 - デスエチル - 21 - n - プロピルスピノシン化合物もしくは 6 - エチル - 21 - デスエチル - 21 - プロピルスピノシン化合物の製造方法を提供する。好ましい態様において、宿主生物体は、S . シナモネンシス (*S. cinnamonensis*) のクロトニル - C o A 還元酵素をコードする D N A で形質転換される。

【 0 0 2 5 】

50

その局面の別のものにおいて、本発明は、*S. シナモネンシス* (*S. cinnamensis*) のクロトニル - CoA 還元酵素をコードする DNA で形質転換されている土壤放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 株を提供する。

【0026】

その局面の別のものにおいて、本発明は、上述されたところの本発明のハイブリッドスピノシンポリケチド合成酵素をコードする DNA を提供する。

【0027】

その局面の別のものにおいて、本発明は上述されたところの DNA を含んでなるベクターを提供する。

【0028】

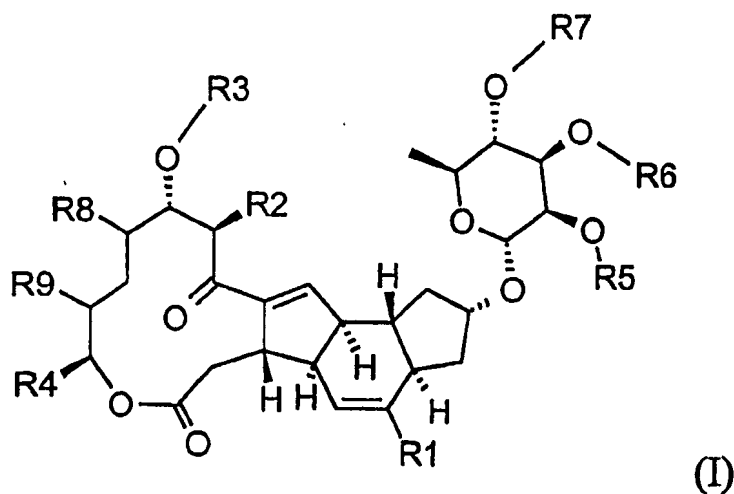
その局面の別のものにおいて、本発明は上述されたところの DNA を含んでなる宿主生物体を提供する。

【0029】

その局面のな別のものにおいて、本発明は、式 (I)

【0030】

【化1】



【0031】

式中、

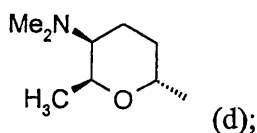
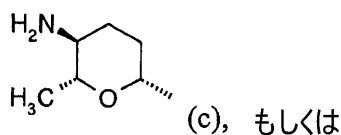
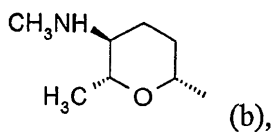
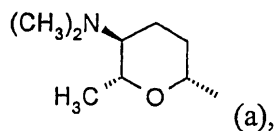
R 1 は水素、メチルもしくはエチルであり；

R 2 は水素、メチルもしくはエチルであり；

R 3 は、水素、

【0032】

【化 2】



10

【 0 0 3 3 】

であり；

20

R 4 はメチルもしくはエチルであり、そのいずれもハロ、ヒドロキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキルチオもしくはシアノから選択される 1 個もしくはそれ以上の基で置換されてよい；

R 4 は、α - 分枝状 C₃ - C₅ アルキル基、C₃ - C₈ シクロアルキル基もしくは C₃ - C₈ シクロアルケニル基であり、そのいずれもハロ、ヒドロキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキルチオもしくはシアノから選択される 1 個もしくはそれ以上の基で置換されてよい；あるいは、

R 4 は、飽和または完全にもしくは部分的に不飽和でありかつハロ、ヒドロキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキルチオもしくはシアノから選択される 1 個もしくはそれ以上の基で置換されてよい、O もしくは S を含有する 3 ~ 6 員の複素環基であり；

30

R 5 は水素もしくはメチルであり；

R 6 は水素もしくはメチルであり；

R 7 は水素もしくはメチルであり；

R 8 は水素、メチルもしくはエチルであり；

R 9 は水素、メチルもしくはエチルである、

の化合物；

あるいは、式 I の化合物の 5 , 6 - ジヒドロ誘導体

(但し；

a) R 4 がハロ、ヒドロキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキルチオもしくはシアノから選択される 1 個もしくはそれ以上の基で置換されるメチルもしくはエチルであるか；あるいは

40

b) R 4 が α - 分枝状 C₃ - C₅ アルキル基、C₃ - C₈ シクロアルキル基もしくは C₃ - C₈ シクロアルケニル基であり、そのいずれもハロ、ヒドロキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキルチオもしくはシアノから選択される 1 個もしくはそれ以上の基で置換されてよい；あるいは

c) R 4 が、飽和または完全にもしくは部分的に不飽和でありかつハロ、ヒドロキシ、C₁ - C₄ アルキル、C₁ - C₄ アルコキシ、C₁ - C₄ アルキルチオもしくはシアノから選択される 1 個もしくはそれ以上の基で置換されてよい、O もしくは S を含有する 3 ~ 6 員の複素環基であるか；あるいは、

50

d) R 1 もしくは R 2 がエチルであるか；あるいは
e) R 8 がメチルもしくはエチルであるか；あるいは
f) R 9 がメチルもしくはエチルである
を条件とする)
を提供する。

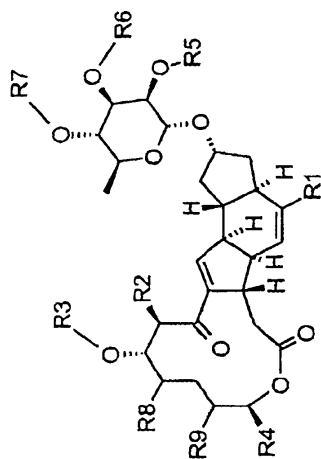
【 0 0 3 4 】

本発明により提供される具体的に説明する化合物を以下の表 3 に同定する。下で引用される化合物番号は表 3 中で同定される化合物を指す。

【 0 0 3 5 】

【表 3】

表3



(I)

化合物 番号	名称	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	21-デースイテル-21-シクロピテルスビシンA	H	CH ₃	(CH ₃) ₂ N H ₃ C (a)	シクロピテル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
2	21-デースイテル-21-シクロピテルスビシンD	CH ₃	CH ₃	(a)	シクロピテル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
3	21-デースイテル-21-シクロピテルスビシンA	H	CH ₃	(a)	シクロピテル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
4	21-デースイテル-21-シクロピテルスビシンD	CH ₃	CH ₃	(a)	シクロピテル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
5	21-デースイテル-21-メチルオメチルスビシンA	H	CH ₃	(a)	メチルオメチル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
6	21-デースイテル-21-メチルオメチルスビシンD	CH ₃	CH ₃	(a)	メチルオメチル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
7	21-デースイテル-21-シア/メチルスビシンA	H	CH ₃	(a)	シア/メチル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

【表 4】

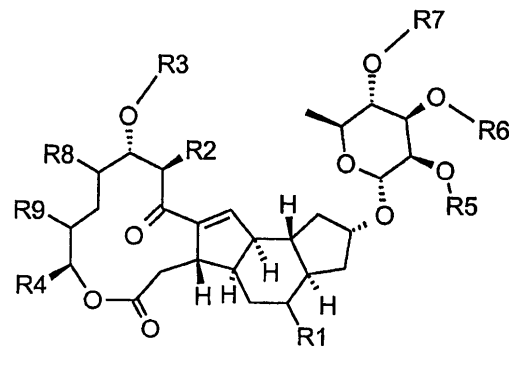
化合物 番号	名称	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
8	5,6-ジヒドロ-21-デシエチル-21-シクロプロピルスチレンA	H	CH ₃	(a)	シクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
9	21-デシエチル-21-イソプロピルスチレンA	H	CH ₃	(a)	イソプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
10	21-デシエチル-21-イソプロピルスチレンD	CH ₃	CH ₃	(a)	イソプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
11	21-デシエチル-21-sec-プロピルスチレンA	H	CH ₃	(a)	sec-プロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
12	21-デシエチル-21-sec-プロピルスチレンD	CH ₃	CH ₃	(a)	sec-プロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
13	21-デシエチル-21-メチルシクロプロピルスチレンA	H	CH ₃	(a)	メチルシクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
14	21-デシエチル-21-メチルシクロプロピルスチレンD	CH ₃	CH ₃	(a)	メチルシクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
15	21-デシエチル-21-(3-フリル)スチレンA	H	CH ₃	(a)	3-フリル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
16	21-デシエチル-21-(3-フリル)スチレンD	CH ₃	CH ₃	(a)	3-フリル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
17	21-デシエチル-21-シクロプロピルスチレンA17- フソイトアクリロン	H	CH ₃	H	シクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
18	21-デシエチル-21-シクロプロピルスチレンD17- フソイトアクリロン	CH ₃	CH ₃	H	シクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
19	21-デシエチル-21-シクロプロピルスチレンA17- フソイトアクリロン	H	CH ₃	H	シクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

【 0 0 3 7 】

【表 5】

化合物 番号	名称	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
20	21-テースイタル-21-シクロプロピルステリシノD17- ソイトアクリコ	CH ₃	CH ₃	H	シクロプロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
21	16-テースイタルステリシノD	CH ₃	H	(a)	イタル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
22	16-テースイタルステリシノD17-ソイトアクリコ	CH ₃	H	H	イタル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
23	21-テースイタル21-n-7-プロピルステリシノA	H	CH ₃	(a)	n-7-プロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
24	6-イタルステリシノA	C ₂ H ₅	CH ₃	(a)	イタル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
25	6-イタル-21-テースイタル-21-n-7-プロピルステリシノA	C ₂ H ₅	CH ₃	(a)	n-7-プロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
26	16-テースイタル-16-イタルステリシノA	H	C ₂ H ₅	(a)	イタル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
27	16-テースイタル-16-イタルステリシノD	CH ₃	C ₂ H ₅	(a)	イタル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
28	21-テースイタル-21-n-7-プロピルステリシノD	CH ₃	CH ₃	(a)	n-7-プロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
29	5,6-ジヒドロ-21-テースイタル-21-n-7-プロピルステリシノA	H	CH ₃	(a)	n-7-プロピル	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

式 I の化合物の 5 , 6 - ジヒドロ誘導体 (例えば表 3 中の化合物 8) は、式 I I :
 【 0 0 3 9 】
 【 化 3 】



10

【 0 0 4 0 】

式中、R 1、R 2、R 3、R 4、R 5、R 6、R 7、R 8 および R 9 は式 I について定義されたとおりである
 の化合物である。

【 0 0 4 1 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、

NRRL 30539、

20

NRRL 30540、

NRRL 30541 および

NRRL 30542

から選択される土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) の生物学的に純粋な培養物を提供する。

【 0 0 4 2 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、有効量の請求項 1 記載の化合物を有害生物に送達することを含んでなる有害生物の防除方法を提供する。

【 0 0 4 3 】

その局面の別のものにおいて、本発明は、適切な希釈剤もしくは担体と組合せの有効成分としての有効量の請求項 1 記載の化合物を含んでなる有害生物防除剤組成物を提供する。

30

[発明の詳細な説明]

培養物の記述

土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) NRRL 18537 もしくは土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) NRRL 18538 に由来しかつ本発明の化合物を産生する新規株を下の表で同定する。該培養物はブダペスト条約の規約に従い米国農務省農業研究部門中西部地域地方センター (the Midwest Area Regional Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture)、815 North University Street、Peoria、IL 61604 に寄託された。該株は 2001 年 1 月 15 日に寄託されかつ下の表 4 に詳述されたとおり寄託番号を割り当てられた。

40

【 0 0 4 4 】

【表 6】

表 4

寄託番号	株	親株
NRRL 30539	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 7D23	NRRL 18538
NRRL 30540	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 13E	NRRL 18537
NRRL 30541	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 21K2	NRRL 18538
NRRL 30542	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 36P4	NRRL 18538

10

【0045】

培養物の特徴

土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) NRRL 18537もしくは土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) NRRL 18538に由来しかつ本発明の化合物を産生する新規株は以下の培養物の特徴を有した：

全培養物はISP2およびベネットアガー上で良好に増殖し、また、使用した全培地で空中菌糸を生じた。空中芽胞塊は主として白色であった（老化とともに薄桃色を発色する）。基質菌糸体はクリーム色ないし淡黄褐色であり、特有の色素は明らかでなかった。溶解性の褐色色素が培地中に放出された。使用した培地のいずれでも有意差は観察されなかった。

20

スピノシン経路およびアクセサリ遺伝子の操作

スピノシン生合成経路の操作を助長するためにコスミドpRHB9A6およびpRHB3E11を得、そして米国特許第6,274,350 B1号明細書およびWaldrónら(2001)に記述されている。

【0046】

スピノシンの産生がどのように調節されているかは、スピノシン生合成遺伝子の配列からは直接明らかではない。遺伝子集団の調節に関連する潜在的複雑さを回避するために、多数の異種プロモーターを使用してポリケチド合成酵素部分の全部もしくは一部を駆動した（遺伝子spnA、spnB、spnC、spnDおよびspnE）。以下のプロモーター、すなわち、その同族のアクチベーターactII-ORF4（第WO 98/01546号明細書、第WO 98/01571号明細書、Roweら1998に記述されるところの）と一緒に使用されるS.コエリコロール (*S. coelicolor*) のアクチノロジン生合成クラスターからのactIプロモーター、および；プリスチナマイシンに対する耐性のプロモーターが、天然のプロモーターとしてスピノシンPKSの産生において少なくとも効率的である（最終産物スピノシンA、スピノシンD、スピノシンAC17-ブソイドアグリコンおよびスピノシンD C17-ブソイドアグリコンの産生により判断される）ことが見出された。後者はS.エリトレア (*S. erythraea*) からのポリケチド遺伝子の過剰発現を駆動することが以前に報告されている（Blancら1995；Sala-Beyら1995）。それはストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種において生理学的ストレスにより誘導され得るプロモーターである。土壌放線菌 (*S. spinosa*) における異種プロモーターの使用は上述されたものに制限されず、かつ、土壌放線菌 (*S. spinosa*) 中で機能することが期待されるとみられる他者を包含し得る。

30

40

異種負荷モジュールを使用するハイブリッドスピノシンPKS

その局面の一において、本発明は生物学的に活性のスピノシンにプロセッシングされるポリケチドを生成させるよう土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 中で機能的であるハイブリッドPKSを提供する。生じるポリケチドは天然のス

50

スピノシンと同一の長さまで伸長され、そして架橋およびグリコシル化によりプロセシングされて新規殺虫性スピノシンを生成した。好ましくは、ハイブリッドPKSは、異なる開始体ユニットを有するスピノシンポリケチドに至る異種負荷モジュールを伴うspnPKSからの伸長モジュールを含んでなる。異種負荷モジュールの後にspn伸長体モジュールを含有するハイブリッドスピノシンPKS遺伝子は、C21に多様な側鎖をもつ新規スピノシンを提供し得る。この側鎖の性質は、該負荷モジュールがポリケチド合成の開始のために選択する開始体ユニットにより決定される。側鎖の変化は生じるスピノシンの物理特性もしくは生物学的活性を変えるかもしれない。負荷モジュールが非天然の酸を包含する多くの異なるカルボン酸を受容するハイブリッドPKS遺伝子を提供することがとりわけ有用である。こうした遺伝子は多様な開始体ユニットの取り込みにより多くの異なるスピノシンを生成するのに使用し得る。例えば、spnPKSの負荷モジュールは広範な開始体ユニットを受容することが知られているavePKSの負荷モジュールにより置換し得る(Duttonら、1991)。eryPKSの負荷モジュールもまた代替の開始体ユニットを受容することが知られている(Paceyら、1998)。従って、こうしたハイブリッドスピノシンPKS遺伝子を発現する生物体は、生物体に供給されるカルボン酸によりC21の側鎖の性質が決定される新規スピノシンを産生し得る。側鎖は分枝もしくは環を伴う多様な長さのものであり得、かつ/もしくはヘテロ原子を含有し得る。

【0047】

より好ましくは、ハイブリッドPKSは、ハイブリッド遺伝子の集成を使用して多くの異なるスピノシンを産生し得るように多くの異なるカルボン酸を受容する負荷モジュールを包含する。とりわけ有用な例は、エリスロマイシン(ery)PKSからの負荷モジュールもしくはアベルメクチン(ave)PKSからの負荷モジュールとともにspn伸長モジュールを含有する。

a. ery負荷モジュールを使用するハイブリッドスピノシンPKS

エリスロマイシン生合成クラスターの負荷モジュール(eryAT0ACP0)はエリスロマイシン分子の開始体へのプロピオニル-CoAの導入を支配する。生産培地に遊離酸を供給することにより代替の開始体がエリスロマイシン分子中に取り込まれ得ることが以前に示されている(Paceyら 1998)。

【0048】

以下の実施例に示されるとおり、エリスロマイシンの負荷モジュールがスピノシンの負荷モジュールに取って代わったハイブリッドspnA遺伝子の生成は、開始体ユニット中に遊離酸を受容し得るスピノシンPKSに至る。以下の具体的に説明する実施例において、エリスロマイシンの負荷モジュールは、保存された領域中のちょうどKSドメイン内のスピノシンKS1の始めまでスプライスされた。新規ドメインもしくはモジュールの結合は、好ましくはドメイン内もしくはそれらの縁近くの保存されたDNA配列でなされるが；しかしながら、活性のポリケチド合成酵素は、あるいは、ドメイン間領域中のスプライス部位を工作することにより生成し得る(第WO 98/01546号明細書)。

【0049】

eryloadフラグメントを、天然のspnPKSとの相同的組換えを可能にするようにspnAの一領域とインフレームでかつその上流にクローン化した。eryloadの上流はactIプロモーター(P_{actI})もしくはプリスチナマイシンに対する耐性のプロモーター(P_{ptr})のいずれかであり、それぞれプラスミドpLSB61およびpLSB62を生じさせた。これらのプラスミドはpKC1132に基づき、そして従ってアブラマイシン耐性である。それらはまた放線菌類へのDNAの接合伝達のためのoriTも運搬する(Biermanら 1992、Matsushimaら 1994)。これらの構築物を接合により土壌放線菌(S. spinosa)NRRL 18537に形質転換した。外接合体は、適切なプロモーター下にハイブリッドのery/spnPKSを含有することがPCR増幅により確認された。

【0050】

土壤放線菌 (*S. spinosa*) NRRL 18537: pLSB62 を土壤放線菌 (*S. spinosa*) 13E と称し、そしてスピノシン産生の分析に使用した。

【0051】

以下の実施例に示されるとおり、生産培地中で培養した場合に、土壤放線菌 (*S. spinosa*) 13E はおよそ等量で主としてスピノシンAおよびスピノシンEを産生した。スピノシンの総収量は野性型スピノシンAのレベルのおよそ10~25%であると推定され、これはおよそ10倍のスピノシンEの収量の増大を表した。この変えられた産物比は、spn 負荷モジュールに関してのery 負荷モジュールのよりゆるい特異性の反映、もしくは*S. エリトレア* (*S. erythraea*) と比較しての土壤放線菌 (*S. spinosa*) の異なる基質供給の反映、または双方の組合せでありうる。ery load 10
による酢酸の取り込みは、*S. エリトレア* (*S. erythraea*) で、エリスロマイシン経路がアップレギュレートされる場合に観察されている (Roweら 1998)。株13Eにおける野性型のレベルを上回る、スピノシンEの収量の増大は、これがスピノシンEの産生のための好ましい株であるとみられることを意味している。

【0052】

多数のカルボン酸を土壤放線菌 (*S. spinosa*) 13E に供給し、変えられた開始体ユニットをもつ新規スピノシン類似物の産生に至った。同定された新規スピノシンは、21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンAおよびD (シクロプロパンカルボン酸の取り込みによる)、21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンAおよびD (シクロブタンカルボン酸の取り込みによる) ならびに21-デスエチル-21-メチルチオメチルスピノシンAおよびD (メチルチオ酢酸から) などであった。該新規類似物は理にかなったクロマトグラフィーの保持時間、特徴的なUV発色団およびMSフラグメンテーションパターンを示し、そして予測された構造は正確な質量測定により裏付けられた。単離された21-シクロプロピルおよび21-シクロブチル化合物の構造の割り当ては完全なNMRの特徴付けにより確認された。単離された化合物は昆虫防除アッセイで活性であった。 20

【0053】

土壤放線菌 (*S. spinosa*) 13E 株の使用はこれらの化合物の製造に制限されない。多数の他のスピノシン類似物が、新規エリスロマイシンを産生するのに使用されるもののような他の酸を供給することにより同定され得ることが期待される (Paceyら 30
1998)。

【実施例】

【0054】

実施例1 pCJR81の構築

図1を参照されたい。プラスミドpCJR81はプリスチナマイシンに対する耐性のプロモーター下でのポリケチド遺伝子の発現のためのベクターである。それは以下のとおり構築した:

2種のオーバーラップオリゴを、それらがプライマーおよび鋳型の双方として作用するPCR反応を実施するために設計した。それらはATG開始コドンを組み込むNdeI制限部位を導入するよう設計し、その結果、遺伝子をリボソーム結合部位からの至適の間隔を伴いクローン化し得る。さらなるクローン化を助長するためSpeI制限部位を組み込んだ。オリゴはPRIS1 (配列番号1) およびPRIS2 (配列番号2) である。 40

【0055】

プロモーターフラグメントを得るための増幅は、製造元の条件を使用してPwo熱安定性DNAポリメラーゼを用いて実施した。112bpのフラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、そしてSmaIで消化しかつ脱リン酸化した商業的に入手可能なpUC18にクローン化した。挿入物を含有するプラスミドを配列決定した。正しい配列を含有する1プラスミドをpRIS4と称した。

【0056】

pRIS4からの94bpの挿入物をSpeI/NdeIフラグメント (配列番号3) 50

として切り出し、そして、Spe IおよびNde Iで以前に消化していたpCJR24 (第WO 98/01546号明細書、第WO 98/01571号明細書、Roweら 1998)にクローン化した。1個の正しいプラスミドをpCJR81と称した。

実施例2 土壌放線菌(*S. spinosa*)からの発現のためのプラスミドの構築

図2を参照されたい。プラスミドpLSB2およびpLSB3を土壌放線菌(*S. spinosa*)中でのポリケチド遺伝子もしくはアクセサリ遺伝子の発現のため構築した。プラスミドpLSB2はact Iプロモーター(P_{act I})およびその同族のアクチベーターact II-ORF4を含有する。プラスミドpLSB3はブリスチナマイシンに対する耐性のプロモーター(P_{ptr})を含有する。これらのプラスミドは以下のとおり構築した:

プラスミドpKC1132(Biermanら 1992)は、伝達起点(oriT)、ならびに大腸菌(*E. coli*)および放線菌類双方での選択のためのアブラマイシン耐性マーカーを含有する。それは従って、大腸菌(*E. coli*)中でのDNA操作に使用可能でありかつ最終のプラスミドが接合により土壌放線菌(*S. spinosa*)に導入されることを可能にし得る。pKC1132のポリリンカーを、適切なEcoRV/Spe I/Nde I/Xba I制限部位を提供するために2種のオリゴCR311(配列番号4)およびCR312(配列番号5)のリンカーにより置換した。

【0057】

プラスミドpKC1132をPvu IIで消化しそして末端をエピアルカリホスファターゼで脱リン酸化した。オリゴCR311およびCR312をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、アニーリングしかつpKC1132_Pvu IIにクローン化してpLSB1を生成した。アクチノロジン経路特異的アクチベーターact II-ORF4およびact Iプロモーターを含有するSpe I/Nde IフラグメントをpCJR24(第WO 98/01546号明細書、第WO 98/01571号明細書、Roweら 1998)から単離し、また、ブリスチナマイシンに対する耐性のプロモーターを含有するSpe I/Nde IフラグメントをpCJR81(上述された、実施例1)から単離した。これらのフラグメントのそれぞれを、Spe IおよびNde Iで消化したpLSB1に独立にクローン化して、pLSB2(act II-ORF4およびP_{act I}を含有する)ならびにpLSB3(P_{ptr}を含有する)を生成した。

実施例3 スピノシンポリケチド合成酵素にエリスロマイシンポリケチド合成酵素の負荷モジュールを組み込むためのベクターの構築

図3を参照されたい。スピノシンポリケチド合成酵素にエリスロマイシンポリケチド合成酵素の負荷モジュールを組み込むためのベクターは、エリスロマイシン負荷モジュール(AT0ACP0)、次いで組込みのための相同性を提供するスピノシンPKSの第一モジュールの一領域を含有する。該ベクターをpLSB62と称し、そして以下のとおり構築した。

【0058】

エリスロマイシン負荷モジュールは、鋳型としてpCJR26(Roweら 1998)ならびにオリゴSP28(配列番号6)およびSP29(配列番号7)を使用するPCRにより増幅した。SP28はery配列の開始コドンにNde Iを組み込み、また、SP29はKS1ドメインの始めにNhe I部位を組み込む。

【0059】

PCRフラグメントをリン酸化し、ゲル精製し、そして以前にSma Iで消化しかつ脱リン酸化していたpUC18にクローン化した。クローンを挿入物の存在についてスクリーニングしかつ配列決定した。正しい配列を含有する1クローンをpLSB44と称した。それはポリリンカーのEcoRI部位近くにNhe I部位をもつ向きの挿入物を含有した。使用したエリスロマイシン負荷モジュールフラグメントのNde I部位からNhe I部位までの配列を配列番号8に示す。

【0060】

プラスミドpLSB8(実施例11に記述される)はspnKS1にNhe I部位で開

10

20

30

40

50

始する *spnA* の 1 フラグメントを含有する。エリスロマイシン負荷モジュールを含有するフラグメントを *pLSB44* から *NdeI* / *NheI* フラグメントとして切り出し、そして *NdeI* および *NheI* で以前に消化した *pLSB8* にクローン化して *pLSB56* を生じた。 *pLSB56* に含有されるフラグメントは、組込みが起こるのに十分である *spnA* に相同な領域を伴い、スピノシン *KS1* までインフレームでスプライスされるエリスロマイシン負荷モジュールを含有する。

【0061】

この領域を *NdeI* / *XbaI* フラグメントとして取り出し、そして *pLSB3* にクローン化して *pLSB62* を生じた。これは、接合により土壌放線菌 (*S. spinosa*) に伝達され得かつアブラマイシン耐性マーカーを使用して選択し得るベクター中で *P_{p_{tr}}* 下に新規 *ery* / *spn* ハイブリッドフラグメントを配置する。

実施例 4 スピノシン *PKS* の *KS1* に融合されたエリスロマイシン負荷モジュールを含んでなるハイブリッドポリケチド合成酵素をもつ土壌放線菌 (*S. spinosa*) 株の生成

図 4 を参照されたい。土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) *NRRL 18537* を、大腸菌 (*E. coli*) *S17-1* (*Simonら*, 1983) からの接合 (*Matsushimaら* 1994) により *pLSB62* で形質転換した。形質転換体をアブラマイシン耐性について選択しかつ *PCR* によりスクリーニングした。単一の形質転換体を土壌放線菌 (*S. spinosa*) *13E* 株と称した。

実施例 5 土壌放線菌 (*S. spinosa*) 醗酵の化学分析

以下の *HPLC* 法は、天然のスピノシンおよび新規の非天然の工作されたスピノシンの製造のための醗酵を分析するのに有用である。

【0062】

2 mL エッペンドルフチューブ中で、醗酵ブロスのアリコート (1 mL) を 20 % アンモニア溶液 (約 20 μ l) の添加により pH 約 10 に調節した。酢酸エチル (1 mL) をサンプルに添加し、そしてボルテックスを使用して 60 秒間活発に混合した。混合物を微小遠心機中での遠心分離により分離し、そして上層を清浄な 2 mL エッペンドルフチューブに取り出した。スピード - バック (*Speed-vac*) を使用する蒸発により酢酸エチルを除去した。残渣をメタノール (250 μ l) に溶解しかつ微小遠心機を使用して澄明にした。分析は以下の *HPLC* 系によった：

注入容量：50 μ l

カラム固定相：150 $\times$ 4.6 mm カラム、塩基不活性化シリカゲル 3 μ m (*Hypersil*) *C₁₈* - *BDS*)。

移動相 A：10 mM 酢酸アンモニウムおよび 0.15 % ギ酸を含有する 10 % アセトニトリル：90 % 水。

移動相 B：10 mM 酢酸アンモニウムおよび 0.15 % ギ酸を含有する 90 % アセトニトリル：10 % 水。

移動相勾配：T = 0 分、10 % B；T = 1、10 % B；T = 25、95 % B；T = 29、95 % B；T = 29.5、10 % B。

流速：1 mL / 分。

検出：254 nm での UV；m/z 範囲 100 ~ 1000 にわたる MS。

実施例 6 土壌放線菌 (*S. spinosa*) *13E* の醗酵による代謝物の産生

土壌放線菌 (*S. spinosa*) *13E* を凍結栄養増殖ストック (*frozen vegetative stock*) (1:1 *CSM* 培養物：低温保存剤、ここで低温保存剤は水中 10 % 乳糖、20 % グリセロール w/v である) から培養した。一次前培養物 (*pre-culture*) は、2 インチ行程で 250 rpm で振とうされる鋼製ばね付き 250 mL 三角フラスコ中 50 mL の培養物中で *CSM* 培地 (トリプシン分解ダイズブロス 30 g/l、酵母抽出物 3 g/l、硫酸マグネシウム 2 g/l、ブドウ糖 5 g/l、麦芽糖 4 g/l；*Hosted* と *Baltz*, 1996；米国特許第 5,362,634 号明細書) 中で 30、75 % 相対湿度で 3 日間増殖させた。これを使用して、栄養増殖

10

20

30

40

50

培地 (vegetative medium) (ブドウ糖 10 g / l、N - Z - アミン A 30 g / l、酵母抽出物 3 g / l、硫酸マグネシウム 2 g / l ; Strobel と Nakatsukasa 1993 ; 米国特許第 5 , 362 , 634 号明細書) 中の二次前培養物に 5 % v / v で接種し、これを同一条件下でさらなる 2 日間培養した。二次栄養増殖前培養物を使用して、生産培地 (ブドウ糖 67 g / l、プロフロー (Proflo) 綿実粉 25 g / l、ペプシン消化乳栄養素 22 g / l、コーンスティープリカー 12 g / l、オレイン酸メチル 40 g / l、炭酸カルシウム 5 g / l、水酸化ナトリウムを用いて pH を 7.0 に ; Strobel と Nakatsukasa 1993) に 5 % v / v で接種した。小スケールの生産培養物を前培養物と同一条件下でしかし 7 ~ 10 日間醗酵させた。初期の土壌放線菌 (S. spinosa) 13E 生産のため、小スケール培養物をばね付き 250 mL 三角フラスコ中の 30 mL の生産培地中で 7 日間増殖させた。

10

【0063】

産生された代謝物の同定のため、醗酵ブロスの 1 mL アリコートを実施例 5 に記述されたところの LC - MS により分析した。真正の標準品および形質転換されない土壌放線菌 (S. spinosa) NRRL 18537 株からの醗酵抽出物との比較により、土壌放線菌 (S. spinosa) 13E により産生された主要化合物はスピノシン A および E (およそ等量で産生される) ならびにスピノシン D (少量の産物として観察された) と同定された。土壌放線菌 (S. spinosa) 13E 株の力価は約 10 ~ 15 mg / l の総スピノシンであった。土壌放線菌 (S. spinosa) 13E の産物の比は NRRL 18537 と異なり、スピノシン E の相対的産生が有意に増大した。

20

実施例 7 土壌放線菌 (S. spinosa) 13E からの新規スピノシンの前駆体に指図される産生 (化合物 1 ~ 6 の製造)。

【0064】

ery / spn ハイブリッド PKS を使用して、生産培養物にカルボン酸を供給することにより新規スピノシン代謝物を生成させた。ery 負荷モジュールは分子の開始体内に該カルボン酸を取り込んだ。

【0065】

平行生産フラスコ (ばね付き 250 mL 三角フラスコ中 30 mL) に、上の実施例 6 に記述されたとおり接種した。24 時間後に、これらのそれぞれに、カルボン酸 (水中で作成しかつ水酸化ナトリウムで pH を 6.5 に調節したストック溶液) を 2 ~ 6 mM の最終濃度で供給した。7 日後に、醗酵ブロスの 1 mL アリコートを実施例 5 に記述されたところの LC - MS により分析した。新規の C21 修飾スピノシンを生成させるためのシクロブチルカルボン酸、シクロプロピルカルボン酸およびメチルチオ酢酸の取り込みが UV および MS クロマトグラム中の新規ピークの出現により示された (表 5)。新規化合物の MS スペクトルは [M + H]⁺ 種およびホロサミンフラグメント (142.3) のイオンを生じた。

30

【0066】

【表 7】

表5

供給したカルボン酸	化合物番号 (表3を参照 されたい)	保持時間(分)	重要な質量スペクトルデータ (m/z)
シクロロピルカルボン酸	1	23.5	744.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
シクロロピルカルボン酸	2	25.0	758.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
シクロチルカルボン酸	3	25.7	758.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
シクロチルカルボン酸	4	27.3	772.5 [M+H] ⁺ ; 142.2
メチルチオ酢酸	5	22.9	764.4 [M+H] ⁺ ; 142.3
メチルチオ酢酸	6	24.3	778.5 [M+H] ⁺ ; 142.3

【0067】

実施例 8 21 - デスエチル - 21 - シクロブチルスピノシン A および D (化合物 3 および 4) の産生および単離

土壌放線菌 (*S. spinosa*) 13E の凍結栄養増殖ストックを、CSM 中の一次栄養前培養物 (ばね付き 250 mL 三角フラスコ中でインキュベートされる 50 mL) に接種した。栄養増殖培地 (ばね付き 2 L 三角フラスコ中でインキュベートされる 250 mL) 中の二次前培養物を調製し、そして実施例 6 に記述されたとおりしかし 1 インチ行程で 300 rpm でインキュベートした。

【0068】

12 ないし 14 L の生産培地を、0.01% v/v のプルロニック (Pluronic) L-0101 (BASF) 消泡剤の添加を伴い実施例 6 でのとおり調製した。生産培地に 5% v/v の二次栄養増殖前培養物を接種し、そして 30 で 7 ~ 10 日間、20 L の攪拌されるバイオリアクター中で醗酵させた。気流を 0.75 vvm に設定し、過剰圧を 0.5 barg もしくはそれより下に設定し、また、溶解酸素圧を空気飽和の 30% もしくはより上に維持するために羽根車先端速度を 0.39 と 1.57 ms⁻¹ の間で制御した。必要とされる場合は追加のプルロニック (Pluronic) L0101 (BASF) を添加して起泡を制御した。シクロブチルカルボン酸を 25 時間に 5 mM の最終濃度までバイオリアクターに添加した。醗酵ブロス を 7 日後に収集し、そして遠心分離により澄清にして上清および細胞を提供した。等容量のメタノールと徹底的に混合することにより細胞 (1 L) を抽出し、その後 30 分間静置させた。細胞 - メタノールのスラリーを遠心分離しそして上清をデカンテーション分離した。該手順を反復した。醗酵上清 (12 L) は 5 N NaOH の添加により pH 約 10 に調節し、そして 0.75 容量の酢酸エチルとともに穏やかに 8 時間攪拌した。上層を吸引により除去しかつ抽出を反復した。酢酸エチルおよびメタノール画分を合わせ、そして溶媒を真空中で除去して黄褐色の油 / 水性混合物 (1 L) を生じた。これを酢酸エチル (2 L) と混合しかつ 50 mM 酒石酸の溶液 (3 × 1.5 L) で抽出した。酒石酸抽出液を合わせ、5 N NaOH で pH 約 10 に調節し、そして酢酸エチル (3 × 1.5 L) で抽出した。酢酸エチル抽出液を合わせかつ溶媒を真空中で除去して褐色の油状残渣 (7.5 g) を残した。残渣を酢酸エチル (500 mL) に溶解しかつ 50 mM 酒石酸 (350 mL) で 3 回抽出した。酒石酸画分を合わせ、p

H約10に調節しかつ酢酸エチル(3×500mL)で再抽出した。酢酸エチル画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去して褐色油状残渣(0.5g)を生じた。

【0069】

該油状残渣をメタノール(1.5mL)に溶解し、そして、21mL/分の流速で下述されるところの移動相勾配で溶出する塩基不活性化逆相シリカゲル(ハイパーシル(Hypersil)C₁₈-BDS、5μm; 21×250mm)で、2つの等部分でクロマトグラフィー分離した。

移動相勾配: T=0分、15%B; T=5、35%B; T=35、90%B; T=45、95%B。

移動相A: 10mM酢酸アンモニウムおよび0.15%ギ酸を含有する10%アセトニトリル/90%水。

移動相B: 10mM酢酸アンモニウムおよび0.15%ギ酸を含有する90%アセトニトリル/10%水。

【0070】

画分は30秒ごとに収集した。21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンAを含有した最初の分画からの画分を合わせ、そして溶媒を真空中で除去した。残渣を、5mL/分の流速で下述されるところの勾配で溶出する逆相シリカゲル(プロディジー(Prodigy)C₁₈、5μm; 10×250mm)でクロマトグラフィー分離した。

T=0、55%B; T=5、70%B; T=35、95%B; T=45、95%B。

【0071】

画分は30秒ごとに収集した。21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンAを含有する画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてC₁₈-ボンドエリュート(BondElite)カートリッジ(200mg)を使用してサンプルを濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水(10mL)で洗浄しかつメタノール(2×10mL)で溶出し、その後溶媒を真空中で除去した。21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンDを含有した最初の粗分画からの画分を合わせ、そして溶媒を真空中で除去した。残渣は、5mL/分の流速で下述されるところの勾配で溶出する逆相シリカゲル(プロディジー(Prodigy)C₁₈、5μm; 10×250mm)でクロマトグラフィー分離した。

T=0分、25%B; T=5、55%B; T=35、95%B; T=45、95%B。

【0072】

画分は30秒ごとに収集した。21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンDを含有する画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてC₁₈-ボンドエリュート(BondElite)カートリッジ(200mg容量)を使用してサンプルを濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水(10mL)で洗浄しかつメタノール(2×10mL)で溶出し、そして溶媒を真空中で除去した。

【0073】

新規スピノシン類の化学構造は、核磁気共鳴分光法(NRM)、質量分析(MS)、紫外分光法(UV)、結合型高速液体クロマトグラフィー-質量分析(HPLC-MS)を包含する分光学的方法により、また、既知化合物スピノシンA、D、EおよびFのスペクトルデータとの比較により決定した。

【0074】

21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンA(化合物3)は以下の特徴を有する:

単離された収量: 3.1mg

分子量: 757

分子式: C₄₃H₆₇NO₁₀

UV(HPLC-MS分析の間のダイオードアレイ検出による): 245nm

電子スプレーMS: [M+H]⁺のm/z=758.5; m/z=142.2にホロサミンの糖フラグメントイオン。

10

20

30

40

50

正確な FT - ICR - MS : $[M + H]^+$ の $m/z = 758.4830$ (758.4838 を必要とする)。

【 0 0 7 5 】

表 6 は $CDCl_3$ 中の 21 - デスエチル - 21 - シクロブチルスピノシン A の 1H および ^{13}C NMR の化学シフトデータを示す。

【 0 0 7 6 】

【 表 8 】

表 6

位置	1H	^{13}C	位置	1H	^{13}C
1	-	172.8	21	4.80	
2a	2.43	33.8	22	2.34	
2b	3.12	33.8	23a	1.65	
3	3.01	47.5	23b	1.65	
4	3.54	41.7	24a	1.76	17.8
5	5.80	128.8	24b	1.76	-
6	5.88	129.3	25a	1.86	24.6
7	2.17	41.1	25b	1.86	-
8a	1.37	36.2	1'	4.85	95.4
8b	1.92	-	2'	3.49	77.7
9	4.31	76.0	3'	3.46	81.0
10a	1.33	37.3	4'	3.12	82.2
10b	2.26	-	5'	3.54	67.9
11	0.91	46.0	6'	1.28	17.8
12	2.88	49.4	2'-OMe	3.49	59.0
13	6.76	147.5	3'-OMe	3.50	57.7
14	-	144.2	4'-OMe	3.56	60.9
15	-	202.9	1''	4.42	103.4
16	3.26	47.8	2''a	1.47	30.8
16-Me	1.17	16.1	2''b	1.98	-
17	3.61	80.6	3''a	1.47	18.5
18a	1.49	34.4	3''b	1.98	-
18b	1.49	-	4''	2.26	64.8
19a	-	21.7	5''	3.84	73.5
19b	-	-	6''	1.26	19.0
20a	1.34	28.2	4''-NMe ₂	2.26	40.6
20b	1.44	-			

【 0 0 7 7 】

化学シフトは 7.26 ppm の $CHCl_3$ のプロトンに関係づけられる。

【 0 0 7 8 】

21 - デスエチル - 21 - シクロブチルスピノシン D (化合物 4) は以下の特徴を有した：

単離された収量：約 1 mg

分子量：771

分子式： $C_{44}H_{69}NO_{10}$

UV (HPLC - MS 分析の間のダイオードアレイ検出による)：245 nm

電子スプレーMS: $[M+H]^+$ の $m/z = 772.5$; $m/z = 142.2$ にホロサミン糖フラグメントイオン。

【0079】

物質の少ない量が本分子の詳細なNMR研究を妨げたが、しかし積算データは期待された構造と矛盾しなかった。この分析は21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンAのデータとの比較により補助された。

実施例9 5,6-ジヒドロ-21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンA(化合物8)および5,6-ジヒドロ-21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA(化合物29)の製造

2 mLのトルエンおよび0.5 mLのエタノール中の21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンA(3.1 mg、0.004 mmol)の溶液を低流の窒素で20分間パージし、その後2 mgのクロロトリス(トリフェニルホスフィン)ロジウムを添加し、そして溶液を60 °Cかつ1 atmで16時間水素化した。冷却および溶媒の除去後にそれぞれ0%、2%、3%、4%および5% MeOHを含有するジクロロメタンの5×25 mL画分で溶出する10 cm×2 cmシリカゲルカラムを使用して残渣をクロマトグラフィー分離した。生成物を含有する画分を合わせかつ濃縮して2.1 mgの5,6-ジヒドロ-21-デスエチル-21-シクロブチルスピノシンAを生じた。MS M^+ 760。

【0080】

5,6-ジヒドロ-21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA(化合物29)は同一の手順を使用して21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA(化合物23)から製造した。

実施例10 21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンAおよびD(化合物1および2)の製造および単離

土壌放線菌(*S. spinosa*) 13Eの凍結栄養増殖ストックをCSM(ばね付き250 mL三角フラスコ中でインキュベートされる50 mL)中の一次栄養増殖前培養物に接種した。栄養増殖培地(ばね付き2 L三角フラスコ中でインキュベートされる250 mL)中の二次前培養物を実施例8に記述されるとおり調製しかつインキュベートした。

【0081】

14リットルの生産培地を、0.01% v/v プルロニック(Pluronic) L-0101(BASF)消泡剤の添加を伴い実施例6でのとおり調製した。生産培地に5% v/vの二次前培養物を接種し、そして20 Lの攪拌されるバイオリアクター中で実施例8に記述された条件下で7~10日間醗酵させた。シクロプロピルカルボン酸を45時間に5 mMの最終濃度までバイオリアクターに供給した。醗酵ブ罗斯を7日後に収集しかつ実施例8に記述されたとおり抽出した。

【0082】

油状残渣をメタノール(1.5 mL)に溶解し、そして最初に、実施例8に記述されたとおり粗にクロマトグラフィー分離した。21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンAを含有した最初の分離からの画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去した。残渣は、5 mL/分の流速で下述されるところの勾配で溶出する逆相シリカゲル(プロディジー(Prodigy) C₁₈、5 μm; 10×250 mm)でクロマトグラフィー分離した。

T = 0分、55% B; T = 70% B; T = 30、95% B; T = 35、95% B。

【0083】

画分は30秒ごとに収集した。21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンAを含有する画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてサンプルをC₁₈-ボンドエリユート(Bond Elute)カートリッジ(200 mg)を使用して濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水(10 mL)で洗浄しかつメタノール(2×10 mL)で溶出し、そしてその後溶媒を真空中で除去した。

【0084】

21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンA(化合物1)は以下の特徴を有

する：

単離された収量：約 1 m g

分子量：743

分子式： $C_{42}H_{65}NO_{10}$

UV (HPLC - MS 分析の間のダイオードアレイ検出による)：245 nm

電子スプレーMS： $[M+H]^+$ の $m/z = 744.5$ ； $m/z = 142.2$ にホロサミン糖フラグメントイオン。

【0085】

表7は $CDCl_3$ 中での21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンAの 1H および ^{13}C NMRスペクトルデータを要約する。

【0086】

【表9】

表 7

位置	1H	^{13}C	位置	1H	^{13}C
1	-	-	20b	1.62	-
2a	2.43	34.0	21	4.18	79.3
2b	3.13	-	22	0.89	16.5
3	3.00	47.3	23a*	0.44	2.3
4	3.49	41.4	23b*	0.14	-
5	5.87	129.1	24a*	0.44	3.7
6	5.79	128.6	24b*	0.14	-
7	2.15	-	25	1.17	16.0
8a	1.34	36.0	1'	4.84	95.2
8b	1.91	-	2'	3.49	77.5
9	4.30	75.9	3'	3.45	80.9
10a	1.32	37.0	4'	3.10	82.1
10b	2.24	-	5'	3.54	67.7
11	0.89	45.9	6'	1.27	17.6
12	2.85	34.0	2'-OMe	3.49	58.8
13	6.74	147.4	3'-OMe	3.48	57.5
14	-	-	4'-OMe	3.55	60.7
15	-	-	1''	4.41	103.4
16	3.26	47.5	2''a	1.47	30.8
17	3.62	80.6	2''b	1.98	-
18a	1.51	34.2	3''a	1.45	18.2
18b	1.51	-	3''b	2.24	-
19a	1.18	22.0	4''	2.24	64.7
19b	1.74	-	5''	3.48	73.4
20a	1.62	30.9	6''	1.27	18.7
			4''-NMe ₂	2.24	40.6

【0087】

化学シフトは7.26 ppmの $CHCl_3$ のプロトンに関係づけられる。

*これらの割り当ては互換性である。

【0088】

21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンD (化合物2) は以下の特徴を有する：

単離された収量：約 0.5 m g

分子量：757

分子式： $C_{43}H_{67}NO_{10}$

UV (HPLC - MS 分析の間のダイオードアレイ検出による)：245 nm

電子スプレーMS： $[M+H]^+$ の $m/z = 758.5$; $m/z = 142.2$ にホロサミン糖フラグメントイオン。

【0089】

物質の少ない量が本分子の詳細なNMR研究を妨げたが、しかし積算データは期待された構造と矛盾しなかった。この分析は21-デスエチル-21-シクロプロピルスピノシンAのデータとの比較により補助された。

b. ave 負荷ドメインを使用するハイブリッドのスピノシンPKS

10

アベルメクチン生合成クラスターの負荷モジュール (aveAT0ACP0) は、イソブチリル-CoA および 2-メチルブチリル-CoA 由来のアベルメクチン分子への C-2 分枝状開始体ユニットの導入を支配する。アベルメクチンの系の開始体ユニットの特異性を新規ポリケチドに与えるためのエリスロマイシン PKS 経路への本負荷ドメインのスイッチングの前例が存在する (第 WO 98/01546 号明細書、第 WO 98/01571 号明細書、Marsden ら 1998)。アベルメクチンの負荷モジュールはまた、その天然の環境でもしくは ave/ery ハイブリッド経路の一部としてのいずれかで、広範な遊離酸の CoA-エステルを生産培地から取り込むことも示されている (Pacey ら 1998)。文献に記述されているアベルメクチンの負荷モジュールの交換 (swap) は、実際にはアベルメクチン AT0ACP0 によるエリスロマイシン AT0ACP0 の置換である。これは開始コドンと SpeI 部位との間のアベルメクチン AT0 の上流のエリスロマイシン DNA 配列の一片に至る。N 末端領域 (相同な AT ドメインの上流) がアベルメクチンの負荷モジュール中でよりもエリスロマイシンのそれにおいてはるかにより大きくかつ該タンパク質の安定性に重要であるとみられるため、ave/ery 実験でこれを包含した。生じるハイブリッドは生産的であったため、その領域を ave/spn ハイブリッドに使用した。実際には生じるハイブリッド遺伝子は ery/ave/spn ハイブリッドであるが、しかし、それはアベルメクチン負荷モジュールの特異性をスピノシン PKS に伝達するため、それは、ave/spn ハイブリッド全体 (ave/spn hybrid through-out) と称されている。

20

【0090】

30

アベルメクチン負荷モジュール (AT0ACP0) を pIG1 (第 WO 98/01546 号明細書、第 WO 98/01571 号明細書、Marsden ら 1998) から P_{actI} もしくは P_{ptr} いずれかの制御下に spnKS1 のインフレームかつその上流にクローン化した。KS1 相同領域の始めの縁の同一のスプライス部位を上述された ery load の実験についてのとおり使用した。組込みのための相同領域は pRHB3E11 から取り込んだ。生じるプラスミド pLSB29 (P_{actI} の制御下にハイブリッド PKS 領域をもつ) および pLSB30 (P_{ptr} の制御下にハイブリッド PKS 領域をもつ) は pKC1132 に基づき、そして従って大腸菌 (E. coli) および土壌放線菌 (S. spinosa) 双方での選択のためのアブラマイシン耐性マーカーならびに大腸菌 (E. coli) から土壌放線菌 (S. spinosa) への DNA の接合伝達のための oriT を含有する (Bierman ら 1992、Matsushima ら 1994)。これらの構築物を接合により土壌放線菌 (S. spinosa) NRRL 18538 に形質転換した。外接合体は、適切なプロモーター下にハイブリッド ave/spn PKS 遺伝子を含有することが PCR 分析により確認された。

40

【0091】

土壌放線菌 (S. spinosa) NRRL 18538 : pLSB29 を土壌放線菌 (S. spinosa) 21K2 と称した。それは、負荷モジュールへの酢酸およびプロピオン酸の取り込みにより主としてスピノシン E、A および D を産生した。新規天然産物 21-デスエチル-21-イソプロピルスピノシン A および 21-デスエチル-21-sec-ブチルスピノシン A、ならびに同等の D 類似物と矛盾しなかった質量をもつ付加的

50

な小さなピークがLC-M Sで観察された。これらの少量の産物は開始体へのそれぞれイソ絡酸および2-メチル絡酸の取り込みに由来した。アベルメクチンの生合成それ自身において、ave 負荷モジュールはこれらの分枝状開始体のみを起用する。しかしながら、ave 負荷モジュールがエリスロマイシンPKS中でKS1の上流でスプライスされた場合に、より広範な範囲の産物が観察され、こうしたハイブリッドが酢酸およびプロピオン酸も同様に取り込む可能性があることを示す。われわれは、従って、この工作した土壌放線菌(*S. spinosa*)株からの期待される範囲の産物を観察した。

【0092】

単離された21-デスエチル-21-イソプロピルスピノシンAの構造をNMR特徴付けにより確認した。21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAは、21-デスエチル-21-イソプロピルスピノシンAの生産培養物から少量成分として単離された。おそらく培地から絡酸を採取する負荷モジュールにより作成される21-n-プロピル類似物もまた完全に特徴付けした。双方は昆虫防除アッセイで活性であった。

10

【0093】

アベルメクチンPKSの負荷モジュールの天然の応用可能性のいく分かは、以前にエリスロマイシンの系に伝達されており、従って変えられた開始体ユニットをもつスピノシンを生成するように広範な遊離酸を土壌放線菌(*S. spinosa*)21K2に供給した。どの酸が供給されたかおよび従ってどの化合物が各実験から期待されたかという知識と一緒に、UV発色団、質量および質量スペクトルのフラグメンテーションに基づき、新規スピノシン化合物が同定された。行われた構造予測を確認するため、新規C21開始体基をもつ多数のスピノシンを単離しかつ完全に特徴付けした。

20

【0094】

こうして使用し得る遊離酸は、限定されるものでないが以下、すなわちシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘキセニルおよび2-メチルシクロプロピルを包含する環状有機酸；2-フロ酸、3-フロ酸、チオフェンカルボン酸およびメチルチオフェンカルボン酸を包含するヘテロ原子含有環状有機酸；分枝状鎖カルボン酸；ならびにメチルチオ酢酸、クロロ酢酸、シアノ酢酸およびメトキシ酢酸を包含した数種の他の酸を挙げることができる。

【0095】

こうした供給実験は、C21がエチル以外の側鎖、一般には α -分枝状C2-C5アルキル基、C3-C8シクロアルキルもしくはシクロアルケニル基(場合によっては例えば1個もしくはそれ以上のヒドロキシ、C1-4アルキルもしくはアルコキシ基またはハロゲン原子で置換される)、あるいは飽和または完全にもしくは部分的に不飽和の場合によっては置換される(シクロアルキルに関して)OもしくはSを含有する3-6員の複素環をもつスピノシンの類似物(スピノシンは表1および2ならびに式Iに具体的に説明される型の22員の四環性核をもつマクロライドである)に至る。C21置換基の好ましい候補は、eryもしくはaveの負荷モジュールにより基質として使用できるカルボン酸ユニットの基である。好ましい基質はシクロブタンカルボン酸およびシクロプロパンカルボン酸を包含する。他の可能性はn-絡酸、イソプロピルカルボン酸、2-(S)-メチル絡酸、2-メチルシクロプロパンカルボン酸、3-フロ酸およびメチルチオ酢酸を包含する。

30

40

【0096】

分枝状鎖の酸、イソプロピルおよび2-メチルブチルカルボン酸の供給は、ave loadの正常な特異性により、作成される新規天然産物の収量を変えなかった。これらの産物は土壌放線菌(*S. spinosa*)21K2の全部の健全な培養物中で低収量で観察された。

【0097】

シクロブチルカルボン酸はave 負荷モジュールにより受容されてAおよびD類似物ならびにかなりの比率のA類似物のC17-プソイドアグリコンを生じた。シクロブチル産物は、供給されたハイブリッドery/spn系でより高レベルで観察された(21-デ

50

スエチル - 21 - シクロブチルスピノシン A が約 5 ~ 10 mg / リットル、21 - デスエチル - 21 - シクロブチルスピノシン D はより低いしかし有意のレベルで、および 21 - デスエチル - 21 - シクロブチルスピノシン A 17 - プソイドアグリコンが約 10 ~ 15 mg / リットルで)。シクロプロピルカルボン酸の供給もまた成功裏であり、21 - デスエチル - 21 - シクロプロピルスピノシン A および D を生じた。2 種のシクロブチル類似物およびシクロプロピル A 類似物は、ery load 実験から単離された精製された化合物に同一であることが示された。

【0098】

メチルチオ酢酸は取り込まれて上のシクロブチル実験のものに匹敵する収量で 21 - デスエチル - 21 - メチルチオメチルスピノシン A を生じた。これは ery load 実験からの同一化合物の産生を上回る収量の有意の改善であった。2 - フロ酸およびメチルシクロプロピルカルボン酸もまた取り込まれて期待された新規産物を生じた。

実施例 11 アベルメクチンポリケチド合成酵素の負荷モジュールをスピノシンポリケチド合成酵素に組み込むためのベクターの構築

図 5 を参照されたい。アベルメクチンポリケチド合成酵素の負荷モジュールをスピノシンポリケチド合成酵素に組み込むためのベクターは、アベルメクチンの負荷モジュール (AT0ACP0)、次いで組込みのための相同性を提供するスピノシン PKS の第一モジュールの一領域を含有する。該ベクターを pLSB29 と称し、そして以下のとおり構築した：

アベルメクチンの負荷モジュールは以前にエリスロマイシンのモジュール 1 の上流でプライスされている (第 WO 98 / 01546 号明細書、第 WO 98 / 01571 号明細書、Marsden ら 1998)。この ave / ery ハイブリッド中で、該負荷モジュールは始めに ery のアミノ酸配列をコードする DNA 配列、次いで ave PKS の AT0ACP0 を有した。このハイブリッドフラグメントはアベルメクチンの負荷ドメインの特異性を賦与したが、とは言えそれは少量の ery 配列を包含した。同一フラグメントを本実験で使用し、そして ery / ave / spn ハイブリッドタンパク質に至る。われわれはそれを単純に ave / spn ハイブリッドとして記述する。スピノシン経路に賦与されるのがアベルメクチンの負荷ドメインの特異性であるためである。該フラグメントは開始コドンを組み込む Nde I 部位で始まり、そして KS1 の始めの工作された Nhe I 部位で終わる。これはスピノシン KS1 配列中に 1 個の保存的アミノ酸変化 (Ile - Leu) を導入する。

【0099】

Nhe I 部位を導入するために、KS1 の始めからの spn A の領域を、鋳型として pRHB3E11 (米国特許第 6,274,350 B1 号明細書、Waldrón ら 2001)、ならびにオリゴ SP14 (配列番号 9) および SP15 (配列番号 10) を使用する PCR により増幅した。SP14 は塩基 24107 - 24112 (番号は米国特許第 6,274,350 号明細書の配列番号 1 を指す) に Nhe I 部位を導入する。SP15 はおよそ 1500 bp 下流の BstEII 部位 (25646 - 25652) で結合する。その後のクローニング段階のため NotI 部位もまた SP15 に組み込んだ。PCR は標準的条件下で Pwo 熱安定性ポリメラーゼを使用して実施した。

【0100】

PCR 産物をリン酸化し、ゲル精製し、そして以前に SmaI で消化しかつ脱リン酸化していた pUC19 にクローン化した。多数の挿入物含有クローンを配列決定した。該ベクター中で Nhe I 部位を EcoRI 部位の隣に配置する向きの挿入物を含有する 1 クローンを pLSB5 と称した。

【0101】

組み込みのための十分に大きい相同領域を提供するために、およそ 2.6 kbp のフラグメント (BstEII から NotI まで) を pRHB3E11 から pLSB5 にクローン化して pLSB8 を生じた。

【0102】

10

20

30

40

50

その後、アベルメクチン負荷モジュールを p I G 1 (第 W O 98 / 01546 号明細書、第 W O 98 / 01571 号明細書、Marsden ら 1998) から Nde I / Nhe I フラグメントとしてクローン化し、そして以前に Nde I および Nhe I で消化した p L S B 8 に連結した。Nde I 部位から Nhe I 部位までの使用したアベルメクチン負荷モジュールフラグメントの DNA 配列を配列番号 11 に示す。生じるプラスミドを p L S B 14 と称した。

【0103】

p L S B 14 に含有されるフラグメントは、組み込みが起こるのに十分である s p n A に相同な領域を伴い、インフレイムでスピノシン K S 1 までスプライスされたアベルメクチン負荷モジュールを含有する。

【0104】

このフラグメントをその後 Nde I / Xba I フラグメントとして取り出しそして p L S B 2 にクローン化して p L S B 29 を生じた。これは、接合により土壌放線菌 (S . s p i n o s a) に伝達されかつその後アブラマイシン耐性マーカーを使用して選択し得るベクター中で P a c t I 下に新規 a v e / s p n ハイブリッドフラグメントを配置する。実施例 12 スピノシン P K S の K S 1 に融合したアベルメクチン負荷モジュールを含んでなるハイブリッドポリケチド合成酵素をもつ土壌放線菌 (S . s p i n o s a) 株の生成

図 6 を参照されたい。土壌放線菌 (S a c c h a r o p o l y s p o r a s p i n o s a) N R R L 18538 を、大腸菌 (E . c o l i) S 17 - 1 (S i m o n ら、1983) からの接合 (M a t s u s h i m a ら 1994) により p L S B 29 で形質転換した。形質転換体をアブラマイシンに対する耐性により選択しかつサザンブロット分析によりスクリーニングした。相同的組換えにより該プラスミドが染色体中に組込まれたことを示す正しいハイブリダイゼーションパターンを表す単一形質転換体を土壌放線菌 (S . s p i n o s a) 21K2 株と称した。

実施例 13 土壌放線菌 (S . s p i n o s a) 21K12 の醗酵による代謝物の製造 (化合物 9 ~ 12 の製造)

土壌放線菌 (S . s p i n o s a) 21K2 は、C S M 培地 (H o s t e d と B a l t z 1996 ; 米国特許第 5 , 362 , 634 号明細書) に接種するのに使用した凍結栄養増殖ストックから培養した。この前培養物を、1 インチ行程で 300 r p m で振とうされるフラスコ中、30 の温度で 3 日間増殖させた。これを使用して 5 % v / v で栄養増殖培地 (S t r o b e l と N a k a t s u k a s a 1993 ; 米国特許第 5 , 362 , 634 号明細書) に接種し、そして同一条件下でさらなる 2 日間培養した。栄養増殖培養物を使用して 5 % v / v で生産培地 (S t r o b e l と N a k a t s u k a s a 1993) に接種した。小スケールの生産培養物を、前培養物と同一条件下でしかし 2 インチ行程で 250 r p m かつ 75 % 相対湿度で 7 ~ 10 日間醗酵させた。初期の小スケール生産培養物はばね付き 25 m L 三角フラスコ中の 6 m L の生産培地中で 7 日間増殖させた。

【0105】

産生された代謝物を同定するために、醗酵ブロスの 1 m L アリコートを実施例 5 に記述されたところの L C - M S により分析した。真正の標準品および土壌放線菌 (S . s p i n o s a) N R R L 18538 株からの醗酵抽出物との比較により、土壌放線菌 (S . s p i n o s a) 21K2 により産生された主要化合物はスピノシン A、D および E であった。スピノシン A が産生された主要成分であり、また、スピノシン類の総収量は約 50 m g / l であった。

【0106】

既知のスピノシン A、D および E に加え、4 種の新規化合物が明らかに存在した。これらの新規化合物についてのクロマトグラフィーの保持時間および質量スペクトルデータ (表 8) は、分枝状鎖開始体ユニット (イソプロピルカルボン酸および 2 - メチル絡酸) の取り込みによるそれらの合成と矛盾しなかった。新規化合物の M S スペクトルは [M + H] + 種およびホロサミンフラグメント (142 . 3) のイオンを生じた。イソプロピルカ

10

20

30

40

50

ルボン酸供給由来の化合物は 2 - メチル酪酸由来のものより 2 ~ 3 倍より高レベル存在した。新規化合物は存在する全スピノシンの 5 % 未満を含んだ。

【 0 1 0 7 】

【 表 1 0 】

表8

カルボン酸開始体ユニット	化合物番号(表3を参照されたい)	保持時間(分)	重要な質量スペクトルデータ (m/z)
イソプロピルカルボン酸	9	25.1	746.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
イソプロピルカルボン酸	10	26.3	760.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
2-メチル酪酸	11	26.7	760.4 [M+H] ⁺ ; 142.3
2-メチル酪酸	12	27.5	774.5 [M+H] ⁺ ; 142.3

10

【 0 1 0 8 】

実施例 1 4 土壌放線菌 (*S . spinosa*) 2 1 K 2 から新規スピノシンの前駆体に指図される製造 (化合物 1 ~ 6 および 1 3 ~ 2 0 の製造)

a v e / s p n ハイブリッド P K S を使用して、生産培養物にカルボン酸を供給することにより新規スピノシン代謝物を生成させた。アベルメクチン負荷モジュールは該分子の開始体内に該カルボン酸を取り込んだ。

20

【 0 1 0 9 】

平行 6 m L 生産フラスコに上の実施例 1 3 に記述されたとおり接種した。2 4 時間後にこれらのそれぞれに 3 m M の最終濃度のカルボン酸 (水中で作成しかつ水酸化ナトリウムで p H を 6 . 5 に調節したストック溶液) を供給した。7 日後、醗酵ブ罗斯の 1 m L アリコートを実施例 6 および 1 2 に記述されたところの L C - M S により分析した。シクロブチルカルボン酸、シクロプロピルカルボン酸、2 - メチルシクロプロピルカルボン酸、メチルチオ酢酸および 3 - フロ酸の取り込みは、U V および M S クロマトグラム中の新規ピークの出現により示されるとおり、新規 C 2 1 修飾スピノシンを提供した (表 9) 。新規化合物の質量スペクトルは [M + H] ⁺ 種およびホロサミンフラグメント (1 4 2 . 3) のイオンを生じた。加えて、シクロブチルおよびシクロプロピルカルボン酸の供給は、対応する 1 7 - プソイドアグリコンの有意の蓄積もまた引き起こした。

30

【 0 1 1 0 】

【表 1 1】

表9

供給されたカルボン酸	化合物番号 (表3を参照 されたい)	保持時間(分)	重要な質量スペクトルデータ (m/z)
シクロブチルCA	2	25.7	758.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
シクロブチルCA	3	27.2	772.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
シクロプロピルCA	1	23.5	744.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
シクロプロピルCA	2	25.1	758.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
2-メチルシクロプロピルCA	13	25.7	758.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
2-メチルシクロプロピルCA	14	26.9	772.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
メチルチオ酢酸	5	22.9	764.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
メチルチオ酢酸	6	24.4	778.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
3-フロ酸	15	22.9	770.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
3-フロ酸	16	24.3	784.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
シクロブチルCA	19	27.1	639.4 [M+Na] ⁺
シクロブチルCA	20	28.6	653.4 [M+Na] ⁺

【0111】

21 - シクロブチルおよびシクロプロピル化合物は、ery load 株、土壌放線菌 (S. spinosa) 13E に供給することから単離された化合物に比較して、正しい構造と確認された。

実施例 15 土壌放線菌 (S. spinosa) 21K2 の大スケール醗酵からの新規代謝物の単離

土壌放線菌 (S. spinosa) 21K2 の凍結栄養増殖ストックを、CSM (ばね付き 250 mL 三角フラスコ中でインキュベートされる 50 mL) 中の土壌放線菌 (S. spinosa) 21K2 の一次栄養増殖前培養物に接種した。栄養増殖培地 (ばね付き 2 L 三角フラスコ中でインキュベートされる 250 mL) 中の二次前培養物を実施例 6 に記述されるとおり調製しかつインキュベートした。

【0112】

14 リットルの生産培地を 0.01 % v/v プルロニック (Pluronic) L-0101 (BAS F) 消泡剤の添加を伴い実施例 6 でのとおり調製した。生産培地に 5 % v/v の二次前培養物を接種し、そして実施例 8 に記述された条件下で 20 L の攪拌されるバイオリアクター中で 7 ~ 10 日間醗酵させた。2 mM の最終濃度までの 2 - メチル絡酸を 26 および 37.5 時間にバイオリアクターに供給し、4 mM の総最終濃度に至った。醗酵ブロス を 7 日後に収集し、そして実施例 8 に記述されるとおり抽出した。

【0113】

油状残渣をメタノール (1.5 mL) に溶解し、そして最初に実施例 8 に記述されるとおりクロマトグラフィー分離した。21 - デスエチル - 21 - イソプロピルスピノシン A を含有した最初の分離からの画分を合わせそして溶媒を真空中で除去した。残渣を、5 mL / 分の流速で下述されるところの勾配で溶出する逆相シリカゲル (プロディジー (Prodigy) C₁₈, 5 μm; 10 × 250 mm) でクロマトグラフィー分離した。T = 0、55 % B; T = 5、70 % B; T = 35、95 % B; T = 45、95 % B。

【0114】

画分を 30 秒ごとに収集した。21 - デスエチル - 21 - イソプロピルスピノシン A を

含有する画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてC₁₈-ボンドエリュート (Bond Elute) カートリッジ (200 mg) を使用してサンプルを濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水 (10 mL) で洗浄しかつメタノール (2 × 10 mL) で溶出し、その後溶媒を真空中で除去した。

【0115】

乾燥したサンプルをメタノール (0.5 mL) に溶解しかつ逆相塩基不活性化シリカゲル (ハイパーシル (hyperasil) - C18 - BDS; 4.6 × 250 mm; 5 μm) でクロマトグラフィー分離した。カラムは酢酸アンモニウム (10 mM) - メタノール - テトラヒドロフラン (40 : 45 : 15) を用い 1 mL / 分の流速でアイソクラチックに溶出し、そして3種の主要成分をUV検出 (244 nm) 後に収集した。これらの条件下での保持時間は以下のとおりであった：スピノシンD : 64.4分、21-デスエチル-21-イソプロピルスピノシンA : 67.8分、および21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA : 75.3分。各サンプルを真空中で乾燥して白色固形物を生じ、これをそのNMRおよび質量スペクトルにより同定した。

10

【0116】

21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA (化合物23) は以下の特徴を有する。

分子量 : 745

分子式 : C₄₂H₆₇NO₁₀

UV (HPLC分析の間のダイオードアレイ検出による) : 244 nm

20

電子スプレーMS : [M+H]⁺ の m/z = 746.5 ; m/z = 142.2 にホロサミンの糖フラグメントイオン。

【0117】

表10はCDCl₃中の21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAの¹Hおよび¹³C NMRの化学シフトデータを要約する。

【0118】

【表 1 2】

表 10

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	-	172.5	20a	1.56	30.7
2a	3.13	34.1	20b	1.50	-
2b	2.42	-	21	4.77	75.3
3	3.03	47.5	22a	1.50	37.8
4	3.50	41.5	22b	1.39	-
5	5.81	128.8	23	1.28	18.3
6	5.89	129.3	24	0.99	14.0
7	2.19	41.1	1'	4.88	95.4
8a	1.94	36.2	2'	3.51	77.7
8b	1.35	-	3'	3.49	81.0
9	4.32	76.0	4'	3.13	82.2
10a	2.29	37.3	5'	3.56	67.9
10b	1.35	-	6'	1.30	19.0
11	0.92	45.9	2'-OMe	3.51	59.0
12	2.88	49.4	3'-OMe	3.51	57.7
13	6.78	144.1	4'-OMe	3.57	60.9
14	-	147.5	1''	4.43	103.5
15	-	202.9	2''a	1.99	30.9
16	3.30	47.6	2''b	1.49	-
16-Me	1.20	16.2	3''a	1.38	18.5
17	3.65	80.6	3''b	1.50	-
18	1.55	34.3	4''	2.25	64.8
18b	1.55	-	5''	3.49	73.5
19a	1.78	21.6	6''	1.28	17.8
19b	1.21	-	4''-NMe ₂	2.26	40.6

【0 1 1 9】

化学シフトは 7 . 2 6 p p m の C H C l ₃ のプロトンに関係づけられる。

【0 1 2 0】

2 1 - デスエチル - 2 1 - イソプロピルスピノシン A (化合物 9) は以下の特徴を有する。

分子量 : 7 4 5

分子式 : C _{4 2} H _{6 7} N O _{1 0}

UV (HPLC 分析の間のダイオードアレイ検出による) : 2 4 4 n m

電子スプレー MS : [M + H] ⁺ の m / z = 7 4 6 . 5 ; m / z = 1 4 2 . 2 にホロサミンの糖フラグメントイオン。

【0 1 2 1】

表 1 1 は C D C l ₃ 中の 2 1 - デスエチル - 2 1 - イソプロピルスピノシン A の ¹ H および ^{1 3} C NMR の化学シフトデータを要約する。

【0 1 2 2】

【表 13】

表 11

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	-	173	20a	1.52	27
2a	3.15	34	20b	1.52	-
2b	2.43	-	21	4.66	80
3	3.03	48	22	1.80	33
4	3.55	42	23	0.85	18
5	5.82	129	22-Me	0.83	18
6	5.90	129			
7	2.19	42	1'	4.87	96
8a	1.94	36	2'	3.51	78
8b	1.35	-	3'	3.47	81
9	4.32	76	4'	3.13	82
10a	2.28	37	5'	3.56	68
10b	1.38		6'	1.30	19
11	0.93	46	2'-OMe	3.51	59
12	2.90	50	3'-OMe	3.51	58
13	6.78	144	4'-OMe	3.58	61
14	-	147	1''	4.43	104
15	-	204	2''a	1.99	31
16	3.28	48	2''b	1.49	-
16-Me	1.19	16	3''a	1.38	19
17	3.63	81	3''b	1.50	-
18	1.52	35	4''	2.25	65
18b	1.52	-	5''	3.49	74
19a	1.80	22	6''	1.28	18
19b	1.19	-	4''-NMe ₂	2.26	41

【0123】

化学シフトは7.26 ppmのCHCl₃のプロトン；2D実験からの¹³Cデータに関係づけられる。

【0124】

推定の21-デスメチル-21-sec-ブチルスピノシンAを含有した最初の分画からの画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去しかつC₁₈-ボンドエリュート(BondElyute)カートリッジ(200mg)を使用して濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水(10mL)で洗浄しかつメタノール(2×10mL)で溶出し、その後溶媒を真空中で除去した。

【0125】

推定の21-デスメチル-21-sec-ブチルスピノシンA(化合物11)は以下の特徴を有する。

分子量：759

分子式： $C_{43}H_{69}NO_{10}$

UV (HPLC 分析の間のダイオードアレイ検出による)：244 nm

電子スプレーMS：[M+H]⁺の $m/z = 760.5$ ； $m/z = 142.2$ にホロサミンの糖フラグメントイオン。

S. シナモンシス (S. cinnamomensis) クロトニル-CoA還元酵素の共発現

別の局面において、本発明は、天然のポリケチド合成酵素が新規産物を産生するような変えられた基質供給を提示する工作された土壌放線菌 (S. spinosa) 宿主を提供する。例えば、スピノシン生合成経路との S. シナモンシス (S. cinnamomensis) クロトニル-CoA還元酵素の共発現は、負荷モジュールが付加的にエチルマロニル-CoAを取り込んで21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAおよびDを生じ、かつ、モジュール8のATが付加的にエチルマロニル-CoAを取り込んで6-エチルスピノシンAを生じる新規産物に至る。加えて、これらのATドメインの双方はエチルマロニル-CoAを受容して6-エチル-21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンを生じ得る。

【0126】

スピノシンの負荷モジュールは、プロピオン酸を取り込むためにメチルマロニル-CoAを主に脱カルボキシル化するKSqAT0ACP0を含んでなる。KSqを含有する負荷モジュールは一般にそれらを欠くものよりも特異的である。従って、スピノシンの負荷モジュールがときにマロニル-CoA (天然に生じる痕跡量のスピノシンE)を受容し、そして、ここで開示されるとおり予期しないことにエチルマロニル-CoAが存在する場合にそれを受容することは興味深くかつ異常である。

【0127】

この概念を裏付ける証拠については実施例18および実施例22にすぐ先行する考察を参照されたい。

異種伸長モジュールを伴うハイブリッドスピノシンPKS

その別の局面において、本発明は異種ATドメインとともに異種伸長モジュールもしくはスピノシン伸長モジュールを含んでなるハイブリッドスピノシンPKSを提供する。

【0128】

ATドメインは、成長するポリケチド鎖に取り込まれる伸長体ユニットを選択する。スピノシンの生合成において伸長体は主としてマロニル-CoAである。しかしながら、モジュール3中のATは本質的にメチルマロニル-CoAに特異的である。それはときにマロニル-CoAを取り込み、天然の少量成分としてのスピノシンFの蓄積につながる。モジュール8中のATは、主としてマロニル-CoA (スピノシンAを生じる)を取り込むがしかしまたかなりの量のメチルマロニル-CoA (約15%のスピノシンDを生じる)も取り込むゆるやかな特異性を示す。モジュール8のATのアミノ酸配列はメチルマロニル-CoAの選択と関連する領域中で他のATドメインに類似である。われわれは従って、この位置での主としてマロニル-CoAの取り込みが、異常にゆるやかな特異性を有するATドメインとともに基質供給の反映であることを示唆する。負荷モジュールのATは主としてメチルマロニル-CoAに対し選択的であるが、しかし時間の5~10%のマロニル-CoAを取り込む (天然の少量成分スピノシンEの産生に至る)。

【0129】

異なるマロニル-CoAに対し選択的な異種ATドメインでの既存のATドメインの置換は、スピノシンポリケチド上の側鎖を付加、除去もしくは置換することができるPKSに至る。該異種ATドメインが細胞内で容易に利用可能でない伸長体分子を取り込み得る場合は、アクセサリ遺伝子が包含されて補助基質を提供する (Stassira 1998)。例えば、土壌放線菌 (S. spinosa) のゲノム中にはクロトニル-CoA還元酵素をコードする明らかな遺伝子が存在せず (C. Waldron、未発表の観察結果)、そして従ってエチルマロニル-CoAの供給がこの生物体中で厳しく制限されることが予想される。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

スピノシンポリケチド合成酵素のモジュール 3 中で A T 交換を実施させる系を構築した。モジュール 3 の A T は天然にメチルマロニル - C o A を取り込みかつスピノシンに 1 6 - メチル分枝を導入する。A T 交換を遂げるための一方法は置換により、それは天然の P K S 中で同一の転写物をもつ株をもたらすことができる。代替の一方法は単一組込みを介し、これは、スピノシン P K S 遺伝子中に完全なプラスミド配列を配置し、また、組込み部位の下流の遺伝子を駆動させるプロモーターが導入されることを必要とする。

【 0 1 3 1 】

以下の実施例（実施例 1 6 ~ 1 9 ）は、酵素 M s c I を使用するフラグメントのサブクローニングを必要とする A T ドメイン交換実験を記述する。M s c I は該部位の周囲の配列による d c m メチル化により影響を及ぼされる。M s c I で消化されることが必要とされるプラスミドは、従って、d c m⁺ 株の大腸菌（E . c o l i ）E T 1 2 5 6 7 により継代されて、d c m⁻ によりメチル化されない D N A を生成する。

A . スピノシンのモジュール 3 の A T の代わりにラパマイシン P K S のモジュール 2 の A T を使用するハイブリッドスピノシン P K S

単一組込みのアプローチを使用して、モジュール 3 の A T （メチルマロニル - C o A 特異的）がラパマイシンのモジュール 2 の A T （マロニル - C o A 特異的）により置換されたスピノシン P S K を生成した。生じる株を土壌放線菌（S . s p i n o s a ）7 D 2 3 と称した。7 D 2 3 の P K S 遺伝子は、天然の s p n A プロモーター下に s p n A 、 s p n B および短縮型 s p n C 、次いで導入されたプロモーターの制御下のプラスミド配列（アブラマイシン耐性マーカーを包含する）ならびにハイブリッド s p n C および s p n D および s p n E を含有する。7 D 2 3 中で使用した異種プロモーターはプリスチナマイシンに対する耐性のプロモーターであった。代替のプロモーター、例えばその同族のアクチベーター a c t I I - O R F 4 を伴う a c t I プロモーターもまた使用し得る。

【 0 1 3 2 】

土壌放線菌（S . s p i n o s a ）7 D 2 3 は 4 種の予測されたスピノシン類似物すなわちスピノシン F 、スピノシン F 1 7 - プソイドアグリコン、1 6 - デスメチルスピノシン D および 1 6 - デスメチルスピノシン D 1 7 - プソイドアグリコンを産生した。収量は予期されないことに高く、工作されない株からよりも 3 倍より低いのみであった（実施例 2 0 内の表 1 2 を参照されたい）。スピノシン F 化合物は工作されない株での少量成分として以前に同定されているが、しかし P K S 遺伝子のこの操作はそれらの収量の劇的な増大をもたらした。

【 0 1 3 3 】

プソイドアグリコン F の豊富さは、この新規基質に対するホロサミングリコシルトランスフェラーゼの低下した活性の反映であるかもしれない。最終的なグリコシル化は C - 1 7 で起こり、従って隣接する C - 1 6 メチル基が基質認識に重要であるかもしれない。

実施例 1 6 隣接する制限部位を伴うスピノシンのモジュール 3 の A T を含有するベクターの構築

図 7 a および 7 b を参照されたい。スピノシンのモジュール 3 の A T ドメインを、鋳型としての p R H B 3 E 1 1 ならびにプライマー C R 3 2 2 （配列番号 1 2 ）および C R 3 2 3 （配列番号 1 3 ）を使用する P C R により増幅した。これらのプライマーは、A T ドメインに隣接する M s c I および A v r I I 部位（配列番号 1 2 および 1 3 の b p 3 - 8 ）を導入する。9 7 3 b p の P C R 産物をリン酸化し、そして以前に S m a I で消化かつ脱リン酸化していた商業的に入手可能な p U C 1 8 にクローン化した。挿入物を含有する形質転換体を向きについてスクリーニングしかつ配列決定した。ポリリンカーの H i n d I I I 部位の隣に A v r I I 部位を配置する向きで正しい配列の挿入物を運搬する 1 形質転換体を p A L K 6 と称した。

【 0 1 3 4 】

スピノシンのモジュール 3 の A T の下流の隣接する領域を、鋳型としての p R H B 3 E 1 1 ならびにプライマー C R 3 2 4 （配列番号 1 4 ）および C R 3 3 2 （配列番号 1 5 ）

を使用するPCRにより増幅した。プライマーCR324はCR323と正確に同一の位置にAvrII部位（配列番号14のbp3-8）を導入し、また、CR332は該配列中に天然に存在するPstI部位の下流を結合する。1557bpのPCR産物をリン酸化し、そして以前にSmaIで消化かつ脱リン酸化していた商業的に入手可能なpUC18にクローン化した。挿入物を含有する形質転換体を向きについてスクリーニングしかつ配列決定した。ポリリンカーのHindIII部位に隣接してAvrII部位を配置する向きで正しい配列の挿入物を運搬する1形質転換体をpALK9と称した。pALK9をAvrIIおよびPstIで消化した。1525bpのフラグメントをゲル精製し、そしてAvrIIおよびPstIで消化したpALK6にクローン化して、プラスミドpALK11を生じた。

10

【0135】

本実験の適するポリリンカーを提供するためpALK12を構築した。pALK6をNdeIおよびPstIで消化しかつオリゴCR328（配列番号16）およびCR329（配列番号17）のアニールリングしたリンカーと連結した。このリンカーは、NdeI部位を破壊しかつXbaI、EcoRVおよびPstI部位を残すように設計した。挿入物を含有するクローンを制限酵素消化により分析し、そして正しいパターンを表す単一クローンをpALK12と称した。

【0136】

スピノシンのモジュール3のATの上流の隣接する領域を、鋳型としてのpRHB3E11ならびにプライマーCR330（配列番号18）およびCR321（配列番号19）を使用するPCRにより増幅した。プライマーCR330はspnC遺伝子のATG開始コドンにNdeI部位（配列番号18のbp18-23）を導入し、また、CR321はCR322と正確に同一の位置にMscI部位（配列番号19のbp3-8）を組み込む。1729bpのPCR産物をリン酸化し、そして以前にSmaIで消化しかつ脱リン酸化していた商業的に入手可能なpUC18にクローン化した。挿入物を含有する形質転換体を向きについてスクリーニングしかつ配列決定した。ポリリンカーのHindIII部位に隣接してMscI部位を配置する向きで正しい配列の挿入物を運搬する1形質転換体をpALK23と称した。pALK12をPstIおよびXmnIで消化し、そして601bpをPstI/XmnIで消化したpALK23にクローン化してpALK24を生じた。pALK11をPstIおよびMscIで消化し、そして、2488bpのフラグメントを、pALK24をPstIおよびMscIで消化することにより生じさせた3777bpのバックボーンに連結してpALK25を生じた。組込みのための十分な相同性を確実にするために、PstI部位（米国特許第6,274,350 B1号明細書中の配列番号1のbp39607-39612）からMscI部位（bp41189-41194）までのDNAのフラグメントをpRHB3E11から切り出し、そしてPstIおよびEcoRVで以前に消化したpALK25にクローン化してpALK26を生じた。

20

30

【0137】

pALK26は、モジュール3中のAT交換を伴うスピノシンPKS遺伝子を生成させる実験での中間体プラスミドである。それは、隣接する制限部位を伴うスピノシンのAT3、開始コドンまでのspnCの上流領域、および相同的組換えのための下流の領域を含有した。それはATの縁のMscI部位のすぐ上流の407bpのMscI-MscIフラグメントを欠いており、AT交換を達成した後にそれを挿入しなければならない。実施例17 C-16デスメチルスピノシンを産生させるようにスピノシン生合成経路を工作するのに使用し得るベクターの構築

40

図8を参照されたい。プラスミドpALK39を使用して相同的組換えにより土壤放線菌（*S. spinosa*）の染色体に組込んだ。それはラパマイシンのAT2をスピノシンのモジュール3中に組み込むよう設計した。こうした工作された土壤放線菌（*S. spinosa*）株は、C-16デスメチルスピノシンおよびこの経路中の中間体を産生した。プラスミドpALK39は下述されるとおり構築した。

【0138】

50

ラパマイシンのモジュール2をpCJR26からMscI/AvrIIフラグメント(配列番号20を参照されたい)として切り出し、そしてMscIおよびAvrIIで以前に消化していたpALK26に連結してpALK28を生じた。この構築物から欠けている407bpのMscIフラグメントをその後pALK24(実施例16)から切り出し、そして脱リン酸化しMscIで消化したpALK28に連結した。クローンを該挿入物の向きについてスクリーニングし、そして該挿入物を正しい向きで含有する単一クローンをpALK32と称した。pALK32は、開始コドンのNdeI部位およびポリケチド合成酵素配列のすぐ外側の下流のXbaI部位を伴い、土壌放線菌(*S. spinosa*)のモジュール3中にrapAT2交換を導入するための必要とされるフラグメントを含有する。この領域をNdeI/XbaIフラグメントとして切り出し、そしてpLSB3にクローン化してpALK39を生じた。新規モジュール3のハイブリッドフラグメントは、それにより、接合により土壌放線菌(*S. spinosa*)に伝達されかつアブラマイシン耐性により選択され得るベクター中でP_{ptr}下に配置された。

10

実施例18 クロトニル-CoA還元酵素を過剰発現することが可能なベクターの構築

図9を参照されたい。基質供給の問題を取り扱うために、ストレプトミセス シナモネンシス(*Streptomyces cinnamomensis*)からのクロトニル-CoA還元酵素(ccr)遺伝子を過剰発現するpALK21を構築した。pALK21は下述されるとおり構築した。

【0139】

S.シナモネンシス(*S. cinnamomensis*)のccr遺伝子を、プライマーCCRMONF(配列番号21)およびCCRMONR(配列番号22)を使用してS.シナモネンシス(*S. cinnamomensis*)ATCC 15413から単離したゲノムDNAからPCRにより増幅した。CCRMONFは、該遺伝子の開始コドンのATGを組み込むNdeI部位(配列番号21のbp7-12)を導入し、また、CCRMONRは終止コドンの下流にBamHI部位(配列番号22のbp6-11)を導入する。ccr遺伝子を得るための増幅はPwo熱安定性DNAポリメラーゼを使用して標準的条件下で実施した。フラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、その後、SmaIで消化しかつ脱リン酸化した商業的に入手可能なpUC18にクローン化した。挿入物を含有するプラスミドを配列決定し、そして正しい配列を含有する1プラスミドをpLSB46と称した。プラスミドpLSB46は、導入したBamHI部位をポリリンカーのXbaI部位に隣接して配置する向きにS.シナモネンシス(*S. cinnamomensis*)のccr遺伝子を含有する。配列番号23は、開始コドンのNdeI部位から終止コドン後のBamHI部位までのccr遺伝子を示す。

20

30

【0140】

ccr遺伝子をNdeI/XbaIフラグメントとして切り出し、そしてNdeIおよびXbaIで消化した発現ベクターpLSB2(実施例2)にクローン化してpLSB59を生じた。プラスミドpLSB59は、actIプロモーターの制御下のccr遺伝子およびアクチベーターactII-ORF4を含有する。工作したハイブリッドPKSとccr遺伝子を共発現させるために、ccrを含有するフラグメントをactII-ORF4アクチベーターおよびactIプロモーターと一緒に、ハイブリッドPKS遺伝子に利用可能な制限部位を有する第二のプロモーター(P_{ptr})を含有するベクターに移入した。これは下述するとおり達成した。

40

【0141】

プラスミドpLSB59をNdeIで消化し、そしてDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントを使用して末端を埋めた。この平滑端フラグメントを再環化してpALK19を生じた。該遺伝子およびプロモーターをpALK19からSpeI/XbaIフラグメントとして切り出し、そしてSpeIで消化したpLSB3(実施例2)にクローン化した。この段階はccr遺伝子の末端のXbaI部位を破壊する。生じるプラスミドをpALK21と称する。プラスミドpALK21は従ってP_{actI}下にccr遺伝子を含有し、唯一のNdeIおよびXbaI部位がptrプロモーターの下流のハイブリッドPK

50

S 遺伝子の導入のため配置される。p A L K 2 1 はアブラマイシン耐性でありかつ DNA の接合伝達のための o r i T を含有する。

実施例 19 スピノシンのモジュール 3 の A T の代わりにラパマイシンのモジュール 2 の A T を含んでなるハイブリッドポリケチド合成酵素をもつ土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 株の生成

図 1 1 を参照されたい。土壤放線菌 (S a c c h a r o p o l y s p o r a s p i n o s a) N R R L 1 8 5 3 8 を大腸菌 (E . c o l i) S 1 7 - 1 (S i m o n ら、1 9 8 3) からの接合 (M a t s u s h i m a ら 1 9 9 4) により p A L K 3 9 で形質転換した。形質転換体をアブラマイシンに対する耐性について選択した。サザンブロット分析により多数の形質転換体をスクリーニングした。該プラスミドが相同的組換えにより染色体中に組込まれたことを示す正しいハイブリッドパターンを表す単一の形質転換体を土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 7 D 2 3 株と称した。

10

【 0 1 4 2 】

下の実施例 2 0 ~ 2 1 は新規スピノシンを産生させるための土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 7 D 2 3 の使用を具体的に説明する。

実施例 2 0 1 6 - デスメチルスピノシンの製造および単離 (スピノシン F 、スピノシン F プソイドアグリコン、ならびに化合物 2 1 および 2 2 の製造)

1 6 - デスメチルスピノシン A は多数の土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 株により産生されるスピノシンのファミリーの 1 つとして以前に同定されており、そしてスピノシン F と称されている (米国特許第 6 , 2 7 4 , 3 5 0 B 1 号明細書) 。ここでわれわれは、土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 7 D 2 3 の工作したハイブリッド経路からのスピノシン F および 1 6 - デスメチルスピノシン D (化合物 2 1) の製造を示す。

20

【 0 1 4 3 】

土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 7 D 2 3 を使用して C S M 培地 (H o s t e d と B a l t z 1 9 9 6 ; 米国特許第 5 , 3 6 2 , 6 3 4 号明細書) に接種した。この前培養物を、2 インチ行程で 2 5 0 r p m で振とうされる、通気を補助するための 3 0 c m ばね付き 2 5 0 m L フラスコ中、7 5 % 相対湿度を伴う 3 0 で 3 日間増殖させた。その後それを使用して、5 % v / v で栄養増殖培地すなわち 2 5 0 m L フラスコ中 3 × 3 0 m L 培養物 (S t r o b e l と N a k a t s u k a s a 1 9 9 3 ; 米国特許第 5 , 3 6 2 , 6 3 4 号明細書) に接種し、それを同一条件下でさらなる 2 日間培養した。栄養増殖培養物を使用して、5 % v / v で生産培地 (S t r o b e l と N a k a t s u k a s a 1 9 9 3) すなわち上述された条件下で増殖させた 2 5 0 m L フラスコ中 3 0 × 3 0 m L 培養物に接種した。土壤放線菌 (S . s p i n o s a) 7 D 2 3 の生産培養物を 1 0 日間増殖させた。

30

【 0 1 4 4 】

代謝物の同定のために醗酵ブロスの 1 m L アリコートを実施例 5 に記述されたところの L C - M S により分析した。真正の標準品との比較により、スピノシン F 、1 6 - デスメチルスピノシン D およびそれらの対応するプソイドアグリコンが存在したことが明らかであった (表 1 2) 。

【 0 1 4 5 】

40

【表 1 4】

表12

化合物	保持時間(分)	重要な質量スペクトルデータ (m/z)	収率 (mg/l)
スピノシンF	21.1	718.5 [M+H] ⁺ ; 142.4	102
16-デスメチルスピノシンD (化合物21)	23.4	732.5 [M+H] ⁺ ; 142.3	38
スピノシンF17- フソイトアグリコン	23.1	599.3 [M+Na] ⁺	125
16-デスメチルスピノシンD17- フソイトアグリコン(化合物22)	24.6	613.3 [M+Na] ⁺	42

10

【0146】

残存する醗酵ブ罗斯を遠心分離により澄清にした。細胞を等容量のメタノールで2回抽出した。上清(780 mL)を5 N NaOHでpH約10に調節しそして酢酸エチル(3×500 mL)で2回抽出した。メタノールおよび酢酸エチル抽出液を合わせ、そして溶媒を真空中で除去して油状残渣を生じた。残渣を酢酸エチル(250 mL)に溶解しかつ50 mM酒石酸(3×200 mL)で抽出した。合わせた酒石酸抽出液を5 N NaOHでpH約10に調節しかつ酢酸エチル(3×300 mL)で抽出した。抽出液を合わせかつ溶媒を真空中で除去して褐色油状物(200 mg)を生じた。該油状物をメタノール(1 mL)に溶解し、そしてこの半分を最初に、実施例8に記述されたとおりクロマトグラフィー分離した。

20

【0147】

16-デスメチルスピノシンDおよびスピノシンFを含有した最初の分離からの主画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去した。残渣を21 mL/分の流速で下述されるところの勾配で溶出する同一カラムでクロマトグラフィー分離した。

30

T = 0分、35% B; T = 35、55% B; T = 45、55% B。

【0148】

画分は30秒ごとに収集した。16-デスメチルスピノシンDもしくはスピノシンFのいずれかを含有する画分を個別に合わせた。その後、画分の合わせた組のそれぞれを以下のとおり処理した。すなわち、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてC₁₈-ボンドエリユート(Bond Elute)カートリッジ(200 mg)を使用してサンプルを濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水(10 mL)で洗浄し、メタノール(2×10 mL)で溶出しそして溶媒を真空中で除去した。

【0149】

16-デスメチルスピノシンD(化合物21)は以下の特徴を有する。

40

単離された収量: 4.8 mg

分子量: 731

分子式: C₄₁H₆₅NO₁₀

UV(HPLC分析の間のダイオードアレイ検出による): 244 nm

電子スプレーMS: MH⁺のm/z = 732.5; m/z = 142.4にホロサミンの糖フラグメントイオン。

正確なFT-ICR-MS: [M+H]⁺のm/z = 732.4689(732.4681を必要とする)。

【0150】

表13はCDC1₃中での16-デスメチルスピノシンDの¹Hおよび¹³C NMR

50

の化学シフトデータを要約する。

【 0 1 5 1 】

【 表 1 5 】

表 13

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	-	172.3	19b	1.67	21.5
2a	2.39	33.9	20a	1.51	29.7
2b	3.09	-	20b	1.51	-
3	2.97	47.7	21	4.65	76.9
4	3.37	42.1	22a	1.49	28.2
5	5.49	122.0	22b	1.49	-
6	-	136.3	23	0.82	9.3
6-Me	1.73	20.7	1'	4.85	95.5
7	2.19	44.5	2'	3.52	77.6
8a	1.41	34.8	3'	3.46	81.1
8b	1.93	-	4'	3.12	82.3
9	4.29	75.7	5'	3.54	67.9
10a	1.35	37.7	6'	1.28	17.8
10b	2.26	-	2'-OMe	3.51	59.1
11	1.01	45.6	3'-OMe	3.50	57.7
12	2.76	49.0	4'-OMe	3.56	61.0
13	6.75	148.7	1''	4.60	98.9
14	-	145.1	2''a	1.67	30.0
15	-	198.0	2''b	1.99	-
16a	2.47	45.1	3''a	1.70	20.5
16b	3.17	-	3''b	2.16	-
17	4.05	74.4	4''	3.10	64.6
18a	1.56	33.7	5''	3.73	70.7
18b	1.56	-	6''	1.47	18.6
19a	1.17	21.5	4''-NMe ₂	見られない*	見られない*

【 0 1 5 2 】

化学シフトは 7 . 2 6 p p m のプロトンに関係づけられる。

* アミノ基のプロトン化を引き起こす痕跡量の酸により見られない。

【 0 1 5 3 】

スピノシン F は以下の特徴を有する。

単離された収量： 5 . 5 m g

分子量： 7 1 7

分子式： C₄₀ H₆₃ N O₁₀

UV (HPLC 分析の間のダイオードアレイ検出による)： 2 4 4 n m

電子スプレー MS： MH⁺ の m / z = 7 1 8 . 5 ; m / z = 1 4 2 . 4 にホロサミンの糖フラグメントイオン。

正確な FT - ICR - MS： [MH]⁺ の m / z = 7 1 8 . 4 5 3 4 (7 1 8 . 4 5 2 5 を必要とする)。

【0154】

本化合物の積算NMRデータはその提案された正体 (i d e n t i t y) および公表されたデータ (米国特許第5, 362, 634号明細書) と一致した。

実施例21 16-デスメチルスピノシンD 17-プソイドアグリコン (化合物22) の製造および単離

16-デスメチルスピノシンA 17-プソイドアグリコンは以前に同定され、そしてスピノシンF 17-プソイドアグリコンとして知られる。それは土壌放線菌 (*S. spinosa*) 株により産生されるスピノシンのファミリーの少量のメンバーの1つとして見出される (米国特許第6, 274, 350 B1号明細書) 。土壌放線菌 (*S. spinosa*) 7D23の作成されたハイブリッド経路からのスピノシンF 17-プソイドアグリコンおよび16-デスメチルスピノシンD 17-プソイドアグリコンの製造方法を下述する。

10

【0155】

土壌放線菌 (*S. spinosa*) 7D23の凍結栄養増殖ストックを使用して、CSM (ばね付き250mL三角フラスコ中でインキュベートされる50mL) 中に土壌放線菌 (*S. spinosa*) 7D23の一次栄養増殖前培養物を接種した。栄養増殖培地 (ばね付き2L三角フラスコ中でインキュベートされる250mL) 中の二次前培養物を実施例8に記述されるとおり調製しかつインキュベートした。

【0156】

0.01% v/v プルロニック (Pluronic) L-0101 (BASF) 消泡剤の添加を伴い、4リットルの生産培地を実施例6でのとおり調製した。生産培地に5% v/v で二次前培養物を接種し、そして7Lの攪拌されるバイオリアクター中、30℃の温度で7~10日間醗酵させた。気流は0.75vvmに設定し、また、溶解酸素圧を空気飽和の30%もしくはそれより上に維持するために羽根車先端速度を0.68と1.1m/sとの間で制御した。

20

【0157】

代謝物の同定のために、醗酵ブロスの1mLアリコートを実施例5に記述されるところのLC-MSにより分析した。真正の標準品との比較により、スピノシンF、16-デスメチルスピノシンDおよびそれらの対応するプソイドアグリコンが存在したことが明らかであった (表14) 。

30

【0158】

【表16】

表14

化合物	保持時間(分)	重要な質量スペクトルデータ(m/z)
スピノシンF	21.4	718.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
16-デスメチルスピノシンD (化合物21)	23.6	732.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
スピノシンF17-プソイドアグリコン	23.2	599.3 [M+Na] ⁺
16-デスメチルスピノシンD17- プソイドアグリコン(化合物22)	24.3	613.3 [M+Na] ⁺

40

【0159】

残存する醗酵ブロスを遠心分離により澄清にした。細胞を等容量のメタノールで2回抽出した。上清 (3.2L) を酢酸エチル (2×1.5L) で抽出した。メタノールおよび酢酸エチル抽出液を合わせかつ溶媒を真空中で除去した。残余の油状物を酢酸エチル (1L) に溶解しかつ50mM酒石酸 (3×500mL) で洗浄した。残存する酢酸エチル溶

50

液を真空中で蒸発させた。生じる油状物をクロロホルム中 5 % メタノールで溶出するフラッシュシリカゲル ($6 \times 13 \text{ cm}$) でクロマトグラフィー分離した。10 mL 容量の画分を収集した。プソイドアグリコンを含有する画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去して褐色油状物を生じた。該褐色油状物をメタノール (1.5 mL) に溶解しかつ実施例 8 に記述されるところの塩基不活性化逆相シリカゲルでクロマトグラフィー分離した。画分を 30 秒ごとに収集し、そして関連産物を含有するものを合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そして C_{18} - ボンドエリユート (Bond Elute) カートリッジ (200 mg) を使用してサンプルを濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水 (10 mL) で洗浄し、メタノール ($2 \times 10 \text{ mL}$) で溶出し、そして溶媒を真空中で除去した。

【 0160 】

10

16 - デスメチルスピノシン D 17 - プソイドアグリコン (化合物 22) は以下の特徴を有した：

単離された収量：3.3 mg

分子量：590

分子式： $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_9$

UV (HPLC - MS 分析の間のダイオードアレイ検出による)：240 nm

電子スプレー MS： $[\text{M} + \text{Na}]^+$ の $m/z = 613.3$

正確な FT - ICR - MS： $[\text{M} + \text{H}]^+$ の $m/z = 591.3517$ (591.3528 を必要とする)。

【 0161 】

20

表 15 は CDCl_3 中での 16 - デスメチルスピノシン D 17 - プソイドアグリコンの ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータを要約する。

【 0162 】

【表 17】

表 15

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	-	172.5	17	4.18	68.2
2a	2.40	34.0	18a	1.58	35.7
2b	3.13	-	18b	1.58	-
3	2.97	47.7	19a	1.20	21.1
4	3.37	42.4	19b	1.60	-
5	5.49	122.1	20a	1.45	30.5
6	-	136.3	20b	1.56	-
6-Me	1.73	20.7	21	4.68	76.3
7	2.19	44.5	22a	1.50	28.0
8a	1.42	34.5	22b	1.50	-
8b	1.93	-	23	0.83	9.4
9	4.30	75.6	1'	4.86	95.5
10a	1.36	37.7	2'	3.51	77.7
10b	2.28	-	3'	3.46	81.1
11	1.03	45.6	4'	3.12	82.3
12	2.76	48.9	5'	3.54	67.9
13	6.77	148.0	6'	1.28	17.8
14	-	145.1	2'-OMe	3.51	59.0
15	-	197.8	3'-OMe	3.51	57.7
16a	2.56	47.5	4'-OMe	3.56	60.9
16b	3.21	-			

【0163】

b. スピノシンのモジュール3のATの代わりにタイロシンPKSの5 ATモジュールを使用するハイブリッドスピノシンPKS

類似の方法で、モジュール3のメチルマロニル-CoA特異的ATドメインをタイロシンのモジュール5のエチルマロニル-CoA特異的ATドメイン(配列番号26)により置換したハイブリッドスピノシンPKSを生成した。該産生株は土壤放線菌(*S. spinosa*)36P4と称した。エチルマロニル-CoAは土壤放線菌(*S. spinosa*)中で豊富であることが期待されず、従って、クロトニル-CoA還元酵素をコードする*S. シナモネンシス*(*S. cinnamomensis*)遺伝子を*actI*プロモーターの制御下で同一細胞中で発現させた。これはエチルマロニル-CoAを提供し得る短鎖脂肪酸カルボキシラーゼの基質であるブチリル-CoAの細胞内貯留を有意に増大させるはずである。土壤放線菌(*S. spinosa*)36P4のPKSは、天然の*spnA*プロモーター下の*spnA*、*spnB*および短縮型*spnC*、次いでアブラマイシン耐性マーカーを包含するプラスミドDNAを含有した。*actI*プロモーター下の*S. シナモネンシス*(*S. cinnamomensis*)クロトニル-CoA還元酵素および*actI*-ORF4アクチベーターもまた該プラスミド配列内にあった。これにブリスチナマイシンに対する耐性のプロモーターの制御下のハイブリッド*spnC*(*spnC**)遺伝子が続いた。当業者は、異種プロモーターが次々に交換(*swap around*)し得る

こと、もしくは実際に多数の他のプロモーターを選ぶことができることを認識するであろう。

【0164】

土壌放線菌 (*S. spinosa*) 36P4株は、期待された16-デスメチル-16-エチルスピノシンAおよびDと矛盾しないUV吸光度、クロマトグラフィー特性、質量およびフラグメンテーションパターンを有した少量成分を産生した。土壌放線菌 (*S. spinosa*) 36P4からの主要産物はスピノシンAおよびDであった。驚くべきことに、株36P4の優勢な新規醗酵産物は21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAおよび6-エチルスピノシンAであった。21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAはスピノシンDのレベルの10%以内のレベルで産生された。これらの化合物を単離しかつMSおよびNMRにより完全に特徴付けした。われわれは、それらが、クロトニル-CoA還元酵素遺伝子の導入に由来したエチルマロニル-CoAの細胞内濃度の増大により作成されたことを示唆する。負荷ATおよびモジュール8のAT双方の低特異性がこの新規基質を取り込ませた。6-エチル-21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAもまた土壌放線菌 (*S. spinosa*) 36P4により少量因子として作成された。これら3産物はそれぞれC16にメチル基を有し、これはタイロシンのモジュール5のATがこの系においてメチルマロニル-CoAを主に取り込んだことを意味する。従って、(天然のAT3をもつ) 工作されていないスピノシンPKSがccr遺伝子の存在下で21-n-プロピルおよび6-エチルスピノシン化合物を産生するであろうと期待される。

実施例22 16-デスメチル-16-エチルスピノシンを産生するようにスピノシン生合成経路を工作するのに使用し得るベクターの構築

図10を参照されたい。プラスミドpTB4は、タイロシンのモジュール4の大部分を包含するタイロシンPKSのBamHIフラグメントを含有するpUC18に基づくプラスミドである。該挿入物は、寄託された配列tylG.emb.、受託番号U78289のbp24125と24130との間のBamHI部位(KS4の始めの)およびbp31597と31612との間のBamHI部位(KS5の始めの)からである。

【0165】

タイロシンのモジュール5のATを鋳型pTB4ならびにプライマーAK1(配列番号24)およびAK2(配列番号25)を使用するPCRにより増幅した。プライマーAK1はATドメインの始めにMscI部位(配列番号24のbp3-8)を導入し、また、プライマーAK2はATドメインの終わりにAvrII部位(配列番号25のbp3-8)を導入する。PCR反応はPwo熱安定性DNAポリメラーゼを使用する標準的条件下で実施した。フラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、そしてSmaIで消化しかつ脱リン酸化した商業的に入手可能なpUC18にクローン化した。挿入物を含有するプラスミドを挿入物の向きについて分析しかつ配列決定した。正しい配列を含有する1プラスミドを同定しかつpALK17と称した。それは、ポリリンカーのHindIII部位に隣接してMscI部位を配置する向きでPCRフラグメントを含有する。tyl AT5をpALK17からMscI/AvrIIフラグメントとして切り出し、そしてMscIおよびAvrIIで消化したpALK26にクローン化してpALK27を生じた。この構築物から欠けている407bpのMscIフラグメントをpALK24(実施例16)から切り出しそして脱リン酸化しMscI消化したpALK27に連結した。該挿入物を正しい向きで含有する単クローンをpALK31と称した。pALK31は、開始コドンのNdeI部位およびポリケチド合成酵素配列のすぐ下流のXbaI部位とともに、土壌放線菌 (*S. spinosa*) のモジュール3へのtyl AT5の交換を導入するのに必要なフラグメントを含有する。このフラグメントをNdeI/XbaIフラグメントとして切り出しそしてpALK21にクローン化してpALK36を生じた。これは、actIプロモーターからccrを共発現しそして接合により土壌放線菌 (*S. spinosa*) 中に伝達されかつアブラマイシン耐性について選択し得るベクター中で、P_{ptr}下に新規モジュール3のハイブリッドフラグメントを配置する。

実施例 23 スピノシンのモジュール 3 の A T の代わりにタイロシンのモジュール 5 の A T を含んでなりかつ適切なエチルマロニル - C o A 補助基質を提供するハイブリッドポリケチド合成酵素をもつ土壤放線菌 (*S . s p i n o s a*) 株の生成

図 12 を参照されたい。土壤放線菌 (*S a c c h a r o p o l y s p o r a s p i n o s a*) N R R L 1 8 5 3 8 を p A L K 3 6 で形質転換した。形質転換体をアブラマイシンに対する耐性について選択しかつサザンブロット分析によりスクリーニングした。単一の形質転換体を土壤放線菌 (*S . s p i n o s a*) 3 6 P 4 株と称した。

実施例 24 土壤放線菌 (*S . s p i n o s a*) 3 6 P 4 からの化合物の製造および単離
土壤放線菌 (*S . s p i n o s a*) 3 6 P 4 の凍結栄養増殖ストックを C S M (ばね付き 2 5 0 m L 三角フラスコ中でインキュベートされる 5 0 m L) 中の土壤放線菌 (*S . s p i n o s a*) 3 6 P 4 の一次栄養増殖前培養物に接種した。栄養増殖培地 (ばね付き 2 L 三角フラスコ中でインキュベートされる 2 5 0 m L) 中の二次前培養物を実施例 8 に記述されるとおり調製しかつインキュベートした。

【 0 1 6 6 】

0 . 0 1 % v / v のプルロニック (*P l u r o n i c*) L - 0 1 0 1 (*B A S F*) 消泡剤の添加を伴い、14 リットルの生産培地を実施例 6 でのとおり調製した。生産培地に 5 % v / v で二次前培養物を接種し、そして 2 0 L の攪拌されるバイオリアクター中、実施例 8 に記述された条件下で 7 ~ 1 0 日間醗酵させた。

【 0 1 6 7 】

代謝物の同定のため、醗酵ブ罗斯の 1 m L アリコートを実施例 5 に記述されるところの L C - M S により分析した。真正の標準品、および土壤放線菌 (*S . s p i n o s a*) N R R L 1 8 5 3 8 株からの醗酵抽出物との比較により、新規スピノシン代謝物の存在が確かめられた (表 1 6) 。主要新規成分はスピノシン D と類似のしかし異なる保持時間で溶出し、そして同一の質量を有し ; この化合物は下で 2 1 - デスエチル - 2 1 - n - プロピルスピノシン A と同定される。第二の有意の新規成分は後で溶出し、そしてスピノシン D よりも 1 4 単位より大きな質量を有し ; この化合物は下で 6 - エチルスピノシン A と同定される。第三の有意のピークはなおより後で溶出し、そしてスピノシン D よりも 2 8 単位より大きな質量を有し ; この化合物は 6 - エチル - 2 1 - デスエチル - 2 1 - n - プロピルスピノシン A であると考えられる。これらの化合物の全部の質量スペクトルは [M + H] ⁺ イオンおよびホロサミンフラグメントを表した。加えて数種の他の新規成分が明らかに存在したが、しかし少量で存在した。これらの新規化合物の 1 つは第一の主要新規成分の後に溶出し、そしてスピノシン D と同一の質量を有し ; この化合物はおそらく 1 6 - デスメチル - 1 6 - エチルスピノシン A であった。他の少量の新規成分は、スピノシン D より 1 4 質量単位より大きい [M + H] ⁺ イオンおよびホロサミンフラグメントと矛盾しない質量を表した。これらの新規少量成分の 1 つが 1 6 - デスメチル - 1 6 - エチルスピノシン D であるかもしれない。

【 0 1 6 8 】

10

20

30

【表 18】

表16

化合物	化合物番号 (表3を参照 されたい)	保持時間(分)	重要な質量スペクトルデータ (m/z)
21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA	23	25.4	746.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
6-エチルスピノシンA	24	27.1	760.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
6-エチル-21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA	25	29.1	774.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
16-デスメチル-16-エチルスピノシンA	26	26.4	746.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
推定の16-デスメチル-16-エチルスピノシンD	27	26.7	760.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
推定の16-デスメチル-16-エチルスピノシンD	27	27.3	760.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
推定の16-デスメチル-16-エチルスピノシンD	27	27.5	760.5 [M+H] ⁺ ; 142.3

【0169】

残存する醗酵ブロス(12L)を遠心分離により澄清にしかつ実施例8に記述されたとおり抽出した。残渣をメタノール(10mL)、水(2mL)およびギ酸(100μl)に溶解した。全サンプルを濾過しかつ重力下でC₁₈-ボンドエリユート(Bond Elite) SPEカートリッジ(70g、150mL)に適用した。その後、カートリッジを、フラッシュマスター(Flash Master)パーソナル系(ジョーンズ クロマトグラフィー(Jones Chromatography)、英国ウェールズ)を使用して0.1%のギ酸を含有する水中アセトニトリルの増大する10%段階的勾配(各段階100mL)で展開した。カラムは最後にメタノール(2×100mL)で洗浄した。746amuもしくはそれ以上の質量をもつスピノシン様分子を含有する画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去した。残余の油状物(3mL)をメタノール(1.5mL)に溶解した。このサンプルを最初に、2個の等部分で、実施例8に記述されたとおりクロマトグラフィー分離した。

【0170】

6-エチルスピノシンAおよび21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンD(m/z=760)を含有した最初の一对の分離からの画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去した。残渣をメタノール(1mL)に溶解し、そして21mL/分の流速で下述されるところの勾配で溶出する逆相シリカゲル(ハイパーシル(Hypersil)C₁₈-BDS、5μm; 21×250mm)でクロマトグラフィー分離した。
T=0分、40%B; T=80、50%B。

【0171】

画分を30秒ごとに収集した。主として6-エチルスピノシンAを含有する画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてC₁₈-ボンドエリユート(Bond Elite)カートリッジ(200mg)を使用してサンプルを濃縮し、水(10mL)で洗浄しかつメタノール(2×10mL)で溶出し、そして溶媒を真空中で除去した。主に21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA(m/z=746)を含有した最初の一对の分離からの画分を合わせかつ溶媒を真空中で除去した。残渣をメタノール:水(7:3、1mL)に溶解し、そして21mL/分で以下の勾配で溶出する同一カラムでクロマトグラフィー分離した。

T=0分、40%B; T=45、80%B。

【0172】

画分を30秒ごとに収集した。21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAのみを含有する画分を合わせた。スピノシンDを含むこの化合物の混合物を含有するサンプルは別個に合わせ、溶媒を真空中で除去し、そして残渣を上記されたとおりもう1回クロマトグラフィー分離した。その後、21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAのみを含有する画分を最初の実験からのものと合わせた。2化合物の混合物を含有する画分を合わせ、そしてもう1回のクロマトグラフィーを実施した。

【0173】

21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンAをのみを含有した3回の実験からの画分を合わせ、アセトニトリルを真空中で除去し、そしてC₁₈-ボンドエリュート(BondElute)カートリッジ(200mg)を使用してサンプルを濃縮した。サンプルは重力下に適用し、水(10mL)で洗浄し、メタノール(2×10mL)で溶出しかつ溶媒を真空中で除去した。

10

【0174】

6-エチルスピノシンA(化合物24)は以下の特徴を有する。

単離された収量: 4.8mg

分子量: 759

分子式: C₄₃H₆₉NO₁₀

UV(HPLC分析の間のダイオードアレイ検出による): 244nm

電子スプレーMS: MH⁺のm/z = 760.5; m/z = 142.4にホロサミンの糖フラグメントイオン。

20

正確なFT-ICR-MS: [MNa]⁺のm/z = 782.4818(782.4814を必要とする)。

【0175】

表17はCDCl₃中での6-エチルスピノシンAの¹Hおよび¹³C NMR化学シフトデータを要約する。

【0176】

【表 19】

表 17

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	-	172.6	21	4.67	76.6
2a	2.42	34.0	22a	1.49	28.4
2b	3.13	-	22b	1.49	-
3	2.97	47.9	23	0.82	9.3
4	3.44	41.9	24a	2.05	27.4
5	5.46	120.3	24b	2.05	-
6	-	141.8	25	1.03	12.6
7	2.23	44.4	26	1.17	16.1
8a	1.42	34.5	1'	4.85	95.5
8b	1.95	-	2'	3.50	77.7
9	4.30	75.8	3'	3.47	81.0
10a	1.35	37.7	4'	3.12	82.3
10b	2.26	-	5'	3.55	67.9
11	1.00	45.9	6'	1.28	17.8
12	2.77	49.1	2'-OMe	3.50	59.0
13	6.76	147.7	3'-OMe	3.50	57.7
14	-	144.4	4'-OMe	3.56	60.9
15	-	202.9	1''	4.43	103.4
16	3.28	47.7	2''a	1.50	30.8
17	3.63	80.6	2''b	1.99	-
18a	1.52	34.3	3''a	1.47	18.6
18b	1.52	-	3''b	1.88	-
19a	1.20	21.7	4''	2.28	64.9
19b	1.77	-	5''	3.49	73.4
20a	1.52	30.0	6''	1.28	19.0
20b	1.52	-	4''-NMe ₂	2.28	40.6

【0177】

化学シフトは7.26 ppmのCHCl₃のプロトンに関係づけられる。

【0178】

21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンD(化合物28)は以下の特徴を有する。

単離された収量：約1mg

分子量：759

分子式：C₄₃H₆₉NO₁₀

この化合物は6-エチルスピノシンAとの4:1の混合物中の少量成分として存在した。これら2化合物の積算UVおよびMSデータは識別不可能である。NMR法を使用して、混合物のCOSYスペクトル中で観察された相関から21-n-プロピルスピン系を割り当て可能であった。メチルH24(δ_H0.87、dd、7.3Hz、7.3Hz)はメチレンH23(δ_H1.23、m)と相関した。H23はメチレンH22(δ_H1.4

10

20

30

40

50

3、m)と相関し、これは順にH 2 1 (δ_{H} 4.73、m)と相関した。H 2 1の共鳴は該混合物の¹H NMRスペクトル中で孤立した多重項として見る事ができた。

【0179】

21-デスエチル-21-n-プロピルスピノシンA(化合物23)は以下の特徴を有する。

単離された収量：5.1mg

分子量：745

分子式： $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{NO}_{10}$

UV(HPLC分析の間のダイオードアレイ検出による)：244nm

電子スプレーMS：MH⁺のm/z = 746.5；m/z = 142.4にホロサミンの糖フラグメントイオン。

10

【0180】

この化合物の積算NMRデータは、実施例15でこの化合物について記述されたものに同一であった。

【0181】

s p n伸長体モジュール内の他のAT(アシルトランスフェラーゼ)ドメインの置換により構築したハイブリッドPKS遺伝子を使用して、ポリケチド上の他の位置に変えられた側鎖をもつ新規スピノシンを製造し得る。例えば、上述されたものに類似の方法において、C18もしくはC20が水素以外の側鎖(一般にメチルもしくはエチル)をもつスピノシンを生じるハイブリッドポリケチド合成酵素を構築し得る。主としてメチルマロニル-CoAを取り込む天然のATドメイン(s p n AT3のような)は、優先的にマロニル-CoA(ラパマイシンAT2のような)もしくはエチルマロニル-CoA(タイロシンAT5のような)を取り込む異種ドメインにより置換し得る。しかしながら、当業者は、これらのハイブリッドポリケチド合成酵素のドナードメインもしくはモジュールが多様なI型ポリケチド合成酵素クラスターから獲得され得ること、ならびにこれはエリスロマイシン、アベルメクチン、ラパマイシンおよびタイロシンの生合成からのドメインもしくはモジュールにいかなる方法でも制限されないことを認識するであろう。

20

【0182】

操作の組合せが生産的生合成経路および2個もしくはそれ以上の新規領域をもつスピノシンに至るはずであることもまた予期される。

30

【0183】

付加的な生合成遺伝子が、エチルマロニル-CoAの供給を増大させるためにc c r遺伝子のような通常はスピノシンに取り込まれない前駆体の十分な供給を提供することを必要とするかもしれない。この遺伝子改変は、他のs p n ATドメインで取り込まれる非天然の前駆体を提供することにより新規スピノシン類の産生にもまたつながり得る。他のs p n ATドメインの置換は、C6のエチル基、またはC18もしくはC20のメチルもしくはエチル側鎖をもつスピノシン類の合成に至るハイブリッドPKS遺伝子を生成し得る。各β-ケト基の修飾の程度の原因であるs p n PKSドメイン(KR、DHもしくはER)もまた、ハイブリッドPKS遺伝子を生成させるように異種ドメインにより置換されることができ、これは多様な飽和結合、ヒドロキシル基もしくは二重結合をもつスピノシン類をもたらす。

40

【0184】

要約すれば、われわれは、本明細書で特許請求されるハイブリッドスピノシンPKS遺伝子が新規殺虫活性スピノシン類の製造に有用であることを示した。該ハイブリッド遺伝子は他のI型PKS遺伝子の一部分もしくは複数の部分と組合せたs p n PKS遺伝子由来である。第WO 98/01546号明細書“Polyketides and their synthesis(ポリケチドおよびそれらの合成)”に記述される戦略を使用して、DNAと一緒にスプライスされる部位を選択した。該ハイブリッド遺伝子は、アクチノロジンの生合成遺伝子act I(その同族のアクチベーターをコードするact I I-ORF4遺伝子と一緒に、第WO 98/01546号明細書を参照されたい)も

50

しくはブリスチナマイシン耐性遺伝子 *ptr* (Blancら、1995) からのもののような異種プロモーターに作動可能に連結し得る。ハイブリッドPKS遺伝子は、生物学的に活性のスピノシンを産生するのに必要とされる非PKS機能もまた含有する生物体中で発現される。本発明により提供される改変株を培養して、米国特許第5,362,634号明細書に開示されるもののような慣習的プロトコルを使用してスピノシン類を提供することができる。

【0185】

本発明のハイブリッドスピノシンPKSは土壌放線菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 中でのみならずしかした他の宿主生物体、例えばサッカロポリスプラ エリトレア (*Saccharopolyspora erythraea*) 中
でもまた発現させて殺虫活性スピノシン類を産生させ得ることが企図される。放線菌類の群、好ましくはストレプトミセス菌の群に属する他の原核生物細胞もまた適する宿主生物体である。ストレプトミセス アルブス (*Streptomyces albus*) が特定の一例である。

新規スピノシンの有害生物防除活性

本明細書で特許請求される化合物は昆虫およびダニ類の防除に有用である。該化合物類の全部の異性体、ならびに該化合物類およびそれらの異性体のいかなる酸付加塩も含まれる。他の修飾スピノシン類を製造するための米国特許第6,001,981号明細書に記述される方法により作成される半合成誘導体もまた含まれる。

【0186】

該化合物は多数の昆虫およびダニに対する活性を示す。より具体的には、該化合物は、シロイチモジヨトウ、タバコガ、コドリングおよびキャベツジルーパー (*cabbage looper*) のような鱗翅目 (*Lepidoptera*) 昆虫のメンバーに対する活性を示す。それらはまた鞘翅目 (*Coleoptera*) (カブトムシおよびゾウムシ) ならびに双翅目 (*Diptera*) (ハエ) のメンバーに対する活性も示す。該化合物はまた、カメムシ目 (*Hemiptera*) (半翅類昆虫 (*true bug*))、ヨコバイ亜目 (*Homoptera*) (アブラムシおよび跳ぶ昆虫類 (*hopper*))、アザミウマ目 (*Thysanoptera*) (アザミウマ)、バッタ目 (*Orthoptera*) (ゴキブリ)、ノミ目 (*Siphonaptera*) (ノミ)、シロアリ目 (*Isopoptera*) (シロアリ) のメンバー、ならびにハチ目 (*Hymenoptera*) のアリ科 (*Formicidae*) (アリ) のメンバーに対する活性も示す。該化合物はまた、クモ形類動物 (*Arachnid*) のダニ目 (*Acarina*) のメンバーであるナミハダニに対する活性も示す。

【0187】

本発明のさらなる一局面は昆虫もしくはダニの阻害方法に向けられる。好ましい一態様において、本発明は有効な昆虫不活性化量の本発明の化合物を植物に適用することを含んでなる感受性昆虫の阻害方法に向けられる。特許請求される化合物は、これもまた本発明の一部である組成物の形態で適用される。これらの組成物は不活性担体中に昆虫もしくはダニを不活性化する量の化合物を含んでなる。有効成分は単一の特許請求される化合物、2種もしくはそれ以上の化合物の混合物、またはそれが産生される醗酵培地の乾燥部分と一緒の化合物のいずれかの混合物として存在してよい。組成物は、農業もしくは害虫防除の技術分野で慣習的であるがしかしかつ本発明の化合物の1種もしくはそれ以上の存在により新規かつ重要である手順および処方に従って製造する。組成物は、水中に分散される濃縮製剤であってよいが、または、さらなる処置を伴わずに使用される粉末、毒餌もしくは顆粒状製剤の形態にあってよい。

【0188】

本発明の組成物の作用は、他の、例えば殺虫性、ダニ駆除性および/もしくは殺線虫性の有効成分を添加することによりかなり広げることができる。例えば、以下の化合物すなわち有機リン化合物、カルバメート、ピレスロイド、アシル尿素、他の型の昆虫成長調節剤および昆虫ホルモン類似物、ネオニコチノイドおよび他のニコチン酸、マクロライドな

らびに他の殺虫性、ダニ駆除性、殺陸貝性および殺線虫性の化合物もしくは有効成分の1種もしくはそれ以上を本発明の化合物と適して組合せ得る。“Synergistic Insecticide Mixtures (相乗的殺虫剤混合物)”に関する第WO 00/56156号明細書は、動物性害虫を防除するためのニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストと組合せのある種の以前に既知のスピノシン化合物の使用を開示する。“Combination of Active Ingredients (有効成分の組合せ剤)”に関する第WO 00/35282号明細書は殺真菌活性化合物と組合せのスピノサッドの使用を開示する。“Combination of Active Ingredients (有効成分の組合せ剤)”に関する第WO 00/35286号明細書は動物性害虫および真菌を防除するための他の化合物とのスピノサッドの組合せ剤の使用を開示する。“Use of Spinosyns as Soil Insecticides (土壌殺虫剤としてのスピノシンの使用)”に関する第WO 99/60856号明細書は土壌を介してのもしくは昆虫を防除するための灌漑による種子の処理および植物への適用のための他の化合物とのスピノシンの使用を開示する。“Use of Macrolides in Pest Control (害虫防除におけるマクロライドの使用)”に関する第WO 99/33343号明細書はトランスジェニック作物における害虫防除のためのスピノシンの使用、害虫による攻撃から後に形成される植物繁殖物質および植物器官を保護するためのスピノシンの使用、ならびに木材害虫および軟体動物を防除するためのスピノシンの使用を開示する。式Iの化合物はこれらの目的上もまた使用し得る。

【0189】

本発明の化合物は節足動物、すなわち、動物に対する害虫である、多様なハエおよびハエ幼虫、ノミ、シラミ、ダニ(mite)およびダニ(tick)を包含する昆虫およびクモ形類動物を防除するための動物の処置にもまた有用である。外寄生虫駆除剤の送達技術は当業者に公知である。一般に、本化合物はスプレー、ディップもしくは粉末により動物の外表面に適用する。該化合物はまたイヤータグ(米国特許第4,265,876号明細書に開示される送達方法)を使用しても動物に送達し得る。

【0190】

なお別の態様において、該化合物は蓄牛および他の動物の糞便中の害虫である昆虫およびクモ形類動物を防除するのに使用し得る。本態様において、該化合物は経口で投与され、そして該化合物は消化管を通して移動しかつ糞便中に出現する。糞便中の害虫の防除は動物を該害虫から間接的に保護する。

【0191】

本発明の化合物は寄生虫例えばシラミを防除するためのヒト医薬としてもまた有用である。該化合物は例えば第WO 00/01347号明細書に開示されるシラミ防除のための製剤で使用し得る。

実施例25 新規の精製されたスピノシンが殺虫性であることの立証

本発明の化合物の生物学的活性は、実験室で飼育した幼虫(平均重量22mg)に幼虫あたり1μgの率で該化合物を適用した局所アッセイにより示された。各化合物を、6匹のタバコガ(Heliothis virescens)幼虫および6匹のシロイチモジヨトウ(Spodoptera exigua)幼虫の背部に沿ってアセトン溶液(1mg/mL)で適用した。処置した幼虫はその後、6ウェルプラスチック培養プレート中21、60%RHで2日間維持した。幼虫にはそれぞれ2日の曝露後間隔の間、養育のため1cm³のアガー基材の鱗翅類の餌を供給した。2日の期間の終了時に死亡率パーセントを決定した(表18)。

【0192】

【表 20】

表18

化合物	化合物番号 (表3を参照 されたい)	タバコ		シロイモシヨウ	
		率 (マイクロ/ 幼虫)	死亡率(%)	率 (マイクロ/ 幼虫)	死亡率(%)
溶媒のみ		0	0	0	0
21-シクロピリル	1	1	100	1	33
21-シクロピリル	3	1	83	1	83
21-シクロピリル, 6-メチル	4	1	100	1	83
21-シクロピリル, 5,6-ジヒドロ	8	1	100	1	83
21-イソピリル	9	1	100	1	100
21-n-ピリル	23	1	100	1	100

10

【0193】

20

式(I)の化合物は、それもまた殺虫活性を有することが期待される半合成のスピノシン類似物を製造するための米国特許第6,001,981号明細書に開示される方法において中間体として使用し得る。

【0194】

【表 2 1】

参考文献

- 1) Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, ET., Nagaraja Rao, R. and Schoner, BE. (1992) "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." *Gene* 116: 43-49.
- 2) Bisang, C., Long, PF., Cortés, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, AL., Cox, RJ., Simpson, TJ., Staunton, J. and Leadlay, PF. (1999) "A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases." *Nature* 401: 502-505. 10
- 3) Blanc, V., Salah-Bey, K., Folcher, M. and Thompson, CJ. (1995) "Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*." *Mol. Microbiol.* 17: 989-999.
- 4) Broughton, MC., Huber, MLB., Creemer, LC., Kirst, HA. and Turner JR. (1991) "Biosynthesis of the macrolide insecticidal compound A83543 by *Saccharopolyspora spinosa*." *Proceedings of Amer. Soc. Microbiol.*, Washington D.C. 20
- 5) Donadio, S., Staver, MJ., McAlpine, JB., Swanson, SJ. and Katz, L. (1991) "Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis." *Science* 252: 675-679.
- 6) Donadio, SA., Stassi, D., McAlpine, JB., Staver, MJ., Sheldon, PJ., Jackson, M., Swanson, SJ., Wendt-Pienkowski, E., Wang, YG., Jarvis, B., Hutchinson, CR. and Katz, L. (1993) "Recent developments in the genetics of erythromycin formation." In *Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics*. (Baltz, RH., Hegeman, GD. and Skatrud, PL., eds), pp. 257-265. Amer. Soc. Microbiol, Washington D.C. 30
- 7) Dutton, CJ., Gibson, SP., Goudie, AC., Holdom, KS., Pacey, MS., Ruddock, JC., Bu'Lock, JD. and Richards, MK. (1991) "Novel avermectins produced by mutational biosynthesis." *J. Antibiot.* 44: 357-365. 40
- 8) Hosted, TJ. and Baltz, RH. (1996) "Mutants of *Streptomyces roseosporus* that express enhanced recombination within partially homologous genes." *Microbiology* 142: 2803-2813.

【 0 1 9 5 】

【表 2 2】

- 9) Hunziker, D., Yu, TW., Hutchinson, CR., Floss, HG. and Khosla, C. (1998) "Primer unit specificity in rifamycin biosynthesis principally resides in the later stages of the biosynthetic pathway." *J. Am. Chem. Soc.* 12: 1092-1093.
- 10) Kirst, HA., Michel, KH., Martin, JW., Creemer, LC., Chio, EH., Yao, RC., Nakatsukasa, WM., Boeck, LD., Occolowitz, JL., Paschal, JW., Deeter, JB., Jones, ND. and Thompson, GD. (1991) "A83543A-D, unique fermentation-derived tetracyclic macrolides." *Tetrahedron Letts* 32: 4839-4842. 10
- 11) Marsden, AFA., Wilkinson, B., Cortés, J., Dunster, NJ., Staunton, J. and Leadlay, PF. (1998) "Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase." *Science* 279: 199-202.
- 12) Matsushima, P., Broughton, MC., Turner, JR. and Baltz, RH. (1994) "Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production." *Gene* 146: 39-45. 20
- 13) Pacey, MS., Dirlam, JP., Geldart, RW., Leadlay, PF., McArthur, HAI, McCormick, EL., Monday, RA., O'Connell, TN, Staunton, J. and Winchester, TJ. (1998) "Novel erythromycins from a recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strain NRRL 2338 pIGI. Fermentation, isolation and biological activity," *J. Antibiot.* 51: 1029-1034.
- 14) Rowe, CJ., Cortés, J., Gaisser, S., Staunton, J. and Leadlay, PF. (1998) "Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes," *Gene* 216: 215-223. 30
- 15) Salah-Bey, K., Blanc, V. and Thompson, CJ. (1995) "Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (*ptr*) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 17: 1001-1012.
- 16) Simon, R., Preifer, U. and Pühler, A. (1983) "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria." *Bio/Technology* 1: 784-791.
- 17) Stassi, DL., Kakavas, SJ, Reynolds, KA, Gunawardana, G., Swanson, S., Zeidner, D., Jackson, M., Liu, H., Buko, A. and Katz, L. (1998) "Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7305-7309. 40
- 18) Strobel, RJ. and Nakatsukasa WM. (1993) "Response surface methods for optimizing

【表 2 3】

Saccharopolyspora spinosa, a novel macrolide producer.” *J. Indust. Microbiol.* 11: 121-127.

- 19) Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, PR., Jr., Broughton, MC., Turner, J., Madduri, K., Crawford, KP., Merlo, DJ. and Baltz, RH. (2001) “Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*.” *Chem. Biol.* 8: 487-499

10

【図面の簡単な説明】

【0197】

【図1】pCJR81の構築を示す。

【図2】土壌放線菌 (*S. spinosa*) の遺伝子の発現に使用したベクター pLSB2 および pLSB3 の構築を示す。

【図3】スピノシン経路に *ery load* を導入するためのベクター pLSB62 の構築を示す。

【図4】土壌放線菌 (*S. spinosa*) 13E のハイブリッド *ery / spn PKS* 経路を示す。

20

【図5】スピノシン経路に *ave load* を導入するためのベクター pLSB29 の構築を示す。

【図6】土壌放線菌 (*S. spinosa*) 21K2 のハイブリッド *ave / spn PKS* 経路を示す。

【図7a - 7b】モジュール3のAT交換プラスミドを生成させるのに使用した中間体プラスミド pALK26 の構築を示す。

【図8】スピノシンのモジュール3に *rapAT2* を導入するのに使用したベクター pALK39 の構築を示す。

【図9】土壌放線菌 (*S. spinosa*) 中で *S. シナモネンシス* (*S. cinnamomensis*) のクロトニル-CoA還元酵素遺伝子を発現させるよう設計したベクター pALK21 の構築を示す。

30

【図10】スピノシンのモジュール3に *tylAT5* を導入するのに使用したベクター pALK36 の構築を示す。

【図11】土壌放線菌 (*S. spinosa*) 7D23株のハイブリッド *PKS* 経路を示す。

【図12】土壌放線菌 (*S. spinosa*) 36P4株のハイブリッド *PKS* 経路を示す。

【0198】

[配列の簡単な説明]

配列番号1はオリゴPRIS1である。

40

配列番号2はオリゴPRIS2である。

配列番号3はプリスチナマイシンに対する耐性のプロモーターのDNA配列である。

配列番号4はオリゴCR311である。

配列番号5はオリゴCR312である。

配列番号6はオリゴSP28である。

配列番号7はオリゴSP29である。

配列番号8は、bp1-6およびbp1680-1685に導入された制限酵素部位を伴う、クローニングに使用した *ery PKS* 負荷モジュールをコードするDNAのフラグメントである。

配列番号9はオリゴSP14である。

50

配列番号 10 はオリゴ S P 15 である。

配列番号 11 は、b p 1 - 6 および b p 1 6 8 9 - 1 6 9 4 に導入された制限酵素部位を伴う、クローニングに使用した a v e P K S 負荷モジュールをコードする D N A のフラグメントである。

配列番号 12 はオリゴ C R 3 2 2 である。

配列番号 13 はオリゴ C R 3 2 3 である。

配列番号 14 はオリゴ C R 3 2 4 である。

配列番号 15 はオリゴ C R 3 2 5 である。

配列番号 16 はオリゴ C R 3 2 8 である。

配列番号 17 はオリゴ C R 3 2 9 である。

10

配列番号 18 はオリゴ C R 3 3 0 である。

配列番号 19 はオリゴ C R 3 2 1 である。

配列番号 20 は、b p 1 - 6 および b p 8 3 2 - 8 3 7 に導入された制限酵素部位を伴う、クローニングに使用した r a p A T 2 をコードする D N A のフラグメントである。

配列番号 21 はオリゴ C C R M O N F である。

配列番号 22 はオリゴ C C R M O N R である。

配列番号 23 は、b p 1 - 6 および b p 1 3 8 9 - 1 3 9 4 に導入された制限部位を伴う、ストレプトミセス シナモネンシス (*S t r e p t o m y c e s c i n n a m o n e n s i s*) のクロトニル - C o A 還元酵素の発現に使用した D N A 配列である。

配列番号 24 はオリゴ A K 1 である。

20

配列番号 25 はオリゴ A K 2 である。

配列番号 26 は、b p 1 - 6 および b p 9 6 7 - 9 7 2 に導入された制限酵素部位を伴う、クローニングに使用した t y l A T 5 をコードする D N A のフラグメントである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Martin, Christine J.
 Burns, Lesley S.
 Graupner, Paul R.
 Lewer, Paul
 Vousden, William A.
 Wilkinson, Barrie
 Waldron, Clive

<120> Novel Spinosyn-Producing Polyketide Synthases

<130> 62069A

<140>

10

<141>

<150> US 60/358075

<151> 2002-02-19

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: oligo PRIS1

20

<400> 1

ggggaattca ctagtccgcg gagaaatagc gctgtacagc gtatgggaat ctcttgtacg 60
 g 61

<210> 2

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: oligo PRIS2

<400> 2

gggggatccc atatgggctc cttgtacggt gtacgggaag ataactcgta accgtacaag 60
 agattccc 68

<210> 3

<211> 94

<212> DNA

<213> *Streptomyces pristinaespiralis*

30

<400> 3

actagtccgc ggagaaatag cgtgtacag cgtatggga tctcttgtac ggtgtacgag 60
 tatcttccc tacaccgtac aaggagccca tatg 94

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligo CR311

<400> 4
cagatatcac tagttcggac gcatatgctg caagtatcta gaac

44

<210> 5
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligo CR312

<400> 5
gttctagata cttgcagcat atgcgtccga actagtata tctg

44

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligo SP28

<400> 6
aggacacata tggcggacct gtcaaagctc tc

32

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligo SP29

20

<400> 7
cccgttagcg gttcgcgggg cgcgcgttcg ttgg

34

<210> 8
<211> 1685
<212> DNA
<213> Saccharopolyspora erythraea

<400> 8
catatggcgg acctgtcaaa gctctccgac agtcggactg cacaacctgg gaggatcgtt 60
cgtccgtlgg ccctgtcggg gtgcaatgaa tccgccttgc gggcccggtg gcgccaatlg 120
cgtgcacatc tcgatcgatt tcccgatgcc ggtgtlogaag gtgtcggggc cgcgctcgcg 180
cacgacgagc aggcggacgc cgttcgcgat cgcgcgggtg tcgtcgcctc ctcgacctcc 240
gagctgctcg acggcctggc cgcggtcgcc gacggccggc cgcacgcctc ggtgggtccg 300
ggcgtlggcc ggccgtccgc gccggtggtg ttctgtcttc cgggcccagg cgcgcaatgg 360
gccgggatgg cgggcgaact cctcggcgag tcaagggttt tcgcgcgcgc gatggacgcg 420
tgcgcgcggg cgttcgagcc cgtgaccgac tggacgctgg cgcaggctct ggactctccc 480
gagcagtcgc gccgcgtcga ggtcgtccag cccgcctgtt tcgcggtgca gacgtcgcctg 540
gccgcgctct ggccgtcctt cggcgtgacc cccgacgcgc tgggtgggcca cagcatcggc 600
gagctggcgg ccgcgcacgt gtgcggtgcg gccggtgccc ccgacgcgcg gcgcgcgcgc 660
gcgctgtlga gccgcgagat gattccgttg gtgggcaacg gcgacatggc agccgttcgcg 720
ctctccgcgc acgagatcga gccgcgcac gcccggtggg acgacgacgt ggtgctggcc 780
ggggtcaacg gtccgcgcgc ggttctgctg accggttcgc cggaaaccgt cgcgcgcgcg 840
gtccaggagc tctcggccga gggggtccgc gcacaggtda tcaatgtgtc gatggcggcg 900
cactcggcgc aggtcgcaga catcgcgcag gggatgcgct cggccctggc gtgggttcgcg 960
cccggtggct cggagggtgc ctctacgcc agcctcaccg gaggtgcggt cgacacgcgc 1020
gagctggttg ccgactactg gcgcgcgagc ttccgggtgc cgggtgcgctt cgacgagggc 1080
atccggtccg ccttgagggt cgttcccggc acgttcgtcg aagcgagccc gcacccggltg 1140
ctggccgcgc cgttcagca gacgttcgac gccgagggtt cctcgcgcgc ggtgggtccg 1200
acgctgcaac gcgggcaggg cggcatgcgg cggttcctgc tggccgcggc ccaggcgttc 1260
accggcggcg tggccgtcga ctggaccgcc gcctacgacg acgtgggggc cgaacccggc 1320
tctctgcgcg agttcgcgc gcccgaggag gaagacgagc cggccgagtc cggcgtcgac 1380
tggaaacgcgc caccgcacgt gctgcgcgag cggctgctcg cggtcgtcaa cggcgcgacc 1440

30

40

gcccgcgttg cgggcccgcga agccgacgcc gaggccacgt tccgcgagct ggggctggac 1500
 tcgggtgctgg ccgcgcagct gcgcgccaaag gtgagcgccg cgatcgggcg cgagggtcaac 1560
 atcgccctgc tctacgacca cccgactccg cgtgcgctcg cggaaacact cgcggcggga 1620
 accgaggtcg cacaacggga aaccgcgcgc cggaccaacg aagcggcgcc cggcgaaccg 1680
 ctagc 1685

<210> 9
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo SP14

<400> 9
 aagctagccg tgatcgggat gggctgtcgg tt 32

10

<210> 10
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo SP15

<400> 10
 atagcggccg cccccagccc ccacagatcc ggtcaccaa 39

<210> 11
 <211> 1694
 <212> DNA
 <213> Streptomyces avermitilis

20

<400> 11
 catatggcgg acctgtcaaa gctctcogac agtcggactg cacaacctgg gaggatcgtt 60
 cgtcccgtag ccctgtcggg gtgcaatgaa tccgccttgc gggcccgtgc gcgccaattg 120
 ogtgcacatc tcgatcgatt tcccgatgcc ggtgtcgaag gtgtcggggc cgcgctcgcg 180
 cagcagcagc aggcggacgc cggtcggcat cgcgcggtcg tcgtcgcctc ctcgacctcc 240
 gagctgctcg acggcctggc cgcgctcgcc gacggccggc cgcacgcctc ggtggtccgc 300
 ggcgtggccc ggccgtccgc gccactagtc ttctgttttc cggggcaggg ccgccaatgg 360
 ccgggcatgg gaagggaaact tctcgacgct tccgacgtct tccgggagag cgtccgcgcc 420
 tcggaagccg cgttcgcgcc ctacgtcgac tggtcggtag agcaggtggt gggggactcg 480
 ccggacgctc ccgggctgga ccgggtggac gtcgtccagc cgacctggt cgcgctcatg 540
 atctccctgg ccgcccctcg gcgctcgcaa ggggtcgagc cgtgcgcggg gctgggacac 600
 agcctgggcg agatcggggc agcccacgtc tccggagggc tctccctggc cgacgcgcga 660
 cgcgtggtga cgttttgagg ccaggcacag accacccctg ccgggacccg cgcgctcgtc 720
 tccgtcgccg ccacgcggga tgagctcctg cccggaatcg ctccgtggac cgaggacaa 780
 ccggcgcggc tcgccgtcgc agcgtcaac ggaccccga gcacagtcgt ttccggtgcc 840
 cgcgagggcg tcgcggaact ggtggccgac ctcccgccg cgcaggtgcg cagcgcatg 900
 atcccggtgg acgttccgc ccaactcccc ctgatgtaog ccacgagga acgggtcgtc 960
 agcggcctgc tgcccatac cccacgcccc tcccgcatcc ccttccactc ctcggtgacc 1020
 ggcggccgcc tcgacacccg cgagctagac ggcggctact ggtaccgcaa catgtcgagc 1080
 acggtccggt tcgagccgcg cgcgccggtg cttctgcagc aggggcccga gacgttcgtc 1140
 gagatgagcc cgcacccggg gctgacctg ggctccagg agctcgcgc ggacctgggc 1200
 gacacccacc gcaccgccga caocgtgatc atgggcacgc tgcgcgcgg ccagggcacc 1260
 ctggaccact tcctgaagtc tctcgcccaa ctacgggggc atggtgagac gtcggcgacc 1320
 accgtcctct cggcacgcct gacggcgctg tccccacgc agcagcagtc gctgctcctg 1380
 gacctggtgc gcgccacac catggcggtg ctgaacgac aggaaacga gcgcaccgcg 1440
 tcggatgccc gcccatcggc gagtttcgcc cacctcggct tcgactcogt catgggtgtc 1500
 gaactgcgca accgctcag caaggccacg ggctgcggg tgcccgtgac gctcatcttc 1560
 gaccacacca cgcgggcgc ggtgcgcgc cgccttcgga cgcggcgct cggccacctc 1620
 gacgaggaca ccgcggccgt accggactca cccagcgccc acggaggcac ggcagcggcg 1680
 gacgaccgcg tagc 1694

30

<210> 12
 <211> 33

40

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo CR322

 <400> 12
 aatggccagg gctggcagtg ggccggtatg gca 33

 <210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo CR323 10

 <400> 13
 aacctaggaa cgccacggcc cagtccacgg t 31

 <210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo CR324

 <400> 14
 aacctaggcg cgggccgacg gctggacct 29

 <210> 15
 <211> 26 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo CR325

 <400> 15
 cgacacgcac gtctcatcct ggtcaa 26

 <210> 16
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo CR328 30

 <400> 16
 tatcactcta gaccagatat ccagctgca 29

 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: oligo CR329

 <400> 17
 gctggatatc tggcttagag tga 23

 <210> 18
 <211> 38 40

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligo CR330

<400> 18
ttcctggagg gaaacgccat atgtcgaatg aagagaag 38

<210> 19
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligo CR321

10

<400> 19
tttggccagg gaagacgaag acgacctcgc cgtc 34

<210> 20
<211> 837
<212> DNA
<213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 20
tgccagggg tgcagcgtg ctggatatggg tgaggaactg gccgccggt tccccgtctt 60
cgccgggagc catcagcagg tgtgggatct gctggatgtg cccgatctcg atgtgaatga 120
gaccggggtat gccagccgg cctgtttcgc tttgcagggt gctctgttcg ggttgctgga 180
atcgtgggggt gtacggccgg atgcgggtgtt cggtcactct gtccgtgagc tcgccgccgg 240
atacgtctcc ggggttggtt cgttggagga tgcctgcact ttggtgtcgg cgcgggctcg 300
tctgatgcag gctctgcctg cgggtgggggt gatggtcgtt gtcccgtctt cggaggatga 360
ggctcggggc gtgctgggtg aggggtgtga gatgccgcgt gtcaacgggc cgtcgtcggg 420
ggttctctcc ggtgatgagg ccgccgtgct gcaggccgcg gaggggctgg ggaagtggac 480
gcggctggcg accagtcacg cgttccattc cgcctgtatg gaaccgatgc tggaggagtt 540
ccgggcccgtc gctgaaggcc tgacctaccg gacgcccgag gtccgccatg ccgctggtga 600
tcagggtgatg accgctgagt actgggtgcg gcagggtccg gacacggtcc ggttcggcga 660
gcagggtggc tcgttcgagg atgcgggtgtt cgtcagagctg ggtgccgacc ggtcactggc 720
ccgcctggtc gatggcatcg cgatgctgca cggtgaccat gaggcgcagg ccgctgtcgg 780
tgccctggct cacctgtacg tgaacggcgt gagtgtcgag tggtcacggg tcctagg 837

20

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligo CCRMONEF

<400> 21
ggcaaacata tgaaggaaat cctggacgcg 30

30

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligo CCRMNR

<400> 22
tccgcggatc ctacgtgcgt tcagatcagt gc 32

<210> 23
<211> 1394
<212> DNA

40

<213> *Streptomyces cinnamonensis*

<400> 23

```

catatgaagg aaatcctgga cgcgattcag gccagaccg cgaccgcgag cggcaccgcc 60
gcgggtcacgt ccgcgcactt cgcgcgtctc cccctgcccg actcgtaccg cgcgataacc 120
gtgcacaagg acgagacgga gatgttcggg ggccctcaggt cccttgacaa ggacccccgc 180
aagtcgctcc atctggacga cgtgcggatc ccgaactcg gcccggtga ggcccttggtg 240
gcggtcatgg cctcctcggg caactacaac tccgtgtgga cctcgatctt cgagccogtc 300
tccaccttoa gcttcctgga gcggtacggc cggctcagcg acctgagcaa gcgccacgac 360
ctgccgtacc acatcatcgg ctccgacctg gcgggcgtcg tgcctgcgac cgggcccggc 420
gtgaacgcct ggaacccggg cgacgaggtc gtcgcgcact gctcgagcgt cgagctggag 480
tctccgacg gccacaacga cagcatgctc gaacccgagc agcgcatctg gggcttcgag 540
accaacttgg gcggtctcgc cgagatcggc ctggtcaagt ccaaccagct catgccgaag 600
ccgggtcacc tgagctggga ggagccggc tcgccggcc tggtagaact caccgcgtac 660
gcgcagctcg tgcctcgcaa cgggcgcggc atgaagcagg gcgacaacgt gctgacttgg 720
ggcgcgagcg gcgactcgg gtcgtacgac acgcagttcg cgtcgccgg cggcgccaac 780
cccattctgt tcgtctccag cccccaagag gcggagatct gccgcgcgat gggcgccgag 840
gcgatcatcg accgcaacgc cgagggtctac aagttctgga aggacgagca gacccaggac 900
cccaaggagt ggaagcgctt cggcaagcgc atccgcgagc tcaccggcgg cgaggacatc 960
gacatcgtct tcgagcacc cggcccgag accttcggcg cctcggtcta cgtcacggcg 1020
aaggcgcgga ccataccacc ctgcgcctcg acctcgggct acatgcacga gtacgacaac 1080
cgctacctgt ggaatgacct gaagcgcatc atcggtctgc acttcgcaa ctaccgcgag 1140
gcgtgggagg ccaaccgcct gatcgcaag ggcaagatcc acccgacgct ctccaagacg 1200
tacgccttgg aggacaccgg ccaggccggc tacgacgtcc accgcaacct ccaccagggc 1260
aaggctcggg tctcgccttc cgcccgagag gagggccttg gctgcgcga cccggagaag 1320
cgggcccagc acatcgacgc gatcaaccgt ttccgcaacg tctgaacgca ctgatctgaa 1380
cgcactgagg atcc 1394

```

10

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: oligo AK1

<400> 24

aatggccagg gctcgcagtg gccgtcgatg gcc 34

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: oligo AK2

<400> 25

ttcctaggaa gagggcttct ccgtcgatct ccagtc 36

30

<210> 26

<211> 972

<212> DNA

<213> *Streptomyces fradiae*

<400> 26

```

tggccagggc tcgcagtggc cgtcgatggc ccgggacctg ctcgaccgcg cgcgccctt 60
ccgcgagacg gcgaaggcct gcgacgcgcg gctgagcgtc catctggact ggtccgtgct 120
cgatgtctct caggagaagc cggacgcgcc gccgctgagc cgggtcgacg tgggtgcagc 180
cgtgctgttc acgatgatgc tctcgctcgc cgcctgctgg cgggacctcg gcttccacc 240
ggccgcgctg gtgggccaact cccagggaga gatcgccggc gcctgcgttg cggcgcgct 300
ctccctggag gacgcggcgc ggtatcgtgg gctgcgcagc cgggcatggc tcacactggc 360
cggcaagggc ggcattggcg ccgtctccct gccggaagcc cggctgcgcg agcggatcga 420
gcggttcggg cagcggtctg cgggtggcgc ggtgaacagc ccgggcacgg cggcggtcgc 480
cggtgacgtg gacgcgctgc gggaactgct ggcgagctg acccgggag gcattccggc 540
caagccgatc cccgcgctgg acacggccgg ccaactccgc caggtggacg gctgaaggga 600

gcattctctt gaggtgctgg cgcgggtctc ccgcgcctcc tcggacatcc cgttctactc 660
gacggtgacg ggcgcgcgcg tggacaccga gcggctggac gccgggtact ggtaccgcaa 720
catgcgggag cccgtggagt tcgagaaggc cgtcagggca ctgatcgccg accgctacga 780
cctgttctct gagtgcaccc cgcacccgat gctcgccatg tcgtcggacg agacactcac 840
cgacagcggc ggccacggca ccgtgatgca caccctccgc cggcagaagg gcagcgccaa 900
ggacttcggc atggcgctct gcctcgcta tgtcaacgga ctggagatcg accgagaagc 960
cctcttccca gg 972

```

40

【図 1】

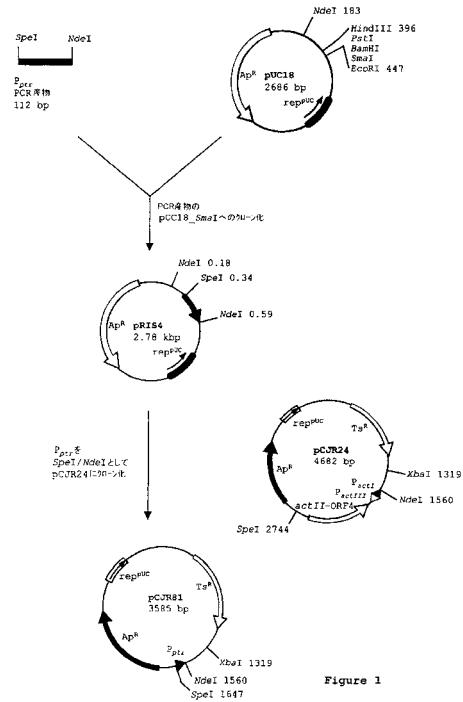


Figure 1

【図 2】

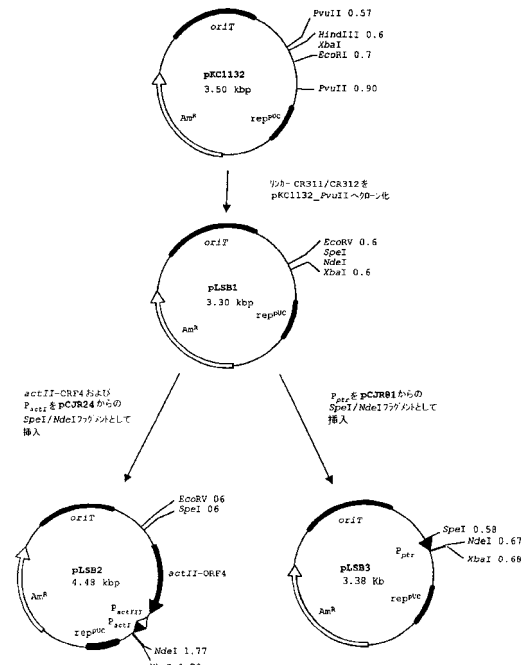


Figure 2

【図 3】

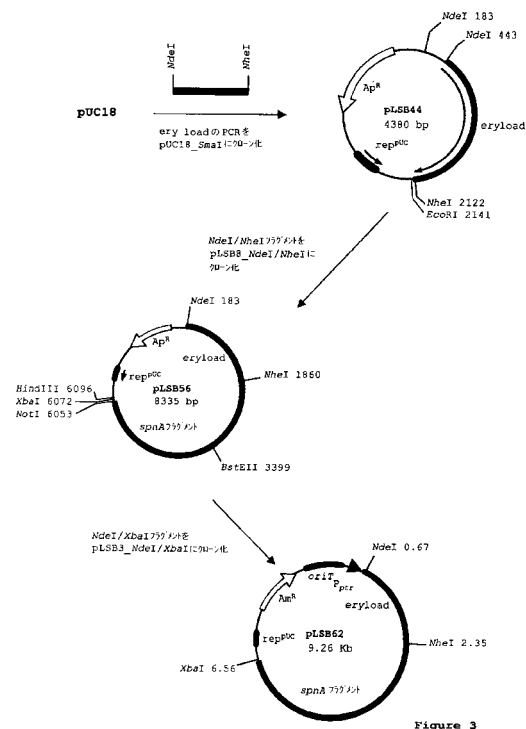


Figure 3

【図 4】

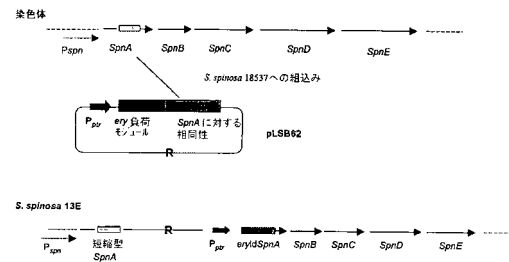


Figure 4

【図 5】

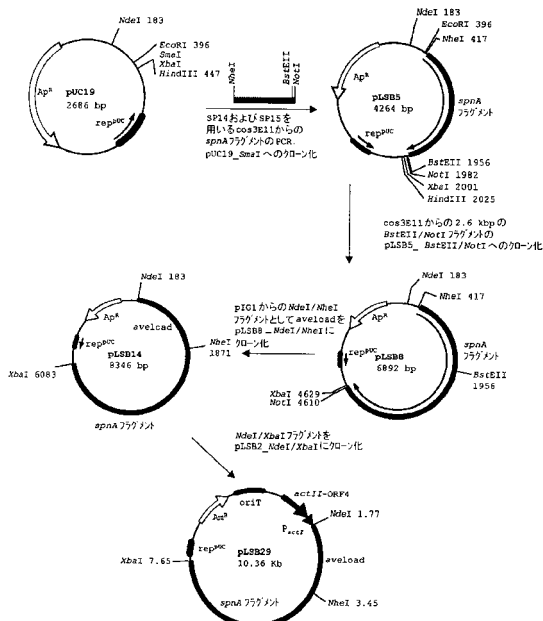


Figure 5

【図 6】

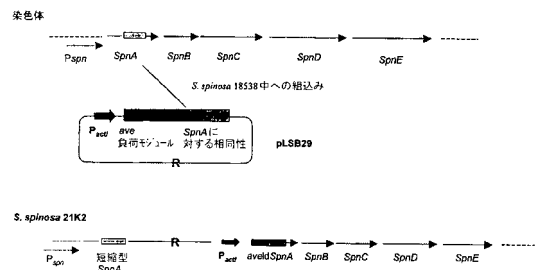


Figure 6

【図 7 a】

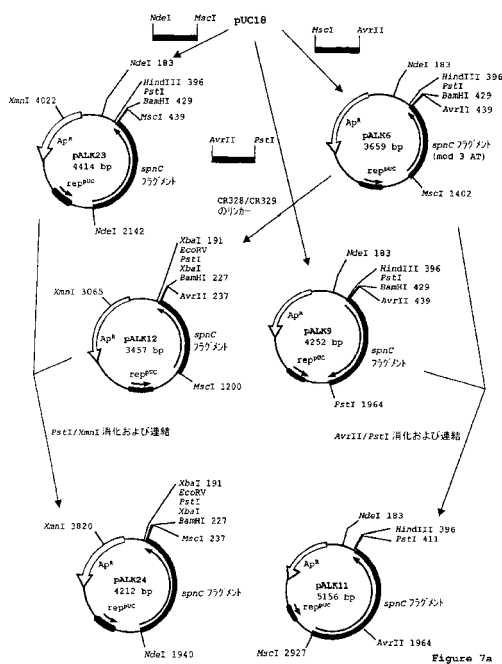


Figure 7a

【図 7 b】

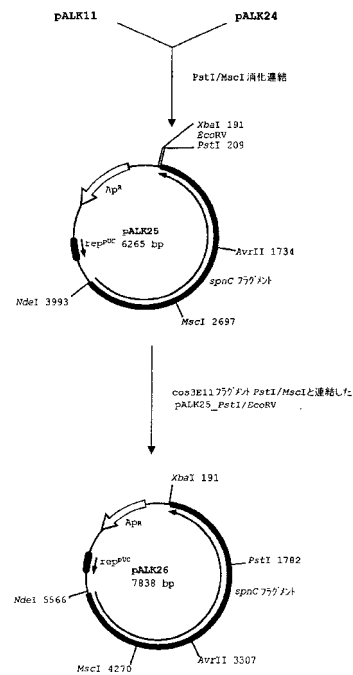


Figure 7b

【図 8】

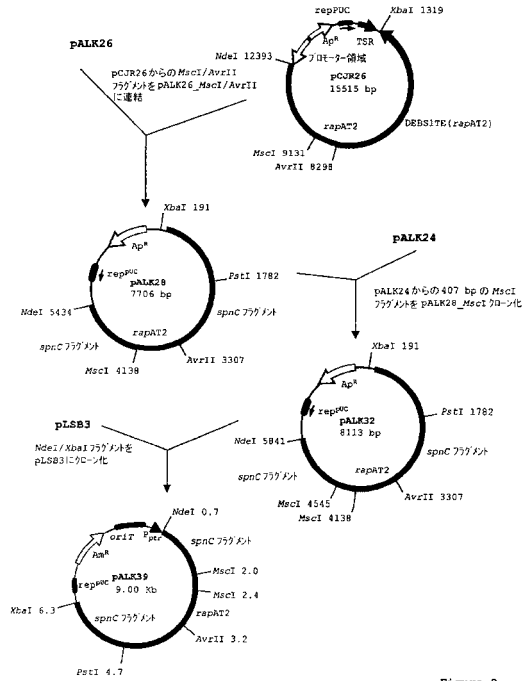


Figure 8

【図 9】

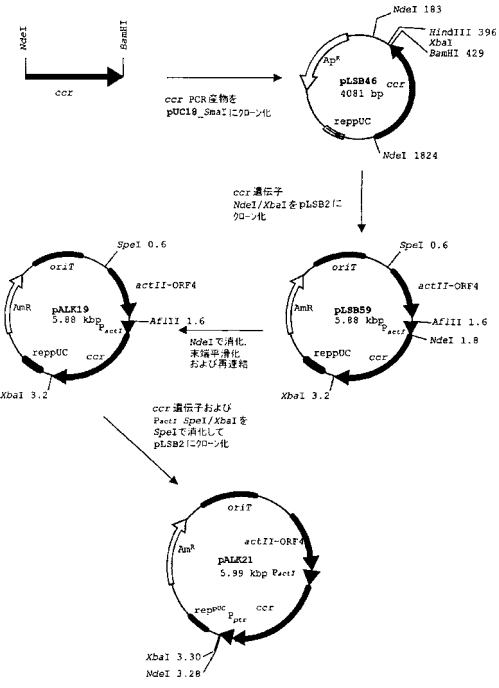


Figure 9

【図 10】

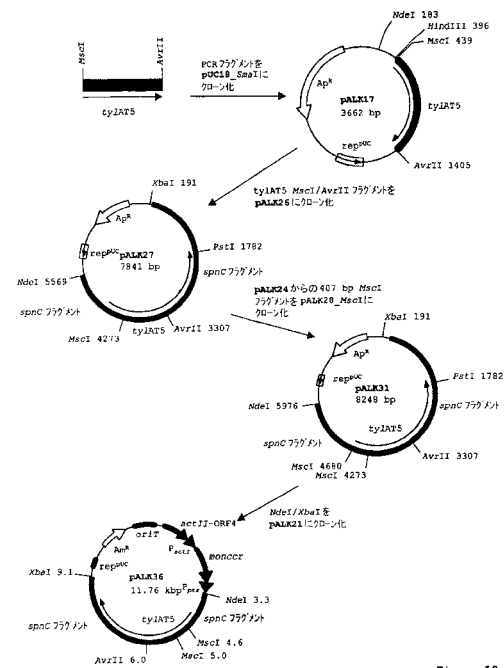


Figure 10

【図 11】

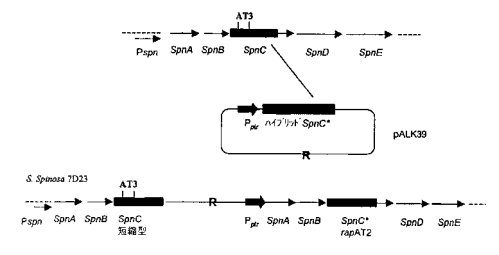


Figure 11

【図 12】

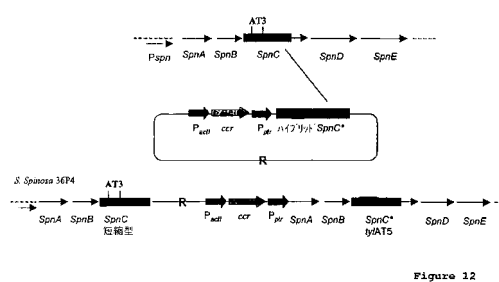


Figure 12

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 A 0 1 M 17/00 (2006.01) A 0 1 M 17/00 Z
 A 0 1 N 45/00 (2006.01) A 0 1 N 45/00
- (72)発明者 グローブナー, ポール・アール
 アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 0 3 3 カーメル・ウエンブリーロード 1 2 7 2 3
- (72)発明者 ルワー, ポール
 アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 2 3 4 インディアナポリス・ダンディクリークドライブ 8 8 1 0
- (72)発明者 マーティン, クリステイン・ジェイ
 イギリス・ハートフォードシャー エスジ-5 1 エツクスイー・ヒツチン・ブランプトンパーク
 ロード 7 3
- (72)発明者 ブースデン, ウィリアム・エイ
 イギリス・ケンブリッジシャー シービー 4 5 イーイー・ロングスタントン・ソーンヒルプレイ
 ス 3 8
- (72)発明者 ウォルドロン, クライブ
 アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 2 2 0 インディアナポリス・グリーンリーブスロード 6 2 0 6
- (72)発明者 ウィルキンソン, バリー
 イギリス・ベドフォードシャー エムケイ 4 4 1 ピーエル・シャーンブルック・ウエルボンドク
 ロース 1 0

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 特表平 0 6 - 5 0 6 4 7 7 (J P , A)
 特表 2 0 0 0 - 5 1 1 0 6 3 (J P , A)
 国際公開第 9 9 / 0 4 6 3 8 7 (W O , A 1)
 国際公開第 0 0 / 0 0 1 8 2 7 (W O , A 1)
 特開平 0 9 - 2 2 4 6 8 7 (J P , A)
 Chemistry & Biology, 2 0 0 1 年, Vol.8, p.487-499
 Science, 1 9 9 1 年, Vol.252, p.675-679

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90
 CA/REGISTRY(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq