

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4599357号  
(P4599357)

(45) 発行日 平成22年12月15日(2010.12.15)

(24) 登録日 平成22年10月1日(2010.10.1)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	9/00 (2006.01)	C 1 2 N	9/00
C 1 2 N	9/02 (2006.01)	C 1 2 N	9/02
C 1 2 N	9/14 (2006.01)	C 1 2 N	9/14
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15

請求項の数 18 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-529309 (P2006-529309)
(86) (22) 出願日	平成17年7月19日(2005.7.19)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/013541
(87) 国際公開番号	W02006/009276
(87) 国際公開日	平成18年1月26日(2006.1.26)
審査請求日	平成18年9月20日(2006.9.20)
(31) 優先権主張番号	特願2004-211279 (P2004-211279)
(32) 優先日	平成16年7月20日(2004.7.20)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ ジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(73) 特許権者	000001915 メルシャン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
(74) 代理人	100087642 弁理士 古谷 聡
(74) 代理人	100076680 弁理士 溝部 孝彦
(74) 代理人	100091845 弁理士 持田 信二
(74) 代理人	100098408 弁理士 義経 和昌

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドをコードするDNA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プラジエノライドの生合成に関与し、ポリケチド合成酵素、6位水酸化酵素、7位アシル化酵素および18,19位エポキシ化酵素から選ばれる少なくとも1種であるポリペプチドをコードする少なくとも1個の領域を含んでなる単離された純粋なDNAであって、以下の(1)項から(4)項までのいずれかの項で定義された塩基配列から選択された少なくとも1個の塩基配列を含んでなるDNA。

(1) 以下の(a)項から(h)項までのいずれかの項で定義された塩基配列、

(a) 配列番号1の塩基8340から塩基27935までの連続した塩基配列

(b) 配列番号1の塩基28021から塩基49098までの連続した塩基配列

(c) 配列番号1の塩基49134から塩基60269までの連続した塩基配列

(d) 配列番号1の塩基60269から塩基65692までの連続した塩基配列

(e) 配列番号1の塩基65707から塩基66903までの連続した塩基配列

(f) 配列番号1の塩基68160から塩基66970までの連続した塩基配列

(g) 配列番号1の塩基69568から塩基68270までの連続した塩基配列

(h) 配列番号1の塩基1から塩基74342までの連続した塩基配列

(2) (1)項において定義されたいずれかの塩基配列との相同性が90%以上である塩基配列

(3) (1)項または(2)項で定義されたいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列

(4) 遺伝暗号の縮重のため、(1)項において定義された塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしないが、(1)項で定義された塩基配列と同じアミノ酸配

10

20

列をコードする塩基配列

【請求項 2】

プラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドをコードする全ての領域を含んでなることを特徴とする、請求項 1 記載のDNA。

【請求項 3】

ストレプトマイセス(Streptomyces)属に属する微生物に由来することを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載のDNA。

【請求項 4】

以下の(a)項から(h)項までのいずれかの項で定義された塩基配列から選択された少なくとも1個の塩基配列を含んでなる、請求項 1 記載のDNA。

(a) 配列番号 1 の塩基8340から塩基27935までの連続した塩基配列

(b) 配列番号 1 の塩基28021から塩基49098までの連続した塩基配列

(c) 配列番号 1 の塩基49134から塩基60269までの連続した塩基配列

(d) 配列番号 1 の塩基60269から塩基65692までの連続した塩基配列

(e) 配列番号 1 の塩基65707から塩基66903までの連続した塩基配列

(f) 配列番号 1 の塩基68160から塩基66970までの連続した塩基配列

(g) 配列番号 1 の塩基69568から塩基68270までの連続した塩基配列

(h) 配列番号 1 の塩基1から塩基74342までの連続した塩基配列

【請求項 5】

請求項 1 から 4 までのいずれかの請求項に記載されたDNAによりコードされるポリペプチド。

【請求項 6】

ポリケチド合成酵素活性を有することを特徴とする、請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 2、3、4 または 5 記載のアミノ酸配列またはその部分配列からなることを特徴とする、請求項 6 記載のポリペプチド。

【請求項 8】

6 位水酸化酵素活性を有することを特徴とする、請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 6 記載のアミノ酸配列またはその部分配列からなることを特徴とする、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 10】

18,19位エポキシ化酵素活性を有することを特徴とする、請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 8 記載のアミノ酸配列またはその部分配列からなることを特徴とする、請求項 10 記載のポリペプチド。

【請求項 12】

7位アシル化酵素活性を有することを特徴とする、請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 7 記載のアミノ酸配列またはその部分配列からなることを特徴とする、請求項 12 記載のポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 1 から 4 までのいずれかの請求項に記載されたDNAを担持する自律複製性または組み込み複製性の組み換えプラスミド。

【請求項 15】

請求項 1 から 4 までのいずれかの請求項に記載されたDNAを保持する形質転換体。

【請求項 16】

請求項 15 記載の形質転換体を培地で培養し、その培養液からプラジエノライドを採取することを特徴とする、プラジエノライドの製造方法。

10

20

30

40

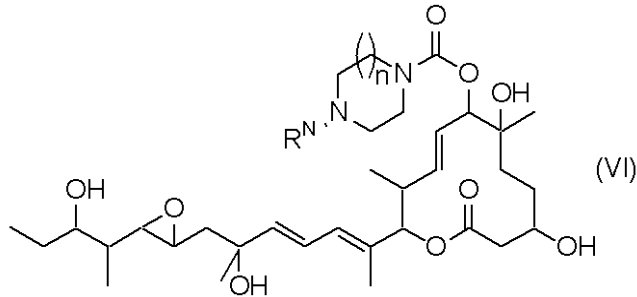
50

## 【請求項 17】

プラジエノライドがプラジエノライドBである、請求項 16 記載の製造方法。

## 【請求項 18】

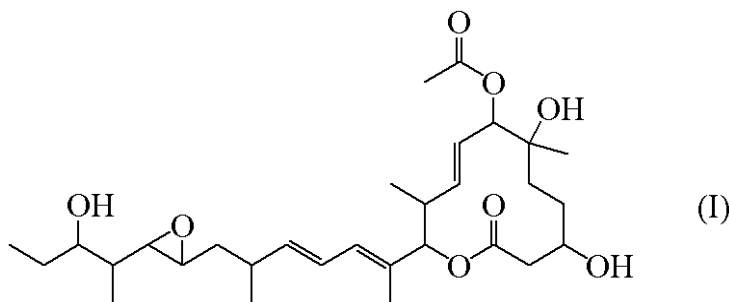
式 (VI)



10

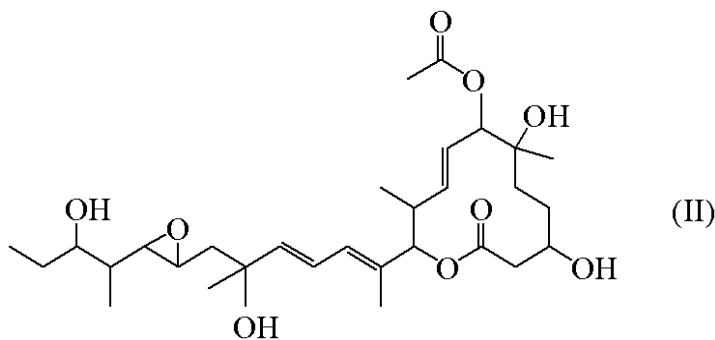
[式中、 $R^N$ は、低級アルキル基または環状の低級アルキル基を示し、 $n$ は、1または2を示す]で表されるプラジエノライドD誘導体の製造方法であって、

(1) 請求項 16 または請求項 17 に記載の製造方法によって式 (I)



20

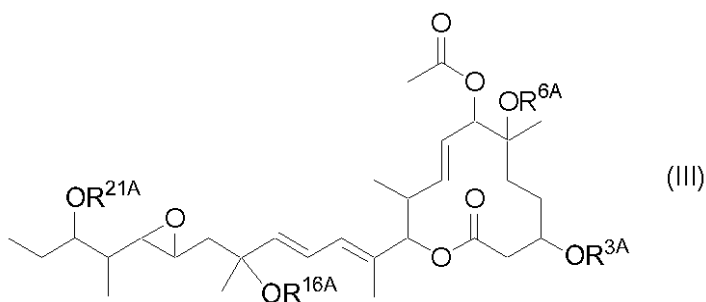
の化合物 (プラジエノライドB) を製造し、次いでその 16 位に水酸基を導入して、式 (II)



30

の化合物 (プラジエノライドD) に変換する工程、

(2) 式 (II) の化合物の 3、6、16 及び / または 21 位の水酸基に適宜保護基を導入して、式 (III)

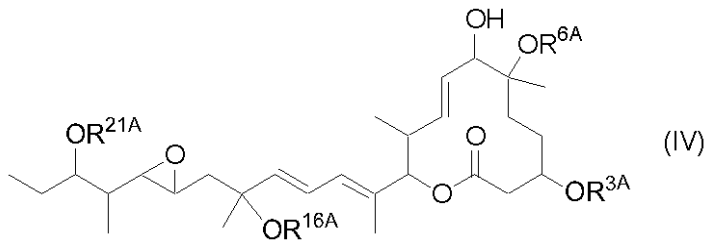


40

の化合物 [式中、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$  および  $R^{21A}$  は、水素原子または水酸基の保護基を示す (ただし、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$  および  $R^{21A}$  は、同時に水素原子を示さない)] に変換する工程、

(3) 式 (III) の化合物の 7 位のアセチル基を脱離させることにより、式 (IV)

50

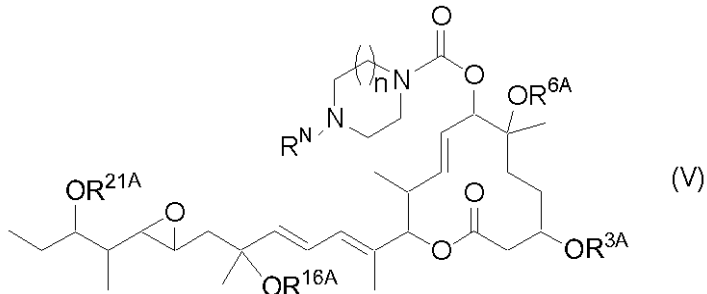


(IV)

の化合物[式中、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$ および $R^{21A}$ は、前記の意味を有する]に変換する工程

(4)式(IV)の化合物の7位に置換基を導入して、式(V)

10



(V)

の化合物[式中、 $R^N$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$ および $R^{21A}$ は、前記の意味を有する]に変換する工程

20

および(5)式(V)の化合物の保護基を脱離させる工程を含む製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、マクロライド系化合物プラジエノライドの生合成に關与するポリペプチドおよびそれらのポリペプチドをコードするDNAおよびそれらの改変体に関する。さらには、それらDNAおよびそれらの改変体の一部または全体を保持する形質転換体、およびそれらの形質転換体を用いたマクロライド系化合物プラジエノライドの製造方法に関する。

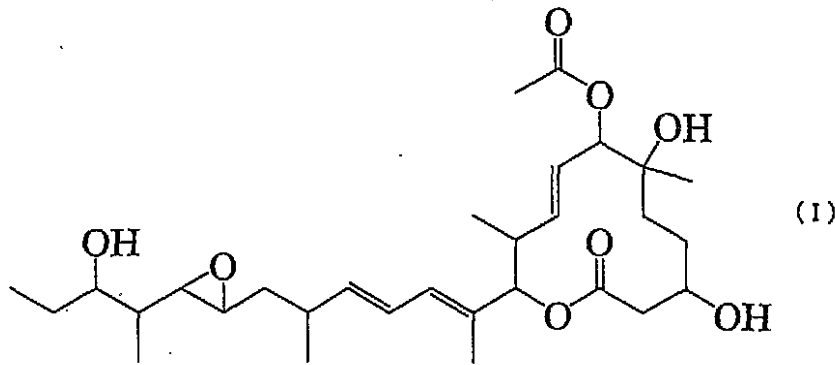
【背景技術】

放線菌の生産する様々な代謝産物のなかには生理活性物質として重要な物質が見出されている。とりわけ構造上ポリケチドを母核にもつ化合物(以下、ポリケチド化合物という)が多く見出されている。例えば、抗菌性物質として知られるエリスロマイシン、ジョサマイシン、タイロシン、ミデカマイシン、マイシナマイシン、抗真菌性物質として知られるナスタチン、アンフォテリシン、殺虫性物質として知られるミルベマイシン、エバメクチン、免疫抑制物質として知られるタクロリムス、ラパマイシンおよび抗腫瘍性物質として知られるダウノマイシン、アドリアマイシン、アクラシノマイシンなどのように種々の生物活性を有する化合物が知られている。

30

そのような化合物の1つとしてプラジエノライドと命名された優れた抗腫瘍活性を示す一群のマクロライド系化合物がある。プラジエノライドは、放線菌ストレプトマイセス・エスピー(*Streptomyces sp.*) Mer-11107株の培養物から見出された化合物群の総称であり、下記式(I)で示される11107B(プラジエノライドB)をはじめとして50種以上の類縁体が知られている(WO02/060890)。

40



11107B (プラジェノライドB)

10

一方、ポリケチド化合物の生合成機構についても多くのことが知られている。上記の多種多様なポリケチド化合物は共通な生合成機構を共有していると言われており、その機構は脂肪酸の生合成と極めて類似している。即ち、ポリケチド化合物の合成は酢酸やプロピオン酸などの低級脂肪酸が連続的に縮合し、次いで伸張したアシル基の位のカルボニル基を脂肪酸合成と同様な方法で様々にケトン還元、脱水あるいはエノイル還元する工程により生合成される。これら多くのポリケチド化合物の種々の反復的な合成工程はそれぞれの反応触媒活性に必要な別々の活性部位(ドメイン)を有する高分子の多機能酵素複合体

20

によって調節されると言われている。ポリケチド生合成の一般的な反応様式は、例えば、Ann. Rev. Gen., 24(1990)37-66およびAnn. Rev. Microbiol., 47(1993)874-912に概説されている。ポリケチド合成酵素をコードしているDNA配列は一般にポリケチド骨格合成に必要なすべての活性をコードしており、縮合工程と縮合後の修飾工程を含む反復単位、即ちモジュールに構成されていることが明らかにされている。各々の触媒活性は、各縮合工程に含まれる特定のカルボン酸構成単位に対する特異性に関与するかあるいは達成される特定の縮合後の修飾機能を規定する異なる部位が関与している。例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA 95(1998)12111-12116にはストレプトマイセス・ベネズエラエ(*Streptomyces venezuelae*) ATCC 15439のピクロマイシン生合成に関わるポリケチド合成酵素をコードする遺伝子について記載されている。またWO93/13663にはサッカロポリスポラ・エリスレア(*Saccharopolyspora erythraea*)のエリスロマイシンポリケチド合成酵素をコードする遺伝子の構成が記載されている。この遺伝子は6つのモジュールから構成されており、各モジュールが1つの縮合工程を行う。即ち、アシル側鎖伸長の正確な配列と伸長している鎖の修飾は各モジュールに存在する遺伝子情報によって決定される。

30

また、多種多様なポリケチド化合物は、ポリケチド合成酵素によりポリケチド骨格の合成が行われた後、水酸化、エポキシ化、メチル化などの修飾反応を触媒する酵素(以下、修飾酵素ということがある)により、しばしば修飾を受けて最終的な代謝産物に変換される。これらの生産に関与する遺伝子群、すなわち最終的な代謝産物を生合成するために必要な酵素のほか、生産調節に必要な調節因子などをコードする遺伝子(以下、これらの生合成に関与する遺伝子群を総称して単に「生合成遺伝子」と称することがある)は、一般に生産菌のゲノムまたはプラスミド上のDNA領域にクラスターを形成して配置されていることが明らかにされている。

40

ポリケチド合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列情報が決定されれば、その情報を基にして、ドメインを改変することにより、炭素鎖の大きさ、縮合過程の位炭素の官能基を変化させることが可能となってくる。例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993)7119-7123には、エリスロマイシンのポリケチド合成酵素遺伝子内の特定ドメインを選択的に不活化することにより、エリスロマイシンの新規

50

誘導体を生じさせることができると記載されている。さらに、各モジュールのドメインを他のものと組み換えることにより、予測可能な新規の化合物を生産させることが可能となってくる。例えば *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 1846-1851 には、エリスロマイシンのポリケチド合成酵素遺伝子内のドメインをいくつか組み換えることで多種の新規化合物ができることが記載されている。

また、修飾酵素をコードする遺伝子（以下、修飾酵素遺伝子ということがある）を含んだ生合成遺伝子クラスターの塩基配列が決定されれば、その情報を基にして、修飾酵素遺伝子を選択的に改変することにより、予測可能な新規の化合物を生産させることが可能となってくる。例えば、*Science* 252 (1991) 114-116 には、エリスロマイシンのポリケチド合成酵素遺伝子の近傍に存在する水酸化酵素遺伝子 *eryF* を欠損させることで新たな誘導体 6-デオキシエリスオノリド B ができることが記載されている。

10

さらに修飾酵素遺伝子の発現を活性化することで不要な副産物を減少させ、単一の目的成分を生産させることも可能となる場合がある。遺伝子発現の活性化には一般的にはプロモーターを置換することによる転写活性化、マルチコピーベクターを用いた遺伝子コピー数の増加、変異導入による遺伝子産物機能の向上などによる方法が知られている。また調節遺伝子を同様な方法で活性化させたり、逆に不活性化させたりすることで生産性を高めることが可能となる場合がある。

さらに、これら生合成遺伝子クラスターをコードする遺伝子を取得し、適当な方法を用いて異種菌株に導入することで、異種菌株による目的ポリケチド化合物の生産ができる場合がある。この時用いる異種菌株は、微生物、特に短期間の培養が可能な大腸菌などを使うと有利である。例えば *Science* 291 (2001) 1790-1792 には、大腸菌にポリケチド合成酵素遺伝子を組み込むことにより、エリスロマイシン前駆体である目的の 6-デオキシエリスオノリド B を効率よく生産できることが記載されている。

20

#### 【発明の開示】

本発明の課題は、マクロライド系化合物ブラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドおよびそれらのポリペプチドをコードする DNA およびそれらの改変体を提供することである。さらには、それら DNA およびそれらの改変体の一部または全体を保持する形質転換体、およびそれらの形質転換体を用いたマクロライド系化合物ブラジエノライドの製造方法を提供することである。

30

本発明者らは、上記課題を解決するため、コロニーハイブリダイゼーション法に従って、一般にポリケチド合成酵素のケト合成酵素領域 (*keto synthase domain*) において保存されていると言われている配列に基づいて調製したプローブを用い、マクロライド系化合物ブラジエノライド生産菌である *Streptomyces* sp.) Mer-11107 株（以下、Mer-11107 株ということがある）から目的の DNA の取得を試みたが、多数のコスミドが選択され目的の DNA を直ちに同定することはできなかった。

そこで、ポリケチド合成酵素遺伝子の近傍に修飾酵素遺伝子が存在する可能性が高いことに着目し、公知の放線菌から修飾酵素の 1 つである水酸化酵素（シトクロム P450 酵素）の遺伝子断片を PCR 法にて取得し、これをプローブとすることによりポリケチド合成酵素領域の配列に基づいて取得された多数のコスミドから目的の DNA を含むいくつかのコスミドを選択した。

40

一方、Mer-11107 株は、多種類のブラジエノライド類縁体を生産する能力を有することから多数の修飾酵素の存在が推定される。本発明者らは、選択されたコスミド中に存在する水酸化酵素が、これら多くの修飾酵素のうちの 6 位水酸化酵素であることを見出し、さらに Mer-11107 株固有の性質であるプロトプラストになりにくい、あるいは常用される薬剤マーカーに耐性を有する等の遺伝子工学を適用するためには不利になる性質を克服することにより、初めて目的の DNA を取得、同定することに成功した。

すなわち、本発明は、以下の [1] ~ [20] に関する。

[1] ブラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドをコードする少なくとも 1 個

50

の領域を含んでなる単離された純粋なDNA。

[ 2 ] プラジエノライドの生合成に關与するポリペプチドをコードする全ての領域を含んでなることを特徴とする、[ 1 ] 記載のDNA。

[ 3 ] プラジエノライドの生合成に關与するポリペプチドが、ポリケチド合成酵素、6位水酸化酵素、7位アシル化酵素、18, 19位エポキシ化酵素および転写調節因子から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、[ 1 ] または[ 2 ] 記載のDNA。

[ 4 ] ストレプトマイセス (Streptomyces) 属に属する微生物に由来することを特徴とする、[ 1 ] から[ 3 ] までのいずれかに記載のDNA。

[ 5 ] 以下の( 1 ) 項から( 5 ) 項までのいずれかの項で定義された塩基配列から選択された少なくとも1個の塩基配列を含んでなる、[ 1 ] 記載のDNA。 10

( 1 ) 以下の( a ) 項から( i ) 項までのいずれかの項で定義された塩基配列、

( a ) 配列番号1の塩基8340から塩基27935までの連続した塩基配列

( b ) 配列番号1の塩基28021から塩基49098までの連続した塩基配列

( c ) 配列番号1の塩基49134から塩基60269までの連続した塩基配列

( d ) 配列番号1の塩基60269から塩基65692までの連続した塩基配列

( e ) 配列番号1の塩基65707から塩基66903までの連続した塩基配列

( f ) 配列番号1の塩基68160から塩基66970までの連続した塩基配列

( g ) 配列番号1の塩基69568から塩基68270までの連続した塩基配列

( h ) 配列番号1の塩基72725から塩基70020までの連続した塩基配列

( i ) 配列番号1の塩基1から塩基74342までの連続した塩基配列 20

( 2 ) ( 1 ) 項において定義されたいずれかの塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが有する塩基配列

( 3 ) ( 1 ) 項において定義されたいずれかの塩基配列との相同性が70%以上である塩基配列

( 4 ) ( 1 ) 項から( 3 ) 項までのいずれかの項で定義されたいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列

( 5 ) 遺伝暗号の縮重のため、( 1 ) 項において定義された塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしないが、( 1 ) 項から( 3 ) 項までのいずれかの項で定義された塩基配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列

[ 6 ] 以下の( a ) 項から( i ) 項までのいずれかの項で定義された塩基配列から選択された少なくとも1個の塩基配列を含んでなる、[ 1 ] 記載のDNA。 30

( a ) 配列番号1の塩基8340から塩基27935までの連続した塩基配列

( b ) 配列番号1の塩基28021から塩基49098までの連続した塩基配列

( c ) 配列番号1の塩基49134から塩基60269までの連続した塩基配列

( d ) 配列番号1の塩基60269から塩基65692までの連続した塩基配列

( e ) 配列番号1の塩基65707から塩基66903までの連続した塩基配列

( f ) 配列番号1の塩基68160から塩基66970までの連続した塩基配列

( g ) 配列番号1の塩基69568から塩基68270までの連続した塩基配列

( h ) 配列番号1の塩基72725から塩基70020までの連続した塩基配列

( i ) 配列番号1の塩基1から塩基74342までの連続した塩基配列 40

[ 7 ] [ 1 ] から[ 6 ] までのいずれかの項に記載されたDNAによりコードされるポリペプチド。

[ 8 ] ポリケチド合成酵素活性を有することを特徴とする、[ 7 ] 記載のポリペプチド。

[ 9 ] 配列番号2、3、4または5記載のアミノ酸配列またはその部分配列を有することを特徴とする、[ 8 ] 記載のポリペプチド。

[ 10 ] 6位水酸化酵素活性を有することを特徴とする、[ 7 ] 記載のポリペプチド。

[ 11 ] 配列番号6記載のアミノ酸配列またはその部分配列を有することを特徴とする、[ 10 ] 記載のポリペプチド。

[ 12 ] 18, 19位エポキシ化酵素活性を有することを特徴とする、[ 7 ] 記載のポ 50

リペプチド。

[ 1 3 ] 配列番号 8 記載のアミノ酸配列またはその部分配列を有することを特徴とする、[ 1 2 ] 記載のポリペプチド。

[ 1 4 ] 転写調節因子活性を有することを特徴とする、[ 7 ] 記載のポリペプチド。

[ 1 5 ] 配列番号 9 記載のアミノ酸配列またはその部分配列を有することを特徴とする、[ 1 4 ] 記載のポリペプチド。

[ 1 6 ] 7 位アシル化酵素活性を有することを特徴とする、[ 7 ] 記載のポリペプチド。

[ 1 7 ] 配列番号 7 記載のアミノ酸配列またはその部分配列を有することを特徴とする、[ 1 6 ] 記載のポリペプチド。

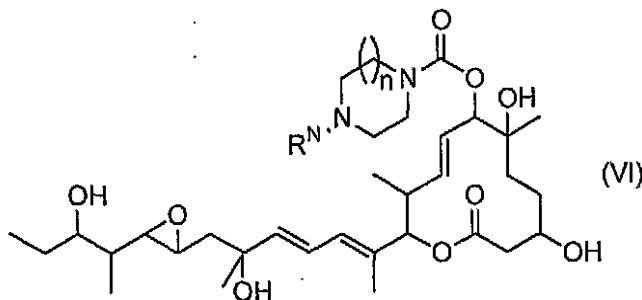
[ 1 8 ] [ 1 ] から [ 6 ] までのいずれかの項に記載された DNA を担持する自立複製性または組み込み複製性の組み換えプラスミド。

[ 1 9 ] [ 1 ] から [ 6 ] までのいずれかの項に記載された DNA を保持する形質転換体。

[ 2 0 ] [ 1 9 ] 記載の形質転換体を培地で培養し、その培養液がプラジエノライドを採取することを特徴とする、プラジエノライドの製造方法。

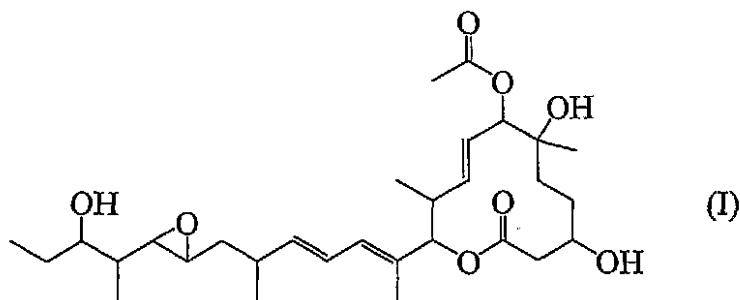
[ 2 1 ] プラジエノライドがプラジエノライド B である、[ 2 0 ] 記載の製造方法。

[ 2 2 ] 式 ( V I )

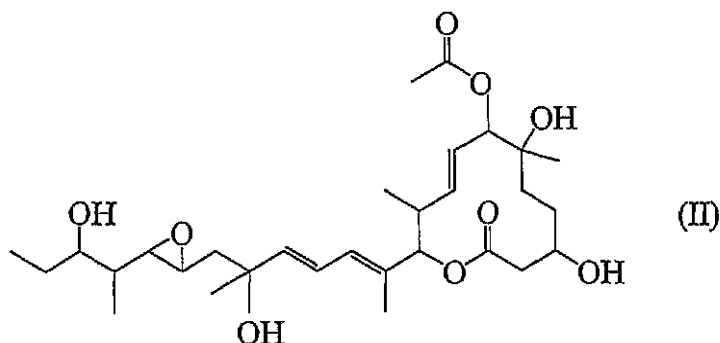


[ 式中、R<sup>N</sup> は、低級アルキル基または環状の低級アルキル基を示し、n は、1 または 2 を示す ] で表されるプラジエノライド D 誘導体を製造方法であって、

( 1 ) [ 2 0 ] または [ 2 2 ] に記載の製造方法によって得られる式 ( I )



の化合物 ( プラジエノライド B ) の 1 6 位に水酸基を導入して、式 ( I I )



10

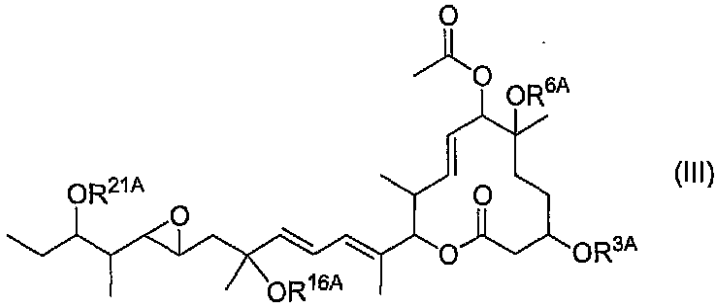
20

30

40

50

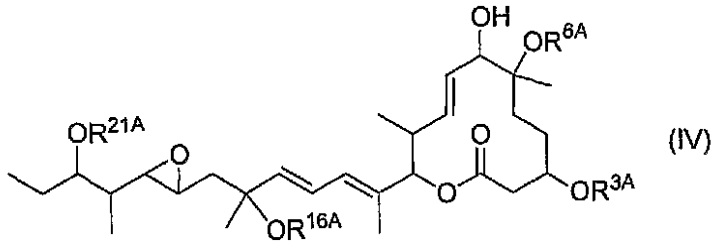
の化合物（プラジエノライド D）に変換する工程、  
 （2）式（II）の化合物の 3、6、16 及び / または 21 位の水酸基に適宜保護基を導入して、式（III）



10

の化合物 [ 式中、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$  および  $R^{21A}$  は、水素原子または水酸基の保護基を示す（ただし、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$  および  $R^{21A}$  は、同時に水素原子を示さない） ] に変換する工程、

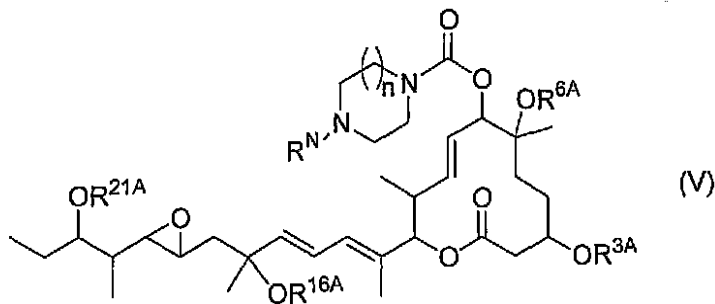
（3）式（III）の化合物の 7 位のアセチル基を脱離させることにより、式（IV）



20

の化合物 [ 式中、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$  および  $R^{21A}$  は、前記の意味を有する ] に変換する工程、

（4）式（IV）の化合物の 7 位に置換基を導入して、式（V）



30

の化合物 [ 式中、 $R^N$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{6A}$ 、 $R^{16A}$  および  $R^{21A}$  は、前記の意味を有する ] に変換する工程

および（5）式（V）の化合物の保護基を脱離させる工程を含む製造方法。

発明の詳細な説明

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

40

なお、本発明書において、「低級アルキル基」とは、炭素数 1 ないし 6 個のアルキル基を意味し、具体的には、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基等が挙げられ、特に、メチル基、エチル基、イソプロピル基等が好ましい。

「環状の低級アルキル基」とは、炭素数 3 ないし 6 個のアルキル基を意味し、具体的には、例えばシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロヘキシル等が挙げられ、特に、シクロプロピル基、シクロブチル基等が好ましい。

「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA」とは、例えば、上記（a）項から（i）項までのいずれかの項で定義された塩基配列を有する DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体

50

的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

「DNAの改変体」とは、構成塩基の削除、変換、付加、挿入などにより修飾されたもの、あるいはその誘導体を意味する。

「相同性」とは、2つの配列を最適の態様で整列させた場合に、2つの配列間で共有する一致したヌクレオチドの百分率を意味する。すなわち、相同性 = (一致した位置の数 / 位置の全数) × 100で算出でき、市販されているアルゴリズムを用いて計算することができる。また、このようなアルゴリズムは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990) 403 - 410に記載されるNBLASTおよびXBLASTプログラム中に組込まれている。

「類縁体」とは、化学構造を特徴づける主骨格が同じで、修飾の様式や側鎖の形状などが異なる化合物を意味する。

本発明においては、マクロライド系化合物プラジエノライドを生産する能力を有する微生物の培養菌体から、プラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドを一部にまたは全体としてコードするDNAを単離し、塩基配列を決定することができる。このような微生物としては、プラジエノライドを生産する能力を有するものであれば種および株の種類を問うことなく使用できるが、好ましい微生物として土壌から分離されたストレプトマイセス・エスピー(*Streptomyces* sp.) Mer-11107株を挙げることができる。本菌株は、FERM P-18144として平成12年12月19日付で日本国305-8566茨城県つくば市東1丁目1番3号在の工業技術院生命工学工業技術研究所(その後、日本国305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(IPOD)に組織変更した)に寄託され、さらに平成13年11月27日付で日本国305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(IPOD)において、これを国際寄託FERM BP-7812に移管された。なお、本菌株の菌学的性状は次のとおりである。

#### (1) 形態

基生菌系より螺旋状(Spirales)の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に10~20個程度の円筒形の孢子からなる孢子鎖を形成する。孢子の大きさは0.7×1.0μm位で、孢子の表面は平滑(smooth)を示し、孢子のう、菌核、鞭毛などの特殊な器官は認められない。

#### (2) 各種培地における生育状態

各種培地上で28℃、2週間培養後の培養性状を以下に示す。色調の記載はトレズナーのカラー・ホイールズ(TresnerのColor wheels)の色標名と括弧内に示す符号で表示する。

##### 1) イースト・麦芽寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、灰色の孢子(Light gray; d)が見られる。培養裏面はLight melon yellow(3ea)である。溶解性色素は産生しない。

##### 2) オートミール寒天培地

生育は中程度で、その表面に気中菌糸を僅かに着生し、灰色の孢子(Gray; g)が見られる。培養裏面はNude tan(4gc)またはPutty(1 1/2 ec)である。溶解性色素は産生しない。

##### 3) スターチ・無機塩寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、灰色の孢子(Gray; e)が見られる。培養裏面はFawn(4ig)またはGray(g)である。溶解性色素は産生しない。

。

10

20

30

40

50

## 4) グリセリン・アスパラギン寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、白色の孢子 (White ; a) が見られる。培養裏面は Pearl pink (3ca) である。溶解性色素は産生しない。

## 5) ペプトン・イースト・鉄寒天培地

生育は悪く、その表面に気中菌糸を着生しない。培養裏面は Light melon yellow (3ea) である。溶解性色素は産生しない。

## 6) チロシン寒天培地

生育は良好で、その表面に気中菌糸を着生し、白色の孢子 (White ; a) が見られる。培養裏面は Pearl pink (3ca) である。溶解性色素は産生しない。

## (3) 各種炭素源の同化性

ブリードハム・ゴトリーブ寒天培地に各種の炭素源を加え、28℃、培養2週間後の生育状況を以下に示す。

- |             |   |
|-------------|---|
| 1) L-アラビノース | ± |
| 2) D-キシロース  | ± |
| 3) D-グルコース  | + |
| 4) D-フルクトース | + |
| 5) シュークロース  | + |
| 6) イノシトール   | + |
| 7) L-ラムノース  | - |
| 8) D-マンニトール | + |
| 9) ラフィノース   | + |

(+は同化する、±は多少同化する、-は殆ど同化しない。)

## (4) 生理学的諸性質

本菌の生理学的諸性質は以下の通りである。

- 1) 生育温度範囲 (イースト・麦芽寒天培地、2週間培養) : 12 ~ 37
- 2) 最適温度範囲 (イースト・麦芽寒天培地、2週間培養) : 21 ~ 33
- 3) ゼラチンの液化 (グルコース・ペプトン・ゼラチン培地) : 陰性
- 4) ミルクの凝固 (スキムミルク培地) : 陰性
- 5) ミルクのペプトン化 (スキムミルク培地) : 陰性
- 6) スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天培地) : 陽性
- 7) メラニン様色素の産生 (ペプトン・イースト・鉄寒天培地) : 陰性  
(チロシン培地) : 陰性
- 8) 硫化水素の産生 (ペプトン・イースト・鉄寒天培地) : 陰性
- 9) 硝酸塩の還元 (0.1%硝酸カリ含有ブロス) : 陰性
- 10) 食塩の耐性 (イースト・麦芽寒天培地、2週間培養) : 食塩含有量4%以下で生育

## (5) 菌体成分

本菌の細胞壁から LL-ジアミノピメリン酸およびグリシンが検出された。

本発明者らはモレキュラ・クローニング第2版に記載されたコロニーハイブリダイゼーション法に従って、上記微生物から本発明のDNAの取得を試みた。まず Mer-11107株のゲノムDNAを適当な制限酵素、例えば Sau3AI で部分分解したものを、大腸菌内で複製可能なコスミドベクターを制限酵素、例えば BamHI で分解したものと連結して得た組換えDNAを大腸菌に組込み形質導入株を得た。一方、Mer-11107株から取得したDNAを鋳型とし、一般にポリケチド合成酵素のケト合成酵素領域 (ketosynthase domain) において保存されていると言われている配列情報と、ピクロマイシン生産菌のケト合成酵素領域の配列情報 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 12111-12116) とを参考に設計されたプライマーを用いてPCRを行い増幅されたDNAを取得した。得られたDNAをプローブとして先に調製した形質導入株をスクリーニングしたが、多数の陽性クローン (コスミド) が取得され、目的のDNAをもつ形質導入株を直ちに同定することはできなかった。

。

10

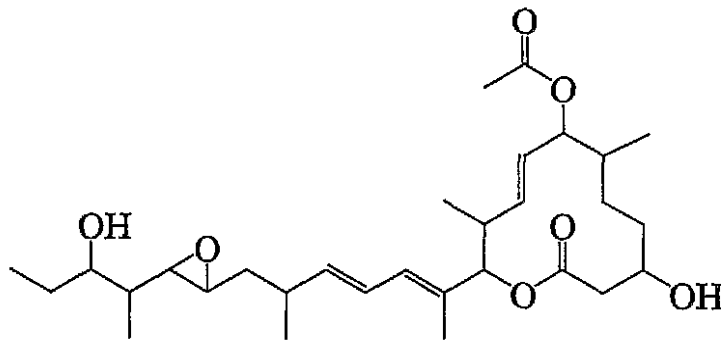
20

30

40

50

そこでポリケチド合成酵素遺伝子の近傍に修飾酵素遺伝子が存在する可能性が高いことに着目し、公知の放線菌 2 株から 2 種類の水酸化酵素（シトクロム P 4 5 0 酵素）遺伝子の断片を P C R 法にて取得し、これをプローブとして、先に得られた多数の形質導入株をスクリーニングし、プローブと結合する 1 種類の形質導入株を選択した。そして選択されたコスミド中に存在する水酸化酵素遺伝子と結合する D N A を取得し、配列を決定した。さらにこれを大腸菌に導入し、形質転換された大腸菌がプラジエノライド B の 6 位デオキシ体である、下記式で表される M E - 2 6 5 をプラジエノライド B に変換する能力をもつことを見出し、この D N A が、6 位水酸化酵素をコードする D N A であることを確認した。



ME-265

こうしてプラジエノライドの生合成に関与する D N A の一部が判明したので、この 6 位水酸化酵素をコードするシトクロム P 4 5 0 遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、先を取得した多数の陽性クローン（コスミド）からシトクロム P 4 5 0 遺伝子に隣接するプラジエノライド生合成遺伝子クラスターを含むコスミドを選択し整列化した。

次いで得られたいくつかのコスミドのうち、ポリケチド合成領域を含むと考えられるコスミドを用いて遺伝子破壊株を作成し、その破壊株がプラジエノライド生産能を失うことを確認することにより、取得した D N A の機能を確認することにした。まず、ポリケチド合成領域と考えられる領域の一部を欠失させたコスミドを作成し、汎用される手法を用いて Mer - 1 1 1 0 7 株の相同組換えを行い遺伝子破壊株を取得することを試みたが、いくつかの問題点が明らかになった。その 1 つは、Mer - 1 1 1 0 7 株が汎用されるリゾチーム処理ではプロトプラストにならないので、放線菌にプラスミドを形質転換させる方法として汎用されるプロトプラスト P E G 法が適用できないということである。

そこで本発明者らは、形質転換させる方法としてプロトプラスト P E G 法の代りに対数増殖期前期の大腸菌と適量の放線菌胞子とを混合して D N A を受渡す接合法を試みたが、Mer - 1 1 1 0 7 株は胞子を形成しにくい性質をもっていたため、さらに検討を加え、胞子菌体の放線菌の代りに対数増殖期前期まで培養した菌糸を用いることによりようやく形質転換することができた。

もう 1 つの問題点は Mer - 1 1 1 0 7 株が元々チオストレプトンにある程度の耐性をもっているため、放線菌の形質転換で汎用されるチオストレプトン耐性遺伝子をマーカーとして利用できないということである。そのため形質転換の手法を再度検討し、マーカーとしてアミノグリコシドリン酸化酵素遺伝子（アミノグリコシド耐性遺伝子）、選択培地としてリボスタマイシン含有培地をそれぞれ用いることにより、Mer - 1 1 1 0 7 株の形質転換株を効率的に選択できることを見出した。そしてこの方法を用いてポリケチド合成領域と考えられる D N A を破壊した遺伝子破壊株を作成し、その破壊株がプラジエノライド生産能を失うことを確認した。

こうして先に得られたコスミドに含まれる遺伝子がプラジエノライドの生合成に関連していることが確認されたので、次に各コスミド中の挿入 D N A 断片の塩基配列を決定した。まず、各コスミドを塩化セシウム法を用いて単離後、約 1 k b に剪断しサブクローン化

した。次いで得られたサブクローンに対し、それぞれの断片の塩基配列を決定し、プラジエノライドの合成に関連するDNAを含む約75kbの塩基配列を決定した(配列番号1参照)。

この配列番号1で示されるDNAには、p1dA I(塩基8340~27935)、p1dA II(塩基28021~49098)、p1dA III(塩基49134~60269)、p1dA IV(塩基60269~65692)、p1dB(塩基65707~66903)、p1dC(塩基68160~66970)、p1dD(塩基69568~68270)およびp1dR(塩基72725~70020)の8つのオープン・リーディング・フレーム(ORF)が含まれていた。またこれらの配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号2~9に示すとおりである。

こうして得られたMer-11107株のプラジエノライド生合成に關与するDNAのうち、p1dA I、p1dA II、p1dA IIIおよびp1dA IVには、既に明らかにされている他のポリケチド生合成遺伝子と同様にモジュールと呼ばれる1またはそれ以上の反復単位をそれぞれ含むいくつかの転写解読枠があった。そして各モジュールは後述するとおりポリケチド合成の縮合反応に關与するアシルキャリアータンパク質(ACP)、 $\alpha$ -ケトアシルACP合成酵素(KS)、アシル転移酵素(AT)と、 $\alpha$ -位カルボニル基修飾反応に關与するケトアシル還元酵素(KR)、脱水酵素(DH)およびエノイル還元酵素(ER)から選択されるドメインの全てあるいはいくつかをコードしており最後のモジュールにはポリケチド鎖をポリケチド合成酵素から切り離すチオエステラーゼ(TE)ドメインが存在していた。

図1に、Mer-11107株におけるプラジエノライドの生合成経路を示した。開始モジュール(loading module)は他のモジュールと違って活性中心のシステインがグルタミンに置換されていることより、P1dA Iは初発反応に關与していることがわかる。またモジュール10にはチオエステラーゼ(TE)ドメインがあることより、P1dA IVはポリケチドの最後の反応に關与していることがわかる。こうしてポリケチドの基本骨格が形成された後、さらに、p1dB、p1dCおよびp1dDがコードしている酵素群(P1dB、P1dCおよびP1dD)により修飾を受け、プラジエノライドが生合成されると思われる。なお、p1dRはエパーメクチン生合成における転写調節因子をコードする遺伝子aveRとの相溶性が高く、プラジエノライド生合成に關与するDNAの転写調節因子をコードしていると思われる。

こうして明らかになったプラジエノライド生合成に關与するDNAのモジュールおよび対応するドメインは以下のとおりである。

ORF p1dA I(配列番号1の塩基8340~27935)は、開始モジュール、モジュール1、モジュール2およびモジュール3をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号2に記載したアミノ酸配列で示される。

開始モジュール(塩基8340~11384)

KSs: 塩基8358~9620

ATs: 塩基9702~10781

ACPs: 塩基11148~11327

モジュール1(塩基11385~16070)

KS1: 塩基11385~12650

AT1: 塩基12747~13829

KR1: 塩基14940~15803

ACP1: 塩基15825~16007

モジュール2(塩基16071~21431)

KS2: 塩基16071~17336

AT2: 塩基17445~18536

DH2: 塩基18717~19418

KR2: 塩基20298~21167

ACP2: 塩基21189~21371

モジュール3 (塩基21432 ~ 27935)

KS3 : 塩基21432 ~ 22695

AT3 : 塩基22800 ~ 23880

DH3 : 塩基24066 ~ 24779

ER3 : 塩基25659 ~ 26588

KR3 : 塩基26610 ~ 27476

ACP3 : 塩基27498 ~ 27680

また対応するポリペプチドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

KSs : アミノ酸7 ~ 427

ATs : アミノ酸455 ~ 814

ACPs : アミノ酸937 ~ 996

KS1 : アミノ酸1016 ~ 1437

AT1 : アミノ酸1470 ~ 1830

KR1 : アミノ酸2201 ~ 2488

ACP1 : アミノ酸2496 ~ 2556

KS2 : アミノ酸2578 ~ 2999

AT2 : アミノ酸3036 ~ 3399

DH2 : アミノ酸3460 ~ 3693

KR2 : アミノ酸3987 ~ 4276

ACP2 : アミノ酸4284 ~ 4344

KS3 : アミノ酸4365 ~ 4786

AT3 : アミノ酸4821 ~ 5181

DH3 : アミノ酸5243 ~ 5480

ER3 : アミノ酸5774 ~ 6083

KR3 : アミノ酸6091 ~ 6379

ACP3 : アミノ酸6387 ~ 6447

ORF pldA II (配列番号1の塩基28021 ~ 49098) は、モジュール4、モジュール5、モジュール6およびモジュール7をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号3に記載したアミノ酸配列で示される。

モジュール4 (塩基28021 ~ 33540)

KS4 : 塩基28132 ~ 29397

AT4 : 塩基29530 ~ 30627

DH4 : 塩基30865 ~ 31566

KR4 : 塩基32413 ~ 33276

ACP4 : 塩基33298 ~ 33480

モジュール5 (塩基33541 ~ 39003)

KS5 : 塩基33541 ~ 34806

AT5 : 塩基34912 ~ 35994

DH5 : 塩基36175 ~ 36876

KR5 : 塩基37755 ~ 38625

ACP5 : 塩基38647 ~ 38829

モジュール6 (塩基39004 ~ 43686)

KS6 : 塩基39004 ~ 40269

AT6 : 塩基40372 ~ 41454

KR6 : 塩基42550 ~ 43407

ACP6 : 塩基43429 ~ 43611

モジュール7 (塩基43687 ~ 49098)

KS7 : 塩基43687 ~ 44952

AT7 : 塩基45031 ~ 46128

DH7 : 塩基46303 ~ 47022

10

20

30

40

50

K R 7 : 塩基 4 7 8 8 1 ~ 4 8 7 4 4

A C P 7 : 塩基 4 8 7 6 6 ~ 4 8 9 4 8

また対応するポリペプチドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

K S 4 : アミノ酸 3 8 ~ 4 5 9

A T 4 : アミノ酸 5 0 4 ~ 8 6 9

D H 4 : アミノ酸 9 4 9 ~ 1 1 8 2

K R 4 : アミノ酸 1 4 6 5 ~ 1 7 5 2

A C P 4 : アミノ酸 1 7 6 0 ~ 1 8 2 0

K S 5 : アミノ酸 1 8 4 1 ~ 2 2 6 2

A T 5 : アミノ酸 2 2 9 8 ~ 2 6 5 8

10

D H 5 : アミノ酸 2 7 1 9 ~ 2 9 5 2

K R 5 : アミノ酸 3 2 4 6 ~ 3 5 3 5

A C P 5 : アミノ酸 3 5 4 3 ~ 3 6 0 3

K S 6 : アミノ酸 3 6 6 2 ~ 4 0 8 3

A T 6 : アミノ酸 4 1 1 8 ~ 4 4 7 8

K R 6 : アミノ酸 4 8 4 4 ~ 5 1 2 9

A C P 6 : アミノ酸 5 1 3 7 ~ 5 1 9 7

K S 7 : アミノ酸 5 2 2 3 ~ 5 6 4 4

A T 7 : アミノ酸 5 6 7 1 ~ 6 0 3 6

D H 7 : アミノ酸 6 0 9 5 ~ 6 3 3 4

20

K R 7 : アミノ酸 6 6 2 1 ~ 6 9 0 8

A C P 7 : アミノ酸 6 9 1 6 ~ 6 9 7 6

ORF p1dA III (配列番号1の塩基49134~60269)は、モジュール8およびモジュール9をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号4に記載したアミノ酸配列で示される。

モジュール8 (塩基49134~53885)

K S 8 : 塩基 4 9 2 3 5 ~ 5 0 5 0 1

A T 8 : 塩基 5 0 5 8 0 ~ 5 1 6 5 6

K R 8 : 塩基 5 2 7 5 2 ~ 5 3 6 2 1

A C P 8 : 塩基 5 3 6 4 2 ~ 5 3 8 2 5

30

モジュール9 (塩基53886~60269)

K S 9 : 塩基 5 3 8 8 6 ~ 5 5 1 5 1

A T 9 : 塩基 5 5 2 4 5 ~ 5 6 3 4 2

D H 9 : 塩基 5 6 5 1 4 ~ 5 7 2 3 0

E R 9 : 塩基 5 8 0 2 9 ~ 5 8 9 2 5

K R 9 : 塩基 5 8 9 4 7 ~ 5 9 8 0 4

A C P 9 : 塩基 5 9 8 2 6 ~ 6 0 0 0 8

また対応するポリペプチドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

K S 8 : アミノ酸 3 5 ~ 4 5 6

A T 8 : アミノ酸 4 8 3 ~ 8 4 1

40

K R 8 : アミノ酸 1 2 0 7 ~ 1 4 9 6

A C P 8 : アミノ酸 1 5 0 4 ~ 1 5 6 4

K S 9 : アミノ酸 1 5 8 5 ~ 2 0 0 6

A T 9 : アミノ酸 2 0 3 8 ~ 2 4 0 3

D H 9 : アミノ酸 2 4 6 1 ~ 2 6 9 9

E R 9 : アミノ酸 2 9 6 6 ~ 3 2 6 4

K R 9 : アミノ酸 3 2 7 2 ~ 3 5 5 7

A C P 9 : アミノ酸 3 5 6 5 ~ 3 6 2 5

ORF p1dA IV (配列番号1の塩基60269~65692)は、モジュール10をコードし、対応するヌクレオチドは、配列番号5に記載したアミノ酸配列で示され

50

る。

モジュール10(塩基60269~65692)

KS10:塩基60431~61696

AT10:塩基61781~62869

KR10:塩基63752~64609

ACP10:塩基64631~64813

TE10:塩基64832~65692

また対応するポリペプチドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

KS10:アミノ酸55~476

AT10:アミノ酸505~867

KR10:アミノ酸1162~1447

ACP10:アミノ酸1455~1515

TE10:アミノ酸1522~1808

ORF pldB(配列番号1の塩基65707~66903)は、プラジエノライドの6位水酸化酵素をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号6に記載したアミノ酸配列で示される。ORF pldC(配列番号1の塩基68160~66970)は、プラジエノライドの7位アシル化酵素をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号7に記載したアミノ酸配列で示される。ORF pldD(配列番号1の塩基69568~68270)は、プラジエノライドの18,19位エポキシ化酵素をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号8に記載したアミノ酸配列で示される。ORF pldR(配列番号1の塩基72725~70020)は、プラジエノライドの生合成における転写調節因子をコードし、対応するポリペプチドは、配列番号9に記載したアミノ酸配列で示される。

さらに本発明のDNAには、前記DNAだけでなく、それらの改変体であって、前記DNAに対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプラジエノライドの生合成に關与するDNAも包含される。このような改変体のより具体的なものとして、配列番号1の塩基8340から塩基27935までの連続した塩基配列、配列番号1の塩基28021から塩基49098までの連続した塩基配列、配列番号1の塩基49134から塩基60269までの連続した塩基配列、配列番号1の塩基60269から塩基65692までの連続した塩基配列、配列番号1の塩基65707から塩基66903までの連続した塩基配列、配列番号1の塩基68160から塩基66970までの連続した塩基配列、配列番号1の塩基69568から塩基68270までの連続した塩基配列または配列番号1の塩基72725から塩基70020までの連続した塩基配列のいずれかの配列と少なくとも70%、好ましくは80%、さらに好ましくは90%の相同性を示すものである。

こうして、一旦塩基配列を確定することができればその情報をもとに公知の方法によって本発明のプラジエノライドの生合成に關与するDNAを取得することもできる。

例えば、配列番号1に示された塩基配列を有するDNAを適当な制限酵素で消化し、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法により消化されたDNAを分離回収し、プローブまたはプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドを調製する。プローブとして用いる場合には、得られたDNA断片をジゴキシゲニン等で標識することが好ましい。ジゴキシゲニンによる標識にはDIGラベリング&デテクションキット(ロシュダイアノスティック社)等を用いることがこのましい。

次いでプラジエノライドを生産する能力を有する微生物の菌体から、モレキュラー・クローニング第2版等に記載のゲノムクローニング法またはcDNAクローニング法を用いてライブラリーを作製する。得られたライブラリーから先に調製したプローブとハイブリダイゼーションするクローン(コロニー)を選抜し、モレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従い選抜されたクローンからプラスミドを抽出し、得られたプラスミドから目的のプラジエノライドの生合成に關与するDNAを取得することができる。

この場合において、抽出されたプラスミドにプラジエノライドの生合成に關与するDN

10

20

30

40

50

Aの部分断片しか存在しない場合には、抽出されたプラスミドを適当な制限酵素、例えば BamHI で消化することにより、これらプラスミドの制限酵素地図を常法に従い作成する。次いでその制限酵素地図からいくつかのクローンに共通して存在する制限酵素断片を見出し、オーバーラップしている部分でクローン化断片をつなぎ合わせることでプラジエノライドの生合成に関与するDNA全体を含むDNAを取得することができる。

あるいは、上記したライブラリーおよびプライマーを用いて、直接PCR反応を行い、目的のDNAを直接増幅することにより、プラジエノライドの生合成に関与するDNAを取得することもできる。

プラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシーケンサー(パーキン・エルマー社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。具体的には、2本鎖プラスミドDNAを種々の配列特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたサイクルシーケンス反応の鋳型として直接用いるか、あるいは、DNA断片を細分化し、バクテリオファージM13にランダムにそして各断片が一部重複したライブラリーまたはプラスミドベクターを用いDNA断片の末端部分から順次欠失を導入した重複ライブラリーまたはプラスミドベクターを用いDNA断片の末端部分から順次欠失を導入した重複ライブラリーを作製し、ついで個々の組み換えDNA断片をベクター配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いてDNA配列を決定することができる。

また、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、例えば8905型DNA合成装置(パーセティブ・バイオシステムズ社製)等のDNA合成装置を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。得られた塩基配列データの整理、編集および解析は既存のソフトウェア、例えばソフトウェア開発社製GenetyxTMを用いて行うことができる。

また本発明のポリペプチドは、例えばモレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法を用い、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて製造することができる。本発明のDNAまたはそれらの改変体を組み込む部位は、宿主微生物のプラスミド上または染色体上のいずれでもよい。このようなプラスミドは、前記DNAまたはそれらの改変体以外に、自律複製配列、プロモーター配列、ターミネーター配列、薬剤耐性遺伝子等を含んでいてもよい。さらに、プラスミドは、使用が予定される宿主のゲノムの一定領域と相同の配列をもつ組込み型プラスミドであってもよい。

このように本発明のDNAでコードされるポリペプチドを発現させるための宿主、プラスミド・ベクター系は、これらのDNAが安定に保持、発現される系であればどのような系でもよいが、例えば元々プラジエノライドを生産する能力を有する放線菌あるいはその類縁株を宿主とするならば、自律複製型ベクターpIJ6021(Gene 166, 133-137 (1995))や染色体組み込み型ベクターKC515〔The bacteria, vol. 9. Antibiotic-producing Streptomyces (ed: Queener, S. E. and Day, L. E.) . p. 119-158. Academic Press, Orlando, Fla.〕などが利用できる。

本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドを単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。得られた無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法により精製標品を得ることができる。

また、先に得られたポリペプチドのアミノ酸配列の情報を基に、フルオレニルメチルオキシカルボニル法(Fmoc法)、t-ブトキシカルボニル法(t-Boc法)等の化学

10

20

30

40

50

合成法により本発明のポリペプチドを製造することもできる。

また先に取得したプラジエノライド生合成遺伝子を含有する形質転換体を培地に培養し、培養物中にプラジエノライドを生成蓄積させ、該培養物からプラジエノライドを採取することによりプラジエノライドを製造することができる。培養条件は、特に制限はないが宿主の通常の培養条件に準ずる。

また、プラジエノライドの生合成に関与するDNAの塩基配列情報を基に、モジュールを修飾することにより、ポリケチド基本骨格の炭素鎖の大きさおよび縮合過程の位炭素の官能基を変化させることができる。さらにポリケチド形成後の修飾酵素を選択的に不活化することにより、予測可能なプラジエノライドの特定成分を優先的に生産させることが可能である。例えば、主としてプラジエノライドBを生産する菌株であるMer-11107株のp1dBを欠損変異することにより、プラジエノライドBの6位デオキシ体である、ME-265を主に生産する菌株にすることが可能である。p1dBを欠損変異する方法としては、モレキュラー・クロニング第2版等に記載の常法により、相同組換えによる置換、あるいは変換を行う方法をあげることができる。

10

こうして取得された特定のプラジエノライドを優先的に生産することが可能となった菌株を用い、プラジエノライドBの製造法に準じて、特定のプラジエノライドを製造することができる。

本発明により、マクロライド系化合物プラジエノライドの生合成に関与するポリペプチドをコードするDNAを単離して、その塩基配列を決定することができる。さらにそのDNAを担持するプラスミド、そのプラスミドで形質転換した形質転換体を作成し、その形質転換体を用いて、プラジエノライドを効率よく生産することができる。さらに得られたDNAの配列を修飾、変更することにより取り込まれるカルボン酸の種類、縮合後の修飾反応、骨格形成後の修飾反応、またそれらのあらゆる組み合わせを改変することにより新規または特定のプラジエノライドの生産が可能になる。

20

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、Mer-11107株におけるプラジエノライドの生合成経路を示した図である。

図2は、Mer-11107株におけるプラジエノライドの生合成に関与するDNAの各ORFとコスミドの対応関係を示した図である。

図3は、pKU253の構造を示す図である。

30

#### 【実施例】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。また下記の説明中、特に記載がない限り表示濃度は重量%である。

実施例1：Mer-11107株の培養およびゲノムDNAの取得

ストレプトマイセス・エスピー(Streptomyces sp.) Mer-11107株の菌糸を25mlのTryptic Soy Brothに接種し、28、3日間振とう培養した。この結果得られた培養液から、D.A.Hopwoodらの放線菌遺伝子実験書Practical Streptomyces Genetics(The John Innes Foundation, Norwich, England, 2000)のIsolation genomic DNA(P162~170)記載の方法に従ってゲノムDNAを調製した。

40

実施例2：Mer-11107株のゲノムライブラリーの調製

滅菌精製水160 $\mu$ lと、Mer-11107株のゲノムDNA溶液(1mg/ml)200 $\mu$ lと、10倍濃度のM緩衝液[100mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ジチオスレイトール, 500mM NaCl]40 $\mu$ lと制限酵素Sau3AI(1unit/ $\mu$ l)1 $\mu$ lとを混合し、37で3分インキュベートした。その後、50 $\mu$ lを取り出し、50 $\mu$ lのフェノール-クロロホルム混液(フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1,容量比)で抽出し、水相を回収し、さらに50 $\mu$ lのクロロホルムで抽出し、再び水相を回収した。こ

50

の液に5  $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウム (pH 6.0) と150  $\mu$ lのエタノールを加えて、  
 - 80 に30分置き、遠心することで沈殿してくるDNAを回収した。このDNAを7  
 0%エタノールで洗浄した後、90  $\mu$ lの滅菌精製水に溶解し、10  $\mu$ lの10倍濃度B  
 AP緩衝液 [500 mM Tris - HCl (pH 9.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>] お  
 よび5  $\mu$ l bacterial alkaline phosphatase (0.5  
 unit/ $\mu$ l、宝酒造社) を加えて37 で3時間インキュベートした。この反応液を  
 100  $\mu$ lのフェノール-クロロホルム混液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルア  
 ルコール = 25:24:1, 容量比) で抽出し、水相を回収し、さらに100  $\mu$ lのクロ  
 ロホルムで抽出し、再び水相を回収した。この液に10  $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウム (pH  
 6.0) と300  $\mu$ lのエタノールを加えて、- 80 に30分置き、遠心することで沈  
 殿してくるDNAを回収した。このDNAを70%エタノールで洗浄した後、20  $\mu$ lの  
 TE緩衝液 [10 mM Tris - HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] に溶解し  
 た。

10

一方でSuperCosコスミドベクター (Stratagene社) 10  $\mu$ gをSt  
 ratagene社のマニュアルに従い制限酵素XbaIで消化後、calf inte  
 stional alkaline phosphatase (宝酒造社) によりDNA  
 末端の脱リン酸化を行い、さらに制限酵素BamHIで消化、精製後、10  $\mu$ lのTE緩  
 衝液に溶解した。

このコスミドDNA溶液1  $\mu$ lに、前述のMer-11107株DNAのSau3A1  
 部分分解物の溶液2.5  $\mu$ lを加え、さらに滅菌精製水1.5  $\mu$ l、DNA Ligat  
 ion Kit (宝酒造社) のSolution IIを5  $\mu$ l、Solution I  
 を10  $\mu$ l順次加えた後、23 で10分インキュベートした。この反応液4  $\mu$ lをGi  
 gapack III XL Kit (Stratagene社) を用いてラムダファージ  
 にパッケージングした。得られたパッケージング液 (全量500  $\mu$ l) について形質導  
 入試験を実施して、コロニー形成能を検定した結果、380 cfu (colony fo  
 rming unit) /  $\mu$ lであった。

20

#### 実施例3: 各種プローブの調製

##### (1) ケト合成酵素コード領域を含むプローブの調製

一般にポリケチド合成酵素のケト合成酵素領域 (keto synthase dom  
 ain) において保存されている配列に基づいて、それぞれ、以下の配列番号10および  
 11に示す塩基配列からなる2種のプライマー、即ち、KS-3FおよびKS-4Rを合  
 成した。

30

KS-3F: 5' - G A C C G C G G C T G G G A C G T G G A G G G - 3' (配列番号  
 10)

KS-4R: 5' - G T G C C C G A T G T T G G A C T T C A A C G A - 3' (配列番  
 号11)

これらのプライマーを用いてPCRを下記の条件にて行った。

(PCR反応液組成)

滅菌精製水	31 $\mu$ l	40
2倍濃縮 GC buffer	50 $\mu$ l	
dNTP 混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2.5mM)	16 $\mu$ l	
KS-3F (100pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
KS-4R (100pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
Mer-11107 株 total DNA (100ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq polymerase (5u/ $\mu$ l, 宝酒造社)	1 $\mu$ l	50

(反応温度条件)

95 3分

(98 20秒, 63 30秒, 68 2分) 30サイクル

72 5分

この反応の結果増幅された930b DNA断片を0.8%アガロースゲル上で電気泳動し、分離した930b DNA断片を切り出し、SUPREC-01(宝酒造社)を用いてDNAを回収精製した。さらに得られたDNA断片10ngを鋳型として反応サイクル数を20サイクルとする以外は前述のPCRと同じ反応条件でケト合成酵素コード領域を含む930b DNA断片を再増幅した。このDNA断片をSUPREC-02(宝酒造社)を用いて濃縮精製して得られた50μlのTE溶液をプローブ溶液とした。

10

(2) シトクロムP450遺伝子領域を含むプローブの調製

シトクロムP450遺伝子プローブを調製するために公知の2種のシトクロムP450遺伝子を放線菌から増幅した。すなわちストレプトマイセスサーモトレランス(*Streptomyces thermotolerans*) ATCC11416由来ORF-A遺伝子(*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:582-588, 1995)を増幅するために、それぞれ、以下の配列番号12および13に示す塩基配列からなる2種のプライマー、即ち、CB-1FおよびCB-2Rを合成した。

CB-1F: 5' - ATGACAGCTTTGAATCTGATGGATCCCC - 3' (配列番号12)

CB-2R: 5' - TCAGAGACGGACCGGCAGACTCTTCAGACG - 3' (配列番号13)

20

一方でストレプトマイセス・ベネズエラエ(*Streptomyces venezuelae*) ATCC15439由来pikC遺伝子(*Chem. Biol.* 5:661-667, 1998)を増幅するために、それぞれ、以下の配列番号14および15に示す塩基配列からなる2種のプライマー、即ち、PKC-1FおよびPKC-2Rを合成した。

PKC-1F: 5' - GTGCGCCGTACCCAGCAGGGAACGACC - 3' (配列番号14)

PKC-2R: 5' - TCACGCGCTCTCCGCCCGCCCCCTGCC - 3' (配列番号15)

30

これらのプライマーを用いてPCRを下記の条件にて行った。

(PCR反応液組成)

滅菌精製水 31μl

2倍濃縮GC buffer 50μl

dNTP混合溶液(dATP, dGTP, dTTP, dCTP各2.5mM) 16μl

primer-F(100pmol/μl) 0.5μl

primer-R(100pmol/μl) 0.5μl

40

ATCC11416株またはATCC15439株のゲノムDNA(100ng/μl) 1μl

LA Taq polymerase(5u/μl, 宝酒造社) 1μl

(反応温度条件)

95 3分

(98 20秒, 63 30秒, 68 2分) 30サイクル

72 5分

この反応の結果増幅された2種の1.2kb DNA断片をQIAGEN PCR Purification Kit(QIAGEN社)で精製した後、各DNA断片10ng

50

g /  $\mu$ l ずつを含む等量混合溶液を調製してプローブ溶液とした。

実施例 4 : ケト合成酵素コード領域を含むプローブを用いたスクリーニング

実施例 2 で調製した Mer - 11107 株のゲノム DNA ライブラリーのパッケージング液を使って大腸菌 XL - 1 Blue MR (Stratagene 社) を宿主とし、Stratagene 社のマニュアルに従って形質導入した。形質導入操作後の菌液を 10 枚の LB - 50  $\mu$ g / ml アンピシリン - 1.5% 寒天培地シャーレ (内径 90 mm、高さ 15 mm) に分注して広げ、37 で 18 時間培養した。各シャーレに生育したコロニーを Hybond N+ フィルター (Amersham Biosciences 社) に転写し、Hybond N+ フィルターに添付のマニュアルに記載された条件でアルカリ処理、中和処理を行い、80 で 2 時間乾燥することでフィルター上にコロニー由来の DNA を固定化した。

10

実施例 3 (1) にて調製したケト合成酵素領域を含む 930 b DNA 断片 100 ng をプローブにして Alk Phos Direct System (Amersham Biosciences 社) を用いてゲノム DNA ライブラリーをコロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは塩濃度 0.5 M NaCl で 65 で 2 時間行った。プローブ DNA の標識、ハイブリダイゼーションおよび検出の条件については Alk Phos Direct System に添付されたマニュアルに記載された条件に従った。試験した約 7,600 コロニーのうち、アルカリホスファターゼで標識したプローブと強くハイブリダイズした 59 コロニーを分離した。このコロニーから派生した大腸菌クローンからコスミドを抽出精製した。

20

実施例 5 : シトクロム P450 遺伝子領域を含むプローブを用いたブラジエノライド生合成遺伝子領域を有するコスミドクローンの選択確認

実施例 4 で得られた各コスミドの DNA 溶液 2  $\mu$ l を Hybond N+ フィルター上にスポットし、添付のマニュアルに記載された条件でアルカリ処理、中和処理を行い、さらに 80 で 2 時間乾燥することでフィルター上に DNA を固定化した。このフィルターを用いて、実施例 3 にて記述したシトクロム P450 遺伝子断片をプローブとして実施例 4 と同じ条件でハイブリダイゼーションを行った。この結果プローブと強くハイブリダイズしたコスミド 1 つを選択し、pKS58 と命名した。

pKS58 DNA を制限酵素 Sau3AI で部分分解した後、ファージベクター Zap Express、BamHI - CIA P 処理済 (Stratagene 社) にライゲーションし、Gigapack III XL Kit (Stratagene 社) を用いてラムダファージにパッケージングした。このファージ液を大腸菌 XL1 - Blue MRF' に感染させて、プラークを形成させた。実施例 3 (2) で調製したシトクロム P450 遺伝子プローブを用いてプラークハイブリダイゼーションを行うことで、約 2 kb のシトクロム P450 遺伝子を含む DNA 断片をサブクロニングした。

30

このシトクロム P450 遺伝子 DNA 断片の配列を決定し、シトクロム P450 コード領域とされる N - 末端および C - 末端から、それぞれ、以下の配列番号 16 および 17 に示す塩基配列からなる 2 種のプライマー、即ち、PDL58 - 1F および PDL58 - 2R を合成した。

PDL58 - 1F : 5' - GCCCCGCA TATGGATCTGGAAACCC AAC TTCTC - 3' (配列番号 16)

40

PDL58 - 2R : 5' - GCACTAGTCAGCCGCGCTCGACGAGGAG GTG - 3' (配列番号 17)

これらのプライマーを用いて PCR を下記の条件にて行った。

(PCR 反応液組成)

滅菌精製水	31 $\mu$ l
2 倍濃縮 GC buffer	50 $\mu$ l
dNTP 混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2.5mM)	16 $\mu$ l
PDL58-1F (100pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
PDL58-2R (100pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
pKS58DNA (10ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
LA Taq polymerase (5u/ $\mu$ l, 宝酒造社)	1 $\mu$ l

10

(反応温度条件)

9 5 3 分  
 ( 9 8 2 0 秒 , 6 3 3 0 秒 , 6 8 2 分 ) 2 0 サイクル  
 7 2 5 分

この反応の結果増幅された 1.2 kb DNA 断片を QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN 社) で精製した後、制限酵素 Nde I と Spe I で分解した。反応後 DNA を 0.8% アガロースゲル上で電気泳動し、分離した 1.2 kb DNA 断片を切り出し、QIAGEN Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を回収精製した。この DNA 断片をシトクロム P450 遺伝子発現用プラスミド pT7NS-camAB (特願 2002-110311 号) の Nde I および Spe I 部位へ挿入することで pPDL96 を構築した。

20

このプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、M9CG 培地 (1.28%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05%  $\text{NaCl}$ 、0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、1% カザミノ酸、0.4% グルコース、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、100  $\mu$  M  $\text{CaCl}_2$ 、50  $\mu$  g/ml アンピシリン) にて菌密度として  $\text{OD}_{600}$  (optical density at 600 nm) が 0.8 に達するまで培養した。5-アミノレブリン酸および IPTG をそれぞれ 80  $\mu$  g/ml、0.1 mM になるよう添加した後、22 で 25 時間培養を継続し、シトクロム P450 タンパク質を誘導させた。誘導後、菌体を集めて CV 緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3)、1 mM EDTA、10% グリセロール、1 mM グルコース] 5 ml に懸濁した。この液 1 ml を試験管に取り、プラジエノライド B の 6 位デオキシ体である ME-265 の DMSO 溶液 (50 mg/ml) を 5  $\mu$  l 添加して 28 で 15 時間インキュベートした。この反応液に 1 ml のアセトニトリルを加えて混合した後、遠心分離して上清を下記の条件にて HPLC で分析することでプラジエノライド B への変換を認めた。このことから pKS58 にプラジエノライド生合成遺伝子領域が含まれていることを確認した。

30

(HPLC の分析条件)

分析装置 : Shimadzu HPLC 10Avp  
 カラム : Develosil ODS UG-3 (4.6 mm x 50 mm 3  $\mu$  m)  
 移動相 (容量%) : 45% ~ 55% メタノール (0 ~ 5 分)  
                   55%                   メタノール (5 ~ 13 分)  
                   55% ~ 70%       メタノール (13 ~ 21 分)  
                   45%                   メタノール (21 ~ 25 分)

40

流速 : 1.2 ml / 分

検出 : UV 240 nm

インジェクション容量 : 5  $\mu$  l

カラム温度 : 40

分析時間 : 25 分

保持時間 : ME-265 ; 20 分、プラジエノライド B ; 13 分、

50

実施例 6 : シトクロム P 4 5 0 遺伝子に隣接する生合成遺伝子クラスターを含むコスミドの選定

実施例 4 で得られた、5 9 個のコスミド DNA の中で、実施例 5 で得られたシトクロム P 4 5 0 遺伝子に隣接する生合成遺伝子クラスターを含むコスミドを選定した。

5 9 個のコスミド DNA を制限酵素 *EcoRI*, *BamHI* で消化し、得られた各々の DNA をアガロースゲル電気泳動し、エパーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 9509 - 9514、特開平 2000 - 245457 号公報または WO 00/50605 パンフレット参照) の *KSD* ドメインの DNA (*aveA2* の *KSD* ドメイン)、*AT* ドメインの DNA (*aveA1* の *AT2* ドメイン)、および実施例 5 で得られたシトクロム P 4 5 0 遺伝子をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。

10

制限酵素 *EcoRI*, *BamHI* で消化した DNA の電気泳動パターンと、各プローブでのハイブリダイズしたバンドパターンの結果から、まず、同じ長さでハイブリダイズした DNA 断片を持つコスミドをグループ化した。そのうち、ほぼ同等のパターンを示したコスミドについては 1 つを残して削除し、残ったものでバンドパターンが部分一致するものについて整列化した。そして、実施例 5 で得られたシトクロム P 4 5 0 遺伝子を含むコスミド *pKS58* を中心とし、シトクロム P 4 5 0 遺伝子側からポリケチド合成酵素遺伝子を含む側に隣接するコスミドとして *pKS56*, *pKS54* を選出し、さらに *pKS54* に隣接するコスミドとして *pKS35* を選出した。また、コスミド *pKS58* とシトクロム P 4 5 0 遺伝子側からポリケチド合成酵素遺伝子を含まない側に隣接するコスミドとして *pKS23* を選出した。その結果、図 2 に示すようにプラジエノライド生合成遺伝子クラスターを包括するコスミドクローンとして *pKS23*, *pKS58*, *pKS56*, *pKS54*, *pKS35* が選定された。

20

実施例 7 : プラジエノライド生合成遺伝子クラスター破壊株の作製

実施例 6 で選定されたコスミドのうち、ポリケチド合成領域を含むと考えられる *pKS56* の DNA を用いた生合成遺伝子破壊株の作製を行った。

*pKS56* のコスミド DNA を制限酵素 *BamHI* で消化し、2 kb のスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*aminoglycoside 3" - adenyltransferase*; 以下 *aadA* と略記するときがある) *BamHI* 消化断片と *NEB quick ligation kit* (*New England Biolabs* 社) を用いて連結した。こうして、*BamHI* により *pKS56* のコスミド DNA 内の 30 kb (図 2 の A 部位: 配列番号 1 のヌクレオチド番号 31194 - 61374) が欠失し、2 kb のスペクチノマイシン耐性遺伝子と組み換わったコスミド *p56aadA* を得た。なお、*aadA* は、プラスミド *pHP45omega* (*Gene* 190, 315 - 317 (1997)) を制限酵素 *BamHI* で消化して作成したものである。

30

得られたコスミド *p56aadA* を *Mer-11107* 株に組み込むために、シャトルベクター *pKU253* を用いた。*p56aadA* を制限酵素 *EcoRI* で消化し、アガロースゲル電気泳動により、各々コスミドベクター部分を含まない 14 kb を分離して、ジーンクリーン II キット (*バイオ 101* 社) を用いて精製した。得られた 14 kb の *EcoRI* 断片を、シャトルベクター *pKU253* を *EcoRI* で消化したものと *NEB quick ligation kit* を用いて連結し、*pKU253-56aadA* を得た。なお、*pKU253* は、図 3 に示すとおり、放線菌 *Streptomyces coelicolor A3(2)* 由来のプラスミド *SCP2* (*J. Gen. Microbiol.*, 126, 427 - 442, 1981) をベースに大腸菌のプラスミド *pUC19* (*Gene*, 33 (1), 103 - 119, 1985) を繋ぎ、アミノグリコシド耐性遺伝子 *aphII* (*Gene*, 19 (3), 327 - 336, 1982) と接合遺伝子の *oriT* (*J. Bacteriol.*, 169, 5320 - 5323, 1987) を入れて作成したものである。

40

得られた *pKU253-56aadA* を、接合大腸菌 *S17-1* (*ATCC 47055*) へエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、*S17-1/pKU253-56a*

50

a d A株を得た。得られたS 17 - 1 / p K U 2 5 3 - 5 6 a a d A株を、25 µg / mlのカナマイシンおよび200 µg / mlのスペクチノマイシンを含むLB培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)10mlに植菌し、30で2時間振盪培養後、集菌し、LB培地10mlで2回洗浄後、LB培地5mlに懸濁した。これを供与菌懸濁液とした。

供与菌懸濁液を調製するのと同進行で、Mer - 11107株をTSB培地(Trypto - Soya broth:日水製薬社)10mlに植菌し、30で5時間振盪培養後、集菌し、滅菌水10mlで2回洗浄後、滅菌水1mlに懸濁した。これを受容菌懸濁液とした。

得られたS 17 - 1 / p K U 2 5 3 - 5 6 a a d A株供与菌懸濁液500 µlを、Mer - 11107株受容菌懸濁液10 µlと混ぜ、Actino Medium No. 4寒天培地(日本製薬社)に塗布した。30で18時間培養後、2 mg / mlのリボスタマイシンを含む2.5 mlのSNA(0.8%栄養培地: Difco社、0.4%寒天)を重層した。30で7日間培養し、リボスタマイシンに耐性なp K U 2 5 3 - 5 6 a a d A形質転換株を得た。

得られたp K U 2 5 3 - 5 6 a a d A形質転換株を、リボスタマイシンを含まないTSB培地10mlに植菌し、30で24時間振盪培養した。なお、プラスミドベクターp K U 2 5 3はMer - 11107株中での複製効率が悪く、薬剤耐性マーカー(リボスタマイシン)を含まない培地で培養すると、Mer - 11107株はp K U 2 5 3を保持できない。

p K U 2 5 3 - 5 6 a a d A形質転換株培養液を集菌し、滅菌水10mlで2回洗浄後、滅菌水10mlに懸濁した。適当に希釈した懸濁液を、200 µg / mlのスペクチノマイシンを含むYMS寒天培地(0.4%酵母エキス、1%麦芽エキス、0.4%溶性デンプン、2%寒天、10 mM塩化カルシウム)に塗布し、30で4日間培養した。スペクチノマイシンを含むYMS寒天培地で生育したシングルコロニーを200 µg / mlのスペクチノマイシンを含むYMS寒天培地および200 µg / mlのリボスタマイシンを含むYMS寒天培地に植えかえ、30で2日間培養した。

培養後、スペクチノマイシン耐性で、リボスタマイシン感受性の株を選択し、ゲノムDNA上の目的とする生合成遺伝子とみられる領域にスペクチノマイシン耐性遺伝子が挿入されたことをサザンハイブリダイゼーション法で確認した。得られた菌株をMer - 11107 - 56 :: a a d A株とした。

実施例8: プラジエノライド生合成遺伝子クラスター破壊株のプラジエノライド生産性試験

実施例7で得られたMer - 11107 - 56 :: a a d A株とコントロールとして親株のMer - 11107株とその形質転換株のMer - 11107 / p K U 2 5 3株の計3株について、プラジエノライドBの生産性を試験した。

実施例7で得られたMer - 11107 - 56 :: a a d A株と、Mer - 11107株およびMer - 11107 / p K U 2 5 3株の各々の凍結種母200 µlを、種母培地(溶性でんぷん2%、エスサンミート2%、酵母エキス0.5%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.25%、CaCO<sub>3</sub> 0.3% pH無調整)20mlに植菌し、25で2日間培養した。

得られた種母培養液の300 µlを、本培養培地(スタビロース5%、グルコース1%、ファルマメディア3%、シクロデキストリン2%、CaCO<sub>3</sub> 0.1% pH7.5)30mlに植菌し、25で4日間および5日間培養した。

培養終了後、得られた培養液に対して9倍量のアセトニトリルを加えて抽出した。得られた抽出液についてHPLCにてプラジエノライドB量を測定した。測定結果を表1に示す。

また、HPLCの測定条件を以下に示す。

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: Develosil ODS UG - 3 (4.6 mm x 50 mm 3 µm)

10

20

30

40

50

移動相 (容量%) : 45% ~ 55%   メタノール (0 ~ 5分)  
                   55%                   メタノール (5 ~ 13分)  
                   55% ~ 70%   メタノール (13 ~ 21分)  
                   45%                   メタノール (21 ~ 25分)

流速 : 1.2 ml / 分

検出 : UV 240 nm

インジェクション容量 : 5 µl

カラム温度 : 40

分析時間 : 25分

保持時間 : プラジエノライド B   13分

【表1】

表1

	プラジエノライド B (mg/L)		
	Mer-11107株	Mer-11107/pKU253株	Mer-11107-56::aadA株
4日培養 (96hr)	1117.5	992.0	0.0
5日培養 (120hr)	1673.4	1481.5	0.0

この結果、図2におけるA部位を欠損したMer-11107-56::aadA株はプラジエノライドBを全く作らない株であることが確認された。このことより、A部位中の遺伝子がプラジエノライドの生合成に関連していることが示された。

実施例9 : プラジエノライド生合成遺伝子クラスターの塩基配列の決定

プラジエノライド生合成遺伝子をコードする一群のDNAの塩基配列を決定した。実施例8より図2のA部位の欠損株はプラジエノライドBを生産できないことから、A部位中の遺伝子がプラジエノライドの生合成に関連している。よって実施例6で選出したpKS35、pKS54、pKS58およびpKS23の4つのコスミドについて、これらコスミド中の挿入DNA断片の塩基配列を決定した。

各コスミドを、塩化セシウム法を用いて単離後、HydroShear (Genomic solutions社)を用いて約1kbに剪断し、BKL Kit (宝酒造社)を用いて、サブクローン化した。

得られたサブクローンに対し、蛍光標識プライマーを用いたサイクルシーケンス反応 (amersham biosciences社)を行い、それぞれの断片の塩基配列を決定 (MegaBACE 1000 : amersham biosciences社)することにより、プラジエノライドの合成に関連するDNAを含む約75kbの塩基配列を決定した (配列番号1参照)。

このDNA中のオープン・リーディング・フレーム (ORF) を検索したところ、以下の8つのORFが含まれていた。

p1dA I : 塩基8340 ~ 27935  
 p1dA II : 塩基28021 ~ 49098  
 p1dA III : 塩基49134 ~ 60269  
 p1dA IV : 塩基60269 ~ 65692  
 p1dB : 塩基65707 ~ 66903  
 p1dC : 塩基68160 ~ 66970  
 p1dD : 塩基69568 ~ 68270  
 p1dR : 塩基72725 ~ 70020

各ORFとコスミドの対応関係を図2に示す。

実施例10 : プラジエノライドの6位水酸化酵素遺伝子 (p1dB) 破壊株の作製

実施例9で決定されたプラジエノライドの生合成に関連するDNAを含む約75kbの塩基配列 (配列番号1参照) より、図1に示された生合成経路でプラジエノライドが生合

10

20

30

40

50

成されることが明らかとなった。そこで、そのうちのシトクロム P 4 5 0 遺伝子 p l d B のみを破壊することで、プラジエノライド B の 6 位デオキシ体である M E - 2 6 5 のみを生産する株を取得可能と考え、以下の方法で p l d B 破壊株を作製した。

配列番号 1 記載の塩基配列に基づいて、それぞれ、以下の配列番号 1 8、1 9、2 0 および 2 1 に示す塩基配列からなる 4 種のプライマー、即ち、p l d B - L - B g l 2 F、p l d B - L - H i n d 3 R、p l d B - R - H i n d 3 F および p l d B - R - B g l 2 R を合成した。

p l d B - L - B g l 2 F : 5 ' - G G G A G A T C T A G A G G C C G G T T A C C T C T A C G A G T A - 3 ' ( 配列番号 1 8 )

p l d B - L - H i n d 3 R : 5 ' - G G G A A G C T T G C G A T G A G C T G T G C C A G A T A G - 3 ' ( 配列番号 1 9 )

p l d B - R - H i n d 3 F : 5 ' - G G G A A G C T T G A A C T G G C G C G A C A G T G T C T T - 3 ' ( 配列番号 2 0 )

p l d B - R - B g l 2 R : 5 ' - G G G A G A T C T G C A G C G G A T C G T C T T C G A G A C C C T T - 3 ' ( 配列番号 2 1 )

これらのプライマーを用いて P C R を下記の条件にて行った。

( P C R 反応液組成 )

滅菌精製水	30 $\mu$ l	
2 倍濃縮 GC buffer	50 $\mu$ l	20
dNTP 混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2.5mM)	16 $\mu$ l	
p l d B - L - B g l 2 F または p l d B - R - H i n d 3 F (50pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
p l d B - L - H i n d 3 R または p l d B - R - B g l 2 R (50pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
Mer-11107 株 total DNA (100ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq polymerase (5u/ $\mu$ l, 宝酒造社)	1 $\mu$ l	

( 反応温度条件 )

9 5 3 分  
( 9 8 2 0 秒 , 6 3 3 0 秒 , 6 8 2 分 ) 3 0 サイクル  
7 2 5 分

この反応の結果、p l d B - L - B g l 2 F と p l d B - L - H i n d 3 R を用いた反応から、配列番号 1 の塩基 6 4 7 5 6 から塩基 6 6 3 0 2 を含む 1 . 5 7 k b の DNA 断片 ( DNA 断片 L 1 ) が増幅され、p l d B - R - H i n d 3 F と p l d B - R - B g l 2 R を用いた反応から、配列番号 1 の塩基 6 6 8 4 9 から塩基 6 8 3 6 8 を含む 1 . 5 4 k b の DNA 断片 ( DNA 断片 R 1 ) が増幅された。DNA 断片 L 1 及び R 1 を Q I A G E N P C R p u r i f i c a t i o n K i t ( Q I A G E N 社 ) で精製した後、制限酵素 B g l I I I と H i n d I I I で消化した。

制限酵素 B g l I I I と H i n d I I I で消化した DNA 断片 L 1 及び R 1 と、制限酵素 H i n d I I I で消化した 2 . 3 k b のハイグロマイシシ B 耐性遺伝子 ( p H P 4 5 o m e g a h y g : G e n e 1 9 0 , 3 1 5 - 3 1 7 , 1 9 9 7 由来。以下 h y g と略記することがある )、及び制限酵素 B a m H I で消化したシャトルベクター p K U 2 5 3 ( 図 3 参照 )、の計 4 者を DNA l i g a t i o n k i t v e r . 2 . 1 ( 宝酒造社 ) で連結した。こうして DNA 断片 L 1 と R 1 の間にハイグロマイシシ B 耐性遺伝子が挿入された形の約 5 . 4 k b の DNA 断片が、p K U 2 5 3 に挿入された約 2 1 . 4 k b のプラスミド p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 が構築された。

得られた p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 を、接合大腸菌 S 1 7 - 1 ヘレクトロポレーション法を用いて形質転換し、S 1 7 - 1 / p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 株を

10

20

30

40

50

得た。得られた S 1 7 - 1 / p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 株を、2 5 μ g / m l のカナマイシンおよび 1 0 0 μ g / m l のハイグロマイシン B を含む L B 培地 ( 1 % バクトトリプトン、0 . 5 % 酵母エキス、0 . 5 % N a C l ) 1 0 m l に植菌し、3 0 °C で 2 時間振盪培養後、集菌し、L B 培地 1 0 m l で 2 回洗浄後、L B 培地 5 m l に懸濁した。これを供与菌懸濁液とした。

供与菌懸濁液を調製すると同時進行で、Mer - 1 1 1 0 7 株を T S B 培地 ( T r y p t o - S o y a b r o t h : 日水製薬社 ) 1 0 m l に植菌し、3 0 °C で 5 時間振盪培養後、集菌し、滅菌水 1 0 m l で 2 回洗浄後、滅菌水 1 m l に懸濁した。これを受容菌懸濁液とした。

得られた S 1 7 - 1 / p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 株供与菌懸濁液 5 0 0 μ l を、Mer - 1 1 1 0 7 株受容菌懸濁液 1 0 μ l と混ぜ、Actino Medium No . 4 寒天培地 ( 日本製薬社 ) に塗布した。3 0 °C で 1 8 時間培養後、2 m g / m l のリボスタマイシンを含む 2 . 5 m l の S N A ( 0 . 8 % 栄養培地 : D i f c o 社、0 . 4 % 寒天 ) を重層した。3 0 °C で 7 日間培養し、リボスタマイシンに耐性な p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 形質転換株を得た。

得られた p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 形質転換株を、リボスタマイシンを含まない T S B 培地 1 0 m l に植菌し、3 0 °C で 2 4 時間振盪培養した。p K U 2 5 3 - L 1 - h y g - R 1 形質転換株培養液を集菌し、滅菌水 1 0 m l で 2 回洗浄後、滅菌水 1 0 m l に懸濁した。適当に希釈した懸濁液を、2 0 0 μ g / m l のハイグロマイシン B を含む Y M S 寒天培地 ( 0 . 4 % 酵母エキス、1 % 麦芽エキス、0 . 4 % 溶性デンプン、2 % 寒天、1 0 m M 塩化カルシウム ) に塗布し、3 0 °C で 4 日間培養した。ハイグロマイシン B を含む Y M S 寒天培地で生育したシングルコロニーを 2 0 0 μ g / m l のハイグロマイシン B を含む Y M S 寒天培地および 2 0 0 μ g / m l のリボスタマイシンを含む Y M S 寒天培地に植えかえ、3 0 °C で 2 日間培養した。

培養後、ハイグロマイシン B 耐性で、リボスタマイシン感受性の株を選択した。得られた菌株は、ゲノム中の p l d B 遺伝子内の 5 4 6 b p ( 配列番号 1 の塩基 6 6 3 0 3 から塩基 6 6 8 4 8 ) を欠失し、その間にハイグロマイシン B 耐性遺伝子が挿入された p l d B 破壊株であり、Mer - 1 1 1 0 7 p l d B : : h y g 株とした。

実施例 1 1 : プラジエノライドの 6 位水酸化酵素遺伝子 ( p l d B ) 破壊株のプラジエノライド生産性試験

実施例 1 0 で得られた Mer - 1 1 1 0 7 p l d B : : h y g 株の凍結種母 2 0 0 μ l を、種母培地 ( 溶性でんぷん 2 %、エスサンミート 2 %、酵母エキス 0 . 5 %、K 2 H P O 4 0 . 1 %、M g S O 4 · 7 H 2 O 0 . 2 5 %、C a C O 3 0 . 3 % p H 無調整 ) 2 0 m l に植菌し、2 5 °C で 2 日間培養した。

得られた種母培養液の 3 0 0 μ l を、本培養培地 ( スタピロース 5 %、グルコース 1 %、ファルマメディア 3 %、β - シクロデキストリン 2 %、C a C O 3 0 . 1 % p H 7 . 5 ) 3 0 m l に植菌し、2 5 °C で 4 日間および 5 日間培養した。

培養終了後、得られた培養液 2 0 m l に同量のアセトニトリルを加えて抽出した。その抽出液の一部を分取しアセトニトリルで 5 倍量に希釈し、下記の条件にて H P L C でプラジエノライド B 及び M E - 2 6 5 の量を測定した。測定結果を表 2 に示す。

( H P L C 分析条件 )

- 分析装置 : S h i m a d z u H P L C 1 0 A v p
- カラム : D e v e l o s i l O D S U G - 3 ( 4 . 6 m m × 5 0 m m 3 μ m )
- 移動相 ( 容量 % ) : 4 5 % ~ 5 5 % メタノール ( 0 ~ 5 分 )
- 5 5 %                   メタノール ( 5 ~ 1 3 分 )
- 5 5 % ~ 7 0 % メタノール ( 1 3 ~ 1 7 分 )
- 7 0 %                   メタノール ( 1 7 ~ 3 5 分 )
- 4 5 %                   メタノール ( 3 5 ~ 4 0 分 )

流速 : 1 . 2 m l / 分

検出 : U V 2 4 0 n m

10

20

30

40

50

インジェクション容量：10 μl

カラム温度：40

分析時間：35分

保持時間：ME-265；22分、プラジエノライドB；16分

【表2】

表2

Mer-11107 pldB::hyg株	ME-265 (mg/L)	プラジエノライドB (mg/L)
4日培養 (96hr)	1247.7	0.0
5日培養 (120hr)	1316.6	0.0

10

実施例12：ME-265の単離精製と構造確認

実施例11で得られたアセトニトリル抽出液をろ過し、菌体を水10ml、40mlで洗浄した。ろ液と洗浄液を一緒にして酢酸エチル100mlで抽出した。さらに水層に飽和食塩水50mlを加え、酢酸エチル50mlで再度抽出した。酢酸エチル層を合わせ飽和食塩水50mlで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を留去した後、TLC（薄層クロマトグラフ、Merck社製Art. 5744 展開溶媒 トルエン：アセトン = 2：1）により精製しME-265を20.3mg得た。

<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)： ppm (積分, 多重度, 結合定数 J (Hz))： 0.87 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.90 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.94 (3H, d, J = 7.3 Hz), 0.97 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.08 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.17 - 1.21 (1H, m), 1.24 - 1.36 (2H, m), 1.42 - 1.52 (3H, m), 1.61 - 1.66 (3H, m), 1.74 (3H, d, J = 1.1 Hz), 1.89 - 1.96 (1H, m), 2.00 (3H, s), 2.41 - 2.47 (1H, m), 2.43 (1H, dd, J = 5.5, 13.9 Hz), 2.51 - 2.58 (1H, m), 2.56 (1H, dd, J = 3.7, 13.9 Hz), 2.65 (1H, dd, J = 2.2, 8.1 Hz), 2.72 (1H, dt, J = 2.2, 5.9 Hz), 3.51 (1H, dt, J = 4.4, 8.4 Hz), 3.75 - 3.80 (1H, m), 4.91 (1H, dd, J = 8.8, 10.6 Hz), 5.00 (1H, d, J = 10.6 Hz), 5.42 (1H, dd, J = 9.2 Hz, 15.0 Hz), 5.49 (1H, dd, J = 9.2, 15.0 Hz), 5.65 (1H, dd, J = 8.4, 15.0 Hz), 6.08 (1H, d, J = 10.6 Hz), 6.32 (1H, dd, J = 10.6, 15.0 Hz)

20

30

この結果、pldB破壊株であるMer-11107 pldB::hyg株はプラジエノライドBを生産せずに、ME-265を生産していることが確認された。すなわち、上記方法により、ME-265を製造、取得することができた。

実施例13：プラジエノライドの7位アシル化酵素遺伝子 (pldC) 破壊株の作製

実施例9で決定されたプラジエノライドの生合成に関連するDNAを含む約75kbの塩基配列 (配列番号1参照) より、図1に示された生合成経路でプラジエノライドが生合成されることが明らかとなった。そこで、そのうちの7位アシル化酵素遺伝子pldCのみを破壊することで、プラジエノライドの7位脱アシル体 (プラジエノライドB<sub>12</sub>)を生産する株を取得可能と考え、以下の方法でpldC破壊株を作製した。

40

配列番号1記載の塩基配列に基づいて、それぞれ、以下の配列番号18、22、23および24に示す塩基配列からなる4種のプライマー、即ち、pldB-L-Bgl2F、pldC-L-Hind3R、pldC-R-Hind3FおよびpldC-R-Bgl2Rを合成した。

pldB-L-Bgl2F：5' - GGGAGATCTAGAGGCCGGTTACCTCTACGAGTA - 3' (配列番号18)

pldC-L-Hind3R：5' - GGG AAGCTTCCAGTCTCGTGCTC

50

A C C A A - 3 ' ( 配列番号 2 2 )

p l d C - R - H i n d 3 F : 5 ' - G G G A A G C T T A G G C C C G T T G G A G A

A G C T G T T - 3 ' ( 配列番号 2 3 )

p l d C - R - B g l 2 R : 5 ' - G G G A G A T C T G C A G C C T C A T C C T C A

C C G A G C T G A A - 3 ' ( 配列番号 2 4 )

これらのプライマーを用いてPCRを下記の条件にて行った。

( PCR 反応液組成 )

滅菌精製水	30 $\mu$ l	
2 倍濃縮 GC buffer	50 $\mu$ l	10
dNTP 混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2.5mM)	16 $\mu$ l	
pldb-L-Bgl2F または pldC-R-Hind3F (50pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
pldC-L-Hind3R または pldC-R-Bgl2R (50pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
Mer-11107 株 total DNA (100ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq polymerase (5u/ $\mu$ l, 宝酒造社)	1 $\mu$ l	

( 反応温度条件 )

9 5 3 分

( 9 8 2 0 秒 , 6 3 4 分 ) 3 0 サイクル

6 8 5 分

この反応の結果、p l d B - L - B g l 2 F と p l d C - L - H i n d 3 R を用いた反応から、配列番号 1 の塩基 6 4 7 5 6 から塩基 6 7 2 2 0 を含む約 2 . 5 k b の DNA 断片 ( DNA 断片 L 2 ) が増幅され、p l d C - R - H i n d 3 F と p l d C - R - B g l 2 R を用いた反応から、配列番号 1 の塩基 6 8 1 0 6 から塩基 7 1 1 1 2 を含む約 3 . 0 k b の DNA 断片 ( DNA 断片 R 2 ) が増幅された。DNA 断片 L 2 及び R 2 を Q I A G E N PCR purification Kit ( Q I A G E N 社 ) で精製した後、制限酵素 B g l I I I と H i n d I I I で消化した。

制限酵素 B g l I I I と H i n d I I I で消化した DNA 断片 L 2 及び R 2 と、制限酵素 H i n d I I I で消化した 2 . 3 k b のハイグロマイシン B 耐性遺伝子 ( p H P 4 5 o m e g a h y g : G e n e 1 9 0 , 3 1 5 - 3 1 7 , 1 9 9 7 由来。以下 h y g と略記することがある )、及び制限酵素 B a m H I で消化したシャトルベクター p K U 2 5 3 ( 図 3 参照 )、の計 4 者を DNA l i g a t i o n k i t v e r . 2 . 1 ( 宝酒造社 ) で連結した。こうして DNA 断片 L 2 と R 2 の間にハイグロマイシン B 耐性遺伝子が挿入された形の約 7 . 8 k b の DNA 断片が、p K U 2 5 3 に挿入された約 2 3 . 8 k b のプラスミド p K U 2 5 3 - L 2 - h y g - R 2 が構築された。

得られた p K U 2 5 3 - L 2 - h y g - R 2 を、接合大腸菌 S 1 7 - 1 ヘエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、S 1 7 - 1 / p K U 2 5 3 - L 2 - h y g - R 2 株を得た。得られた S 1 7 - 1 / p K U 2 5 3 - L 2 - h y g - R 2 株を、2 5  $\mu$  g / m l のカナマイシンおよび 1 0 0  $\mu$  g / m l のハイグロマイシン B を含む LB 培地 ( 1 % バクトトリプトン、0 . 5 % 酵母エキス、0 . 5 % N a C l ) 1 0 m l に植菌し、3 0 で 2 時間振盪培養後、集菌し、LB 培地 1 0 m l で 2 回洗浄後、LB 培地 5 m l に懸濁した。これを供与菌懸濁液とした。

供与菌懸濁液を調製するのと同進行で、Mer - 1 1 1 0 7 株を T S B 培地 ( T r y p t o - S o y a b r o t h : 日水製薬社 ) 1 0 m l に植菌し、3 6 で 5 時間振盪培養後、集菌し、滅菌水 1 0 m l で 2 回洗浄後、滅菌水 1 m l に懸濁した。これを受容菌懸濁液とした。

得られた S 1 7 - 1 / p K U 2 5 3 - L 2 - h y g - R 2 株供与菌懸濁液 5 0 0  $\mu$  l を

20

30

40

50

、Mer - 11107株受容菌懸濁液10μlと混ぜ、Actino Medium No. 4寒天培地(日本製薬社)に塗布した。30℃で18時間培養後、2mg/mlのリボスタマイシンを含む2.5mlのSNA(0.8%栄養培地: Difco社、0.4%寒天)を重ねた。30℃で7日間培養し、リボスタマイシンに耐性なpKU253-L2-hyg-R2形質転換株を得た。

得られたpKU253-L2-hyg-R2形質転換株を、リボスタマイシンを含まないTSB培地10mlに植菌し、30℃で24時間振盪培養した。pKU253-L2-hyg-R2形質転換株培養液を集菌し、滅菌水10mlで2回洗浄後、滅菌水10mlに懸濁した。適当に希釈した懸濁液を、200μg/mlのハイグロマイシンBを含むYMS寒天培地(0.4%酵母エキス、1%麦芽エキス、0.4%溶性デンプン、2%寒天、10mM塩化カルシウム)に塗布し、30℃で4日間培養した。ハイグロマイシンBを含むYMS寒天培地で生育したシングルコロニーを200μg/mlのハイグロマイシンBを含むYMS寒天培地および200μg/mlのリボスタマイシンを含むYMS寒天培地に植えかえ、30℃で2日間培養した。

10

培養後、ハイグロマイシンB耐性で、リボスタマイシン感受性の株を選択した。得られた菌株は、ゲノム中のpldC遺伝子内の886bp(配列番号1の塩基67221から塩基68105)を欠失し、その間にハイグロマイシンB耐性遺伝子が挿入されたpldC破壊株であり、Mer-11107pldC::hyg株とした。

実施例14: プラジエノライドの7位アシル化酵素遺伝子(pldC)破壊株のプラジエノライド生産性試験

20

実施例13で得られたMer-11107 pldC::hyg株の凍結種母200μlを、種母培地(溶性でんぷん2%、エスサンミート2%、酵母エキス0.5%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.1%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.25%、CaCO<sub>3</sub>0.3% pH無調整)20mlに植菌し、25℃で2日間培養した。

得られた種母培養液の300μlを、本培養培地(スタビローズ5%、グルコース1%、ファルマメディア3%、β-シクロデキストリン2%、CaCO<sub>3</sub> 0.1% pH7.5)30mlに植菌し、25℃で4日間および5日間培養した。

培養終了後、得られた培養液25mlに同量のアセトニトリルを加えて抽出した。その抽出液の一部を分取しアセトニトリルで5倍量に希釈し、下記の条件にてHPLCでプラジエノライドB及びプラジエノライドB<sub>12</sub>の量を測定した。測定結果を表3に示す。

30

(HPLC分析条件)

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: Develosil ODS UG-3 (4.6mm x 50mm 3μm)

移動相(容量%): 45%~55% メタノール(0~5分)

55%                   メタノール(5~13分)

55%~70%           メタノール(13~17分)

70%                   メタノール(17~35分)

45%                   メタノール(35~40分)

流速: 1.2ml/分

検出: UV240nm

インジェクション容量: 10μl

カラム温度: 40

分析時間: 35分

保持時間: プラジエノライドB<sub>12</sub>; 16分、プラジエノライドB; 12分

40

【表 3】

表 3

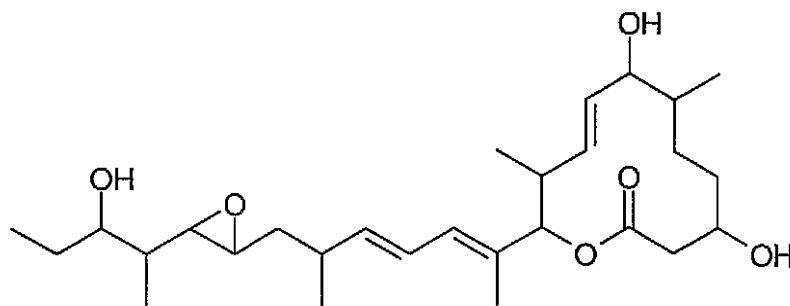
Mer-11107 pldC::hyg 株	プラジエノライド B <sub>12</sub> (mg/L)	プラジエノライド B(mg/L)
4 日培養 (96hr)	190.3	0.0
5 日培養 (120hr)	252.9	0.0

実施例 15 : プラジエノライド B<sub>12</sub> の単離精製と構造確認

実施例 14 で得られたアセトニトリル抽出液をろ過し、更に水 10 ml 及びアセトニトリル 10 ml にて洗浄した。ろ液を酢酸エチル 40 ml にて抽出し、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣 91.4 mg を TLC (薄層クロマトグラフィ、Merck 社製 Art. 5744 展開溶媒; ヘキサン: 酢酸エチル = 10:50) にて精製し、プラジエノライド B<sub>12</sub> (Rf = 0.46, 3.1 mg) を得た。

1. 分子量: 478, ESI-MS m/z 501 (M+Na)<sup>+</sup>, 477 (M-H)<sup>-</sup>

2. <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): ppm (積分, 多重度, 結合定数 J (Hz)): 0.89 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.90 (3H, d, J = 7.1 Hz), 0.94 (3H, t, J = 7.5 Hz), 1.07 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.08 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.16 - 1.26 (2H, m), 1.27 - 1.36 (1H, m), 1.41 - 1.67 (7H, m), 1.74 (3H, d, J = 1.1 Hz), 2.42 (1H, dd, J = 5.4, 14.2 Hz), 2.44 - 2.58 (2H, m), 2.56 (1H, dd, J = 3.5, 14.1 Hz), 2.65 (1H, dd, J = 2.3, 8.2 Hz), 2.72 (1H, dt, J = 2.3, 6.0 Hz), 3.51 (1H, dt, J = 4.4, 8.6 Hz), 3.57 (1H, dd, J = 9.6, 9.6 Hz), 3.72 - 3.79 (1H, m), 5.00 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.30 (1H, dd, J = 9.7, 15.1 Hz), 5.46 (1H, dd, J = 9.5, 15.0 Hz), 5.65 (1H, dd, J = 8.4, 15.1 Hz), 6.07 (1H, d, J = 10.9 Hz), 6.32 (1H, dd, J = 10.9, 15.1 Hz)

プラジエノライド B<sub>12</sub>

この結果、pldC破壊株である Mer-11107 pldC::hyg 株は、プラジエノライド B を生産せずにプラジエノライド B<sub>12</sub> を生産していることが確認された。すなわち、上記方法によりプラジエノライド B<sub>12</sub> を製造、取得することができた。

実施例 16 : プラジエノライドの 18, 19 位エポキシ化酵素遺伝子 (pldD) 破壊株の作製

実施例 9 で決定されたプラジエノライドの生合成に関連する DNA を含む約 75 kb の塩基配列 (配列番号 1 参照) より、図 1 に示された生合成経路でプラジエノライドが生合成されることが明らかとなった。そこで、18, 19 位エポキシ化酵素遺伝子 (pldD

10

20

30

40

50

)を破壊し、その下流の7位アシル化酵素遺伝子(pldC)の発現を抑えることで、プラジエノライドの7位脱アシル、18,19位オレフィン体(プラジエノライドZ)を生産する株を取得可能と考え、以下の方法でpldD破壊株を作製した。

配列番号1記載の塩基配列に基づいて、それぞれ、以下の配列番号25、26、27および28に示す塩基配列からなる4種のプライマー、即ち、pldD-L-Bgl2F、pldD-L-Hind3R、pldD-R-Hind3FおよびpldD-R-Bgl2Rを合成した。

pldD-L-Bgl2F: 5'-GGGAGATCTAGACCTGTCCATGGA  
TCTGGA AAC-3' (配列番号25)

pldD-L-Hind3R: 5'-GGGAAGCTTTCGGATCGTCTTTCGA  
GACCCCTT-3' (配列番号26)

pldD-R-Hind3F: 5'-GGGAAGCTTGTGGGGTGCCCTTT  
CTGACTT-3' (配列番号27)

pldD-R-Bgl2R: 5'-GGGAGATCTG CAGGAGGAGCTGCT  
CGGGCTGAA-3' (配列番号28)

これらのプライマーを用いてPCRを下記の条件にて行った。

(PCR反応液組成)

滅菌精製水	30 $\mu$ l	
2倍濃縮GC buffer	50 $\mu$ l	20
dNTP 混合溶液(dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2.5mM)	16 $\mu$ l	
pldD-L-Bgl2F または pldD-R-Hind3F(50pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
pldD-L-Hind3R または pldD-R-Bgl2R(50pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
Mer-11107 株 total DNA(100ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq polymerase(5u/ $\mu$ l, 宝酒造社)	1 $\mu$ l	

(反応温度条件)

95 3分  
(98 20秒, 63 4分) 30サイクル  
68 5分

この反応の結果、pldD-L-Bgl2FとpldD-L-Hind3Rを用いた反応から、配列番号1の塩基65700から塩基68368を含む約2.7kbのDNA断片(DNA断片L3)が増幅され、pldD-R-Hind3FとpldD-R-Bgl2Rを用いた反応から、配列番号1の塩基69514から塩基71951を含む約2.4kbのDNA断片(DNA断片R3)が増幅された。DNA断片L3及びR3をQIAGEN PCR purification Kit(QIAGEN社)で精製した後、制限酵素BglIIとHindIIIで消化した。

制限酵素BglIIとHindIIIで消化したDNA断片L3及びR3と、制限酵素HindIIIで消化した2.3kbのハイグロマイシンB耐性遺伝子(pHP45omegahyg: Gene 190, 315-317, 1997由来。以下hygと略記することがある)、及び制限酵素BamHIで消化したシャトルベクターpKU253(図3参照)、の計4者をDNALigation kit ver. 2.1(宝酒造社)で連結した。こうしてDNA断片L3とR3の間にハイグロマイシンB耐性遺伝子が挿入された形の約7.4kbのDNA断片が、pKU253に挿入された約23.4kbのプラスミドpKU253-L3-hyg-R3が構築された。

得られたpKU253-L3-hyg-R3を、接合大腸菌S17-1へエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、S17-1/pKU253-L3-hyg-R3株を

10

20

30

40

50

得た。得られたS17-1/pKU253-L3-hyg-R3株を、25µg/mlのカナマイシンおよび100µg/mlのハイグロマイシンBを含むLB培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)10mlに植菌し、30℃で2時間振盪培養後、集菌し、LB培地10mlで2回洗浄後、LB培地5mlに懸濁した。これを供与菌懸濁液とした。

供与菌懸濁液を調製すると同時進行で、Mer-11107株をTSB培地(Trypto-Soya broth:日水製薬社)10mlに植菌し、30℃で5時間振盪培養後、集菌し、滅菌水10mlで2回洗浄後、滅菌水1mlに懸濁した。これを受容菌懸濁液とした。

得られたS17-1/pKU253-L3-hyg-R3株供与菌懸濁液500µlを、Mer-11107株受容菌懸濁液10µlと混ぜ、Actino Medium No.4寒天培地(日本製薬社)に塗布した。30℃で18時間培養後、2mg/mlのリボスタマイシンを含む2.5mlのSNA(0.8%栄養培地: Difco社、0.4%寒天)を重ねた。30℃で7日間培養し、リボスタマイシンに耐性なpKU253-L3-hyg-R3形質転換株を得た。

10

得られたpKU253-L3-hyg-R3形質転換株を、リボスタマイシンを含まないTSB培地10mlに植菌し、30℃で24時間振盪培養した。pKU253-L3-hyg-R3形質転換株培養液を集菌し、滅菌水10mlで2回洗浄後、滅菌水10mlに懸濁した。適当に希釈した懸濁液を、200µg/mlのハイグロマイシンBを含むYMS寒天培地(0.4%酵母エキス、1%麦芽エキス、0.4%溶性デンプン、2%寒天、10mM塩化カルシウム)に塗布し、30℃で4日間培養した。ハイグロマイシンBを含むYMS寒天培地で生育したシングルコロニーを200µg/mlのハイグロマイシンBを含むYMS寒天培地および200µg/mlのリボスタマイシンを含むYMS寒天培地に植えかえ、30℃で2日間培養した。

20

培養後、ハイグロマイシンB耐性で、リボスタマイシン感受性の株を選択した。得られた菌株は、ゲノム中のpldD遺伝子内の1146bp(配列番号1の塩基68369から塩基69513)を欠失し、その間にハイグロマイシンB耐性遺伝子が挿入されたpldD破壊株であり、Mer-11107 pldDC::hyg株とした。

実施例17: プラジエノライドの18, 19位エポキシ化酵素遺伝子(pldD)破壊株のプラジエノライド生産性試験

30

実施例16で得られたMer-11107 pldDC::hyg株の凍結種母200µlを、種母培地(溶性でんぷん2%、エスサンミート2%、酵母エキス0.5%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25%、CaCO<sub>3</sub>0.3% pH無調整)20mlに植菌し、25℃で2日間培養した。

得られた種母培養液の300µlを、本培養培地(スタピロース5%、グルコース1%、ファルマメディア3%、β-シクロデキストリン2%、CaCO<sub>3</sub>0.1% pH7.5)30mlに植菌し、25℃で4日間および5日間培養した。

培養終了後、得られた培養液20mlに同量のアセトニトリルを加えて抽出した。その抽出液の一部を分取しアセトニトリルで5倍量に希釈し、下記の条件にてHPLCでプラジエノライドB及びプラジエノライドZの量を測定した。測定結果を表4に示す。

40

(HPLC分析条件)

分析装置: Shimadzu HPLC 10Avp

カラム: Develosil ODS UG-3 (4.6mm x 50mm 3µm)

移動相(容量%): 45%~55% メタノール(0~5分)

55% メタノール(5~13分)

55%~70% メタノール(13~17分)

70% メタノール(17~35分)

45% メタノール(35~40分)

流速: 1.2ml/分

検出: UV240nm

50

インジェクション容量：10 μl

カラム温度：40

分析時間：35分

保持時間：プラジエノライドZ；20分、プラジエノライドB；12分

【表4】

表4

Mer-11107 pldC::hyg 株	プラジエノライド Z(mg/L)	プラジエノライド B(mg/L)
4日培養 (96hr)	676.9	0.0
5日培養 (120hr)	695.8	0.0

10

実施例18：プラジエノライドZの単離精製と構造確認

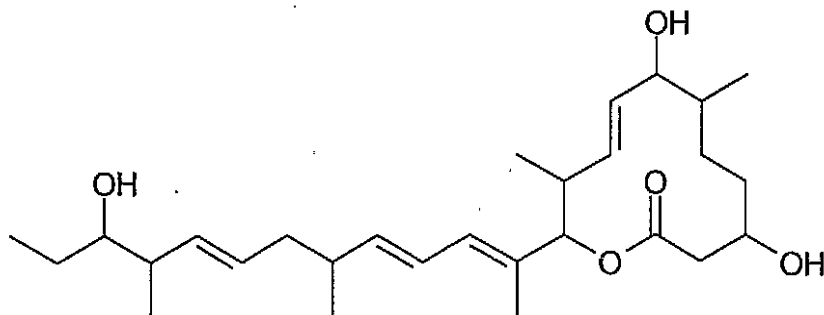
実施例17で得られたアセトニトリル抽出液をろ過し、更に水10ml及び酢酸エチル10mlにて洗浄した。ろ液に飽和食塩水40ml及び酢酸エチル90mlを加え抽出し、飽和食塩水50mlにて洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をTLC(薄層クロマトグラフィー、Merck社製Art. 5744 展開溶媒；ヘキサン：酢酸エチル=10：50)にて精製し、プラジエノライドZ(Rf=0.59, 22.8mg)を得た。

1. 分子量：462, ESI-MS m/z 485 (M+Na)<sup>+</sup>, 461 (M-H)

20

2. <sup>1</sup>H-NMR スペクトル(CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)： ppm(積分, 多重度, 結合定数 J(Hz))：0.89(3H, d, J=6.8Hz), 0.92(3H, t, J=7.5Hz), 0.98(3H, d, J=6.8Hz), 1.01(3H, d, J=6.8Hz), 1.07(3H, d, J=6.8Hz), 1.17-1.37(3H, m), 1.49-1.67(4H, m), 1.73(3H, d, J=1.0Hz), 2.04(2H, dd, J=6.8, 6.8Hz), 2.07-2.15(1H, m), 2.23-2.31(1H, m), 2.42(1H, dd, J=5.3, 14.1Hz), 2.50-2.59(1H, m), 2.55(1H, dd, J=3.4, 14.1Hz), 3.16-3.22(1H, m), 3.57(1H, dd, J=9.6, 9.6Hz), 3.72-3.79(1H, m), 5.00(1H, d, J=10.7Hz), 5.17-5.43(3H, m), 5.46(1H, dd, J=9.5, 15.0Hz), 5.64(1H, dd, J=7.8, 15.1Hz), 6.05(1H, d, J=10.8Hz), 6.21(1H, dd, J=10.8, 15.1Hz)

30



40

プラジエノライドZ

この結果、pldD破壊株であるMer-11107 pldDC::hyg株は、プラジエノライドBを生産せずにプラジエノライドZを生産していることが確認された。すなわち、上記方法によりプラジエノライドZを製造、取得することができた。



【配列表】

0004599357000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> <i>1/19</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> <i>1/21</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> <i>5/00</i> <i>1 0 1</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>17/16</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> <i>17/16</i>

- (72)発明者 町田 和弘  
静岡県磐田市中泉 1 7 9 7 - 3 3 6
- (72)発明者 有澤 章  
静岡県磐田市中泉 1 7 9 7 - 3 1 3
- (72)発明者 竹田 晋  
熊本県八代市三楽町 2 - 1 9 ( 7 )
- (72)発明者 吉田 政史  
静岡県磐田市中泉 1 7 9 7 - 3 2 6
- (72)発明者 土田 外志夫  
静岡県磐田市国府台 1 1 8 - 1 - 1 0 2

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 6 0 8 9 0 ( WO , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 6 6 1 ( WO , A 1 )  
国際公開第 9 3 / 0 1 3 6 6 3 ( WO , A 1 )  
Proc.Nat.I.Acad.Sci.U.S.A.,1998,95(21),p.12111-6

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
  - UniProt/GeneSeq
  - PubMed
  - JSTPlus(JDreamII)
  - BIOSIS(DIALOG)
  - WPI