

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7584401号
(P7584401)

(45)発行日 令和6年11月15日(2024.11.15)

(24)登録日 令和6年11月7日(2024.11.7)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10 Z N A
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 22 (全206頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-504769(P2021-504769)	(73)特許権者	522149980
(86)(22)出願日	令和1年7月17日(2019.7.17)		テイト アンド ライル ソリューションズ
(65)公表番号	特表2021-532757(P2021-532757 A)		ユー・エス・エー エル・エル・シー
(43)公表日	令和3年12月2日(2021.12.2)		Tate & Lyle Solutio
(86)国際出願番号	PCT/US2019/042151		ns USA LLC
(87)国際公開番号	WO2020/028039		アメリカ合衆国 6 0 1 9 2 イリノイ
(87)国際公開日	令和2年2月6日(2020.2.6)		ホフマン・エステーツ プレーリー・ス
審査請求日	令和4年7月15日(2022.7.15)		トーン・パークウェイ 5 4 5 0
(31)優先権主張番号	62/712,199		5 4 5 0 Prairie Stone
(32)優先日	平成30年7月30日(2018.7.30)		Parkway, Hoffman Es
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		tates, IL 6 0 1 9 2, Un
(31)優先権主張番号	62/712,327	(74)代理人	100078282
(32)優先日	平成30年7月31日(2018.7.31)		弁理士 山本 秀策
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 操作されたグリコシルトランスフェラーゼおよびステビオールグリコシドのグルコシル化方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

配列番号20、36、174、406、408、440、520、626、または678に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたグリコシルトランスフェラーゼであって、前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が：

(a) 146、221、16、196、232、および／または410の1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異を含むか、または153C、204M、170T、175D、207V、285S、289A、338A、および／または402Iの1つまたは複数の変異を含み、前記位置が、配列番号20、36、174、408、440、または520を基準にして番号が付けられている；

(b) 41E／72P／233Q／338A、41E／72P／338A、41E／144Q／233T、41E／233Q、41E／233Q／338V、41E／233T、41E／233T／338V、61D、61D／87K／91L／107L、61D／87K／91L／259T、61D／107V、61D／259T／428I、61D／407T／428I、61E／87K／91L／107V、61E／91L／431M、61E／411T、72P、72P／76S、72P／76S／163A／197K、72P／76S／207V／338V、72P／76T、72P／76T／195Q／233T、72P／76T／197K／204T、72P／76T／207V／233Q、7

2 P / 8 1 T、7 2 P / 8 1 T / 1 9 5 Q / 2 3 3 Q、7 2 P / 1 3 9 N / 1 9 5 Q / 2
 0 4 T、7 2 P / 1 4 4 Q / 3 3 8 V、7 2 P / 2 0 0 R / 2 0 4 T / 2 0 7 V、7 2 P
 / 2 0 7 V、7 6 S / 1 4 4 Q / 1 9 7 K / 2 0 0 R、7 6 S / 1 9 5 Q / 1 9 7 K / 2
 0 4 T / 2 0 7 V / 2 3 3 T、7 6 S / 1 9 7 K / 2 0 7 V / 2 3 3 Q、7 6 S / 2 3 3
 T、8 1 T / 1 3 9 N / 1 4 4 Q / 1 9 5 Q / 2 0 0 R / 2 0 4 T / 2 0 7 V / 2 3 3 Q
 、8 1 T / 1 4 4 Q / 2 3 3 Q、8 1 T / 1 9 7 K / 2 0 0 R / 2 0 7 V / 2 3 3 Q / 3
 3 8 A、8 1 T / 2 3 3 Q / 3 3 8 V、8 1 T / 3 3 8 V、1 0 7 V、1 0 7 V / 2 5 9
 T、1 3 9 N / 1 4 4 Q / 2 3 3 Q、1 4 4 Q / 2 3 3 T、1 4 4 Q / 2 3 3 T / 3 3 8
 V、1 5 6 S / 4 0 7 T、1 6 3 A / 2 3 3 T / 3 3 8 A、2 0 0 R / 2 0 4 T / 2 0 7
 V / 2 3 3 T、2 3 3 Q / 3 3 8 V、2 5 9 T、7 1 G、7 1 T、8 0 D、8 0 P、8 0
 Q、8 1 A、8 1 L、8 1 M、8 1 S、8 1 T、8 1 V、8 1 V / 2 7 0 K、8 3 D、8
 5 T、8 5 V、9 7 V、1 2 4 P、2 6 3 C、2 8 6 L、3 3 4 V、4 0 2 I、4 2 0 R
 および4 5 6 Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位
 置が、配列番号20を基準にして番号が付けられている；

10

(c) 7 3 S / 8 1 T / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 9 T、7 3 S / 8 1 T / 1 4 4 Q /
 2 0 7 V / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、7 3 S / 8 1 T / 2 5 9 T / 2 8 5 S / 4 2 6 I / 4 5
 1 Q、7 3 S / 8 1 T / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、7 3 S / 1 1 1 T / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、
 7 3 S / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 2 P / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、7 3 S / 1 4 4 Q / 2 0
 7 V / 2 5 9 T / 2 8 5 S / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、7 3 S / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 9
 T / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、7 3 S / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 9 T / 4 2 6 I / 4 5 1 Q
 、7 3 S / 1 4 4 Q / 2 5 9 T / 2 8 5 S、7 3 S / 2 5 9 T / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、7
 3 S / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、8 1 T / 1 1 1 T / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 8 5 S / 4 5 1
 Q、8 1 T / 1 1 1 T / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、8 1 T / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 2 P /
 2 8 5 S / 4 2 6 I、8 1 T / 1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、8 1 T / 1 4
 4 Q / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、8 1 T / 1 4 4 Q / 2 5 9 T、8 1 T
 / 1 4 4 Q / 2 5 9 T / 2 8 5 S、8 1 T / 1 4 4 Q / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、8 1 T / 2
 0 7 V / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、8 1 T / 2 0 7 V / 2 8 5 S / 4 2 6 I / 4 5
 1 Q、8 1 T / 2 8 5 S、8 1 T / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、1 1 1 T / 1 4 4 Q / 2 0 7 V
 / 2 5 2 P / 2 8 5 S / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、1 1 1 T / 1 4 4 Q / 2 5 2 P / 2 5 9 T
 / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、1 1 1 T / 1 4 4 Q / 2 5 9 T / 2 8 5 S / 4 2 6 I / 4 5 1 Q
 、1 1 1 T / 2 0 7 V / 2 8 5 S、1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 2 P / 2 5 9 T、1 4 4 Q
 / 2 0 7 V / 2 5 9 T、1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 5 9 T / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、1 4 4 Q
 / 2 0 7 V / 2 5 9 T / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、1 4 4 Q / 2 0 7 V / 2 8 5 S / 4 2 6 I
 、1 4 4 Q / 2 0 7 V / 4 5 1 Q、1 4 4 Q / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 2 8 5 S、1 4 4 Q
 / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、1 4 4 Q / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 4 2 6 I
 、1 4 4 Q / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、1 4 4 Q / 2 5 9 T / 2 8 5 S
 、1 4 4 Q / 2 8 5 S、1 4 4 Q / 2 8 5 S / 4 5 1 Q、1 4 4 Q / 4 5 1 Q、2 0 7 V
 、2 0 7 V / 2 5 2 P / 2 5 9 T / 4 5 1 Q、2 0 7 V / 2 5 2 P / 4 5 1 Q、2 0 7 V
 / 2 5 9 T、2 0 7 V / 2 5 9 T / 4 2 6 I / 4 5 1 Q、2 0 7 V / 2 8 5 S / 4 2 6 I
 / 4 5 1 Q、2 0 7 V / 4 5 1 Q、2 5 2 P / 2 5 9 T、2 5 9 T、2 5 9 T / 2 8 5 S
 / 4 5 1 Q、2 8 5 Sおよび2 8 5 S / 4 5 1 Qから選択される少なくとも1つの変異ま
 たは変異のセットを含み、前記位置が、配列番号36を基準にして番号が付けられている；

20

30

40

(d) 8 0 D / 8 1 A、8 0 D / 8 1 A / 8 5 V、8 0 D / 8 1 A / 8 5 V / 2 3 8 G
 、8 0 D / 8 1 A / 8 5 V / 2 5 1 M / 2 5 9 T、8 0 D / 8 1 A / 8 5 V / 2 5 2 P /
 2 5 6 G / 2 5 9 T、8 0 D / 8 5 V、8 0 D / 8 5 V / 2 3 8 G、8 0 D / 8 5 V / 2
 3 8 G / 2 5 1 M / 2 5 9 T、8 0 D / 8 5 V / 2 5 1 I / 2 5 2 P / 2 5 6 G / 2 5 9
 T、8 0 D / 8 5 V / 2 5 1 I / 2 5 9 T、8 0 D / 8 5 V / 2 5 1 M、8 0 D / 8 5 V
 / 2 5 1 M / 2 5 2 P、8 0 D / 8 5 V / 2 5 1 M / 2 5 2 P / 2 5 6 G / 2 5 9 T、8
 0 D / 8 5 V / 2 5 9 T、8 0 D / 2 5 9 T、8 0 P / 8 1 A / 8 5 V / 2 5 9 T、8 0
 P / 8 1 A / 2 5 1 I / 2 5 2 P / 2 5 9 T、8 0 P / 8 5 V、8 0 P / 8 5 V / 2 5 1

50

M/252P/259T、81A/85V、81A/85V/251M/252P、81A/85V/259T、85V、85V/238G、85V/251F、85V/251F/259T、85V/251M/252P/256G、85V/256G/259T、175D/402I、251I/252P/259T、259T、270K/402I、420R、3S、5A、5H、5L、5T、7A、7Q、99V、153C、232I/317L、252A、273K、299M、326A、326E、326N、326S、393I、404M、404V、409S、422I、443A、451E、451V、455Mおよび455Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号174を基準にして番号が付けられている；

(e) 81A/85V、81A/85V/175E/259T/402E、81A/85V/251I、81A/85V/251I/259T、81A/85V/259T、81A/85V/259T/402E、85V、85V/175E、85V/175E/251I、85V/175E/251I/259T/402E、85V/175E/259T、85V/175E/259T/402E、85V/175E/402E、85V/259T、85V/259T/402Eおよび85V/402Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号406を基準にして番号が付けられている；

(f) 153C、153C/326S、153C/326S/443A、153C/326S/443A/455M、232I、232I/273K/299M、232I/393I/451E、299M/451E、326E、326S、404V、451E、25A、116D、116R、116S、146G、170C、170G、170P、170S、170T、173S、227T、296V、300S、315T、327Y、330G、330T、361C、408C、408T、412A、412K、412S、438Q、448Hおよび449Sから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号408を基準にして番号が付けられている；

(g) 146G/170S/196I、146G/170S/232I、146G/170S/232I/423K/448H/451E/455M、146G/170T/196I/232I、146G/170T/196I/232I/423K、146G/170T/196I/232I/451E/455R、146G/170T/196I/408T/451E、146G/170T/232I/423K、146G/170T/259E、146G/196I、146G/196I/232I、146G/196I/232I/259E/448H/451E、146G/196I/455R、146G/232I/259E/455M、146G/232I/315S、146G/232I/315S/423K/451E/455M、146G/232I/326E、146G/232I/448H、146G/232I/451E、146G/413M/451E/455M、9L、12Q、107C、131A、156S、161E、169T、199S、204M、209Y、233K、262A、289A、337N、337Wおよび417Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号440を基準にして番号が付けられている；

(h) 9L/12Q/107C/161E/199S/209Y/337N、9L/12Q/161E/169T/199S/209Y/337W、9L/12Q/199S/204M/209Y/337N/455R、9L/12Q/199S/209Y/337W/451E/455R、9L/107C/131A/204M/259E/417V/451E、9L/107C/156S/161E/199S/204M/417V/455R、9L/107C/161E/209Y/259E/289A/451E/455R、9L/131A/156S/209Y/289A/337N、9L/131A/204M/337N/451E、9L/156S/169T/204M/337N、9L/169T/204M/289A/337W/451E/455R、9L/204M、9L/204M/259E/289A、9L/337W、12Q/14I/107C/204M/289A/455R、12Q/107C/131A/204M/289A/337W/4

10

20

30

40

50

17V/451E/455R、12Q/107C/156S/209Y/289A/455R、107C/161E/169T/199S/204M/259E/451E、107C/199S/204M/289A、107C/199S/209Y/259E/451E/455R、107C/204M、156S/169T/199S/204M/209Y/259E/289A、161E/204M/417V、204M/451E/455R、289A、451E/455R、16M、53Q、54P、78V、80A、95W、111C、111G、111S、221A、257A、336R、349V、391R、410V、413L、426Sおよび430Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号520を基準にして番号が付けられている；あるいは

(i) 16M、16M/59Q/80A/413L、16M/80A、16M/80A/111C、16M/80A/111S/257A、16M/80A/221A/257A/336R/410V、16M/80A/221A/336R/410V、16M/80A/257A、16M/111C/221A/257A/391R、16M/111S/221A、16M/221A、16M/221A/257A、16M/221A/257A/336R/391R、16M/221A/410V、16M/257A、16M/257A/336R/413L/420G、80A/111S/221A/257A/410V、111S/221A/257A/336R/391R、111S/221A/257A/391R、221A、221A/257A、5L、5M、5N、5Q、7L、14L、65V、91V、99L、99S、102R、118S、118V、138I、194P、254G、254T、254V、286L、416E、418Dおよび420Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号626を基準にして番号が付けられている；

(j) 5L/14L/99L、5L/14L/416E、5N、5N/91V、5N/91V/102R/118V、5N/91V/102R/254T/418D、5N/91V/106I/254T/286L、5N/91V/118S/194P/254T/418D、5N/91V/118S/254T/286L/418D、5N/91V/118S/286L、5N/91V/118V/194P/254T/286L、5N/91V/118V/194P/418D、5N/91V/194P/254T、5N/91V/194P/418D、5N/91V/254T、5N/91V/254T/286L、5N/102R/418D、5N/118S/194P/286L/418D、5N/118S/286L、5N/118V/254T、5N/194P、5N/254T/286L、5N/418D、7L/14L、7L/14L/65V/99L、7L/14L/99S/416E、14L、14L/65V/99L/416E、14L/99L、14L/99L/254G、14L/99L/254G/416E、14L/99L/254G/416E/455R、14L/99L/416E、14L/99S/416E、14L/167E、14L/254G、14L/455R、91V、91V/102R/194P、91V/118V、91V/118V/194P、91V/118V/194P/286L、91V/118V/194P/418D、91V/118V/286L、91V/194P/254T/286L、91V/286Lおよび118V/286L/418Dから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号678を基準にして番号が付けられている、

ここで、

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、ベーター1，3-グリコシルトランスフェラーゼおよびADP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼであり、

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、配列番号20の配列を有する操作されたグリコシルトランスフェラーゼと比較して、ADP-グルコースへのグルコシルトランスフェラーゼの改善した活性、ならびに、レバウジオシドAまたはレバウジオシドDからのレバウジオシドMの増加した産生、および／または、ステビオールからのレバウジオシドAの増加した産生により特徴づけられる、

10

20

30

40

50

操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

【請求項 2】

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、146、16、196、221、232、および／または410の1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異を含み、前記変異が146G、16M、196I、221A、232I、および／または410Vであり、前記位置が、配列番号20、36、174、408、440、または520を基準にして番号が付けられている、請求項1に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

【請求項 3】

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、153C、204M、170T、175D、207V、285S、289A、338A、および／または402Iの1つまたは複数の変異を含み、前記位置が、配列番号20、36、174、408、440、または520を基準にして番号が付けられている、請求項1に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

【請求項 4】

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、配列番号26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、268、270、272、274、276、278、286、288、290、292、294、296、298、300、302、304、306、308、310、312、314、316、318、320、322、324、326、328、330、332、334、336、338、340、342、344、346、348、350、352、354、356、358、360、362、364、366、368、370、372、374、376、378、380、382、384、386、388、390、392、394、396、398、400、402、404、406、408、410、412、414、416、418、420、422、424、426、428、430、432、434、436、438、440、442、444、446、448、450、452、454、456、458、460、462、464、466、468、470、472、474、476、478、480、482、484、486、488、490、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538、540、542、544、546、548、550、552、554、556、558、560、562、564、566、568、570、572、574、576、578、580、582、584、586、588、590、592、594、596、598、600、602、604、606、608、610、612、614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、660、662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、708、710、712、714、716、718、720、722、724、726、728、730、732、734、7

10

20

30

40

50

36、738、740、742、744、746、748、750、752、754、756、758、760、762、764、766、768、770、772、774、776、778、780、782、784、786、788、790、792、794、796、798、800、802、804、806、808、810、812、814、816、818、820、822、824、826、828、830、832、834、836、838、840、842、844、846、848、850、852、854、または856を含むポリペプチド配列を含む、請求項1に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

【請求項5】

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、配列番号36の配列を有する操作されたグリコシルトランスフェラーゼと比較して増大した熱安定性により特徴づけられる、請求項1から4のいずれか一項に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

【請求項6】

請求項1から5のいずれか一項で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドをコードする操作されたポリヌクレオチド。

【請求項7】

請求項6に記載の少なくとも1つの操作されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項8】

少なくとも1つの制御配列をさらに含む、請求項7に記載のベクター。

【請求項9】

請求項6に記載の少なくとも1つの操作されたポリヌクレオチド、あるいは請求項7または8に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項10】

真核生物および原核生物から選択される、請求項9に記載の宿主細胞。

【請求項11】

請求項1から5の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを産生するための方法であって、請求項9または10に記載の宿主細胞を、前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼが前記宿主細胞により産生されるような条件下で培養するステップを含む、方法。

【請求項12】

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼを回収するステップをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

請求項1から5のいずれか一項に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを含む組成物。

【請求項14】

(a) 基質のグリコシル化のための方法であって、少なくとも1つの基質、請求項1から5のいずれか一項に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、および前記基質と前記グリコシルトランスフェラーゼとを、前記基質がグリコシル化されて少なくとも1つのグリコシル化産物を産生するような条件下で接触させるステップを含む、方法；

(b) レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドD基質、NDP-グルコース、および請求項1から5のいずれか一項に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記レバウジオシドD基質、NDP-グルコース、および前記グリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

(c) レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP-グルコース、および請求項1から5のいずれか一項に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レ

10

20

30

40

50

バウジオシド A および／またはレバウジオシド I が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

(d) レバウジオシド D を産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP-グルコース、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼ、およびベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシド D が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

ここで、前記 NDP-グルコースが ADP-グルコースである、方法。

【請求項 15】

(a) について、前記基質が少なくとも 1 つのステビオールグリコシドを含み；ならびに／あるいは前記グリコシル化産物が少なくとも 1 つのモノグリコシル化および／またはポリグリコシル化産物を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

(a) レバウジオシド M を産生する方法であって、レバウジオシド D 基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、および請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記レバウジオシド D 基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシド M が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

(b) レバウジオシド A および／またはレバウジオシド I を産生する方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、および請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシド A および／またはレバウジオシド I が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

(c) レバウジオシド D を産生する方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼ、およびベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシド D が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

(d) レバウジオシド M を産生する方法であって、少なくとも 1 つのステビオシドを含むおよび／またはステビオシドとレバウジオシド A の混合物を含むステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼ、ならびにベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシド M が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；あるいは

(e) レバウジオシド M を産生する方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、少なくとも 1 つのスクロースシンターゼ、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼ、およびベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシド A が先ず産生され、次いでレバウジオシド D および／またはレバウジオシド I が産生され、最後にレバウジオシド M が産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法；

ここで、前記 NDP が ADP であり、前記ベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼが、ADP-グルコースを利用できる操作されたベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼである、方法。

【請求項 17】

前記スクロースシンターゼが、操作されたスクロースシンターゼである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

(i) 前記方法が、ワンポット反応として行われる；

(ii) 前記方法が、逐次的に行われる；かつ／または

(iii) 前記方法の前記ステップを反復するステップをさらに含む、請求項 14 または 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ステビオシド基質が、*Stevia rebaudiana* から抽出されるか、または合成により産生される、請求項 14 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記グリコシルトランスフェラーゼが、固定化されている、請求項 14 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

フルクトースを含む反応産物を産生する、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記フルクトースが、前記反応産物から除去される、請求項 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2018年7月30日に出願した米国仮特許出願第62／712,199号、および2018年7月31日に出願した米国仮特許出願第62／712,327号の優先権を主張するものであり、前記仮出願の両方は、それらの全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ (GT) 酵素、GT活性を有するポリペプチド、およびこれらの酵素をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は、操作されたスクロースシンターゼ (SuS) 酵素、SuS活性を有するポリペプチド、およびこれらの酵素をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は、GT酵素を含む組成物、およびβ-グルコース結合を有する産物を作製するために操作されたGT酵素を使用する方法を、さらに提供する。本発明は、レバウジオシド (例えば、レバウジオシドM、レバウジオシドA、レバウジオシドIおよびレバウジオシドD) の産生のための組成物および方法をさらに提供する。本発明は、SuS酵素を含む組成物、およびそれらを使用する方法も提供する。GTおよびSuS酵素を産生する方法も提供される。

【0003】

配列表、表またはコンピュータプログラムへの言及

配列表の公式コピーは、ファイル名が「CX8-180USP1A_ST25.txt」であり、作成日が2018年7月31日であり、サイズが8,929キロバイトである、ASCII形式のテキストファイルとして、本明細書と同時にEFS-Web経由で提出されている。EFS-Web経由で出願したこの配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

グリコシルトランスフェラーゼ (GT) は、活性化されたヌクレオシド糖からグリコシル残基を単量体および多量体アクセプター分子 (例えば、他の糖、タンパク質、脂質、および他の有機基質) に翻訳後転移させる酵素である。したがって、これらの酵素は、置換リン酸脱離基を含有する活性化されたドナー糖基質を利用する。ドナー糖基質 (すなわち、「グリコシルドナー」) は、一般的にヌクレオシドニリン酸糖として活性化される。し

10

20

30

40

50

かし、ヌクレオシドーリン酸糖などの他の糖、脂質ホスフェート、および非置換ホスフェートも使用される（例えば、Lairson et al., Ann. Rev. Biochem., 77:25.1-25.35 [2008]を参照されたい）。GTは、基質および反応産物の立体化学に基づいて、保持型または反転型酵素のどちらかとして分類される。ドナーのアノマー結合の立体化学が保持される（例えば、アルファからアルファ）反応では、GTは保持型酵素である。立体化学が反転する（例えば、アルファからベータ）反応では、GTは反転型酵素である。これらのグリコシル化産物は、様々な代謝経路およびプロセスに関与する。実際、非常に多くの二糖、オリゴ糖および多糖の生合成は、様々なグリコシルトランスフェラーゼの作用を必要とする。グルコシル部分の転移は、アクセプターの生物活性、溶解度、および細胞内の輸送特性を変更し得る。GTは、特定の化合物（例えば、複合糖質およびグリコシド）の標的化された合成、および差次的にグリコシル化された薬物、生物学的プローブ、または天然産物ライブラリーの産生に使用されている。一部の方法では、複合糖質合成のためのGTの大規模使用は、大量のグリコシルドナーを必要とし、したがって、そのような手法の費用を増大させる。放出されるヌクレオチドからのグリコシルドナーの再合成を可能にするために、ヌクレオチド再利用システムが開発された。これらの再利用システムはまた、反応中に形成されるヌクレオチド副産物の量を低減させ、それによって、GTにより引き起こされる阻害を低減させる。それでもなお、GTによる複合糖質の大規模産生に好適な改善された方法が、依然として必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】Lairsonら、Ann. Rev. Biochem. (2008) 77:25.1~25.35

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ（GT）酵素、GT活性を有するポリペプチド、およびこれらの酵素をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は、操作されたスクロースシンターゼ（SuS）酵素、SuS活性を有するポリペプチド、およびこれらの酵素をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は、GT酵素を含む組成物、およびβ-グルコース結合を有する産物を作製するために操作されたGT酵素を使用する方法を、さらに提供する。本発明は、レバウジオシド（例えば、レバウジオシドM、レバウジオシドA、レバウジオシドIおよびレバウジオシドD）の産生のための組成物および方法をさらに提供する。本発明は、SuS酵素を含む組成物、およびそれらを使用する方法も提供する。GTおよびSuS酵素を産生する方法も提供される。

本発明は、配列番号2に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ改変体を提供する。一部の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、配列番号20に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性であるポリペプチドを含む。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、41/72/233/338、41/72/338、41/144/233、41/233、41/233/338、61、61/87/91/107、61/87/91/259、61/91/431、61/107、61/259/428、61/407/428、61/411、72、72/76、72/76/163/197、72/76/195/233、72/76/197/204、72/76/207/233、72/76/207/338、72/81、72/81/195/2

33、72/139/195/204、72/144/338、72/200/204/207、72/207、76/144/197/200、76/195/197/204/207/233、76/197/207/233、76/233、81/139/144/195/200/204/207/233、81/144/233、81/197/200/207/233/338、81/233/338、81/338、107、107/259、139/144/233、144/233、144/233/338、156/407、163/233/338、200/204/207/233、233/338、および259から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、41E/72P/233Q/338A、41E/72P/338A、41E/144Q/233T、41E/233Q、41E/233Q/338V、41E/233T、41E/233T/338V、61D、61D/87K/91L/107L、61D/87K/91L/259T、61D/107V、61D/259T/428I、61D/407T/428I、61E/87K/91L/107V、61E/91L/431M、61E/411T、72P、72P/76S、72P/76S/163A/197K、72P/76S/207V/338V、72P/76T、72P/76T/195Q/233T、72P/76T/197K/204T、72P/76T/207V/233Q、72P/81T、72P/81T/195Q/233Q、72P/139N/195Q/204T、72P/144Q/338V、72P/200R/204T/207V、72P/207V、76S/144Q/197K/200R、76S/195Q/197K/204T/207V/233T、76S/197K/207V/233Q、76S/233T、81T/139N/144Q/195Q/200R/204T/207V/233Q、81T/144Q/233Q、81T/197K/200R/207V/233Q/338A、81T/233Q/338V、81T/338V、107V、107V/259T、139N/144Q/233Q、144Q/233T、144Q/233T/338V、156S/407T、163A/233T/338A、200R/204T/207V/233T、233Q/338V、および259Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、A41E/T72P/W233Q/C338A、A41E/T72P/C338A、A41E/M144Q/W233T、A41E/W233Q、A41E/W233Q/C338V、A41E/W233T、A41E/W233T/C338V、Q61D、Q61D/A87K/Q91L/A107L、Q61D/A87K/Q91L/E259T、Q61D/A107V、Q61D/E259T/K428I、Q61D/I407T/K428I、Q61E/A87K/Q91L/A107V、Q61E/Q91L/D431M、Q61E/R411T、T72P、T72P/R76S、T72P/R76S/L163A/Q197K、T72P/R76S/I207V/C338V、T72P/R76T、T72P/R76T/H195Q/W233T、T72P/R76T/Q197K/D204T、T72P/R76T/I207V/W233Q、T72P/H81T、T72P/H81T/H195Q/W233Q、T72P/K139N/H195Q/D204T、T72P/M144Q/C338V、T72P/K200R/D204T/I207V、T72P/I207V、R76S/M144Q/Q197K/K200R、R76S/H195Q/Q197K/D204T/I207V/W233T、R76S/Q197K/I207V/W233Q、R76S/W233T、H81T/K139N/M144Q/H195Q/K200R/D204T/I207V/W233Q、H81T/M144Q/W233Q、H81T/Q197K/K200R/I207V/W233Q/C338A、H81T/W233Q/C338V、H81T/C338V、A107V、A107V/E259T、K139N/M144Q/W233Q、M144Q/W233T、M144Q/W233T/C338V、C156S/I407T、L163

10

20

30

40

50

A/W233T/C338A、K200R/D204T/I207V/W233T、W233Q/C338V、およびE259Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。

【0007】

一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、71、80、81、81/270、83、85、97、124、263、286、334、402、420および456から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、71G、71T、80D、80P、80Q、81A、81L、81M、81S、81T、81V、81V/270K、83D、85T、85V、97V、124P、263C、286L、334V、402I、420Rおよび456Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、Q71G、Q71T、T80D、T80P、T80Q、H81A、H81L、H81M、H81S、H81T、H81V、H81V/Q270K、P83D、A85T、A85V、A97V、A124P、T263C、V286L、I334V、E402I、E420RおよびS456Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。

【0008】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、41/72/233/338、41/72/338、61、61/91/431、61/259/428、61/407/428から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、41E/72P/233Q/338A、41E/72P/338A、61D、61D/259T/428I、61D/407T/428I、61E/91L/431M、81T/139N/144Q/195Q/200R/204T/207V/233Q、および81T/197K/200R/207V/233Q/338Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、A41E/T72P/W233Q/C338A、A41E/T72P/C338A、Q61D、Q61D/E259T/K428I、Q61D/I407T/K428I、Q61E/Q91L/D431M、H81T/K139N/M144Q/H195Q/K200R/D204T/I207V/W233Q、およびH81T/Q197K/K200R/I207V/W233Q/C338Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号20を基準にして番号が付けられている。

【0009】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、73/81/144/207/259、73/81/144/207/285/451、73/81/259/285/426/451、73/81/259/451、73/111/285/451、73/144/207/252/426/451、73/144/207/259/285/426/451、73/144/207/259/285/451、73/144/207/259/426/451、73/144/259/285、73/259/426/451、73/259/451、81/111/144/207/285/451、81/111/259/451、81/144/207/252/285/426、81/144/207/259/451、81/144/252/259/285/451、81/144/259、81/144/259

／ 2 8 5、8 1／ 1 4 4／ 2 5 9／ 4 5 1、8 1／ 2 0 7／ 2 5 2／ 2 5 9／ 4 5 1、8
 1／ 2 0 7／ 2 8 5／ 4 2 6／ 4 5 1、8 1／ 2 8 5、8 1／ 2 8 5／ 4 5 1、1 1 1／
 1 4 4／ 2 0 7／ 2 5 2／ 2 8 5／ 4 2 6／ 4 5 1、1 1 1／ 1 4 4／ 2 5 2／ 2 5 9／
 2 8 5／ 4 5 1、1 1 1／ 1 4 4／ 2 5 9／ 2 8 5／ 4 2 6／ 4 5 1、1 1 1／ 2 0 7／
 2 8 5、1 4 4／ 2 0 7／ 2 5 2／ 2 5 9、1 4 4／ 2 0 7／ 2 5 9、1 4 4／ 2 0 7／
 2 5 9／ 2 8 5／ 4 5 1、1 4 4／ 2 0 7／ 2 5 9／ 4 2 6／ 4 5 1、1 4 4／ 2 0 7／
 2 8 5／ 4 2 6、1 4 4／ 2 0 7／ 4 5 1、1 4 4／ 2 5 2／ 2 5 9／ 2 8 5、1 4 4／
 2 5 2／ 2 5 9／ 2 8 5／ 4 5 1、1 4 4／ 2 5 2／ 2 5 9／ 4 2 6、1 4 4／ 2 5 2／
 2 5 9／ 4 2 6／ 4 5 1、1 4 4／ 2 5 9／ 2 8 5、1 4 4／ 2 8 5、1 4 4／ 2 8 5／
 4 5 1、1 4 4／ 4 5 1、2 0 7、2 0 7／ 2 5 2／ 2 5 9／ 4 5 1、2 0 7／ 2 5 2／
 4 5 1、2 0 7／ 2 5 9、2 0 7／ 2 5 9／ 4 2 6／ 4 5 1、2 0 7／ 2 8 5／ 4 2 6／
 4 5 1、2 0 7／ 4 5 1、2 5 2／ 2 5 9、2 5 9、2 5 9／ 2 8 5／ 4 5 1、2 8 5、
 および 2 8 5／ 4 5 1 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異また
 は変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 3 6 を基準にして番号が付けられてい
 る。

【 0 0 1 0 】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド
 配列は、7 3 S／ 8 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 9 T、7 3 S／ 8 1 T／ 1 4 4 Q／
 2 0 7 V／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、7 3 S／ 8 1 T／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I／ 4 5
 1 Q、7 3 S／ 8 1 T／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、7 3 S／ 1 1 1 T／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、
 7 3 S／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 2 P／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、7 3 S／ 1 4 4 Q／ 2 0
 7 V／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、7 3 S／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 9
 T／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、7 3 S／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 9 T／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q
 、7 3 S／ 1 4 4 Q／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S、7 3 S／ 2 5 9 T／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、7
 3 S／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、8 1 T／ 1 1 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 8 5 S／ 4 5 1
 Q、8 1 T／ 1 1 1 T／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、8 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 2 P／
 2 8 5 S／ 4 2 6 I、8 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、8 1 T／ 1 4
 4 Q／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、8 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 5 9 T、8 1 T
 ／ 1 4 4 Q／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S、8 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、8 1 T／ 2
 0 7 V／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、8 1 T／ 2 0 7 V／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I／ 4 5
 1 Q、8 1 T／ 2 8 5 S、8 1 T／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、1 1 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 0 7 V
 ／ 2 5 2 P／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、1 1 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T
 ／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、1 1 1 T／ 1 4 4 Q／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q
 、1 1 1 T／ 2 0 7 V／ 2 8 5 S、1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T、1 4 4 Q
 ／ 2 0 7 V／ 2 5 9 T、1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、1 4 4 Q
 ／ 2 0 7 V／ 2 5 9 T／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I
 、1 4 4 Q／ 2 0 7 V／ 4 5 1 Q、1 4 4 Q／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S、1 4 4 Q
 ／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、1 4 4 Q／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 4 2 6 I
 、1 4 4 Q／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、1 4 4 Q／ 2 5 9 T／ 2 8 5 S
 、1 4 4 Q／ 2 8 5 S、1 4 4 Q／ 2 8 5 S／ 4 5 1 Q、1 4 4 Q／ 4 5 1 Q、2 0 7 V
 、2 0 7 V／ 2 5 2 P／ 2 5 9 T／ 4 5 1 Q、2 0 7 V／ 2 5 2 P／ 4 5 1 Q、2 0 7 V
 ／ 2 5 9 T、2 0 7 V／ 2 5 9 T／ 4 2 6 I／ 4 5 1 Q、2 0 7 V／ 2 8 5 S／ 4 2 6 I
 ／ 4 5 1 Q、2 0 7 V／ 4 5 1 Q、2 5 2 P／ 2 5 9 T、2 5 9 T、2 5 9 T／ 2 8 5 S
 ／ 4 5 1 Q、2 8 5 S、および 2 8 5 S／ 4 5 1 Q から選択される少なくとも 1 つの変異
 または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 3 6 を基準にして番号が付けられ
 ている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペ
 プチド配列は、E 7 3 S／ H 8 1 T／ M 1 4 4 Q／ I 2 0 7 V／ E 2 5 9 T、E 7 3 S／
 H 8 1 T／ M 1 4 4 Q／ I 2 0 7 V／ E 2 8 5 S／ V 4 5 1 Q、E 7 3 S／ H 8 1 T／ E
 2 5 9 T／ E 2 8 5 S／ A 4 2 6 I／ V 4 5 1 Q、E 7 3 S／ H 8 1 T／ E 2 5 9 T／ V
 4 5 1 Q、E 7 3 S／ S 1 1 1 T／ E 2 8 5 S／ V 4 5 1 Q、E 7 3 S／ M 1 4 4 Q／ I

10

20

30

40

50

207V/S252P/A426I/V451Q、E73S/M144Q/I207V/
E259T/E285S/A426I/V451Q、E73S/M144Q/I207V/
/E259T/E285S/V451Q、E73S/M144Q/I207V/E259
T/A426I/V451Q、E73S/M144Q/E259T/E285S、E73
S/E259T/A426I/V451Q、E73S/E259T/V451Q、H81
T/S111T/M144Q/I207V/E285S/V451Q、H81T/S11
1T/E259T/V451Q、H81T/M144Q/I207V/S252P/E2
85S/A426I、H81T/M144Q/I207V/E259T/V451Q、H
81T/M144Q/S252P/E259T/E285S/V451Q、H81T/M
144Q/E259T、H81T/M144Q/E259T/E285S、H81T/M
144Q/E259T/V451Q、H81T/I207V/S252P/E259T/
V451Q、H81T/I207V/E285S/A426I/V451Q、H81T/
E285S、H81T/E285S/V451Q、S111T/M144Q/I207V
/S252P/E285S/A426I/V451Q、S111T/M144Q/S25
2P/E259T/E285S/V451Q、S111T/M144Q/E259T/E
285S/A426I/V451Q、S111T/I207V/E285S、M144Q
/I207V/S252P/E259T、M144Q/I207V/E259T、M14
4Q/I207V/E259T/E285S/V451Q、M144Q/I207V/E
259T/A426I/V451Q、M144Q/I207V/E285S/A426I
、M144Q/I207V/V451Q、M144Q/S252P/E259T/E28
5S、M144Q/S252P/E259T/E285S/V451Q、M144Q/S
252P/E259T/A426I、M144Q/S252P/E259T/A426I
/V451Q、M144Q/E259T/E285S、M144Q/E285S、M14
4Q/E285S/V451Q、M144Q/V451Q、I207V、I207V/S
252P/E259T/V451Q、I207V/S252P/V451Q、I207V
/E259T、I207V/E259T/A426I/V451Q、I207V/E28
5S/A426I/V451Q、I207V/V451Q、S252P/E259T、E
259T、E259T/E285S/V451Q、E285S、およびE285S/V4
51Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は
、配列番号36を基準にして番号が付けられている。さらに一部のさらなる実施形態では
、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、81/111/14
4/207/285/451、144/207/252/259、144/207/25
9/285/451、144/252/259/426、144/252/259/42
6/451、および144/285/451から選択される1つまたは複数の位置に少な
くとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号36を基準にし
て番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフ
ェラーゼのポリペプチド配列は、81T/111T/144Q/207V/285S/4
51Q、144Q/207V/252P/259T、144Q/207V/259T/2
85S/451Q、144Q/252P/259T/426I、144Q/252P/2
59T/426I/451Q、および144Q/285S/451Qから選択される少な
くとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号36を基準にし
て番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフ
ェラーゼのポリペプチド配列は、H81T/S111T/M144Q/I207V/E2
85S/V451Q、M144Q/I207V/S252P/E259T、M144Q/
I207V/E259T/E285S/V451Q、M144Q/S252P/E259
T/A426I、M144Q/S252P/E259T/A426I/V451Q、およ
びM144Q/E285S/V451Qから選択される少なくとも1つの変異または変異
のセットを含み、これらの位置は、配列番号36を基準にして番号が付けられている。

【0011】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリ

10

20

30

40

50

ペプチド配列は、80/81、80/81/85、80/81/85/238、80/81/85/251/259、80/81/85/252/256/259、80/81/85/259、80/81/251/252/259、80/85、80/85/238、80/85/238/251/259、80/85/251、80/85/251/252、80/85/251/252/256/259、80/85/251/252/259、80/85/251/259、80/85/259、80/259、81/85、81/85/251/252、81/85/259、85、85/238、85/251、85/251/252/256、85/251/259、85/256/259、175/402、251/252/259、259、270/402、および420から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、80D/81A、80D/81A/85V、80D/81A/85V/238G、80D/81A/85V/251M/259T、80D/81A/85V/252P/256G/259T、80D/85V、80D/85V/238G、80D/85V/238G/251M/259T、80D/85V/251I/252P/256G/259T、80D/85V/251I/259T、80D/85V/251M、80D/85V/251M/252P、80D/85V/251M/252P/256G/259T、80D/85V/259T、80D/259T、80P/81A/85V/259T、80P/81A/251I/252P/259T、80P/85V、80P/85V/251M/252P/259T、81A/85V、81A/85V/251M/252P、81A/85V/259T、85V、85V/238G、85V/251F、85V/251F/259T、85V/251M/252P/256G、85V/256G/259T、175D/402I、251I/252P/259T、259T、270K/402I、および420Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、T80D/T81A、T80D/T81A/A85V、T80D/T81A/A85V/A238G、T80D/T81A/A85V/A251M/E259T、T80D/T81A/A85V/S252P/L256G/E259T、T80D/A85V、T80D/A85V/A238G、T80D/A85V/A238G/A251M/E259T、T80D/A85V/A251I/S252P/L256G/E259T、T80D/A85V/A251I/E259T、T80D/A85V/A251M、T80D/A85V/A251M/S252P、T80D/A85V/A251M/S252P/L256G/E259T、T80D/A85V/E259T、T80D/E259T、T80P/T81A/A85V/E259T、T80P/T81A/A251I/S252P/E259T、T80P/A85V、T80P/A85V/A251M/S252P/E259T、T81A/A85V、T81A/A85V/A251M/S252P、T81A/A85V/E259T、A85V、A85V/A238G、A85V/A251F、A85V/A251F/E259T、A85V/A251M/S252P/L256G、A85V/L256G/E259T、E175D/E402I、A251I/S252P/E259T、E259T、Q270K/E402I、およびE420Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3、5、7、99、153、232/317、252、273、299、326、393、404、409、422、443、451および455から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3S、5A、5H、5L、5T、7A、7Q、99V、153C、232I/317L、252A、273K、299M、326A、326E、3

10

20

30

40

50

26N、326S、393I、404M、404V、409S、422I、443A、451E、451V、455Mおよび455Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、N3S、S5A、S5H、S5L、S5T、T7A、T7Q、E99V、A153C、V232I/Y317L、S252A、S273K、V299M、G326A、G326E、G326N、G326S、V393I、G404M、G404V、A409S、M422I、S443A、Q451E、Q451V、S455MおよびS455Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、80/81/85、80/85、80/85/251/259、85、85/251/252/256、175/402、および270/402から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、80D/81A/85V、80D/85V/251I/259T、80P/85V、85V、85V/251M/252P/256G、175D/402I、および270K/402Iから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号174を基準にして番号が付けられている。

【0012】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、81/85、81/85/175/259/402、81/85/251、81/85/251/259、81/85/259、81/85/259/402、85、85/175、85/175/251、85/175/251/259/402、85/175/259、85/175/259/402、85/175/402、85/259、85/259/402、および85/402から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号406を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、81A/85V、81A/85V/175E/259T/402E、81A/85V/251I、81A/85V/251I/259T、81A/85V/259T、81A/85V/259T/402E、85V、85V/175E、85V/175E/251I、85V/175E/251I/259T/402E、85V/175E/259T、85V/175E/259T/402E、85V/175E/402E、85V/259T、85V/259T/402E、および85V/402Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号406を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、T81A/A85V、T81A/A85V/D175E/E259T/I402E、T81A/A85V/A251I、T81A/A85V/A251I/E259T、T81A/A85V/E259T、T81A/A85V/E259T/I402E、A85V、A85V/D175E、A85V/D175E/A251I、A85V/D175E/A251I/E259T/I402E、A85V/D175E/E259T、A85V/D175E/E259T/I402E、A85V/D175E/I402E、A85V/E259T、A85V/E259T/I402E、およびA85V/I402Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号406を基準にして番号が付け

10

20

30

40

50

られている。

【0013】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、153、153／326、153／326／443、153／326／443／455、232、232／273／299、232／393／451、299／451、326、404および451から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、153C、153C／326S、153C／326S／443A、153C／326S／443A／455M、232I、232I／273K／299M、232I／393I／451E、299M／451E、326E、326S、404Vおよび451Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、25、116、146、170、173、227、296、300、315、327、330、361、408、412、438、448および449から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、25A、116D、116R、116S、146G、170C、170G、170P、170S、170T、173S、227T、296V、300S、315T、327Y、330G、330T、361C、408C、408T、412A、412K、412S、438Q、448Hおよび449Sから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、L25A、E116D、E116R、E116S、S146G、D170C、D170G、D170P、D170S、D170T、R173S、S227T、R296V、A300S、K315T、F327Y、E330G、E330T、T361C、N408C、N408T、R412A、R412K、R412S、A438Q、E448HおよびR449Sから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、153、232、232／393／451、および451から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、153C、232I、232I／393I／451E、および451Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、A153C、V232I、V232I／V393I／Q451E、およびQ451Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号408を基準にして番号が付けられている。

【0014】

一部の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、146／170／196、146／170／196／232、146／170／196

10

20

30

40

50

／232／423、146／170／196／232／451／455、146／170／196／408／451、146／170／232、146／170／232／423、146／170／232／423／448／451／455、146／170／259、146／196、146／196／232、146／196／232／259／448／451、146／196／455、146／232／259／455、146／232／315、146／232／315／423／451／455、146／232／326、146／232／448、146／232／451、および146／413／451／455から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号440を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、146G／170S／196I、146G／170S／232I、146G／170S／232I／423K／448H／451E／455M、146G／170T／196I／232I、146G／170T／196I／232I／423K、146G／170T／196I／232I／451E／455R、146G／170T／196I／408T／451E、146G／170T／232I／423K、146G／170T／259E、146G／196I、146G／196I／232I、146G／196I／232I／259E／448H／451E、146G／196I／455R、146G／232I／259E／455M、146G／232I／315S、146G／232I／315S／423K／451E／455M、146G／232I／326E、146G／232I／448H、146G／232I／451E、および146G／413M／451E／455Mから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号440を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S146G／D170S／W196I、S146G／D170S／V232I、S146G／D170S／V232I／R423K／E448H／Q451E／S455M、S146G／D170T／W196I／V232I、S146G／D170T／W196I／V232I／R423K、S146G／D170T／W196I／V232I／Q451E／S455R、S146G／D170T／W196I／N408T／Q451E、S146G／D170T／V232I／R423K、S146G／D170T／T259E、S146G／W196I、S146G／W196I／V232I、S146G／W196I／V232I／T259E／E448H／Q451E、S146G／W196I／S455R、S146G／V232I／T259E／S455M、S146G／V232I／K315S、S146G／V232I／K315S／R423K／Q451E／S455M、S146G／V232I／G326E、S146G／V232I／E448H、S146G／V232I／Q451E、およびS146G／V413M／Q451E／S455Mから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号440を基準にして番号が付けられている。

【0015】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9、12、107、131、156、161、169、199、204、209、233、262、289、337および417から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号440を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9L、12Q、107C、131A、156S、161E、169T、199S、204M、209Y、233K、262A、289A、337N、337Wおよび417Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号440を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、V9L、R12Q、A107C、P131A、C156S、L161E、E169T、A199S、D204M、E209Y、Q233K、S262A、K289A、S337N

、S 3 3 7 WおよびP 4 1 7 Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号4 4 0を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、1 4 6 / 1 7 0 / 1 9 6、1 4 6 / 1 7 0 / 1 9 6 / 2 3 2、1 4 6 / 1 7 0 / 1 9 6 / 2 3 2 / 4 5 1 / 4 5 5、1 4 6 / 1 7 0 / 2 3 2、1 4 6 / 1 7 0 / 2 3 2 / 4 2 3 / 4 4 8 / 4 5 1 / 4 5 5、1 4 6 / 1 9 6 / 2 3 2、1 4 6 / 1 9 6 / 2 3 2 / 2 5 9 / 4 4 8 / 4 5 1、および1 4 6 / 2 3 2 / 4 4 8から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号4 4 0を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、1 4 6 G / 1 7 0 S / 1 9 6 I、1 4 6 G / 1 7 0 S / 2 3 2 I、1 4 6 G / 1 7 0 S / 2 3 2 I / 4 2 3 K / 4 4 8 H / 4 5 1 E / 4 5 5 M、1 4 6 G / 1 7 0 T / 1 9 6 I / 2 3 2 I、1 4 6 G / 1 7 0 T / 1 9 6 I / 2 3 2 I / 4 5 1 E / 4 5 5 R、1 4 6 G / 1 9 6 I / 2 3 2 I、1 4 6 G / 1 9 6 I / 2 3 2 I / 2 5 9 E / 4 4 8 H / 4 5 1 E、および1 4 6 G / 2 3 2 I / 4 4 8 Hから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号4 4 0を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S 1 4 6 G / D 1 7 0 S / W 1 9 6 I、S 1 4 6 G / D 1 7 0 S / V 2 3 2 I、S 1 4 6 G / D 1 7 0 S / V 2 3 2 I / R 4 2 3 K / E 4 4 8 H / Q 4 5 1 E / S 4 5 5 M、S 1 4 6 G / D 1 7 0 T / W 1 9 6 I / V 2 3 2 I、S 1 4 6 G / D 1 7 0 T / W 1 9 6 I / V 2 3 2 I / Q 4 5 1 E / S 4 5 5 R、S 1 4 6 G / W 1 9 6 I / V 2 3 2 I、S 1 4 6 G / W 1 9 6 I / V 2 3 2 I / T 2 5 9 E / E 4 4 8 H / Q 4 5 1 E、およびS 1 4 6 G / V 2 3 2 I / E 4 4 8 Hから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号4 4 0を基準にして番号が付けられている。

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9 / 1 2 / 1 0 7 / 1 6 1 / 1 9 9 / 2 0 9 / 3 3 7、9 / 1 2 / 1 6 1 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 9 / 3 3 7、9 / 1 2 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 0 9 / 3 3 7 / 4 5 5、9 / 1 2 / 1 9 9 / 2 0 9 / 3 3 7 / 4 5 1 / 4 5 5、9 / 1 0 7 / 1 3 1 / 2 0 4 / 2 5 9 / 4 1 7 / 4 5 1、9 / 1 0 7 / 1 5 6 / 1 6 1 / 1 9 9 / 2 0 4 / 4 1 7 / 4 5 5、9 / 1 0 7 / 1 6 1 / 2 0 9 / 2 5 9 / 2 8 9 / 4 5 1 / 4 5 5、9 / 1 3 1 / 1 5 6 / 2 0 9 / 2 8 9 / 3 3 7、9 / 1 3 1 / 2 0 4 / 3 3 7 / 4 5 1、9 / 1 5 6 / 1 6 9 / 2 0 4 / 3 3 7、9 / 1 6 9 / 2 0 4 / 2 8 9 / 3 3 7 / 4 5 1 / 4 5 5、9 / 2 0 4、9 / 2 0 4 / 2 5 9 / 2 8 9、9 / 3 3 7、1 2 / 1 4 / 1 0 7 / 2 0 4 / 2 8 9 / 4 5 5、1 2 / 1 0 7 / 1 3 1 / 2 0 4 / 2 8 9 / 3 3 7 / 4 1 7 / 4 5 1 / 4 5 5、1 2 / 1 0 7 / 1 5 6 / 2 0 9 / 2 8 9 / 4 5 5、1 0 7 / 1 6 1 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 5 9 / 4 5 1、1 0 7 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 8 9、1 0 7 / 1 9 9 / 2 0 9 / 2 5 9 / 4 5 1 / 4 5 5、1 0 7 / 2 0 4、1 5 6 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 0 9 / 2 5 9 / 2 8 9、1 6 1 / 2 0 4 / 4 1 7、2 0 4 / 4 5 1 / 4 5 5、2 8 9、および4 5 1 / 4 5 5から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号5 2 0を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9 L / 1 2 Q / 1 0 7 C / 1 6 1 E / 1 9 9 S / 2 0 9 Y / 3 3 7 N、9 L / 1 2 Q / 1 6 1 E / 1 6 9 T / 1 9 9 S / 2 0 9 Y / 3 3 7 W、9 L / 1 2 Q / 1 9 9 S / 2 0 4 M / 2 0 9 Y / 3 3 7 N / 4 5 5 R、9 L / 1 2 Q / 1 9 9 S / 2 0 9 Y / 3 3 7 W / 4 5 1 E / 4 5 5 R、9 L / 1 0 7 C / 1 3 1 A / 2 0 4 M / 2 5 9 E / 4 1 7 V / 4 5 1 E、9 L / 1 0 7 C / 1 5 6 S / 1 6 1 E / 1 9 9 S / 2 0 4 M / 4 1 7 V / 4 5 5 R、9 L / 1 0 7 C / 1 6 1 E / 2 0 9 Y / 2 5 9 E / 2 8 9 A / 4 5 1 E / 4 5 5 R、9 L / 1 3 1 A / 1 5 6 S / 2 0 9 Y / 2 8 9 A / 3 3 7 N、9 L / 1 3 1 A / 2 0 4 M / 3 3 7 N / 4 5 1 E、9 L / 1 5 6 S / 1 6 9 T / 2 0 4 M / 3 3 7 N、9 L / 1 6 9 T / 2 0 4 M / 2 8 9 A / 3 3 7 W / 4 5 1 E / 4 5 5 R、9 L / 2 0 4 M、9 L / 2 0 4

10

20

30

40

50

M/259E/289A、9L/337W、12Q/14I/107C/204M/289A/455R、12Q/107C/131A/204M/289A/337W/417V/451E/455R、12Q/107C/156S/209Y/289A/455R、107C/161E/169T/199S/204M/259E/451E、107C/199S/204M/289A、107C/199S/209Y/259E/451E/455R、107C/204M、156S/169T/199S/204M/209Y/259E/289A、161E/204M/417V、204M/451E/455R、289A、および451E/455Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、V9L/R12Q/A107C/L161E/A199S/E209Y/S337N、V9L/R12Q/L161E/E169T/A199S/E209Y/S337W、V9L/R12Q/A199S/D204M/E209Y/S337N/S455R、V9L/R12Q/A199S/E209Y/S337W/Q451E/S455R、V9L/A107C/P131A/D204M/T259E/P417V/Q451E、V9L/A107C/C156S/L161E/A199S/D204M/P417V/S455R、V9L/A107C/L161E/E209Y/T259E/K289A/Q451E/S455R、V9L/P131A/C156S/E209Y/K289A/S337N、V9L/P131A/D204M/S337N/Q451E、V9L/C156S/E169T/D204M/S337N、V9L/E169T/D204M/K289A/S337W/Q451E/S455R、V9L/D204M、V9L/D204M/T259E/K289A、V9L/S337W、R12Q/V14I/A107C/D204M/K289A/S455R、R12Q/A107C/P131A/D204M/K289A/S337W/P417V/Q451E/S455R、R12Q/A107C/C156S/E209Y/K289A/S455R、A107C/L161E/E169T/A199S/D204M/T259E/Q451E、A107C/A199S/D204M/K289A、A107C/A199S/E209Y/T259E/Q451E/S455R、A107C/D204M、C156S/E169T/A199S/D204M/E209Y/T259E/K289A、L161E/D204M/P417V、D204M/Q451E/S455R、K289A、およびQ451E/S455Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、16M、53Q、54P、78V、80A、95W、111C、111G、111S、221A、257A、336R、349V、391R、410V、413L、426Sおよび430Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、16M、53Q、54P、78V、80A、95W、111C、111G、111S、221A、257A、336R、349V、391R、410V、413L、426Sおよび430Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9/12/199/204/209/337/455、9/131/156/209/289/337、9/204、12/14/107/204/289/455、107/161/169/199/204/259/451、107/199/204/289、および20

10

20

30

40

50

4 / 4 5 1 / 4 5 5 から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9 L / 1 2 Q / 1 9 9 S / 2 0 4 M / 2 0 9 Y / 3 3 7 N / 4 5 5 R、9 L / 1 3 1 A / 1 5 6 S / 2 0 9 Y / 2 8 9 A / 3 3 7 N、9 L / 2 0 4 M、1 2 Q / 1 4 I / 1 0 7 C / 2 0 4 M / 2 8 9 A / 4 5 5 R、1 0 7 C / 1 6 1 E / 1 6 9 T / 1 9 9 S / 2 0 4 M / 2 5 9 E / 4 5 1 E、1 0 7 C / 1 9 9 S / 2 0 4 M / 2 8 9 A、および2 0 4 M / 4 5 1 E / 4 5 5 R から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、V 9 L / R 1 2 Q / A 1 9 9 S / D 2 0 4 M / E 2 0 9 Y / S 3 3 7 N / S 4 5 5 R、V 9 L / P 1 3 1 A / C 1 5 6 S / E 2 0 9 Y / K 2 8 9 A / S 3 3 7 N、V 9 L / D 2 0 4 M、R 1 2 Q / V 1 4 I / A 1 0 7 C / D 2 0 4 M / K 2 8 9 A / S 4 5 5 R、A 1 0 7 C / L 1 6 1 E / E 1 6 9 T / A 1 9 9 S / D 2 0 4 M / T 2 5 9 E / Q 4 5 1 E、A 1 0 7 C / A 1 9 9 S / D 2 0 4 M / K 2 8 9 A、およびD 2 0 4 M / Q 4 5 1 E / S 4 5 5 R から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号520を基準にして番号が付けられている。

10

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、1 6、1 6 / 5 9 / 8 0 / 4 1 3、1 6 / 8 0、1 6 / 8 0 / 1 1 1、1 6 / 8 0 / 1 1 1 / 2 5 7、1 6 / 8 0 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 3 6 / 4 1 0、1 6 / 8 0 / 2 2 1 / 3 3 6 / 4 1 0、1 6 / 8 0 / 2 5 7、1 6 / 1 1 1 / 2 2 1、1 6 / 1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 9 1、1 6 / 2 2 1、1 6 / 2 2 1 / 2 5 7、1 6 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 3 6 / 3 9 1、1 6 / 2 2 1 / 4 1 0、1 6 / 2 5 7、1 6 / 2 5 7 / 3 3 6 / 4 1 3 / 4 2 0、8 0 / 1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 4 1 0、1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 3 6 / 3 9 1、1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 9 1、2 2 1、および2 2 1 / 2 5 7 から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、1 6 M、1 6 M / 5 9 Q / 8 0 A / 4 1 3 L、1 6 M / 8 0 A、1 6 M / 8 0 A / 1 1 1 C、1 6 M / 8 0 A / 1 1 1 S / 2 5 7 A、1 6 M / 8 0 A / 2 2 1 A / 2 5 7 A / 3 3 6 R / 4 1 0 V、1 6 M / 8 0 A / 2 2 1 A / 3 3 6 R / 4 1 0 V、1 6 M / 8 0 A / 2 5 7 A、1 6 M / 1 1 1 C / 2 2 1 A / 2 5 7 A / 3 9 1 R、1 6 M / 1 1 1 S / 2 2 1 A、1 6 M / 2 2 1 A、1 6 M / 2 2 1 A / 2 5 7 A、1 6 M / 2 2 1 A / 2 5 7 A / 3 3 6 R / 3 9 1 R、1 6 M / 2 2 1 A / 4 1 0 V、1 6 M / 2 5 7 A、1 6 M / 2 5 7 A / 3 3 6 R / 4 1 3 L / 4 2 0 G、8 0 A / 1 1 1 S / 2 2 1 A / 2 5 7 A / 4 1 0 V、1 1 1 S / 2 2 1 A / 2 5 7 A / 3 3 6 R / 3 9 1 R、1 1 1 S / 2 2 1 A / 2 5 7 A / 3 9 1 R、2 2 1 A、および2 2 1 A / 2 5 7 A から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、L 1 6 M、L 1 6 M / H 5 9 Q / T 8 0 A / V 4 1 3 L、L 1 6 M / T 8 0 A、L 1 6 M / T 8 0 A / T 1 1 1 C、L 1 6 M / T 8 0 A / T 1 1 1 S / L 2 5 7 A、L 1 6 M / T 8 0 A / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A / K 3 3 6 R / I 4 1 0 V、L 1 6 M / T 8 0 A / F 2 2 1 A / K 3 3 6 R / I 4 1 0 V、L 1 6 M / T 8 0 A / L 2 5 7 A、L 1 6 M / T 1 1 1 C / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A / L 3 9 1 R、L 1 6 M / T 1 1 1 S / F 2 2 1 A、L 1 6 M / F 2 2 1 A、L 1 6 M / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A、L 1 6 M / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A / K 3 3 6 R / L 3 9 1 R、L 1 6 M / F 2 2 1 A / I 4 1 0 V、L 1 6 M / L 2 5 7 A、L 1 6 M / L 2 5 7 A / K 3 3 6 R / V 4 1 3 L / E 4 2 0 G、T 8 0 A / T 1 1 1 S / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A / I 4 1 0 V、T 1 1 1 S / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A / K 3 3 6 R / L 3 9 1 R、T 1 1 1 S / F 2 2 1 A / L 2 5 7 A / L 3 9 1 R、F 2 2 1 A、およびF 2 2 1 A / L 2 5 7 A から選択される少なくとも1つの変異または変異のセッ

20

30

40

50

トを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、5、7、14、65、91、99、102、118、138、194、254、286、416、418および420から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、5L、5M、5N、5Q、7L、14L、65V、91V、99L、99S、102R、118S、118V、138I、194P、254G、254T、254V、286L、416E、418Dおよび420Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S5L、S5M、S5N、S5Q、T7L、V14L、I65V、Q91V、E99L、E99S、K102R、A118S、A118V、L138I、S194P、S254G、S254T、S254V、V286L、D416E、E418DおよびE420Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、16/80/221/257/336/410、16/111/221、16/221/257、16/221/410、16/257、80/111/221/257/410、および221から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、16M/80A/221A/257A/336R/410V、16M/111S/221A、16M/221A/257A、16M/221A/410V、16M/257A、80A/111S/221A/257A/410V、および221Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、L16M/T80A/F221A/L257A/K336R/I410V、L16M/T111S/F221A、L16M/F221A/L257A、L16M/F221A/I410V、L16M/L257A、T80A/T111S/F221A/L257A/I410V、およびF221Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号626を基準にして番号が付けられている。

【0016】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、5、5/14/99、5/14/416、5/91、5/91/102/118、5/91/102/254/418、5/91/106/254/286、5/91/118/194/254/286、5/91/118/194/254/418、5/91/118/194/418、5/91/118/254/286/418、5/91/118/286、5/91/194/254、5/91/194/418、5/91/254、5/91/254/286、5/102/418、5/118/194/286/418、5/118/254、5/118/286、5/194、5/254/286、5/418、7/14、7/14/65/99、7/14/99/416、14、14/65/99/416、14/99、14/99/254、14/99/254/416、14/99/254/416/455、14/99/416、14/167、14/254、14/455、91、91/102/194、91/118、91/118/194、91/118/194/286、91/118/194/418、91/118/286、91/194/254/286、91/286、および118/286/418から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号678を基準にして番号が付けられている。

10

20

30

40

50

【0017】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、5L/14L/99L、5L/14L/416E、5N、5N/91V、5N/91V/102R/118V、5N/91V/102R/254T/418D、5N/91V/106I/254T/286L、5N/91V/118S/194P/254T/418D、5N/91V/118S/254T/286L/418D、5N/91V/118S/286L、5N/91V/118V/194P/254T/286L、5N/91V/118V/194P/418D、5N/91V/194P/254T、5N/91V/194P/418D、5N/91V/254T、5N/91V/254T/286L、5N/102R/418D、5N/118S/194P/286L/418D、5N/118S/286L、5N/118V/254T、5N/194P、5N/254T/286L、5N/418D、7L/14L、7L/14L/65V/99L、7L/14L/99S/416E、14L、14L/65V/99L/416E、14L/99L、14L/99L/254G、14L/99L/254G/416E、14L/99L/254G/416E/455R、14L/99L/416E、14L/99S/416E、14L/167E、14L/254G、14L/455R、91V、91V/102R/194P、91V/118V、91V/118V/194P、91V/118V/194P/286L、91V/118V/194P/418D、91V/118V/286L、91V/194P/254T/286L、91V/286L、および118V/286L/418Dから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号678を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S5L/V14L/E99L、S5L/V14L/D416E、S5N、S5N/Q91V、S5N/Q91V/K102R/A118V、S5N/Q91V/K102R/S254T/E418D、S5N/Q91V/S106I/S254T/V286L、S5N/Q91V/A118S/S194P/S254T/E418D、S5N/Q91V/A118S/S254T/V286L/E418D、S5N/Q91V/A118S/V286L、S5N/Q91V/A118V/S194P/S254T/V286L、S5N/Q91V/A118V/S194P/E418D、S5N/Q91V/S194P/S254T、S5N/Q91V/S194P/E418D、S5N/Q91V/S254T、S5N/Q91V/S254T/V286L、S5N/K102R/E418D、S5N/A118S/S194P/V286L/E418D、S5N/A118S/V286L、S5N/A118V/S254T、S5N/S194P、S5N/S254T/V286L、S5N/E418D、T7L/V14L、T7L/V14L/I65V/E99L、T7L/V14L/E99S/D416E、V14L、V14L/I65V/E99L/D416E、V14L/E99L、V14L/E99L/S254G、V14L/E99L/S254G/D416E、V14L/E99L/S254G/D416E/S455R、V14L/E99L/D416E、V14L/E99S/D416E、V14L/D167E、V14L/S254G、V14L/S455R、Q91V、Q91V/K102R/S194P、Q91V/A118V、Q91V/A118V/S194P、Q91V/A118V/S194P/V286L、Q91V/A118V/S194P/E418D、Q91V/A118V/V286L、Q91V/S194P/S254T/V286L、Q91V/V286L、およびA118V/V286L/E418Dから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号678を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、5/91/106/254/286、5/91/118/286、5/91/254/286、14、14/65/99/416、14/99、および14/99/254から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号678を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配

10

20

30

40

50

列は、5 N / 9 1 V / 1 0 6 I / 2 5 4 T / 2 8 6 L、5 N / 9 1 V / 1 1 8 S / 2 8 6 L、5 N / 9 1 V / 2 5 4 T / 2 8 6 L、1 4 L、1 4 L / 6 5 V / 9 9 L / 4 1 6 E、1 4 L / 9 9 L、および 1 4 L / 9 9 L / 2 5 4 G から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 6 7 8 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S 5 N / Q 9 1 V / S 1 0 6 I / S 2 5 4 T / V 2 8 6 L、S 5 N / Q 9 1 V / A 1 1 8 S / V 2 8 6 L、S 5 N / Q 9 1 V / S 2 5 4 T / V 2 8 6 L、V 1 4 L、V 1 4 L / I 6 5 V / E 9 9 L / D 4 1 6 E、V 1 4 L / E 9 9 L、および V 1 4 L / E 9 9 L / S 2 5 4 G から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 6 7 8 を基準にして番号が付けられている。

10

【0018】

本発明は、配列番号 1 2 に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたグリコシルトランスフェラーゼも提供する。一部の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、1 6、1 6 / 1 2 7 / 1 6 9、1 6 / 1 3 4、1 6 / 1 4 3 / 4 2 3、1 6 / 1 6 9、1 6 / 1 6 9 / 3 9 8 / 3 9 9、1 6 / 1 6 9 / 4 2 3、1 6 / 3 9 8、1 6 / 3 9 8 / 3 9 9、1 6 / 3 9 8 / 4 2 7、1 6 / 4 2 3、1 6 / 4 2 3 / 4 2 7、1 3 4、1 4 3、3 9 9 / 4 2 3、および 4 2 3 / 4 2 7 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 4 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、1 6 T、1 6 T / 1 2 7 V / 1 6 9 E、1 6 T / 1 3 4 S、1 6 T / 1 4 3 G / 4 2 3 L、1 6 T / 1 6 9 E、1 6 T / 1 6 9 E / 3 9 8 M / 3 9 9 K、1 6 T / 1 6 9 E / 4 2 3 L、1 6 T / 3 9 8 M、1 6 T / 3 9 8 M / 3 9 9 K、1 6 T / 3 9 8 M / 4 2 7 S、1 6 T / 4 2 3 L、1 6 T / 4 2 3 L / 4 2 7 S、1 3 4 S、1 4 3 G、3 9 9 K / 4 2 3 L、および 4 2 3 L / 4 2 7 S から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 4 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、L 1 6 T、L 1 6 T / Q 1 2 7 V / P 1 6 9 E、L 1 6 T / A 1 3 4 S、L 1 6 T / P 1 4 3 G / R 4 2 3 L、L 1 6 T / P 1 6 9 E、L 1 6 T / P 1 6 9 E / A 3 9 8 M / Q 3 9 9 K、L 1 6 T / P 1 6 9 E / R 4 2 3 L、L 1 6 T / A 3 9 8 M、L 1 6 T / A 3 9 8 M / Q 3 9 9 K、L 1 6 T / A 3 9 8 M / R 4 2 7 S、L 1 6 T / R 4 2 3 L、L 1 6 T / R 4 2 3 L / R 4 2 7 S、A 1 3 4 S、P 1 4 3 G、Q 3 9 9 K / R 4 2 3 L、および R 4 2 3 L / R 4 2 7 S から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 4 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3、8、1 1、4 1、4 4、5 6、6 0、1 2 2、1 3 5、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 5 8、1 6 4、1 7 6、2 2 1、2 3 2、2 3 3、2 3 5、2 4 8、2 4 9、2 8 1、2 8 4、2 8 5、3 0 1、3 2 2、3 7 2、3 9 2、4 0 0、4 2 1、4 2 6、4 2 7、4 3 3、4 4 0、4 4 3 および 4 4 6 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 4 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3 I、3 V、8 R、1 1 L、1 1 P、4 1 M、4 4 E、5 6 A、6 0 T、1 2 2 C、1 3 5 V、1 3 7 T、1 3 8 K、1 3 8 R、1 3 9 T、1 5 8 H、1 5 8 V、1 6 4 A、1 6 4 E、1 6 4 N、1 6 4 Q、1 6 4 S、1 7 6 S、2 2 1 D、2 3 2 A、2 3 3 S、2 3 3 T、2 3 5 L、2 3 5 M、2 4 8 M、2 4 9 R、2 8 1 S、2 8 4 V、2 8 5 A、3 0 1 G、3 2 2 R、3 7 2 S、3 9 2 V、4 0 0 C、4 2 1 A、4 2 1 G、4 2 6 S、4 2 7 A、4 2 7 W、4 3 3 G、4 3 3 T、4 4 0 L、4 4 0 M、4 4 3 G、4 4 3 H、および 4 4 6 L から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 4 を基準にして番号が付けられてい

20

30

40

50

る。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、H3I、H3V、V8R、Q11L、Q11P、F41M、Y44E、K56A、P60T、L122C、L135V、Q137T、G138K、G138R、I139T、F158H、F158V、H164A、H164E、H164N、H164Q、H164S、R176S、E221D、P232A、P233S、P233T、Q235L、Q235M、I248M、D249R、G281S、L284V、S285A、Q301G、L322R、A372S、I392V、V400C、S421A、S421G、A426S、R427A、R427W、N433G、N433T、I440L、I440M、C443G、C443H、およびR446Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号24を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、16、16/127/169、および16/169から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号24を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、16T、16T/127V/169E、および16T/169Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号24を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、L16T、L16T/Q127V/P169E、およびL16T/P169Eから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号24を基準にして番号が付けられている。

【0019】

一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3/22/198/421、3/22/421、3/201/248/322、3/201/248/322/392、13/233/331/440、13/440/443、22/32/56/60/198/248/322/392/421、22/56、22/56/137/198/201/248/322/392、22/56/137/198/248/392/421、22/56/137/322、22/56/137/322/392/423、22/56/198/202/248、22/56/198/248/322/392/421、22/56/198/248/421/423、22/56/421/423、22/60/392/421、22/137、22/137/198/202/248、22/198/202/248/392、22/248/392、22/392、22/421、22/421/423、22/423、44/164/233、44/164/233/329/331、44/331、125、125/233/443/446、164/221/233/331/440/446、164/233/331/440、164/233/446、164/331、164/440、164/443、198/202/392、221/329/331、233、233/446、329、421/423、および443/446から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号858を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3I/22G/198Q/421G、3I/22G/421G、3I/201A/248M/322R、3I/201A/248M/322R/392V、13Q/233S/331V/440M、13Q/440M/443G、22G/32L/56A/60T/198Q/248M/322R/392V/421G、22G/56A、22G/56A/137T/198Q/201A/248M/322R/392V、22G/56A/137T/198Q/248M/392V/421G、22G/56A/137T/322R、22G/56A/137T/322R/392V/423L、22G/56A/198Q/202Y/248M、22G/56A/198Q/248M/322R/392V/421G、22G/56A/198Q/248M/421G/423L、22G/56A/421G/423L、22G/6

O T / 3 9 2 V / 4 2 1 G、2 2 G / 1 3 7 T、2 2 G / 1 3 7 T / 1 9 8 Q / 2 0 2 Y / 2 4 8 M、2 2 G / 1 9 8 Q / 2 0 2 Y / 2 4 8 M / 3 9 2 V、2 2 G / 2 4 8 M / 3 9 2 V、2 2 G / 3 9 2 V、2 2 G / 4 2 1 G、2 2 G / 4 2 1 G / 4 2 3 L、2 2 G / 4 2 3 L、4 4 E / 1 6 4 A / 2 3 3 S、4 4 E / 1 6 4 E / 2 3 3 S、4 4 E / 1 6 4 E / 2 3 3 S / 3 2 9 L / 3 3 1 V、4 4 E / 3 3 1 V、1 2 5 L、1 2 5 L / 2 3 3 S / 4 4 3 G / 4 4 6 L、1 6 4 A / 2 3 3 S / 4 4 6 L、1 6 4 A / 3 3 1 V、1 6 4 A / 4 4 0 M、1 6 4 A / 4 4 3 G、1 6 4 E / 2 2 1 D / 2 3 3 S / 3 3 1 V / 4 4 0 M / 4 4 6 L、1 6 4 E / 2 3 3 S / 3 3 1 V / 4 4 0 M、1 9 8 Q / 2 0 2 Y / 3 9 2 V、2 2 1 D / 3 2 9 L / 3 3 1 V、2 3 3 S、2 3 3 S / 4 4 6 L、3 2 9 L、4 2 1 G / 4 2 3 L、および 4 4 3 G / 4 4 6 L から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 8 5 8 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、H 3 I / A 2 2 G / G 1 9 8 Q / S 4 2 1 G、H 3 I / A 2 2 G / S 4 2 1 G、H 3 I / G 2 0 1 A / I 2 4 8 M / L 3 2 2 R、H 3 I / G 2 0 1 A / I 2 4 8 M / L 3 2 2 R / I 3 9 2 V、L 1 3 Q / P 2 3 3 S / I 3 3 1 V / I 4 4 0 M、L 1 3 Q / I 4 4 0 M / C 4 4 3 G、A 2 2 G / I 3 2 L / K 5 6 A / P 6 0 T / G 1 9 8 Q / I 2 4 8 M / L 3 2 2 R / I 3 9 2 V / S 4 2 1 G、A 2 2 G / K 5 6 A、A 2 2 G / K 5 6 A / Q 1 3 7 T / G 1 9 8 Q / G 2 0 1 A / I 2 4 8 M / L 3 2 2 R / I 3 9 2 V、A 2 2 G / K 5 6 A / Q 1 3 7 T / G 1 9 8 Q / I 2 4 8 M / I 3 9 2 V / S 4 2 1 G、A 2 2 G / K 5 6 A / Q 1 3 7 T / L 3 2 2 R、A 2 2 G / K 5 6 A / Q 1 3 7 T / L 3 2 2 R / I 3 9 2 V / R 4 2 3 L、A 2 2 G / K 5 6 A / G 1 9 8 Q / I 2 0 2 Y / I 2 4 8 M、A 2 2 G / K 5 6 A / G 1 9 8 Q / I 2 4 8 M / L 3 2 2 R / I 3 9 2 V / S 4 2 1 G、A 2 2 G / K 5 6 A / G 1 9 8 Q / I 2 4 8 M / S 4 2 1 G / R 4 2 3 L、A 2 2 G / K 5 6 A / S 4 2 1 G / R 4 2 3 L、A 2 2 G / P 6 0 T / I 3 9 2 V / S 4 2 1 G、A 2 2 G / Q 1 3 7 T、A 2 2 G / Q 1 3 7 T / G 1 9 8 Q / I 2 0 2 Y / I 2 4 8 M、A 2 2 G / G 1 9 8 Q / I 2 0 2 Y / I 2 4 8 M / I 3 9 2 V、A 2 2 G / I 2 4 8 M / I 3 9 2 V、A 2 2 G / I 3 9 2 V、A 2 2 G / S 4 2 1 G、A 2 2 G / S 4 2 1 G / R 4 2 3 L、A 2 2 G / R 4 2 3 L、Y 4 4 E / H 1 6 4 A / P 2 3 3 S、Y 4 4 E / H 1 6 4 E / P 2 3 3 S、Y 4 4 E / H 1 6 4 E / P 2 3 3 S / A 3 2 9 L / I 3 3 1 V、Y 4 4 E / I 3 3 1 V、F 1 2 5 L、F 1 2 5 L / P 2 3 3 S / C 4 4 3 G / R 4 4 6 L、H 1 6 4 A / P 2 3 3 S / R 4 4 6 L、H 1 6 4 A / I 3 3 1 V、H 1 6 4 A / I 4 4 0 M、H 1 6 4 A / C 4 4 3 G、H 1 6 4 E / E 2 2 1 D / P 2 3 3 S / I 3 3 1 V / I 4 4 0 M / R 4 4 6 L、H 1 6 4 E / P 2 3 3 S / I 3 3 1 V / I 4 4 0 M、G 1 9 8 Q / I 2 0 2 Y / I 3 9 2 V、E 2 2 1 D / A 3 2 9 L / I 3 3 1 V、P 2 3 3 S、P 2 3 3 S / R 4 4 6 L、A 3 2 9 L、S 4 2 1 G / R 4 2 3 L、および C 4 4 3 G / R 4 4 6 L から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 8 5 8 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、3 I / 2 2 G / 1 9 8 Q / 4 2 1 G、1 3 Q / 4 4 0 M / 4 4 3 G、2 2 G / 5 6 A / 1 9 8 Q / 2 0 2 Y / 2 4 8 M、2 2 G / 1 3 7 T、2 2 G / 1 9 8 Q / 2 0 2 Y / 2 4 8 M / 3 9 2 V、1 6 4 E / 2 2 1 D / 2 3 3 S / 3 3 1 V / 4 4 0 M / 4 4 6 L、1 6 4 E / 2 3 3 S / 3 3 1 V / 4 4 0 M、および 2 3 3 S / 4 4 6 L から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 8 5 8 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、H 3 I / A 2 2 G / G

10

20

30

40

50

198Q/S421G、L13Q/I440M/C443G、A22G/K56A/G198Q/I202Y/I248M、A22G/Q137T、A22G/G198Q/I202Y/I248M/I392V、H164E/E221D/P233S/I331V/I440M/R446L、H164E/P233S/I331V/I440M、およびP233S/R446Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号858を基準にして番号が付けられている。

【0020】

一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、83/202/233、164、164/202、164/202/233/331、164/202/248/272、164/202/331、164/202/331/423、164/423、202/233、202/233/248、202/233/248/423、202/248、202/331、202/421/423、202/423、202/446、233、248、および423から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号994を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、83Y/202I/233S、164E、164E/202I、164E/202I/233S/331V、164E/202I/248I/272C、164E/202I/331V、164E/202I/331V/423L、164E/423L、202I/233S、202I/233S/248I、202I/233S/248I/423L、202I/248I、202I/331V、202I/421G/423L、202I/423L、202I/446L、233S、248I、および423Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号994を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、H83Y/Y202I/P233S、H164E、H164E/Y202I、H164E/Y202I/P233S/I331V、H164E/Y202I/M248I/R272C、H164E/Y202I/I331V、H164E/Y202I/I331V/R423L、H164E/R423L、Y202I/P233S、Y202I/P233S/M248I、Y202I/P233S/M248I/R423L、Y202I/M248I、Y202I/I331V、Y202I/S421G/R423L、Y202I/R423L、Y202I/R446L、P233S、M248I、およびR423Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号994を基準にして番号が付けられている。一部の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、7、9、10、54、73、84、106、115、116、132、165、286、309、389、406、422および438から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号994を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、7T、9L、10P、54L、54M、73R、73S、84L、106S、115A、116I、132R、165P、286G、309E、389E、406H、406M、406Q、422A、422T、422V、438A、および438Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号994を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、83/202/233、164、164/202、

10

20

30

40

50

1 6 4 / 4 2 3、2 0 2 / 2 3 3 / 2 4 8、および 2 3 3 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 9 9 4 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、8 3 Y / 2 0 2 I / 2 3 3 S、1 6 4 E、1 6 4 E / 2 0 2 I、1 6 4 E / 4 2 3 L、2 0 2 I / 2 3 3 S / 2 4 8 I、および 2 3 3 S から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 9 9 4 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、H 8 3 Y / Y 2 0 2 I / P 2 3 3 S、H 1 6 4 E、H 1 6 4 E / Y 2 0 2 I、H 1 6 4 E / R 4 2 3 L、Y 2 0 2 I / P 2 3 3 S / M 2 4 8 I、および P 2 3 3 S から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 9 9 4 を基準にして番号が付けられている。

10

【0 0 2 1】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、7 / 9 / 7 3 / 1 6 5 / 2 8 6、7 / 9 / 1 6 5 / 2 8 6、7 / 9 / 4 2 2、7 / 1 1 6 / 1 6 5 / 2 8 6、7 / 1 6 5、9 / 7 3 / 1 1 6 / 1 6 5 / 2 8 6 / 4 2 2、9 / 2 8 6 / 3 8 9、5 4、5 4 / 8 4、5 4 / 4 0 6、7 3、7 3 / 1 1 6 / 1 6 5 / 2 8 6 / 3 8 9、7 3 / 1 1 6 / 2 8 6、7 3 / 1 1 6 / 2 8 6 / 4 2 2、7 3 / 1 6 5 / 2 8 6、7 3 / 2 8 6 / 3 8 9、7 3 / 2 8 6 / 4 2 2、7 3 / 4 2 2、8 4、1 1 5、1 1 6、1 1 6 / 1 6 5、1 1 6 / 1 6 5 / 2 8 6 / 4 2 2、1 1 6 / 3 8 9、1 6 5、1 6 5 / 2 8 6、1 6 5 / 3 8 9、1 6 5 / 3 8 9 / 4 2 2、2 8 6、2 8 6 / 4 2 2、3 8 9 / 4 2 2、および 4 2 2 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 1 0 8 0 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、7 T / 9 L / 7 3 R / 1 6 5 P / 2 8 6 G、7 T / 9 L / 1 6 5 P / 2 8 6 G、7 T / 9 L / 4 2 2 A、7 T / 1 1 6 I / 1 6 5 P / 2 8 6 G、7 T / 1 6 5 P、9 L / 7 3 R / 1 1 6 I / 1 6 5 P / 2 8 6 G / 4 2 2 A、9 L / 2 8 6 G / 3 8 9 E、5 4 L / 8 4 L、5 4 M、5 4 M / 4 0 6 M、7 3 R、7 3 R / 1 1 6 I / 1 6 5 P / 2 8 6 G / 3 8 9 E、7 3 R / 1 1 6 I / 2 8 6 G、7 3 R / 1 1 6 I / 2 8 6 G / 4 2 2 A、7 3 R / 1 6 5 P / 2 8 6 G、7 3 R / 2 8 6 G / 3 8 9 E、7 3 R / 2 8 6 G / 4 2 2 A、7 3 R / 2 8 6 G / 4 2 2 T、7 3 R / 4 2 2 T、8 4 L、1 1 5 A、1 1 6 I、1 1 6 I / 1 6 5 P、1 1 6 I / 1 6 5 P / 2 8 6 G / 4 2 2 A、1 1 6 I / 3 8 9 E、1 6 5 P、1 6 5 P / 2 8 6 G、1 6 5 P / 3 8 9 E、1 6 5 P / 3 8 9 E / 4 2 2 T、2 8 6 G、2 8 6 G / 4 2 2 A、3 8 9 E / 4 2 2 A、および 4 2 2 T から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 1 0 8 0 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、G 7 T / S 9 L / A 7 3 R / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G、G 7 T / S 9 L / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G、G 7 T / S 9 L / K 4 2 2 A、G 7 T / L 1 1 6 I / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G、G 7 T / E 1 6 5 P、S 9 L / A 7 3 R / L 1 1 6 I / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G / K 4 2 2 A、S 9 L / N 2 8 6 G / D 3 8 9 E、S 5 4 L / Y 8 4 L、S 5 4 M、S 5 4 M / S 4 0 6 M、A 7 3 R、A 7 3 R / L 1 1 6 I / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G / D 3 8 9 E、A 7 3 R / L 1 1 6 I / N 2 8 6 G、A 7 3 R / L 1 1 6 I / N 2 8 6 G / K 4 2 2 A、A 7 3 R / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G、A 7 3 R / N 2 8 6 G / D 3 8 9 E、A 7 3 R / N 2 8 6 G / K 4 2 2 A、A 7 3 R / N 2 8 6 G / K 4 2 2 T、A 7 3 R / K 4 2 2 T、Y 8 4 L、N 1 1 5 A、L 1 1 6 I、L 1 1 6 I / E 1 6 5 P、L 1 1 6 I / E 1 6 5 P / N 2 8 6 G / K 4 2 2 A、L 1 1 6 I / D 3 8 9 E、E 1 6 5 P、E 1 6 5 P / N 2 8 6 G、E 1 6 5 P / D 3 8 9 E、E 1 6 5 P / D 3 8 9 E / K 4 2 2 T、N 2 8 6 G、N 2 8 6 G / K 4 2 2 A、D 3 8 9 E / K 4 2 2 A、および K 4 2 2 T から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 1 0 8 0 を基準にして番号が付けられている。

20

30

40

50

。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、185／190、219、220、255、257、302、385、395、395／437、399、401、409、412、416、434、441、445、447および449から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1080を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、185L／190P、219L、220A、255R、257H、302A、302H、302L、302R、302T、385M、385P、385S、395A、395D、395H、395N、395S／437L、399R、401V、409L、412K、416N、434I、441A、441K、441L、441R、441S、445K、445R、447A、447R、447S、447V、449A、449H、および449Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1080を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、F185L／T190P、C219L、T220A、P255R、N257H、N302A、N302H、N302L、N302R、N302T、V385M、V385P、V385S、G395A、G395D、G395H、G395N、G395S／E437L、Q399R、L401V、T409L、I412K、K416N、A434I、Q441A、Q441K、Q441L、Q441R、Q441S、N445K、N445R、N447A、N447R、N447S、N447V、Y449A、Y449H、およびY449Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1080を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9／73／116／165／286／422、54、54／84、54／406、73／116／286／422、116／165／286／422、および286／422から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1080を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、9L／73R／116I／165P／286G／422A、54L／84L、54M、54M／406M、73R／116I／286G／422A、116I／165P／286G／422A、および286G／422Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1080を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S9L／A73R／L116I／E165P／N286G／K422A、S54L／Y84L、S54M、S54M／S406M、A73R／L116I／N286G／K422A、L116I／E165P／N286G／K422A、およびN286G／K422Aから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1080を基準にして番号が付けられている。

【0022】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、54、54／185／190、54／185／190／219／257／302／385／389／395／445／447／449、54／185／190／219／385、54／185／190／219／385／389／395／399／441／445／447／449、54／185／190／219／385／395／399／441／445／447／449、54／185／190／219／385／445／447、54／185／190／219／389／395／399／441／445／447／449、54／185／190／302、54／185／190／302／395／399、54／185／190／385／447／449、54／185／190／389／395、54／185／190／389／441／445／447／449、54／185／190／389／445、54／185／190／395／399／441

/ 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 8 5 / 2 1 9 / 3 8 9、5 4 / 1 8 5 / 2 5 7 / 3
 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 8 5 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4
 5 / 4 4 7、5 4 / 1 8 5 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 9、5 4 /
 1 8 5 / 3 8 5 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 8 5 / 3 8 9 / 3
 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 0 2、5 4 / 1 9 0 / 2 1 9
 / 2 5 7 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7、5 4 / 1 9 0 / 2
 5 7 / 3 0 2 / 3 9 9、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 0 9 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9
 9 / 4 4 5、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 9 5 /
 4 4 5 / 4 4 9、5 4 / 1 9 0 / 3 0 2 / 3 8 9、5 4 / 1 9 0 / 3 0 2 / 3 8 9 / 3 9
 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 1 9 0 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5
 、5 4 / 1 9 0 / 3 8 5 / 3 9 5、5 4 / 1 9 0 / 3 8 5 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5
 4 / 1 9 0 / 3 9 5、5 4 / 1 9 0 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 2 1 9 / 3 0 2 /
 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 2 1 9 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4
 4 5 / 4 4 7、5 4 / 2 5 7、5 4 / 2 5 7 / 3 8 5 / 4 4 9、5 4 / 2 5 7 / 3 8 9、
 5 4 / 2 5 7 / 3 9 9、5 4 / 2 5 7 / 4 4 1 / 4 4 7、5 4 / 2 5 7 / 4 4 1 / 4 4 9
 、5 4 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3
 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 9、5 4 / 3 8 5、5 4 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5
 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 7 / 4 4 9、1 8 5 / 1 9 0 /
 2 1 9 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 0 2 /
 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 9、
 1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 /
 3 8 9 / 3 9 5、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 7 /
 4 4 9、1 8 5 / 1 9 0 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 /
 3 8 9 / 4 4 7 / 4 4 9、1 8 5 / 1 9 0 / 3 9 5 / 3 9 9、1 8 5 / 2 1 9 / 2 5 7 /
 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、
 1 8 5 / 3 0 2 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、1 8 5 / 3 9 5 /
 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4 4 1 /
 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、1 9 0 / 2 1 9 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4 5、1 9 0 /
 2 5 7 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 9、1 9 0 /
 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4 4 5 / 4 4 7、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 9 5、1 9 0 /
 2 5 7 / 3 8 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 /
 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 9 0 / 2 5 7 / 3 9 9 / 4 4 7 / 4 4 9、1 9 0 / 3 0 2 /
 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 9 0 / 3 8 9、2 1 9 /
 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 7 / 4 4 9、2 1 9 / 2 5 7 / 3 9 5、
 2 1 9 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 9、2 1 9 / 3 9 5、2 5 7 / 3 8 5 /
 3 8 9 / 3 9 9、2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、2 5 7 / 3 8 9 /
 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 9、2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 9、3 0 2 / 3 8 9 / 3 9 5 /
 4 4 5、3 8 5 / 3 8 9、3 8 5 / 3 9 5、3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、3 9 5 /
 3 9 9、および 3 9 9 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異また
 は変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 1 2 1 6 を基準にして番号が付けられ
 ている。

【0 0 2 3】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド
 配列は、5 4 M、5 4 M / 1 8 5 L / 1 9 0 P、5 4 M / 1 8 5 L / 1 9 0 P / 2 1 9 L
 / 2 5 7 H / 3 0 2 R / 3 8 5 P / 3 8 9 E / 3 9 5 H / 4 4 5 K / 4 4 7 A / 4 4 9 H
 、5 4 M / 1 8 5 L / 1 9 0 P / 2 1 9 L / 3 8 5 P / 4 4 5 R / 4 4 7 A、5 4 M / 1
 8 5 L / 1 9 0 P / 2 1 9 L / 3 8 5 S、5 4 M / 1 8 5 L / 1 9 0 P / 2 1 9 L / 3 8
 5 S / 3 8 9 E / 3 9 5 D / 3 9 9 R / 4 4 1 R / 4 4 5 R / 4 4 7 A / 4 4 9 H、5 4
 M / 1 8 5 L / 1 9 0 P / 2 1 9 L / 3 8 5 S / 3 9 5 A / 3 9 9 R / 4 4 1 R / 4 4 5
 K / 4 4 7 A / 4 4 9 H、5 4 M / 1 8 5 L / 1 9 0 P / 2 1 9 L / 3 8 9 E / 3 9 5 H

/399R/441S/445K/447A/449H、54M/185L/190P/
302H、54M/185L/190P/302R/395H/399R、54M/18
5L/190P/385P/447A/449H、54M/185L/190P/389
E/395H、54M/185L/190P/389E/441R/445R/447A
/449H、54M/185L/190P/389E/445K、54M/185L/1
90P/395D/399R/441R/445K/447A/449H、54M/18
5L/219L/389E、54M/185L/257H/389E/441S/445
R/447A/449H、54M/185L/302H/385S/399R/445R
/447A、54M/185L/385S/389E/395D/441R/445K/
449H、54M/185L/385S/395D/399R/445R/447A/4
49H、54M/185L/389E/395D/445K/447A、54M/190
P/219L/257H/302H、54M/190P/219L/257H/395H
/445R/447A/449H、54M/190P/257H、54M/190P/2
57H/302H/399R、54M/190P/257H/309N/385S/38
9E/395D/399R/445K、54M/190P/257H/385S/389
E、54M/190P/257H/395D/445K/449H、54M/190P/
302H/389E/395D/399R/445K/447S、54M/190P/3
02R/389E、54M/190P/385P/395D、54M/190P/385
P/445R/447A/449H、54M/190P/385S/389E/395H
/441S/445R、54M/190P/395A、54M/190P/395H/4
45K/447A、54M/219L/302R/395H/441S/445R/44
7A、54M/219L/385P/389E/395D/441R/445K/447
A、54M/257H、54M/257H/385S/449H、54M/257H/3
89E、54M/257H/399R、54M/257H/441R/447A、54M
/257H/441R/449H、54M/302H/385P/399R/441S/
445K/447S、54M/302H/385S/399R/441S/445R/4
49H、54M/385P、54M/385P/389E/441R/445K/447
A/449H、54M/389E/395D/399R/447A/449H、185L
/190P/219L/257H/389E/395A/445K/447A、185L
/190P/257H/302R/395D/441S/445R/447S、185L
/190P/257H/385P/389E/399R、185L/190P/257H
/385P/399R/445R/447A、185L/190P/257H/389E
/395A、185L/190P/257H/389E/395H/399R/441S
/447S/449H、185L/190P/385S/389E/441R/445K
/447S、185L/190P/389E/447S/449H、185L/190P
/395D/399R、185L/190P/395H/399R、185L/219L
/257H/399R/445R/447A、185L/257H/385S/395A
/399R/445R/447A、185L/302R/395H/399R/441R
/445K/447S/449H、185L/395D/399R/441R/445R
/447A、190P/219L/257H/385S/389E/441S/445R
/447A/449H、190P/219L/302H/385P/399R/445R
、190P/257H/302H/385P/399R、190P/257H/385P
/389E/399R、190P/257H/385S/389E/445K/447A
、190P/257H/385S/395D、190P/257H/385S/441S
/445R/447S/449H、190P/257H/389E/395H/441R
/445R/447A、190P/257H/399R/447A/449H、190P
/302H/385P/389E/395D/399R/441S/445K/447S
、190P/389E、219L/257H/385S/389E/395D/441R
/447A/449H、219L/257H/395H、219L/385S/389E
/399R/445R/449H、219L/395H、257H/385P/389E

10

20

30

40

50

／399R、257H／389E／395D／399R／445K／447A、257H
／389E／395D／399R／445K／449H、257H／389E／399R
、302H／389E／395H／445R、385S／389E、385S／395D
、389E／395D／445R／447S、395D／399R、および399Rから
選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号
1216を基準にして番号が付けられている。

【0024】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド
配列は、S54M、S54M／F185L／T190P、S54M／F185L／T19
0P／C219L／N257H／N302R／V385P／D389E／G395H／N
445K／N447A／Y449H、S54M／F185L／T190P／C219L／
V385P／N445R／N447A、S54M／F185L／T190P／C219L
／V385S、S54M／F185L／T190P／C219L／V385S／D389
E／G395D／Q399R／Q441R／N445R／N447A／Y449H、S5
4M／F185L／T190P／C219L／V385S／G395A／Q399R／Q
441R／N445K／N447A／Y449H、S54M／F185L／T190P／
C219L／D389E／G395H／Q399R／Q441S／N445K／N447
A／Y449H、S54M／F185L／T190P／N302H、S54M／F185
L／T190P／N302R／G395H／Q399R、S54M／F185L／T19
0P／V385P／N447A／Y449H、S54M／F185L／T190P／D3
89E／G395H、S54M／F185L／T190P／D389E／Q441R／N
445R／N447A／Y449H、S54M／F185L／T190P／D389E／
N445K、S54M／F185L／T190P／G395D／Q399R／Q441R
／N445K／N447A／Y449H、S54M／F185L／C219L／D389
E、S54M／F185L／N257H／D389E／Q441S／N445R／N44
7A／Y449H、S54M／F185L／N302H／V385S／Q399R／N4
45R／N447A、S54M／F185L／V385S／D389E／G395D／Q
441R／N445K／Y449H、S54M／F185L／V385S／G395D／
Q399R／N445R／N447A／Y449H、S54M／F185L／D389E
／G395D／N445K／N447A、S54M／T190P／C219L／N257
H／N302H、S54M／T190P／C219L／N257H／G395H／N44
5R／N447A／Y449H、S54M／T190P／N257H、S54M／T19
0P／N257H／N302H／Q399R、S54M／T190P／N257H／K3
09N／V385S／D389E／G395D／Q399R／N445K、S54M／T
190P／N257H／V385S／D389E、S54M／T190P／N257H／
G395D／N445K／Y449H、S54M／T190P／N302H／D389E
／G395D／Q399R／N445K／N447S、S54M／T190P／N302
R／D389E、S54M／T190P／V385P／G395D、S54M／T190
P／V385P／N445R／N447A／Y449H、S54M／T190P／V38
5S／D389E／G395H／Q441S／N445R、S54M／T190P／G3
95A、S54M／T190P／G395H／N445K／N447A、S54M／C2
19L／N302R／G395H／Q441S／N445R／N447A、S54M／C
219L／V385P／D389E／G395D／Q441R／N445K／N447A
、S54M／N257H、S54M／N257H／V385S／Y449H、S54M／
N257H／D389E、S54M／N257H／Q399R、S54M／N257H／
Q441R／N447A、S54M／N257H／Q441R／Y449H、S54M／
N302H／V385P／Q399R／Q441S／N445K／N447S、S54M
／N302H／V385S／Q399R／Q441S／N445R／Y449H、S54
M／V385P、S54M／V385P／D389E／Q441R／N445K／N44
7A／Y449H、S54M／D389E／G395D／Q399R／N447A／Y4

10

20

30

40

50

49H、F185L/T190P/C219L/N257H/D389E/G395A/
 N445K/N447A、F185L/T190P/N257H/N302R/G395
 D/Q441S/N445R/N447S、F185L/T190P/N257H/V3
 85P/D389E/Q399R、F185L/T190P/N257H/V385P/
 Q399R/N445R/N447A、F185L/T190P/N257H/D389
 E/G395A、F185L/T190P/N257H/D389E/G395H/Q3
 99R/Q441S/N447S/Y449H、F185L/T190P/V385S/
 D389E/Q441R/N445K/N447S、F185L/T190P/D389
 E/N447S/Y449H、F185L/T190P/G395D/Q399R、F1
 85L/T190P/G395H/Q399R、F185L/C219L/N257H/
 Q399R/N445R/N447A、F185L/N257H/V385S/G395
 A/Q399R/N445R/N447A、F185L/N302R/G395H/Q3
 99R/Q441R/N445K/N447S/Y449H、F185L/G395D/
 Q399R/Q441R/N445R/N447A、T190P/C219L/N257
 H/V385S/D389E/Q441S/N445R/N447A/Y449H、T1
 90P/C219L/N302H/V385P/Q399R/N445R、T190P/
 N257H/N302H/V385P/Q399R、T190P/N257H/V385
 P/D389E/Q399R、T190P/N257H/V385S/D389E/N4
 45K/N447A、T190P/N257H/V385S/G395D、T190P/
 N257H/V385S/Q441S/N445R/N447S/Y449H、T190
 P/N257H/D389E/G395H/Q441R/N445R/N447A、T1
 90P/N257H/Q399R/N447A/Y449H、T190P/N302H/
 V385P/D389E/G395D/Q399R/Q441S/N445K/N447
 S、T190P/D389E、C219L/N257H/V385S/D389E/G3
 95D/Q441R/N447A/Y449H、C219L/N257H/G395H、
 C219L/V385S/D389E/Q399R/N445R/Y449H、C219
 L/G395H、N257H/V385P/D389E/Q399R、N257H/D3
 89E/G395D/Q399R/N445K/N447A、N257H/D389E/
 G395D/Q399R/N445K/Y449H、N257H/D389E/Q399
 R、N302H/D389E/G395H/N445R、V385S/D389E、V3
 85S/G395D、D389E/G395D/N445R/N447S、G395D/
 Q399R、およびQ399Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセット
 を含み、これらの位置は、配列番号1216を基準にして番号が付けられている。一部の
 追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、
 5、14、96、108、157、181、188、278、293および341から選
 択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これ
 らの位置は、配列番号1216を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形
 態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、5S、14T
 、96K、96P、108E、157Q、181L、188L、278L、293Vおよ
 び341Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含む。

【0025】

一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド
 配列は、H5S、R14T、G96K、G96P、N108E、N157Q、M181L
 、E188L、V278L、A293VおよびI341Lから選択される少なくとも1つ
 の変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1216を基準にして番号
 が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラ
 ーゼのポリペプチド配列は、54/185/190/219/257/302/385/
 389/395/445/447/449、54/185/190/385/447/4
 49、54/190/257/302/385/395/399、54/190/302
 /389/395/399/445/447、54/257/385/449、54/2

10

20

30

40

50

57／389、および54／389／395／399／447／449から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1216を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、54M／185L／190P／219L／257H／302R／385P／389E／395H／445K／447A／449H、54M／185L／190P／385P／447A／449H、54M／190P／257H／302R／385P／395A／399R、54M／190P／302H／389E／395D／399R／445K／447S、54M／257H／385S／449H、54M／257H／389E、および54M／389E／395D／399R／447A／449Hから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1216を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S54M／F185L／T190P／C219L／N257H／N302R／V385P／D389E／G395H／N445K／N447A／Y449H、S54M／F185L／T190P／V385P／N447A／Y449H、S54M／T190P／N257H／N302R／V385P／G395A／Q399R、S54M／T190P／N302H／D389E／G395D／Q399R／N445K／N447S、S54M／N257H／V385S／Y449H、S54M／N257H／D389E、およびS54M／D389E／G395D／Q399R／N447A／Y449Hから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1216を基準にして番号が付けられている。

10

20

【0026】

一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、14／42／51／108／181、14／42／51／157／341、14／42／341、14／51／96／157、14／51／96／157／341、14／51／96／341、14／51／108、14／51／341、14／96、14／96／108／133、14／96／108／181／341、14／96／108／188、14／96／341、14／108／157、14／108／157／188、14／157／181／278、14／278、42／96／157／341、42／188／341、96／108／181／293、96／108／188、96／108／188／341、96／188、181、188、および293から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、14T／42T／51V／108E／181L、14T／42T／51V／157Q／341L、14T／42T／341L、14T／51V／96K／157Q、14T／51V／96P／157Q／341L、14T／51V／96P／341L、14T／51V／108E、14T／51V／341L、14T／96K、14T／96K／108E／133I、14T／96K／108E／188V、14T／96K／341L、14T／96P／108E／181L／341L、14T／108E／157Q、14T／108E／157Q／188L、14T／157Q／181L／278L、14T／278L、42T／96P／157Q／341L、42T／188L／341L、96K／188L、96P／108E／181L／293V、96P／108E／188L、96P／108E／188L／341L、181L、188L、および293Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、R14T／V42T／N51V／N108E／M181L、R14T／V42T／N51V／N157Q／I341L、R14T／V42T／I341L、R14T／N51V／G96K／N157Q、R14T／N51V／G96P／N157Q／I341L、R14T／N51V／G96P／I341L、R14T／N51V／N108E、R14

30

40

50

T/N51V/I341L、R14T/G96K、R14T/G96K/N108E/V133I、R14T/G96K/N108E/E188V、R14T/G96K/I341L、R14T/G96P/N108E/M181L/I341L、R14T/N108E/N157Q、R14T/N108E/N157Q/E188L、R14T/N157Q/M181L/V278L、R14T/V278L、V42T/G96P/N157Q/I341L、V42T/E188L/I341L、G96K/E188L、G96P/N108E/M181L/A293V、G96P/N108E/E188L、G96P/N108E/E188L/I341L、M181L、E188L、およびA293Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、122、144、147、187、196、197、198、199、201、268および324から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、122V、144V、147F、187K、196M、196P、196V、197V、198A、198F、199G、199Q、199S、201P、268A、324Kおよび324Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、L122V、L144V、S147F、T187K、A196M、A196P、A196V、P197V、Q198A、Q198F、N199G、N199Q、N199S、G201P、Y268A、H324KおよびH324Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、14/42/341、14/96、14/96/108/133、14/96/108/181/341、および188から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、14T/42T/341L、14T/96K、14T/96K/108E/133I、14T/96P/108E/181L/341L、および188Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、R14T/V42T/I341L、R14T/G96K、R14T/G96K/N108E/V133I、R14T/G96P/N108E/M181L/I341L、およびE188Lから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1488を基準にして番号が付けられている。

【0027】

さらに一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、147/188/196/201、152/187/188/324、152/188、152/188/196/198/199/324、152/188/196/199、152/188/196/201/324、152/188/324、188、188/196/198/199/201、188/196/198/199/201/324、188/196/198/201、188/196/198/324、188/196/201、188/198/199/201/324、188/198/199/268、188/198/201/324、188/198/324、188/199/201、188/201、188/201/324、および188/324から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1516を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形

10

20

30

40

50

態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、147F/188E/196V/201P、152Y/187K/188E/324K、152Y/188E、152Y/188E/196V/198A/199Q/324K、152Y/188E/196V/199Q、152Y/188E/196V/201P/324K、152Y/188E/324K、188E、188E/196V/198A/199Q/201P、188E/196V/198A/324K、188E/196V/198F/199Q/201P/324K、188E/196V/198F/201P、188E/196V/201P、188E/198A/199Q/268A、188E/198A/201P/324K、188E/198A/324K、188E/198F/199Q/201P/324K、188E/199Q/201P、188E/201P、188E/201P/324K、および188E/324Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1516を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、S147F/L188E/A196V/G201P、F152Y/T187K/L188E/H324K、F152Y/L188E、F152Y/L188E/A196V/Q198A/N199Q/H324K、F152Y/L188E/A196V/N199Q、F152Y/L188E/A196V/G201P/H324K、F152Y/L188E/H324K、L188E、L188E/A196V/Q198A/N199Q/G201P、L188E/A196V/Q198A/H324K、L188E/A196V/Q198F/N199Q/G201P/H324K、L188E/A196V/Q198F/G201P、L188E/A196V/G201P、L188E/Q198A/N199Q/Y268A、L188E/Q198A/G201P/H324K、L188E/Q198A/H324K、L188E/Q198F/N199Q/G201P/H324K、L188E/N199Q/G201P、L188E/G201P、L188E/G201P/H324K、およびL188E/H324Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1516を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、152/188/196/198/199/324、188/196/198/199/201、188/196/198/201、188/196/201、188/198/199/268、188/201、および188/324から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1516を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、152Y/188E/196V/198A/199Q/324K、188E/196V/198A/199Q/201P、188E/196V/198F/201P、188E/196V/201P、188E/198A/199Q/268A、188E/201P、および188E/324Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1516を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのポリペプチド配列は、F152Y/L188E/A196V/Q198A/N199Q/H324K、L188E/A196V/Q198A/N199Q/G201P、L188E/A196V/Q198F/G201P、L188E/A196V/G201P、L188E/Q198A/N199Q/Y268A、L188E/G201P、およびL188E/H324Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1516を基準にして番号が付けられている。

【0028】

本発明は、本明細書で提供される操作されたグリコシルトランスフェラーゼであって、ベクター1，2-グリコシルトランスフェラーゼおよびベクター1，3-グリコシルトランスフェラーゼから選択される操作されたグリコシルトランスフェラーゼも提供する。一部の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、ADP-グルコース依

10

20

30

40

50

存性グリコシルトランスフェラーゼ（AGT）、CDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（CGT）、GDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（GGT）、TDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（TGT）およびIDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（IGT）から選択される、NDP-グリコシルトランスフェラーゼである。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、ADP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼである。一部のさらなる実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、ウラシルニリン酸以外の糖ドナーを優先的に使用する。

【0029】

本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドをコードする操作されたポリヌクレオチドも提供する。本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つのグリコシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも1つの操作されたポリヌクレオチドを含むベクターも提供する。一部の実施形態では、ベクターは、少なくとも1つの制御配列をさらに含む。本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つのグリコシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも1つの操作されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞も提供する。本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つのベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。一部の実施形態では、宿主細胞は、真核生物および原核生物から選択される。

【0030】

本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを産生するための方法であって、本明細書で提供される宿主細胞を、操作されたグリコシルトランスフェラーゼが宿主細胞により産生されるような条件下で培養するステップを含む方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、操作されたグリコシルトランスフェラーゼを回収するステップをさらに含む。本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを含む組成物も提供する。

【0031】

本発明は、配列番号6に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたスクロースシンターゼも提供する。一部の実施形態では、配列番号22に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたスクロースシンターゼ。一部の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、3／548、4、7、12、41、42、44、47、52、57、59、71、81、85、93、97、122、129、134、136、139、154、175、215、266、270、343、358、381、388、434、442、519、524、532、536、570、589、603、606、615、635、641、652、724、727、および738から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号22を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、3G／548R、4Q、4T、7H、7L、12K、41Q、41S、42D、42E、42I、44A、44I、44L、44T、47A、47G、47R、47T、52G、52Q、52S、52T、52V、57H、57Y、59M、59T、71Q、71T、81H、81P、81Q、85T、93I、97S、97T、122P、129Q、134P、134Q、134R、136G、139G、154A、175S、215L、266R、270L、343L、358P、358Q、381K、381R、381T、381Y、388A、388R、388S、434G、434L、442Y、519C、519V、524R、524S、532E、532T、532Y、536T、570K、589Q、603M、603T、606A、606P、615T、635G、635R、641I、641L、652R、652Y、724A、724S、727H、738A、および738Kから選択される少な

10

20

30

40

50

くとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号22を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、E3G/P548R、E4Q、E4T、Q7H、Q7L、S12K、K41Q、K41S、T42D、T42E、T42I、R44A、R44I、R44L、R44T、P47A、P47G、P47R、P47T、P52G、P52Q、P52S、P52T、P52V、W57H、W57Y、A59M、A59T、R71Q、R71T、L81H、L81P、L81Q、V85T、V93I、A97S、A97T、A122P、E129Q、V134P、V134Q、V134R、Q136G、K139G、H154A、G175S、F215L、N266R、V270L、H343L、E358P、E358Q、S381K、S381R、S381T、S381Y、K388A、K388R、K388S、Y434G、Y434L、H442Y、T519C、T519V、A524R、A524S、S532E、S532T、S532Y、E536T、R570K、S589Q、Q603M、Q603T、M606A、M606P、R615T、S635G、S635R、V641I、V641L、G652R、G652Y、K724A、K724S、E727H、S738A、およびS738Kから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号22を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、41、52、134、381、442、519、524および724から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号22を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、41S、52V、134R、381R、442Y、519V、524Rおよび724Sから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号22を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、K41S、P52V、V134R、S381R、H442Y、T519V、A524RおよびK724Sから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号22を基準にして番号が付けられている。

【0032】

一部の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、25/44/52/134/434/724、41/44/52/97/442/719/724、41/44/52/134/442、41/44/52/434/442/532/724、41/44/52/434/724、41/44/136/329、41/44/136/442、41/44/532、41/52/97/434/442/532/724、41/52/134/136/434、41/52/134/442/724、41/52/136、41/52/434、41/52/434/442、41/52/434/442/724、41/52/442、41/97/134/434/442/532/553、41/134/442/532、41/329/442、41/434/442/532、41/434/442/532/724、41/434/532、41/532、44/52/97/434/442/724、44/52/97/442/724、44/52/134/136/329/434/442/532、44/52/134/434/532、44/136/329/434/532、44/136/532、44/434/442/553、52、52/97、52/97/434/442、52/97/442、52/97/532、52/134、52/134/136/434、52/134/136/442、52/134/329/434、52/134/329/532、52/134/434/442/532/553、52/134/442/724、52/136、52/136/434、52/136/434/442、52/136/434/442/532、52/136/434/724、52/136/442、52/434、52/434/442/532、52/434/442/724、52/434/532、52/442、52/442/532/724、52/442/553/724、52/442/724、52/532、52/553、57/97/4

10

20

30

40

50

3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、9 7 / 1 3 4 / 1 3 6 / 4 4 2 / 5 3 2、9 7 / 1 3 4 / 1 3 6 / 5 3 2、9 7 / 1 3 4 / 4 4 2、9 7 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2、9 7 / 3 2 9 / 7 2 4、9 7 / 4 4 2、1 3 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 5 5 3 / 7 2 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 5 3 / 7 2 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 5 3 2 / 7 2 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 4 2 / 5 3 2、1 3 4 / 4 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、1 3 6、1 3 6 / 4 4 2、1 3 6 / 4 4 2 / 7 2 4、1 3 6 / 5 3 2 / 7 2 4、4 3 4、4 3 4 / 4 4 2、4 4 2、4 4 2 / 7 2 4、および 5 3 2 / 7 2 4 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 1 6 5 2 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、2 5 T / 4 4 I / 5 2 G / 1 3 4 R / 4 3 4 G / 7 2 4 S、4 1 S / 4 4 I / 5 2 G / 9 7 T / 4 4 2 Y / 7 1 9 T / 7 2 4 S、4 1 S / 4 4 I / 5 2 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 7 2 4 S、4 1 S / 4 4 I / 5 2 G / 4 3 4 G / 7 2 4 S、4 1 S / 4 4 I / 5 2 V / 1 3 4 R / 4 4 2 Y、4 1 S / 4 4 I / 1 3 6 G / 3 2 9 Q、4 1 S / 4 4 I / 1 3 6 G / 4 4 2 Y、4 1 S / 4 4 I / 5 3 2 Y、4 1 S / 5 2 G / 1 3 4 R / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、4 1 S / 5 2 G / 1 3 6 G、4 1 S / 5 2 V / 9 7 T / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 7 2 4 S、4 1 S / 5 2 V / 1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 3 4 G、4 1 S / 5 2 V / 4 3 4 G、4 1 S / 5 2 V / 4 3 4 G / 4 4 2 Y、4 1 S / 5 2 V / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、4 1 S / 5 2 V / 4 4 2 Y、4 1 S / 9 7 T / 1 3 4 R / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 5 5 3 A、4 1 S / 1 3 4 R / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y、4 1 S / 3 2 9 Q / 4 4 2 Y、4 1 S / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y、4 1 S / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 7 2 4 S、4 1 S / 4 3 4 G / 5 3 2 Y、4 1 S / 5 3 2 Y、4 4 I / 5 2 G / 1 3 4 R / 1 3 6 G / 3 2 9 Q / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y、4 4 I / 5 2 V / 9 7 T / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、4 4 I / 5 2 V / 9 7 T / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、4 4 I / 5 2 V / 1 3 4 R / 4 3 4 G / 5 3 2 Y、4 4 I / 1 3 6 G / 3 2 9 Q / 4 3 4 G / 5 3 2 Y、4 4 I / 1 3 6 G / 5 3 2 Y、4 4 I / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 5 3 A、5 2 G、5 2 G / 9 7 T、5 2 G / 9 7 T / 4 3 4 G / 4 4 2 Y、5 2 G / 9 7 T / 4 4 2 Y、5 2 G / 9 7 T / 5 3 2 Y、5 2 G / 1 3 4 R、5 2 G / 1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 3 4 G、5 2 G / 1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 4 2 Y、5 2 G / 1 3 4 R / 3 2 9 Q / 4 3 4 G、5 2 G / 1 3 4 R / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 5 5 3 A、5 2 G / 1 3 6 G、5 2 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y、5 2 G / 4 4 2 Y、5 2 G / 4 4 2 Y / 5 5 3 A / 7 2 4 S、5 2 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、5 2 G / 5 3 2 Y、5 2 G / 5 5 3 A、5 2 V / 1 3 4 R / 3 2 9 Q / 5 3 2 Y、5 2 V / 1 3 4 R / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、5 2 V / 1 3 6 G / 4 3 4 G、5 2 V / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y、5 2 V / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 7 2 4 S、5 2 V / 1 3 6 G / 4 4 2 Y、5 2 V / 4 3 4 G、5 2 V / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、5 2 V / 4 3 4 G / 5 3 2 Y、5 2 V / 4 4 2 Y、5 2 V / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 7 2 4 S、5 2 V / 4 4 2 Y / 5 5 3 A / 7 2 4 S、5 2 V / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、5 2 V / 5 3 2 Y、5 7 C / 9 7 T / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、9 7 T / 1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y、9 7 T / 1 3 4 R / 1 3 6 G / 5 3 2 Y、9 7 T / 1 3 4 R / 4 4 2 Y、9 7 T / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y、9 7 T / 3 2 9 Q / 7 2 4 S、9 7 T / 4 4 2 Y、1 3 4 R、1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y、1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y / 5 5 3 A / 7 2 4 S、1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 5 5 3 A / 7 2 4 S、1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 3 4 G / 5 3 2 Y / 7 2 4 S、1 3 4 R / 1 3 6 G / 4 4 2 Y / 5 3 2 Y、1 3 4 R / 4 3 4 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、1 3 6 G、1 3 6 G / 4 4 2 Y、1 3 6 G / 4 4 2 Y / 7 2 4 S、1 3 6 G / 5 3 2 Y / 7 2 4 S、4 3 4 G、4 3 4 G / 4 4 2 Y、4 4 2 Y、4 4 2 Y / 7 2 4 S、および 5 3 2 Y / 7 2 4 S から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 1 6 5 2 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、A 2 5 T / R 4 4 I / P 5 2 G / V 1 3 4

10

20

30

40

50

R/Y434G/K724S、K41S/R44I/P52G/A97T/H442Y/
A719T/K724S、K41S/R44I/P52G/Y434G/H442Y/S
532Y/K724S、K41S/R44I/P52G/Y434G/K724S、K4
1S/R44I/P52V/V134R/H442Y、K41S/R44I/Q136G
/E329Q、K41S/R44I/Q136G/H442Y、K41S/R44I/S
532Y、K41S/P52G/V134R/H442Y/K724S、K41S/P5
2G/Q136G、K41S/P52V/A97T/Y434G/H442Y/S532
Y/K724S、K41S/P52V/V134R/Q136G/Y434G、K41S
/P52V/Y434G、K41S/P52V/Y434G/H442Y、K41S/P
52V/Y434G/H442Y/K724S、K41S/P52V/H442Y、K4
1S/A97T/V134R/Y434G/H442Y/S532Y/V553A、K4
1S/V134R/H442Y/S532Y、K41S/E329Q/H442Y、K4
1S/Y434G/H442Y/S532Y、K41S/Y434G/H442Y/S5
32Y/K724S、K41S/Y434G/S532Y、K41S/S532Y、R4
4I/P52G/V134R/Q136G/E329Q/Y434G/H442Y/S5
32Y、R44I/P52V/A97T/Y434G/H442Y/K724S、R44
I/P52V/A97T/H442Y/K724S、R44I/P52V/V134R/
Y434G/S532Y、R44I/Q136G/E329Q/Y434G/S532Y
、R44I/Q136G/S532Y、R44I/Y434G/H442Y/V553A
、P52G、P52G/A97T、P52G/A97T/Y434G/H442Y、P5
2G/A97T/H442Y、P52G/A97T/S532Y、P52G/V134R
、P52G/V134R/Q136G/Y434G、P52G/V134R/Q136G
/H442Y、P52G/V134R/E329Q/Y434G、P52G/V134R
/Y434G/H442Y/S532Y/V553A、P52G/Q136G、P52G
/Y434G/H442Y/S532Y、P52G/H442Y、P52G/H442Y
/V553A/K724S、P52G/H442Y/K724S、P52G/S532Y
、P52G/V553A、P52V/V134R/E329Q/S532Y、P52V/
V134R/H442Y/K724S、P52V/Q136G/Y434G、P52V/
Q136G/Y434G/H442Y、P52V/Q136G/Y434G/H442Y
/S532Y、P52V/Q136G/Y434G/K724S、P52V/Q136G
/H442Y、P52V/Y434G、P52V/Y434G/H442Y/K724S
、P52V/Y434G/S532Y、P52V/H442Y、P52V/H442Y/
S532Y/K724S、P52V/H442Y/V553A/K724S、P52V/
H442Y/K724S、P52V/S532Y、W57C/A97T/Y434G/H
442Y/K724S、A97T/V134R/Q136G/H442Y/S532Y、
A97T/V134R/Q136G/S532Y、A97T/V134R/H442Y、
A97T/Q136G/Y434G/H442Y、A97T/E329Q/K724S、
A97T/H442Y、V134R、V134R/Q136G/Y434G/H442Y
、V134R/Q136G/Y434G/H442Y/S532Y/V553A/K72
4S、V134R/Q136G/Y434G/H442Y/V553A/K724S、V
134R/Q136G/Y434G/S532Y/K724S、V134R/Q136G
/H442Y/S532Y、V134R/Y434G/H442Y/K724S、Q13
6G、Q136G/H442Y、Q136G/H442Y/K724S、Q136G/S
532Y/K724S、Y434G、Y434G/H442Y、H442Y、H442Y
/K724S、およびS532Y/K724Sから選択される少なくとも1つの変異また
は変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1652を基準にして番号が付けられ
ている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配
列は、3、4、22、32、34、38、47/488、51、51/433、62、7
5/169、101、169、195/213、708および718から選択される1つ
または複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、

10

20

30

40

50

配列番号1652を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、3A、4V、22L、22T、32S、34E、34S、38L、38N、38V、38W、47S/488N、51A、51H、51H/433P、51T、62I、75I/169A、101V、169E、195K/213T、708Vおよび718Hから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1652を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、E3A、E4V、H22L、H22T、L32S、T34E、T34S、R38L、R38N、R38V、R38W、P47S/D488N、Y51A、Y51H、Y51H/L433P、Y51T、V62I、M75I/Q169A、L101V、Q169E、S195K/A213T、T708V、およびA718Hから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1652を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、44/52/97/442/724、52/97/442、97/442、および434/442から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1652を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、44I/52V/97T/442Y/724S、52G/97T/442Y、97T/442Y、および434G/442Yから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1652を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、R44I/P52V/A97T/H442Y/K724S、P52G/A97T/H442Y、A97T/H442Y、およびY434G/H442Yから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1652を基準にして番号が付けられている。

【0033】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、4/22、4/22/34、4/22/34/38、4/22/34/38/169/708、4/22/34/47/51/169/213、4/22/51/708、4/22/101、4/34/38/101、4/34/708、4/62/433/708、4/169、4/169/433、4/169/708、4/433、4/708、22/34、22/34/38、22/34/101/169、22/34/101/169/195、22/34/169/708、22/47/169/433、22/75、34/38/62、34/62/169/433、34/101、62/708、75/169、169/708、および195/708から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、4V/22L/34E、4V/22L/51A/708V、4V/22L/101V、4V/22T、4V/22T/34E/38N、4V/22T/34E/38V/169A/708V、4V/22T/34E/47S/51H/169A/213T、4V/34E/38N/101V、4V/34E/708V、4V/62I/433P/708V、4V/169A、4V/169A/433P、4V/169A/708V、4V/433P、4V/708V、22L/34E、22L/34S/169A/708V、22L/75I、22T/34E/38V、22T/34E/101V/169E、22T/34E/101V/169E/195K、22T/47S/169A/433P、34E/62I/169E/433P、34E/101V、34S/38L/62I、62I/708V、75I/169A、169A/708V、および195K/708Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、E4V/H2

10

20

30

40

50

2 L / T 3 4 E、E 4 V / H 2 2 L / Y 5 1 A / T 7 0 8 V、E 4 V / H 2 2 L / L 1 0 1 V、E 4 V / H 2 2 T、E 4 V / H 2 2 T / T 3 4 E / R 3 8 N、E 4 V / H 2 2 T / T 3 4 E / R 3 8 V / Q 1 6 9 A / T 7 0 8 V、E 4 V / H 2 2 T / T 3 4 E / P 4 7 S / Y 5 1 H / Q 1 6 9 A / A 2 1 3 T、E 4 V / T 3 4 E / R 3 8 N / L 1 0 1 V、E 4 V / T 3 4 E / T 7 0 8 V、E 4 V / V 6 2 I / L 4 3 3 P / T 7 0 8 V、E 4 V / Q 1 6 9 A、E 4 V / Q 1 6 9 A / L 4 3 3 P、E 4 V / Q 1 6 9 A / T 7 0 8 V、E 4 V / L 4 3 3 P、E 4 V / T 7 0 8 V、H 2 2 L / T 3 4 E、H 2 2 L / T 3 4 S / Q 1 6 9 A / T 7 0 8 V、H 2 2 L / M 7 5 I、H 2 2 T / T 3 4 E / R 3 8 V、H 2 2 T / T 3 4 E / L 1 0 1 V / Q 1 6 9 E、H 2 2 T / T 3 4 E / L 1 0 1 V / Q 1 6 9 E / S 1 9 5 K、H 2 2 T / P 4 7 S / Q 1 6 9 A / L 4 3 3 P、T 3 4 E / V 6 2 I / Q 1 6 9 E / L 4 3 3 P、T 3 4 E / L 1 0 1 V、T 3 4 S / R 3 8 L / V 6 2 I、V 6 2 I / T 7 0 8 V、M 7 5 I / Q 1 6 9 A、Q 1 6 9 A / T 7 0 8 V、および S 1 9 5 K / T 7 0 8 V から選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、4、22、34、121、169、341、411、433、441、518、526、527、528、544、557、558、565、585、602、604、623、708、731および770から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、4V、22L、22T、34E、121D、169A、341N、411I、433P、441A、441L、518S、526H、526V、527A、527Q、528Q、544H、557P、558G、565V、585A、602P、604A、623A、623K、623Q、623R、708V、731A、731M、731Q、731T、および770Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、E4V、H22L、H22T、T34E、E121D、Q169A、P341N、L411I、L433P、D441A、D441L、R518S、T526H、T526V、E527A、E527Q、E528Q、R544H、R557P、Q558G、M565V、S585A、V602P、N604A、H623A、H623K、H623Q、H623R、T708V、D731A、D731M、D731Q、D731T、およびV770Tから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、4、4/22/34/38、4/169、4/169/433、4/433、62/708、および169/708から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、4V、4V/22T/34E/38N、4V/169A、4V/169A/433P、4V/433P、62I/708V、および169A/708Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、E4V、E4V/H22T/T34E/R38N、E4V/Q169A、E4V/Q169A/L433P、E4V/L433P、V62I/T708V、およびQ169A/T708Vから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号1822を基準にして番号が付けられている。

【0034】

さらに一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34/62/411/526/557、34/62/411/557/602/6

10

20

30

40

50

04、34/62/441/557/623、34/62/518/623、34/62/623/731、34/121/441/544/604/623、34/121/526/604/731、34/411/441、34/411/441/518/526/557/565/731、34/411/441/518/544/557/565/708/731、34/411/441/518/585/604/770、34/441/518/526/585/604/731、34/441/526/565/708/770、34/441/544/557/585/602/623、34/441/585/623/708/731、34/526/585/623、62/121/329/518/557/565/623/708、62/121/411/441/518/544/557/585/604/623、62/121/441/518/526/623/770、62/121/441/565/585、62/121/518/557/585/604/708/770、62/411/526/565/604/623、62/411/585/731、62/441/518/557/604/623/708/731、62/441/623/708/770、62/441/770、121/441/518/526/602/604、121/441/518/526/623/708、121/441/526/557/565/708、121/604/708/731/770、411/441/518/557/623、411/441/518/708、411/441/604/623/708/731、411/518/526/604/623/731、411/565/604/623、411/585/623、441/518/526/557/565/602/604/623/708、441/518/526/604/623、441/518/557/565/585、441/518/565/623/731/770、441/518/585、441/585、441/585/602/604/623/708/731、441/708/731、557/602/604、557/604、585/623/708、および623から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。

【0035】

一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34E/62I/411I/526H/557P、34E/62I/411I/557P/602P/604A、34E/62I/441L/557P/623K、34E/62I/518S/623K、34E/62I/623K/731Q、34E/121D/441L/544H/604A/623K、34E/121D/526H/604A/731Q、34E/411I/441L、34E/411I/441L/518S/526H/557P/565V/731Q、34E/411I/441L/518S/544H/557P/565V/708V/731Q、34E/411I/441L/518S/585A/604A/770T、34E/441L/518S/526H/585A/604A/731Q、34E/441L/526H/565V/708V/770T、34E/441L/544H/557P/585A/602P/623K、34E/441L/585A/623K/708V/731Q、34E/526H/585A/623K、62I/121D/329Q/518S/557P/565V/623R/708V、62I/121D/411I/441L/518S/544H/557P/585A/604A/623K、62I/121D/441L/518S/526H/623R/770T、62I/121D/441L/565V/585A、62I/121D/518S/557P/585A/604A/708V/770T、62I/411I/526H/565V/604A/623K、62I/411I/585A/731Q、62I/441L/518S/557P/604A/623K/708V/731Q、62I/441L/623R/708V/770T、62I/441L/770T、121D/441L/518S/526H/602P/604A、121D/441L/518S/526H/623K/708V、121D/441L/526H/557P/565V/708V、1

10

20

30

40

50

21D/604A/708V/731Q/770T、411I/441L/518S/5
57P/623K、411I/441L/518S/708V、411I/441L/6
04A/623K/708V/731Q、411I/518S/526H/604A/6
23K/731Q、411I/565V/604A/623R、411I/585A/6
23K、441L/518S/526H/557P/565V/602P/604A/6
23K/708V、441L/518S/526H/557P/585A/604A/6
23R/708V、441L/518S/526H/604A/623R、441L/5
18S/557P/565V/585A、441L/518S/565V/623R/7
31Q/770T、441L/518S/585A、441L/585A、441L/5
85A/602P/604A/623R/708V/731Q、441L/708V/7
31Q、557P/602P/604A、557P/604A、585A/623R/7
08V、および623Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み
、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。一部の追加の
実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、T34E/V6
2I/L411I/T526H/R557P、T34E/V62I/L411I/R55
7P/V602P/N604A、T34E/V62I/D441L/R557P/H62
3K、T34E/V62I/R518S/H623K、T34E/V62I/H623K
/D731Q、T34E/E121D/D441L/R544H/N604A/H623
K、T34E/E121D/T526H/N604A/D731Q、T34E/L411
I/D441L、T34E/L411I/D441L/R518S/T526H/R55
7P/M565V/D731Q、T34E/L411I/D441L/R518S/R5
44H/R557P/M565V/T708V/D731Q、T34E/L411I/D
441L/R518S/S585A/N604A/V770T、T34E/D441L/
R518S/T526H/S585A/N604A/D731Q、T34E/D441L
/T526H/M565V/T708V/V770T、T34E/D441L/R544
H/R557P/S585A/V602P/H623K、T34E/D441L/S58
5A/H623K/T708V/D731Q、T34E/T526H/S585A/H6
23K、V62I/E121D/E329Q/R518S/R557P/M565V/H
623R/T708V、V62I/E121D/L411I/D441L/R518S/
R544H/R557P/S585A/N604A/H623K、V62I/E121D
/D441L/R518S/T526H/H623R/V770T、V62I/E121
D/D441L/M565V/S585A、V62I/E121D/R518S/R55
7P/S585A/N604A/T708V/V770T、V62I/L411I/T5
26H/M565V/N604A/H623K、V62I/L411I/S585A/D
731Q、V62I/D441L/R518S/R557P/N604A/H623K/
T708V/D731Q、V62I/D441L/H623R/T708V/V770T
、V62I/D441L/V770T、E121D/D441L/R518S/T526
H/V602P/N604A、E121D/D441L/R518S/T526H/H6
23K/T708V、E121D/D441L/T526H/R557P/M565V/
T708V、E121D/N604A/T708V/D731Q/V770T、L411
I/D441L/R518S/R557P/H623K、L411I/D441L/R5
18S/T708V、L411I/D441L/N604A/H623K/T708V/
D731Q、L411I/R518S/T526H/N604A/H623K/D731
Q、L411I/M565V/N604A/H623R、L411I/S585A/H6
23K、D441L/R518S/T526H/R557P/M565V/V602P/
N604A/H623K/T708V、D441L/R518S/T526H/R557
P/S585A/N604A/H623R/T708V、D441L/R518S/T5
26H/N604A/H623R、D441L/R518S/R557P/M565V/
S585A、D441L/R518S/M565V/H623R/D731Q/V770
T、D441L/R518S/S585A、D441L/S585A、D441L/S5

10

20

30

40

50

85A/V602P/N604A/H623R/T708V/D731Q、D441L/T708V/D731Q、R557P/V602P/N604A、R557P/N604A、S585A/H623R/T708V、およびH623Rから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、63、65、269、323、406、416、469、511および640から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、63G、63S、63T、65C、65L、269V、323G、323S、323T、406G、416F、469S、511L、640A、640E、640H、640N、640R、640Vおよび640Wから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34/62/441/557/623、34/441/585/623/708/731、62/441/623/708/770、411/441/518/557/623、411/441/604/623/708/731、441/518/526/557/585/604/623/708、441/518/557/565/585、および441/585/602/604/623/708/731から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34E/62I/441L/557P/623K、34E/441L/585A/623K/708V/731Q、62I/441L/623R/708V/770T、411I/441L/518S/557P/623K、411I/441L/604A/623K/708V/731Q、441L/518S/526H/557P/585A/604A/623R/708V、441L/518S/557P/565V/585A、および441L/585A/602P/604A/623R/708V/731Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、T34E/V62I/D441L/R557P/H623K、T34E/D441L/S585A/H623K/T708V/D731Q、V62I/D441L/H623R/T708V/V770T、L411I/D441L/R518S/R557P/H623K、L411I/D441L/N604A/H623K/T708V/D731Q、D441L/R518S/T526H/R557P/S585A/N604A/H623R/T708V、D441L/R518S/R557P/M565V/S585A、およびD441L/S585A/V602P/N604A/H623R/T708V/D731Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2092を基準にして番号が付けられている。

【0036】

一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34、34/62、34/62/65/640、34/62/323、34/63/65/323/528/640、34/63/65/406/528/640/713、34/63/323/526/528/640、34/63/406/528/640/731、34/65、34/65/528/640、34/323/406/640、34

10

20

30

40

50

／3 2 3／6 4 0、3 4／6 4 0、3 8／6 4 0、6 2／6 3、6 2／6 3／6 5／5 2
8／6 4 0、6 2／6 3／6 9／3 2 3／4 0 6／6 4 0、6 2／6 3／5 2 6／6 4 0
／7 3 1、6 2／3 2 3／6 4 0、6 3／6 5／3 2 3／4 0 6／5 2 6／5 2 8／6 4
0／7 3 1、6 3／6 5／4 0 6／7 3 1、6 3／6 5／5 2 8／6 4 0／7 3 1、6 3
／6 5／6 4 0、6 3／3 2 3／4 0 6／6 4 0、6 3／4 0 6、6 3／4 0 6／6 4 0
、6 3／5 2 6／5 2 8／6 4 0／7 3 1、6 3／7 3 1、3 2 3／4 0 6／6 4 0、3
2 3／4 0 6／6 4 0／7 3 1、3 2 3／5 2 6／5 2 8／6 4 0、3 2 3／5 2 6／6
4 0、3 2 3／6 4 0／7 3 1、4 0 6／6 4 0、5 2 6／5 2 8／6 4 0／7 3 1、お
よび7 3 1から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセ
ットを含み、これらの位置は、配列番号2 1 8 2を基準にして番号が付けられている。一
部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、3 4
E、3 4 E／6 2 I、3 4 E／6 2 I／6 5 C／6 4 0 R、3 4 E／6 2 I／3 2 3 G、
3 4 E／6 3 S／6 5 C／4 0 6 G／5 2 8 D／6 4 0 R／7 1 3 V、3 4 E／6 3 S／
3 2 3 G／5 2 6 T／5 2 8 D／6 4 0 R、3 4 E／6 3 S／4 0 6 G／5 2 8 D／6 4
0 N／7 3 1 Q、3 4 E／6 3 T／6 5 C／3 2 3 G／5 2 8 D／6 4 0 R、3 4 E／6
5 C、3 4 E／6 5 C／5 2 8 D／6 4 0 R、3 4 E／3 2 3 G／4 0 6 G／6 4 0 A、
3 4 E／3 2 3 G／6 4 0 A、3 4 E／6 4 0 A、3 4 E／6 4 0 R、3 8 H／6 4 0 R
、6 2 I／6 3 S／6 5 C／5 2 8 D／6 4 0 A、6 2 I／6 3 S／5 2 6 T／6 4 0 R
／7 3 1 Q、6 2 I／6 3 T、6 2 I／6 3 T／6 9 F／3 2 3 G／4 0 6 G／6 4 0 R
、6 2 I／3 2 3 G／6 4 0 R、6 3 S／6 5 C／6 4 0 R、6 3 S／3 2 3 G／4 0 6
G／6 4 0 A、6 3 S／4 0 6 G、6 3 S／5 2 6 T／5 2 8 D／6 4 0 R／7 3 1 Q、
6 3 S／7 3 1 Q、6 3 T／6 5 C／3 2 3 G／4 0 6 G／5 2 6 T／5 2 8 D／6 4 0
N／7 3 1 Q、6 3 T／6 5 C／4 0 6 G／7 3 1 Q、6 3 T／6 5 C／5 2 8 D／6 4
0 A／7 3 1 Q、6 3 T／4 0 6 G／6 4 0 A、3 2 3 G／4 0 6 G／6 4 0 N、3 2 3
G／4 0 6 G／6 4 0 R／7 3 1 Q、3 2 3 G／5 2 6 T／5 2 8 D／6 4 0 R、3 2 3
G／5 2 6 T／6 4 0 R、3 2 3 G／6 4 0 A／7 3 1 Q、4 0 6 G／6 4 0 R、5 2 6
T／5 2 8 D／6 4 0 A／7 3 1 Q、および7 3 1 Qから選択される少なくとも1つの変
異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2 1 8 2を基準にして番号が付
けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプ
チド配列は、T 3 4 E、T 3 4 E／V 6 2 I、T 3 4 E／V 6 2 I／T 6 5 C／T 6 4 0
R、T 3 4 E／V 6 2 I／A 3 2 3 G、T 3 4 E／A 6 3 S／T 6 5 C／N 4 0 6 G／E
5 2 8 D／T 6 4 0 R／A 7 1 3 V、T 3 4 E／A 6 3 S／A 3 2 3 G／H 5 2 6 T／E
5 2 8 D／T 6 4 0 R、T 3 4 E／A 6 3 S／N 4 0 6 G／E 5 2 8 D／T 6 4 0 N／D
7 3 1 Q、T 3 4 E／A 6 3 T／T 6 5 C／A 3 2 3 G／E 5 2 8 D／T 6 4 0 R、T 3
4 E／T 6 5 C、T 3 4 E／T 6 5 C／E 5 2 8 D／T 6 4 0 R、T 3 4 E／A 3 2 3 G
／N 4 0 6 G／T 6 4 0 A、T 3 4 E／A 3 2 3 G／T 6 4 0 A、T 3 4 E／T 6 4 0 A
、T 3 4 E／T 6 4 0 R、R 3 8 H／T 6 4 0 R、V 6 2 I／A 6 3 S／T 6 5 C／E 5
2 8 D／T 6 4 0 A、V 6 2 I／A 6 3 S／H 5 2 6 T／T 6 4 0 R／D 7 3 1 Q、V 6
2 I／A 6 3 T、V 6 2 I／A 6 3 T／I 6 9 F／A 3 2 3 G／N 4 0 6 G／T 6 4 0 R
、V 6 2 I／A 3 2 3 G／T 6 4 0 R、A 6 3 S／T 6 5 C／T 6 4 0 R、A 6 3 S／A
3 2 3 G／N 4 0 6 G／T 6 4 0 A、A 6 3 S／N 4 0 6 G、A 6 3 S／H 5 2 6 T／E
5 2 8 D／T 6 4 0 R／D 7 3 1 Q、A 6 3 S／D 7 3 1 Q、A 6 3 T／T 6 5 C／A 3
2 3 G／N 4 0 6 G／H 5 2 6 T／E 5 2 8 D／T 6 4 0 N／D 7 3 1 Q、A 6 3 T／T
6 5 C／N 4 0 6 G／D 7 3 1 Q、A 6 3 T／T 6 5 C／E 5 2 8 D／T 6 4 0 A／D 7
3 1 Q、A 6 3 T／N 4 0 6 G／T 6 4 0 A、A 3 2 3 G／N 4 0 6 G／T 6 4 0 N、A
3 2 3 G／N 4 0 6 G／T 6 4 0 R／D 7 3 1 Q、A 3 2 3 G／H 5 2 6 T／E 5 2 8 D
／T 6 4 0 R、A 3 2 3 G／H 5 2 6 T／T 6 4 0 R、A 3 2 3 G／T 6 4 0 A／D 7 3
1 Q、N 4 0 6 G／T 6 4 0 R、H 5 2 6 T／E 5 2 8 D／T 6 4 0 A／D 7 3 1 Q、お
よびD 7 3 1 Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これら
の位置は、配列番号2 1 8 2を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形

10

20

30

40

50

態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、28、30、30／158、37、59、102、108、158、164、183、191、206、235、307、311、409、419、533、543、546、559、683、710、752および793から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2182を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、28H、30A、30H／158H、30M、30Q、37L、37M、59T、102N、102T、108R、158A、158K、164G、164Q、164S、164T、183P、191L、206I、235A、307E、307H、311L、311S、409S、419L、419V、533K、533R、543A、546N、546Q、546T、559R、683L、683V、710A、710G、710S、710V、752R、および793Gから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2182を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、R28H、S30A、S30H／R158H、S30M、S30Q、Q37L、Q37M、A59T、S102N、S102T、Q108R、R158A、R158K、A164G、A164Q、A164S、A164T、N183P、T191L、L206I、V235A、N307E、N307H、Q311L、Q311S、A409S、T419L、T419V、L533K、L533R、G543A、P546N、P546Q、P546T、K559R、R683L、R683V、E710A、E710G、E710S、E710V、T752R、およびE793Gから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2182を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34／62、34／65、34／323／640、34／640、38／640、および63／65／406／731から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2182を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34E／62I、34E／65C、34E／323G／640A、34E／640A、38H／640R、および63T／65C／406G／731Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2182を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、T34E／V62I、T34E／T65C、T34E／A323G／T640A、T34E／T640A、R38H／T640R、およびA63T／T65C／N406G／D731Qから選択される少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2182を基準にして番号が付けられている。

【0037】

さらに一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34／65／323／406／411／565、34／323／406／411／565、34／323／406／565／731、62／65／323／406／565、62／65／323／406／565／731、62／65／323／411／565、62／65／406／411／565／731、62／323／406／411、62／323／406／411／565、62／323／411／565、63／65／323／406／565／731、63／65／406／411／565、65／323／406／565、323／406／411／565、323／411／565、および636から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号2322を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、34E／65C／323G／406G／411I／565V、34E／323G／406G／411I／565V、34E／323G／406G／565V／731Q、62I／65C／3

10

20

30

40

50

2 3 G / 4 0 6 G / 5 6 5 V、6 2 I / 6 5 C / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 5 6 5 V / 7 3 1 Q、6 2 I / 6 5 C / 3 2 3 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、6 2 I / 6 5 C / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V / 7 3 1 Q、6 2 I / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I、6 2 I / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、6 2 I / 3 2 3 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、6 3 T / 6 5 C / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 5 6 5 V / 7 3 1 Q、6 3 T / 6 5 C / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、6 5 C / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 5 6 5 V、3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、3 2 3 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、6 3 6 A、6 3 6 H、および 6 3 6 N から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、T 3 4 E / T 6 5 C / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、T 3 4 E / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、T 3 4 E / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / M 5 6 5 V / D 7 3 1 Q、V 6 2 I / T 6 5 C / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / M 5 6 5 V / D 7 3 1 Q、V 6 2 I / T 6 5 C / A 3 2 3 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、V 6 2 I / T 6 5 C / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V / D 7 3 1 Q、V 6 2 I / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I、V 6 2 I / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、V 6 2 I / A 3 2 3 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、A 6 3 T / T 6 5 C / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / M 5 6 5 V / D 7 3 1 Q、A 6 3 T / T 6 5 C / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、T 6 5 C / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / M 5 6 5 V、A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、A 3 2 3 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、Q 6 3 6 A、Q 6 3 6 H、および Q 6 3 6 N から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている。一部のさらなる実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、3 4 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、3 4 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、6 2 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5、6 2 / 6 5 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5 / 6 3 6 / 7 3 1、6 2 / 6 5 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5 / 7 3 1、6 2 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1、6 2 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、および 6 2 / 3 2 3 / 4 1 1 / 5 6 5 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、3 4 E / 6 5 C / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、3 4 E / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、6 2 I / 6 5 C / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 5 6 5 V、6 2 I / 6 5 C / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V / 6 3 6 H / 7 3 1 Q、6 2 I / 6 5 C / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V / 7 3 1 Q、6 2 I / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I、6 2 I / 3 2 3 G / 4 0 6 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V、および 6 2 I / 3 2 3 G / 4 1 1 I / 5 6 5 V から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている。一部の追加の実施形態では、操作されたスクロースシンターゼのポリペプチド配列は、T 3 4 E / T 6 5 C / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、T 3 4 E / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、V 6 2 I / T 6 5 C / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / M 5 6 5 V、V 6 2 I / T 6 5 C / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V / Q 6 3 6 H / D 7 3 1 Q、V 6 2 I / T 6 5 C / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V / D 7 3 1 Q、V 6 2 I / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I、V 6 2 I / A 3 2 3 G / N 4 0 6 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V、および V 6 2 I / A 3 2 3 G / L 4 1 1 I / M 5 6 5 V から選択される少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、これらの位置は、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている。

【0038】

本発明は、本明細書で提供される少なくとも 1 つの操作されたスクロースシンターゼポリペプチドをコードする操作されたポリヌクレオチドも提供する。本発明は、本明細書で提供される少なくとも 1 つの操作されたスクロースシンターゼをコードする少なくとも 1 つの操作されたポリヌクレオチドを含むベクターをさらに提供する。一部の実施形態では

10

20

30

40

50

、ベクターは、少なくとも1つの制御配列をさらに含む。本発明は、少なくとも1つのスクロースシンターゼをコードする少なくとも1つの操作されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞も提供する。一部の実施形態では、宿主細胞は、少なくとも1つのスクロースシンターゼをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む少なくとも1つのベクターを含む。一部の実施形態（embodiments）では、宿主細胞は、真核生物および原核生物から選択される。本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたスクロースシンターゼ改変体を産生するための方法であって、本明細書で提供される宿主細胞を、操作されたスクロースシンターゼ改変体が宿主細胞により産生されるような条件下で培養するステップを含む方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、操作されたスクロースシンターゼ改変体を回収するステップをさらに含む。本発明は、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたスクロースシンターゼ改変体を含む組成物も提供する。

10

【0039】

本発明は、基質のグリコシル化のための方法であって、少なくとも1つの基質、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、および基質とグリコシルトランスフェラーゼとを、基質がグリコシル化されて少なくとも1つのグリコシル化産物を産生するような条件下で接触させるステップを含む方法も提供する。一部の実施形態では、基質は、少なくとも1個のステビオールグリコシドを含む。一部の追加の実施形態では、グリコシル化産物は、少なくとも1つのモノグリコシル化および／またはポリグリコシル化産物を含む。

20

【0040】

本発明は、レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、NDP-グルコース、ならびに本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、レバウジオシドDおよびレバウジオシドI基質、NDP-グルコース、ならびにグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0041】

本発明は、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP-グルコース、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、NDP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

30

【0042】

本発明は、レバウジオシドDを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP-グルコース、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、NDP-グルコース、グリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドDが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

40

【0043】

本明細書で提供される方法の一部の実施形態では、NDP-グルコースは、ADP-グルコース、CDP-グルコース、TDP-グルコース、GDP-グルコース、および／またはIDT-グルコースから選択される。一部のさらなる実施形態では、NDP-グルコースは、UDP-グルコースではない。

【0044】

本発明は、レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、ADP-グルコース、ならびに本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、ADP-グルコース、ならびにグリコシ

50

ルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0045】

本発明は、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、ADP-グルコース、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたADP-グリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、ADP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0046】

本発明は、レバウジオシドDを産生するための方法であって、ステビオシド基質、ADP-グルコース、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、ADP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドDが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0047】

本発明は、レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、ならびに本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、レバウジオシドD基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0048】

本発明は、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0049】

本発明は、レバウジオシドDを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドDが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0050】

本発明は、レバウジオシドMを産生するための方法であって、少なくとも1つのステビオシドを含むおよび／またはステビオシドとrebAの混合物を含むステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、ならびに本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供する。

【0051】

本発明は、レバウジオシドMを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、少なくとも1つのスクロースシンターゼ、および本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、ステビオシド基質、NDP、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAが先ず産生され、次いでレバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドIが産生され、最後にレバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む方法も提供す

る。

【0052】

本明細書で提供される方法の一部の実施形態では、スクロースシンターゼは、本明細書で提供される操作されたスクロースシンターゼである。本明細書で提供される方法の一部のさらなる実施形態では、方法は、ワンポット反応として行われる。一部の代替実施形態では、方法は、逐次的に行われる。さらに一部の追加の実施形態では、方法は、方法のステップを反復するステップをさらに含む。一部のさらなる実施形態では、スクロースは、反復されるステップを通して再利用される。一部の追加の実施形態では、操作されたグリコシルトランスフェラーゼおよび／または他の反応成分は、再利用される。さらに一部のさらなる実施形態では、ステビオシド基質は、*Stevia rebaudiana*から抽出される。一部の追加の実施形態では、ステビオシド基質は、合成により産生される。さらに一部のさらなる実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼおよび／またはスクロースシンターゼは、固定化されている。一部のさらなる実施形態では、方法は、フルクトースを含む反応産物を産生する。さらに一部のさらなる実施形態では、フルクトースは、反応産物から除去される。一部の実施形態では、方法は、洗浄ステップをさらに含む。一部の追加の実施形態では、方法は、少なくとも1つのカラムクロマトグラフィーステップをさらに含む。方法のさらに一部の追加の実施形態では、少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、本明細書で提供されるグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター1，2-グリコシルトランスフェラーゼである。方法の一部の追加の実施形態では、少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、本明細書で提供されるグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター1，3-グリコシルトランスフェラーゼである。方法の一部の実施形態では、少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼは、本明細書で提供されるグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター1，2-グリコシルトランスフェラーゼであり、本明細書で提供されるグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター1，3-グリコシルトランスフェラーゼであることをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、本明細書で提供される少なくとも1つの操作されたスクロースシンターゼをさらに含む。

【0053】

本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生される少なくとも1つのレバウジオシドも提供する。本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生されるレバウジオシドを含む組成物も提供する。一部の実施形態では、レバウジオシドMは、本明細書で提供される方法に従って産生される。本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生されるレバウジオシドMを含む組成物も提供する。

【0054】

一部の実施形態では、レバウジオシドAは、本明細書で提供される方法に従って産生される。本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生されるレバウジオシドAを含む組成物も提供する。一部の実施形態では、レバウジオシドIは、本明細書で提供される方法に従って産生される。本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生されるレバウジオシドIを含む組成物も提供する。一部の実施形態では、レバウジオシドDは、本明細書で提供される方法に従って産生される。本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生されるレバウジオシドDを含む組成物も提供する。一部の実施形態では、レバウジオシドの混合物は、本明細書で提供される方法に従って産生される。本発明は、本明細書で提供される方法に従って産生されるレバウジオシドの混合物を含む組成物も提供する。一部の実施形態では、混合物は、本明細書で提供される方法に従って産生される少なくとも1つのレバウジオシドを含む少なくとも2つの組成物を含む。本発明は、本明細書で提供される少なくとも2つのレバウジオシドの混合物を含む組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1は、グリコシルトランスフェラーゼが、ヌクレオシドジホスホグルコース（NDP-グルコース）、例えばADP-グルコース、からのグルコシル基の、アクセプタ

一、例えば $R-OH$ （式中、 R は、任意のグリコシル、アルコキシ、カルボキシ、アミノカルボニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボキシアルキル、アミノアルキル、ハロアルキル、アルキルチオアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、またはヘテロアリールアルキル基である）への転移を触媒する、酵素反応スキームを提供する図である。さらなる実施形態では、 $R-OH$ は、ステビオシドまたはレバウジオシドDであり、産物は、レバウジオシドA、レバウジオシドI、またはレバウジオシドMである。ヌクレオシドニリン酸依存性シンターゼは、NDP-グルコースを再生して副産物（例えば、フルクトース）を放出する、グルコースドナー（例えば、スクロース）からのグリコシル基のヌクレオシドニリン酸への転移を触媒する。

【0056】

【図2】図2は、炭素に番号を付けたレバウジオシドMの構造を提供する図である。

【0057】

【図3】図3は、炭素に番号を付けたレバウジオシドIの構造を提供する図である。

【発明を実施するための形態】

【0058】

本発明は、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ（GT）酵素、GT活性を有するポリペプチド、およびこれらの酵素をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は、操作されたスクロースシンターゼ（SuS）酵素、SuS活性を有するポリペプチド、およびこれらの酵素をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含むベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明は、GT酵素を含む組成物、およびβ-グルコース結合を有する産物を作製するために操作されたGT酵素を使用する方法を、さらに提供する。本発明は、レバウジオシド（例えば、レバウジオシドM、レバウジオシドA、レバウジオシドIおよびレバウジオシドD）の産生のための組成物および方法をさらに提供する。本発明は、SuS酵素を含む組成物、およびそれらを使用する方法も提供する。GTおよびSuS酵素を産生する方法も提供される。

【0059】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての専門および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を一般に有する。一般に、本明細書で使用される命名法、ならびに下記の細胞培養、分子遺伝学、微生物学、有機化学、分析化学および核酸化学の実験手順は、当技術分野において周知かつ一般に利用されているものである。そのような技術は、周知であり、当業者に周知の非常に多くの教科書および参考文献に記載されている。標準的な技術またはそれらの改良形態が、化学合成および化学分析に使用される。本明細書において上記および下記両方で言及される全ての特許、特許出願、論文および刊行物は、これにより参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0060】

本明細書に記載のものと同様または同等の任意の好適な方法および材料が本発明の実施の際に使用されるが、一部の方法および材料が本明細書に記載される。本発明が、記載される特定の метод論、プロトコールおよび試薬に限定されないことは、これらの方法論、プロトコールおよび試薬はそれらが当業者によって使用される状況に依存して変わり得るので、理解されるはずである。したがって、直ぐ下で定義される用語は、本発明に総じて言及することによりさらに十分に説明される。

【0061】

上述の概要および下記の詳細な説明の両方が、例示的かつ説明的なものに過ぎず、本発明を制限するものでないことを、理解されたい。本明細書で使用される節の見出しは、構成を目的としたものに過ぎず、記載される主題を限定するものと見なすべきでない。数値範囲は、範囲を規定する数を含む。したがって、本明細書で開示されるあらゆる数値範囲は、そのようなより広い数値範囲内に入るあらゆるより狭い数値範囲を、そのようなより狭い数値範囲が全て本明細書に明確に記載されているかのごとく包含するように意図され

10

20

30

40

50

ている。本明細書で開示されるあらゆる最大（または最小）数値限度は、あらゆる数値下（上）限を、そのような数値下（上）限が本明細書に明確に記載されているかのごとく含むことも、意図されている。

【0062】

略号および定義

遺伝子コードされるアミノ酸について使用される略号は、従来通りであり、以下の通りである：アラニン（A l aまたはA）、アルギニン（A r gまたはR）、アスパラギン（A s nまたはN）、アスパラギン酸（A s pまたはD）、システイン（C y sまたはC）、グルタミン酸（G l uまたはE）、グルタミン（G l nまたはQ）、ヒスチジン（H i sまたはH）、イソロイシン（I l eまたはI）、ロイシン（L e uまたはL）、リシン（L y sまたはK）、メチオニン（M e tまたはM）、フェニルアラニン（P h eまたはF）、プロリン（P r oまたはP）、セリン（S e rまたはS）、トレオニン（T h rまたはT）、トリプトファン（T r pまたはW）、チロシン（T y rまたはY）、およびバリン（V a lまたはV）。3文字略号が使用されるとき、特に、「L」もしくは「D」が先行する場合または略号が使用される文脈から明らかである場合を除き、アミノ酸は、 α 炭素（C α ）についてL立体配置であってもよく、またはD立体配置であってもよい。例えば、「A l a」は、 α 炭素についての立体配置の指定のないアラニンを示すが、「D-A l a」および「L-A l a」は、それぞれ、D-アラニンおよびL-アラニンを示す。1文字略号が使用されるとき、大文字は、 α 炭素についてL-立体配置のアミノ酸を示し、小文字は、 α 炭素についてD-立体配置のアミノ酸を示す。例えば「A」は、L-アラニンを示し、「a」は、D-アラニンを示す。ポリペプチド配列が一連の1文字または3文字略号（またはその混合形）として提示されるとき、配列は、一般的な慣習に従ってアミノ（N）からカルボキシ（C）への方角で提示される。

【0063】

遺伝子コードされるヌクレオシドについて使用される略号は、従来通りであり、次の通りである：アデノシン（A）、グアノシン（G）、シチジン（C）、チミジン（T）、およびウリジン（U）。詳しい説明が特にない場合は、略記されたヌクレオシドは、リボヌクレオシドであることもあり、または2'-デオキシリボヌクレオシドであることもある。ヌクレオシドは、個別にまたは集合的に、リボヌクレオシドまたは2'-デオキシリボヌクレオシドのどちらかであると指定されることがある。核酸配列が、一連の1文字略号として提示されるとき、配列は、一般的な慣例に従って5'から3'方向に提示され、リン酸は示されない。

【0064】

本発明に関して、本明細書での説明に使用される専門および科学用語は、別段の特別な定義がない限り、当業者によって一般に理解されている意味を有することとする。したがって、以下の用語は、以下の意味を有するように意図されている。

【0065】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの（a）」、「1つの（a n）」および「その（t h e）」は、別段の文脈による明確な指示がない限り、複数の言及対象を含む。したがって、例えば、「ポリペプチド（a p o l y p e p t i d e）」は、1つより多くのポリペプチドを含む。

【0066】

同様に、「含む（c o m p r i s e）」、「含む（c o m p r i s e s）」、「含む（c o m p r i s i n g）」、「含む（i n c l u d e）」、「含む（i n c l u d e s）」および「含む（i n c l u d i n g）」は、置き換え可能であり、限定することを意図したものではない。したがって、本明細書で使用される場合、用語「含む（c o m p r i s i n g）」およびその同語源語は、それらの包括的な意味で使用される（すなわち、用語「含む（i n c l u d i n g）」およびその対応する同語源語と同等である）。

【0067】

様々な実施形態の説明が用語「含む（c o m p r i s i n g）」を使用する場合、一部

10

20

30

40

50

の具体的な事例では、実施形態が、その代わりに「から本質的になる」または「からなる」という言葉を使用して説明されることがあることは、当業者に理解されるであろう。

【0068】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、特定の値についての許容される誤差を意味する。一部の事例では、「約」は、所与の値範囲の0.05%、0.5%、1.0%または2.0%以内を意味する。一部の事例では、「約」は、所与の値の1標準偏差、2標準偏差、3標準偏差または4標準偏差以内を意味する。

【0069】

本明細書で使用される場合、「EC」番号は、国際生化学・分子生物学連合の命名法委員会 (the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (NC-IUBMB) の酵素命名法をいう。IUBMB生化学分類は、酵素についての、それらが触媒する化学反応に基づく、数値分類体系である。

【0070】

本明細書で使用される場合、「ATCC」は、米国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) を指し、そのバイオレポジトリコレクションは、遺伝子および株を含む。

【0071】

本明細書で使用される場合、「NCBI」は、米国国立生物学情報センター (National Center for Biological Information) およびそこで提供されている配列データベースを指す。

【0072】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」は、長さや翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）を問わず、アミド結合により共有結合で連結されている少なくとも2個のアミノ酸のポリマーを示すために、本明細書では同義的に使用される。この定義には、D-アミノ酸、L-アミノ酸、D-アミノ酸とL-アミノ酸の混合物、D-アミノ酸を含むポリマー、L-アミノ酸を含むポリマー、およびD-アミノ酸とL-アミノ酸の混合物を含むポリマーが含まれる。

【0073】

「アミノ酸」は、本明細書では、それらの一般に公知の3文字記号、またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨される1文字記号のどちらかによって言及される。ヌクレオチドは、同様に、それらの一般に受け入れられている1文字コードによって言及され得る。

【0074】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、共有結合で互いに連結されている2つまたはそれより多くのヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは、完全にリボヌクレオチド（すなわち、RNA）から構成されることもあり、完全に2'デオキシリボヌクレオチド（すなわち、DNA）から構成されることもあり、またはリボヌクレオチドと2'デオキシリボヌクレオチドの混合物から構成されることもある。ヌクレオシドは、典型的には、標準的なホスホジエステル連結によって互いに連結されているが、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の非標準的連結を含むこともある。ポリヌクレオチドは、一本鎖状もしくは二本鎖状であることもあり、または一本鎖領域と二本鎖領域両方を含むこともある。さらに、ポリヌクレオチドは、典型的には、天然に存在するコード核酸塩基（すなわち、アデニン、グアニン、ウラシル、チミンおよびシトシン）で構成されているが、例えばイノシン、キサントシン、ヒポキサントシンなどのような、1つまたは複数の修飾および／または合成核酸塩基を含むこともある。一部の実施形態では、そのような修飾または合成核酸塩基は、アミノ酸配列をコードする核酸塩基である。

【0075】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」は、核酸塩基（すなわち、窒素含有塩基）と5炭糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）とを含むグリコシルアミンを指

10

20

30

40

50

す。ヌクレオシドの非限定的な例としては、シチジン、ウリジン、アデノシン、グアノシン、チミジンおよびイノシンが挙げられる。対照的に、用語「ヌクレオチド」は、核酸塩基と5炭糖と1つまたは複数のリン酸基とを含むグリコシルアミンを指す。一部の実施形態では、ヌクレオシドをキナーゼによりリン酸化してヌクレオチドを生じさせることができる。

【0076】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシドニリン酸」は、核酸塩基（すなわち、窒素含有塩基）と5炭糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）とニリン酸（すなわち、ピロリン酸）部分とを含むグリコシルアミンを指す。本明細書における一部の実施形態では、「ヌクレオシドニリン酸」は、「NDP」と略記される。ヌクレオシドニリン酸の非限定的な例としては、シチジンニリン酸（CDP）、ウリジンニリン酸（UDP）、アデノシンニリン酸（ADP）、グアノシンニリン酸（GDP）、チミジンニリン酸（TDP）、およびイノシンニリン酸が挙げられる。用語「ヌクレオシド」および「ヌクレオチド」は、一部の文脈では同義的に使用されることもある。

【0077】

本明細書で使用される場合、「コード配列」は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸（例えば、遺伝子）のその部分を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、用語「生体触媒作用」、「生体触媒（の）」、「生体内変換」および「生合成」は、有機化合物に対する化学反応を行うための酵素の使用を指す。

【0079】

本明細書で使用される場合、「グリコシルトランスフェラーゼ」（GT）は、活性化された糖ドナーからグリコシル残基を単量体および多量体アクセプター分子に転移する酵素能力があるポリペプチドを指す。一部の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼは、「グリコシルトランスフェラーゼ改変体」または「グリコシルトランスフェラーゼ組合せ改変体」と呼ばれる。一部の実施形態では、「グリコシルトランスフェラーゼ」は、UDPを放出してアクセプターβ-D-グルクロノシドを形成する、UDP-α-D-グルクロン酸からのグルコース（UDP-グルコースとしても公知）のアクセプターへの転移を触媒する、分類EC 2. 4. 1. 17のUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ酵素を指す。糖質関連酵素データベース（CAZy）は、グリコシルトランスフェラーゼファミリーの継続的に更新されているリストを提供している。一部の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼは、これらに限定されないが、GT1ファミリーに分類される酵素を含む。一部の好ましい実施形態では、本発明のグリコシルトランスフェラーゼ改変体は、ADP-グルコースを優先的に利用する。一部の追加の実施形態では、本発明のグリコシルトランスフェラーゼ酵素は、UDP-グルコースを利用しない。一部のさらなる実施形態では、本発明のグリコシルトランスフェラーゼ改変体は、ADP-グルコース、CDP-グルコース、TDP-グルコース、GDP-グルコースおよび／またはIDP-グルコースを利用するが、UDP-グルコースを利用しない。したがって、一部の好ましい実施形態では、本発明は、ADP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（ADP-グリコシルトランスフェラーゼ；AGT）、CDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（CDP-グリコシルトランスフェラーゼ；CGT）、GDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（GDP-グリコシルトランスフェラーゼ；GGT）、TDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（TDP-グリコシルトランスフェラーゼ；TGT）、およびIDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（IDP-グリコシルトランスフェラーゼ；IGT）を提供する。

【0080】

本明細書で使用される場合、「NDP-グリコシルトランスフェラーゼ」（NDP-GT）は、NDPである活性化された糖ドナーからグリコシル残基を単量体および多量体アクセプター分子に転移する酵素能力があるポリペプチドを指す。一部の実施形態では、NDP-グリコシルトランスフェラーゼは、一般に、「グリコシルトランスフェラーゼ」と

呼ばれる。実際、本明細書で使用される場合の用語「グリコシルトランスフェラーゼ」は、A D P－グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（A D P－グリコシルトランスフェラーゼ；A G T）、C D P－グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（C D P－グリコシルトランスフェラーゼ；C G T）、G D P－グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（G D P－グリコシルトランスフェラーゼ；G G T）、T D P－グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（T D P－グリコシルトランスフェラーゼ；T G T）、およびI D P－グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ（I D P－グリコシルトランスフェラーゼ；I G T）を含むがこれらに限定されない、N D P－グリコシルトランスフェラーゼを包含する。一部の実施形態では、本発明のグリコシルトランスフェラーゼ酵素は、A D P－グルコース、C D P－グルコース、T D P－グルコース、G D P－グルコースおよび／またはI D T－グルコースを利用するが、U D P－グルコースを利用しない。一部の追加の実施形態では、これらの酵素は、「改変体」または「組合せ改変体」（例えば、A D P－グリコシルトランスフェラーゼ改変体）と呼ばれる。

【0081】

本明細書で使用される場合、「トランスグリコシル化」は、グリコシル残基が二糖、三糖またはオリゴ糖ドナーから非グリコシル化またはグリコシル化ドナー分子に転移される反応を指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、「トランスグリコシル化」は、転移されるグリコシル残基がグルコースであり、二糖、三糖またはオリゴ糖ドナーがグルコースを含有する、トランスグリコシル化反応を指す。

【0083】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化」は、グリコシル残基とアクセプター分子との間のグリコシド結合の形成を指す。

【0084】

本明細書で使用される場合、「グルコシル化」は、グルコース残基とアクセプター分子との間のグリコシド結合の形成を指す。

【0085】

本明細書で使用される場合、「グリコシル」は、環状型の単糖、低級オリゴ糖またはオリゴ糖誘導体からヘミアセタールヒドロキシル基を除去することにより得られる一価フリーラジカルまたは置換基構造である有機基を指す。グリコシル基は、無機酸（例えば、リン酸）と反応してエステル（例えば、グルコース1－リン酸）を形成する。

【0086】

本明細書で使用される場合、「グリコシド」は、炭水化物（例えば、糖）がグリコシド結合により別の官能基に結合されている分子を指す。グリコシドを加水分解して、糖および非糖（すなわち、アグリコン）成分を生じさせることができる。

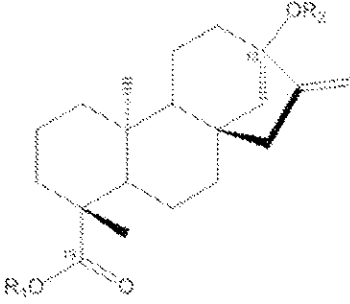
【0087】

本明細書で使用される場合、用語「ステビオールグリコシド」は、天然に存在するステビオールグリコシド（例えば、ステビオシド、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、ルブソシド、ズルコシドB、ズルコシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドG、レバウジオシドC、レバウジオシドF、レバウジオシドA、レバウジオシドE、レバウジオシドH、レバウジオシドL、レバウジオシドK、レバウジオシドJ、レバウジオシドM（レバウジオシドXとも呼ばれる）、レバウジオシドD、レバウジオシドN、レバウジオシドO）、および合成ステビオールグリコシド（例えば、酵素によってグルコシル化されたステビオールグリコシド）、ならびにこれらの組合せを含むがそれらに限定されない、ステビオールのグリコシドを指す。ステビオールおよびそのグリコシドの化学構造は、下にある（W O 2 0 1 3 / 1 7 6 7 3 8を参照されたい）。

【0088】

本明細書で使用される場合、「ステビオシド基質」は、少なくとも1つのステビオールグリコシドを含む任意の好適な物質を指す。

【表 A - 1】

ステピオールおよびそのグリコシドの化学構造		
		
グリコシド	R ₁	R ₂
ステピオール	H	H
ステピオールモノシド	H	Glcβ1-
ステピオールモノグルコシル エステル	Glcβ1-	H
ルブソシド	Glcβ1-	Glcβ1-
ステピオールピオシド	H	Glcβ (1-2) Glcβ1-
ズルコシド A	Glcβ1-	Rhaα(1-2) Glcβ1-
ステピオシド	Glcβ1-	Glcβ (1-2) Glcβ1-
レバウジオシド B	H	Glcβ (1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-
レバウジオシド C	Glcβ1-	Rhaα(1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-

【表 A - 2】

ステピオールおよびそのグリコシドの化学構造		
レバウジオシド A	Glcβ1-	Glcβ (1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-
レバウジオシド D	Glcβ (1-2) Glcβ1-	Glcβ (1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-
レバウジオシド I	Glcβ (1-3) Glcβ1-	Glcβ (1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-
レバウジオシド M	Glcβ (1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-	Glcβ (1-2)[Glcβ (1-3)] Glcβ1-
(Glc=グルコース、Rha=ラムノース)		

【0089】

本明細書で使用される場合、「スクロースシンターゼ」は、NDPおよびスクロースへのNDP-グルコース+D-フルクトースの化学反応を可逆的に触媒するグリコシルトランスフェラーゼ酵素（EC2.4.1.1.13）を指す。一部の実施形態では、本発明

は、*Acidithiobacillus caldus* スクロースシンターゼ（「*Ac Su S*」）の改変体を提供する。一部の実施形態では、これらの酵素は、「スクロースシンターゼ改変体」、「*Su S*」、「*SUS*」、「*Su S* 改変体」、「*SUS* 改変体」、「スクロースシンターゼ組合せ改変体」、または「*Su S* 組合せ改変体」、または「*SUS* 組合せ改変体」と呼ばれる。一部の実施形態では、これらの改変体は、ウリジン以外のNDPを優先的に利用する（すなわち、UDP-グルコースではなく、ADP-グルコース、CDP-グルコース、TDP-グルコース、GDP-グルコースおよび／またはIDP-グルコースが、利用される）。一部の実施形態では、これらの改変体は、UDP-グルコースを利用しない。

【0090】

本明細書で使用される場合、用語「ワンポット反応」は、1つの反応容器内での目的のレバウジオシドの産生を指す。一部の実施形態では、この用語は、*reb A* および／またはステビオシドを含むがこれらに限定されない出発物質からの *reb M* の、他のレバウジオシド（例えば、*reb D* および／または *reb I*）の中間体産生を伴う、産生に関して使用される。一部の実施形態では、ステビオシドの *Reb A* への変換、*Reb A* から *Reb D* および／または *Reb I* への変換、ならびに *Reb D* および／または *Reb I* から *Reb M* への変換が、1つの反応容器内で複数の酵素カスケードとして行われる。

【0091】

本明細書で使用される場合、「野生型」および「天然に存在する」は、自然界に見られる形態を指す。例えば、野生型ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、生物に存在する配列であって、自然界の供給源から単離することができ、ヒトによる操作によって意図的に修飾されていない、配列である。

【0092】

本明細書で使用される場合、細胞、核酸またはポリペプチドに関して使用されるとき「組換え」、「操作された」、および「天然に存在しない」は、そうしなければ自然界に存在しない様式で修飾されている物質またはこの物質の天然もしくはネイティブ形態に対応する物質を指す。一部の実施形態では、細胞、核酸またはポリペプチドは、天然に存在する細胞、核酸またはポリペプチドと同一であるが、合成物質からおよび／または組換え技術を使用する操作により産生または誘導される。非限定的な例としては、数ある中でも特に、ネイティブ（非組換え）形態の細胞内に見られない遺伝子を発現する、またはそうしなければ異なるレベルで発現されるネイティブ遺伝子を発現する、組換え細胞が挙げられる。

【0093】

用語「配列同一性パーセント（％）」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の比較を指すために本明細書で使用され、比較ウィンドウにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較することにより決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、これら2つの配列の最適なアラインメントのために参照配列と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことがある。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に出現する位置の数を決定してマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性パーセンテージを得ることによって計算することができる。あるいは、パーセンテージは、同一の核酸塩基もしくはアミノ酸残基のいずれかが両方の配列に出現する位置の数または核酸塩基もしくはアミノ酸残基がギャップを用いてアラインメントされる位置の数を決定してマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性パーセンテージを得ることによって計算することができる。2配列のアラインメントに利用可能な多数の確立されたアルゴリズムがあることは、当業者には理解される。比較のための配列の最適なアラインメントは、当技術分野において公知であるように、*Smith* および *Waterman* の局所相同性アルゴリズム（*Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 [1981]*）を含むがこれに限定され

10

20

30

40

50

ない、任意の好適な方法により、NeedlemanおよびWunschの相同性アラインメントアルゴリズム (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 [1970]) により、PearsonおよびLipmanの類似性検索方法 (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]) により、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行 (例えば、GCG Wisconsin Software PackageのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA) により、または目視検査により、行うことができる。配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントの決定に好適であるアルゴリズムの例としては、これらに限定されないが、Altschulらによって記載されているBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムが挙げられる (それぞれ、Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]; およびAltschul et al., Nucl. Acids Res., 3389-3402 [1977] を参照されたい)。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) のウェブサイトを通して公的に入手できる。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインメントしたときにマッチするか何らかの正の値の閾スコアTを満たす、問い合わせ配列中の長さWの短いワードを特定することによって、高スコアの配列対 (HSP) を先ず特定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul et al., 上掲を参照されたい)。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するためのシードとしての役割を果たす。次いで、ワードヒットが、累積アラインメントスコアを増加することができる限り、各配列に沿って両方向に拡大される。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM (マッチする残基対についての報酬スコア、常に >0) およびN (ミスマッチの残基についてのペナルティスコア、常に <0) を使用して計算される。アミノ酸配列については、累積スコアを計算するためにスコア行列が使用される。各方向のワードヒットの拡大は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ低下すると、停止され; 累積スコアが、1つもしくは複数の負のスコアの残基アラインメントの累積に起因してゼロもしくはそれ未満になると、停止され; またはどちらかの配列の末端に達すると停止される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列について) は、デフォルトとして、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列についてのBLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長 (W) 3、期待値 (E) 10、およびBLOSUM62スコア行列を使用する (Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989] を参照されたい)。配列アラインメントおよび配列同一性%の例示的決定は、提供されているデフォルトパラメーターを使用して、GCG Wisconsin Software package (Accelrys, Madison WI) のBESTFITまたはGAPプログラムを利用することができる。

【0094】

本明細書で使用される場合、「参照配列」は、配列および／または活性比較の基準として使用される定義された配列を指す。参照配列は、より大きい配列のサブセット、例えば、完全長遺伝子またはポリペプチド配列のセグメントであることもある。一般に、参照配列は、核酸またはポリペプチドの長さ少なくとも20ヌクレオチドまたはアミノ酸残基、長さ少なくとも25残基、長さ少なくとも50残基、長さ少なくとも100残基または完全長である。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、各々、(1) 2配列間で類似している配列 (すなわち、完全配列の一部) を含むことがあり、かつ(2) 2配列間で相違する配列をさらに含むことがあるので、2つの (またはそれより多くの) ポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列比較は、配列類似性の局所領域を同定し、比較する

ために、「比較ウィンドウ」にわたって2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を比較することによって典型的に行われる。一部の実施形態では、「参照配列」は、一次アミノ酸配列に基づくことがあり、この場合、参照配列は、一次配列の1つまたは複数の変化を有し得る配列である。

【0095】

本明細書で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20の連続するヌクレオチド位置またはアミノ酸残基の概念上のセグメントであって、少なくとも20個の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と配列を比較することができ、比較ウィンドウ内のその配列の部分が、2配列の最適なアラインメントのために参照配列（付加も欠失も含まない）と比較して20パーセントまたはそれ未満の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る、セグメントを指す。比較ウィンドウは、20個の連続する残基より長いこともあり、必要に応じて30、40、50、100またはそれより長いウィンドウを含む。

【0096】

本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の番号付けの文脈で使用されるとき「～に対応する」、「～に対して」および「～と比較して」は、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列が参照配列と比較されるとき指定参照配列の残基の番号付けを指す。言い換えると、所与のポリマーの残基番号または残基位置は、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の番号の位置によるのではなく、参照配列に対して示される。例えば、所与のアミノ酸配列、例えば、操作されたグリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列は、2配列間の残基マッチを最適化するためにギャップを導入することによって参照配列とアラインメントすることができる。これらの場合、ギャップが存在するが、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列中の残基の番号付けは、それがアラインメントされた参照配列に対して行われる。

【0097】

本明細書で使用される場合、「実質的同一性」は、少なくとも20残基位置の比較ウィンドウにわたって、多くの場合、少なくとも30～50残基のウィンドウにわたって、参照配列と比較して少なくとも80パーセントの配列同一性、少なくとも85パーセントの同一性、少なくとも89～95パーセントの間の配列同一性、またはより通常は少なくとも99パーセントの配列同一性を有する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を指し、この配列同一性パーセンテージは、合計で参照配列の20パーセントまたはそれ未満となる欠失または付加を含む配列と参照配列を比較ウィンドウにわたって比較することによって計算される。ポリペプチドに適用される一部の具体的な実施形態では、用語「実質的同一性」は、2つのポリペプチド配列が、最適にアラインメントされたとき、例えば、デフォルトギャップ重みを使用してプログラムGAPまたはBESTFITにより最適にアラインメントされたとき、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも89パーセントの配列同一性、少なくとも95パーセントの配列同一性またはそれより高い配列同一性（例えば、99パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。一部の実施形態では、比較される配列中の同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換が異なる。

【0098】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸相違」および「残基相違」は、参照配列中の対応する位置におけるアミノ酸残基と比較した、ポリペプチド配列の位置におけるアミノ酸残基の相違を指す。一部の場合には、参照配列は、ヒスチジンタグを有するが、番号付けは、ヒスチジンタグのない同等の参照配列と比較して維持される。アミノ酸相違の位置は、本明細書では一般に「X_n」と呼ばれ、この場合のnは、残基相違の基準となる参照配列中の対応する位置を指す。例えば、「配列番号4と比較してX₉₃位における残基相違」は、配列番号4の93位に対応するポリペプチド位置におけるアミノ酸残基の相違を指す。したがって、配列番号4の参照ポリペプチドが93位にセリンを有する場合には、「配列番号4と比較してX₉₃位における残基相違」は、配列番号4の93位に対応するポ

リペプチドの位置におけるセリン以外の任意の残基のアミノ酸置換。本明細書におけるほとんどの事例では、ある位置における特定のアミノ酸残基相違は、「X n Y」として示され、この場合、「X n」は、上記の通り対応する位置を指定し、「Y」は、操作されたポリペプチドに見られるアミノ酸（すなわち、参照ポリペプチド中のものとは異なる残基）の1文字識別子である。一部の事例では（例えば、実施例で提示される表において）、本発明は、従来表記「A n B」により示される特定のアミノ酸相違も提供し、この場合、Aは、参照配列中の残基の1文字識別子であり、「n」は、参照配列中の残基位置の番号であり、Bは、操作されたポリペプチドの配列中の残基置換の1文字識別子である。一部の事例では、本発明のポリペプチドは、参照配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸残基相違を含み、これは、参照配列と比較して残基相違が存在する特定の位置のリストにより示される。一部の実施形態では、1個より多くのアミノ酸をポリペプチドの特定の残基位置に使用することができる場合、使用することができる様々なアミノ酸残基は、「/」によって隔てられている（例えば、X 3 0 7 H / X 3 0 7 P または X 3 0 7 H / P）。スラッシュは、所与の改変体内の複数の置換（すなわち、1つより多くの置換が所与の配列に、例えば組合せ改変体に、存在すること）を示すためにも使用され得る。一部の実施形態では、本発明は、保存的または非保存的アミノ酸置換を含む1つまたは複数のアミノ酸相違を含む操作されたポリペプチド配列を含む。一部の追加の実施形態では、本発明は、保存的アミノ酸置換と非保存的アミノ酸置換の両方を含む操作されたポリペプチド配列を提供する。

【0099】

本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、類似の側鎖を有する異なる残基での残基の置換を指し、したがって、アミノ酸の同じまたは類似の定義されたクラス内のアミノ酸でのポリペプチド中のアミノ酸の置換を典型的には含む。例として、限定ではなく、一部の実施形態では、脂肪族側鎖を有するアミノ酸は、別の脂肪族アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）で置換され；ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸は、ヒドロキシル側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、セリンおよびトレオニン）で置換され；芳香族側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびヒスチジン）で置換され；塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性側鎖（*basic side chain*）を有する別のアミノ酸（例えば、リシンおよびアルギニン）で置換され；酸性側鎖を有するアミノ酸は、酸性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）で置換され；および/または疎水性もしくは親水性アミノ酸は、それぞれ、別の疎水性もしくは親水性アミノ酸で置き換えられる。

【0100】

本明細書で使用される場合、「非保存的置換」は、有意に異なる側鎖特性を有するアミノ酸でのポリペプチド中のアミノ酸の置換を指す。非保存的置換は、定義された群内ではなく定義された群間のアミノ酸を使用することがあり、（a）置換（例えば、プロリンでのグリシンの置換）の領域内のペプチド骨格の構造、（b）電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖の嵩に影響を与える。例として、限定ではなく、例示的非保存的置換は、塩基性または脂肪族アミノ酸で置換された酸性アミノ酸；小さいアミノ酸で置換された芳香族アミノ酸；および疎水性アミノ酸で置換された親水性アミノ酸であり得る。

【0101】

本明細書で使用される場合、「欠失」は、参照ポリペプチドからの1個または複数のアミノ酸の除去によるポリペプチドの修飾を指す。欠失は、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ酵素の酵素活性を保持しながら、および/または改善された特性を保持しながら、参照酵素を構成する1個もしくはそれより多くのアミノ酸、2個もしくはそれより多くのアミノ酸、5個もしくはそれより多くのアミノ酸、10個もしくはそれより多くのアミノ酸、15個もしくはそれより多くのアミノ酸、または20個もしくはそれより多くのアミノ酸、アミノ酸の総数の最大10%、またはアミノ酸の総数の最大20%の除去を含むことができる。欠失は、ポリペプチドの内部部分および/または末端部分に関すること

がある。様々な実施形態では、欠失は、連続するセグメントを含むこともあり、または不連続であることもある。欠失は、典型的には、アミノ酸配列の中で「-」によって示される。

【0102】

本明細書で使用される場合、「挿入」は、参照ポリペプチドからの1個または複数のアミノ酸の付加によるポリペプチドの修飾を指す。挿入は、ポリペプチドの内部部分におけるものであることもあり、またはカルボキシもしくはアミノ末端へのものであることもある。本明細書で使用される場合の挿入は、当技術分野において公知であるような融合タンパク質を含む。挿入は、天然に存在するポリペプチド中のアミノ酸の連続したセグメントであることもあり、またはアミノ酸の1個もしくは複数によって隔てられていることもある。

10

【0103】

「機能的断片」および「生物活性断片」は、アミノ末端および／もしくはカルボキシ末端欠失ならびに／または内部欠失を有するが、残りのアミノ酸配列は、それが比較される配列（例えば、本発明の完全長操作されたグリコシルトランスフェラーゼ）中の対応する位置と同一である、ポリペプチドであって、完全長ポリペプチドの活性の実質的に全てを保持するポリペプチドを指すために、本明細書では同義的に使用される。

【0104】

本明細書で使用される場合、「単離されたポリペプチド」は、天然にそれに付随する他の夾雑物（例えば、タンパク質、脂質およびポリヌクレオチド）から実質的に分離されているポリペプチドを指す。この用語は、それらの天然に存在する環境または発現系から除去または精製された（例えば、宿主細胞内のまたは *in vitro* 合成による）ポリペプチドを包含する。組換えグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、細胞内に存在することもあり、細胞培地に存在することもあり、または溶解物もしくは単離された調製物などの様々な形態で調製されることもある。したがって、一部の実施形態では、組換えグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、単離されたポリペプチドであることがある。

20

【0105】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋なポリペプチド」または「精製されたタンパク質」は、ポリペプチド種が、存在する優勢種である（すなわち、モル濃度または重量ベースで、それが組成物中のいずれの他の個々の高分子種より存在量が多い）組成物を指し、一般に、目的種が、存在する高分子種のモルまたは重量%で少なくとも約50パーセントを構成する場合には実質的に精製された組成物である。しかし、一部の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼを含む組成物は、50%未満純粋（例えば、約10%、約20%、約30%、約40%、または約50%）であるグリコシルトランスフェラーゼを含む。一般に、実質的に純粋なグリコシルトランスフェラーゼ組成物は、組成物中に存在する全高分子種のモルまたは重量%で約60%またはそれより高い%、約70%またはそれより高い%、約80%またはそれより高い%、約90%またはそれより高い%、約95%またはそれより高い%、および約98%またはそれより高い%を構成する。一部の実施形態では、目的種は、組成物が単一の高分子種から本質的になる本質的均質まで精製される（すなわち、従来の検出法により夾雑種を組成物中で検出することができない）。溶媒種、小分子（<500ダルトン）、および元素イオン種は、高分子種と見なされない。一部の実施形態では、単離された組換えグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

30

40

【0106】

本明細書で使用される場合、「改善された酵素特性」は、酵素の少なくとも1つの改善された特性を指す。一部の実施形態では、本発明は、参照グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドおよび／または野生型グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドおよび／または別の操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドと比較して任意の酵素特性の改善を示す、操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドを提供する。

50

したがって、「改善」のレベルは、野生型はもちろん操作されたグリコシルトランスフェラーゼも含む、様々なグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド間で、決定および比較され得る。改善された特性は、これらに限定されないが、タンパク質発現の増加、熱活性の増加、熱安定性の増大、pH活性の増加、安定性の増大、酵素活性の増加、基質特異性のまたは親和性の増大、比活性の増加、基質または最終産物阻害に対する耐性の増大、化学的安定性の増大、化学選択性の改善、溶媒安定性の改善、酸性pHに対する耐性の増大、タンパク質分解活性に対する耐性の増大（すなわち、タンパク質分解に対する感受性の低下）、凝集の低減、溶解度の増加、および温度プロファイルの変更のような特性を含む。追加の実施形態では、この用語は、スクロースシンターゼ酵素の少なくとも1つの改善された特性に関して使用される。一部の実施形態では、本発明は、参照スクロースシンターゼポリペプチドおよび／または野生型スクロースシンターゼポリペプチドおよび／または別の操作されたスクロースシンターゼポリペプチドと比較して任意の酵素特性の改善を示す、操作されたスクロースシンターゼポリペプチドを提供する。したがって、「改善」のレベルは、野生型はもちろん操作されたスクロースシンターゼも含む、様々なスクロースシンターゼポリペプチド間で、決定および比較され得る。

【0107】

本明細書で使用される場合、「酵素活性の増加」および「触媒活性の増強」は、参照酵素と比較して比活性（例えば、産生される産物／時間／タンパク質重量）の増加または基質の産物への変換パーセント（例えば、指定量の酵素を使用する指定期間内の出発量の基質の産物への変換パーセント）の上昇によって表され得る、操作されたポリペプチドの改善された特性を指す。一部の実施形態では、これらの用語は、参照グリコシルトランスフェラーゼ酵素と比較して比活性（例えば、産生される産物／時間／タンパク質重量）の増加または基質の産物への変換パーセント（例えば、指定量のグリコシルトランスフェラーゼを使用する指定期間内の出発量の基質の産物への変換パーセント）の上昇によって表され得る、本明細書で提供される操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドの改善された特性を指す。一部の実施形態では、これらの用語は、本明細書で提供される改善されたスクロースシンターゼ酵素に関して使用される。本発明の操作されたグリコシルトランスフェラーゼおよびスクロースシンターゼの酵素活性を決定するための例示的方法は、実施例で提供される。 K_m 、 V_{max} または k_{cat} （これらの変化は酵素活性の増加につながり得る）の古典的酵素特性を含む、酵素活性に関係する任意の特性が、影響を受け得る。例えば、酵素活性の改善は、対応する野生型酵素の酵素活性の約1.1倍から、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドが誘導された天然に存在するグリコシルトランスフェラーゼまたは別の操作されたグリコシルトランスフェラーゼの2倍、5倍、10倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍ほどのものまたはそれよりも高い酵素活性までであり得る。

【0108】

本明細書で使用される場合、「変換」は、基質の対応する産物への酵素的変換（または生体内変換）を指す。「変換パーセント」は、指定条件下で期間内に産物に変換される基質のパーセントを指す。したがって、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は、特定の期間内の産物への基質の「変換パーセント」として表すことができる。

【0109】

「ゼネラリスト（generalist）特性」を有する酵素（または「ゼネラリスト酵素」）は、親配列と比較して、広範な基質に対して改善された活性を示す酵素を指す。ゼネラリスト酵素は、あらゆる可能な基質に対して改善された活性を必ずしも実証しない。一部の実施形態では、本発明は、広範な立体的および電子的に多様な基質に対して親遺伝子と比較して同様のまたは改善された活性を示すことからゼネラリスト特性を有する、グリコシルトランスフェラーゼ改変体を提供する。加えて、本明細書で提供されるゼネラリスト酵素は、代謝物／産物の産生を増加させるために広範な多様な分子にわたって改善されるように操作された。

【0110】

用語「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、核酸ハイブリッドが安定している条件を指すために本明細書では使用される。当業者には公知であるように、ハイブリッドの安定性は、ハイブリッドの融解温度 (T_m) に反映される。一般に、ハイブリッドの安定性は、イオン強度、温度、G/C含量、およびカオトロピック剤の存在の関数である。ポリヌクレオチドの T_m 値は、融解温度を予測するための公知の方法を使用して計算することができる (例えば、Baldino et al., Meth. Enzymol., 168:761-777 [1989]; Bolton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390 [1962]; Bresslauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8893-8897 [1986]; Freier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9373-9377 [1986]; Kierzek et al., Biochem., 25:7840-7846 [1986]; Rychlik et al., Nucl. Acids Res., 18:6409-6412 [1990] (誤植、Nucl. Acids Res., 19:698 [1991]); Sambrook et al., 上掲; Suggs et al., 1981, in Developmental Biology Using Purified Genes, Brown et al. [eds.], pp. 683-693, Academic Press, Cambridge, MA [1981]; および Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227-259 [1991] を参照されたい)。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書で開示されるポリペプチドをコードし、中等度にストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件などの定義された条件下で、本発明の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードする配列の相補配列とハイブリダイズする。

【0111】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーションストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションの際の、洗浄条件などの、ハイブリダイゼーション条件を指す。一般に、ハイブリダイゼーション反応は、より低度のストリンジェンシーの条件下で行われ、これに様々な、しかしより高度な、ストリンジェンシーの洗浄が続く。用語「中等度にストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、標的DNAが、標的DNAに対して約60%の同一性、好ましくは、約75%の同一性、約85%の同一性とともにより標的ポリヌクレオチドに対して約90%より高い同一性を有する相補的核酸に結合することを可能にする条件を指す。例示的な中等度にストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2% SDS 中、42℃でのハイブリダイゼーション、続いて0.2×SSPE、0.2% SDS 中、42℃での洗浄に相当する条件である。「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」は、定義されたポリヌクレオチド配列についての溶液条件下で決定された熱融解温度 T_m から約10℃またはそれ未満である条件を一般に指す。一部の実施形態では、高ストリンジェンシー条件は、0.018M NaCl 中、65℃で安定したハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す (すなわち、ハイブリッドが、0.018M NaCl 中、65℃で、安定しない場合、それは、本明細書で企図されるような高ストリンジェンシー条件下で安定しないことになる)。高ストリンジェンシー条件は、例えば、0.1×SSPE、および0.1% SDS 中、65℃での洗浄が続く、42℃で50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2% SDS に相当する条件でのハイブリダイゼーションによって、提供され得る。別の高ストリンジェンシー条件は、0.1% (w/v) SDS を含有する5×SSC 中、65℃でのハイブリダイゼーションおよび0.1% SDS を含有する0.1×SSC 中、65℃での洗浄に相当する条件でのハイブリダイゼーションである。他の高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、および中等度にストリンジェントな条件は、上記の参考文献に記載されている。

【0112】

本明細書で使用される場合、「コドン最適化された」は、コードされたタンパク質が目的の生物において効率的に発現されるような、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンの、その特定の生物において優先的に使用されるコドンへの変化を指す。遺伝コードは、大部分のアミノ酸が、「シノニム」または「同義」コドンと呼ばれるいくつかのコドンによって表されることから縮重しているが、特定の生物によるコドン使用頻度がランダムでなく、特定のコドントリプレットに偏っていることは、周知である。このコドン使用頻度の偏りは、所与の遺伝子、共通の機能または祖先起源の遺伝子、低コピー数タンパク質に対して高度に発現されるタンパク質、および生物のゲノムの凝集タンパク質コード領域に関して、より高度であり得る。一部の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現に選択された宿主生物における最適な産生のためにコドン最適化され得る。

【0113】

本明細書で使用される場合、単独でまたは組み合わせて使用されるとき、「好ましい」コドン、「最適な」コドンおよび「高度のコドン使用頻度の偏り」コドンは、同義語として、同じアミノ酸をコードする他のコドンより高頻度でタンパク質コード領域において使用されるコドンを指す。好ましいコドンは、単一の遺伝子、共通の機能または起源の遺伝子のセット、高度に発現される遺伝子におけるコドン使用頻度に関して決定されることもあり、生物全体の凝集タンパク質コード領域におけるコドン頻度に関して決定されることもあり、関連生物の凝集タンパク質コード領域におけるコドン頻度に関して決定されることもあり、またはこれらの組合せに関して決定されることもある。頻度が遺伝子発現レベルに伴って増加するコドンは、典型的には発現に最適なコドンである。例えば、クラスター解析または対応解析を使用する、多変量解析を含む、特定の生物におけるコドン頻度（例えば、コドン使用頻度、相対同義コドン使用頻度）およびコドン選好を決定するための様々な方法、ならびに遺伝子において使用されるコドンの有効数を決定するための様々な方法が、公知である（例えば、GCG CodonPreference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodonW, Peden, University of Nottingham; McInerney, Bioinform., 14:372-73 [1998]; Stenico et al., Nucl. Acids Res., 22:2437-46 [1994]; および Wright, Gene 87:23-29 [1990] を参照されたい）。多くの異なる生物についてのコドン使用頻度表が入手可能である（例えば、Wada et al., Nucl. Acids Res., 20:2111-2118 [1992]; Nakamura et al., Nucl. Acids Res., 28:292 [2000]; Duret, et al., 上掲; Henaut and Danchin, in Escherichia coli and Salmonella, Neidhardt, et al. (eds.), ASM Press, Washington D.C., p. 2047-2066 [1996] を参照されたい）。コドン使用頻度を得るためのデータ源は、タンパク質をコードすることができる任意の利用可能なヌクレオチド配列に依拠す得る。これらのデータセットは、発現されるタンパク質（例えば、完全タンパク質コード配列-CDS）をコードすること、発現される配列タグ（ESTS）をコードすること、またはゲノム配列の予測コード領域をコードすることが実際に公知である核酸配列を含む（例えば、Mount, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Chapter 8, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [2001]; Uberbacher, Meth. Enzymol., 266:259-281 [1996]; および Tiwari et al., Comput. Appl. Biosci., 13:263-270 [1997] を参照されたい）。

【0114】

本明細書で使用される場合、「制御配列」は、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現に必要なまたは有利である全ての成分を含む。各制御配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列にとってネイティブのものであってもよいし、または外来のものであってもよい。そのような制御配列としては、これらに限定されないが、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター配列、シグナルペプチド配列、開始配列および転写ターミネーターを含む。少なくとも、制御配列は、プロモーター、ならびに転写および翻訳停止シグナルを含む。制御配列は、制御配列とポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域とのライゲーションを助長する特異的制限部位を導入するためにリンカーを備えていることもある。

【0115】

「作動可能に連結した」は、本明細書では、制御配列が、目的のポリヌクレオチドに対して相対的な位置に、制御配列が目的のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を指令または調節するように適切に（すなわち、機能的関係で）配置されている構成と定義される。

【0116】

「プロモーター配列」は、目的のポリヌクレオチドの発現について宿主細胞により認識される核酸配列、例えばコード配列を指す。プロモーター配列は、目的のポリヌクレオチドの発現を媒介する転写制御配列を含有する。プロモーターは、変異体、切断型およびハイブリッドプロモーターを含む、選ばれる宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列であり得、プロモーターを、宿主細胞にとって同種または異種のどちらかの細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

【0117】

「好適な反応条件」という句は、本発明のグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドが所望の産物化合物に基質を変換することができる、酵素的変換反応溶液における条件（例えば、酵素負荷量、基質負荷量、温度、pH、緩衝剤、共溶媒などの範囲）を指す。一部の例示的な「好適な反応条件」が本明細書で提供される。

【0118】

本明細書で使用される場合、「化合物負荷量」または「酵素負荷量」などにおける「負荷量」は、反応開始時の反応混合物中の成分の濃度または量を指す。

【0119】

本明細書で使用される場合、酵素的変換反応プロセスの文脈での「基質」は、本明細書で提供される操作された酵素（例えば、操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド）による作用を受ける化合物または分子を指す。

【0120】

本明細書で使用される場合、用語「バイオマス」、「バイオマス基質」、「セルロース系バイオマス」、「セルロース系供給材料」、および「セルロース基質」は、セルロースを含有する任意の材料を指す。バイオマスは、植物、動物または微生物に由来することがあり、農業、産業および林業残渣、産業および都市廃棄物、ならびにエネルギー目的で成長させた陸生および水生作物を、これらに限定されないが、含み得る。セルロース基質の例としては、これらに限定されないが、木材、木材パルプ、製紙用パルプ、トウモロコシ繊維、トウモロコシ穀粒、トウモロコシ穂軸、作物残渣、例えばトウモロコシ外皮、トウモロコシ莖葉、イネ科植物、小麦、麦わら、大麦、大麦わら、干し草、稲、稲わら、スイッチグラス、紙くず、紙加工およびパルプ処理廃棄物、木本または草本植物、果実または野菜の果肉、トウモロコシ穂軸、醸造用穀物、イネ科植物、もみ殻、綿、麻、亜麻、サイザル麻、サトウキビの絞りかす、ソルガム、大豆、スイッチグラス；穀物、木、枝、根、葉、木片、おがくず、低木、低木の茂み、野菜、果実および花の粉碎から得られる成分；ならびにこれらの任意の好適な混合物が挙げられる。一部の実施形態では、セルロース系バイオマスは、これらに限定されないが、栽培作物（例えば、スイッチグラス、コードグラス、ライグラス、ススキ、クサヨシまたはこれらの任意の組合せなどの、C4イネ科植物を含む、イネ科植物）、製糖残渣、例えば、これに限定されないが、絞りかす（例えば

10

20

30

40

50

、サトウキビの絞りかす、ビートパルプ〔例えば、サトウダイコン〕、またはこれらの組合せ)、農業残渣(例えば、ダイズ茎葉、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ繊維、稲わら、サトウキビわら、稲、もみ殻、大麦わら、トウモロコシ穂軸、麦わら、キャノーラわら、オート麦わら、オート麦の殻、トウモロコシ繊維、麻、亜麻、サイザル麻、綿、またはこれらの任意の組合せ)、果実の果肉、野菜の果肉、醸造用穀物、林業バイオマス(例えば、木材、木材パルプ、製紙用パルプ、再生木材パルプ繊維、おがくず、硬材、例えばポプラ材、軟材、またはこれらの組合せ)を含む。さらに、一部の実施形態では、セルロース系バイオマスは、紙加工およびパルプ処理廃棄物、新聞用紙、厚紙などを含むがこれらに限定されない、セルロース系廃材および／または林業廃材を含む。一部の実施形態では、セルロース系バイオマスは、一種類の繊維を含むが、一部の代替実施形態では、セルロース系バイオマスは、異なるセルロース系バイオマスに由来する繊維の混合物を含む。一部の実施形態では、バイオマスは、リグニナーゼおよび／またはセルラーゼ酵素を発現するトランスジェニック植物も含み得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0104724号を参照されたい)。

【0121】

本明細書で使用される場合、用語「スラリー」は、セルロース基質などの1つまたは複数の固体成分が分散されている水溶液を指す。

【0122】

本明細書で使用される場合、反応からの産物(例えば、ステビオールグリコシド)の収量の「増加」は、反応中に存在する特定の成分(例えば、GH酵素)が、目的の成分の非存在下だが同じ基質および他の置換基を用いて同じ条件下で行われた反応と比較して、より多くの産物を産生させる場合に起こる。

【0123】

本明細書で使用される場合、セルロースまたは他の多糖の「加水分解」は、基質中に存在する2つの単糖間のグリコシド結合の少なくとも一部が加水分解されるときに起こり、それによって、前に結合していた2つのモノマーから互いに解離することになる。

【0124】

特定の酵素の量が、反応を触媒することに関与する他の酵素と比較して約2%、約1%または約0.1%(wt/wt)未満であった場合、反応にはその特定の酵素が「実質的にない」ことになる。

【0125】

本明細書で使用される場合、液体(例えば、培養ブロス)を「分画すること」は、所望のタンパク質(例えば、レバウジオシド)が初期液体産物中より溶液中でのほうが全タンパク質に対して高いパーセンテージを構成する溶液を得るために分離プロセス(例えば、塩析沈殿、カラムクロマトグラフィー、サイズ排除、濾過)またはそのようなプロセスの組合せを適用することを意味する。

【0126】

本明細書で使用される場合、「出発組成物」は、少なくとも1つの基質を含む任意の組成物を指す。一部の実施形態では、出発組成物は、任意のセルロース基質を含む。

【0127】

一部の代替実施形態では、用語「出発組成物」は、少なくとも1つのステビオールグリコシドを含み、ステビオールグリコシドのうちの1つまたは複数が生体内変換の基質として作用する、任意の組成物を指す。一部の実施形態では、出発組成物は、水溶液として提供される。一部の実施形態では、出発組成物は、ステビオシド、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、ルブソシド、ズルコシドB、ズルコシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドG、レバウジオシドC、レバウジオシドF、レバウジオシドA、レバウジオシドI、レバウジオシドE、レバウジオシドH、レバウジオシドL、レバウジオシドK、レバウジオシドJ、レバウジオシドM(レバウジオシドXとも呼ばれる)、レバウジオシドD、レバウジオシドN、レバウジオシドO、および合成ステビオールグリコシド(例えば、酵素によってグルコシル化されたステビオールグリコシド)から選択される、少な

10

20

30

40

50

くとも1つのステビオールグリコシドを含む。一部の実施形態では、出発組成物は、2つまたはそれより多くのステビオールグリコシドを含む。一部の実施形態では、出発組成物は、*Stevia rebaudiana*植物材料（例えば、葉）の精製から得られる抽出物である。一部の代替実施形態では、出発組成物は、市販のステビア抽出物を含む。追加の出発組成物は、ステビオールグリコシドを単離および精製するために使用されるプロセスの副産物を含む。一部の実施形態では、出発組成物は、精製されたまたは部分的に精製されたステビオールグリコシド基質を含む。一部の実施形態では、出発組成物は、特定のステビオールグリコシドを約99重量%より多く含む。

【0128】

一部の実施形態では、出発組成物は、少なくとも1つのグリコシドとセルロース系成分とを、少なくとも1つのステビオールグリコシド（例えば、レバウジオシドA、Dなど）を産生するための基質として含む。

【0129】

本明細書で使用される場合、酵素的変換プロセスの文脈での「産物」は、基質に対する酵素ポリペプチドの作用の結果として生じる化合物または分子を指す。本明細書で 사용되는場合、一部の実施形態では、この用語は、基質に対するグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドの作用の結果として生じる化合物または分子を指す。一部の実施形態では、本発明により提供される産物は、ステビオールグリコシドである。一部の実施形態では、産物は、ステビオシド、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、ルブソシド、ズルコシドB、ズルコシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドG、レバウジオシドC、レバウジオシドF、レバウジオシドA、レバウジオシドI、レバウジオシドE、レバウジオシドH、レバウジオシドL、レバウジオシドK、レバウジオシドJ、レバウジオシドM（レバウジオシドXとも呼ばれる）、レバウジオシドD、レバウジオシドN、レバウジオシドO、および合成ステビオールグリコシド（例えば、酵素によってグルコシル化されたステビオールグリコシド）から選択される、少なくとも1つのステビオールのグリコシドを含む。

【0130】

本明細書で使用される場合、用語「培養すること」は、任意の好適な条件下で（例えば、液体、ゲルまたは固体培地を使用して）微生物細胞の集団を増殖させることを指す。

【0131】

組換えポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の好適な方法を使用して産生することができる。目的の野生型ポリペプチドをコードする遺伝子をプラスミドなどのベクター内にクローニングし、*E. coli*などの所望の宿主に発現させることができる。組換えポリペプチドの改変体を当技術分野において公知の様々な方法により生成することができる。実際、当業者に周知の多種多様な異なる変異誘発技術がある。加えて、変異誘発キットも、多くの商業的分子生物学供給業者から入手することができる。定義されたアミノ酸における特異的置換（部位指向性）、遺伝子の局所領域における特異的もしくはランダム変異（位置特異的）、または遺伝子全体にわたってのランダム変異誘発（例えば、飽和変異誘発）を行う方法を利用することができる。PCRを使用する一本鎖DNAもしくは二本鎖DNAの部位指向性変異誘発、カセット変異誘発、遺伝子合成、エラープロードPCR、シャフリング、および化学的飽和変異誘発、または当技術分野において公知の任意の他の好適な方法を含むがこれらに限定されない、酵素改変体を生成するための非常に多数の好適な方法が、当業者に公知である。発現させること、スクリーニングすることおよびアッセイすることができる改変体ライブラリーを生成するために、酵素をコードするポリヌクレオチドに変異誘発および定向進化方法を容易に適用することができる。任意の好適な変異誘発および定向進化方法が本発明において使用され、当技術分野において周知である（例えば、米国特許第5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252、5,837,458、5,928,905、6,096,548、6,117,679、6,132,970、6,165,793、6,180,406、6,251,674、6,265,201、6,277,638、6,287,8

10

20

30

40

50

61、6、287、862、6、291、242、6、297、053、6、303、3
44、6、309、883、6、319、713、6、319、714、6、323、0
30、6、326、204、6、335、160、6、335、198、6、344、3
56、6、352、859、6、355、484、6、358、740、6、358、7
42、6、365、377、6、365、408、6、368、861、6、372、4
97、6、337、186、6、376、246、6、379、964、6、387、7
02、6、391、552、6、391、640、6、395、547、6、406、8
55、6、406、910、6、413、745、6、413、774、6、420、1
75、6、423、542、6、426、224、6、436、675、6、444、4
68、6、455、253、6、479、652、6、482、647、6、483、0
11、6、484、105、6、489、146、6、500、617、6、500、6
39、6、506、602、6、506、603、6、518、065、6、519、0
65、6、521、453、6、528、311、6、537、746、6、573、0
98、6、576、467、6、579、678、6、586、182、6、602、9
86、6、605、430、6、613、514、6、653、072、6、686、5
15、6、703、240、6、716、631、6、825、001、6、902、9
22、6、917、882、6、946、296、6、961、664、6、995、0
17、7、024、312、7、058、515、7、105、297、7、148、0
54、7、220、566、7、288、375、7、384、387、7、421、3
47、7、430、477、7、462、469、7、534、564、7、620、5
00、7、620、502、7、629、170、7、702、464、7、747、3
91、7、747、393、7、751、986、7、776、598、7、783、4
28、7、795、030、7、853、410、7、868、138、7、783、4
28、7、873、477、7、873、499、7、904、249、7、957、9
12、7、981、614、8、014、961、8、029、988、8、048、6
74、8、058、001、8、076、138、8、108、150、8、170、8
06、8、224、580、8、377、681、8、383、346、8、457、9
03、8、504、498、8、589、085、8、762、066、8、768、8
71、9、593、326、9、665、694、9、684、771、および全ての関
連米国特許、ならびにPCTおよび非米国対応特許；Ling et al., Anal
. Biochem., 254 (2) : 157-78 [1997] ; Dale et
al., Meth. Mol. Biol., 57 : 369-74 [1996] ; S
mith, Ann. Rev. Genet., 19 : 423-462 [1985]
；Botstein et al., Science, 229 : 1193-1201
[1985] ; Carter, Biochem. J., 237 : 1-7 [1986
] ; Kramer et al., Cell, 38 : 879-887 [1984] ;
Wells et al., Gene, 34 : 315-323 [1985] ; Min
shull et al., Curr. Op. Chem. Biol., 3 : 284
-290 [1999] ; Christians et al., Nat. Biote
chnol., 17 : 259-264 [1999] ; Cramer et al.,
Nature, 391 : 288-291 [1998] ; Cramer et al.,
Nat. Biotechnol., 15 : 436-438 [1997] ; Zh
ang et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.,
94 : 4504-4509 [1997] ; Cramer et al., Nat.
Biotechnol., 14 : 315-319 [1996] ; Stemmer, N
ature, 370 : 389-391 [1994] ; Stemmer, Proc.
Nat. Acad. Sci. USA, 91 : 10747-10751 [1994
] ; WO95/22625 ; WO97/0078 ; WO97/35966 ; WO98/2
7230 ; WO00/42651 ; WO01/75767 ; およびWO2009/152
336を参照されたく、これらの全てが、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0132】

一部の実施形態では、変異誘発処理後に得られる酵素クローンは、酵素調製物を既定の温度（または他のアッセイ条件）に付すこと、および熱処理または他の好適なアッセイ条件後に残存する酵素活性の量を測定することによって、スクリーニングされる。次いで、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するクローンは、遺伝子から単離され、ヌクレオチド配列変化（もしあれば）を同定するためにシーケンシングされ、宿主細胞において酵素を発現させるために使用される。発現ライブラリーからの酵素活性の測定は、当技術分野において公知の任意の好適な方法（例えば、HPLC分析などの標準的な生化学技術）を使用して行うことができる。

【0133】

改変体が産生された後、それらを任意の所望の特性（例えば、高い活性もしくは活性の増加、または低い活性もしくは活性の低下、熱活性の増加、熱安定性の増大、および／または酸性pH安定性など）についてスクリーニングすることができる。一部の実施形態では、「組換えグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド」（本明細書では「操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド」、「改変体グリコシルトランスフェラーゼ酵素」、「グリコシルトランスフェラーゼ改変体」、および「グリコシルトランスフェラーゼ組合せ改変体」とも呼ばれる）が使用される。一部の実施形態では、「組換えスクロースシンターゼポリペプチド」（「操作されたスクロースシンターゼポリペプチド」、「改変体スクロースシンターゼ酵素」、「スクロースシンターゼ改変体」、および「スクロースシンターゼ組合せ改変体」とも呼ばれる）が使用される。

【0134】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、DNA配列を細胞に導入するためのDNA構築物である。一部の実施形態では、ベクターは、DNA配列にコードされたポリペプチドの好適な宿主における発現を果たすことができる好適な制御配列に作動可能に連結した発現ベクターである。一部の実施形態では、「発現ベクター」は、宿主細胞における発現を駆動するためのDNA配列（例えば、導入遺伝子）に作動可能に連結したプロモーター配列を有し、一部の実施形態では、転写ターミネーター配列も含む。

【0135】

本明細書では、用語「発現」は、転写、転写後修飾、翻訳、および翻訳後修飾を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの産生に関与する任意のステップを含む。一部の実施形態では、この用語は、細胞からのポリペプチドの分泌も包含する。

【0136】

本明細書で使用される場合、用語「産生する」は、細胞によるタンパク質および／または他の化合物の産生を指す。この用語は、転写、転写後修飾、翻訳、および翻訳後修飾を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの産生に関与する任意のステップを包含することが意図されている。一部の実施形態では、この用語は、細胞からのポリペプチドの分泌も包含する。

【0137】

本明細書で使用される場合、アミノ酸またはヌクレオチド配列（例えば、プロモーター配列、シグナルペプチド、ターミネーター配列など）は、この配列が作動可能に連結した別の配列にとって、それら2つの配列が天然に会合していない場合、「異種」である。例えば、「異種ポリヌクレオチド」は、実験技術により宿主細胞に導入される任意のポリヌクレオチドであり、宿主細胞から除去され、実験操作に付され、そしてその後、宿主細胞に再導入されるポリヌクレオチドを含む。

【0138】

本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」および「宿主株」は、本明細書で提供されるDNA（例えば、グリコシルトランスフェラーゼ改変体をコードするポリヌクレオチド）を含む発現ベクターのための好適な宿主を指す。一部の実施形態では、宿主細胞は、当技術分野において公知の組換えDNA技術を使用して構築されたベクターが形質転換されたまたはトランスフェクトされた真核または原核細胞である。

10

20

30

40

50

【0139】

用語「類似体」は、参照ポリペプチドと70%より高い配列同一性、しかし100%未満の配列同一性（例えば、75%、78%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超える配列同一性）を有する、ポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、類似体は、天然に存在するアミノ酸ばかりでなく、ホモアルギニン、オルニチンおよびノルバリンを含むがこれらに限定されない、1つまたは複数の天然に存在しないアミノ酸も含有する、ポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、類似体はまた、1つまたは複数のD-アミノ酸残基、および2つまたはそれより多くのアミノ酸残基間の非ペプチド連結を含む。

【0140】

用語「有効量」は、所望の結果を生じさせるのに十分な量を意味する。当業者は、日常の実験を使用することにより何が有効量を決定することができる。

【0141】

用語「単離された」および「精製された」は、それが天然に会合している少なくとも1つの他の成分から除去されている分子（例えば、単離された核酸、ポリペプチドなど）または他の成分を指すために使用される。用語「精製された」は、絶対純度を必要とせず、むしろ、相対的定義として意図されている。

【0142】

本明細書で使用される場合、「立体選択性」は、化学または酵素反応における1つの立体異性体の別の立体異性体に対する優先的形成を指す。立体選択性は、1つの立体異性体が他の立体異性体より選好される場合、部分的であり得、または1つの立体異性体のみが形成される場合、完全であり得る。立体異性体がエナンチオマーである場合、立体選択性は、エナンチオ選択性と呼ばれ、これは、両方のエナンチオマーの和における一方のエナンチオマーの分率（典型的にはパーセンテージとして報告される）である。これは、一般に、当技術分野ではその代わりに、そこから式[主エナンチオマー-副エナンチオマー] / [主エナンチオマー+副エナンチオマー]に従って計算されるエナンチオマー過剰率（「e.e.」）として（典型的にはパーセンテージとして）報告される。立体異性体がジアステレオ異性体である場合、立体選択性は、ジアステレオ選択性と呼ばれ、これは、2つのジアステレオマーの混合物中の一方のジアステレオマーの分率（典型的にはパーセンテージとして報告される）であり、一般に、その代わりに、ジアステレオマー過剰率（「d.e.」）として報告される。エナンチオマー過剰率およびジアステレオマー過剰率は、立体異性体過剰率の種類である。

【0143】

本明細書で使用される場合、「位置選択性」および「位置選択的反応」は、結合生成または切断の1つの方向が、全ての他の可能な方向より優先的に起こる反応を指す。反応は、識別が完全であり、実質的に位置選択的（少なくとも75%）である場合、完全（100%）位置選択的であり得、または1つの部位での反応の産物が他の部位での反応の産物より優勢である場合、部分的に位置選択的（x%、この場合のパーセンテージは、目的の反応に依存して設定される）であり得る。

【0144】

本明細書で使用される場合、「熱安定性の」は、ある期間（例えば、0.5～24時間）の高温（例えば、40～80℃）への曝露後に、同じ高温に曝露された野生型酵素と比較して同様の活性（例えば、60%～80%より高い）を維持する、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドを指す。

【0145】

本明細書で使用される場合、「溶媒安定性の」は、ある期間（例えば、0.5～24時間）の様々な濃度（例えば、5～99%）の溶媒（エタノール、イソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド[DMSO]、テトラヒドロフラン、2-メチルテトラヒドロフラン、アセトン、トルエン、酢酸ブチル、メチルtert-ブチルエーテルなど）への曝露後に、同じ濃度の同じ溶媒に曝露された野生型酵素と比較して同様の活性（例えば、6

10

20

30

40

50

0%～80%より高い)を維持する、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドを指す。

【0146】

本明細書で使用される場合、「熱および溶媒安定性の」は、熱安定性でもあり、溶媒安定性でもある、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチドを指す。

【0147】

本明細書で使用される場合、「還元剤」は、 Fe^{+3} を Fe^{+2} に変換することができる化合物または作用物質を指す。例示的な還元剤は、アスコルビン酸であり、これは、一般に、L-アスコルビン酸の形態である。

【0148】

本明細書で使用される場合、「必要に応じた」および「必要に応じて」は、その後に記載される事象または状況が、起こることもありまたは起こらないこともあること、およびその記載が、事象または状況が起こる事例と、それが起こらない事例とを含むことを意味する。1つまたは複数の必要に応じた置換基を含有すると記載される任意の分子に関して、立体的に現実的なおよび／または合成により実現可能な化合物のみが含まれるように意図されていることが、当業者には理解されるであろう。「必要に応じて置換されている」は、化学基という用語または一連の化学基における全ての後続の修飾語句を指す。

【0149】

グリコシル化

グリコシル化は、安定性、薬力学、溶解度および膜輸送を含む、天然および合成産物の多くの特性を変更することができる。本発明は、様々なアグリコンおよびグリコシル化基質からの新しいグリコシル化化合物の生成に好適な組成物、方法および酵素を提供する。一部の実施形態では、本発明は、容易に得られる前駆体から公知のグリコシル化化合物を効率的に生成するための手段を提供する。一部の場合には、グリコシル化は、化学合成方法によって果たされる。しかし、これらの方法は、望ましくない化学物質およびプロセスを概して必要とし、混合産物（例えば、誤った位置に結合を有する、および／または望ましくないアノマー配置を有する）を生じさせる結果となり得る。さらに、炭水化物化学は、複数の保護および脱保護ステップを必要とする。

【0150】

対照的に、グリコシル化酵素は、温和な条件下で活性であり得、高い位置選択性および立体特異性を単一のステップで付与することができる。多くの天然に存在するグリコシル化代謝物は、様々な糖ヌクレオシドから糖部分を転移させるグリコシルトランスフェラーゼを使用して *in vivo* で生成される。抗菌特性、抗腫瘍特性、天然甘味特性などを有する多くの二次代謝物を含む、多くの分子は、 β -グリコシド結合で修飾された非リボソームペプチド、ポリケチドまたはテルペノイド骨格を含む。植物、*Stevia rebaudiana* Bertoni、から抽出されるジテルペングリコシドの多くは、 β 連結グルコース分子を含有する。自然に、これらの分子は、UDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ酵素を使用して *in vivo* でグリコシル化される。本発明は、新しい操作されたグリコシルトランスフェラーゼを使用して、ヌクレオシドジホスホグルコースからグルコース部分を基質（例えば、レバウジオシドDまたはステビオシド）に転移させて、1つまたは複数の β -グルコース連結産物（例えば、レバウジオシドM、レバウジオシドA、またはレバウジオシドI）を産生する方法（図1を参照されたい）を提供する。しかし、*in vitro* で使用される場合、UDP-グルコースは、法外に高価および／または入手不可能であり得る。一部の追加の実施形態では、シンターゼ（例えば、スクロースシンターゼまたはトレハロースシンターゼ）は、逆方向に作用して、ヌクレオシドニリン酸およびグルコースドナー（例えば、スクロース、トレハロースまたはデンプン）からヌクレオシドジホスホグルコース化合物を形成する。

【0151】

したがって、グリコシル化は、香草、*Stevia rebaudiana* Bertoni、に由来するものなどの天然甘味料の産生に使用される。上述の通り、この植物は、多くの他の強力な甘味料より優れた高強度の甘味および知覚特性を特徴とする、いくつか

10

20

30

40

50

のジテルペングリコシドを産生する。上述の甘味グリコシドは、一般的なアグリコン（すなわち、ステビオール）を有するが、C 13およびC 19位における炭水化物残基の数およびタイプが異なる。ステビオールグリコシドは、それらの分子構造ばかりでなく、それらの味覚特性も互いに異なる。通常、ステビオシドは、スクロースの89～143倍の甘味があるが、レバウジオシドAは、スクロースの85～242倍の間の甘味があると報告されている（例えば、Kasai et al., Nippon Kagaku Kaishi, 1981:726-735 [1981]を参照されたい）。これらの一般的な化合物のうち、レバウジオシドAは、収れん性が最も低く、苦味が最も少なく、後味の持続性が最も低い。したがって、レバウジオシドAには主要ステビオールグリコシドの最も好ましい感覚的特質があり、レバウジオシドAは、商品化されている。しかし、レバウジオシドAは、*Stevia rebaudiana* Bertoniから単離される全グリコシドのほんの一部（約20%）しか構成せず、ステビオシド（約70%）および副次的ステビオールグリコシドが残部を構成する（例えば、FAO, Chemical and Technical Assessment, 63rd JECFA, Steviol Glycosides [2004]を参照されたい）。天然に存在するが存在量がさらにより少ない化合物であるレバウジオシドMは、レバウジオシドXとしても公知であり、スクロースの200～350倍甘く、レバウジオシドAと比較して低減された後味を有する（例えば、Prakash et al., Food, 3:162-175 [2014]を参照されたい）。したがって、例えば天然甘味料としての、レバウジオシドMの商品化に関心が持たれているが、この化合物の実行可能な商業的合成経路は今のところない。

【0152】

操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド

本発明は、グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドを調製する方法、およびポリペプチドを使用する方法を提供する。説明がポリペプチドに関する場合、その説明がポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも説明することを理解されたい。一部の実施形態では、本発明は、野生型GT酵素と比較して改善された特性を有する、操作された、天然に存在しないGT酵素を提供する。任意の好適な反応条件が本発明において使用される。一部の実施形態では、方法は、トランスフェラーゼ反応を行うための操作されたポリペプチドの改善された特性を分析するために使用される。一部の実施形態では、反応条件は、下記および実施例でさらに説明されるように、ポリペプチドの濃度もしくは量、基質、補基質、緩衝剤、共溶媒、pH、温度および反応時間を含む条件、ならびに／または固体支持体上に固定化されたポリペプチドに伴う条件に関して改良される。

【0153】

一部の実施形態では、本明細書に記載の操作されたGTポリペプチドは、野生型GT酵素と比較して改善された特性、例えば、ステビオールグリコシドのさらにグリコシル化されたステビオールグリコシドへの（例えば、ステビオシドのレバウジオシドAへの、またはレバウジオシドDのレバウジオシドMへの）変換の点およびアデニンジホスホグルコースまたは他のヌクレオシドニリン酸の使用の点で改善された特性を有する。

【0154】

一部の実施形態では、反応条件を補足するために追加の反応成分または追加の技術が利用される。一部の実施形態では、これらは、酵素を安定化するかまたは酵素の不活性化を防止するための手段、産物阻害を低減させるための手段、反応の平衡をグルコシル化産物形成にシフトさせるための手段を講じることを含む。

【0155】

一部のさらなる実施形態では、基質化合物の産物化合物への変換のための上記のいずれのプロセスも、産物化合物の抽出；単離；精製；および結晶化、濾過または凍結乾燥から選択される1つまたは複数のステップをさらに含むことがある。上で開示されたプロセスにより産生される生体触媒反応混合物からグルコシル化産物を抽出、単離、精製および／

または結晶化するための方法、技術およびプロトコールは、当業者に公知であり、および／または日常的な実験によって入手される。加えて、説明に役立つ方法が、下記の実施例で提供される。

【0156】

操作されたスクロースシンターゼポリペプチド

本発明は、操作されたスクロースシンターゼ（S u S）ポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドを調製する方法、およびポリペプチドを使用する方法を提供する。説明がポリペプチドに関する場合、その説明がポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも説明することを理解されたい。一部の実施形態では、本発明は、野生型S u S酵素と比較して改善された特性を有する、操作された、天然に存在しないS u S酵素を提供する。任意の好適な反応条件が本発明において使用される。一部の実施形態では、方法は、シンターゼ反応を行うための操作されたポリペプチドの改善された特性を分析するために使用される。一部の実施形態では、反応条件は、下記および実施例でさらに説明されるように、操作されたS u Sの濃度もしくは量、基質、緩衝剤、溶媒、p H、温度および反応時間を含む条件、ならびに／または固体支持体上に固定化された操作されたS u Sポリペプチドに伴う条件に関して改良される。

10

【0157】

一部の実施形態では、本明細書に記載の操作されたS u Sポリペプチドは、野生型S u S酵素と比較して改善された特性、例えば、本明細書に記載の反応の点で改善された特性を有する。

20

【0158】

一部の実施形態では、反応条件を補足するために追加の反応成分または追加の技術が利用される。一部の実施形態では、これらは、酵素を安定化するかまたは酵素の不活性化を防止するための手段、産物阻害を低減させるための手段、反応の平衡をグルコシル化産物形成にシフトさせるための手段を講じることを含む。

【0159】

一部のさらなる実施形態では、基質化合物の産物化合物への変換のための上記のいずれのプロセスも、産物化合物の抽出、単離、精製、結晶化、濾過および／または凍結乾燥から選択される1つまたは複数のステップをさらに含むことがある。本明細書で提供されるプロセスにより産生される生体触媒反応混合物から産物（例えば、レバウジオシド）を抽出、単離、精製および／または結晶化するための方法、技術およびプロトコールは、当業者に公知であり、および／または日常的な実験によって入手される。加えて、説明に役立つ方法が、下記の実施例で提供される。

30

【0160】

操作されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞

本発明は、本明細書に記載の操作された酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現させることができる組換えポリヌクレオチドを作出するために遺伝子発現を制御する1つまたは複数の異種調節配列に動作可能に連結している。一部の実施形態では、操作された酵素ポリペプチドをコードする少なくとも1つの異種ポリヌクレオチドを含有する発現構築物は、対応する酵素ポリペプチドを発現させるために適切な宿主細胞に導入される。

40

【0161】

当業者には明らかであるように、タンパク質配列と様々なアミノ酸に対応するコドンについての知識とが利用可能であることによって、対象ポリペプチドをコードすることができる全てのポリヌクレオチドについての説明が得られる。同じアミノ酸が代替または同義コドンによりコードされる遺伝コードの縮重は、全てが操作された酵素（例えば、G TまたはS u S）ポリペプチドをコードするものである極めて多数の核酸を作製することを可能にする。したがって、本発明は、可能なコドン選択肢に基づいて組合せを選択することによって本明細書に記載の酵素ポリペプチドをコードするものにされ得る酵素ポリヌクレオチドのありとあらゆる可能なバリエーションの産生のための方法および組成物を提供し

50

、全てのそのようなバリエーションは、実施例で（例えば、様々な表で）提示されるアミノ酸配列を含む、本明細書に記載の任意のポリペプチドについて考えられ、具体的に開示されることになる。

【0162】

一部の実施形態では、コドンは、好ましくは、タンパク質産生のための選択された宿主細胞による利用のために最適化される。例えば、細菌において使用される好ましいコドンは、細菌における発現のために典型的に使用される。それ故、操作された酵素ポリペプチドをコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、完全長コード領域中のコドン位置の約40%、50%、60%、70%、80%、90%、または90%より多くに好ましいコドンを含む。

10

【0163】

一部の実施形態では、酵素ポリヌクレオチドは、酵素活性と本明細書で開示される特性を有する操作されたポリペプチドであって、本明細書で提供される配列番号から選択される参照配列に対して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い同一性を有するアミノ酸配列、または任意の改変体（例えば、実施例で提供されるもの）のアミノ酸配列と、参照ポリヌクレオチドまたは実施例で開示される任意の改変体のアミノ酸配列と比較して1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10カ所もしくはそれより多くのアミノ酸残基位置）の残基相違を含む、操作されたポリペプチドをコードする。

20

【0164】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書で提供される任意のポリヌクレオチド配列から選択される参照ポリヌクレオチド配列、もしくはその相補配列、または本明細書で提供される改変体酵素ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド配列と、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる。一部の実施形態では、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、参照配列と比較して1つまたは複数の残基相違を有するアミノ酸配列を含む酵素ポリペプチドをコードする。

【0165】

一部の実施形態では、本明細書における操作された酵素ポリペプチドのいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドは、酵素ポリペプチドの発現を助長するように様々な方法で操作される。一部の実施形態では、酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、1つまたは複数の制御配列が、酵素ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドの発現を調節するために存在する、発現ベクターを含む。ベクターへのその挿入の前の単離されたポリヌクレオチドの操作は、利用される発現ベクターに依存して望ましいまたは必要であることがある。組換えDNA法を利用してポリヌクレオチドおよび核酸配列を修飾する技術は、当技術分野において周知である。一部の実施形態では、制御配列は、数ある中でも特に、プロモーター、リーダー配列、ポリアダニル化配列、プロペプチド配列、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターを含む。一部の実施形態では、好適なプロモーターは、宿主細胞選択に基づいて選択される。細菌宿主細胞について、本開示の核酸構築物の転写を指令するのに好適なプロモーターとしては、これらに限定されないが、*E. coli lac* オペロン、*Streptomyces coelicolor* アラゼ遺伝子 (*dagA*)、*Bacillus subtilis* レバンスクラゼ遺伝子 (*sacB*)、*Bacillus licheniformis* アルファアミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、*Bacillus stearothermophilus* マルトース生成アミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、*Bacillus amyloliquefaciens* アルファアミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、*Bacillus licheniformis* ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、*Bacillus subtilis* *xyIA* および *xyLB* 遺伝子、ならびに原核生物ベクターラクタマーゼ遺伝子から得られるプロモーター（例えば、*Villa-Kamaroff et al.*, *Proc.*

30

40

50

Natl Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 [1978] を参照されたい)、ならびにtacプロモーター(例えば、DeBoer et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 80: 21-25 [1983] を参照されたい)が挙げられる。糸状真菌宿主細胞についての例示的プロモーターとしては、これらに限定されないが、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Aspergillus niger* 中性アルファアミラーゼ、*Aspergillus niger* 安定性アルファアミラーゼ、*Aspergillus niger* または *Aspergillus awamori* グルコアミラーゼ (glaA)、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*Aspergillus oryzae* アルカリプロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* トリオスリン酸イソメラーゼ、*Aspergillus nidulans* アセトアミダーゼ、および *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得られるプロモーター(例えば、WO96/00787を参照されたい)、ならびにNA2-tpiプロモーター(*Aspergillus niger* 中性アルファアミラーゼの遺伝子からのプロモーターと *Aspergillus oryzae* トリオスリン酸イソメラーゼの遺伝子からのプロモーターのハイブリッド)、ならびにこれらの変異体、切断型およびハイブリッドプロモーターが挙げられる。例示的な酵母細胞プロモーターは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ (ENO-1)、*Saccharomyces cerevisiae* ガラクトキナーゼ (GAL1)、*Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP)、および *Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセリン酸キナーゼの遺伝子に由来し得る遺伝子に由来し得る。酵母宿主細胞についての他の有用なプロモーターは、当技術分野において公知である(例えば、Romanos et al., Yeast 8: 423-488 [1992] を参照されたい)。

【0166】

一部の実施形態では、制御配列は、好適な転写ターミネーター配列(すなわち、転写を終結させるために宿主細胞により認識される配列)でもある。一部の実施形態では、ターミネーター配列は、酵素ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作動可能に連結している。選ばれる宿主細胞において機能性である任意の好適なターミネーターが、本発明において使用される。糸状真菌宿主細胞についての例示的な転写ターミネーターは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸シンターゼ、*Aspergillus niger* アルファグルコシダーゼ、および *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞についての例示的なターミネーターは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* シトクロムC (CYC1)、および *Saccharomyces cerevisiae* グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子から得ることができる。酵母宿主細胞についての他の有用なターミネーターは、当技術分野において公知である(例えば、Romanos et al., 上掲を参照されたい)。

【0167】

一部の実施形態では、制御配列は、好適なリーダー配列(すなわち、宿主細胞による翻訳にとって重要であるmRNAの非翻訳領域)でもある。一部の実施形態では、リーダー配列は、酵素ポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作動可能に連結している。選ばれる宿主細胞において機能性である任意の好適なリーダー配列が、本発明において使用される。糸状真菌宿主細胞についての例示的リーダーは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、および *Aspergillus nidulans* トリオスリン酸イソメラーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞に好適なリーダーは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ (ENO-1)、*Sacch*

aromyces cerevisiae 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* アルファ因子、および *Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ／グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP) の遺伝子から得られる。

【0168】

一部の実施形態では、制御配列は、ポリアデニル化配列（すなわち、核酸配列の3'末端に作動可能に連結した配列であって、転写されたとき、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加させるためのシグナルとして宿主細胞により認識される配列）でもある。選ばれる宿主細胞において機能性である任意の好適なポリアデニル化配列が、本発明において使用される。糸状真菌宿主細胞についての例示的なポリアデニル化配列としては、これらに限定されないが、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸シンターゼ、*Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ、および *Aspergillus niger* アルファ-グルコシダーゼの遺伝子が挙げられる。酵母宿主細胞についての有用なポリアデニル化配列は公知である（例えば、Guo and Sherman, Mol. Cell. Biol., 15: 5983-5990 [1995] を参照されたい）。

【0169】

一部の実施形態では、制御配列は、シグナルペプチド（すなわち、ポリペプチドのアミノ末端に連結されたアミノ酸配列をコードし、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に方向付ける、コード領域）でもある。一部の実施形態では、核酸配列のコード配列の5'末端は、分泌されるポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと翻訳リーディングフレーム内で天然で連結されるシグナルペプチドコード領域を本質的に含有する。あるいは、一部の実施形態では、コード配列の5'末端は、コード配列にとって外来のシグナルペプチドコード領域を含有する。発現されたポリペプチドを選ばれる宿主細胞の分泌経路に方向付ける任意の好適なシグナルペプチドコード領域が、操作されたポリペプチドの発現に使用される。細菌宿主細胞についての有効なシグナルペプチドコード領域は、*Bacillus NCIB 11837* マルトース生成アミラーゼ、*Bacillus stearothermophilus* アルファ-アミラーゼ、*Bacillus licheniformis* サブチリシン、*Bacillus licheniformis* ベータ-ラクタマーゼ、*Bacillus stearothermophilus* 中性プロテアーゼ (nprT、nprS、nprM)、および *Bacillus subtilis* prsA の遺伝子からのものを含むがこれらに限定されない、シグナルペプチドコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、当技術分野において公知である（例えば、Simonen and Palva, Microbiol. Rev., 57: 109-137 [1993] を参照されたい）。一部の実施形態では、糸状真菌宿主細胞についての有効なシグナルペプチドコード領域としては、これらに限定されないが、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* 中性アミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Humicola insolens* セルラーゼ、および *Humicola lanuginosa* リパーゼの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域が挙げられる。酵母宿主細胞についての有用なシグナルペプチドとしては、これらに限定されないが、*Saccharomyces cerevisiae* アルファ因子および *Saccharomyces cerevisiae* インベルターゼの遺伝子からのものが挙げられる。

【0170】

一部の実施形態では、制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域でもある。結果として得られるポリペプチドは、「プロ酵素」、「プロポリペプチド」または「チモーゲン」と呼ばれる。プロポリペプチドは、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的または自己触媒的切断によって成熟活

10

20

30

40

50

性ポリペプチドに変換され得る。プロペプチドコード領域は、*Bacillus subtilis* アルカリプロテアーゼ (aprE)、*Bacillus subtilis* 中性プロテアーゼ (nprT)、*Saccharomyces cerevisiae* アルファ因子、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、および *Myceliophthora thermophila* ラクターゼの遺伝子を含むがこれらに限定されない、任意の好適な供給源から得ることができる（例えば、WO 95/33836 を参照されたい）。シグナルペプチド領域とプロペプチド領域の両方がポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の隣に位置し、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の隣に位置する。

【0171】

一部の実施形態では、調節配列も利用される。これらの配列は、宿主細胞の増殖に関連してポリペプチドの発現の調節を助長する。調節系の例は、調節化合物の存在を含む、化学的または物理的刺激に応答して遺伝子発現をオンまたはオフにさせるものである。原核生物宿主細胞において、好適な調節配列としては、これらに限定されないが、lac、tac および trp オペレーター系が挙げられる。酵母宿主細胞において、好適な調節配列としては、これらに限定されないが、ADH2 系または GAL1 系が挙げられる。糸状真菌において、好適な調節配列としては、これらに限定されないが、TAKA アルファアミラーゼプロモーター、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼプロモーター、および *Aspergillus oryzae* グルコアミラーゼプロモーターが挙げられる。

【0172】

別の態様では、本発明は、操作された酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、導入されることになる宿主の種類に依存して、プロモーターおよびターミネーター、複製起点などのような1つまたは複数の発現調節領域を含む、組換え発現ベクターに関する。一部の実施形態では、本明細書に記載の様々な核酸および制御配列は、1つまたは複数の便利な制限部位を、そのような部位での酵素ポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にするために含む、組換え発現ベクターを生じさせるために一緒に連結される。あるいは、一部の実施形態では、本発明の核酸配列は、核酸配列またはその配列を含む核酸構築物を発現のための適切なベクターに挿入することによって発現される。発現ベクターの作出を含む一部の実施形態では、コード配列は、ベクター内に、コード配列が発現のための適切な制御配列と作動可能に連結するように位置する。

【0173】

組換え発現ベクターは、便利に組換えDNA手順に付すことができ、酵素ポリヌクレオチド配列の発現を生じさせることができる、任意の好適なベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）であり得る。ベクターの選択は、ベクターとベクターが導入されることになる宿主細胞との適合性に典型的に依存する。ベクターは、直鎖状プラスミドであってもよく、または閉環状プラスミドであってもよい。

【0174】

一部の実施形態では、発現ベクターは、自己複製ベクター（すなわち、染色体外実体として存在し、その複製が染色体複製に依存しないベクター、例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、または人工染色体）である。ベクターは、自己複製を確実にするための任意の手段を含有し得る。一部の代替実施形態では、ベクターは、宿主細胞に導入されたとき、ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体とともに複製されるものであり得る。さらに、一部の実施形態では、単一のベクターもしくはプラスミド、または宿主細胞のゲノムにおよび／もしくはトランスポゾンに導入されることになる全DNAと一緒に含有する2つもしくはそれより多くのベクターもしくはプラスミドが、利用される。

【0175】

一部の実施形態では、発現ベクターは、形質転換細胞の容易な選択を可能にする、1つまたは複数の選択可能なマーカーを含有する。「選択可能なマーカー」は、その産物が、

10

20

30

40

50

殺生物剤またはウイルス抵抗性を、重金属に対する耐性を、栄養要求株に原栄養性を、およびこれらに類するものをもたらし、遺伝子である。細菌の選択可能なマーカーの例としては、これらに限定されないが、*Bacillus subtilis*もしくは*Bacillus licheniformis*からの dal 遺伝子、またはアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールもしくはテトラサイクリン耐性などの抗生物質耐性を付与するマーカーが挙げられる。酵母宿主細胞についての好適なマーカーとしては、これらに限定されないが、 ADE2 、 HIS3 、 LEU2 、 LYS2 、 MET3 、 TRP1 および URA3 が挙げられる。糸状真菌宿主細胞において使用するための選択可能なマーカーとしては、これらに限定されないが、 amdS （アセトアミダーゼ；例えば、*A. nidulans*または*A. oryzae*からのもの）、 argB （オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、 bar （ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ；例えば、*S. hygroscopicus*からのもの）、 hph （ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、 niaD （硝酸レダクターゼ）、 pyrG （オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ；例えば、*A. nidulans*または*A. oryzae*からのもの）、 sC （硫酸アデニルトランスフェラーゼ）、および trpC （アントラニル酸シンターゼ）、ならびにこれらの等価物が挙げられる。別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つの操作された酵素ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、ポリヌクレオチドが、宿主細胞における操作された酵素（単数／複数）の発現のために1つまたは複数の制御配列に動作可能に連結している、宿主細胞を提供する。本発明の発現ベクターによりコードされるポリペプチドを発現させる際の使用に好適な宿主細胞は、当技術分野において周知であり、これらに限定されないが、細菌細胞、例えば、*E. coli*、*Vibrio fluvialis*、*Streptomyces*および*Salmonella typhimurium*細胞；真菌細胞、例えば、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*（ATCC受託番号201178））；昆虫細胞、例えば、*Drosophila S2*および*Spodoptera Sf9*細胞；動物細胞、例えば、*CHO*、*COS*、*BHK*、293およびBowes黒色腫細胞；ならびに植物細胞を含む。例示的な宿主細胞は、様々な*Escherichia coli*株（例えば、W3110（ $\Delta fhuA$ ）およびBL21）も含む。

【0176】

したがって、別の態様では、本発明は、操作された酵素ポリペプチドを産生するための方法であって、操作された酵素ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現することができる宿主細胞を、ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、本明細書に記載されるような、酵素ポリペプチドを単離および／または精製するステップを、さらに含む。

【0177】

宿主細胞についての適切な培養培地および増殖条件は、当技術分野において周知である。酵素ポリペプチドの発現のためにポリヌクレオチドを細胞に導入するための任意の好適な方法が本発明で使用されることが、企図される。好適な技術としては、これらに限定されないが、電気穿孔、微粒子銃による粒子衝突、リポソーム媒介性トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクション、およびプロトプラスト融合が挙げられる。

【0178】

説明に役立つことを意図したものであり、限定を意図したものではない、以下の代表的実施例で、本発明の様々な特徴および実施形態が例証される。

【実施例】

【0179】

実験

遂行した実験および結果を含む以下の実施例は、説明に役立つことを目的として提供するものに過ぎず、本発明を限定するものと解釈すべきでない。実際、下記の試薬および機器の多くには様々な好適な供給元がある。本発明をいずれかの試薬または機器物品につい

ていずれかの特定の供給元に限定することを意図していない。

【0180】

下で開示する実験では、以下の略語が適用される：M（モル濃度）；mM（ミリモル濃度）、 μ Mおよび μ M（マイクロモル濃度）；nM（ナノモル濃度）；mol（モル）；gmおよびg（グラム）；mg（ミリグラム）； μ gおよび μ g（マイクログラム）；Lおよびl（リットル）；mlおよびmL（ミリリットル）；cm（センチメートル）；mm（ミリメートル）； μ mおよび μ m（マイクロメートル）；sec.（秒）；min（分）；hおよびhr（時）；U（単位）；MW（分子量）；rpm（毎分回転数）；psiおよびPSI（ポンド毎平方インチ）； $^{\circ}$ C（摂氏度）；RTおよびrt（室温）；CV（変動係数）；CAMおよびcam（クロラムフェニコール）；PMBS（ポリミキシンB硫酸塩）；IPTG（イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド）；LB（ルリアブロス）；TB（テリフィックブロス）；SFP（振盪フラスコ粉末）；CDS（コード配列）；DNA（デオキシリボ核酸）；RNA（リボ核酸）；nt（ヌクレオチド；ポリヌクレオチド）；aa（アミノ酸；ポリペプチド）；E. coli W3110（Coli Genetic Stock Center [CGSC]、New Haven、CTから入手可能な、一般に使用されている実験室E. coli株）；AcSus（Acidithiobacillus caldusスクロースシンターゼ）；SUS、SuSおよびSuSy（スクロースシンターゼ、これはスクロースシンターゼとしても公知）；NDP（ヌクレオシドニリン酸）；アデノシンニリン酸（ADP）；シチジンニリン酸（CDP）；グアノシンニリン酸（GDP）；チミジンニリン酸（TDP）；ウリジンニリン酸（UDP）；イノシンニリン酸（IDP）；GT（グリコシルトランスフェラーゼ）；UGT（UDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；NGT（NDP-ヌクレオシドニリン酸依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；AGT（ADP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；CGT（CDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；GGT（GDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；TGT（TDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；IGT（IDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；UGT（UDP-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ）；reb（レバウジオシド）；rebA（レバウジオシドA）；rebD（レバウジオシドD）；rebI（レバウジオシドI）；rebM（レバウジオシドM）；「Reb A 60」は、ステビオシドとレバウジオシドAのそれぞれ約1：2混合物である；HTP（ハイスループット）；HPLC（高圧液体クロマトグラフィー）；HPLC-UV（HPLC-紫外可視検出器）； ^{1} H NMR（プロトン核磁気共鳴分光法）；HSQC NMR（異種核-量子コヒーレンス分光法（heteronuclear single quantum coherence spectroscopy）NMR）；COSY NMR（同種核相関分光法（homonuclear correlation spectroscopy）NMR）；AcorN（AcorN NMR、Livermore、CA）；FIOPC（陽性対照に対する改善倍率）；SigmaおよびSigma-Aldrich（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）；Difco（Difco Laboratories、BD Diagnostic Systems、Detroit、MI）；Microfluidics（Microfluidics、Westwood、MA）；ChromaDex（ChromaDex, Inc.、Irvine、CA）；Life Technologies（Life Technologies、Fisher Scientificの一部、Waltham、MA）；Amresco（Amresco, LLC、Solon、OH）；Carbosynth（Carbosynth, Ltd.、Berkshire、UK）；Varian（Varian Medical Systems、Palo Alto、CA）；Agilent（Agilent Technologies, Inc.、Santa Clara、CA）；およびThermotron（Thermotron, Inc.、Holland、MI）。

【0181】

(実施例 1)

合成、最適化およびアッセイ

この実施例では、グルコシル化活性を有する UGT 酵素の合成、最適化およびアッセイに使用する方法を説明する。

【0182】

遺伝子合成および最適化：

ステビオールビオシドをグルコシル化して、レバウジオシド B にすることおよびステビオシドをグルコシル化してレバウジオシド A にすることが報告されている、野生型 *Stevia rebaudiana* ポリペプチド（配列番号 2）をコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 1）（例えば、Richman et al., Plant J., 41: 56-67 [2005] を参照されたい）をコドン最適化し、配列番号 3 の遺伝子として合成した。この合成遺伝子（配列番号 3）を pCK110900 ベクター系（例えば、これにより参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2006/0195947 号を参照されたい）にクローニングし、その後、*E. coli* W3110 ($\Delta fhuA$) において発現させた。*E. coli* 株 W3110 は、*lac* プロモーターの制御下で UGT 酵素を発現した。進化ラウンドは、以下の実施例で説明する通りに行った。

【0183】

振盪フラスコ粉末 (SFP) の産生：

振盪フラスコ手順を使用して、本明細書に記載の生体触媒プロセスで使用される特徴付けアッセイのためのグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド振盪フラスコ粉末 (SFP) を生成した。酵素の振盪フラスコ粉末 (SFP) 調製によって、HTP アッセイで使用される細胞溶解物と比較して酵素のより精製された調製物（例えば、総タンパク質の > 30% まで）が得られ、より濃縮された酵素溶液の使用も可能になる。目的の操作されたポリペプチドをコードするプラスミドを含有する *E. coli* の単一コロニーを、 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールと 1% グルコースとを含有する 5 mL のルリアーベルターニブロスに接種した。細胞を 30°C のインキュベーターにおいて 250 rpm で振盪しながら一晩（少なくとも 16 時間）増殖させた。1 L フラスコ内の $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ の CAM を含有する 250 mL のテリフィックブロス ($12 \text{ g}/\text{L}$ のバクトートリプトン、 $24 \text{ g}/\text{L}$ の酵母抽出物、 $4 \text{ mL}/\text{L}$ のグリセロール、 65 mM リン酸カリウム、 $\text{pH } 7.0$ 、 1 mM MgSO_4) に培養物を添加して希釈して 0.2 の 600 nm 光学密度 (OD 600) にし、 30°C で増殖させた。

【0184】

培養物の OD 600 が 0.6 ~ 0.8 になったときに、最終濃度 1 mM まで IPTG を添加することにより、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を誘導した。次いで、インキュベーションを一晩（少なくとも 16 時間）継続した。遠心分離 (5000 rpm 、15 分、 4°C) により細胞を収集し、上清を廃棄した。細胞ペレットを 2 体積の 25 mM トリエタノールアミン緩衝剤、 $\text{pH } 7.5$ に再懸濁させ、標準 *E. coli* 溶解に設定して 4°C で維持した MICROFLUIDIZER（登録商標）高圧ホモジナイザー (*Microfluidics*) に通した。細胞デブリを遠心分離 ($10,000 \text{ rpm}$ 、45 分、 4°C) により除去した。清澄化溶解物上清を回収し、 -80°C で凍結させ、次いで、His 親和性精製し、透析して精製タンパク質を生じさせたか、または凍結乾燥させて粗タンパク質の乾燥振盪フラスコ粉末を生じさせた。

【0185】

ステビオシドグルコシル化についての SFP のアッセイ：

SFP を再構成して $20 \text{ g}/\text{L}$ の粉末を得た。次いで、これらのストックの $50 \mu\text{L}$ を、 3 mM MgSO_4 および 1 mM ステビオシド (*ChromaDex*、純度 > 94%) と 2 mM ウリジンジホスホグルコースを伴う 50 mM *Tris-HCl* 緩衝剤、 $\text{pH } 7.5$ の $200 \mu\text{L}$ の総反応体積で、希釈した。 30°C で THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で振盪しながら 16 ~ 18 時間、反応を行った。

【0186】

HPLC-MS/MS分析：

0.2%ギ酸を伴う0.5体積／体積のアセトニトリルで上記の反応物をクエンチし、遠心分離により沈殿させた。以下の計器およびパラメーターを用いてLC-MS/MSにより上清中のグリコシル化ステビオシド産物を検出した：

【表1】

表1.1 ステビオールグリコシドのHPLC-MS/MS分析																			
計器	Agilent HPLC 1200シリーズ、Sciex 4000 QTrap																		
カラム	Poroshell 120 EC C18 5×3.0、2.7 μmのガードカラムを伴うPoroshell 120 EC C18 50×3.0mm、2.7 μm(Agilent Technologies)																		
移動相	勾配(A:水中の0.1%ギ酸;B:メタノール中の0.1%ギ酸) <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th><th>%B</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>60</td></tr> <tr><td>0.50</td><td>60</td></tr> <tr><td>1.00</td><td>70</td></tr> <tr><td>4.33</td><td>70</td></tr> <tr><td>5.00</td><td>95</td></tr> <tr><td>5.33</td><td>9</td></tr> <tr><td>5.34</td><td>60</td></tr> <tr><td>6.00</td><td>60</td></tr> </tbody> </table>	時間(分)	%B	0	60	0.50	60	1.00	70	4.33	70	5.00	95	5.33	9	5.34	60	6.00	60
時間(分)	%B																		
0	60																		
0.50	60																		
1.00	70																		
4.33	70																		
5.00	95																		
5.33	9																		
5.34	60																		
6.00	60																		
流量	0.8mL/分																		
実行時間	6分																		
ピーク滞留時間	レバウジオシドA:2.35分																		
カラム温度	40 °C																		
注入体積	10 μL																		
MS検出	MRM 990/828(ステビオールテトラグリコシド、例えば、レバウジオシドAについて)、1152/828(ステビオールペンタグリコシド、例えば、レバウジオシドDについて)、1314/828(ステビオールヘキサグリコシド、例えば、レバウジオシドMについて)、828/666(ステビオールトリグリコシド、例えばステビオシドについて)、666/504(ステビオールジグリコシド、例えば、ルブソシドについて)																		
MS条件	モード:MRM;CUR:30;IS:4750;CAD:高;TEM:550°C;GS1:50;GS2:50;DP:150;EP:10;CXP:14;DT:各トランジションに50ms。最初の3回のトランジションについてのCE:85;最後の2回のトランジションについてのCE:60。																		

【0187】

配列番号4について活性を検出した。ステビオシドのレバウジオシドAへの高度の変換(すなわち、>95%)が、上記のアッセイ試料のLC-MS/MS分析で観察された。

【0188】

(実施例2)

配列番号4のGT改変体

この実施例では、ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化改善のための、配列番号4に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。酵素のある特定の構造的特徴に関連する位置に変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号3によりコードされるGT(す

なわち、配列番号4)の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する第1ラウンド (「ラウンド1」) の操作されたG T 改変体ポリペプチドを得た。ラウンド1における活性改善に関連する変異と次いでその後の進化ラウンドにおける活性改善に関連する変異とを組み換えた改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより、多くの追加の進化ラウンドを行った。次いで、下で説明するハイスループット (H T P) 増殖、発現、溶解物調製およびアッセイを使用して、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、スクリーニングした。

【0189】

H T P 増殖、発現および溶解物調製

細胞を96ウェルプレートに採取し、1%グルコースと30 μ g/mLのCAMとを含有するLB培地中、30°C、200 rpm、湿度85%で一晩増殖させた。次いで、一晩増殖させたもの20 μ Lを、30 μ g/mLのCAMを含有する380 μ LのTB増殖培地を含有するディープウェルプレートに移し、1mM IPTGで誘導し、18時間、30°C、200 rpm、湿度85%でインキュベートした。細胞培養物を4000 rpm、4°Cで10分間、遠心分離し、培地を廃棄した。このようにして得た細胞ペレットを-80°Cで凍結させ、タイタープレートシェーカーを用いて室温で2時間、低速で振盪しながら250 μ Lの溶解緩衝液 (20mM Tris-HCl緩衝剤、pH7.5中の0.5g/Lのリゾチームおよび0.5g/LのPMBS) 中で溶解した。次いで、プレートを4000 rpmおよび4°Cで20分間、遠心分離し、清澄化溶解物上清を、下で説明するH T P アッセイ反応に使用した。

【0190】

A D P - グルコースからステビオシドへのグルコース転移についてのH T P アッセイ

配列番号3改変体を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いて、200 μ L反応物中50 μ L溶解物の溶解物負荷量で、ならびに50%エタノール中の20mMストック溶液からの1mMステビオシド (ChromaDex、純度>94%)の基質負荷量、および0.5mM A D P - グルコース (Sigma、純度>93%)の補基質負荷量で、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら18時間、50mM Tris-HCl緩衝剤、pH7.5、3mM MgCl₂、30°C。0.2%ギ酸を伴う100 μ L/ウェルのアセトニトリルで反応物をクエンチし、10分、4°Cで遠心分離し、実施例1、表1.1に記載のHPLC-MS/MSにより上清を分析した。

【0191】

野生型UGT76G1 (配列番号4) とA D P - グルコースの存在下でのステビオシドからのレバウジオシドAの形成は、無酵素対照と区別できなかった。配列番号4の野生型酵素とは対照的に、ステビオシドとA D P - グルコースからレバウジオシドAを産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドは、同定された。これらの操作されたポリペプチドを表2.1に収載する。親構築物および改変体構築物は、親和性精製のためにN末端ヒスチンタグを含有したが、明確にするために、タグを付けていない参照配列と比較して変異に番号を付けた。複数の進化ラウンド中に産生された改変体の振盪フラスコ規模の培養物を、実施例1で説明したようにタンパク質精製のために増殖させた。

【0192】

(実施例3)

グルコシル化活性を有するグリコシルトランスフェラーゼ酵素の合成、最適化およびアッセイ

この実施例では、グルコシル化活性を有するUGT酵素の合成、最適化およびアッセイに使用する方法を説明する。

【0193】

遺伝子合成および最適化

ベクター1, 2-グリコシルトランスフェラーゼ *Solanum tuberosum* をコードするポリヌクレオチド配列をコドン最適化し、配列番号11の遺伝子として合成した。これらの合成遺伝子をpCK110900ベクター系（例えば、これにより参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9, 714, 437号を参照されたい）にクローニングし、その後、*E. coli* W3110 ($\Delta fhuA$) において発現させた。*E. coli* 株W3110は、*lac*プロモーターの制御下でUGT酵素を発現した。

【0194】

振盪フラスコ粉末 (SFP) の産生

振盪フラスコ手順を使用して、本明細書に記載の生体触媒プロセスで使用される特徴付けアッセイのためのグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド振盪フラスコ粉末 (SFP) を生成した。酵素の振盪フラスコ粉末 (SFP) 調製によって、HTPアッセイで使用される細胞溶解物と比較して酵素のより精製された調製物（例えば、総タンパク質の>30%まで）が得られ、より濃縮された酵素溶液の使用も可能になる。目的の操作されたポリペプチドをコードするプラスミドを含有する *E. coli* の単一コロニーを、 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールと1%グルコースとを含有する5mLのルリアーベルターニブロスに接種した。細胞を30°Cのインキュベーターにおいて250rpmで振盪しながら一晩（少なくとも16時間）増殖させた。1Lフラスコ内の $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ のCAMを含有する250mLのテリフィックブロス（12g/Lのバクトートリプトン、24g/Lの酵母抽出物、4mL/Lのグリセロール、65mMリン酸カリウム、pH7.0、1mM MgSO_4 ）に培養物を添加して希釈して0.2の600nm光学密度 (OD600) にし、30°Cで増殖させた。

【0195】

培養物のOD600が0.6~0.8になったときに、最終濃度1mMまでIPTGを添加することにより、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を誘導した。次いで、インキュベーションを一晩（少なくとも16時間）継続した。遠心分離（5000rpm、15分、4°C）により細胞を収集し、上清を廃棄した。細胞ペレットを2体積の25mMトリエタノールアミン緩衝剤、pH7.5に再懸濁させ、標準 *E. coli* 溶解に設定して4°Cで維持したMICROFLUIDIZER（登録商標）高圧ホモジナイザー（Microfluidics）に通した。細胞デブリを遠心分離（10,000rpm、45分、4°C）により除去した。清澄化溶解物上清を回収し、-80°Cで凍結させ、次いで、His親和性精製し、透析して精製タンパク質を生じさせたか、または凍結乾燥させて粗タンパク質の乾燥振盪フラスコ粉末を生じさせた。

【0196】

精製タンパク質でのレバウジオシドAグルコシル化についてのアッセイ

まず、 $50 \mu\text{L}$ の精製タンパク質を、50mM Tris-HCl緩衝剤pH7.5、3mM塩化マグネシウム、1mMレバウジオシドAおよび0.5mMウリジンジホスホグルコースからなる200 μL の総反応体積で、希釈した。30°CでTHERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら18時間、反応を行った。煮沸した酵素反応を陰性対照として使用した。0.2%ギ酸を伴う90 μL のアセトニトリルで10 μL の反応物をクエンチし、遠心分離により沈殿させた。実施例1、表1.1に記載のLC-MS/MSにより上清中のグリコシル化レバウジオシドA産物を検出した。不良な可溶性発現にもかかわらず、配列番号12は、ステビオールグリコシド基質における β -1, 2-グルコース結合の生成への高い比活性および良好な選択性を実証した。

【0197】

振盪フラスコ粉末でのレバウジオシドAグルコシル化についてのアッセイ

凍結乾燥振盪フラスコ粉末を20mg/mLに再構成した。次いで、これらのストックの10 μL を、3mM MgCl_2 と1mMレバウジオシドA（純度>97%）と2mMウリジンジホスホグルコース（UDP-グルコース）とを伴う50mMリン酸カリウム（

10

20

30

40

50

K P h o s) 緩衝剤、p H 7 の 1 0 0 μ L の総反応体積で、希釈した。4 0 $^{\circ}$ C で T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 1 6 ~ 1 8 時間、反応を行った。陰性対照より高い活性が配列番号 1 2 について検出された。レバウジオシド A のレバウジオシド D への低度の変換 (すなわち、< 1 0 %) が L C - M S / M S 分析で観察された。

【0198】

(実施例 4)

配列番号 1 2 の G T 改変体

この実施例では、ステビオールグリコシドのグルコシル化改善のための、配列番号 1 2 に由来する G T ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。酵素の表面残基に関連する位置に変異誘発を施した改変体遺伝子の組合せライブラリーを構築することによって、配列番号 1 1 によりコードされる G T (すなわち、配列番号 1 2) の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、ステビオールグリコシドへの β - 1 , 2 - グルコシルトランスフェラーゼ活性を有する第 1 ラウンド (「ラウンド 1」) の操作された G T 改変体ポリペプチドを得た。ラウンド 1 における活性改善に関連する変異と次いでその後の進化ラウンドにおける活性改善に関連する変異とを組み換えた改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより、多くの追加の進化ラウンドを行った。次いで、下で説明するハイスループット (H T P) 増殖、発現、溶解物調製およびアッセイを使用して、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、スクリーニングした。

【0199】

H T P 増殖、発現および溶解物調製

細胞を 9 6 ウェルプレートに採取し、1 % グルコースと 3 0 μ g / m L の C A M とを含有する L B 培地中、3 0 $^{\circ}$ C、2 0 0 r p m、湿度 8 5 % で一晚増殖させた。次いで、一晚増殖させたもの 2 0 μ L を、3 0 μ g / m L の C A M を含有する 3 8 0 μ L の T B 増殖培地を含有するディープウェルプレートに移し、1 m M I P T G で誘導し、1 8 時間、3 0 $^{\circ}$ C、2 0 0 r p m、湿度 8 5 % でインキュベートした。細胞培養物を 4 0 0 0 r p m、4 $^{\circ}$ C で 1 0 分間、遠心分離し、培地を廃棄した。このようにして得た細胞ペレットを - 8 0 $^{\circ}$ C で凍結させ、タイタープレートシェーカーを用いて室温で 2 時間、低速で振盪しながら 2 5 0 μ L の溶解緩衝液 (2 0 m M T r i s - H C l 緩衝剤、p H 7 . 5 中の 0 . 5 g / L のリゾチームおよび 0 . 5 g / L の P M B S) 中で溶解した。次いで、プレート を 4 0 0 0 r p m および 4 $^{\circ}$ C で 2 0 分間、遠心分離し、清澄化溶解物上清を、下で説明する H T P アッセイ反応に使用した。

【0200】

レバウジオシド A グルコシル化についての H T P アッセイ

酵素改変体を発現する清澄化 E . c o l i 培養溶解物の 9 6 ウェルプレートを用いて、1 0 0 μ L 反応物中 2 5 μ L 溶解物の溶解物負荷量で、ならびに 5 0 % エタノール中の 2 0 m M ストック溶液からの 1 m M レバウジオシド A (S i g m a、純度 > 9 6 %) の基質負荷量、および 0 . 5 m M U D P - グルコース (S i g m a、純度 > 9 8 %) の補基質負荷量で、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 4 時間、5 0 m M T r i s - H C l 緩衝剤、p H 7 . 5、3 m M M g C l ₂、3 0 $^{\circ}$ C。0 . 2 % ギ酸を伴う 0 . 5 体積 / 体積のアセトニトリルで反応物をクエンチし、1 0 分、4 $^{\circ}$ C での遠心分離により沈殿させた。水で 1 : 2 0 希釈した後、実施例 1、表 1 . 1 に記載の計器およびパラメーターを用いて L C - M S / M S により上清中のグリコシル化産物を検出した。参照骨格配列より多い量でレバウジオシド A からレバウジオシド D を産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定し、後続の進化ラウンドに使用した。改変体の分析のために、実施例 1 で説明したように凍結乾燥粉末産生のための振盪フラスコ規模の培養物を増殖させた。

【0201】

振盪フラスコ溶解物特徴付けアッセイおよびレバウジオシドAグルコシル化についての分析

まず、250mL振盪フラスコ培養物を増殖させ、誘導し、溶解した。細胞デブリを実施例1で説明したように遠心分離により除去し、清澄化溶解物上清を回収した。次いで、10 μ Lの溶解物を、50mM Tris-HCl緩衝剤、pH7.5と3mM MgCl₂と1mMレバウジオシドA (Sigma、純度>96%)と2mM UDP-グルコース (Sigma、純度>98%)との100 μ Lの総反応体積で、希釈した。30℃でTHERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら0~18時間、反応を行った。0.2%ギ酸を伴う0.5体積/体積のアセトニトリルで上記の反応物をクエンチし、遠心分離により沈殿させた。水で1:20希釈した後、実施例1、表1.1に記載の計器およびパラメーターを用いてLC-MS/MSにより上清中のグリコシル化産物を検出した。

【0202】

(実施例5)

配列番号6のスクロースシンターゼ改変体

この実施例では、スクロースおよびADPからのADP-グルコースの産生の改善のための、コドン最適化 *Acidothermophilus caldus* スクロースシンターゼポリヌクレオチド (配列番号5) に由来するスクロースシンターゼ (SuS) ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。酵素のある特定の構造的特徴に関連する位置に飽和変異誘発を施した、および公開データベース内のホモログからの多様性を組み換えた、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号5によりコードされるSuS (すなわち、配列番号6) の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (HTP) アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースの合成への活性が改善された第1ラウンド (「ラウンド1」) の操作されたSuS改変体ポリペプチドを得た。ラウンド1における活性改善に関連する変異と次いでその後の進化ラウンドにおける活性改善に関連する変異とを組み換えた改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより、多くの追加の進化ラウンドを行った。次いで、下で説明するハイスループット (HTP) 増殖、発現、溶解物調製およびアッセイを使用して、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、スクリーニングした。

【0203】

スクロースからADPへのグルコース転移についてのHTPアッセイ

配列番号5改変体 (すなわち、配列番号6の改変体) を発現する清澄化 *E. coli* 培養溶解物の96ウェルプレートを用いて、100 μ L反応物中25 μ L溶解物の溶解物負荷量で、ならびに水中の60%ストック溶液からの30%w/vスクロース (Sigma) の基質負荷量、および2mM ADP (Sigma、純度>95%) の補基質負荷量で、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: Thermocyclerにおいて2時間、50mM Tris-HCl緩衝剤、pH7.5、3mM MgCl₂、30℃。反応物を95℃で10分間、熱でのクエンチを行い、次いで、文献から適応させた比色D-フルクトースデヒドロゲナーゼアッセイにより分析した (例えば、Ameyama et al., J. Bacteriol., 145:814-823 [1981]; およびAmeyama, Meth. Enzymol., 89:20-29 [1982] を参照されたい)。手短に述べると、一晚酵素結合アッセイを、96ウェルプレートにおいて、フルクトース濃度が<1g/Lになるように希釈した20 μ Lの試料と、20 μ Lの100mMフェリシアン化カリウム (Sigma P-8131) と、0.1% Triton (登録商標) X-100を伴うpH4.6マッキルバイン緩衝剤に溶解した0.8単位/mLのフルクトースデヒドロゲナーゼ (Sigma F4892) 160 μ Lとを用いて行った。この反応は、フルクトースをK₄Fe(CN)₆に定量的に変換するものであり、したがって、67 μ Lの一晚反応物を、33 μ Lの停止溶液 (0.3w/v %

ドデシル硫酸ナトリウム、Sigma L-4509、8.1 v/v%リン酸、Sigma P-6560、および0.5 w/v%硫酸第二鉄、Sigma F-1135)に添加し、20分間振盪して $K_4Fe(CN)_6$ のプルシアンブルーへの完全変換を可能ならしめ、プレートリーダーを用いてこの吸光度を690 nmの波長で読み取ることにより、 $K_4Fe(CN)_6$ を比色分析で定量する。一次アッセイ後、配列番号6よりフルクトース形成活性が高い、したがって化学量論的ADP-グルコース形成活性が高い、操作されたスクロースシンターゼ(SuS)改変体ポリペプチドを、2 w/v%スクロース(Sigma)のより低い基質負荷および1 mM ADP(Sigma、>95%)の補基質負荷で3連でスクリーニングした。

【0204】

スクロースからADPへの、それからレバウジオシドDへのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

以下のHTP酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状E. coli培養物を、1 mM硫酸マグネシウムと0.5 mg/mLのリゾチームとポリミキシンB硫酸塩(PMBS)とを伴う250 μ LのTris-HCl、pH 7.5で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物をTris-HCl、pH 7.5に添加して20倍希釈した。次いで、10 μ Lの希釈されたSuS溶解物および2 g/LのGT配列番号8を、100 μ Lの反応体積で、約1 mMレバウジオシドDの基質負荷量ならびに1 mM ADP(Sigma、>95%)および10 mMスクロース(Sigma)の補基質負荷量と組み合わせた。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら2時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 7、3 mM $MgCl_2$ 、50°C。0.2%ギ酸を伴う90 μ Lアセトニトリルに10 μ Lアッセイ混合物を添加することにより上記反応物をクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で10倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5.1 ステビオールグリコシド検出のための RapidFire SPE-MS/MS 条件。 Agilent RapidFire 条件						
緩衝液 A	LC/MS グレード水中の 0.1%ギ酸;流量 1.5mL/分					
緩衝液 B	LC/MS グレードメタノール中の 0.1%ギ酸;流量 0.8mL/分					
水性洗浄液	水					
有機洗浄液	アセトニトリル					
SPE カートリッジ	Agilent RapidFire カートリッジ A(C4)					
RF 段階 1	600 ms					
RF 段階 2	2500 ms					
RF 段階 3	0					
RF 段階 4	5000 ms					
RF 段階 5	1000 ms					
Agilent Jet Stream ソースパラメーター						
乾燥ガス温度	300 ° C					
乾燥ガス流量	10L/分					
ネブライザー圧力	45 psi					
シースガス温度	350 ° C					
シースガス流量	11L/分					
キャピラリー電圧	+3500 V					
ノズル電圧	+2000 V					
Agilent 6470 トリプル四重極 MRM パラメーター						
化合物	Q1	Q3	滞留	フラグメンター	CE	CAV
ステビオシド	827.4	665.3	50	150	50	5
RebA	989.5	827.5	50	350	60	5
RebD または RebI	1151.7	827.5	50	350	55	5
RebM	1313.7	827.5	50	350	70	5

【0205】

振盪フラスコ粉末（SFP）の産生

振盪フラスコ手順を使用して、本明細書に記載の生体触媒プロセスで使用される特徴付けアッセイのためのグリコシルトランスフェラーゼポリペプチド振盪フラスコ粉末（SFP）を生成した。酵素の振盪フラスコ粉末（SFP）調製によって、HTPアッセイで使用する細胞溶解物と比較して酵素のより精製された調製物（例えば、総タンパク質の>30%まで）が得られ、より濃縮された酵素溶液の使用も可能になる。目的の操作されたポリペプチドをコードするプラスミドを含有する *E. coli* の単一コロニーを、30 µg/mL のクロラムフェニコールと1%グルコースとを含有する5 mL のルリアーベルターニブロスに接種した。細胞を30°Cのインキュベーターにおいて250 rpmで振盪しながら一晩（少なくとも16時間）増殖させた。1 L フラスコ内の30 µg/mL のCAMを含有する250 mLのテリフィックブロス（12 g/Lのバクトートリプトン、24 g/Lの酵母抽出物、4 mL/Lのグリセロール、65 mMリン酸カリウム、pH 7.0、1 mM MgSO₄）に培養物を添加して希釈して0.2の600 nm光学密度（OD₆₀₀）にし、30°Cで増殖させた。

【0206】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

レバウジオシドDからのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対する操作されたSuS改変体の活性を特徴付けるために実験を行った。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH7と3mM塩化マグネシウムと1g/LのレバウジオシドDと10mMスクロースと1mM ADPと2g/LのGT配列番号10とを含有する100μLの総反応体積に0.125g/Lの濃度で振盪フラスコ粉末(SFP)を添加した。反応を50℃でTHERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら1時間行った。0.2%ギ酸を伴う90μLアセトニトリルに10μLの反応混合物を添加することにより反応物をクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で10倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシドについて分析した。これらの結果に基づいて、酵素を最適化するために追加の進化ラウンドを行った。

10

【0207】

(実施例6)

スクロースシンターゼ改変体

前の進化ラウンドにおける活性改善に関連する変異を組み換えた改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより、スクロースシンターゼ酵素の定向進化を継続した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット(HTP)アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースの生成への活性を有する追加の反復ラウンドの操作されたSuS改変体ポリペプチドを得た。

【0208】

20

スクロースからADPへの、それからレバウジオシドAへのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

以下のHTP酵素結合アッセイを使用して、組合せライブラリーをスクリーニングした。ペレット状E.coli培養物を、1mM硫酸マグネシウムと0.5mg/mLのリゾチームとポリミキシンB硫酸塩(PMBS)とを伴う400μLのTris-HCl、pH7.5で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物をTris-HCl、pH7.5に添加して約90倍希釈した。次いで、10μLの希釈されたSuS溶解物および1g/LのGT配列番号14を、100μLの反応体積で、4.5~7.5mMレバウジオシドA97の基質負荷量ならびに0.2~0.25mM ADP(Sigma、>95%)および30mMスクロース(Sigma)の補基質負荷量と組み合わせた。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら2時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、55℃。上記の反応物を、90~190μLの水に10μLのアッセイを添加することにより可溶化し、0.2%ギ酸を伴う90μLアセトニトリルに10μLの可溶化アッセイを添加することによりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で4.4~6.7倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。分析後、GTと結合してレバウジオシドAに対する活性改善を示した操作されたSuS改変体ポリペプチドを同定した。

30

【0209】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからレバウジオシドAへのグルコシル転移についての分析

40

レバウジオシドAからのレバウジオシドDの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対する操作されたSuS改変体の活性を特徴付けるために実験を行った。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6と7.5mMレバウジオシドA97と30mMスクロースと0.2mM ADPと1g/LのGT配列番号14とを含有する100μLの総反応体積に、0.02g/Lの濃度で振盪フラスコ粉末(SFP)を添加した。反応を50℃でTHERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら1時間行った。反応物を水に添加して20倍希釈することにより可溶化し、0.2%ギ酸を伴う90μLアセトニトリルに10μLの希釈された反応物を添加することによりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で4.4倍希釈し、表5.1

50

に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシドについて分析した。活性が参照配列より高く、レバウジオシドAから産生されるレバウジオシドDがより高レベルである、改変体を、さらなる定向進化のために、スクロースからADPにグルコースを転移させる再利用反応の触媒作用のために選択した。

【0210】

(実施例7)

配列番号20のベクター1, 3-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、*in situ*で合成されるADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグリコシル化改善のための、配列番号8598に由来する β 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ(β 1, 3GT)ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号19によりコードされるGT(すなわち、配列番号20)の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット(HTP)アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグリコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの72種の操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。

【0211】

スクロースからADPへのグルコース転移、次いでADP-グルコースからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTPアッセイ

配列番号19改変体(すなわち、配列番号20の改変体)を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例6で説明したように清澄化し、次いで、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6に添加して10倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、Thermotron(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら1時間、75℃でそれらの溶解物をブレインキュベートした。100 μ Lの反応物に10 μ Lのブレインキュベートされた溶解物を用い、20g/LのレバウジオシドA60%基質、0.025g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)補基質、0.05g/LのSUS SFP配列番号18、0.12g/Lの β -1, 2-グリコシルトランスフェラーゼ(β 12GT)配列番号16、および40g/Lのスクロース(蔗糖)を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のRapidFire-MS/MSにより試料を分析した。*in situ*で合成されるADP-グルコースを用いてレバウジオシドA60からレバウジオシドMを配列番号20より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表7.1および表7.2に収載する。配列番号20と比較して表7.3に示す改変体の分析のために、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7.1 β 1,3GT 組合せ改変体および RebM レベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 20 と比較して)	RebM の増加 ^a
25/26	H81T/K139N/M144Q/H195Q/K200R/D204T/I207V/W233Q	+++
27/28	H81T/Q197K/K200R/I207V/W233Q/C338A	+++
29/30	A41E/T72P/C338A	+++
31/32	M144Q/W233T/C338V	+++
33/34	T72P/M144Q/C338V	+++
35/36	A41E/T72P/W233Q/C338A	+++
37/38	R76S/M144Q/Q197K/K200R	+++
39/40	K200R/D204T/I207V/W233T	+++
41/42	H81T/M144Q/W233Q	+++
43/44	T72P/K200R/D204T/I207V	++
45/46	T72P/H81T/H195Q/W233Q	++
47/48	Q61D/E259T/K428I	++
49/50	A41E/W233T/C338V	++
51/52	A41E/W233Q	++
53/54	M144Q/W233T	++
55/56	W233Q/C338V	++
57/58	R76S/Q197K/I207V/W233Q	++
59/60	H81T/C338V	++
61/62	A41E/W233Q/C338V	++
63/64	K139N/M144Q/W233Q	++
65/66	A41E/M144Q/W233T	++
67/68	R76S/H195Q/Q197K/D204T/I207V/W233T	++
69/70	T72P/R76S/L163A/Q197K	++
71/72	T72P/I207V	++
73/74	T72P/R76T/Q197K/D204T	+
75/76	L163A/W233T/C338A	+
77/78	T72P/R76S/I207V/C338V	+
79/80	T72P/R76S	+
81/82	T72P	+
83/84	T72P/R76T	+
85/86	A41E/W233T	+
87/88	T72P/R76T/I207V/W233Q	+

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

表7.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 20と比較して)	RebMの増加 ^a
89/90	T72P/R76T/H195Q/W233T	+
91/92	T72P/H81T	+
93/94	T72P/K139N/H195Q/D204T	+
95/96	R76S/W233T	+
97/98	H81T/W233Q/C338V	+
99/100	Q61D	+
101/102	Q61E/R411T	+
103/104	Q61D/A87K/Q91L/A107L	+
105/106	Q61E/Q91L/D431M	+
107/108	Q61D/A87K/Q91L/E259T	+
109/110	A107V/E259T	+
111/112	A107V	+
113/114	Q61D/I407T/K428I	+
115/116	Q61D/A107V	+
117/118	C156S/I407T	+
119/120	E259T	+
121/122	Q61E/A87K/Q91L/A107V	+
^a 配列番号20の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの1.24倍以上、1.36倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.36倍以上、1.43倍未満増大した産生; および「+++」=1.43倍以上増大した産生。		

【表 7 - 3】

表7.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 20と比較して)	60°Cでの RebM の増加 ^a	65°Cでの RebM の増加 ^a
123/124	A85V	++	++
125/126	H81L	++	+
127/128	A124P	++	-
129/130	T80P	++	++
131/132	H81A	++	++
133/134	H81M	++	+
135/136	H81V/Q270K	++	++

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

表7.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 20と比較して)	60℃での RebM の増加 ^a	65℃での RebM の増加 ^a
137/138	H81T	++	++
139/140	H81V	++	+
141/142	V286L	++	-
143/144	H81S	++	+
145/146	T80D	++	++
147/148	A85T	++	+
149/150	P83D	+	-
151/152	Q71G	+	+
153/154	A97V	+	-
155/156	S456K	+	-
157/158	E420R	+	+
159/160	T263C	+	+
161/162	I334V	+	-
163/164	Q71T	+	-
165/166	T80Q	-	+
167/168	E402I	-	++
^a 配列番号20の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照の活性未満;「+」=参照の活性以上、1.1倍未満増大した産生; および「++」=1.1倍以上増大した産生。			

【0 2 1 2】

SFP特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからADPへのグルコシル転移、次いでADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 20 g/L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 15 mM ステビオシド (純度 > 95 %) またはレバウジオシド D と 0.02 g/L の ADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0.05 g/L の SUS SFP 配列番号 18 と 37.5 mM スクロース (蔗糖) との 100 μ L の総反応体積中、0.005 ~ 0.15 g/L の SFP に希釈した。Thermotron (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で振盪しながら 4 時間、60 °C で反応物をインキュベートした。反応物を水での 20 倍希釈により可溶化し、0.2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で 15 倍希釈した。実施例 5、表 5.1 に記載の SPE-QQQ によりグリコシル化産物を検出した。50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 20 g/L の RebA60 と 0.02 g/L の ADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0.05 g/L の SUS SFP 配列番号 18 と 0.12 g/L の β 1,2GT SFP 配列番号 16 と 30 g/L のスクロース (蔗糖) との 100 μ L の総反応体積中、0.01 ~ 0.3 g/L の SFP を用いて、ワンポット反応を行った。THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で振盪しながら 16 時間、

60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で20倍希釈し、24時間、75.1℃でインキュベートした後の10μLの粗振盪フラスコ溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

【表7-5】

表7.3 β1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル					
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号20と比較して)	RebAの 増加、 60℃ ^a	RebMの 増加、 60℃ ^a	RebM (A60からの もの)の増加、 60℃ ^a	活性残存% ^b
25/26	H81T/K139N/M144Q/H1 95Q/K200R/D204T/I207 V/W233Q	++	+++	+++	-
27/28	H81T/Q197K/K200R/I20 7V/W233Q/C338A	-	+	+++	-
29/30	A41E/T72P/C338A	++	++	++	-
35/36	A41E/T72P/W233Q/C33 8A	+	+	+++	+
47/48	Q61D/E259T/K428I	+	+	+	-
99/100	Q61D	-	-	-	-
105/106	Q61E/Q91L/D431M	+	+	-	+
113/114	Q61D/I407T/K428I	-	+	+	-
^a 単一基質については0.019g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.04g/Lで配列番号20の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの未満の産生;「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=参照ポリペプチドと比較して1.1倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを75.1℃での24時間ブレインキュベーション後に、60℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=75.1℃で24時間ブレインキュベーション後に残存した活性20%未満; および「+」=残存した活性20%以上。					

【0213】

これらの実験では、表7.3中の少なくとも4つの改変体は、レバウジオシドA60から配列番号20より多くのレバウジオシドMを産生し、3つの改変体は、ステビオシドからより多くのレバウジオシドA、およびレバウジオシドDからレバウジオシドMも産生した。全ての改変体は、配列番号20より熱安定性が低かった。配列番号36を、ワンポットアッセイでのその優れた性能および熱安定性のわずかな低下のため、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0214】

(実施例8)

配列番号36のベクター1, 3-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、*in situ*で合成されるADP-グルコースを使用するステビオ

ールグリコシドのグルコシル化改善のための、配列番号36に由来する β 1,3-グリコシルトランスフェラーゼ(β 1,3GT)ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびN末端コード領域を標的化した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号35によりコードされるGT(すなわち、配列番号36)の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット(HTP)アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの58種の操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。

【0215】

スクロースからADPへのグルコース転移、次いでADP-グルコースからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTPアッセイ

配列番号35(すなわち、配列番号36の改変体)を発現する清澄化E.coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例6で説明したように清澄化し、次いで、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6に添加して20倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら2時間、75℃でそれらの溶解物をプレインキュベートした。100 μ Lの反応物に10 μ Lのプレインキュベートされた溶解物を用い、20g/LのレバウジオシドA60%基質、0.02g/LのADP(Amrresco、ウルトラピュアグレード)補基質、0.03g/LのSUS SFP配列番号22、0.08g/Lの β -1,2-グリコシルトランスフェラーゼ(β 12GT)配列番号858、および30g/Lのスクロース(蔗糖)を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した:THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のRapidFire-MS/MSにより試料を分析した。in situで合成されるADP-グルコースを用いてレバウジオシドA60からレバウジオシドMを配列番号36より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表8.1に収載する。修飾N末端DNAコード配列を有するが、アミノ酸変異を有さない、4つの追加の改変体も、配列番号277/278、279/280、281/282、および283/284で同定した。配列番号36と比較して表8.2に示す改変体の分析のために、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表8.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 36と比較して)	RebM の増加 ^a
169/170	M144Q/I207V/E259T/E285S/V451Q	+++
171/172	M144Q/S252P/E259T/A426I	+++
173/174	H81T/S111T/M144Q/I207V/E285S/V451Q	+++
175/176	M144Q/E285S/V451Q	+++
177/178	M144Q/I207V/S252P/E259T	+++
179/180	E73S/M144Q/I207V/E259T/E285S/V451Q	+++
181/182	M144Q/I207V/V451Q	+++
183/184	E73S/H81T/M144Q/I207V/E285S/V451Q	+++
185/186	M144Q/S252P/E259T/A426I/V451Q	+++
187/188	E73S/E259T/V451Q	+++
189/190	E73S/M144Q/I207V/E259T/E285S/A426I/V451Q	+++
191/192	H81T/M144Q/I207V/S252P/E285S/A426I	+++
193/194	H81T/M144Q/E259T/E285S	++
195/196	I207V/E259T/A426I/V451Q	++
197/198	M144Q/E259T/E285S	++
199/200	M144Q/I207V/E259T	++
201/202	E73S/M144Q/E259T/E285S	++
203/204	H81T/M144Q/I207V/E259T/V451Q	++
205/206	M144Q/E285S	++
207/208	E73S/H81T/M144Q/I207V/E259T	++
209/210	E73S/S111T/E285S/V451Q	++
211/212	E73S/M144Q/I207V/S252P/A426I/V451Q	++
213/214	M144Q/I207V/E285S/A426I	++
215/216	S111T/M144Q/E259T/E285S/A426I/V451Q	++
217/218	H81T/M144Q/E259T	++
219/220	H81T/M144Q/E259T/V451Q	++
221/222	H81T/I207V/S252P/E259T/V451Q	++
223/224	M144Q/I207V/E259T/A426I/V451Q	++
225/226	H81T/S111T/E259T/V451Q	++
227/228	E73S/M144Q/I207V/E259T/A426I/V451Q	+
229/230	E259T/E285S/V451Q	+
231/232	S111T/M144Q/S252P/E259T/E285S/V451Q	+
233/234	M144Q/S252P/E259T/E285S/V451Q	+

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

表8.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 36と比較して)	RebM の増加 ^a
235/236	E259T	+
237/238	E285S	+
239/240	M144Q/V451Q	+
241/242	S111T/M144Q/I207V/S252P/E285S/A426I/V451Q	+
243/244	E73S/E259T/A426I/V451Q	+
245/246	M144Q/S252P/E259T/E285S	+
247/248	I207V/E285S/A426I/V451Q	+
249/250	I207V/S252P/E259T/V451Q	+
251/252	H81T/E285S	+
253/254	H81T/M144Q/S252P/E259T/E285S/V451Q	+
255/256	I207V	+
257/258	H81T/I207V/E285S/A426I/V451Q	+
259/260	I207V/S252P/V451Q	+
261/262	E285S/V451Q	+
263/264	I207V/V451Q	+
265/266	I207V/E259T	+
267/268	E73S/H81T/E259T/E285S/A426I/V451Q	+
269/270	S252P/E259T	+
271/272	H81T/E285S/V451Q	+
273/274	S111T/I207V/E285S	+
275/276	E73S/H81T/E259T/V451Q	+
^a 配列番号36の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、1.28倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.28倍以上、1.38倍未満増大した産生; および「+++」=1.38倍以上増大した産生。		

【0216】

SFP特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからADPへのグルコシル転移、次いでADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 20 g / L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 15 mM ステビオシド (純度 > 95 %) またはレバウジオシド D と 0.02 g / L の ADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0.05 g / L の SUS SFP 配列番号 22 と 37. 5 mM スクロース (蔗糖) との 100 μ L の総反応体積中、0.005 ~ 0.15 g / L の SFP に希釈した。Thermotron (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で振盪しながら 4 時間、60 °C で反応物をインキュベートした。反応物を水での 20 倍希釈により可溶化し、0.2

%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で15倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6と20g/LのRebA60と0.02g/LのADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と0.03g/LのSUS SFP配列番号22と0.08g/Lのβ1,2GT SFP配列番号858と30g/Lのスクロース (蔗糖) との100μLの総反応体積中、0.01~0.3g/LのSFPを用いて、ワンポット反応を行った。THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で20倍希釈し、24時間、75.2℃でインキュベートした後の10μLの粗振盪フラスコ溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

【表8-3】

表8.2 β1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号36と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM (A60からの もの) の増加 ^a	活性残存 ^{%b}
279/280	N/A	+	+	+	+
277/279	N/A	+	+	+	+
185/186	M144Q/S252P/E259T/A 426I/V451Q	++	++	++	-
173/174	H81T/S111T/M144Q/I20 7V/E285S/V451Q	+++	+++	+++	-
169/107	M144Q/I207V/E259T/E2 85S/V451Q	+	+++	+++	-
171/172	M144Q/S252P/E259T/A 426I	++	++	+++	+
175/176	M144Q/E285S/V451Q	++	+++	+++	-
177/178	M144Q/I207V/S252P/E2 59T	+	+++	+++	+

^a単一基質については0.019g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.04g/Lで配列番号36の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した:

「-」=参照ポリペプチドのもの未満の産生;

「+」=参照のもの0.92倍以上、参照ポリペプチドの1.2倍未満の産生;

「++」=1.2倍以上、1.4倍未満増大した産生;

および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.4倍以上増大した産生。

^b各改変体についての活性残存パーセントを75.2℃での24時間ブレインキュベーション後に、65℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する:

「-」=75.2℃での24時間ブレインキュベーション後に残存した活性40%未満;

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

表8.2 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、 およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 36と比較して)	RebA の 増加 ^a	RebM の 増加 ^a	RebM (A60 からの もの) の増加 ^a	活性残存率 ^b
および「+」=残存した活性40%以上。					

10

【0217】

これらの実験では、表 8 . 2 中の 2 つの N 末端修飾配列は、配列番号 3 6 と同じことを果たし、6 つの組合せ改変体は、3 つ全ての基質に対してより良好に動作した。配列番号 1 7 4 を、3 つ全ての基質に対するその優れた性能のため、さらなる酵素操作のための出発点として選択した。

【0218】

(実施例 9)

配列番号 1 7 4 のベクター 1 , 3 - A D P - グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、i n s i t u で合成される A D P - グルコースを使用するステビオールグリコシドのグリコシル化改善のための、配列番号 1 7 4 に由来する β 1 , 3 - グリコシルトランスフェラーゼ (β 1 , 3 G T) ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号 1 7 3 によりコードされる G T (すなわち、配列番号 1 7 4) の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースおよびステビオールグリコシドへのグリコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの 6 0 種の操作された G T 改変体ポリペプチドを得た。

20

【0219】

スクロースから A D P へのグルコース転移、次いで A D P - グルコースからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P アッセイ

30

配列番号 1 7 3 改変体 (すなわち、配列番号 1 7 4 の改変体) を発現する清澄化 E . c o l i 培養溶解物の 9 6 ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例 6 で説明したように清澄化し、次いで、5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 に添加して 2 5 ~ 3 3 . 3 倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 2 時間、7 5 ° C でそれらの溶解物をプレインキュベートした。1 0 0 μ L の反応物に 1 0 μ L のプレインキュベートされた溶解物を用い、2 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % 基質、0 . 0 2 g / L の A D P (A m r e s c o、ウルトラピュアグレード) 補基質、0 . 0 3 g / L の S U S S F P 配列番号 1 6 5 2、0 . 0 8 g / L の β - 1 , 2 - グリコシルトランスフェラーゼ (β 1 2 G T) 配列番号 8 5 8、および 3 0 g / L のスクロース (蔗糖) を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 1 6 時間、5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6、6 0 ° C。反応物を水での 2 0 倍希釈により可溶化し、0 . 2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、分析のために水で 2 0 倍希釈した。実施例 5、表 5 . 1 に記載の R a p i d F i r e - M S / M S により試料を分析した。i n s i t u で合成される A D P - グルコースを用いてレバウジオシド A 6 0 からレバウジオシド M を配列番号 1 7 4 より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表 9 . 1 および表 9 . 2 に収載する。加えて、表 9 . 2 に収載する飽和変異誘発改変

40

50

体をさらに4つの条件下でアッセイした。1つは、16時間、70℃でインキュベートしたことを除き、上記のアッセイと同じであった。別の1つは、40 g/LのRebA60をリン酸カリウム希釈緩衝剤のブレインキュベーションに含めたことを除き、上記と同じであった。他の2つは、清澄化溶解物を50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6に添加して25倍希釈し、75℃で2時間ブレインキュベートし、次いで、10倍希釈して、15 mMステビオールグリコシド95%またはレバウジオシドDと30 g/Lのスクロースと0.02 g/LのADPと50 mMリン酸カリウムpH 6と0.03 g/L SUS SFP配列番号1652とを含有する100 μLの反応物にした、単一基質反応条件であった。これらの反応物を16時間、60℃でインキュベートし、水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、低温遠心分離により沈殿させた。次いで、上清を水で15倍希釈し、RapidFire-MS/MSにより分析した。配列番号174と比較して表9.3に示す改変体の分析のために、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表9-1】

表 9.1 β 1,3GT 組合せ改変体 および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 174と比較して)	RebM の増加 ^a
285/286	T80D/A85V/A251I/E259T	+++
287/288	A85V	+++
289/290	T80P/A85V	+++
291/292	A85V/A251M/S252P/L256G	+++
293/294	T80D/T81A/A85V	+++
295/296	T80D/T81A/A85V/A238G	+++
297/298	T80P/T81A/A85V/E259T	++
299/300	T80D/A85V/A251I/S252P/L256G/E259T	++
301/302	T80D/A85V/E259T	++
303/304	A85V/A238G	++
305/306	T81A/A85V/E259T	++
307/308	T80D/A85V	++
309/310	T80D/A85V/A251M	++
311/312	T80P/T81A/A251I/S252P/E259T	++
313/314	T80D/A85V/A238G	++
315/316	T80D/A85V/A251M/S252P	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

表 9.1 β 1,3GT 組合せ改変体 および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 174 と比較して)	RebM の増加 ^a
317/318	T81A/A85V	+
319/320	T81A/A85V/A251M/S252P	+
321/322	T80D/A85V/A251M/S252P/L256G/E259T	+
323/324	T80P/A85V/A251M/S252P/E259T	+
325/326	T80D/E259T	+
327/328	T80D/T81A/A85V/A251M/E259T	+
329/330	E259T	+
331/332	Q270K/E402I	+
333/334	A85V/A251F	+
335/336	A251I/S252P/E259T	+
337/338	T80D/T81A	+
339/340	E420R	+
341/342	T80D/A85V/A238G/A251M/E259T	+
343/344	A85V/L256G/E259T	+
345/346	T80D/T81A/A85V/S252P/L256G/E259T	+
347/348	A85V/A251F/E259T	+
349/350	E175D/E402I	+
^a 配列番号174の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.12倍以上、1.21倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.21倍以上、1.24倍未満増大した産生; および「+++」=1.24倍以上増大した産生。		

【表 9 - 3】

表9.2 β 1,3GT 飽和変異誘発改変体およびRebMレベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 174 と比較して)	RebA の 増加 ^a	RebM の 増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 60°C) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 70°C) の増加 ^a	RebM(A60 からのもの、 A60 をプレ インキュベートした) の増加 ^a
351/352	G326E	++	++	+++	++	+++
353/354	G404V	++	++	+++	+++	+++
355/356	S443A	++	++	+++	++	+
357/358	S5L	+++	++	+++	+++	++
359/360	G326A	++	++	+++	++	++

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

表9.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 174 と比較して)	RebA の 増加 ^a	RebM の 増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 60°C) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 70°C) の増加 ^a	RebM(A60 からのもの、 A60 をプレ インキュベートした) の増加 ^a
361/362	N3S	++	+	++	++	+++
363/364	S5T	++	+	++	+	++
365/366	M422I	+	++	++	++	++
367/368	S455M	++	+	++	++	++
369/370	T7A	++	+	++	+	++
371/372	V299M	+	+	++	-	-
373/374	G404M	+	++	++	++	++
375/376	G326S	++	+	++	++	+
377/378	V232I/Y317L	-	+	++	-	++
379/380	G326N	++	+	++	+	+
381/382	V393I	+	-	++	+	+
383/384	S5A	++	+	++	++	++
385/386	A153C	+	+	+	++	++
387/388	S5H	++	+	+	+	+
389/390	T7Q	+	+	+	+	+
391/392	A409S	++	+	+	+	-
393/394	Q451V	+	-	+	+	+
395/396	S455R	+	+	+	+++	+
397/398	Q451E	+	+	+	+	-
399/400	E99V	-	-	+	+	+
401/402	S252A	-	+	+	-	+
403/404	S273K	+	+	+	+	+
^a 配列番号174の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのもの未満の産生; 「+」=参照のもの以上、1.1倍未満増大した産生; 「++」=参照のものの1.1倍以上、1.2倍未満; および「+++」=参照と比較して1.2倍以上増大した産生。						

【0220】

SFP特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからADPへのグルコシル転移、次いでADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 20 g / L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 15 mM ステビオシド (純度 > 95 %) またはレバウジオシド D と 0.02 g / L の ADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0.03 g / L の SUS SFP 配列番号 1652 と 37.5 mM スクロース (蔗糖) との 100 μ L の総反応体積中、0.005 ~ 0.15 g / L の SFP に希釈した。THERMOTRO

N（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら4時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で15倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6と20g/LのRebA60と0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質と0.03g/LのSUS SFP配列番号1652と0.08g/Lのβ1,2GTSFP配列番号858と30g/Lのスクロース（蔗糖）との100μLの総反応体積中の0.01~0.3g/LのSFPを用いて、ワンポット反応を行った。THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で20倍希釈し、24時間、75.2℃でインキュベートした後の10μLの粗振盪フラスコ溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

【表9-5】

表9.3 β1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号174と比較して)	RebAの 増加、 60℃ ^a	RebMの 増加、 60℃ ^a	RebM (A60 からのもの) の増加、60℃ ^a	活性残存% ^b
287/288	A85V	++	++	+++	++
285/286	T80D/A85V/A251I/E259 T	++	++	+++	+++
291/292	A85V/A251M/S252P/L2 56G	-	++	+++	-
293/294	T80D/T81A/A85V	+	+	+++	+
289/290	T80P/A85V	++	-	++	++
349/350	E175D/E402I	+	-	-	+++
331/332	Q270K/E402I	-	-	-	-

^a単一基質については0.019g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.04g/Lで配列番号174の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した:
「-」=参照ポリペプチドのもの未満の産生;
「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生;
「++」=1.1倍以上、1.2倍未満増大した産生;
および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.2倍以上増大した産生。

^b各改変体についての活性残存パーセントを75.2℃での24時間プレインキュベーション後に、65℃での24時間プレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する:
「-」=75.2℃での24時間プレインキュベーション後に残存した活性20%未満;
「+」=残存した活性20%以上だが、活性残存30%未満;
「++」=残存した活性30%以上だが、活性残存40%未満;
および「+++」=残存した活性40%以上。

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

表9.3 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、 およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号174と比較して)	RebAの 増加、 60°C ^a	RebMの 増加、 60°C ^a	RebM (A60 からのもの) の増加、60°C ^a	活性残存% ^b

【0221】

これらの実験では、表9.3中の5つの改変体は、レバウジオシドA60から配列番号174より多くのレバウジオシドMを産生し、4つの改変体は、ステビオシドからより多くのレバウジオシドAも産生し、これらの3つは、レバウジオシドDからより多くのレバウジオシドMも産生した。いくつかの改変体は、配列番号190より熱安定性が有意に高かった。最も熱安定性の高い改変体である配列番号350を、実施例8からの最良のN末端DNA配列（配列番号279／280）を用いて再クローニングし、配列番号406であるこの酵素を、さらなる酵素操作の出発点として使用した。

【0222】

(実施例10)

配列番号406のベクター1，3-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、*in situ*で合成されるADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化改善のための、配列番号406に由来する β 1，3-グリコシルトランスフェラーゼ（ β 1，3GT）ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号405によりコードされるGT（すなわち、配列番号406）の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット（HTP）アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの16種の操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。

【0223】

スクロースからADPへのグルコース転移、次いでADP-グルコースからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTPアッセイ

配列番号405改変体（すなわち、配列番号406の改変体）を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例6で説明したように清澄化し、次いで、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6に添加して15倍希釈し、別途、40g/LのレバウジオシドA60%基質を伴う同じ緩衝剤に添加して15倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら2時間、75°Cでそれらの溶解物をプレインキュベートした。100μLの反応物に10μLのプレインキュベートされた溶解物を用い、20g/LのレバウジオシドA60%基質、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質、0.03g/LのSUS SFP配列番号1822、0.06g/Lの β -1，2-グリコシルトランスフェラーゼ（ β 12GT）配列番号994、および30g/Lのスクロース（蔗糖）を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60°C。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のRapidFire-MS/MSにより試料を分析した。*in situ*で合成されるADP-グルコースを用いてレバウ

10

20

30

40

50

ジオシド A 6 0 からレバウジオシド M を配列番号 4 0 6 より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表 1 0 . 1 に収載する。

【表 1 0】

表10.1 β 1,3GT 組合せ改変体および RebM レベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号406と比較して)	RebMの増加 ^a	RebM の増加 (A60をブレインキュベートした) ^a
407/408	A85V/E259T	++	++
409/410	A85V/D175E/E259T	++	+++
411/412	A85V/D175E/A251I/E259T/I402E	++	++
413/414	A85V	++	++
415/416	A85V/D175E/E259T/I402E	++	+++
417/418	A85V/D175E/I402E	++	+
419/420	T81A/A85V/A251I/E259T	++	++
421/422	T81A/A85V/A251I	++	++
423/424	T81A/A85V/E259T/I402E	++	++
425/426	T81A/A85V/D175E/E259T/I402E	++	+
427/428	A85V/I402E	++	++
429/430	A85V/E259T/I402E	++	++
431/432	T81A/A85V	++	++
433/434	A85V/D175E	++	++
435/436	A85V/D175E/A251I	+	++
437/438	T81A/A85V/E259T	+	++
^a 配列番号406の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.1倍以上、1.25倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.25倍以上、1.5倍未満増大した産生; および「+++」=1.5倍以上増大した産生。			

【0 2 2 4】

表 1 0 . 1 に収載した改変体からの配列番号 4 0 8 を、レバウジオシド A 6 0 % を伴うおよび伴わないリン酸カリウム緩衝剤中でのブレインキュベートに対する安定性の改善、ならびに 2 つの変異 A 8 5 V および E 2 5 9 T に関連する利点に基づいて、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0 2 2 5】

(実施例 1 1)

配列番号 4 0 8 のベクター 1 , 3 - A D P - グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、i n s i t u で合成される A D P - グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号 4 0 8 に由来する β 1 , 3 - グリコシルトランスフェラーゼ (β 1 , 3 G T) ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号 4 0 7 によりコードされる G T (すなわち、配列番号 4 0

8) の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの 3 9 種の操作された G T 改変体ポリペプチドを得た。

【0 2 2 6】

スクロースからの A D P へのグルコース転移、次いで A D P-グルコースからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P アッセイ

配列番号 4 0 7 改変体 (すなわち、配列番号 4 0 8 の改変体) を発現する清澄化 E . c o l i 培養溶解物の 9 6 ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例 6 で説明したように清澄化し、次いで、6 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % を伴う 5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 に添加して 2 0 倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 2 時間、7 5 ° C でそれらの溶解物をブレインキュベートした。1 0 0 μ L の反応物に 1 0 μ L のブレインキュベートされた溶解物を用い、2 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % 基質、0 . 0 2 g / L の A D P (A m r e s c o 、ウルトラピュアグレード) 補基質、0 . 0 3 g / L の S U S S F P 配列番号 1 8 2 2 、0 . 0 6 g / L の β - 1 , 2 - グリコシルトランスフェラーゼ (β 1 2 G T) 配列番号 1 0 8 0 、および 3 0 g / L のスクロース (蔗糖) を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 1 6 時間、5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 、6 0 ° C 。反応物を水での 2 0 倍希釈により可溶化し、0 . 2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、分析のために水で 2 0 倍希釈した。実施例 5 、表 5 . 1 に記載の R a p i d F i r e - M S / M S により試料を分析した。i n s i t u で合成される A D P-グルコースを用いてレバウジオシド A 6 0 からレバウジオシド M を配列番号 4 0 8 より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表 1 1 . 1 および表 1 1 . 2 に収載する。配列番号 4 0 8 と比較して表 1 1 . 3 に示す改変体の分析のために、実施例 1 で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表11.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号408と比較して)	RebMの増加 ^a
439/440	A153C	+++
441/442	A153C/G326S/S443A	++
443/444	A153C/G326S	++
445/446	V232I/V393I/Q451E	++
447/448	G326E	++
449/450	V232I	+
451/452	G404V	+
453/454	A153C/G326S/S443A/S455M	+
455/456	G326S	+
457/458	Q451E	+
459/460	V232I/S273K/V299M	+
461/462	V299M/Q451E	+
^a 配列番号408の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.1倍以上、1.15倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.15倍以上、1.3倍未満増大した産生; および「+++」=1.3倍以上増大した産生。		

【表 1 1 - 2】

表11.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号408と比較して)	RebMの増加 ^a
463/464	D170P	+++
465/466	D170G	+++
467/468	A300S	+++
469/470	S146G	+++
471/472	R412A	+++
473/474	D170C	++
475/476	E116R	++
477/478	D170T	++
479/480	D170S	++
481/482	R412K	++
483/484	S227T	++
485/486	A438Q	++

【表 1 1 - 3】

表11.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号408と比較して)	RebMの増加 ^a
487/488	E330T	++
489/490	K315T	+
491/492	E448H	+
493/494	N408C	+
495/496	T361C	+
497/498	E330G	+
499/500	R296V	+
501/502	E116D	+
503/504	F327Y	+
505/506	R449S	+
507/508	R173S	+
509/510	L25A	+
511/512	R412S	+
513/514	E116S	+
515/516	N408T	+
^a 配列番号408の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.10倍以上、1.14倍未満増大した産生; 「++」=1.14倍以上、1.19倍未満増大した産生; および「+++」=1.19倍を超えて増大した産生。		

【0 2 2 7】

SFP特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからADPへのグルコシル転移、次いでADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末(SFP)を20 g/Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と15 mMステビオシド(純度>95%)またはレバウジオシドDと0.02 g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)補基質と0.03 g/LのSUS SFP配列番号1822と37.5 mMスクロース(蔗糖)との100 μ Lの総反応体積中、0.005~0.15 g/LのSFPに希釈した。THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら4時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で15倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と20 g/LのRebA60と0.02 g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)補基質と0.03 g/LのSUS SFP配列番号1822と0.06 g/Lの β 1,2GT SFP配列番号1080と30 g/Lのスクロース(蔗糖)との100 μ Lの総反応体積中の0.01~0.3 g/LのSFPを用いて、ワンポット反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、75℃で2時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。THERMO

TRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で20倍希釈し、24時間、75.2℃でインキュベートした後の10μLの粗振盪フラスコ溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

【表11-4】

表11.3 β1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号408と 比較して)	RebA の 増加 ^a	RebM の 増加 ^a	RebM (A60 からのもの) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 A60をプレ インキュベートした) の増加 ^a	活性残存% ^b
439/440	A153C	++	++	+	+	++
449/450	V232I	++	+	+	++	+
445/446	V232I/V393I/ Q451E	+++	+	++	++	-
457/458	Q451E	+++	+	+	+	-

^a単一基質については0.009g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.02g/Lで配列番号408の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した:
「+」=参照のものの1.1倍未満の産生;
「++」=参照のものの1.1倍以上、参照ポリペプチドの1.25倍未満の産生;
および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.25倍以上増大した産生。

^b各改変体についての活性残存パーセントを75.2℃での24時間プレインキュベーション後に、65℃での24時間プレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する:
「-」=75.2℃での24時間プレインキュベーション後に残存した活性30%未満;
「+」=残存した活性30%以上、しかし活性残存は50%未満であった;
および「++」=残存した活性50%以上。

【0228】

これらの実験では、表11.3中の4つ全ての改変体は、レバウジオシドA60から配列番号408より多くのレバウジオシドM、ステビオシドからより多くのレバウジオシドA、およびレバウジオシドDからより多くのレバウジオシドMを産生した。最も熱安定性の高い改変体である配列番号440を、さらなる酵素操作の出発点として使用した。

【0229】

(実施例12)

配列番号440のベクター1, 3-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、in situで合成されるADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグリコシル化の改善のための、配列番号440に由来するβ1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ(β1, 3GT)ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号439によりコードされるGT(すなわち、配列番号440)の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット(HTP)アッセイを使用してスクリーニングして、AD

P-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの36種の操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。

【0230】

スクロースからADPへのグルコース転移、次いでADP-グルコースからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTPアッセイ

配列番号440改変体を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例6で説明したように清澄化し、次いで、80g/LのレバウジオシドA60%を伴う50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6に添加して20倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら2時間、75℃でそれらの溶解物をプレインキュベートした。100μLの反応物に10μLのプレインキュベートされた溶解物を用い、20g/LのレバウジオシドA60%基質、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質、0.03g/LのSUS SFP配列番号1822、0.06g/Lのβ-1,2-グリコシルトランスフェラーゼ（β12GT）配列番号1080、および30g/Lのスクロース（蔗糖）を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のRapidFire-MS/MSにより試料を分析した。in situで合成されるADP-グルコースを用いてレバウジオシドA60からレバウジオシドMを配列番号440より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表12.1および表12.2に記載する。配列番号440と比較して表12.3に示す改変体の分析のために、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表12-1】

表12.1 β1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号440と比較して)	RebMの増加 ^a
517/518	S146G/D170S/V232I	+++
519/520	S146G/D170T/W196I/V232I	+++
521/522	S146G/D170S/V232I/R423K/E448H/Q451E/S455M	+++
523/524	S146G/W196I/V232I	+++
525/526	S146G/W196I/V232I/T259E/E448H/Q451E	++
527/528	S146G/D170T/W196I/V232I/Q451E/S455R	++

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

表12.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号440と比較して)	RebMの増加 ^a
529/530	S146G/D170T/V232I/R423K	++
531/532	S146G/V232I/K315S/R423K/Q451E/S455M	++
533/534	S146G/V232I/G326E	++
535/536	S146G/D170T/W196I/V232I/R423K	++
537/538	S146G/D170S/W196I	+
539/540	S146G/V232I/Q451E	+
541/542	S146G/V232I/E448H	+
543/544	S146G/W196I	+
545/546	S146G/V413M/Q451E/S455M	+
547/548	S146G/V232I/K315S	+
549/550	S146G/D170T/T259E	+
551/552	S146G/V232I/T259E/S455M	+
553/554	S146G/W196I/S455R	+
555/556	S146G/D170T/W196I/N408T/Q451E	+
^a 配列番号440の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.36倍以上、1.52倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.52倍以上、1.65倍未満増大した産生; および「+++」=1.65倍以上増大した産生。		

【表 1 2 - 3】

表12.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号440と比較して)	RebMの増加 ^a
557/558	E209Y	+++
559/560	D204M	+++
561/562	A107C	+++
563/564	K289A	++
565/566	L161E	++
567/568	V9L	++
569/570	R12Q	++
571/572	P417V	++
573/574	E169T	+
575/576	S337W	+
577/578	C156S	+

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 4】

表12.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号440と比較して)	RebMの増加 ^a
579/580	P131A	+
581/582	S337N	+
583/584	A199S	+
585/586	Q233K	+
587/588	S262A	+
^a 配列番号440の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.07倍以上、1.12倍未満増大した産生; 「++」=参照のものの1.12倍以上、1.16倍未満増大した産生; および「+++」=1.16倍以上増大した産生。		

10

【0 2 3 1】

S F P 特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからA D Pへのグルコシル転移、次いでA D P-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移について

20

振盪フラスコ粉末 (S F P) を 2 0 g / L の濃度に再構成し、5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 と 1 5 m M ステビオシド (純度 > 9 5 %) またはレバウジオシド D と 0 . 0 2 g / L の A D P (A m r e s c o、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0 . 0 3 g / L の S U S S F P 配列番号 1 8 2 2 と 3 7 . 5 m M スクロース (蔗糖) との 1 0 0 μ L の総反応体積中、0 . 0 0 5 ~ 0 . 1 5 g / L の S F P に希釈した。T h e r m o t r o n (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 4 時間、6 0 ° C で反応物をインキュベートした。反応物を水での 2 0 倍希釈により可溶化し、0 . 2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で 1 5 倍希釈した。実施例 5、表 5 . 1 に記載の S P E - Q Q Q によりグリコシル化産物を検出した。5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 と 2 0 g / L の R e b A 6 0 と 0 . 0 2 g / L の A D P (A m r e s c o、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0 . 0 3 g / L の S U S S F P 配列番号 1 8 2 2 と 0 . 0 6 g / L の β 1 , 2 G T S F P 配列番号 1 0 8 0 と 3 0 g / L のスクロース (蔗糖) との 1 0 0 μ L の総反応体積中の 0 . 0 1 ~ 0 . 3 g / L の S F P を用いて、ワンポット反応を行った。S F P 希釈物の一方のセットは、8 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % と共に 5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 中で 2 時間、7 5 ° C でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 1 6 時間、6 0 ° C で反応物をインキュベートした。反応物を水での 2 0 倍希釈により可溶化し、0 . 2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で 2 0 倍希釈した。7 8 . 5 ° C で 2 4 時間インキュベートした 5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 中の 1 . 5 m g / m L の振盪フラスコ粉末 1 0 μ L を用いて、類似のワンポット反応も行った。

30

40

50

【表 1 2 - 5】

表12.3 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、 およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 440 と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM (A60 からのもの) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 A60をプレ インキュベートした) の増加 ^a	活性残存% ^b
541/542	S146G/V232I/ E448H	-	+	+	+	-
537/538	S146G/D170S /W196I	-	+	+++	++	-
523/524	S146G/W196I /V232I	-	+	+++	++	-
525/526	S146G/W196I /V232I/T259E /E448H/Q451 E	-	+	++	+	-
527/528	S146G/D170T /W196I/V232I /Q451E/S455 R	-	++	+++	+++	++
519/520	S146G/D170T /W196I/V232I	-	++	+++	+++	-
517/518	S146G/D170S /V232I	-	++	++	++	+
521/522	S146G/D170S /V232I/R423 K/E448H/Q45 1E/S455M	-	++	++	++	-
^a 単一基質については0.009g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.02g/Lで配列番号440の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.25倍未満の産生; 「++」=1.25倍以上、1.5倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.5倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを78.5℃での24時間ブレインキュベーション後に、65℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=78.5℃での24時間ブレインキュベーション後に残存した活性50%未満; 「+」=残存した活性50%以上、活性残存60%未満;						

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 6】

表12.3 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、 およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 440 と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM (A60 からのもの) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 A60をプレ インキュベートした) の増加 ^a	活性残存% ^b
および「++」=残存した活性60%以上。						

10

【0 2 3 2】

これらの実験では、表 1 2 . 3 中の 8 つ全ての改変体は、配列番号 4 4 0 より多くのレバウジオシド M をレバウジオシド A 6 0 からおよびレバウジオシド D から産生した。改変体の全てはまた、レバウジオシド A を形成するためのステビオシドのグルコシル化を触媒する点で活性が低かった。3 つの基質に対して最も活性の高い改変体である配列番号 5 2 0 を、さらなる酵素操作の出発点として使用した。

【0 2 3 3】

(実施例 1 3)

配列番号 5 2 0 のベクター 1 , 3 - A D P - グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、*in situ*で合成される A D P - グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号 5 2 0 に由来する β 1 , 3 - グリコシルトランスフェラーゼ (β 1 , 3 G T) ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号 5 1 9 によりコードされる G T (すなわち、配列番号 5 2 0) の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの 4 4 種の操作された G T 改変体ポリペプチドを得た。

20

30

【0 2 3 4】

スクロースから A D P へのグルコース転移、次いで A D P - グルコースからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P アッセイ

配列番号 5 1 9 改変体 (すなわち、配列番号 5 2 0 の改変体) を発現する清澄化 *E. coli* 培養溶解物の 9 6 ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例 6 で説明したように清澄化し、次いで、1 0 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % を伴う 5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 に添加して 4 9 倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 2 時間、7 5 ° C でそれらの溶解物をプレインキュベートした。1 0 0 μ L の反応物に 1 0 μ L のプレインキュベートされた溶解物を用い、4 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % 基質、0 . 0 2 g / L の A D P (A m r e s c o 、ウルトラピュアグレード) 補基質、0 . 0 6 g / L の S U S S F P 配列番号 2 1 8 2 、0 . 1 2 g / L の β - 1 , 2 - グリコシルトランスフェラーゼ (β 1 2 G T) 配列番号 1 2 1 6 、および 6 0 g / L のスクロース (蔗糖) を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 1 6 時間、5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 、6 0 ° C 。反応物を水での 4 0 倍希釈により可溶化し、0 . 2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、分析のために水で 2 0 倍希釈した。実施例 5 、表 5 . 1 に記載の R a p i d F i r e - M S / M S により試料を分析した。*in situ*で合成される A D P - グルコースを用いてレバウジオシド A 6 0 からレバウジオシド M を配列

40

50

番号 520 より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表 13.1 および表 13.2 に収載する。配列番号 520 と比較して表 13.3 に示す改変体の分析のために、実施例 1 で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。
【表 13-1】

表13.1 β 1,3GT 組合せ改変体および RebM レベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号520と比較して)	RebMの 増加 ^a
589/590	D204M/Q451E/S455R	+++
591/592	V9L/R12Q/A199S/D204M/E209Y/S337N/S455R	+++
593/594	V9L/D204M	+++
595/596	L161E/D204M/P417V	+++
597/598	V9L/D204M/T259E/K289A	+++
599/600	V9L/R12Q/L161E/E169T/A199S/E209Y/S337W	++
601/602	V9L/A107C/C156S/L161E/A199S/D204M/P417V/S455R	++
603/604	A107C/A199S/E209Y/T259E/Q451E/S455R	++
605/606	Q451E/S455R	++
607/608	V9L/E169T/D204M/K289A/S337W/Q451E/S455R	++
609/610	V9L/P131A/C156S/E209Y/K289A/S337N	++
611/612	V9L/R12Q/A107C/L161E/A199S/E209Y/S337N	++
613/614	C156S/E169T/A199S/D204M/E209Y/T259E/K289A	++
615/616	K289A	+
617/618	R12Q/V14I/A107C/D204M/K289A/S455R	+
619/620	V9L/A107C/L161E/E209Y/T259E/K289A/Q451E/S455R	+
621/622	V9L/P131A/D204M/S337N/Q451E	+
623/624	V9L/S337W	+
625/626	A107C/A199S/D204M/K289A	+
627/628	R12Q/A107C/C156S/E209Y/K289A/S455R	+
629/630	V9L/R12Q/A199S/E209Y/S337W/Q451E/S455R	+
631/632	V9L/C156S/E169T/D204M/S337N	+
633/634	R12Q/A107C/P131A/D204M/K289A/S337W/P417V/Q451E/S455R	+
635/636	V9L/A107C/P131A/D204M/T259E/P417V/Q451E	+

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

表13.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号520と比較して)	RebMの 増加 ^a
637/638	A107C/D204M	+
639/640	A107C/L161E/E169T/A199S/D204M/T259E/Q451E	+
^a 配列番号520の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.15倍以上、1.25倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.25倍以上、1.36倍未満増大した産生; および「+++」=1.36倍以上増大した産生。		

10

【表 1 3 - 3】

表13.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号520と比較して)	RebMの増加 ^a
641/642	L257A	++
643/644	K430Q	++
645/646	V413L	++
647/648	K336R	++
649/650	T111C	++
651/652	I410V	++
653/654	T80A	+
655/656	K53Q	+
657/658	F221A	+
659/660	T111S	+
661/662	L16M	+
663/664	H95W	+
665/666	L78V	+
667/668	A426S	+
669/670	L391R	+
671/672	I349V	+
673/674	T54P	+
675/676	T111G	+
^a 配列番号520の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.02倍以上、1.1倍未満増大した産生; および「++」=1.1倍以上増大した産生。		

20

30

40

【0 2 3 5】

S F P 特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからA D Pへのグルコシル転移、次いでA D P-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移につい

50

ての分析

振盪フラスコ粉末（SFP）を20 g/Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と15 mMステビオシド（純度>95%）またはレバウジオシドDと0.02 g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質と0.03 g/LのSUS SFP配列番号2182と37.5 mMスクロース（蔗糖）との100 μLの総反応体積中、0.005~0.15 g/LのSFPに希釈した。THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら4時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で15倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と40 g/LのRebA60と0.02 g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質と0.03 g/LのSUS SFP配列番号2182と0.12 g/Lのβ1,2GT SFP配列番号1216と60 g/Lのスクロース（蔗糖）との100 μLの総反応体積中の0.01~0.3 g/LのSFPを用いて、ワンポット反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、100 g/LのレバウジオシドA60%と共に50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中で2時間、75℃でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら16時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での40倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。100 g/LのレバウジオシドA60%を伴う50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6で25倍希釈して24時間、75.2℃でインキュベートした10 μLの粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

【表13-4】

表13.3 β1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号520 と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM (A60 からのもの) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 A60をプレ インキュベートした) の増加 ^a	活性残存% ^b
625/626	A107C/A199S /D204M/K289 A	+++	+	++	++	+
617/618	R12Q/V14I/A 107C/D204M/ K289A/S455R	+++	+	++	++	+
589/590	D204M/Q451 E/S455R	++	+	++	+++	+

10

20

30

40

50

【表 13-5】

表13.3 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 520 と比較して)	RebA の 増加 ^a	RebM の 増加 ^a	RebM (A60 からのもの) の増加 ^a	RebM (A60 からのもの、 A60 をプレ インキュベートした) の増加 ^a	活性残存 ^b
591/592	V9L/R12Q/A 199S/D204M/ E209Y/S337N /S455R	+++	+	+	++	-
639/640	A107C/L161E /E169T/A199 S/D204M/T25 9E/Q451E	+++	+	+	++	-
593/594	V9L/D204M	+	+	+	++	-
609/610	V9L/P131A/C 156S/E209Y/ K289A/S337 N	+	+	+	++	+
^a 単一基質については0.02g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.04g/Lで配列番号520の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上、1.25倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.25倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを75.2°Cでの24時間プレインキュベーション後に、65°Cでの24時間プレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=65°Cでの24時間プレインキュベーション後に残存した活性30%未満; および「+」=残存した活性30%以上。						

【0236】

これらの実験では、表13.3中の7つ全ての改変体は、配列番号520より、多くのレバウジオシドMをレバウジオシドA60からおよびレバウジオシドDから、ならびに多くのレバウジオシドAをステビオシドから産生した。4つの改変体は、配列番号520と同様の熱安定性を有した。プレインキュベーションなしでステビオシドおよびRebA60に対して最も高い活性を有する改変体である配列番号626を、さらなる酵素操作の出発点として使用した。

【0237】

(実施例14)

配列番号626のベクター1, 3-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、in situで合成されるADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号626に由来する β 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ(β 1, 3GT)ポリペプチドの進化およびスクリーニング

の実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた、およびある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した、改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号625によりコードされるGT（すなわち、配列番号626）の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット（HTP）アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの43種の操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。

【0238】

スクロースからADPへのグルコース転移、次いでADP-グルコースからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTPアッセイ

配列番号625改変体（すなわち、配列番号626の改変体）を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例6で説明したように清澄化し、次いで、100g/LのレバウジオシドA60%を伴う50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6に添加して100倍希釈した。溶解物を熱でチャレンジするために、THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら2時間、75℃でそれらの溶解物をプレインキュベートした。100μLの反応物に10μLのプレインキュベートされた溶解物を用い、40g/LのレバウジオシドA60%基質、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質、0.06g/LのSUS SFP配列番号2182、0.09g/Lのβ-1,2-グリコシルトランスフェラーゼ（β12GT）配列番号1488、および60g/Lのスクロース（蔗糖）を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。反応物を水での40倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のRapidFire-MS/MSにより試料を分析した。in situで合成されるADP-グルコースを用いてレバウジオシドA60からレバウジオシドMを配列番号626より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表14.1および表14.2に収載する。配列番号626と比較して表14.3に示す改変体の分析のために、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表14-1】

表14.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号626と比較して)	RebMの 増加 ^a
693/694	L16M/F221A/I410V	+++
695/696	L16M/T80A/F221A/L257A/K336R/I410V	+++
681/682	L16M/F221A/L257A	+++

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

表14.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号626と比較して)	RebMの 増加 ^a
683/684	L16M/T111S/F221A	+++
685/686	T80A/T111S/F221A/L257A/I410V	++
687/688	F221A	++
689/690	L16M/F221A/L257A/K336R/L391R	++
691/692	L16M/L257A	++
693/694	L16M/F221A	++
695/696	T111S/F221A/L257A/L391R	++
697/698	L16M	+
699/700	L16M/T80A/T111C	+
701/702	L16M/T80A/F221A/K336R/I410V	+
703/704	L16M/T80A	+
705/706	F221A/L257A	+
707/708	L16M/L257A/K336R/V413L/E420G	+
709/710	T111S/F221A/L257A/K336R/L391R	+
711/712	L16M/T80A/L257A	+
713/714	L16M/T111C/F221A/L257A/L391R	+
715/716	L16M/T80A/T111S/L257A	+
717/718	L16M/H59Q/T80A/V413L	+
^a 配列番号626の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの1.15倍以上、1.22倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.22倍以上、1.28倍未満増大した産生; および「+++」=1.28倍以上増大した産生。		

【表 1 4 - 3】

表14.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル				
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号626と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM(A60からのもの) の増加 ^a
719/720	S194P	+	+++	+++
721/722	S5N	+	+++	+++
723/724	S5M	+	+++	+++
725/726	S5L	+	+++	+++
727/728	A118V	+	++	++
729/730	V286L	+	++	++

【表 1 4 - 4】

表14.2 β 1,3GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル				
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号626と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM(A60からのもの) の増加 ^a
731/732	S254T	+	+++	++
733/734	E418D	+	+++	++
735/736	K102R	+	++	++
737/738	A118S	+	++	++
739/740	Q91V	+	+	++
741/742	V14L	+	+	+
743/744	E99S	+	+	+
745/746	E99L	+	+	+
747/748	D416E	+	+	+
749/750	S254G	+	+	+
751/752	T7L	+	++	+
753/754	L138I	+	+	+
755/756	S254V	+	+	+
757/758	S5Q	+	+	+
759/760	E420A	+	+	+
761/762	I65V	+	+	+
^a 配列番号626の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの0.95倍以上、1.15倍未満増大した産生; 「++」=参照のものの1.15倍以上、1.3倍未満増大した産生; および「+++」=1.3倍以上増大した産生。				

【0 2 3 9】

SFP特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからADPへのグルコシル転移、次いでADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末(SFP)を20 g/Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と15 mMステビオシド(純度>95%)またはレバウジオシドDと0.02 g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)補基質と0.03 g/LのSUS SFP配列番号2182と37.5 mMスクロース(蔗糖)との100 μ Lの総反応体積中、0.005~0.15 g/LのSFPに希釈した。THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら4時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で15倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と50 g/LのRebA60と0.025 g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)補基質と0.075 g/LのSUS SFP配列番号2182と0.09 g/Lの β 1,2GT SFP配列番号1488と75 g/Lのスクロース(蔗糖)との100 μ Lの総反応体積中の0.01~0.3 g/LのSFPを用いて、ワンポット反応を行った。SF

P希釈物の一方のセットは、100 g/LのレバウジオシドA60%と共に50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中で2時間、75℃でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら16時間、60℃で反応物をインキュベートした。反応物を水での50倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。100 g/LのレバウジオシドA60%を伴う50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6で25倍希釈して24時間、75.2℃でインキュベートした10 µLの粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

【表 14-5】

表14.3 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号626 と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM (A60からの もの)の 増加 ^a	RebM (A60 から のもの、A60 を プレインキュベートした) の増加 ^a	活性残存% ^b
687/688	F221A	+	-	-	+	+
681/682	L16M/F221A/ L257A	++	+	+	+	++
691/692	L16M/L257A	+	-	+	+	+
683/684	L16M/T111S/ F221A	-	-	-	-	+
679/680	L16M/T80A/F 221A/L257A/ K336R/I410V	+++	-	+	+	+++
685/686	T80A/T111S/ F221A/L257A /I410V	++	-	+	+	+
677/678	L16M/F221A/ I410V	++	+	+	++	++

【表 1 4 - 6】

表14.3 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体ならびにRebA、RebDからのRebM、 およびRebA60からのRebM、ならびに熱安定性レベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号626 と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM (A60からの もの)の 増加 ^a	RebM (A60 から のもの、A60 を ブレインキューベートした) の増加 ^a	活性残存% ^b
^a 単一基質については0.02g/Lの振盪フラスコ粉末およびワンポットについては0.04g/Lで配列番号626の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのもの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のもの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.15倍未満の産生; 「++」=1.15倍以上、1.3倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.3倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを75.2°Cでの24時間ブレインキューベーション後に、65°Cでの24時間ブレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=75.2°Cでの24時間ブレインキューベーション後に残存した活性27%以上、57%未満; 「++」=残存した活性57%以上、70%未満; および「+++」=残存した活性70%以上。						

10

20

【0 2 4 0】

これらの実験では、表 1 4 . 3 中の 5 つの改変体は、配列番号 6 2 6 より多くのレバウジオシド M をレバウジオシド A 6 0 から産生した。これらのうち、配列番号 6 7 8 である 1 つの改変体は、ステビオシドのレバウジオシド A へのグルコシル化およびレバウジオシド D のレバウジオシド M へのグルコシル化に対する触媒作用も改善され、配列番号 6 2 6 より熱安定性が高かった。配列番号 6 7 8 であるこの活性かつ熱安定の改変体を、さらなる酵素操作の出発点として使用した。

30

【0 2 4 1】

(実施例 1 5)

配列番号 6 7 8 のベータ-1, 3-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、in situ で合成される ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号 6 7 8 に由来する β 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ (β 1, 3 GT) ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた改変体遺伝子のライブラリーを構築することによって、配列番号 6 7 7 によりコードされる GT (すなわち、配列番号 6 7 8) の定向進化を行った。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (HTP) アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの 4 7 種の操作された GT 改変体ポリペプチドを得た。

40

【0 2 4 2】

スクロースから ADP へのグルコース転移、次いで ADP-グルコースからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての HTP アッセイ

配列番号 6 7 7 改変体 (すなわち、配列番号 6 7 8 の改変体) を発現する清澄化 E. coli 培養溶解物の 96 ウェルプレートを用いてアッセイを行った。ペレットを溶解し、溶解物を実施例 6 で説明したように清澄化し、次いで、100 g/L のレバウジオシド A 6 0 % を伴う 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 に添加して 70 倍希釈した。溶解物

50

を熱でチャレンジするために、THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら2時間、75℃でそれらの溶解物をプレインキュベートした。100μLの反応物に10μLのプレインキュベートされた溶解物を用い、50g/LのレバウジオシドA60%基質、0.025g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質、0.075g/LのSUS SFP配列番号2322、0.09g/Lのβ-1,2-グリコシルトランスフェラーゼ（β12GT）配列番号1488、および75g/Lのスクロース（蔗糖）を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。反応物を水での50倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のRapidFire-MS/MSにより試料を分析した。in situで合成されるADP-グルコースを用いてレバウジオシドA60からレバウジオシドMを配列番号678より大量に産生するグリコシルトランスフェラーゼ改変体ポリペプチドを同定した。これらの操作されたポリペプチドを表15.1に収載する。配列番号678と比較して表15.2に示す改変体の分析のために、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、清澄化し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表15-1】

表15.1 β1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号678と比較して)	RebMの増加 ^a
763/764	S5N/Q91V/S194P/E418D	+++
765/766	S5N/Q91V/A118S/V286L	+++
767/768	S5N/Q91V/S106I/S254T/V286L	+++
769/770	S5N/A118S/S194P/V286L/E418D	+++
771/772	S5N/S194P	+++
773/774	Q91V/A118V/S194P	+++
775/776	S5N/Q91V	+++
777/778	S5N/Q91V/S254T/V286L	+++
779/780	V14L/E99L	+++
781/782	S5N/Q91V/A118V/S194P/S254T/V286L	++
783/784	S5N/A118V/S254T	++
785/786	T7L/V14L/I65V/E99L	++
787/788	Q91V/A118V/S194P/V286L	++
789/790	V14L/E99L/S254G	++
791/792	S5N/Q91V/S194P/S254T	++

【表 15 - 2】

表15.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号678と比較して)	RebMの増加 ^a
793/794	A118V/V286L/E418D	++
795/796	S5N/K102R/E418D	++
797/798	V14L/S455R	++
799/800	V14L/E99S/D416E	++
801/802	S5N/A118S/V286L	++
803/804	V14L/D167E	++
805/806	S5L/V14L/E99L	++
807/808	V14L/E99L/S254G/D416E/S455R	++
809/810	Q91V/A118V/V286L	+
811/812	S5N/Q91V/A118V/S194P/E418D	+
813/814	S5N/Q91V/K102R/S254T/E418D	+
815/816	V14L/E99L/D416E	+
817/818	V14L/S254G	+
819/820	V14L	+
821/822	V14L/I65V/E99L/D416E	+
823/824	S5N/Q91V/A118S/S254T/V286L/E418D	+
825/826	T7L/V14L/E99S/D416E	+
827/828	S5N/Q91V/A118S/S194P/S254T/E418D	+
829/830	S5N/Q91V/K102R/A118V	+
831/832	Q91V/A118V	+
833/834	Q91V/K102R/S194P	+
835/836	V14L/E99L/S254G/D416E	+
837/839	Q91V	+
841/840	S5N	+
841/842	T7L/V14L	+
843/844	Q91V/S194P/S254T/V286L	+
845/846	S5N/Q91V/S254T	+
847/848	S5N/E418D	+
849/850	Q91V/A118V/S194P/E418D	+
851/852	S5L/V14L/D416E	+
853/854	Q91V/V286L	+
855/856	S5N/S254T/V286L	+

10

20

30

40

50

【表 15 - 3】

表15.1 β 1,3GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号678と比較して)	RebMの増加 ^a
^a 配列番号678の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.32倍以上、1.46倍未満増大した産生; 「++」=参照ポリペプチドと比較して1.46倍以上、1.62倍未満増大した産生; および「+++」=1.62倍以上増大した産生。		

10

【0243】

SFP特徴付けアッセイ、ならびにスクロースからADPへのグルコシル転移、次いでADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 20 g/L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 15 mM ステビオシド (純度 > 95%) またはレバウジオシド D またはレバウジオシド E (β 1, 2 GT で処理したステビオシドから社内で調製した) と 0.02 g/L の ADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0.025 g/L の SUS SFP 配列番号 2322 と 37.5 mM スクロース (蔗糖) との 100 μ L の総反応体積中、0.0125 ~ 0.2 g/L の SFP に希釈した。THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で振盪しながら 4 時間、60°C で反応物をインキュベートした。反応物を水での 20 倍希釈により可溶化し、0.2% ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で 15 倍希釈した。実施例 5、表 5.1 に記載の SPE-QQQ によりグリコシル化産物を検出した。50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 100 g/L の RebA60 と 0.05 g/L の ADP (Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と 0.2 g/L の SUS SFP 配列番号 2322 と 0.2 g/L の β 1, 2 GT SFP 配列番号 1516 と 150 g/L のスクロース (蔗糖) との 100 μ L の総反応体積中の 0.0125 ~ 0.2 g/L の SFP を用いて、ワンポット反応を行った。SFP 希釈物の一方のセットは、100 g/L のレバウジオシド A60% と共に 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 中で 2 時間、75°C でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で振盪しながら 16 時間、60°C で反応物をインキュベートした。反応物を水での 100 倍希釈により可溶化し、0.2% ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で 20 倍希釈した。100 g/L のレバウジオシド A60% を伴う 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 で 25 倍希釈して 24 時間、75.2°C でインキュベートした 10 μ L の粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポット反応も行った。

20

30

40

50

【表 15 - 4】

表15.2 β 1,3GT振盪フラスコ粉末改変体およびRebA; RebD、RebEおよびRebA60からのRebM;ならびに熱安定性レベル							
配列番号 (nt/ aa)	アミノ酸相違 (配列番号678 と比較して)	RebAの 増加 ^a	RebM (RebEからの もの) の 増加 ^a	RebM (RebD からの もの) の 増加 ^a	RebM (A60からの もの) の増加 ^a	RebM (A60 からの もの、 A60 をブレ インキュベートした) の増加 ^a	活性 残存% ^b
767/768	S5N/Q91V/ S106I/S254 T/V286L	+	+++	+	++	+++	++
765/766	S5N/Q91V/ A118S/V28 6L	-	+++	+	++	+++	-
777/778	S5N/Q91V/ S254T/V28 6L	-	++	+	+	++	-
819/820	V14L	+	-	+	-	+	-
779/780	V14L/E99L	+	+	+	+	+	+
821/822	V14L/I65V/ E99L/D416 E	+	-	-	-	+	+
789/790	V14L/E99L/ S254G	+	+	+	+	+	+
^a 振盪フラスコ粉末0.025g/Lで配列番号678の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのもの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のもの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上、1.3倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.3倍以上増大した産生。							
^b 各改変体についての活性残存パーセントを75.2℃での24時間ブレインキュベーション後に、65℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=75.2℃での24時間ブレインキュベーション後に残存した活性30%未満; 「+」=残存した活性30%以上、しかし活性残存は39%未満であった; および「++」=残存した活性39%以上。							

【0244】

これらの実験では、表15.2中の3つの改変体は、配列番号678より多くのレバウジオシドMをレバウジオシドA60から産生した。これらのうち、配列番号768である1つの改変体は、熱安定性が配列番号678と少なくとも同様でもあった。したがって、配列番号768を、ADP-グルコースからステビオシドおよびレバウジオシドDへの、それぞれレバウジオシドAおよびレバウジオシドMの形成のための、グリコシル転移を触媒するために最良の酵素として、選択した。

【0245】

(実施例16)

配列番号24のベクター1，2-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグリコシル化の改善のための、配列番号24に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号23によりコードされるGTの定向進化を、改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換え、および酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異

誘発を施した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するH T Pアッセイを使用してスクリーニングして、A D P－グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作されたG T改変体ポリペプチドを得た。組合せライブラリーから16種の操作された改変体を同定し（表16．1）、飽和変異誘発ライブラリーから51種を同定した（表16．2）。
【0246】

スクロースからA D Pへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのH T P結合アッセイ

配列番号23改変体（すなわち、配列番号24の改変体）を発現する清澄化E．c o l i培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、400μLであり、溶解物を50mMリン酸カリウム、pH6．0に添加して150倍希釈し、1時間、75℃でプレインキュベートした。次いで、20g／LのレバウジオシドA60%（R e b A60）基質と0．02g／LのA D P（A m r e s c o、ウルトラピュアグレード）補基質と30g／Lのスクロースとを伴う100μLの反応体積中の、10μLの希釈された溶解物、0．03g／LのS U S S F P配列番号22および0．1g／Lのβ－1，3－グリコシルトランスフェラーゼ（β1，3G T）S F P配列番号20を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：T H E R M O T R O N（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300R P Mで振盪しながら16～18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6．60℃。反応物を、水への添加による20倍希釈により可溶化し、0．2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により20倍希釈した。R e b A60に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表16．1および16．2に収載する。表16．3に収載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表16－1】

表16.1 β1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebMの 増加 ^a
857/858	L16T/Q127V/P169E	+++
859/860	L16T/R423L/R427S	+++
861/862	L16T/P169E	+++
863/864	L16T/P169E/A398M/Q399K	++
865/866	R423L/R427S	++
867/868	L16T	++
869/870	L16T/P169E/R423L	++
871/872	L16T/R423L	++

【表 1 6 - 2】

表16.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebMの 増加 ^a
873/874	A134S	+
875/876	Q399K/R423L	+
877/878	L16T/A398M/R427S	+
879/880	P143G	+
881/882	L16T/P143G/R423L	+
883/884	L16T/A134S	+
885/886	L16T/A398M	+
887/888	L16T/A398M/Q399K	+
^a 配列番号24の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.15倍以上、参照ポリペプチドの1.18倍未満の産生; 「++」=1.18倍以上、1.21倍未満増大した産生; および「+++」=1.21倍以上増大した産生。		

【表 1 6 - 3】

表16.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebMの増加 ^a
889/890	Y44E	+++
891/892	C443G	+++
893/894	H164A	+++
895/896	P233S	+++
897/898	E221D	+++
899/900	H164E	+++
901/902	I248M	+++
903/904	R446L	+++
905/906	Q137T	+++
907/908	S421G	+++
909/910	H3I	++
911/912	P60T	++
913/914	K56A	++
915/916	I392V	++
917/918	I440M	++
919/920	L322R	++
921/922	G281S	++
923/924	V400C	++

10

20

30

40

50

【表 16 - 4】

表16.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebMの増加 ^a
925/926	N433G	++
927/928	A426S	++
929/930	H164Q	++
931/932	R427W	++
933/934	H3V	++
935/936	F158V	++
937/938	F41M	++
939/940	F158H	+
941/942	I139T	+
943/944	L122C	+
945/946	R427A	+
947/948	V8R	+
949/950	S285A	+
951/952	L135V	+
953/954	Q301G	+
955/956	P232A	+
957/958	P233T	+
959/960	H164S	+
961/962	C443H	+
963/964	Q235M	+
965/966	Q11L	+
967/968	G138K	+
969/970	L284V	+
971/972	D249R	+
973/974	N433T	+
975/976	A372S	+
977/978	H164N	+
979/980	G138R	+
981/982	I440L	+
983/984	R176S	+
985/986	S421A	+
987/988	Q235L	+
989/990	Q11P	+

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 5】

表16.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebMの増加 ^a
^a 配列番号24の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.06倍未満の産生; 「++」=1.06倍以上、1.18倍未満増大した産生; および「+++」=1.18倍以上増大した産生。		

10

【0 2 4 7】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末（SFP）を4 g / Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と20 g / LのRebA97（単一基質）またはRebA60（ワンポット）と0.02 g / LのADPと20（単一基質）または30 g / L（ワンポット）のスクロースと0.04 g / LのSUS SFP配列番号22と、ワンポット反応についてのみ、0.15 g / Lの β -1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ（ β 1, 3 GT）SFP配列番号36とを含有する100 μ Lの総反応体積中、0.0013~0.04 g / Lに希釈した。60℃でTHERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで4時間（単一基質）または16~18時間（ワンポット）、反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、75℃で1時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中でブレインキュベートしたが、もう一方のセットはブレインキュベートしなかった。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5. 1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。熱安定性を評価するために、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6で200倍希釈して24時間、66.2℃でインキュベートした10 μ Lの粗清澄化溶解物を用いて、類似の単一基質レバウジオシドA反応も行った。0.01 g / LのSFP負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシドDおよびワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表16. 3に示す。

20

30

【表 1 6 - 6】

表16.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebDの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキュベートした) ^a	活性残存% ^b
867/868	L16T	++	++	+	++
857/858	L16T/Q127V/P169E	++	++	++	++
861/862	L16T/P169E	+	+	+	+

40

50

【表 16 - 7】

表16.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号24と比較して)	RebDの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM の増加 (ブレインキューベートした) ^a	活性残存% ^b
^a 配列番号24の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=1.1倍以上増大した産生。					
^b 各改変体についての活性残存パーセントを66.2℃での23時間プレインキューベーション後に、60℃での24時間プレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=66.2℃での23時間プレインキューベーション後に残存した活性50%以上、60%未満; および「++」=残存した活性60%以上。					

10

【0248】

これらの実験では、表16.3中の3つの改変体は、配列番号24と比較して、レバウジオシドAのレバウジオシドDへのグルコシル化に対する触媒作用、およびレバウジオシドA60%のレバウジオシドMへの変換に関与する β 1, 2-グルコシル化に対する触媒作用が改善された。これらの改変体のうちの2つは、配列番号24より熱安定性も高かった。これらのうち、プレインキューベートして最も改善された改変体である配列番号858を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

20

【0249】

(実施例17)

配列番号858のベクター1, 2-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、ADP-グルコースを使用するステピオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号858に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号857によりコードされるGTの定向進化を、改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた。次に、これらのライブラリーをプレインキューベートし、増殖させ、下で説明するHTPアッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステピオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。44種の操作された改変体を組合せライブラリーから同定した(表17.1)。

30

【0250】

スクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

配列番号857改変体(すなわち、配列番号858の改変体)を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、400 μ Lであり、溶解物を50mMリン酸カリウム、pH6.0に添加して200倍希釈し、2時間、75℃でプレインキューベートした。次いで、20g/LのレバウジオシドA60%(RebA60)基質と0.02g/LのADP(Amrresco、ウルトラピュアグレード)補基質と30g/Lのスクロースとを伴う100 μ Lの反応体積中の、10 μ Lの希釈された溶解物、0.03g/LのSUS SFP配列番号1652および0.1g/Lの β -1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ(β 1, 3GT)SFP配列番号174を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6.60℃。反応物を、水への添加による20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により

40

50

20倍希釈した。RebA60に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表17.1に収載する。表17.2に収載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表17-1】

表17.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号858と比較して)	RebMの 増加 ^a
991/992	H3I/A22G/G198Q/S421G	+++
993/994	A22G/G198Q/I202Y/I248M/I392V	+++
995/996	A22G/K56A/S421G/R423L	+++
997/998	H164E/P233S/I331V/I440M	+++
999/1000	F125L/P233S/C443G/R446L	+++
1001/1002	A22G/K56A	+++
1003/1004	P233S	+++
1005/1006	A22G/S421G/R423L	+++
1007/1008	A22G/I392V	+++
1009/1010	A22G/K56A/Q137T/G198Q/G201A/I248M/L322R/I392V	++
1011/1012	L13Q/P233S/I331V/I440M	++
1013/1014	H3I/A22G/S421G	++
1015/1016	A22G/R423L	++
1017/1018	H164A/I331V	++
1019/1020	A22G/K56A/G198Q/I248M/S421G/R423L	++
1021/1022	H164E/E221D/P233S/I331V/I440M/R446L	++
1023/1024	A22G/K56A/G198Q/I248M/L322R/I392V/S421G	++
1025/1026	H164A/P233S/R446L	++
1027/1028	A22G/Q137T	++
1029/1030	A22G/K56A/G198Q/I202Y/I248M	++
1031/1032	C443G/R446L	++
1033/1034	A22G/I248M/I392V	++
1035/1036	G198Q/I202Y/I392V	+
1037/1038	A329L	+
1039/1040	A22G/K56A/Q137T/G198Q/I248M/I392V/S421G	+
1041/1042	H3I/G201A/I248M/L322R/I392V	+

10

20

30

40

50

【表 17-2】

表17.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号858と比較して)	RebMの 増加 ^a
1043/1044	H3I/G201A/I248M/L322R	+
1045/1046	A22G/S421G	+
1047/1048	P233S/R446L	+
1049/1050	Y44E/H164E/P233S	+
1051/1052	H164A/I440M	+
1053/1054	A22G/K56A/Q137T/L322R	+
1055/1056	H164A/C443G	+
1057/1058	F125L	+
1059/1060	Y44E/H164A/P233S	+
1061/1062	S421G/R423L	+
1063/1064	A22G/K56A/Q137T/L322R/I392V/R423L	+
1065/1066	A22G/Q137T/G198Q/I202Y/I248M	+
1067/1068	A22G/I32L/K56A/P60T/G198Q/I248M/L322R/I392V/S421G	+
1069/1070	E221D/A329L/I331V	+
1071/1072	L13Q/I440M/C443G	+
1073/1074	A22G/P60T/I392V/S421G	+
1075/1076	Y44E/I331V	+
1077/1078	Y44E/H164E/P233S/A329L/I331V	+
^a 配列番号858の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.22倍以上、参照ポリペプチドの1.27倍未満の産生; 「++」=1.27倍以上、1.38倍未満増大した産生; および「+++」=1.38倍以上増大した産生。		

【0251】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末（SFP）を4 g/Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と20 g/LのRebA97（単一基質）またはRebA60（ワンポット）と0.02 g/LのADPと20（単一基質）または30 g/L（ワンポット）のスクロースと0.03 g/LのSUS SFP配列番号1652と、ワンポット反応についてのみ、0.1 g/Lの β -1,3-グリコシルトランスフェラーゼ（ β 1,3GT）SFP配列番号174とを含有する100 μ Lの総反応体積中、0.0013~0.04 g/Lに希釈した。60°CでTHERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで4時間（単一基質）または16~18時間（ワンポット）、反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、75°Cで2時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した

。熱安定性を評価するために、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6で70倍希釈して24時間、71.8℃でインキュベートした10 μLの粗清澄化溶解物を用いて、類似の単一基質レバウジオシドA反応も行った。0.005 g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシドDおよびワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表17.2に示す。

【表17-3】

表17.2 β1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号858と比較して)	RebDの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキュベート した) ^a	活性残存% ^b
997/998	H164E/P233S/I331V/I440M	+	++	+	++
1071/1072	L13Q/I440M/C443G	++	++	+	++
1021/1022	H164E/E221D/P233S/I331V /I440M/R446L	++	++	+	+
1047/1048	P233S/R446L	+	+	+	+
1027/1028	A22G/Q137T	++	++	+	-
993/994	A22G/G198Q/I202Y/I248M /I392V	+++	+++	+	+
1029/1030	A22G/K56A/G198Q/I202Y/ I248M	+++	+++	+	+
991/992	H3I/A22G/G198Q/S421G	+++	++	++	+++
^a 配列番号858の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.3倍未満の産生; 「++」=1.3倍以上、1.6倍未満増大した産生; および「+++」=1.6倍以上増大した産生。					
^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.8℃での23時間ブレインキュベーション後に、65℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=71.8℃での23時間ブレインキュベーション後に残存した活性27%未満; 「+」=残存した活性27%以上、37%未満; 「++」=残存した活性37%以上、42%未満; および「+++」=残存した活性42%以上。					

【0252】

これらの実験では、表17.2中の8つ全ての改変体は、配列番号858と比較して、レバウジオシドAのレバウジオシドDへのグルコシル化に対する触媒作用、およびレバウジオシドA60%のレバウジオシドMへの変換に関与するβ1,2-グルコシル化に対する触媒作用が改善された。両方の基質に対して最も活性の高い改変体である配列番号994を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0253】

(実施例18)

配列番号994のベクター1,2-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号994に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号994によりコードされるGTの定向進化を、改変体遺

伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換え、および酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するHTPアッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。組合せライブラリーから19種の操作された改変体を同定し（表18.1）、飽和変異誘発ライブラリーから25種を同定した（表18.2）。

【0254】

スクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

配列番号994改変体（すなわち、配列番号994の改変体）を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、400μLであり、溶解物を、20g/L（組合せライブラリー）または30g/L（飽和変異誘発ライブラリー）レバウジオシドA60%を伴うまたは伴わない50mMリン酸カリウム、pH6.0に添加して100倍希釈し、2時間、75℃でプレインキュベートした。次いで、20g/LのレバウジオシドA60%（RebA60）基質と0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質と30g/Lのスクロースとを伴う100μLの反応体積中の、10μLの希釈された溶解物、0.03g/LのSUS SFP配列番号1822および0.1g/Lのβ-1,3-グリコシルトランスフェラーゼ（β1,3GT）SFP配列番号350を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6.60℃。反応物を、水への添加による20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により20倍希釈した。RebA60に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表18.1および90.2に記載する。表18.3に記載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表18-1】

表18.1 β1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル			
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号994と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (A60をプレインキュベートした) ^a
1079/1080	H164E/Y202I	++	++
1081/1082	H83Y/Y202I/P233S	++	+

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

表18.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル			
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号994と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebM の増加 (A60をプレインキュベートした) ^a
1083/1084	Y202I/P233S/M248I	++	+
1085/1086	R423L	++	+
1087/1088	Y202I/P233S/M248I/R423L	+	+
1089/1090	P233S	+	-
1091/1092	H164E/Y202I/P233S/I331V	+	+
1093/1094	M248I	+	+
1095/1096	H164E/R423L	+	+
1097/1098	Y202I/I331V	+	+
1099/1100	Y202I/P233S	+	+++
1101/1102	H164E	+	+
1103/1104	Y202I/S421G/R423L	+	+++
1105/1106	Y202I/M248I	+	+++
1107/1108	H164E/Y202I/I331V/R423L	+	+++
1109/1110	Y202I/R423L	+	+++
1111/1112	H164E/Y202I/I331V	+	+++
1113/1114	Y202I/R446L	+	++
1115/1116	H164E/Y202I/M248I/R272C	+	++
^a 配列番号994の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.5倍未満の産生; 「++」=1.5倍以上、3倍未満増大した産生; および「+++」=3倍以上増大した産生。			

【表 18 - 3】

表18.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号994と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (A60をプレ インキュベートした) ^a
1117/1118	K422T	++	++
1119/1120	S54L	++	++
1121/1122	K422A	++	+++
1123/1124	K422V	++	+
1125/1126	L116I	++	++
1127/1128	K132R	++	+

10

20

30

40

50

【表 18 - 4】

表18.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号994と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (A60をプレ インキュベートした) ^a
I129/I130	G7T	++	+
I131/I132	Y84L	++	++
I133/I134	S9L	++	+
I135/I136	S54M	+	+
I137/I138	D10P	+	+
I139/I140	K309E	+	+
I141/I142	A106S	+	+
I143/I144	E165P	+	++
I145/I146	S406Q	+	+
I147/I148	A73S	+	+
I149/I150	D389E	+	++
I151/I152	N286G	+	+++
I153/I154	N115A	+	+
I155/I156	S406H	+	++
I157/I158	E438A	+	+++
I159/I160	A73R	+	+
I161/I162	E438T	+	+++
I163/I164	なし-N 末端 DNA 発現改変体	+	++
I165/I166	S406M	+	+
^a 配列番号994の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.1倍以上、参照ポリペプチドの1.18倍未満の産生; 「++」=1.18倍以上、1.27倍未満増大した産生; および「+++」=1.27倍以上増大した産生。			

【0255】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 4 g / L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 20 g / L の RebA97 (単一基質) または RebA60 (ワンポット) と 0.02 g / L の ADP と 20 (単一基質) または 30 g / L (ワンポット) のスクロースと 0.03 g / L の SUS SFP 配列番号 1822 と、ワンポット反応についてのみ、0.1 g / L の β -1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ (β 1, 3 GT) SFP 配列番号 350 とを含有する 100 μ L の総反応体積中、0.0013 ~ 0.04 g / L に希釈した。60°C で THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で 4 時間 (単一基質) または 16 ~ 18 時間 (ワンポット)、反応を行った。SFP 希釈物の一方のセットは、75°C で 2 時間、10 g / L のレバウジオシド A60 % と共に 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 中でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。反応物を水での 20 倍希釈により可溶化し、0.2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離

により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。熱安定性を評価するために、10g/LのRebA60を伴う50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で70倍希釈して24時間、71.8℃でインキュベートした10μLの粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポットRebA60反応も行った。0.005g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシドDおよびワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表18.3に示す。

【表18-5】

表18.3 β1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号994 と比較して)	RebDの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキュベートした) ^a	活性残存% ^b
1079/1080	H164E/Y202I	-	+	++	+
1081/1082	H83Y/Y202I/P233S	+	-	++	+
1083/1084	Y202I/P233S/M248I	+	+	++	+
1101/1102	H164E	+	+	+	-
1095/1096	H164E/R423L	+	+	-	-
1089/1090	P233S	++	+	-	-
^a 配列番号994の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=1.1倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.8℃での24時間ブレインキュベーション後に、65℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=71.8℃での24時間ブレインキュベーション後に残存した活性16%未満; および「+」=残存した活性16%以上。					

【0256】

これらの実験では、表18.3中の3つの改変体は、ブレインキュベーション後に配列番号994と比較して、レバウジオシドAのレバウジオシドDへのグルコシル化に対する触媒作用が有意に改善された。最も熱安定性の高い改変体である配列番号1080を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0257】

(実施例19)

配列番号1080のベクター1, 2-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体
この実施例では、ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号1080に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号1079によりコードされるGTの定向進化を、改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換え、および酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するHTPアッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。組合せライブラリーから33種の操作された改変体を同定し(表19.1)、飽和変異誘発ライブラリーから38種を同定した(表19

． 2) 。

【 0 2 5 8 】

スクロースから A D P への、それからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P 結合アッセイ

配列番号 1 0 7 9 改変体（すなわち、配列番号 1 0 8 0 の改変体）を発現する清澄化 E . c o l i 培養溶解物の 9 6 ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、4 0 0 μ L であり、溶解物を、3 0 g / L（組合せライブラリー）または 1 0 g / L（飽和変異誘発再試験）レバウジオシド A 6 0 % を伴う 5 0 m M リン酸カリウム、p H 6 . 0 に添加して 1 0 0 倍希釈し、2 時間、7 5 $^{\circ}$ C でプレインキュベートした。次いで、2 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 %（R e b A 6 0）基質と 0 . 0 2 g / L の A D P（A m r e s c o、ウルトラピュアグレード）補基質と 3 0 g / L のスクロースとを伴う 1 0 0 μ L の反応体積中の、1 0 μ L の希釈された溶解物、0 . 0 3 g / L の S U S S F P 配列番号 1 8 2 2 および 0 . 1 g / L の β - 1 , 3 - グリコシルトランスフェラーゼ（ β 1 , 3 G T）S F P 配列番号 3 5 0 を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：T H E R M O T R O N（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて 3 0 0 R P M で振盪しながら 1 6 ~ 1 8 時間、5 0 m M リン酸カリウム緩衝剤、p H 6 . 6 0 $^{\circ}$ C 。反応物を、水への添加による 2 0 倍希釈により可溶化し、0 . 2 % ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により 2 0 倍希釈した。R e b A 6 0 に対するグリコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表 1 9 . 1 および 1 9 . 2 に記載する。表 1 9 . 3 に記載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表 1 9 - 1】

表19.1 β 1,2GT 組合せ改変体および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1080 と比較して)	RebM の増加 ^a
1167/1168	S9L/A73R/L116I/E165P/N286G/K422A	+++
1169/1170	D389E/K422A	+++
1171/1172	E165P	+++
1173/1174	A73R/L116I/N286G	+++
1175/1176	N286G/K422A	+++
1177/1178	A73R/N286G/D389E	+++
1179/1180	A73R/N286G/K422A	++
1181/1182	L116I/E165P/N286G/K422A	++
1183/1184	A73R/K422T	++

【表 19 - 2】

表19.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1080と比較して)	RebMの増加 ^a
1185/1186	A73R/N286G/K422T	++
1187/1188	G7T/E165P	++
1189/1190	N286G	++
1191/1192	A73R/L116I/E165P/N286G/D389E	++
1193/1194	A73R	++
1195/1196	G7T/S9L/A73R/E165P/N286G	++
1197/1198	G7T/L116I/E165P/N286G	++
1199/1200	G7T/S9L/E165P/N286G	+
1201/1202	S54M/S406M	+
1203/1204	L116I/E165P	+
1205/1206	E165P/D389E	+
1207/1208	K422T	+
1209/1210	L116I	+
1211/1212	S9L/N286G/D389E	+
1213/1214	E165P/N286G	+
1215/1216	A73R/L116I/N286G/K422A	+
1217/1218	G7T/S9L/K422A	+
1219/1220	L116I/D389E	+
1221/1222	N115A	+
1223/1224	E165P/D389E/K422T	+
1225/1226	A73R/E165P/N286G	+
1227/1228	Y84L	+
1229/1230	S54M	+
1231/1232	S54L/Y84L	+
^a 配列番号1080の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.37倍以上、参照ポリペプチドの1.65倍未満の産生; 「++」=1.65倍以上、2.02倍未満増大した産生; および「+++」=2.02倍以上増大した産生。		

【表 19 - 3】

表19.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号: (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1080と比較して)	RebMの増加 ^a
1233/1234	Q441R	+++

10

20

30

40

50

【表 19 - 4】

表19.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1080と比較して)	RebMの増加 ^a
1235/1236	V385P	+++
1237/1238	G395D	+++
1239/1240	F185L/T190P	+++
1241/1242	Q441S	+++
1243/1244	Q399R	+++
1245/1246	Q441A	+++
1247/1248	G395H	+++
1249/1250	N445R	++
1251/1252	N447A	++
1253/1254	N445K	++
1255/1256	Y449H	++
1257/1258	V385S	++
1259/1260	G395A	++
1261/1262	N302H	++
1263/1264	G395N	++
1265/1266	N257H	++
1267/1268	Q441K	++
1269/1270	N447S	++
1271/1272	N447R	+
1273/1274	N302R	+
1275/1276	V385M	+
1277/1278	C219L	+
1279/1280	T220A	+
1281/1282	N302T	+
1283/1284	N302L	+
1285/1286	P255R	+
1287/1288	Q441L	+
1289/1290	N447V	+
1291/1292	N302A	+
1293/1294	Y449A	+
1295/1296	T409L	+
1297/1298	A434I	+
1299/1300	G395S/E437L	+

10

20

30

40

50

【表 19 - 5】

表19.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1080と比較して)	RebMの増加 ^a
1301/1302	I412K	+
1303/1304	K416N	+
1305/1306	L401V	+
1307/1308	Y449T	+
^a 配列番号1080の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.11倍以上、参照ポリペプチドの1.22倍未満の産生; 「++」=1.22倍以上、1.40倍未満増大した産生; および「+++」=1.40倍以上増大した産生。		

10

【0259】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 4 g / L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 と 20 g / L の RebA97 もしくはステビオールグリコシド 95 % (単一基質) または RebA60 (ワンポット) と 0.02 g / L の ADP と 20 (単一基質) または 30 g / L (ワンポット) のスクロースと 0.03 g / L の SUS SFP 配列番号 1822 と、ワンポット反応についてのみ、0.1 g / L の β -1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ (β 1, 3GT) SFP 配列番号 440 とを含有する 100 μ L の総反応体積中、0.0013 ~ 0.04 g / L に希釈した。60 °C で THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 RPM で 4 時間 (単一基質) または 16 ~ 18 時間 (ワンポット)、反応を行った。SFP 希釈物の一方のセットは、75 °C で 2 時間、30 g / L のレバウジオシド A60 % と共に 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 中でブレインキュベートしたが、もう一方のセットはブレインキュベートしなかった。反応物を水での 20 倍希釈により可溶化し、0.2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で 20 倍希釈した。実施例 5、表 5. 1 に記載の SPE-QQQ によりグリコシル化産物を検出した。熱安定性を評価するために、30 g / L の RebA60 を伴う 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 で 70 倍希釈して 24 時間、71.8 °C でインキュベートした 10 μ L の粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポット RebA60 反応も行った。0.01 g / L の SFP 負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシド D およびレバウジオシド E ならびにワンポット反応でのレバウジオシド M の熱安定性結果および産生レベルを表 19. 3 に示す。

20

30

40

50

【表 19 - 6】

表19.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1080と 比較して)	RebDの 増加 ^a	RebEの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM の 増加(プレ インキュベート した) ^a	活性 残存% ^b
1167/1168	S9L/A73R/L116 I/E165P/N286G/ K422A	-	-	-	++	++
1215/1216	A73R/L116I/N2 86G/K422A	+	+	+	++	++
1175/1176	N286G/K422A	-	+	+	++	+
1181/1182	L116I/E165P/N 286G/K422A	+	+	-	+++	+
1229/1230	S54M	+	++	-	+++	+
1231/1232	S54L/Y84L	-	+	-	++	+
1201/1202	S54M/S406M	-	+	-	++	+
^a 配列番号1080の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上、1.5倍未満増大した産生; および「+++」=1.5倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.8°Cでの24時間プレインキュベーション後に、65°Cでの24 時間プレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.8°Cでの24時間プレインキュベーション後に残存した活性35%未満; および「++」=残存した活性35%以上。						

【0260】

これらの実験では、表19.3中の2つの改変体は、配列番号1080と比較して、プレインキュベートせずに同様の活性、およびプレインキュベートするとより大きい活性を有した。より熱安定性の高い改変体である配列番号1216を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0261】

(実施例20)

配列番号1216のベクター1，2-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号1216に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号1215によりコードされるGTの定向進化を、改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換え、および酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するHTPアッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドへのグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。組合せライブラリーから91種の操作された改変体を同定し(表20.1)、飽和変異誘発ライブラリーから11種を同定した(表20.2)。

【0262】

スクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

配列番号1215改変体（すなわち、配列番号1216の改変体）を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、400μLであり、溶解物を、60g/L（組合せライブラリー）または80g/L（飽和変異誘発再試験）レバウジオシドA60%を伴う50mMリン酸カリウム、pH6.0に添加して60倍希釈し、2時間、75℃でプレインキュベートした。次いで、20g/LのレバウジオシドA60%（RebA60）基質と0.01g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質と30g/Lのスクロースとを伴う100μLの反応体積中の、10μLの希釈された溶解物、0.03g/LのSUS SFP配列番号2182および0.1g/Lのβ-1,3-グリコシルトランスフェラーゼ（β1,3GT）SFP配列番号520を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16～18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6.60℃。反応物を、水への添加による20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により20倍希釈した。RebA60に対してグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表20.1および20.2に収載する。表20.3に収載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表20-1】

表20.1 β1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違(配列番号1216と比較して)	RebMの 増加 ^a
1309/1310	F185L/T190P/V385S/D389E/Q441R/N445K/N447S	+++
1311/1312	S54M/D389E/G395D/Q399R/N447A/Y449H	+++
1313/1314	S54M/F185L/T190P/C219L/N257H/N302R/V385P/D389E/G395H/N445K/N447A/Y449H	+++
1315/1316	S54M/F185L/T190P/V385P/N447A/Y449H	+++
1317/1318	V385S/D389E	+++
1319/1320	T190P/N257H/V385S/D389E/N445K/N447A	+++
1321/1322	N257H/D389E/G395D/Q399R/N445K/Y449H	+++
1323/1324	S54M/N257H/Q441R/Y449H	+++
1325/1326	F185L/C219L/N257H/Q399R/N445R/N447A	+++
1327/1328	S54M/F185L/V385S/G395D/Q399R/N445R/N447A/Y449H	+++
1329/1330	S54M/T190P/N257H/V385S/D389E	+++
1331/1332	S54M/T190P/N302H/D389E/G395D/Q399R/N445K/N447S	+++
1333/1334	S54M/C219L/N302R/G395H/Q441S/N445R/N447A	+++

10

20

30

40

50

【表 20 - 2】

表20.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違(配列番号1216と比較して)	RebMの 増加 ^a
1335/1336	S54M/N257H/Q441R/N447A	+++
1337/1338	S54M/F185L/T190P/D389E/Q441R/N445R/N447A/Y449H	+++
1339/1340	F185L/T190P/N257H/N302R/G395D/Q441S/N445R/N447S	+++
1341/1342	T190P/N257H/D389E/G395H/Q441R/N445R/N447A	+++
1343/1344	F185L/T190P/G395D/Q399R	+++
1345/1346	S54M/F185L/V385S/D389E/G395D/Q441R/N445K/Y449H	++
1347/1348	F185L/T190P/C219L/N257H/D389E/G395A/N445K/N447A	++
1349/1350	S54M/V385P	++
1351/1352	N257H/D389E/Q399R	++
1353/1354	S54M/T190P/G395A	++
1355/1356	S54M/F185L/T190P	++
1357/1358	S54M/V385P/D389E/Q441R/N445K/N447A/Y449H	++
1359/1360	S54M/F185L/T190P/C219L/D389E/G395H/Q399R/Q441S/N445K/N447A/Y449H	++
1361/1362	S54M/F185L/T190P/C219L/V385S	++
1363/1364	S54M/N257H	++
1365/1366	S54M/F185L/T190P/D389E/G395H	++
1367/1368	F185L/N302R/G395H/Q399R/Q441R/N445K/N447S/Y449H	++
1369/1370	F185L/T190P/G395H/Q399R	++
1371/1372	S54M/F185L/N302H/V385S/Q399R/N445R/N447A	++
1373/1374	F185L/G395D/Q399R/Q441R/N445R/N447A	++
1375/1376	S54M/F185L/T190P/N302R/G395H/Q399R	++
1377/1378	S54M/F185L/T190P/G395D/Q399R/Q441R/N445K/N447A/Y449H	++
1379/1380	S54M/N257H/D389E	++
1381/1382	F185L/T190P/D389E/N447S/Y449H	++
1383/1384	C219L/N257H/G395H	++
1385/1386	S54M/T190P/G395H/N445K/N447A	++
1387/1388	T190P/N257H/V385S/G395D	++
1389/1390	S54M/T190P/V385S/D389E/G395H/Q441S/N445R	++
1391/1392	S54M/N257H/V385S/Y449H	++
1392/1394	T190P/C219L/N302H/V385P/Q399R/N445R	++
1395/1396	S54M	++
1397/1398	S54M/T190P/N257H/N302H/Q399R	++

10

20

30

40

50

【表 20 - 3】

表20.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違(配列番号1216と比較して)	RebMの 増加 ^a
1399/1400	S54M/N257H/Q399R	+
1401/1402	S54M/F185L/C219L/D389E	+
1403/1404	S54M/T190P/C219L/N257H/N302H	+
1405/1406	N257H/V385P/D389E/Q399R	+
1407/1408	S54M/T190P/V385P/N445R/N447A/Y449H	+
1409/1410	S54M/T190P/N257H	+
1411/1412	S54M/T190P/N302R/D389E	+
1413/1414	S54M/C219L/V385P/D389E/G395D/Q441R/N445K/N447A	+
1415/1416	C219L/G395H	+
1417/1418	S54M/F185L/T190P/N302H	+
1719/1420	G395D/Q399R	+
1421/1422	S54M/T190P/N257H/K309N/V385S/D389E/G395D/Q399R/N445K	+
1423/1424	S54M/F185L/T190P/C219L/V385S/D389E/G395D/Q399R/Q441R/N445R/N447A/Y449H	+
1425/1426	V385S/G395D	+
1427/1428	S54M/F185L/T190P/C219L/V385S/G395A/Q399R/Q441R/N445K/N447A/Y449H	+
1429/1430	S54M/T190P/C219L/N257H/G395H/N445R/N447A/Y449H	+
1431/1432	S54M/F185L/T190P/D389E/N445K	+
1433/1434	N257H/D389E/G395D/Q399R/N445K/N447A	+
1435/1436	T190P/N257H/Q399R/N447A/Y449H	+
1467/1438	F185L/T190P/N257H/D389E/G395H/Q399R/Q441S/N447S/Y449H	+
1439/1440	F185L/N257H/V385S/G395A/Q399R/N445R/N447A	+
1441/1442	F185L/T190P/N257H/D389E/G395A	+
1443/1444	T190P/N257H/N302H/V385P/Q399R	+
1445/1446	T190P/D389E	+
1447/1448	D389E/G395D/N445R/N447S	+
1449/1450	Q399R	+
1451/1452	S54M/T190P/V385P/G395D	+
1453/1454	S54M/F185L/D389E/G395D/N445K/N447A	+
1455/1456	N302H/D389E/G395H/N445R	+
1457/1458	S54M/N302H/V385S/Q399R/Q441S/N445R/Y449H	+
1459/1460	S54M/F185L/N257H/D389E/Q441S/N445R/N447A/Y449H	+

10

20

30

40

50

【表 20 - 4】

表20.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違(配列番号1216と比較して)	RebMの 増加 ^a
1461/1462	F185L/T190P/N257H/V385P/D389E/Q399R	+
1463/1464	S54M/F185L/T190P/C219L/V385P/N445R/N447A	+
1465/1466	T190P/C219L/N257H/V385S/D389E/Q441S/N445R/N447A/Y449H	+
1467/1468	T190P/N302H/V385P/D389E/G395D/Q399R/Q441S/N445K/N447S	+
1469/1470	C219L/N257H/V385S/D389E/G395D/Q441R/N447A/Y449H	+
1471/1472	S54M/T190P/N257H/G395D/N445K/Y449H	+
1473/1474	T190P/N257H/V385P/D389E/Q399R	+
1475/1476	T190P/N257H/V385S/Q441S/N445R/N447S/Y449H	+
1477/1478	F185L/T190P/N257H/V385P/Q399R/N445R/N447A	+
1479/1480	S54M/N302H/V385P/Q399R/Q441S/N445K/N447S	+
1481/1482	C219L/V385S/D389E/Q399R/N445R/Y449H	+
^a 配列番号1216の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.87倍以上、参照ポリペプチドの2.17倍未満の産生; 「++」=2.17倍以上、2.42倍未満増大した産生; および「+++」=2.42倍以上増大した産生。		

【表 20 - 5】

表20.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1216と比較して)	RebMの増加 ^a
1491/1492	I341L	+++
1493/1494	N157Q	+++
1495/1496	V278L	++
1497/1498	N108E	++
1499/1500	M181L	++
1501/1502	E188L	+
1503/1504	A293V	+
1505/1506	G96K	+
1507/1508	R14T	+
1509/1510	H5S	+
1511/1512	G96P	+

【表 20-6】

表20.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1216と比較して)	RebMの増加 ^a
^a 配列番号1216の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.17倍以上、参照ポリペプチドの1.40倍未満の産生; 「++」=1.40倍以上、1.83倍未満増大した産生; および「+++」=1.83倍以上増大した産生。		

10

【0263】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末（SFP）を4 g/Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6と20 g/LのRebA97もしくはステビオールグリコシド95%（単一基質）またはRebA60（ワンポット）と0.02 g/LのADPと20（単一基質）または30 g/L（ワンポット）のスクロースと0.03 g/LのSUS SFP配列番号2182と、ワンポット反応についてのみ、0.1 g/Lのβ-1,3-グリコシルトランスフェラーゼ（β1,3GT）SFP配列番号520とを含有する100 μLの総反応体積中、0.0013~0.04 g/Lに希釈した。60℃でTHERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで4時間（単一基質）または16~18時間（ワンポット）、反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、75℃で2時間、80 g/LのレバウジオシドA60%と共に50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中でブレインキュベートしたが、もう一方のセットはブレインキュベートしなかった。反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。熱安定性を評価するために、100 g/LのRebA60を伴う50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6で70倍希釈して24時間、71.8℃でインキュベートした10 μLの粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポットRebA60反応も行った。0.005 g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシドDおよびレバウジオシドEならびにワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表20.3に示す。

20

30

【表 20-7】

表20.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1216と 比較して)	RebDの 増加 ^a	RebEの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの 増加（ブレ インキュベ ートした） ^a	活性 残存% ^b
1315/1316	S54M/F185L/T190P/V385P/N447A/Y449H	+	+	++	+++	++
1487/1488	S54M/T190P/N257H/N302R/V385P/G395A/Q399R	+	+	+	+++	+++
1379/1380	S54M/N257H/D389E	+	+	+	++	+

40

50

【表 20 - 8】

表20.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1216と 比較して)	RebDの 増加 ^a	RebEの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの 増加 (プレ インキュベート した) ^a	活性 残存% ^b
1331/1332	S54M/T190P/N30 2H/D389E/G395D /Q399R/N445K/N 447S	-	+	+	+++	+
1313/1314	S54M/F185L/T19 0P/C219L/N257H /N302R/V385P/D 389E/G395H/N44 5K/N447A/Y449 H	-	+	+	+++	++
1391/1392	S54M/N257H/V3 85S/Y449H	+	+	++	++	+
1311/1312	S54M/D389E/G39 5D/Q399R/N447 A/Y449H	+	+	+	++	+
^a 配列番号1216の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上、1.8倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.8倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.8℃での24時間プレインキュベーション後に、65℃での24 時間プレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.8℃での24時間プレインキュベーション後に残存した活性17%以上、33%未満; 「++」=残存した活性33%以上、35%未満; および「+++」=残存した活性35%以上。						

【0264】

これらの実験では、表20.3中の7つ全ての改変体は、プレインキュベートすると、配列番号1216と比較して改善された。より熱安定性の高い改変体である配列番号1488を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0265】

(実施例21)

配列番号1488のベクター1，2-ADP-グリコシルトランスフェラーゼ改変体

この実施例では、ADP-グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号1488に由来するGTポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号1487によりコードされるGTの定向進化を、改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換え、および酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するHTPアッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースおよびステビオールグリコシドに対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作されたGT改変体ポリペプチドを得た。組合せライブラリーから26種の操作された改変体を同定し(表21.1)、飽和変異誘発ライブラリーから17種を同定した(表

21.2)。

【0266】

スクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

配列番号1487改変体（すなわち、配列番号1488の改変体）を発現する清澄化E. coli培養溶解物の96ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、400μLであり、溶解物を、100g/LのレバウジオシドA60%を伴う50mMリン酸カリウム、pH6.0に添加して60または100倍希釈し、2時間、75℃でプレインキュベートした。次いで、50g/LのレバウジオシドA60%（RebA60）基質と0.025g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補基質と75g/Lのスクロースとを伴う100μLの反応体積中の、10μLの希釈された溶解物、0.075g/LのSUS SFP配列番号2182および0.25g/Lのβ-1,3-グリコシルトランスフェラーゼ（β1,3GT）SFP配列番号626を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16～18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。反応物を、水への添加による50倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により20倍希釈した。RebA60に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表21.1および21.2に収載する。表21.3に収載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表21-1】

表21.1 β1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1488と比較して)	RebMの 増加 ^a
1513/1514	R14T/G96P/N108E/M181L/I341L	+++
1515/1516	E188L	+++
1517/1518	V42T/E188L/I341L	+++
1519/1520	M181L	+++
1521/1522	G96P/N108E/E188L/I341L	+++
1523/1524	R14T/G96K	++
1525/1526	R14T/G96K/N108E/V133I	++
1527/1528	R14T/N108E/N157Q/E188L	++
1529/1530	R14T/N51V/G96P/N157Q/I341L	++
1531/1532	R14T/V42T/I341L	++
1533/1534	G96K/E188L	++
1535/1536	R14T/V42T/N51V/N157Q/I341L	++
1537/1538	R14T/N51V/N108E	++
1539/1540	G96P/N108E/E188L	+

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

表21.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1488と比較して)	RebM の 増加 ^a
1541/1542	R14T/V42T/N51V/N108E/M181L	+
1543/1544	R14T/N51V/G96K/N157Q	+
1545/1546	R14T/V278L	+
1547/1548	R14T/N51V/I341L	+
1549/1550	R14T/N108E/N157Q	+
1551/1552	G96P/N108E/M181L/A293V	+
1553/1554	R14T/G96K/N108E/E188V	+
1555/1556	R14T/G96K/I341L	+
1557/1558	R14T/N157Q/M181L/V278L	+
1559/1560	V42T/G96P/N157Q/I341L	+
1561/1562	A293V	+
1563/1564	R14T/N51V/G96P/I341L	+
^a 配列番号1488の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.11倍以上、参照ポリペプチドの1.21倍未満の産生; 「++」=1.21倍以上、1.35倍未満増大した産生; および「+++」=1.35倍以上増大した産生。		

【表 2 1 - 3】

表21.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1488と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebM の増加 (A60をプレインキュベートした) ^a
1565/1566	H324K	+++	+
1567/1568	A196V	+++	++
1569/1570	P197V	++	+
1571/1572	Y268A	++	+
1573/1574	A196P	++	+
1575/1576	G201P	++	+++
1577/1578	N199Q	+	+
1579/1580	T187K	+	+
1581/1582	H324R	+	+
1583/1584	A196M	+	++
1585/1586	S147F	+	+++
1587/1588	Q198F	+	+++
1589/1590	N199G	+	+

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 4】

表21.2 β 1,2GT飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号： (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1488と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebM の増加 (A60をブレインキュベートした) ^a
1591/1592	Q198A	+	++
1593/1594	L144V	+	++
1595/1596	L122V	+	++
1597/1598	N199S	+	+
^a 配列番号1488の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.22倍未満の産生; 「++」=1.22倍以上、1.45倍未満増大した産生; および「+++」=1.45倍以上増大した産生。			

10

【0 2 6 7】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

振盪フラスコ粉末（SFP）を4 g/Lの濃度に再構成し、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6を含有する100 μ Lの総反応体積中、0.0013~0.04 g/Lに希釈した。単一基質反応は、20 g/LのRebA97、0.02 g/LのADP、20 g/Lのスクロース、および0.03 g/LのSUS SFP配列番号2182からなった。ワンポット反応は、50 g/LのRebA60、0.025 g/LのADP、75 g/Lのスクロース、0.075 g/LのSUS SFP配列番号2182、および0.25 g/Lの β -1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ（ β 1, 3GT）SFP配列番号626からなった。60℃でTHERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで4時間（単一基質）または16~18時間（ワンポット）、反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、75℃で2時間、100 g/LのレバウジオシドA60%と共に50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6中でブレインキュベートしたが、もう一方のセットはブレインキュベートしなかった。反応物を、水中1 g/Lの基質に希釈することにより可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5. 1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。熱安定性を評価するために、100 g/LのRebA60を伴う50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で70倍希釈して24時間、71.8℃でインキュベートした10 μ Lの粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポットRebA60反応も行った。0.005 g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシドDおよびレバウジオシドEならびにワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表21. 3に示す。

20

30

40

【表 2 1 - 5】

表21.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1488と比較して)	RebDの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebM の増加 (ブレインキュベートした) ^a	活性残存% ^b
1523/1524	R14T/G96K	-	-	+	+
1525/1526	R14T/G96K/N108E/V133I	-	-	+	+

50

【表 2 1 - 6】

表21.3 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル					
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1488と比較して)	RebDの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (フレインキューベート した) ^a	活性残存% ^b
1515/1516	E188L	++	++	+	+
1513/1514	R14T/G96P/N108E/M181L/ I341L	-	-	++	+
1531/1532	R14T/V42T/I341L	-	-	++	+
1523/1524	R14T/G96K	-	-	+	+
1525/1526	R14T/G96K/N108E/V133I	-	-	+	+
^a 配列番号1488の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.95倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.95倍以上、参照ポリペプチドの1.05倍未満の産生; および「++」=1.05倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.8°Cでの24時間プレインキューベーション後に、65°Cでの24時間 プレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.8°Cでの24時間プレインキューベーション後に残存した活性17%以上、23%未満。					

【0 2 6 8】

これらの実験では、表 2 1 . 3 中の 1 つの改変体は、単一基質、プレインキューベーションを伴うおよび伴わないワンポット、および 2 4 時間熱安定性条件下で、配列番号 1 4 4 8 と比べて同様にまたはより良好に動作した。配列番号 1 5 1 6 であるこの改変体を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0 2 6 9】

(実施例 2 2)

配列番号 1 5 1 6 のベクター 1 , 2 - A D P - グリコシルトランスフェラーゼ改変体
この実施例では、A D P - グルコースを使用するステビオールグリコシドのグルコシル化の改善のための、配列番号 1 5 1 6 に由来する G T ポリペプチドの進化およびスクリーニングの実験を説明する。配列番号 1 5 1 6 によりコードされる G T の定向進化を、改変体遺伝子のライブラリーを構築することにより行った。ライブラリーは、本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えた。次に、これらのライブラリーをプレイングし、増殖させ、下で説明する H T P アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースおよびステビオールグリコシドに対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する別のラウンドの操作された G T 改変体ポリペプチドを得た。組合せライブラリーから 2 1 種の操作された改変体を同定した (表 2 2 . 1) 。

【0 2 7 0】

スクロースから A D P への、それからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P 結合アッセイ

配列番号 1 5 1 5 改変体 (すなわち、配列番号 1 5 1 6 の改変体) を発現する清澄化 E . c o l i 培養溶解物の 9 6 ウェルプレートを用いてアッセイを行った。溶解緩衝液の体積は、4 0 0 μ L であり、溶解物を、1 0 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % を伴うおよび伴わない 5 0 m M リン酸カリウム、p H 6 . 0 に添加して 3 3 倍希釈し、1 0 0 g / L の R e b A 6 0 を伴うプレートを 2 時間、7 5 ° C でプレインキューベートした。次いで、5 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % (R e b A 6 0) 基質と 0 . 0 2 5 g / L の A D P (

Amresco、ウルトラピュアグレード) 補基質と75 g/Lのスクロースとを伴う100 μLの反応体積中の、10 μLの希釈された溶解物、0.075 g/LのSUS SFP配列番号2322および0.25 g/Lのβ-1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ(β1, 3GT) SFP配列番号678を用いて、アッセイを行った。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら16~18時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6、60 °C。反応物を、水への添加による50倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルへの添加による5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させ、上記の分析のために水への添加により20倍希釈した。RebA60に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性を有する得られた操作された改変体を表22.1に収載する。表22.2に収載する改変体については、振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表22-1】

表22.1 β1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1516と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (A60を ブレインキュベートした) ^a
1599/1600	L188E/Q198A/N199Q/Y268A	+	+++
1601/1602	L188E/H324K	++	++
1603/1604	L188E/A196V/G201P	+	+++
1605/1606	F152Y/L188E/A196V/Q198A/N199Q/H324K	+	+++
1607/1608	L188E/A196V/Q198A/N199Q/G201P	+	+++
1609/1610	L188E/A196V/Q198F/G201P	+	+++
1611/1612	L188E/G201P	++	+++
1613/1614	F152Y/L188E/A196V/G201P/H324K	-	+++
1615/1616	L188E/Q198F/N199Q/G201P/H324K	-	++
1617/1618	S147F/L188E/A196V/G201P	-	++
1619/1620	L188E/Q198A/H324K	+	++
1621/1622	L188E/N199Q/G201P	+	++
1623/1624	F152Y/L188E/A196V/N199Q	+	++
1625/1626	L188E	+	++
1627/1628	L188E/A196V/Q198A/H324K	+	++
1629/1630	L188E/A196V/Q198F/N199Q/G201P/H324K	+	++
1631/1632	F152Y/L188E	+	++
1633/1634	L188E/G201P/H324K	+	++

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

表22.1 β 1,2GT組合せ改変体およびRebMレベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1516と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (A60を プレインキュベートした) ^a
1635/1636	F152Y/T187K/L188E/H324K	+	++
1637/1638	L188E/Q198A/G201P/H324K	-	++
1639/1640	F152Y/L188E/H324K	+	++
^a 配列番号1516の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照のものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照の1.2倍未満の産生; 「++」=1.2倍以上、1.4倍未満増大した産生; および「+++」=1.4倍以上増大した産生。			

10

【0 2 7 1】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

20

振盪フラスコ粉末 (SFP) を 4 g/L の濃度に再構成し、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 を含有する 100 μ L の総反応体積中、0.013 ~ 0.2 g/L に希釈した。単一基質反応は、20 g/L のレバウジオシドA97%またはステビオールグリコシド95%、0.02 g/L のADP、20 g/L のスクロース、および0.03 g/L のSUS SFP配列番号2322からなった。ワンポット反応は、100 g/L のRebA60、0.05 g/L のADP、150 g/L のスクロース、0.2 g/L のSUS SFP配列番号2322、および0.3 g/L の β -1, 3-グリコシルトランスフェラーゼ (β 1, 3GT) SFP配列番号678からなった。60°CでTHERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで4時間 (単一基質) または16 ~ 18時間 (ワンポット)、反応を行った。SFP希釈物の一方のセットは、75°Cで2時間、100 g/L のレバウジオシドA60%と共に50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6中でプレインキュベートしたが、もう一方のセットはプレインキュベートしなかった。反応物を、水中1 g/Lの基質に希釈することにより可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により清澄化し、分析のために水で20倍希釈した。実施例5、表5.1に記載のSPE-QQQによりグリコシル化産物を検出した。熱安定性を評価するために、100 g/LのRebA60を伴う50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6で70倍希釈して24時間、71.8°Cでインキュベートした10 μ Lの粗清澄化溶解物を用いて、類似のワンポットRebA60反応も行った。0.0125 g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体による単一基質でのレバウジオシドDおよびレバウジオシドEならびにワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表22.2に示す。

30

40

50

【表 2 2 - 3】

表22.2 β 1,2GT振盪フラスコ改変体ならびにRebDおよびRebMレベル						
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 1516と 比較して)	RebDの 増加 ^a	RebEの 増加 ^a	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキューベート した) ^a	活性残存% ^b
1599/1600	L188E/Q198A/N1 99Q/Y268A	++	++	++	+++	++
1601/1602	L188E/H324K	++	++	++	+	+
1603/1604	L188E/A196V/G2 01P	++	+	++	+++	+
1605/1606	F152Y/L188E/A1 96V/Q198A/N199 Q/H324K	+	+	++	+++	+
1607/1608	L188E/A196V/Q1 98A/N199Q/G201 P	+	+	+	+++	+
1609/1610	L188E/A196V/Q1 98F/G201P	+	++	++	+++	+
1611/1612	L188E/G201P	++	+++	++	++	+
^a 配列番号1516の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.3倍未満の産生; 「++」=参照のものの1.3倍以上、1.6倍未満の産生; および「+++」=1.6倍以上増大した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.8°Cでの24時間ブレインキューベーション後に、65°Cでの24 時間ブレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.8°Cでの24時間ブレインキューベーション後に残存した活性20%以上、25%未満; および「++」=残存した活性25%以上。						

【0 2 7 2】

これらの実験では、表 2 2 . 2 中の 8 つ全ての改変体は、両方の単一基質および両方のワンポットアッセイにおいて配列番号 1 5 1 6 と比較して改善された。1 つの改変体は、2 4 時間熱安定性条件で安定性もより高かった。配列番号 1 5 1 6 であるこの改変体を、これらの振盪フラスコ粉末のうちのいくつかに存在した有益なアミノ酸変異 G 9 6 K (表 2 2 . 3) を導入することによりさらに操作して、配列番号 1 6 4 1 / 1 6 4 2 を生じさせた。配列番号 1 6 4 2 であるこの酵素を、A D P - グルコースからのステビオシドおよびレバウジオシド A への、それぞれレバウジオシド E およびレバウジオシド D の形成のための、グリコシル転移を触媒するために、ならびにスクロースシンターゼおよび β - 1 , 3 - グリコシルトランスフェラーゼを用いるワンポット反応でのレバウジオシド M の形成のために、最良の酵素として選択した。

【0 2 7 3】

(実施例 2 3)

配列番号 2 2 のスクロースシンターゼ改変体

酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリーを構

築することによって、配列番号21によりコードされるスクロースシンターゼの定向進化を継続した。次に、このライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット（HTP）アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースの生成への活性が増加した別のラウンドの88種の操作されたSuS改変体ポリペプチドを得た。

【0274】

レバウジオシドMを形成するためのスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

以下のHTP酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状E. coli 培養物を、1mM硫酸マグネシウムと0.5mg/mLのリゾチームとポリミキシンB硫酸塩（PMBS）とを伴う400μLのTris-HCl、pH7.5で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物を、14.5g/LのRebA60を伴うリン酸カリウム緩衝剤、pH6.0に添加して60～120倍希釈し、1～1.5時間、75～77℃でプレインキュベートした。次いで、10μLの希釈されプレインキュベートされたSuS溶解物、0.08g/Lのβ1,2GT SFP配列番号24、および0.2g/Lのβ1,3GT SFP配列番号20を、20g/LのRebA60、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）、30g/Lのスクロース（蔗糖）、および7.2g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16～18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapid Fire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。分析後、このワンポット反応で活性改善を示した操作されたSuS改変体ポリペプチドを同定した。それらを表23.1に収載する。表23.2に示すアミノ酸変異を有する改変体については、実施例1で説明したようにタンパク質を特徴付けるために振盪フラスコ規模の培養物を増殖させた。

【表23-1】

表23.1 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号22と比較して)	1時間、77℃で プレインキュベートした、 RebMの増加 ^a	1.5時間、75℃で プレインキュベートした、 RebMの増加 ^a
1643/1644	H442Y	+	+++
1645/1646	V134R	+	+++
1647/1648	P52V	+	+++
1649/1650	A524R	+	+++
1651/1652	S381R	+	+++
1653/1654	K41S	+	+++
1655/1656	T519V	+	+++

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

表23.1 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号22と比較して)	1時間、77℃で ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a	1.5時間、75℃で ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a
1657/1658	P52G	+	+++
1659/1660	K724S	+	+++
1661/1662	S532Y	+	+++
1663/1664	Y434G	+	+++
1665/1666	Q136G	+	+++
1667/1668	S381K	+	+++
1669/1670	R44I	++	+++
1671/1672	S381Y	+	+++
1672/1674	S738K	++	+++
1675/1676	H154A	+	++
1677/1678	V134P	++	++
1679/1680	K41Q	+	++
1681/1682	A97T	++	++
1683/1684	S635R	+	++
1685/1686	K724A	+	++
1687/1688	P52Q	++	++
1689/1690	S381T	+	++
1691/1692	A59M	+	++
1693/1694	R44L	++	++
1695/1696	T42D	++	++
1697/1698	E358Q	+	++
1699/1700	P52S	++	++
1701/1702	R44T	+	++
1703/1704	E4T	+	++
1705/1706	P47A	+	++
1707/1708	V85T	+	++
1709/1710	A97S	+	++
1711/1712	V64I	+	++
1713/1714	P52T	+	++
1715/1716	P47R	+	++
1717/1718	H343L	+	++
1719/1720	Y434L	+	++

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 3】

表23.1 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号22と比較して)	1時間、77℃で ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a	1.5時間、75℃で ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a
1721/1722	V270L	+	++
1723/1724	E4Q	+	++
1725/1726	V641L	+	++
1727/1728	A59T	++	++
1729/1730	S12K	+	++
1731/1732	E3G/P548R	+	++
1733/1734	R44A	+	+
1735/1736	R71T	+	+
1737/1738	E536T	+	+
1739/1740	E129Q	+	+
1741/1742	S589Q	+	+
1743/1744	Q603T	+	+
1745/1746	R570K	+	+
1747/1748	N266R	+	+
1749/1750	W57H	+	+
1751/1752	V134Q	+	+
1753/1754	W57Y	+	+
1755/1756	S532T	+	+
1757/1758	T519C	+	+
1759/1760	K139G	+	+
1761/1762	T42E	++	+
1762/1764	M606A	+	+
1765/1766	P47G	+	+
1767/1768	G652Y	+	+
1769/1770	L81H	+	+
1771/1772	A122P	+	+
1773/1774	E358P	++	+
1775/1776	G652R	+	+
1777/1778	E727H	+	+
1779/1780	Q7L	+	+
1781/1782	S635G	+	+
1783/1784	K388A	+	+

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 4】

表23.1 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号22と比較して)	1時間、77℃で ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a	1.5時間、75℃で ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a
1785/1786	T42I	+	+
1781/1788	S738A	+	+
1789/1790	F215L	++	+
1791/1792	R615T	+	+
1793/1794	V93I	+	+
1795/1796	Q7H	+	+
1797/1798	R71Q	+	+
1799/1800	S532E	+	+
1801/1802	G175S	+	+
1803/1804	L81P	+	+
1805/1806	A524S	+	+
1807/1808	K388R	+	+
1809/1810	P47T	+	+
1811/1812	K388S	+	+
1812/1814	L81Q	+	+
1815/1816	Q603M	+	+
1817/1818	M606P	+	+
^a 配列番号22の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.3倍未満の産生; 「++」=1.3倍以上増大した産生だが、1.5倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.5倍以上増大した産生。			

【0 2 7 5】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびレバウジオシドMを形成するためのスクロースからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

レバウジオシドA60%からのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対するこれらの操作されたSUS改変体の活性を特徴付けるために実験を行った。振盪フラスコ粉末(SFP)を、リン酸カリウム緩衝剤、pH6中の14.5g/LのRebA60中、0.016~0.5g/Lに構成し、アリコート75℃で1.5時間ブレインキュベートした。10μLの希釈され、ブレインキュベートされたかまたはブレインキュベートされていないSUS溶解物、0.08g/Lのβ1,2GT SFP配列番号24、および0.2g/Lのβ1,3GT SFP配列番号20を、20g/LのRebA60、0.02g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)、30g/Lのスクロース(蔗糖)、および7.2g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメータ

ーを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。熱安定性を評価するために、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で20倍希釈して20時間、73.5℃で、100μLの反応体積で15mMのレバウジオシドA基質、0.02mM ADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）補因子、37.5mMスクロース補基質、9mMフルクトースおよび0.5g/Lのβ1,2GT SFP配列番号24と共にインキュベートした10μLの粗清澄化溶解物を用いる反応も行った。これらの単一基質反応物を4時間、60℃でインキュベートし、次いで、水での40倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈および遠心分離による沈殿によりクエンチし、次いで、上清を水で7.5倍希釈し、上で説明したように分析した。0.006g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体によるワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表23.2に示す。

【表23-5】

表23.2 SUS SFP改変体およびRebMレベル				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号22と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキュベート した) ^a	活性残存% ^b
1651/1562	S381R	++	++	+
1643/1644	H442Y	+	++	+++
1649/1670	A524R	+	+	+
1645/1646	V134R	-	+	++
1655/1656	T519V	+	+	+
1659/1660	K724S	+	++	+
1647/1648	P52V	++	+	+
1653/1654	K41S	+	+	+
^a 配列番号22の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=参照ポリペプチドのものと比較して1.1倍以上増加した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを73.5℃での20時間ブレインキュベーション後に、60℃での20時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=73.5℃での24時間ブレインキュベーション後に残存した活性13%以上、20%未満; 「++」=残存した活性20%以上、30%未満; および「+++」=残存した活性30%以上。				

【0276】

表23.2に記載した8つ全ての改変体は、3つ全てのアッセイにおいて配列番号22と比べて同様にまたはより良好に動作した。配列番号1652を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0277】

(実施例24)

配列番号1652のスクロースシンターゼ改変体

酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリー、および本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えたライブラリーを構

築することによって、配列番号1651によりコードされるスクロースシンターゼの定向進化を継続した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット（HTP）アッセイを使用してスクリーニングして、ADP-グルコースの生成に対する活性が増加した別のラウンドの111種の操作されたSuS改変体ポリペプチドを得た。

【0278】

レバウジオシドMを形成するためのスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

以下のHTP酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状E. coli培養物を、1mM硫酸マグネシウムと0.5mg/mLのリゾチムとポリミキシンB硫酸塩（PMBS）とを伴う400μLのTris-HCl、pH7.5で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物を、14.5g/LのRebA60を伴うリン酸カリウム緩衝剤、pH6.0に添加して120倍希釈し、または40g/LのRebA60を伴う同じ緩衝剤に添加することにより20倍希釈（組合せライブラリーについて）もしくは60倍希釈（飽和変異誘発ライブラリーについて）し、2時間、75℃でブレインキュベートした。次いで、10μLの希釈されブレインキュベートされたSuS溶解物、0.08g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号858、および0.14g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号174を、20g/LのRebA60、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）、30g/Lのスクロース（蔗糖）、および7.2g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16～18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。飽和変異誘発ライブラリーを、40g/LのRebA60を伴うリン酸カリウム緩衝剤、pH6.0で200倍希釈して2時間、75℃でブレインキュベートした溶解物を使用して、0.02g/LのADP、30g/Lのスクロース、7.2g/Lのフルクトース、および0.12g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号994を用いて、20g/Lでの単一基質レバウジオシドA97%に関してもアッセイした。上記の反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。ワンポット反応で活性改善を示した、得られた操作されたスクロースシンターゼ改変体を、表24.1および24.2に収載する。表24.3に収載する改変体については、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 1】

表24.1 SUS組合せ改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1652と比較して)	14.5g/Lの RebA60を プレインキュベート した、 RebMの増加 ^a	40g/Lの RebA60を プレインキュベート した、 RebMの増加 ^a
1819/1820	R44I/P52V/A97T/Y434G/H442Y/K724S	+++	++
1821/1822	Y434G/H442Y	+++	++
1823/1824	A25T/R44I/P52G/V134R/Y434G/K724S	+++	+
1825/1826	A97T/H442Y	+++	++
1827/1828	K41S/P52V/H442Y	+++	++
1829/1830	Q136G/H442Y/K724S	+++	+++
1831/1832	R44I/Q136G/E329Q/Y434G/S532Y	+++	+
1833/1834	V134R/Q136G/Y434G/S532Y/K724S	+++	+
1835/1836	P52G/A97T/H442Y	+++	+++
1837/1838	K41S/P52V/Y434G/H442Y/K724S	+++	+++
1839/1840	R44I/P52V/V134R/Y434G/S532Y	+++	+++
1841/1842	P52V/Q136G/Y434G/K724S	+++	++
1843/1844	P52V/H442Y/V553A/K724S	+++	+
1845/1846	P52V/H442Y	+++	+
1847/1848	K41S/P52V/Y434G	++	+
1849/1850	P52V/Q136G/Y434G/H442Y	++	+
1851/1852	P52V/Q136G/Y434G	++	+
1853/1854	K41S/Y434G/H442Y/S532Y	++	+++
1855/1856	P52V/Y434G	++	+
1857/1858	H442Y	++	+
1859/1860	P52V/Q136G/H442Y	++	+
1861/1862	R44I/Y434G/H442Y/V553A	++	+
1863/1864	K41S/R44I/P52G/A97T/H442Y/A719T/K724S	++	+
1865/1866	K41S/P52V/V134R/Q136G/Y434G	++	++
1867/1868	R44I/P52V/A97T/H442Y/K724S	++	+
1869/1870	P52G/A97T/Y434G/H442Y	++	++
1817/1872	P52G/Y434G/H442Y/S532Y	++	+++
1873/1874	K41S/R44I/P52G/Y434G/K724S	++	+
1875/1876	K41S/Y434G/S532Y	++	+
1877/1878	K41S/Y434G/H442Y/S532Y/K724S	++	++
1879/1880	P52G/V134R	++	+

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

表24.1 SUS組合せ改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1652と比較して)	14.5g/Lの RebA60を ブレインキュベート した、 RebMの増加 ^a	40g/Lの RebA60を ブレインキュベート した、 RebMの増加 ^a
1881/1882	V134R/Y434G/H442Y/K724S	++	+
1883/1884	P52G/A97T	++	+
1885/1886	P52G/V134R/E329Q/Y434G	++	+
1887/1888	P52G/H442Y/K724S	++	++
1889/1890	K41S/R44I/Q136G/H442Y	++	+
1891/1892	P52G/V134R/Q136G/H442Y	++	+++
1893/1894	A97T/V134R/H442Y	++	++
1895/1896	K41S/S532Y	+	+
1897/1898	K41S/P52V/A97T/Y434G/H442Y/S532Y/K724S	+	++
1899/1900	Q136G/S532Y/K724S	+	+
1901/1902	P52V/Q136G/Y434G/H442Y/S532Y	+	+
1903/1904	K41S/E329Q/H442Y	+	+
1905/1906	V134R/Q136G/Y434G/H442Y/V553A/K724S	+	++
1907/1908	A97T/Q136G/Y434G/H442Y	+	+++
1909/1910	R44I/Q136G/S532Y	+	+
1911/1912	P52G/H442Y/V553A/K724S	+	+
1913/1914	V134R/Q136G/Y434G/H442Y/S532Y/V553A/K724S	+	+
1915/1916	K41S/R44I/P52V/V134R/H442Y	+	++
1917/1918	K41S/P52V/Y434G/H442Y	+	+
1919/1920	P52V/S532Y	+	+
1921/1922	V134R	+	+
1923/1924	K41S/R44I/Q136G/E329Q	+	+
1925/1926	K41S/R44I/S532Y	+	++
1927/1928	Y434G	+	+
1929/1930	K41S/P52G/Q136G	+	++
1931/1932	K41S/A97T/V134R/Y434G/H442Y/S532Y/V553A	+	+++
1933/1934	P52G/V134R/Y434G/H442Y/S532Y/V553A	+	++
1935/1936	P52V/H442Y/K724S	+	+
1937/1938	Q136G/H442Y	+	++

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 3】

表24.1 SUS組合せ改変体およびRebMLレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1652と比較して)	14.5g/Lの RebA60を ブレインキュベート した、 RebMの増加 ^a	40g/Lの RebA60を ブレインキュベート した、 RebMの増加 ^a
1939/1940	H442Y/K724S	+	+
1941/1942	P52G/Q136G	+	++
1943/1944	P52G/V134R/Q136G/Y434G	+	+
1945/1946	V134R/Q136G/Y434G/H442Y	+	+
1947/1948	P52G	+	+
1949/1950	P52G/H442Y	+	+++
1951/1952	A97T/E329Q/K724S	+	+
1953/1954	P52V/Y434G/S532Y	+	+
1955/1956	K41S/V134R/H442Y/S532Y	+	++
1957/1958	K41S/R44I/P52G/Y434G/H442Y/S532Y/K724S	+	+
1959/1960	A97T/V134R/Q136G/H442Y/S532Y	+	++
1961/1962	P52G/A97T/S532Y	+	+
1963/1964	P52G/S532Y	+	+
1965/1966	P52G/V553A	+	+
1967/1968	P52V/Y434G/H442Y/K724S	+	+
1969/1970	Q136G	+	++
1971/1972	R44I/P52G/V134R/Q136G/E329Q/Y434G/H442Y/S532Y	+	+
1973/1974	V134R/Q136G/H442Y/S532Y	+	++
1975/1976	A97T/V134R/Q136G/S532Y	+	+
1977/1978	W57C/A97T/Y434G/H442Y/K724S	+	+
1979/1980	P52V/V134R/H442Y/K724S	+	+
1981/1982	P52V/V134R/E329Q/S532Y	+	+
1983/1984	P52V/H442Y/S532Y/K724S	+	+
1985/1986	S532Y/K724S	+	+
1987/1988	K41S/P52G/V134R/H442Y/K724S	+	++
^a 配列番号1652の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.15倍未満の産生; 「++」=1.15倍以上増大した産生だが、1.3倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.3倍以上増大した産生。			

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 4】

表24.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1652と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebDの 増加 ^a
1989/1990	R38V	+++	+++
1991/1992	R38L	++	+
1993/1994	Y51H/L433P	++	++
1995/1996	R38N	++	+
1997/1998	E4V	++	+++
1999/2000	H22T	+	+
2001/2002	Y51A	+	++
2003/2004	P47S/D488N	+	+++
2005/2006	T708V	+	+
2007/2008	T34E	+	++
2009/2010	V62I	+	++
2011/2012	M75I/Q169A	+	+
2013/2014	L101V	+	+
2015/2016	R38W	+	+
2017/2018	H22L	+	+
2019/2020	S195K/A213T	+	+
2021/2022	L32S	+	-
2023/2024	Q169E	+	++
2025/2026	E3A	+	-
2027/2028	Y51T	+	++
2029/2030	A718H	+	-
2031/2032	Y51H	+	++
2033/2034	T34S	+	+++
^a 配列番号1652の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上増大した産生だが、1.2倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.2倍以上増大した産生。			

【0 2 7 9】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびレバウジオシドMを形成するためのスクロースからレバウジオシドA 60へのグルコシル転移についての分析

レバウジオシドA 60%からのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対するこれらの操作されたSUS改変体の活性を特徴付けるために実験を行った。振盪フラスコ粉末(SFP)を、40g/LのRebA 60を伴うおよび伴わないリン酸カリウム緩衝剤、pH 6中、0.016~0.5g/Lに構成し、RebA 60を伴う溶液を75℃で2時間ブレインキュベートした。10μLの希釈され、ブレインキュベートされたかまたはブレインキュベートされていないSUS溶解物、0.08g/Lの

β 1, 2 G T S F P 配列番号 8 5 8、および 0.14 g/L の β 1, 3 G T S F P 配列番号 1 7 4 を、20 g/L の R e b A 6 0、0.02 g/L の A D P (A m r e s c o、ウルトラピュアグレード)、30 g/L のスクロース (蔗糖)、および 7.2 g/L のフルクトースと共に、100 μL の反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した: T H E R M O T R O N (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて 300 R P M で振盪しながら 16 ~ 18 時間、50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6、60 °C。上記の反応物を水での 20 倍希釈により可溶化し、0.2 % ギ酸を伴うアセトニトリルでの 5 倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で 20 倍希釈し、表 5. 1 に記載の計器およびパラメーターを用いて R a p i d F i r e S P E - M S / M S によりステビオールグリコシド産物を検出した。熱安定性を評価するために、40 g/L の R e b A 6 0 を伴う 50 mM リン酸カリウム緩衝剤、pH 6 で 20 倍希釈して 24 時間、71.1 °C で、100 μL の反応体積で、上で説明した同じワンポット反応条件下でインキュベートした、10 μL の粗清澄化溶解物を用いる反応も行った。0.0125 g/L の S F P 負荷量でのこれらの改変体によるワンポット反応でのレバウジオシド M の熱安定性結果および産生レベルを表 2 4 . 3 に示す。

【表 2 4 - 5】

表24.3 SUS SFP改変体およびRebMレベル				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1652と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (プレインキュベート した) ^a	活性残存% ^b
1835/1836	P52G/A97T/H442Y	+	+	++
1867/1868	R44I/P52V/A97T/H442Y/K724S	+	+	+++
1825/1826	A97T/H442Y	+	+	++
1821/1822	Y434G/H442Y	+	+	++
^a 配列番号1652の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.1°Cでの24時間プレインキュベーション後に、65°Cでの24時間プレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.1°Cでの24時間プレインキュベーション後に残存した活性15%以上、20%未満; および「++」=残存した活性20%以上。				

【0280】

表 2 4 . 3 に収載した 4 つの改変体は、両方の活性アッセイで配列番号 1 6 5 2 と同様に動作し、24 時間プレインキュベーションアッセイでは熱安定性がより高かった。配列番号 1 8 2 2 である 1 つの改変体は、ワンポットアッセイでわずかにより高い活性を示し、この改変体を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0281】

(実施例 2 5)

配列番号 1 8 2 2 のスクロースシンターゼ改変体

酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリー、および本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えたライブラリーを構築することによって、配列番号 1 8 2 1 によりコードされるスクロースシンターゼの定向進化を継続した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グル

コースの生成に対する活性が増加した追加のラウンドの63の操作されたSuS改変体ポリペプチドを得た。

【0282】

レバウジオシドMを形成するためのスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

以下のHTP酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状E. coli培養物を、1mM硫酸マグネシウムと0.5mg/mLのリゾチムとポリミキシンB硫酸塩(PMBS)とを伴う400μLのTris-HCl、pH7.5で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物を、40g/LのRebA60を伴うリン酸カリウム緩衝剤、pH6.0に添加して90倍希釈し、2時間、75℃でブレインキュベートした。このブレインキュベーション条件を用いて、および80g/LのRebA60のブレインキュベーションを用いて、飽和変異誘発試料を再試験した。次いで、10μLの希釈されブレインキュベートされたSuS溶解物、0.04g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号994、および0.08g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号350を、20g/LのRebA60、0.02g/LのADP (Amresco、ウルトラピュアグレード)、30g/Lのスクロース(蔗糖)、および7.2g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。ワンポット反応で活性改善を示した、得られた操作されたスクロースシンターゼ改変体を、表25.1および25.2に収載する。表25.3に収載する改変体については、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1】

表25.1 SUS組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1822と比較して)	RebMの 増加 ^a
2035/2036	V62I/T708V	+++
2037/2038	Q169A/T708V	+++
2039/2040	E4V/T708V	+++
2041/2042	E4V/L433P	+++
2043/2044	H22L/T34S/Q169A/T708V	+++
2045/2046	E4V/H22L/Y51A/T708V	++
2047/2048	H22T/T34E/L101V/Q169E	++
2049/2050	T34S/R38L/V62I	++
2051/2052	E4V/H22T/T34E/R38N	++
2053/2054	E4V/H22L/L101V	++
2055/2056	E4V/H22L/T34E	++
2057/2058	E4V/T34E/T708V	++
2059/2060	E4V/Q169A	++
2061/2062	E4V/V62I/L433P/T708V	++
2063/2064	H22T/T34E/L101V/Q169E/S195K	+
2065/2066	H22T/P47S/Q169A/L433P	+
2067/2068	E4V/H22T	+
2069/2070	M75I/Q169A	+
2071/2072	T34E/L101V	+
2073/2074	E4V/H22T/T34E/R38V/Q169A/T708V	+
2075/2076	H22L/M75I	+
2077/2078	E4V/Q169A/T708V	+
2079/2080	E4V/T34E/R38N/L101V	+
2081/2082	T34E/V62I/Q169E/L433P	+
2083/2084	S195K/T708V	+
2085/2086	E4V/H22T/T34E/P47S/Y51H/Q169A/A213T	+
2087/2088	H22L/T34E	+
2089/2090	H22T/T34E/R38V	+
2091/2092	E4V/Q169A/L433P	+
^a 配列番号1822の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.19倍未満の産生; 「++」=1.19倍以上増大した産生だが、1.22倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.22倍以上増大した産生。		

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2】

表25.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1822と比較して)	40g/L の RebA60 を ブレインキュベートした、 RebM の増加 ^a	80g/L の RebA60 を ブレインキュベートした、 RebM の増加 ^a
2093/2094	V602P	+	+++
2095/2096	S585A	++	+++
2097/2098	M565V	+	+++
2099/2100	H623K	+	+++
2101/2102	R518S	+	+++
2147/2148	L433P	+	+++
2149/2150	Q169A	+	++
2151/2152	E4V	++	++
2103/2104	R557P	+	++
2105/2106	D731Q	+	++
2107/2108	D441A	+	++
2109/2110	D731T	+	++
2111/2112	E121D	+	++
2113/2114	D441L	++	++
2115/2116	T526H	+	++
2153/2154	T708V	+	++
2117/2778	E528Q	-	++
2119/2120	N604A	+	++
2155/2156	H22L	-	++
2157/2158	T34E	+	+
2121/2122	D731M	+	+
2159/2160	H22T	+	+
2123/2124	D731A	+	+
2125/2126	Q558G	+	+
2127/2128	V770T	+	+
2129/2130	P341N	-	+
2131/2132	H623Q	+	+
2133/2134	T526V	+	+
2135/2136	E527Q	-	+
2137/2138	L411I	+	+
2139/2140	H623A	-	+

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3】

表25.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1822と比較して)	40g/L の RebA60 を ブレインキュベートした、 RebM の増加 ^a	80g/L の RebA60 を ブレインキュベートした、 RebM の増加 ^a
2141/2142	E527A	-	+
2143/2144	R544H	+	+
2145/2146	H623R	++	+
^a 配列番号1822の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照のものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上増大した産生だが、1.2倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.2倍以上増大した産生。			

10

【 0 2 8 3】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびレバウジオシドMを形成するためのスクロースからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

20

レバウジオシドA60%からのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対するこれらの操作されたSUS改変体の一部についての活性を特徴付けるために実験を行った。振盪フラスコ粉末（SFP）を、80g/LのRebA60を伴うおよび伴わないリン酸カリウム緩衝剤、pH6中、0.016~0.5g/Lに構成し、RebA60を伴う溶液を75℃で2時間ブレインキュベートした。10μLの希釈され、ブレインキュベートされたかまたはブレインキュベートされていないSUS溶解物、0.04g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号994、および0.08g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号350を、20g/LのRebA60、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）、30g/Lのスクロース（蔗糖）、および7.2g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水で20倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。熱安定性を評価するために、40g/LのRebA60を伴う50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で200倍希釈して24時間、71.1℃で、100μLの反応体積で、上で説明した同じワンポット反応条件下でインキュベートした、10μLの粗清澄化溶解物を用いる反応も行った。0.0125g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体によるワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表25.3に示す。

30

40

【表 2 5 - 4】

表25.3 SUS SFP改変体およびRebMレベル				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号1822と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキュベートした) ^a	活性残存% ^b
2151/2152	E4V	+	++	++
2035/2036	V62I/T708V	+	+	++
2051/2052	E4V/H22T/T34E/R38N	+	+	+
2091/2092	E4V/Q169A/L433P	+	+++	++
2041/2042	E4V/L433P	+	+++	++
2037/2038	Q169A/T708V	+	+	+
2059/2060	E4V/Q169A	++	+	++
^a 配列番号1822の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上、1.25倍未満の産生; および「+++」=参照ポリペプチドのものと比較して1.25倍以上増加した産生。				
^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.1℃での24時間ブレインキュベーション後に、65℃での24時間ブレインキュベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.1℃での24時間ブレインキュベーション後に残存した活性25%以上、30%未満; および「++」=残存した活性30%以上。				

【0 2 8 4】

表 2 5 . 3 に記載した 7 つ全ての改変体は、両方の活性アッセイでおよび 2 4 時間ブレインキュベーションアッセイで配列番号 1 8 2 2 と比べて同様にまたはより良好に動作した。7 5 °C で 8 0 g / L のレバウジオシド A 6 0 % 中での 2 時間ブレインキュベーション後に最も活性の高い改変体である配列番号 2 0 9 2 を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0 2 8 5】

(実施例 2 6)

配列番号 2 0 9 2 のスクロースシンターゼ改変体

酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリー、および本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えたライブラリーを構築することによって、配列番号 2 0 9 2 によりコードされるスクロースシンターゼの定向進化を継続した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースの生成に対する活性が増加した別のラウンドの 7 4 種の操作された S u S 改変体ポリペプチドを得た。

【0 2 8 6】

レバウジオシド M を形成するためのスクロースから A D P への、それからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P 結合アッセイ

以下の H T P 酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状 E . c o l i 培養物を、1 m M 硫酸マグネシウムと 0 . 5 m g / m L のリゾチームとポリミキシン B 硫酸塩 (P M B S) とを伴う 4 0 0 μ L の T r i s - H C l , p H 7 . 5 で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物を、1 0 0 g / L の R e b A 6 0 を伴うリン酸カリウム緩衝剤、p H 6 . 0 に添加して 5 0 ~ 1 0 0 倍希釈し、2 時間、7 5 °C でブレインキュベートした。次いで、1 0 μ L の希釈されブレインキュベートされた S u S

溶解物、0.04 g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号1080、および0.2 g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号440を、30 g/LのRebA60、0.02 g/LのADP (Amresco、ウルトラピュアグレード)、30 g/Lのスクロース (蔗糖)、および7.2 g/Lのフルクトースと共に、100 μLの反応体積で使用した。飽和変異誘発ライブラリーをまた、10 μLの希釈されブレインキュベートされたSuS溶解物、0.2 g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号1080、および0.43 g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号440を、50 g/LのRebA60、0.01 g/LのADP (Amresco、ウルトラピュアグレード)、75 g/Lのスクロース (蔗糖)、および18 g/Lのフルクトースと共に、100 μLの反応体積で用いて、再試験した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON (登録商標) タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら16～18時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6、60℃。上記の反応物を、水中1～1.5 g/Lの出発RebA60に希釈することにより可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。ワンポット反応で活性改善を示した、得られた操作されたスクロースシンターゼ改変体を、表26.1および26.2に収載する。表26.3に収載する改変体については、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表26-1】

表26.1 SUS組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2092と比較して)	RebMの 増加 ^a
2161/2162	T34E/V62I/D441L/R557P/H623K	+++
2163/2164	T34E/D441L/S585A/H623K/T708V/D731Q	+++
2165/2166	D441L/S585A/V602P/N604A/H623R/T708V/D731Q	+++
2167/2168	D441L/R518S/R557P/M565V/S585A	+++
2169/2170	D441L/R518S/T526H/R557P/M565V/V602P/N604A/H623K/T708V	+++
2171/2172	L411I/D441L/R518S/R557P/H623K	+++
2173/2174	T34E/V62I/H623K/D731Q	+++
2175/2176	T34E/V62I/L411I/R557P/V602P/N604A	+++
2177/2178	V62I/E121D/D441L/M565V/S585A	+++
2179/2180	T34E/V62I/R518S/H623K	+++
2181/2182	D441L/R518S/T526H/R557P/S585A/N604A/H623R/T708V	+++
2183/2184	L411I/D441L/N604A/H623K/T708V/D731Q	++

【表 2 6 - 2】

表26.1 SUS組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2092と比較して)	RebM の 増加 ^a
2185/2186	T34E/D441L/R518S/T526H/S585A/N604A/D731Q	++
2187/2188	V62I/D441L/H623R/T708V/V770T	++
2189/2190	E121D/N604A/T708V/D731Q/V770T	++
2191/2192	T34E/D441L/T526H/M565V/T708V/V770T	++
2192/2194	D441L/R518S/T526H/N604A/H623R	++
2195/2196	V62I/L411I/T526H/M565V/N604A/H623K	++
2197/2198	R557P/N604A	++
2199/2200	E121D/D441L/R518S/T526H/V602P/N604A	++
2201/2202	L411I/R518S/T526H/N604A/H623K/D731Q	++
2203/2204	T34E/D441L/R544H/R557P/S585A/V602P/H623K	++
2205/2206	L411I/S585A/H623K	++
2207/2208	V62I/E121D/L411I/D441L/R518S/R544H/R557P/S585A/N604A/H623K	++
2209/2210	V62I/E121D/D441L/R518S/T526H/H623R/V770T	++
2211/2212	V62I/L411I/S585A/D731Q	++
2213/2214	T34E/E121D/T526H/N604A/D731Q	++
2215/2216	L411I/M565V/N604A/H623R	+
2217/2218	D441L/R518S/M565V/H623R/D731Q/V770T	+
2219/2220	T34E/V62I/L411I/T526H/R557P	+
2221/2222	T34E/L411I/D441L	+
2223/2224	V62I/E121D/R518S/R557P/S585A/N604A/T708V/V770T	+
2225/2226	E121D/D441L/R518S/T526H/H623K/T708V	+
2227/2228	V62I/D441L/R518S/R557P/N604A/H623K/T708V/D731Q	+
2229/2230	V62I/D441L/V770T	+
2231/2232	D441L/R518S/S585A	+
2233/2234	R557P/V602P/N604A	+
2235/2236	D441L/S585A	+
2237/2238	T34E/L411I/D441L/R518S/R544H/R557P/M565V/T708V/D731Q	+
2239/2240	H623R	+
2241/2242	T34E/L411I/D441L/R518S/S585A/N604A/V770T	+
2243/2244	T34E/E121D/D441L/R544H/N604A/H623K	+
2245/2246	V62I/E121D/E329Q/R518S/R557P/M565V/H623R/T708V	+
2247/2248	E121D/D441L/T526H/R557P/M565V/T708V	+

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 3】

表26.1 SUS組合せ改変体およびRebMレベル		
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2092と比較して)	RebM の 増加 ^a
2249/2250	D441L/T708V/D731Q	+
2251/2252	T34E/T526H/S585A/H623K	+
2253/2254	S585A/H623R/T708V	+
2255/2256	T34E/L411I/D441L/R518S/T526H/R557P/M565V/D731Q	+
2257/2258	L411I/D441L/R518S/T708V	+
^a 配列番号2092の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの1.3倍以上、参照ポリペプチドの1.47倍未満の産生; 「++」=1.47倍以上増大した産生だが、1.7倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.7倍以上増大した産生。		

10

【表 2 6 - 4】

表26.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2092と比較して)	30g/LのRebA60を ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a	50g/LのRebA60を ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a
2269/2270	T640A	+++	+++
2271/2272	T640N	++	+++
2273/2274	T640R	+++	+++
2275/2276	T65C	+++	++
2277/2278	A63T	-	++
2279/2280	A63G	+	++
2281/2282	T640E	+++	++
2283/2284	T640H	+++	++
2285/2286	A323G	+++	++
2287/2288	N406G	+	+
2289/2290	T640W	-	+
2291/2292	L416F	+	+
2293/2294	V511L	-	+
2295/2296	A323S	+	+
2297/2298	I269V	-	+
2299/2300	A63S	+++	+
2301/2302	T640V	-	+
2303/2304	A323T	++	+

20

30

40

50

【表 2 6 - 5】

表26.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル			
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2092と比較して)	30g/LのRebA60を ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a	50g/LのRebA60を ブレインキュベートした、 RebMの増加 ^a
2305/2306	T65L	+	+
2307/2308	T469S	-	+
^a 配列番号2092の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照のものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、1.1倍未満の産生; 「++」=1.1倍以上、1.2倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.2倍以上増大した産生。			

10

【0 2 8 7】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびレバウジオシドMを形成するためのスクロースからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

レバウジオシドA60%からのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対する操作されたSUS改変体の一部についての活性を特徴付けるために実験を行った。振盪フラスコ粉末（SFP）を、100g/LのRebA60を伴うおよび伴わないリン酸カリウム緩衝剤、pH6中、0.016~0.5g/Lに構成し、RebA60を伴う溶液を75℃で2時間ブレインキュベートした。10μLの希釈され、ブレインキュベートされたかまたはブレインキュベートされていないSUS溶解物、0.04g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号1080、および0.2g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号440を、30g/LのRebA60、0.02g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）、30g/Lのスクロース（蔗糖）、および7.2g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での30倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。熱安定性を評価するために、100g/LのRebA60を伴う50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で100倍希釈して24時間、71.1℃で、100μLの反応体積で、上で説明した同じワンポット反応条件下でインキュベートした、10μLの粗清澄化溶解物を用いる反応も行った。0.0125g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体によるワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表26.3に示す。

20

30

40

50

【表 2 6 - 6】

表26.3 SUS SFP改変体およびRebMレベル				
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2092と比較して)	RebM の 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキューベ した) ^a	活性残存% ^b
2163/2664	T34E/D441L/S585A/H623K/T708V/D 731Q	+	++	+
2167/2168	D441L/R518S/R557P/M565V/S585A	++	++	+
2161/2162	T34E/V62I/D441L/R557P/H623K	+	+	+
2165/2166	D441L/S585A/V602P/N604A/H623R/ T708V/D731Q	+	+	+
2171/2172	L411I/D441L/R518S/R557P/H623K	++	+	+
2183/2184	L411I/D441L/N604A/H623K/T708V/ D731Q	++	++	++
2181/2182	D441L/R518S/T526H/R557P/S585A/N 604A/H623R/T708V	+	++	+++
2187/2188	V62I/D441L/H623R/T708V/V770T	++	+	+
^a 配列番号2092の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=参照ポリペプチドのものと比較して1.1倍以上増加した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.1℃での24時間ブレインキューベーション後に、65℃での24 時間ブレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「+」=71.1℃での24時間ブレインキューベーション後に残存した活性14%以上、18%未満; 「++」=残存した活性18%以上、30%未満; および「+++」=残存した活性30%以上。				

【0 2 8 8】

表 2 6 . 3 に記載した 8 つ全ての改変体は、両方の活性アッセイでおよび 2 4 時間ブレインキューベーションアッセイで配列番号 2 0 9 2 と比べて同様にまたはより良好に動作した。2 4 時間ブレインキューベーション後に最も熱安定性の高い改変体である配列番号 2 1 8 2 を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0 2 8 9】

(実施例 2 7)

配列番号 2 1 8 2 のスクロースシンターゼ改変体

酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリー、および本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えたライブラリーを構築することによって、配列番号 2 1 8 2 によりコードされるスクロースシンターゼの定向進化を継続した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースの生成への活性が増加した別のラウンドの 8 0 種の操作された S u S 改変体ポリペプチドを得た。

【0290】

レバウジオシドMを形成するためのスクロースからADPへの、それからレバウジオシドA60へのグルコース転移についてのHTP結合アッセイ

以下のHTP酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状E. coli培養物を、1mM硫酸マグネシウムと0.5mg/mLのリゾチームとポリミキシンB硫酸塩(PMBS)とを伴う400μLのTris-HCl、pH7.5で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物を、100g/LのRebA60を伴うリン酸カリウム緩衝剤、pH6.0に添加して75~100倍希釈し、2時間、75℃でプレインキュベートした。次いで、10μLの希釈されプレインキュベートされたSuS溶解物、0.2g/Lのβ1,2GT SFP配列番号1216、および0.43g/Lのβ1,3GT SFP配列番号520を、50g/LのRebA60、0.01g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)、75g/Lのスクロース(蔗糖)、および18g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での50倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。ワンポット反応で活性改善を示した、得られた操作されたスクロースシンターゼ改変体を、表27.1および99.2に記載する。表27.3に記載する改変体については、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表27-1】

表 27.1 SUS 組合せ改変体および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 2182 と比較して)	RebM の増加 ^a
2309/2310	T34E/A323G/T640A	++
2311/2312	T34E/V62I	++
2313/2314	N406G/T640R	++
2315/2316	T34E/T65C	++
2317/2318	T34E/T640A	++
2319/2320	A323G/T640A/D731Q	++
2321/2322	R38H/T640R	++
2323/2324	V62I/A63S/T65C/E528D/T640A	++
2325/2326	A323G/H526T/E528D/T640R	++
2327/2328	A63T/T65C/N406G/D731Q	++

【表 2 7 - 2】

表 27.1 SUS 組合せ改変体および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 2182 と比較して)	RebM の増加 ^a
2329/2330	A63T/T65C/A323G/N406G/H526T/E528D/T640N/D731Q	++
2331/2332	T34E/A63S/N406G/E528D/T640N/D731Q	+
2333/2334	A63S/D731Q	+
2335/2336	A63S/T65C/T640R	+
2337/2338	T34E/T65C/E528D/T640R	+
2339/2340	T34E/A63S/A323G/H526T/E528D/T640R	+
2341/2342	A63S/N406G	+
2343/2344	D731Q	+
2345/2346	A63S/A323G/N406G/T640A	+
2347/2348	A63S/H526T/E528D/T640R/D731Q	+
2349/2350	T34E/A323G/N406G/T640A	+
2351/2352	T34E/A63T/T65C/A323G/E528D/T640R	+
2353/2354	H526T/E528D/T640A/D731Q	+
2355/2356	T34E/V62I/T65C/T640R	+
2357/2358	V62I/A63S/H526T/T640R/D731Q	+
2359/2360	A323G/N406G/T640N	+
2361/2362	V62I/A63T/I69F/A323G/N406G/T640R	+
2363/2364	A63T/N406G/T640A	+
2365/2366	T34E/A63S/T65C/N406G/E528D/T640R/A713V	+
2367/2368	V62I/A323G/T640R	+
2369/2370	A323G/N406G/T640R/D731Q	+
2371/2372	T34E/T640R	+
2373/2374	A63T/T65C/E528D/T640A/D731Q	+
2375/2376	T34E/V62I/A323G	+
2377/2378	A323G/H526T/T640R	+
2379/2380	V62I/A63T	+
2381/2382	T34E	+
^a 配列番号2182の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のもの以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=参照ポリペプチドと比較して1.1倍以上増大した産生。		

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 3】

表27.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2182と比較して)	RebMの増加 ^a
2383/2384	S102T	++
2385/2386	S30A	++
2387/2388	Q108R	++
2389/2390	R683V	++
2391/2392	L206I	++
2393/2394	P546N	++
2395/2396	A59T	++
2397/2398	R158A	++
2399/2400	Q37L	++
2401/2402	N183P	++
2403/2404	R158K	+
2405/2406	N307H	+
2407/2408	A164G	+
2409/2410	A409S	+
2411/2412	Q37M	+
2413/2414	E710S	+
2415/2416	Q311S	+
2417/2418	R28H	+
2419/2420	T191L	+
2421/2422	R683L	+
2423/2424	V235A	+
2425/2426	A164T	+
2427/2428	T419V	+
2429/2430	S30M	+
2431/2432	E710A	+
2433/2434	S30H/R158H	+
2435/2436	Q311L	+
2437/2438	S30Q	+
2439/2440	T419L	+
2441/2442	P546Q	+
2443/2444	E710V	+
2445/2446	E793G	+
2447/2448	G543A	+

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 4】

表27.2 SUS飽和変異誘発改変体およびRebMレベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2182と比較して)	RebMの増加 ^a
2449/2450	N307E	+
2451/2452	L533R	+
2453/2454	K559R	+
2455/2456	A164Q	+
2457/2458	T752R	+
2459/2460	E710G	+
2461/2462	A164S	+
2463/2464	S102N	+
2465/2466	L533K	+
2467/2468	P546T	+
^a 配列番号2182の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの0.99倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=参照ポリペプチドと比較して1.1倍以上増大した産生。		

【0 2 9 1】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびレバウジオシドMを形成するためのスクロースからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

レバウジオシドA60%からのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対する操作されたSUS改変体の一部についての活性を特徴付けるために実験を行った。振盪フラスコ粉末（SFP）を、100 g/LのRebA60を伴うおよび伴わないリン酸カリウム緩衝剤、pH6中、0.016~0.5 g/Lに構成し、RebA60を伴う溶液を75℃で2時間ブレインキュベートした。10 μLの希釈され、ブレインキュベートされたかまたはブレインキュベートされていないSUS溶解物、0.2 g/Lのβ1, 2GT SFP配列番号1216、および0.43 g/Lのβ1, 3GT SFP配列番号520を、50 g/LのRebA60、0.01 g/LのADP（Amresco、ウルトラピュアグレード）、75 g/Lのスクロース（蔗糖）、および18 g/Lのフルクトースと共に、100 μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら16~18時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での50倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。熱安定性を評価するために、100 g/LのRebA60を伴う50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6に0.2 g/Lで溶解して24時間、71.1℃でインキュベートした10 μLの振盪フラスコ粉末でも反応を行い、次いで、100 μLの反応体積で、上で説明した同じワンポット反応条件下でアッセイした。0.0125 g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体によるワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表27.3に示す。

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 5】

表27.3 SUS SFP改変体およびRebMレベル				
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号2182と比較して)	RebMの 増加 ^a	RebMの増加 (ブレインキューベート した) ^a	活性残存% ^b
2317/2318	T34E/T640A	+	++	+
2315/2316	T34E/T65C	+	+	-
2327/2328	A63T/T65C/N406G/D731Q	+	+	++
2321/2322	R38H/T640R	+	+	+
2311/2312	T34E/V62I	+	+	+
2309/2310	T34E/A323G/T640A	-	+	++
^a 配列番号2182の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「-」=参照ポリペプチドのものの0.9倍未満の産生; 「+」=参照のものの0.9倍以上、参照ポリペプチドの1.1倍未満の産生; および「++」=参照ポリペプチドのものと比較して1.1倍以上増加した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.1℃での24時間ブレインキューベーション後に、65℃での24時間ブレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=71.1℃での24時間ブレインキューベーション後に残存した活性16%未満; 「+」=残存した活性16%以上、26%未満; および「++」=残存した活性26%以上。				

【0 2 9 2】

表 2 7 . 3 に収載した 6 つ全ての改変体は、両方の活性アッセイでおよび 2 4 時間ブレインキューベーションアッセイで配列番号 2 1 8 2 と比べて同様にまたはより良好に動作した。2 時間ブレインキューベーションを伴わないワンポットアッセイで最も活性の高い改変体である配列番号 2 3 2 2 を、さらなる酵素操作の出発点として選択した。

【0 2 9 3】

(実施例 2 8)

配列番号 2 3 2 2 のスクロースシンターゼ改変体

酵素のある特定の構造的特徴に飽和変異誘発を施した改変体遺伝子のライブラリー、および本発明の開発中に同定された産生改善に関連する変異を組み換えたライブラリーを構築することによって、配列番号 2 3 2 1 によりコードされるスクロースシンターゼの定向進化を継続した。次に、これらのライブラリーをプレーティングし、増殖させ、下で説明するハイスループット (H T P) アッセイを使用してスクリーニングして、A D P - グルコースの生成への活性が増加した追加のラウンドの 1 8 の操作された S u S 改変体ポリペプチドを得た。

【0 2 9 4】

レバウジオシド M を形成するためのスクロースから A D P への、それからレバウジオシド A 6 0 へのグルコース転移についての H T P 結合アッセイ

以下の H T P 酵素結合アッセイを使用して、ライブラリーをスクリーニングした。ペレット状 E . c o l i 培養物を、1 m M 硫酸マグネシウムと 0 . 5 m g / m L のリゾチームとポリミキシン B 硫酸塩 (P M B S) とを伴う 4 0 0 μ L の T r i s - H C l , p H 7 . 5 で溶解し、遠心分離により清澄化した。溶解物を、1 0 0 g / L の R e b A 6 0 を伴うリン酸カリウム緩衝剤、p H 6 . 0 に添加して 1 0 0 倍希釈し、2 時間、7 5 ° C でブレイ

ンキュベートした。次いで、10 μ Lの希釈されブレインキュベートされたSuS溶解物、0.4 g/Lの β 1, 2GT SFP配列番号1516、および0.9 g/Lの β 1, 3GT SFP配列番号678を、100 g/LのRebA60、0.05 g/LのADP (Amresco、ウルトラピュアグレード)、150 g/Lのスクロース（蔗糖）、および36 g/Lのフルクトースと共に、100 μ Lの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した：THERMOTRON（登録商標）タイタープレートシェーカーにおいて300 RPMで振盪しながら16～18時間、50 mMリン酸カリウム緩衝剤、pH 6、60℃。上記の反応物を水での100倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SP E-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。ワンポット反応で活性改善を示した、得られた操作されたスクロースシンターゼ改変体を、表28.1に収載する。表28.2に収載する改変体については、実施例1で説明したように振盪フラスコ規模の培養物を増殖させ、溶解し、凍結乾燥させて粉末にした。

【表28-1】

表 28.1 SUS 改変体および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 2322 と比較して)	RebM の 増加 ^a
2469/2470	V62I/T65C/A323G/N406G/M565V/D731Q	+
2471/2472	A63T/T65C/A323G/N406G/M565V/D731Q	+
2473/2474	T34E/T65C/A323G/N406G/L411I/M565V	++
2475/2476	T34E/A323G/N406G/M565V/D731Q	+
2477/2478	V62I/T65C/N406G/L411I/M565V/D731Q	+++
2479/2480	A323G/L411I/M565V	++
2481/2482	A63T/T65C/N406G/L411I/M565V	+
2483/2484	A323G/N406G/L411I/M565V	++
2495/2486	V62I/A323G/L411I/M565V	+++
2487/2488	V62I/A323G/N406G/L411I/M565V	++
2489/2490	T34E/A323G/N406G/L411I/M565V	+++
2491/2492	Q636H	+
2493/2494	Q636N	+

【表 28-2】

表 28.1 SUS 改変体および RebM レベル		
配列番号 (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 2322 と比較して)	RebM の 増加 ^a
2495/2496	Q636A	+
2497/2498	V62I/T65C/A323G/N406G/M565V	+++
2499/2500	V62I/A323G/N406G/L411I	++
2501/2502	V62I/T65C/A323G/L411I/M565V	+
2503/2504	T65C/A323G/N406G/M565V	+
^a 配列番号2322の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.05倍以上、参照ポリペプチドの1.34倍未満の産生; 「++」=1.34倍以上増大した産生だが、1.39倍未満増大した産生; および「+++」=参照ポリペプチドと比較して1.39倍以上増大した産生。		

【0295】

振盪フラスコ粉末特徴付けアッセイおよびレバウジオシドMを形成するためのスクロースからレバウジオシドA60へのグルコシル転移についての分析

レバウジオシドA60%からのレバウジオシドMの形成を助長するためのスクロースおよびADPに対する操作されたSUS改変体の一部についての活性を特徴付けるために実験を行った。振盪フラスコ粉末(SFP)を、100g/LのRebA60を伴うおよび伴わないリン酸カリウム緩衝剤、pH6中、0.125~2g/Lに構成し、RebA60を伴う溶液を75℃で2時間ブレインキュベートした。10μLの希釈され、ブレインキュベートされたかまたはブレインキュベートされていないSUS溶解物、0.4g/Lのβ1,2GT SFP配列番号1516、および0.9g/Lのβ1,3GT SFP配列番号678を、100g/LのRebA60、0.05g/LのADP(Amresco、ウルトラピュアグレード)、150g/Lのスクロース(蔗糖)、および36g/Lのフルクトースと共に、100μLの反応体積で使用した。以下の反応条件を使用した: THERMOTRON(登録商標)タイタープレートシェーカーにおいて300RPMで振盪しながら16~18時間、50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6、60℃。上記の反応物を水での100倍希釈により可溶化し、0.2%ギ酸を伴うアセトニトリルでの5倍希釈によりクエンチし、遠心分離により沈殿させた。上清を水で20倍希釈し、表5.1に記載の計器およびパラメーターを用いてRapidFire SPE-MS/MSによりステビオールグリコシド産物を検出した。熱安定性を評価するために、100g/LのRebA60を伴う50mMリン酸カリウム緩衝剤、pH6で25倍希釈して24時間、71.1℃でインキュベートした10μLの粗清澄化溶解物を用いる反応も行い、次いで、100μLの反応体積で、上で説明した同じワンポット反応条件下でアッセイした。0.025g/LのSFP負荷量でのこれらの改変体によるワンポット反応でのレバウジオシドMの熱安定性結果および産生レベルを表28.2に示す。

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 3】

表 28.2 SUS SFP 改変体および RebM レベル				
配列番号 : (nt/aa)	アミノ酸相違 (配列番号 2322 と比較して)	RebM の 増加 ^a	RebM の増加 (ブレインキューベート した) ^a	活性残存 ^b
2473/2474	T34E/T65C/A323G/N406G/L411I/M56 5V	+	+++	+
2477/2478	V62I/T65C/N406G/L411I/M565V/D73 1Q	+	+++	++
2485/2486	V62I/A323G/L411I/M565V	++	++	-
2487/2488	V62I/A323G/N406G/L411I/M565V	+	+++	+
2489/2490	T34E/A323G/N406G/L411I/M565V	+	+++	-
2497/2498	V62I/T65C/A323G/N406G/M565V	++	++	-
2499/2500	V62I/A323G/N406G/L411I	+	++	+
2505/2506	V62I/T65C/N406G/L411I/M565V/Q63 6H/D731Q	+	+	++
^a 配列番号2322の参照ポリペプチドと比較して増大した産生のレベルを決定し、次のように定義した: 「+」=参照のものの1.15倍以上、参照ポリペプチドの1.35倍未満の産生; 「++」=1.15倍以上、1.35倍未満の産生; および「+++」=参照ポリペプチドのものと比較して1.35倍以上増加した産生。 ^b 各改変体についての活性残存パーセントを71.1℃での24時間ブレインキューベーション後に、65℃での24 時間ブレインキューベーション後の各改変体からの産生と比較して決定した。これを次のように定義する: 「-」=71.1℃での24時間ブレインキューベーション後に残存した活性44%未満; 「+」=残存した活性44%以上、54%未満; および「++」=残存した活性54%以上。				

【0 2 9 6】

表 2 8 . 2 に記載した 8 つ全ての改変体は、両方の活性アッセイで配列番号 2 3 2 2 と比べて同様にまたはより良好に動作し、これらのうちの 3 つは、1 0 0 g / L の R e b A 6 0 中、7 1 . 1 ° C での 2 4 時間ブレインキューベーション後に安定性がより高かった。3 つの熱安定性のより高い改変体のうち、2 時間ブレインキューベーションを伴うおよび伴わないワンポットアッセイにおいて最も活性の高い改変体は、配列番号 2 4 7 8 であった。配列番号 2 4 7 8 であるこの改変体を、アミノ酸変異 Q 6 3 6 H を導入することによりさらに操作して、配列番号 2 5 0 5 / 2 5 0 6 を生じさせた。配列番号 2 5 0 6 であるこの酵素を、β - 1 , 2 - グリコシルトランスフェラーゼおよび β - 1 , 3 - グリコシルトランスフェラーゼを用いるワンポット反応の状況下で A D P - グルコースを再生するためのスクロースからの A D P へのグリコシル転移を触媒するために、ならびにステビオールグリコシド（例えば、レバウジオシド A 6 0 % またはステビオールグリコシド 9 5 % またはステビオールグリコシド 8 5 % ）からのレバウジオシド M の形成のために、最良の酵素として選択した。

【0 2 9 7】

本願に引用する全ての刊行物、特許、特許出願および他の文献は、個々の刊行物、特許、特許出願および他の文献の各々があらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれると個々に示されている場合と同程度に、あらゆる目的でそれら全体がこれにより参照により

本明細書に組み込まれる。

【0298】

様々な具体的な実施形態を例証し、説明してきたが、本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく様々な変化を加えることができることが理解されるであろう。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

配列番号2に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目2)

配列番号20に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性であるポリペプチドを含む、項目1に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目3)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、41/72/233/338、41/72/338、41/144/233、41/233、41/233/338、61、61/87/91/107、61/87/91/259、61/91/431、61/107、61/259/428、61/407/428、61/411、72、72/76、72/76/163/197、72/76/195/233、72/76/197/204、72/76/207/233、72/76/207/338、72/81、72/81/195/233、72/139/195/204、72/144/338、72/200/204/207、72/207、76/144/197/200、76/195/197/204/207/233、76/197/207/233、76/233、81/139/144/195/200/204/207/233、81/144/233、81/197/200/207/233/338、81/233/338、81/338、107、107/259、139/144/233、144/233、144/233/338、156/407、163/233/338、200/204/207/233、233/338、および259から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号20を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目4)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、71、80、81、81/270、83、85、97、124、263、286、334、402、420および456から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号20を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目5)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、41/72/233/338、41/72/338、61、61/91/431、61/259/428、61/407/428、81/139/144/195/200/204/207/233および81/197/200/207/233/338から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号20を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目6)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、73/81/144/207/259、73/81/144/207/285/451、73/81/259/285/426/451、73/81/259/451、73/111/285/451、73/144/207/252/426/451、73/144/207/

10

20

30

40

50

2 5 9 / 2 8 5 / 4 2 6 / 4 5 1、7 3 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 9 / 2 8 5 / 4 5 1、7
 3 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 9 / 4 2 6 / 4 5 1、7 3 / 1 4 4 / 2 5 9 / 2 8 5、7 3 /
 2 5 9 / 4 2 6 / 4 5 1、7 3 / 2 5 9 / 4 5 1、8 1 / 1 1 1 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 8
 5 / 4 5 1、8 1 / 1 1 1 / 2 5 9 / 4 5 1、8 1 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 2 / 2 8 5 /
 4 2 6、8 1 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 9 / 4 5 1、8 1 / 1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 2 8
 5 / 4 5 1、8 1 / 1 4 4 / 2 5 9、8 1 / 1 4 4 / 2 5 9 / 2 8 5、8 1 / 1 4 4 / 2
 5 9 / 4 5 1、8 1 / 2 0 7 / 2 5 2 / 2 5 9 / 4 5 1、8 1 / 2 0 7 / 2 8 5 / 4 2 6
 / 4 5 1、8 1 / 2 8 5、8 1 / 2 8 5 / 4 5 1、1 1 1 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 2 / 2
 8 5 / 4 2 6 / 4 5 1、1 1 1 / 1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 2 8 5 / 4 5 1、1 1 1 / 1
 4 4 / 2 5 9 / 2 8 5 / 4 2 6 / 4 5 1、1 1 1 / 2 0 7 / 2 8 5、1 4 4 / 2 0 7 / 2
 5 2 / 2 5 9、1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 9、1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 9 / 2 8 5 / 4 5 1、1
 4 4 / 2 0 7 / 2 5 9 / 4 2 6 / 4 5 1、1 4 4 / 2 0 7 / 2 8 5 / 4 2 6、1 4 4 / 2
 0 7 / 4 5 1、1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 2 8 5、1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 2 8 5 / 4
 5 1、1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 4 2 6、1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 4 2 6 / 4 5 1、1
 4 4 / 2 5 9 / 2 8 5、1 4 4 / 2 8 5、1 4 4 / 2 8 5 / 4 5 1、1 4 4 / 4 5 1、2
 0 7、2 0 7 / 2 5 2 / 2 5 9 / 4 5 1、2 0 7 / 2 5 2 / 4 5 1、2 0 7 / 2 5 9、2
 0 7 / 2 5 9 / 4 2 6 / 4 5 1、2 0 7 / 2 8 5 / 4 2 6 / 4 5 1、2 0 7 / 4 5 1、2
 5 2 / 2 5 9、2 5 9、2 5 9 / 2 8 5 / 4 5 1、2 8 5、および 2 8 5 / 4 5 1 から選
 択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記
 位置が、配列番号 3 6 を基準にして番号が付けられている、項目 2 に記載の操作されたグリ
 コシルトランスフェラーゼ。

10

20

(項目 7)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、8 1 / 1 1
 1 / 1 4 4 / 2 0 7 / 2 8 5 / 4 5 1、1 4 4 / 2 0 7 / 2 5 2 / 2 5 9、1 4 4 / 2 0
 7 / 2 5 9 / 2 8 5 / 4 5 1、1 4 4 / 2 5 2 / 2 5 9 / 4 2 6、1 4 4 / 2 5 2 / 2 5
 9 / 4 2 6 / 4 5 1 および 1 4 4 / 2 8 5 / 4 5 1 から選択される 1 つまたは複数の位置
 に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 3 6 を基準に
 して番号が付けられている、項目 2 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 8)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、8 0 / 8 1
 、8 0 / 8 1 / 8 5、8 0 / 8 1 / 8 5 / 2 3 8、8 0 / 8 1 / 8 5 / 2 5 1 / 2 5 9、
 8 0 / 8 1 / 8 5 / 2 5 2 / 2 5 6 / 2 5 9、8 0 / 8 1 / 8 5 / 2 5 9、8 0 / 8 1 /
 2 5 1 / 2 5 2 / 2 5 9、8 0 / 8 5、8 0 / 8 5 / 2 3 8、8 0 / 8 5 / 2 3 8 / 2 5
 1 / 2 5 9、8 0 / 8 5 / 2 5 1、8 0 / 8 5 / 2 5 1 / 2 5 2、8 0 / 8 5 / 2 5 1 /
 2 5 2 / 2 5 6 / 2 5 9、8 0 / 8 5 / 2 5 1 / 2 5 2 / 2 5 9、8 0 / 8 5 / 2 5 1 /
 2 5 9、8 0 / 8 5 / 2 5 9、8 0 / 2 5 9、8 1 / 8 5、8 1 / 8 5 / 2 5 1 / 2 5 2
 、8 1 / 8 5 / 2 5 9、8 5、8 5 / 2 3 8、8 5 / 2 5 1、8 5 / 2 5 1 / 2 5 2 / 2
 5 6、8 5 / 2 5 1 / 2 5 9、8 5 / 2 5 6 / 2 5 9、1 7 5 / 4 0 2、2 5 1 / 2 5 2
 / 2 5 9、2 5 9、2 7 0 / 4 0 2、および 4 2 0 から選択される 1 つまたは複数の位置
 に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 1 7 4 を基準
 にして番号が付けられている、項目 2 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

30

40

(項目 9)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、3、5、7
 、9 9、1 5 3、2 3 2 / 3 1 7、2 5 2、2 7 3、2 9 9、3 2 6、3 9 3、4 0 4、
 4 0 9、4 2 2、4 4 3、4 5 1 および 4 5 5 から選択される 1 つまたは複数の位置に少
 なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 1 7 4 を基準に
 して番号が付けられている、項目 2 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 1 0)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、8 0 / 8 1
 / 8 5、8 0 / 8 5、8 0 / 8 5 / 2 5 1 / 2 5 9、8 5、8 5 / 2 5 1 / 2 5 2 / 2 5

50

6、175/402および270/402から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号174を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目11)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、81/85、81/85/175/259/402、81/85/251、81/85/251/259、81/85/259、81/85/259/402、85、85/175、85/175/251、85/175/251/259/402、85/175/259、85/175/259/402、85/175/402、85/259、85/259/402、および85/402から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号406を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

10

(項目12)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、153、153/326、153/326/443、153/326/443/455、232、232/273/299、232/393/451、299/451、326、404および451から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号408を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

20

(項目13)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、25、116、146、170、173、227、296、300、315、327、330、361、408、412、438、448および449から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号408を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目14)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、153、232、232/393/451および451から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号408を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

30

(項目15)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、146/170/196、146/170/196/232、146/170/196/232/423、146/170/196/232/451/455、146/170/196/408/451、146/170/232、146/170/232/423、146/170/232/423/448/451/455、146/170/259、146/196、146/196/232、146/196/232/259/448/451、146/196/455、146/232/259/455、146/232/315、146/232/315/423/451/455、146/232/326、146/232/448、146/232/451、および146/413/451/455から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号440を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

40

(項目16)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、9、12、107、131、156、161、169、199、204、209、233、262、289、337および417から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号440を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目17)

50

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、1 4 6 / 1 7 0 / 1 9 6、1 4 6 / 1 7 0 / 1 9 6 / 2 3 2、1 4 6 / 1 7 0 / 1 9 6 / 2 3 2 / 4 5 1 / 4 5 5、1 4 6 / 1 7 0 / 2 3 2、1 4 6 / 1 7 0 / 2 3 2 / 4 2 3 / 4 4 8 / 4 5 1 / 4 5 5、1 4 6 / 1 9 6 / 2 3 2、1 4 6 / 1 9 6 / 2 3 2 / 2 5 9 / 4 4 8 / 4 5 1および1 4 6 / 2 3 2 / 4 4 8から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号440を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目18)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、9 / 1 2 / 1 0 7 / 1 6 1 / 1 9 9 / 2 0 9 / 3 3 7、9 / 1 2 / 1 6 1 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 9 / 3 3 7、9 / 1 2 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 0 9 / 3 3 7 / 4 5 5、9 / 1 2 / 1 9 9 / 2 0 9 / 3 3 7 / 4 5 1 / 4 5 5、9 / 1 0 7 / 1 3 1 / 2 0 4 / 2 5 9 / 4 1 7 / 4 5 1、9 / 1 0 7 / 1 5 6 / 1 6 1 / 1 9 9 / 2 0 4 / 4 1 7 / 4 5 5、9 / 1 0 7 / 1 6 1 / 2 0 9 / 2 5 9 / 2 8 9 / 4 5 1 / 4 5 5、9 / 1 3 1 / 1 5 6 / 2 0 9 / 2 8 9 / 3 3 7、9 / 1 3 1 / 2 0 4 / 3 3 7 / 4 5 1、9 / 1 5 6 / 1 6 9 / 2 0 4 / 3 3 7、9 / 1 6 9 / 2 0 4 / 2 8 9 / 3 3 7 / 4 5 1 / 4 5 5、9 / 2 0 4、9 / 2 0 4 / 2 5 9 / 2 8 9、9 / 3 3 7、1 2 / 1 4 / 1 0 7 / 2 0 4 / 2 8 9 / 4 5 5、1 2 / 1 0 7 / 1 3 1 / 2 0 4 / 2 8 9 / 3 3 7 / 4 1 7 / 4 5 1 / 4 5 5、1 2 / 1 0 7 / 1 5 6 / 2 0 9 / 2 8 9 / 4 5 5、1 0 7 / 1 6 1 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 5 9 / 4 5 1、1 0 7 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 8 9、1 0 7 / 1 9 9 / 2 0 9 / 2 5 9 / 4 5 1 / 4 5 5、1 0 7 / 2 0 4、1 5 6 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 0 9 / 2 5 9 / 2 8 9、1 6 1 / 2 0 4 / 4 1 7、2 0 4 / 4 5 1 / 4 5 5、2 8 9、および4 5 1 / 4 5 5から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号520を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目19)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、1 6、5 3、5 4、7 8、8 0、9 5、1 1 1、2 2 1、2 5 7、3 3 6、3 4 9、3 9 1、4 1 0、4 1 3、4 2 6および4 3 0から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号520を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目20)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、9 / 1 2 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 0 9 / 3 3 7 / 4 5 5、9 / 1 3 1 / 1 5 6 / 2 0 9 / 2 8 9 / 3 3 7、9 / 2 0 4、1 2 / 1 4 / 1 0 7 / 2 0 4 / 2 8 9 / 4 5 5、1 0 7 / 1 6 1 / 1 6 9 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 5 9 / 4 5 1、1 0 7 / 1 9 9 / 2 0 4 / 2 8 9および2 0 4 / 4 5 1 / 4 5 5から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号520を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目21)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、1 6、1 6 / 5 9 / 8 0 / 4 1 3、1 6 / 8 0、1 6 / 8 0 / 1 1 1、1 6 / 8 0 / 1 1 1 / 2 5 7、1 6 / 8 0 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 3 6 / 4 1 0、1 6 / 8 0 / 2 2 1 / 3 3 6 / 4 1 0、1 6 / 8 0 / 2 5 7、1 6 / 1 1 1 / 2 2 1、1 6 / 1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 9 1、1 6 / 2 2 1、1 6 / 2 2 1 / 2 5 7、1 6 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 3 6 / 3 9 1、1 6 / 2 2 1 / 4 1 0、1 6 / 2 5 7、1 6 / 2 5 7 / 3 3 6 / 4 1 3 / 4 2 0、8 0 / 1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 4 1 0、1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 3 6 / 3 9 1、1 1 1 / 2 2 1 / 2 5 7 / 3 9 1、2 2 1、および2 2 1 / 2 5 7から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号626を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラー

10

20

30

40

50

ぜ。

(項目 2 2)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、5、7、14、65、91、99、102、118、138、194、254、286、416、418および420から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号626を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 2 3)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、16/80/221/257/336/410、16/111/221、16/221/257、16/221/410、16/257、80/111/221/257/410および221から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号626を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 2 4)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、5、5/14/99、5/14/416、5/91、5/91/102/118、5/91/102/254/418、5/91/106/254/286、5/91/118/194/254/286、5/91/118/194/254/418、5/91/118/194/418、5/91/118/254/286/418、5/91/118/286、5/91/194/254、5/91/194/418、5/91/254、5/91/254/286、5/102/418、5/118/194/286/418、5/118/254、5/118/286、5/194、5/254/286、5/418、7/14、7/14/65/99、7/14/99/416、14、14/65/99/416、14/99、14/99/254、14/99/254/416、14/99/254/416/455、14/99/416、14/167、14/254、14/455、91、91/102/194、91/118、91/118/194、91/118/194/286、91/118/194/418、91/118/286、91/194/254/286、91/286、および118/286/418から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号678を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 2 5)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、5/91/106/254/286、5/91/118/286、5/91/254/286、14、14/65/99/416、14/99および14/99/254から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号678を基準にして番号が付けられている、項目2に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 2 6)

配列番号12に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 2 7)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、16、16/127/169、16/134、16/143/423、16/169、16/169/398/399、16/169/423、16/398、16/398/399、16/398/427、16/423、16/423/427、134、143、399/423および423/427から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号24を基準にして番号が付けられてい

10

20

30

40

50

る、項目 26 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 28)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、3、8、11、41、44、56、60、122、135、137、138、139、158、164、176、221、232、233、235、248、249、281、284、285、301、322、372、392、400、421、426、427、433、440、443 および 446 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 24 を基準にして番号が付けられている、項目 26 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 29)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、16、16/127/169 および 16/169 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 24 を基準にして番号が付けられている、項目 26 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 30)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、3/22/198/421、3/22/421、3/201/248/322、3/201/248/322/392、13/233/331/440、13/440/443、22/32/56/60/198/248/322/392/421、22/56、22/56/137/198/248/392/421、22/56/137/322、22/56/137/322/392/423、22/56/198/202/248、22/56/198/248/322/392/421、22/56/198/248/421/423、22/56/421/423、22/60/392/421、22/137、22/137/198/202/248、22/198/202/248/392、22/248/392、22/392、22/421、22/421/423、22/423、44/164/233、44/164/233/329/331、44/331、125、125/233/443/446、164/221/233/331/440/446、164/233/331/440、164/331、164/440、164/443、198/202/392、221/329/331、233、233/446、329、421/423、および 443/446 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 858 を基準にして番号が付けられている、項目 26 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 31)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、3/22/198/421、13/440/443、22/56/198/202/248、22/137、22/198/202/248/392、164/221/233/331/440/446、164/233/331/440 および 233/446 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 858 を基準にして番号が付けられている、項目 26 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 32)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、83/202/233、164、164/202、164/202/233/331、164/202/248/272、164/202/331、164/202/331/423、164/423、202/233、202/233/248、202/233/248/423、202/248、202/331、202/421/423、202/423、202/446、233、248、および 423 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 994 を基準にして番号が付けられている、項目 26 に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

10

20

30

40

50

(項目 3 3)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、7、9、10、54、73、84、106、115、116、132、165、286、309、389、406、422および438から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号994を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 3 4)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、83/202/233、164、164/202、164/423、202/233/248および233から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号994を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

10

(項目 3 5)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、7/9/73/165/286、7/9/165/286、7/9/422、7/116/165/286、7/165、9/73/116/165/286/422、9/286/389、54、54/84、54/406、73、73/116/165/286/389、73/116/286、73/116/286/422、73/165/286、73/286/389、73/286/422、73/422、84、115、116、116/165、116/165/286/422、116/389、165、165/286、165/389、165/389/422、286、286/422、389/422、および422から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1080を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

20

(項目 3 6)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、185/190、219、220、255、257、302、385、395、395/437、399、401、409、412、416、434、441、445、447および449から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1080を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

30

(項目 3 7)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、9/73/116/165/286/422、54、54/84、54/406、73/116/286/422、116/165/286/422および286/422から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1080を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 3 8)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、54、54/185/190、54/185/190/219/257/302/385/389/395/445/447/449、54/185/190/219/385、54/185/190/219/385/389/395/399/441/445/447/449、54/185/190/219/385/395/399/441/445/447/449、54/185/190/219/385/445/447、54/185/190/219/389/395/399/441/445/447/449、54/185/190/302、54/185/190/302/395/399、54/185/190/385/447/449、54/185/190/389/395、54/185/190/389/441/445/447/449、54/185/190/389/445、54/185/190/395/399/441/445/447/449、

40

50

5 4 / 1 8 5 / 2 1 9 / 3 8 9、5 4 / 1 8 5 / 2 5 7 / 3 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4
 7 / 4 4 9、5 4 / 1 8 5 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 1 8 5 /
 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 9、5 4 / 1 8 5 / 3 8 5 / 3 9 5 / 3
 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4
 / 1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 0 2、5 4 / 1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 9 5 / 4 4 5 /
 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 0 2 / 3 9 9、5 4
 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 0 9 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5、5 4 / 1 9 0 /
 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9、5 4 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 9、5 4 / 1 9
 0 / 3 0 2 / 3 8 9、5 4 / 1 9 0 / 3 0 2 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7
 、5 4 / 1 9 0 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5、5 4 / 1 9 0 / 3 8 5 / 3
 9 5、5 4 / 1 9 0 / 3 8 5 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 1 9 0 / 3 9 5、5 4 /
 1 9 0 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 2 1 9 / 3 0 2 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4
 4 7、5 4 / 2 1 9 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 2 5 7
 、5 4 / 2 5 7 / 3 8 5 / 4 4 9、5 4 / 2 5 7 / 3 8 9、5 4 / 2 5 7 / 3 9 9、5 4
 / 2 5 7 / 4 4 1 / 4 4 7、5 4 / 2 5 7 / 4 4 1 / 4 4 9、5 4 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3
 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、5 4 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4
 9、5 4 / 3 8 5、5 4 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、5 4 / 3
 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 7 / 4 4 9、1 8 5 / 1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3
 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 0 2 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4
 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 9、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3
 8 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5、1 8 5 / 1
 9 0 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 7 / 4 4 9、1 8 5 / 1 9 0 / 3
 8 5 / 3 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 1 9 0 / 3 8 9 / 4 4 7 / 4 4 9、1
 8 5 / 1 9 0 / 3 9 5 / 3 9 9、1 8 5 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、1
 8 5 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、1 8 5 / 3 0 2 / 3 9 5 / 3
 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、1 8 5 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4
 4 7、1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、1
 9 0 / 2 1 9 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 9 9 / 4 4 5、1 9 0 / 2 5 7 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3
 9 9、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 9、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 4
 4 5 / 4 4 7、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 9 5、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 5 / 4 4 1 / 4
 4 5 / 4 4 7 / 4 4 9、1 9 0 / 2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1
 9 0 / 2 5 7 / 3 9 9 / 4 4 7 / 4 4 9、1 9 0 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3
 9 9 / 4 4 1 / 4 4 5 / 4 4 7、1 9 0 / 3 8 9、2 1 9 / 2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3
 9 5 / 4 4 1 / 4 4 7 / 4 4 9、2 1 9 / 2 5 7 / 3 9 5、2 1 9 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3
 9 9 / 4 4 5 / 4 4 9、2 1 9 / 3 9 5、2 5 7 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 9、2 5 7 / 3
 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4 4 7、2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 5 / 3 9 9 / 4 4 5 / 4
 4 9、2 5 7 / 3 8 9 / 3 9 9、3 0 2 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 5、3 8 5 / 3 8 9、3
 8 5 / 3 9 5、3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7、3 9 5 / 3 9 9、および 3 9 9 から選
 択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記
 位置が、配列番号 1 2 1 6 を基準にして番号が付けられている、項目 2 6 に記載の操作さ
 れたグリコシルトランスフェラーゼ。

10

20

30

40

(項目 3 9)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、5、1 4、
 9 6、1 0 8、1 5 7、1 8 1、1 8 8、2 7 8、2 9 3 および 3 4 1 から選択される 1
 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配
 列番号 1 2 1 6 を基準にして番号が付けられている、項目 2 6 に記載の操作されたグリコ
 シルトランスフェラーゼ。

(項目 4 0)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、5 4 / 1 8
 5 / 1 9 0 / 2 1 9 / 2 5 7 / 3 0 2 / 3 8 5 / 3 8 9 / 3 9 5 / 4 4 5 / 4 4 7 / 4 4

50

9、54/185/190/385/447/449、54/190/257/302/385/395/399、54/190/302/389/395/399/445/447、54/257/385/449、54/257/389、および54/389/395/399/447/449から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1216を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目41)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、14/42/51/108/181、14/42/51/157/341、14/42/341、14/51/96/157、14/51/96/157/341、14/51/96/341、14/51/108、14/51/341、14/96、14/96/108/133、14/96/108/181/341、14/96/108/188、14/96/341、14/108/157、14/108/157/188、14/157/181/278、14/278、42/96/157/341、42/188/341、96/108/181/293、96/108/188、96/108/188/341、96/188、181、188、および293から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1488を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目42)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、122、144、147、187、196、197、198、199、201、268および324から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1488を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目43)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、14/42/341、14/96、14/96/108/133、14/96/108/181/341および188から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1488を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目44)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、147/188/196/201、152/187/188/324、152/188、152/188/196/198/199/324、152/188/196/199、152/188/196/201/324、152/188/324、188、188/196/198/199/201、188/196/198/199/201/324、188/196/198/201、188/196/198/324、188/196/201、188/198/199/201/324、188/198/199/268、188/198/201/324、188/198/324、188/199/201、188/201、188/201/324、および188/324から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1516を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目45)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼの前記ポリペプチド配列が、152/188/196/198/199/324、188/196/198/199/201、188/196/198/201、188/196/201、188/198/199/268、188/201および188/324から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1516を基準にして番号が付けられている、項目26に記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

10

20

30

40

50

(項目 4 6)

ベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼおよびベクター 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼから選択される、項目 1 から 4 5 のいずれかに記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 4 7)

A D P-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ (A G T)、C D P-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ (C G T)、G D P-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ (G G T)、T D P-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ (T G T) および I D P-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼ (I G T) から選択される、N D P-グリコシルトランスフェラーゼである、項目 1 から 4 6 のいずれかに記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

10

(項目 4 8)

A D P-グルコース依存性グリコシルトランスフェラーゼである、項目 1 から 4 7 のいずれかに記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 4 9)

ウラシルニリン酸以外の糖ドナーを優先的に使用する、項目 1 から 4 8 のいずれかに記載の操作されたグリコシルトランスフェラーゼ。

(項目 5 0)

項目 1 から 4 8 のいずれかで提供される少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼポリペプチドをコードする操作されたポリヌクレオチド。

20

(項目 5 1)

項目 5 0 に記載の少なくとも 1 つの操作されたポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 5 2)

少なくとも 1 つの制御配列をさらに含む、項目 5 1 に記載のベクター。

(項目 5 3)

項目 5 0 に記載の少なくとも 1 つの操作されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

(項目 5 4)

項目 5 1 および／または 5 2 に記載の少なくとも 1 つのベクターを含む宿主細胞。

(項目 5 5)

真核生物および原核生物から選択される、項目 5 3 または 5 4 に記載の宿主細胞。

30

(項目 5 6)

項目 1 から 4 5 のいずれかで提供される少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを産生するための方法であって、項目 5 3 から 5 5 のいずれかに記載の宿主細胞を、前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼが前記宿主細胞により産生されるような条件下で培養するステップを含む、方法。

(項目 5 7)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼを回収するステップをさらに含む、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

項目 1 から 4 5 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを含む組成物。

40

(項目 5 9)

配列番号 6 に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 6 0)

配列番号 2 2 に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含む、操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 6 1)

50

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3 / 5 4 8、4、7、1 2、4 1、4 2、4 4、4 7、5 2、5 7、5 9、7 1、8 1、8 5、9 3、9 7、1 2 2、1 2 9、1 3 4、1 3 6、1 3 9、1 5 4、1 7 5、2 1 5、2 6 6、2 7 0、3 4 3、3 5 8、3 8 1、3 8 8、4 3 4、4 4 2、5 1 9、5 2 4、5 3 2、5 3 6、5 7 0、5 8 9、6 0 3、6 0 6、6 1 5、6 3 5、6 4 1、6 5 2、7 2 4、7 2 7、および7 3 8から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号22を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目62)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、4 1、5 2、1 3 4、3 8 1、4 4 2、5 1 9、5 2 4および7 2 4から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号22を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目63)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、2 5 / 4 4 / 5 2 / 1 3 4 / 4 3 4 / 7 2 4、4 1 / 4 4 / 5 2 / 9 7 / 4 4 2 / 7 1 9 / 7 2 4、4 1 / 4 4 / 5 2 / 1 3 4 / 4 4 2、4 1 / 4 4 / 5 2 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 7 2 4、4 1 / 4 4 / 5 2 / 4 3 4 / 7 2 4、4 1 / 4 4 / 1 3 6 / 3 2 9、4 1 / 4 4 / 1 3 6 / 4 4 2、4 1 / 4 4 / 5 3 2、4 1 / 5 2 / 9 7 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 7 2 4、4 1 / 5 2 / 1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4、4 1 / 5 2 / 1 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、4 1 / 5 2 / 1 3 6、4 1 / 5 2 / 4 3 4、4 1 / 5 2 / 4 3 4 / 4 4 2、4 1 / 5 2 / 4 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、4 1 / 5 2 / 4 4 2、4 1 / 9 7 / 1 3 4 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 5 5 3、4 1 / 1 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2、4 1 / 3 2 9 / 4 4 2、4 1 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2、4 1 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 7 2 4、4 1 / 4 3 4 / 5 3 2、4 1 / 5 3 2、4 4 / 5 2 / 9 7 / 4 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、4 4 / 5 2 / 9 7 / 4 4 2 / 7 2 4、4 4 / 5 2 / 1 3 4 / 1 3 6 / 3 2 9 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2、4 4 / 5 2 / 1 3 4 / 4 3 4 / 5 3 2、4 4 / 1 3 6 / 3 2 9 / 4 3 4 / 5 3 2、4 4 / 1 3 6 / 5 3 2、4 4 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 5 3、5 2、5 2 / 9 7、5 2 / 9 7 / 4 3 4 / 4 4 2、5 2 / 9 7 / 4 4 2、5 2 / 9 7 / 5 3 2、5 2 / 1 3 4、5 2 / 1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4、5 2 / 1 3 4 / 1 3 6 / 4 4 2、5 2 / 1 3 4 / 3 2 9 / 4 3 4、5 2 / 1 3 4 / 3 2 9 / 5 3 2、5 2 / 1 3 4 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 5 5 3、5 2 / 1 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、5 2 / 1 3 6、5 2 / 1 3 6 / 4 3 4、5 2 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2、5 2 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2、5 2 / 1 3 6 / 4 3 4 / 7 2 4、5 2 / 1 3 6 / 4 4 2、5 2 / 4 3 4、5 2 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2、5 2 / 4 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、5 2 / 4 3 4 / 5 3 2、5 2 / 4 4 2、5 2 / 4 4 2 / 5 3 2 / 7 2 4、5 2 / 4 4 2 / 5 5 3 / 7 2 4、5 2 / 4 4 2 / 7 2 4、5 2 / 5 3 2、5 2 / 5 5 3、5 7 / 9 7 / 4 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、9 7 / 1 3 4 / 1 3 6 / 4 4 2 / 5 3 2、9 7 / 1 3 4 / 1 3 6 / 5 3 2、9 7 / 1 3 4 / 4 4 2、9 7 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2、9 7 / 3 2 9 / 7 2 4、9 7 / 4 4 2、1 3 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 3 2 / 5 5 3 / 7 2 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 4 4 2 / 5 5 3 / 7 2 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 3 4 / 5 3 2 / 7 2 4、1 3 4 / 1 3 6 / 4 4 2 / 5 3 2、1 3 4 / 4 3 4 / 4 4 2 / 7 2 4、1 3 6、1 3 6 / 4 4 2、1 3 6 / 4 4 2 / 7 2 4、1 3 6 / 5 3 2 / 7 2 4、4 3 4、4 3 4 / 4 4 2、4 4 2、4 4 2 / 7 2 4、および5 3 2 / 7 2 4から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1652を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目64)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3、4、2 2、3 2、3 4、3 8、4 7 / 4 8 8、5 1、5 1 / 4 3 3、6 2、7 5 / 1 6 9、1 0 1、1 6 9、1 9 5 / 2 1 3、7 0 8および7 1 8から選択される1つまたは複数の位置に少なく

10

20

30

40

50

とも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1652を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目65)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、44/52/97/442/724、52/97/442、97/442および434/442から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1652を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目66)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、4/22、4/22/34、4/22/34/38、4/22/34/38/169/708、4/22/34/47/51/169/213、4/22/51/708、4/22/101、4/34/38/101、4/34/708、4/62/433/708、4/169、4/169/433、4/169/708、4/433、4/708、22/34、22/34/38、22/34/101/169、22/34/101/169/195、22/34/169/708、22/47/169/433、22/75、34/38/62、34/62/169/433、34/101、62/708、75/169、169/708、および195/708から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1822を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目67)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、4、22、34、121、169、341、411、433、441、518、526、527、528、544、557、558、565、585、602、604、623、708、731および770から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1822を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目68)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、4、4/22/34/38、4/169、4/169/433、4/433、62/708および169/708から選択される1つまたは複数の位置に少なくとも1つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号1822を基準にして番号が付けられている、項目59に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目69)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、34/62/411/526/557、34/62/411/557/602/604、34/62/441/557/623、34/62/518/623、34/62/623/731、34/121/441/544/604/623、34/121/526/604/731、34/411/441、34/411/441/518/526/557/565/731、34/411/441/518/544/557/565/708/731、34/411/441/518/585/604/770、34/441/518/526/585/604/731、34/441/526/565/708/770、34/441/544/557/585/602/623、34/441/585/623/708/731、34/526/585/623、62/121/329/518/557/565/623/708、62/121/411/441/518/544/557/585/604/623、62/121/441/518/526/623/770、62/121/441/565/585、62/121/518/557/585/604/708/770、62/411/526/565/604/623、62/411/585/731、62/441/518/557/604/623/708/731、62/441/623/708/770、62/441/770、121/441/518/526/

10

20

30

40

50

6 0 2 / 6 0 4、1 2 1 / 4 4 1 / 5 1 8 / 5 2 6 / 6 2 3 / 7 0 8、1 2 1 / 4 4 1 / 5 2 6 / 5 5 7 / 5 6 5 / 7 0 8、1 2 1 / 6 0 4 / 7 0 8 / 7 3 1 / 7 7 0、4 1 1 / 4 4 1 / 5 1 8 / 5 5 7 / 6 2 3、4 1 1 / 4 4 1 / 5 1 8 / 7 0 8、4 1 1 / 4 4 1 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8 / 7 3 1、4 1 1 / 5 1 8 / 5 2 6 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 3 1、4 1 1 / 5 6 5 / 6 0 4 / 6 2 3、4 1 1 / 5 8 5 / 6 2 3、4 4 1 / 5 1 8 / 5 2 6 / 5 5 7 / 5 6 5 / 6 0 2 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8、4 4 1 / 5 1 8 / 5 2 6 / 5 5 7 / 5 8 5 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8、4 4 1 / 5 1 8 / 5 2 6 / 6 0 4 / 6 2 3、4 4 1 / 5 1 8 / 5 5 7 / 5 6 5 / 5 8 5、4 4 1 / 5 1 8 / 5 6 5 / 6 2 3 / 7 3 1 / 7 7 0、4 4 1 / 5 1 8 / 5 8 5、4 4 1 / 5 8 5、4 4 1 / 5 8 5 / 6 0 2 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8 / 7 3 1、4 4 1 / 7 0 8 / 7 3 1、5 5 7 / 6 0 2 / 6 0 4、5 5 7 / 6 0 4、5 8 5 / 6 2 3 / 7 0 8、および 6 2 3 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 0 9 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

10

(項目 7 0)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、6 3、6 5、2 6 9、3 2 3、4 0 6、4 1 6、4 6 9、5 1 1 および 6 4 0 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 0 9 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 7 1)

20

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3 4 / 6 2 / 4 4 1 / 5 5 7 / 6 2 3、3 4 / 4 4 1 / 5 8 5 / 6 2 3 / 7 0 8 / 7 3 1、6 2 / 4 4 1 / 6 2 3 / 7 0 8 / 7 7 0、4 1 1 / 4 4 1 / 5 1 8 / 5 5 7 / 6 2 3、4 1 1 / 4 4 1 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8 / 7 3 1、4 4 1 / 5 1 8 / 5 2 6 / 5 5 7 / 5 8 5 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8、4 4 1 / 5 1 8 / 5 5 7 / 5 6 5 / 5 8 5、および 4 4 1 / 5 8 5 / 6 0 2 / 6 0 4 / 6 2 3 / 7 0 8 / 7 3 1 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 0 9 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 7 2)

30

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3 4、3 4 / 6 2、3 4 / 6 2 / 6 5 / 6 4 0、3 4 / 6 2 / 3 2 3、3 4 / 6 3 / 6 5 / 3 2 3 / 5 2 8 / 6 4 0、3 4 / 6 3 / 6 5 / 4 0 6 / 5 2 8 / 6 4 0 / 7 1 3、3 4 / 6 3 / 3 2 3 / 5 2 6 / 5 2 8 / 6 4 0、3 4 / 6 3 / 4 0 6 / 5 2 8 / 6 4 0 / 7 3 1、3 4 / 6 5、3 4 / 6 5 / 5 2 8 / 6 4 0、3 4 / 3 2 3 / 4 0 6 / 6 4 0、3 4 / 3 2 3 / 6 4 0、3 4 / 6 4 0、3 8 / 6 4 0、6 2 / 6 3、6 2 / 6 3 / 6 5 / 5 2 8 / 6 4 0、6 2 / 6 3 / 6 9 / 3 2 3 / 4 0 6 / 6 4 0、6 2 / 6 3 / 5 2 6 / 6 4 0 / 7 3 1、6 2 / 3 2 3 / 6 4 0、6 3 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 2 6 / 5 2 8 / 6 4 0 / 7 3 1、6 3 / 6 5 / 4 0 6 / 7 3 1、6 3 / 6 5 / 5 2 8 / 6 4 0 / 7 3 1、6 3 / 6 5 / 6 4 0、6 3 / 3 2 3 / 4 0 6 / 6 4 0、6 3 / 4 0 6、6 3 / 4 0 6 / 6 4 0、6 3 / 5 2 6 / 5 2 8 / 6 4 0 / 7 3 1、6 3 / 7 3 1、3 2 3 / 4 0 6 / 6 4 0、3 2 3 / 4 0 6 / 6 4 0 / 7 3 1、3 2 3 / 5 2 6 / 5 2 8 / 6 4 0、3 2 3 / 5 2 6 / 6 4 0、3 2 3 / 6 4 0 / 7 3 1、4 0 6 / 6 4 0、5 2 6 / 5 2 8 / 6 4 0 / 7 3 1、および 7 3 1 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 1 8 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

40

(項目 7 3)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、2 8、3 0、3 0 / 1 5 8、3 7、5 9、1 0 2、1 0 8、1 5 8、1 6 4、1 8 3、1 9 1、2 0 6、2 3 5、3 0 7、3 1 1、4 0 9、4 1 9、5 3 3、5 4 3、5 4 6、5 5 9、6 8 3、7 1 0、7 5 2 および 7 9 3 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異ま

50

たは変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 1 8 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 7 4)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3 4 / 6 2、3 4 / 6 5、3 4 / 3 2 3 / 6 4 0、3 4 / 6 4 0、3 8 / 6 4 0 および 6 3 / 6 5 / 4 0 6 / 7 3 1 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 1 8 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 7 5)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3 4 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、3 4 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、3 4 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5 / 7 3 1、6 2 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5、6 2 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5 / 7 3 1、6 2 / 6 5 / 3 2 3 / 4 1 1 / 5 6 5、6 2 / 6 5 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5 / 7 3 1、6 2 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1、6 2 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、6 2 / 3 2 3 / 4 1 1 / 5 6 5、6 3 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5 / 7 3 1、6 3 / 6 5 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5、3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、3 2 3 / 4 1 1 / 5 6 5、および 6 3 6 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 7 6)

前記操作されたスクロースシンターゼの前記ポリペプチド配列が、3 4 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、3 4 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、6 2 / 6 5 / 3 2 3 / 4 0 6 / 5 6 5、6 2 / 6 5 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5 / 6 3 6 / 7 3 1、6 2 / 6 5 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5 / 7 3 1、6 2 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1、6 2 / 3 2 3 / 4 0 6 / 4 1 1 / 5 6 5、および 6 2 / 3 2 3 / 4 1 1 / 5 6 5 から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの変異または変異のセットを含み、前記位置が、配列番号 2 3 2 2 を基準にして番号が付けられている、項目 5 9 に記載の操作されたスクロースシンターゼ。

(項目 7 7)

項目 5 9 から 7 6 のいずれかで提供される少なくとも 1 つの操作されたスクロースシンターゼポリペプチドをコードする操作されたポリヌクレオチド。

(項目 7 8)

項目 7 7 に記載の少なくとも 1 つの操作されたポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 7 9)

少なくとも 1 つの制御配列をさらに含む、項目 7 8 に記載のベクター。

(項目 8 0)

項目 7 8 に記載の少なくとも 1 つの操作されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

(項目 8 1)

項目 7 8 または項目 7 9 に記載のベクターを含む宿主細胞。

(項目 8 2)

真核生物および原核生物から選択される、項目 8 0 および / または 8 1 に記載の宿主細胞。

(項目 8 3)

項目 5 9 から 7 6 のいずれかで提供される少なくとも 1 つの操作されたスクロースシンターゼ改変体を産生するための方法であって、項目 8 0 から 8 2 のいずれかに記載の宿主細胞を、前記操作されたスクロースシンターゼ改変体が前記宿主細胞により産生されるような条件下で培養するステップを含む、方法。

(項目 8 4)

前記操作されたスクロースシンターゼ改変体を回収するステップをさらに含む、項目 8

10

20

30

40

50

3に記載の方法。

(項目85)

項目60から75のいずれかに記載の少なくとも1つの操作されたスクロースシンターゼ改変体を含む組成物。

(項目86)

基質のグリコシル化のための方法であって、少なくとも1つの基質、項目1から45のいずれかに記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、および前記基質と前記グリコシルトランスフェラーゼとを、前記基質がグリコシル化されて少なくとも1つのグリコシル化産物を産生するような条件下で接触させるステップを含む、方法。

10

(項目87)

前記基質が、少なくとも1つのステビオールグリコシドを含む、項目86に記載の方法。

(項目88)

前記グリコシル化産物が、少なくとも1つのモノグリコシル化および／またはポリグリコシル化産物を含む、項目86に記載の方法。

(項目89)

レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、NDP-グルコース、ならびに項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記レバウジオシドDおよびレバウジオシドI基質、NDP-グルコース、ならびに前記グリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

20

(項目90)

レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP-グルコース、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

(項目91)

レバウジオシドDを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP-グルコース、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドDが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

30

(項目92)

前記NDP-グルコースが、ADP-グルコース、CDP-グルコース、TDP-グルコース、GDP-グルコース、および／またはIDT-グルコースから選択される、項目86から91のいずれかに記載の方法。

(項目93)

前記NDP-グルコースが、UDP-グルコースではない、項目86から92のいずれかに記載の方法。

40

(項目94)

前記グリコシルトランスフェラーゼが、項目1から25および／または項目26から45のいずれかに記載の少なくとも1つのグリコシルトランスフェラーゼを含む、項目86から93のいずれかに記載の方法。

(項目95)

レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、ADP-グルコース、ならびに項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記レバウジオシ

50

ドDおよび／またはレバウジオシドI基質、ADP-グルコース、ならびにグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

(項目96)

レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、ADP-グルコース、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたADP-グリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、ADP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

10

(項目97)

レバウジオシドDを産生するための方法であって、ステビオシド基質、ADP-グルコース、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、ADP-グルコース、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドDが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

(項目98)

レバウジオシドMを産生するための方法であって、レバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドI基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、ならびに項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記レバウジオシドD基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

20

(項目99)

レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAおよび／またはレバウジオシドIが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

30

(項目100)

レバウジオシドDを産生するための方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドDが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

(項目101)

レバウジオシドMを産生するための方法であって、少なくとも1つのステビオシドを含むおよび／またはステビオシドとrebAの混合物を含むステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、ならびに項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、スクロース、スクロースシンターゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

40

(項目102)

レバウジオシドMを産生する方法であって、ステビオシド基質、NDP、スクロース、少なくとも1つのスクロースシンターゼ、および項目1から45に記載の少なくとも1つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼを提供するステップ、前記ステビオシド基質、NDP、およびグリコシルトランスフェラーゼを、レバウジオシドAが先ず産生され、次いでレバウジオシドDおよび／またはレバウジオシドIが産生され、最後にレバウジオシドMが産生されるような条件下で組み合わせるステップを含む、方法。

50

(項目 1 0 3)

前記スクロースシンターゼが、項目 5 9 から 7 6 のいずれかで提供される操作されたスクロースシンターゼである、項目 9 8 から 1 0 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 0 4)

ワンポット反応として行われる、項目 8 6 から 1 0 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 0 5)

逐次的に行われる、項目 8 6 から 1 0 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 0 6)

前記方法の前記ステップを反復するステップをさらに含む、項目 8 6 から 1 0 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 0 7)

前記スクロースが、反復されるステップを通して再利用される、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

前記操作されたグリコシルトランスフェラーゼおよび／または他の反応成分が、再利用される、項目 1 0 6 および／または 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 9)

前記ステビオシド基質が、*Stevia rebaudiana* から抽出される、項目 8 6 から 1 0 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 0)

前記ステビオシド基質が、合成により産生される、項目 8 6 から 1 0 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 1)

前記グリコシルトランスフェラーゼおよび／または前記スクロースシンターゼが、固定化されている、項目 8 6 から 1 1 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 2)

フルクトースを含む反応産物を産生する、項目 8 6 から 1 1 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記フルクトースが、前記反応産物から除去される、項目 1 1 2 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

洗浄ステップをさらに含む、項目 8 6 から 1 1 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 5)

少なくとも 1 つのカラムクロマトグラフィーステップをさらに含む、項目 8 6 から 1 1 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 6)

前記少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、項目 2 6 から 4 5 のいずれかに記載のグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼである、項目 8 6 から 1 1 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 7)

前記少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、項目 1 から 2 5 のいずれかに記載のグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼである、項目 8 6 から 1 1 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 8)

前記少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、項目 2 6 から 4 5 のいずれかに記載のグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター 1, 2-グリコシルトランスフェラーゼであり、少なくとも 1 つの操作されたグリコシルトランスフェラーゼが、項目 1 から 2 5 のいずれかに記載のグリコシルトランスフェラーゼから選択されるベクター 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼであることをさらに含む、項目 8 6 から 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 1 9)

10

20

30

40

50

項目 5 9 から 7 6 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの操作されたスクロースシンターゼをさらに含む、項目 8 6 から 1 1 8 に記載の方法。

(項目 1 2 0)

項目 8 6 から 1 1 9 のいずれかに記載の方法に従って産生される、少なくとも 1 つのレバウジオシド。

(項目 1 2 1)

項目 1 2 0 に記載のレバウジオシドを含む、組成物。

(項目 1 2 2)

項目 8 6 から 8 9、9 2 から 9 5、9 8、および／または 1 0 1 から 1 2 1 のいずれかに記載の方法に従って産生される、レバウジオシド M。

(項目 1 2 3)

項目 1 2 2 に記載のレバウジオシド M を含む、組成物。

(項目 1 2 4)

項目 8 6 から 9 4、9 6、9 9、および／または 1 0 1 から 1 2 1 のいずれかに記載の方法に従って産生される、レバウジオシド A。

(項目 1 2 5)

項目 1 2 4 に記載のレバウジオシド A を含む、組成物。

(項目 1 2 6)

項目 8 6 から 9 4、9 6、9 9、および／または 1 0 1 から 1 2 1 のいずれかに記載の方法に従って産生される、レバウジオシド I。

(項目 1 2 7)

項目 1 2 6 に記載のレバウジオシド I を含む、組成物。

(項目 1 2 8)

項目 8 6 から 9 4、9 7、および／または 1 0 0 から 1 2 1 のいずれかに記載の方法に従って産生される、レバウジオシド D。

(項目 1 2 9)

項目 1 2 8 に記載のレバウジオシド D を含む、組成物。

(項目 1 3 0)

項目 1 2 2、1 2 4、1 2 6 および／または 1 2 8 で提供される少なくとも 2 つのレバウジオシドを含む、組成物。

(項目 1 3 1)

項目 1 2 3、1 2 5、1 2 7 および／または 1 2 9 で提供される少なくとも 2 つの組成物の混合物を含む、組成物。

10

20

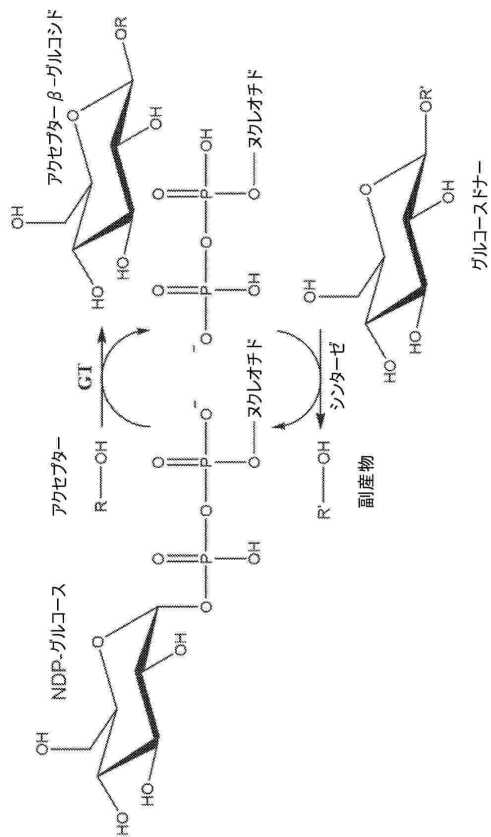
30

40

50

【図面】

【図 1】



【図 2】

FIG. 1

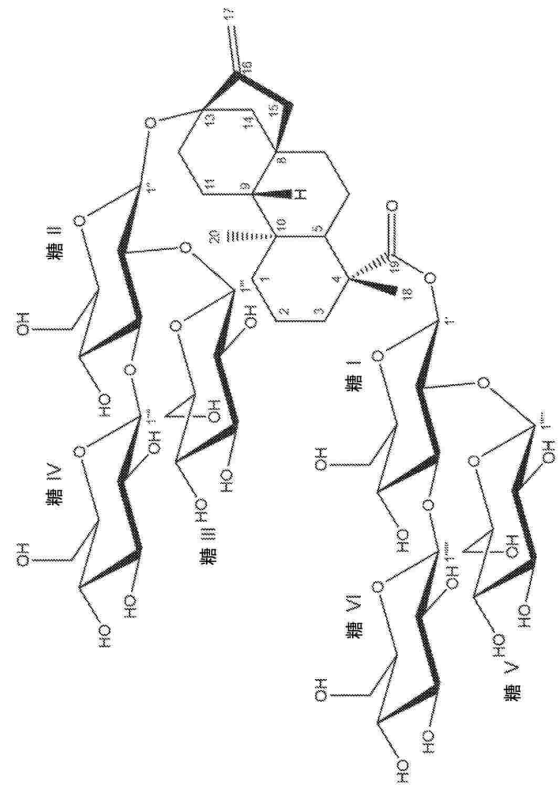


FIG. 2

【図 3】

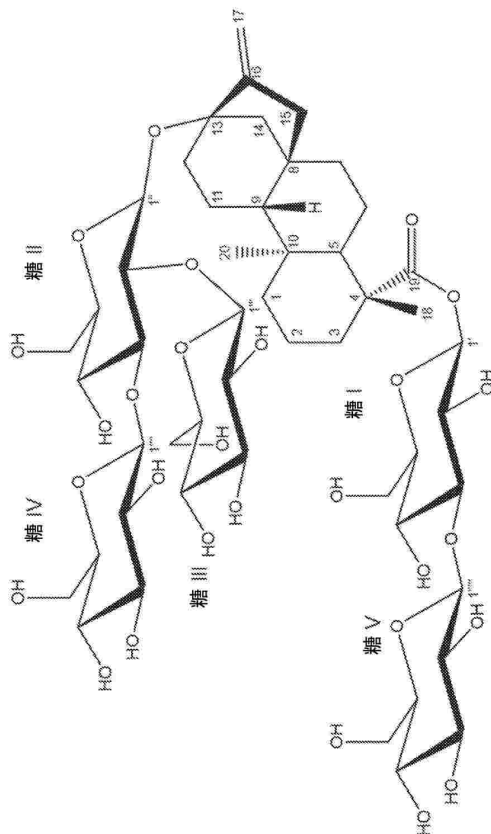


FIG. 3

10

20

30

40

50

【配列表】
0007584401000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	19/56 (2006.01)	C 1 2 P	19/56
C 1 2 N	11/00 (2006.01)	C 1 2 N	11/00

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ブルーム, ジョナサン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

(72)発明者 ガラニー, ステファニー スー

アメリカ合衆国 テネシー 3 7 9 3 2, ノックスビル, スナイダー リッジ レーン 1 1 6 4

(72)発明者 リャン, ジャック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

(72)発明者 リウ, ジョイス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

(72)発明者 デラス, ニッキ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

(72)発明者 メイヨー, メリッサ アン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

(72)発明者 エントウィッスル, デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 2 0 0

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 8 3 2 4 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 0 7 4 8 4 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 5 4 5 3 4 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q