(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-509415
(P2005-509415A)
(43)公表日　平成17年4月14日(2005.4.14)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A01N 63/00	A01N	63/00	A	4B050
C07K 16/40	A01N	63/00	D	4B064
C12N 1/15	C07K	16/40		4B065
C12N 1/19	C12N	1/15		4H011

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 62 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-540199 (P2003-540199)
(86)(22)出願日　平成14年10月30日 (2002.10.30)
(85)翻訳文提出日　平成16年4月26日 (2004.4.26)
(86)国際出願番号　PCT/GB2002/004916
(87)国際公開番号　WO2003/037918
(87)国際公開日　平成15年5月8日 (2003.5.8)
(31)優先権主張番号　0126164.3
(32)優先日　平成13年10月31日 (2001.10.31)
(33)優先権主張国　英国 (GB)
(31)優先権主張番号　60/343,485
(32)優先日　平成13年12月21日 (2001.12.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　397060588
ダニスコ　エイ／エス
デンマーク国　コペンハーゲン　ケイ　ディーケイ－１００１，ピー．オー．ボックス　１７，ランゲブロガード　１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　モーガン，　アンドリュー　ジョン
デンマーク国　ヴェドベク　ディーケイー　２９５０，　フレデンスヴェイ　１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水酵素

(57)【要約】
本発明は、ピラノゾン脱水素酵素に関する配列情報を開示する。本発明は、さらに、ＡＦのＡＰＰおよびミクロセシンへの転換およびグルコースのコルタルセロンへの転換におけるピラノゾン脱水素酵素の使用に関する。本願は、配列番号１のポリペプチドを含み、このポリペプチドは、以下：（ｉ）配列番号１のヌクレオチド配列またはその相補体を含むポリヌクレオチド；（ｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド；（ｉｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；および（ｉｖ）配列番号１のポリヌクレオチドに対する遺伝コードの結果として縮重するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、から選択される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下：
【化１】
(i) KPHCEPEQPAALPLFQPQLVQGGRPDXYWVEAFPFRSDSSK または
KPHXEPEQPAALPLFQPQLVV(Q)GGRPDXY;
(ii) SDIQMFVNPYATTNNQSSXWTPVSLAKLDFPVAMHYADITK;
(iii) VSWLENPGELR;
(iv) DGVDCLWYDGAR;
(v) PAGSPTGIVRAEWTRHVLDVFGXLXXK;
(vi) HTGSIHQVVCADIDGDGEDEFLVAMMGADPPDFQRTGVWCYK;
(vii) TEMEFLDVAGK;
(viii) KLTLVVLPPFARLDVERNVSGVK;
(ix) SMDELVAHNLFPAYVPDSVR;
(x) NDATDGTPVLALLDLDGGPSPQAWNISHVPPGTDMYEIAHAK;
(xi) TGSLVCARWPPVK;
(xii) NQRVAGTHSPAAMGLTSRWAVTK;
(xiii) GQITFRLPEAPDHGPLFLSVSAIRHQ;

から選択される少なくとも１つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド、またはその変異体、ホモログ、もしくは誘導体であって、ここで、Ｘは未知のアミノ酸残基である、単離されたポリペプチド。
【請求項２】
請求項１から選択される少なくとも１つの配列を含む、請求項１記載のポリペプチド。
【請求項３】
ピラノゾン（ｐｙｒａｎｏｓｏｎｅ）脱水酵素活性を有する、請求項１または請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
請求項１～請求項３のいずれか１項に記載の精製されたポリペプチドに対して惹起される抗体に免疫反応性である、ポリペプチド。
【請求項５】
請求項１～請求項４のいずれか１項に記載のポリペプチド、またはその変異体、ホモログ、フラグメント、もしくは誘導体をコードする、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項６】
以下：
（ｉ）配列番号１のヌクレオチド配列またはその相補体を含むポリヌクレオチド；
（ｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド；
（ｉｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；および
（ｉｖ）配列番号１のポリヌクレオチドに対する遺伝コードの結果として縮重するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、
から選択される、請求項５記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項７】
前記ヌクレオチド配列は、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ、Ｐｏｌｙｐｏｒｕｓ ｏｂｔｕｓｕｓ、またはＣｏｒｔｉｃｉｕｍ ｃａｅｒｕｌｅｕｍ

から得られ得る、請求項５、請求項６、または請求項７のいずれか１項記載のヌクレオチド配列。
【請求項８】
前記ヌクレオチド配列は、Ｐｅｚｉｚａｌｅｓ目、Ａｕｒｉｃｕｌａｒｉａｌｅｓ目、Ａｐｈｙｌｌｏｐｈｏｒａｌｅｓ目、Ａｇａｒｉｃａｌｅｓ目、またはＧｒａｃｉｌａｒｉａｌｅｓ目から得られ得る、請求項５、請求項６、または請求項７のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列。
【請求項９】
前記ヌクレオチド配列は、Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ、Ｐｅｚｉｚａ ｂａｄｉａ、Ｐ．ｓｕｃｃｏｓａ、Ｓａｒｃｏｐｈａｅｒａ ｅｘｉｍｉａ、Ｍｏｒｃｈｅｌｌａ ｃｏｎｉｃａ、Ｍ．ｃｏｓｔａｔａ、Ｍ．ｅｌａｔａ、Ｍ．ｅｓｃｕｌｅｎｔａ、Ｍ．ｅｓｃｕｌｅｎｔａ ｖａｒ．ｒｏｔｕｎｄａ、Ｍ．ｈｏｒｔｅｎｓｉｓ、Ｇｙｒｏｍｉｔｒａ ｉｎｆｕｌａ、Ａｕｒｉｃｕｌａｒｉａ ｍｅｓｅｎｔｅｒｉｃａ、Ｐｕｌｃｈｅｒｒｉｃｉｕｍ ｃａｅｒｕｌｅｕｍ、Ｐｅｎｉｏｐｈｏｒａ ｑｕｅｒｃｉｎａ、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｓｏｒｄｉｄａ、Ｖｕｉｌｌｅｍｉｎｉａ ｃｏｍｅｄｅｎｓ、Ｓｔｅｒｅｕｍ ｇａｕｓａｐａｔｕｍ、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｎｏｌｅｎｔｕｍ、Ｌｏｐｈａｒｉａ ｓｐａｄｉｃｅａ、Ｓｐａｒａｓｓｉｓ ｌａｍｉｎｏｓａ、Ｂｏｌｅｔｏｌｐｓｉｓ ｓｕｂｓｑｕａｍｏｓａ、Ｂｊｅｒｋａｎｄｅｒａ ａｄｕｓｔａ、Ｔｒｉｃｈａｐｔｕｍ ｂｉｆｏｒｍｉｓ、Ｃｅｒｒｅｎａ ｕｎｉｃｏｌｏｒ、Ｐｙｃｎｏｐｏｒｕｓ ｃｉｎｎａｂａｒｉｎｕｓ、Ｐ．ｓａｎｇｕｉｎｅｕｓ、Ｊｕｎｇｈｕｎｉａ ｎｉｔｉｄａ、Ｒａｍａｒｉａ ｆｌａｖａ、Ｃｌａｖｕｌｉｎｏｐｓｉｓ ｈｅｌｖｏｌａ、Ｃ．ｈｅｌｖｏｌａ ｖａｒ．ｇｅｏｇｌｏｓｓｏｉｄｅｓ、Ｖ．ｐｕｌｃｈｒａ、Ｃｌｉｔｏｃｙｂｅ ｃｙａｔｈｉｆｏｒｍｉｓ、Ｃ．ｄｉｃｏｌｏｒ、Ｃ．ｇｉｂｂａ、Ｃ．ｏｄｏｒａ、Ｌｅｐｉｓｔａ ｃａｅｓｐｉｔｏｓａ、Ｌ．ｉｎｖｅｒｓａ、Ｌ．ｌｕｓｃｉｎａ、Ｌ．ｎｅｂｕｌａｒｉｓ、Ｍｙｃｅｎａ ｓｅｙｎｉｉ、Ｐｌｅｕｒｏｃｙｂｅｌｌａ ｐｏｒｒｉｇｅｎｓ、Ｍａｒａｓｍｉｕｓ ｏｒｅａｌｅｓ、Ｉｎｏｃｙｂｅ ｐｙｒｉｏｄｏｒａ、Ｇｒａｃｉｌａｒｉａ ｖａｒｒｕｃｏｓａ、Ｇｒａｃｉｌａｒｉａ ｔｅｎｕｉｓｔｉｐｉｔａｔａ、Ｇｒａｃｉｌａｒｉｏｐｓｉｓ ｓｐ．、またはＧｒａｃｉｌａｒｉｏｐｓｉｓ ｌｅｍａｎｅｉｆｏｒｍｉｓから得られ得る、請求項５、請求項６、または請求項７のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列。
【請求項１０】
以下：
（ｉ）配列番号１のヌクレオチド配列またはその相補体を含むポリヌクレオチド；
（ｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド；
（ｉｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；および
（ｉｖ）配列番号１のポリヌクレオチドに対する遺伝コードの結果として縮重するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、
から選択される単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１１】
請求項５～請求項１０のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列を含む、構築物。
【請求項１２】
請求項５～請求項１０のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列を含む、ベクター。
【請求項１３】
宿主細胞中での前記ポリヌクレオチドの発現を指示することができる調節配列に作動可能に連結した請求項５～請求項１０のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。
【請求項１４】
請求項５～請求項１０のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列が組み込まれた、宿主細

胞。
【請求項１５】
配列番号１のポリヌクレオチド配列、またはその変異体、ホモログ、フラグメント、もしくは誘導体によってコードされる単離されたポリペプチド。
【請求項１６】
７個までのアミノ酸がＮ末端から除去されている、請求項１５に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項１７】
配列番号１によってコードされるポリペプチド配列と少なくとも７５％の同一性を有する、請求項１５または請求項１６に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項１８】
請求項１～請求項４または請求項１５～請求項１７のいずれか１項に記載のポリペプチドに結合し得る抗体。
【請求項１９】
請求項５～請求項１０のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列を発現する工程、ならびに必要に応じて、該ヌクレオチド配列を単離および／または精製する工程を包含する、請求項１～請求項４または請求項１５～請求項１７のいずれか１項に記載のポリペプチドを調製するプロセス。
【請求項２０】
請求項１～請求項４または請求項１５～請求項１７のいずれか１項に記載のポリペプチドを使用する、ミクロセシン（ｍｉｃｒｏｔｈｅｃｉｎ）を調製するためのプロセス。
【請求項２１】
請求項１～請求項４または請求項１５～請求項１７のいずれか１項記載のポリペプチドを使用する、アスコピロン（ａｓｃｏｐｙｒｏｎｅ）Ｐを調製するためのプロセス。
【請求項２２】
前記ポリペプチドと、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する、請求項２０または請求項２１に記載のプロセス。
【請求項２３】
アスコピロンＰの調製におけるＡＰＰシンターゼの使用をさらに包含する、請求項２１記載のプロセス。
【請求項２４】
ＡＰＰシンターゼおよび前記ポリペプチドと、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する、請求項２３記載のプロセス。
【請求項２５】
前記ポリペプチドと、グルカンリアーゼおよびデキストリンデンプンとを接触させる工程を包含する、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２６】
請求項１～請求項４または請求項１５～請求項１７のいずれか１項に記載のポリペプチドを使用する、コルタルセロン（ｃｏｒｔａｌｃｅｒｏｎｅ）を調製するプロセス。
【請求項２７】
前記ポリペプチドとグルコソン（ｇｌｕｃｏｓｏｎｅ）とを反応させる工程を包含する、請求項２６に記載のプロセス。
【請求項２８】
前記ポリペプチドと、グルコースおよびピラノース２－オキシダーゼとを反応させる工程を包含する、請求項２６に記載のプロセス。
【請求項２９】
ピラノゾン脱水酵素と、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する、ミクロセシンを調製するためのプロセス。
【請求項３０】
ピラノゾン脱水酵素と、グルコースおよびデキストリンデンプンとを反応させる工程を包

含する、ミクロセシンを調製するためのプロセス。
【請求項３１】
ピラノゾン脱水酵素およびＡＰＰシンターゼと、１，５－アヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する、アスコピロンＰを調製するためのプロセス。
【請求項３２】
ピラノゾン脱水酵素と、グルコソンを反応させる工程を包含する、コルタルセロンを調製するためのプロセス。
【請求項３３】
ピラノゾン脱水酵素と、グルコソンおよびピラノース２－オキシダーゼとを反応させる工程を包含する、コルタルセロンを調製するためのプロセス。
【請求項３４】
病原体Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓの増殖の阻止および／または阻害、および／または死滅におけるミクロセシン、コルタルセロン（ｃｏｒｔａｌｃｅｒｏｎｅ）、またはその誘導体もしくは異性体の使用。
【請求項３５】
前記病原体は、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ　ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓである、請求項３４記載の使用。
【請求項３６】
前記ミクロセシンの誘導体は、２－フリル－ヒドロキシメチル－ケトンまたは４－デオキシ－グリセロ－ヘキソ－２，３－ジルオースである、請求項３４または請求項３５に記載の使用。
【請求項３７】
前記コルタルセロンの誘導体は、２－フリルグリオキサールである、請求項３４または請求項３５記載の使用。
【請求項３８】
植物または植物の種子の処置における、請求項３４～請求項３７のいずれか１項に記載の使用。
【請求項３９】
植物または種子の保護剤としての、ミクロセシン、コルタルセロン、またはその誘導体もしくは異性体の使用。
【請求項４０】
サトウダイコンの種子の処置における、請求項３４～請求項３９のいずれか１項に記載の使用。
【請求項４１】
実質的に本明細書に記載され、添付の実施例に関連するピラノゾン脱水酵素活性を有する酵素。
【請求項４２】
実質的に本明細書に記載され、添付の実施例に関連するピラノゾン脱水酵素活性を有する酵素をコードするヌクレオチド配列。
【請求項４３】
実質的に本明細書に記載され、添付の実施例に関連するアスコピロンＰを調製するためのプロセス。
【請求項４４】
実質的に本明細書に記載され、添付の実施例に関連するミクロセシンを調製するためのプロセス。
【請求項４５】
実質的に本明細書に記載され、添付の実施例に関連するコルタルセロンを調製するためのプロセス。
【請求項４６】
実質的に本明細書に記載され、添付の実施例に関連する病原体Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓの

成長を阻止および／または阻害し、かつ／または該病原体Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓを死滅させるための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（発明の分野）

本発明は、配列に関する。詳細には、本発明は、ピラノゾン脱水酵素のアミノ酸配列およびこれをコードする核酸配列に関する。

【背景技術】

【０００２】

（技術背景および先行技術）

グルコースを、ピラノース２－オキシダーゼ（ＥＣ１．１．３．１０、Ｐ２Ｏ）で酸化してグルコソン（Ｄ－アラビノ－ヘキソス－２－ウロース）を形成し、次いでピラノゾン脱水酵素（ＰＤ）によってコルタルセロンに転換することができることが文献で十分に報告されている（Ｋｏｔｈｓ，Ｋ．；Ｈａｌｅｎｂｅｃｋ，Ｒ．；Ｍｏｒｅｌａｎｄ，Ｍ．，１９９２，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．Ｖｏｌ．２３２Ｎｏ．１，ＰＰ．５９－７５；Ｇａｂｒｉｅｌ，Ｊ．；Ｖｏｌｃ，Ｊ；Ｓｅｄｍｅｒａ，Ｐ；Ｄａｎｉｅｌ，Ｇ．；Ｋｕｂａｔｏｖａ，Ｅ．，１９９３，Ａｒｃｈ．Ｍｉｃｒｏｂｉ．，１６０：２７－３４）。Ｐ２ＯおよびＰＤは共に真菌から精製されており、Ｐ２Ｏがクローニングされている。ＰＤは、Ｋｏｔｈｓら（１９９２）によってＰｏｌｙｐｏｒｕｓ　ｏｂｔｕｓｕｓから、およびＧａｂｒｉｅｌら（１９９３）によってＰｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍから精製されている。しかし、現在まで、ＰＤのアミノ酸配列もヌクレオチド配列も特徴付けられていない。

【０００３】

デンプンを１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトース（ＡＦ）に転換することができることが当該技術分野で確立されている（Ｓ．Ｙｕ　ａｎｄ　Ｊ．Ｍａｒｃｕｓｓｅｎ，Ｒｅｃｅｎｔ　Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ；Ｇｉｌｂｅｒｔ，Ｈ．Ｊ．；Ｄａｖｉｅｓ，Ｇ．Ｊ．；Ｈｅｎｒｉｓｓａｔ　Ｂ．；Ｓｖｅｎｓｓｏｎ，Ｂ．，Ｅｄｓ．；Ｒｏｙａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｏｆ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（ＲＳ．Ｃ）Ｐｒｅｓｓ，１９９９，２４２－２５０）。いくつかの真菌および紅藻抽出物がおそらく酵素によりＡＦをミクロセシンに転換することができることがさらに示されたが、関連する酵素は単離も、精製も、特徴付けもされていない（Ｂａｕｔｅ，Ｍ－Ａ．；Ｄｅｆｆｉｅｕｘ，Ｇ．；Ｂａｕｔｅ，Ｒ．，１９８６，Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｏｘｆ）ｖｏｌ．２５：１４７２－１４７３；Ｂｒｏｂｅｒｇ，Ａ．，Ｋｅｎｎｅ，Ｌ．，ａｎｄ　Ｐｅｄｅｒｓｅｎ，Ｍ．（１９９６）Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｏｘｆ），４１：１５１－１５４）。現在まで、ＰＤが、ＡＦのミクロセシンへの転換において役割を果たし得ることは示唆されていない。

【０００４】

ＡＦからアスコピロンＰ（ＡＰＰ）を生成することができることも報告されている（Ｂａｕｔｅ，Ｍ－Ａ．；Ｄｅｆｆｉｅｕｘ，Ｇ．；Ｖｅｒｃａｕｔｅｒｅｎ，Ｊ．；Ｂａｕｔｅ，Ｒ．；Ｂａｄｏｃ，Ａ．，１９９３，Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｏｘｆ）ｖｏｌ．３３ｎｏ．１，４１－４５）。同様に、このプロセスにおけるＰＤの関与を示唆する証拠は存在しなかった。

【０００５】

（発明の要旨）

広範な局面では、本発明は、ピラノゾン脱水酵素をコードするアミノ酸配列およびヌクレオチド配列の特徴付けに関する。

【０００６】

本発明のさらなる局面は、ＡＦのミクロセシンおよびＡＰＰへの転換およびグルコソンのコルタルセロンへの転換を含む、ピラノゾン脱水酵素の以前に開示されていない使用に関する。

【０００７】

本発明の局面を、特許請求の範囲および以下の解説で示す。

【０００８】

簡単に述べれば、本発明のいくつかの局面は、以下に関する。

１．新規のアミノ酸配列
２．新規のヌクレオチド配列
３．上記アミノ酸配列を調製する方法
４．上記ヌクレオチドの配列を調製する方法
５．上記ヌクレオチド配列を含む発現系
６．上記ヌクレオチド配列を発現させる方法
７．上記ヌクレオチド配列を含む形質転換宿主／宿主細胞
８．上記アミノ酸配列の使用
９．上記ヌクレオチド配列の使用。

【０００９】

本発明に関して使用される、用語「発現」、「発現する」、「発現された」、および「発現可能な」は、各用語「転写」、「転写する」、「転写された」、および「転写可能な」と同義である。

【００１０】

本発明のヌクレオチド配列に関する他の局面には、以下が含まれる：本発明の配列を含む構築物；本発明の配列を含むベクター；本発明の配列を含むプラスミド；本発明の配列を含む形質転換細胞；本発明の配列を含む形質転換組織；本発明の配列を含む形質転換器官；本発明の配列を含む形質転換宿主；本発明の配列を含む形質転換生物。本発明はまた、本発明の配列を移入する方法を含む、宿主植物細胞における発現などの本発明の配列を使用したヌクレオチド配列を発現させる方法を含む。

【００１１】

参照を容易にするために、本発明のこれらおよびさらなる局面を、ここでは適切な見出しをつけた節によって考察する。しかし、各節の教示は、必ずしもそれぞれの特定の節に限定されない。

【００１２】

（発明の詳細な開示）

本発明の１つの局面は、以下：

【００１３】

【化２】

(i) KPHCEPEQPAALPLFQPQLVQGGRPDXYWVEAFPFRSDSSK;

(ii) SDIQMFVNPYATTNNQSSXWTPVSLAKLDFPVAMHYADITK;

(iii) VSWLENPGELR;

(iv) DGVDCLWYDGAR;

(v) PAGSPTGIVRAEWTRHVLDVFGXLXXK;

(vi) HTGSIHQVVCADIDGDGEDEFLVAMMGADPPDFQRTGVWCYK;

(vii) TEMEFLDVAGK;

(viii) KLTLVVLPPFARLDVERNVSGVK;

(ix) SMDELVAHNLFPAYVPDSVR;

(x) NDATDGTPVLALLDLDGGPSPQAWNISHVPPGTDMYEIAHAK;

(xi) TGSLVCARWPPVK;

(xii) NQRVAGTHSPAAMGLTSRWAVTK;

(xiii) GQITFRLPEAPDHGPLFLSVSAIRHQ;

(xiv) KPHXEPEQPAALPLFQPQLVV(Q)GGRPDXY;

から選択される少なくとも１つのアミノ酸配列（ここで、Ｘは未知のアミノ酸残基である）を含む、単離ポリペプチド、またはその変異体、ホモログ、もしくは誘導体に関する。

【００１４】

なおさらなる局面では、本発明は、以下から選択されるヌクレオチド配列に関する：

（ａ）上記アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

（ｂ）（ａ）のヌクレオチド配列の変異体、ホモログ、誘導体、またはフラグメントであるヌクレオチド配列；

（ｃ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補体であるヌクレオチド配列；

（ｄ）（ａ）のヌクレオチド配列の変異体、ホモログ、誘導体、またはフラグメントの相補体であるヌクレオチド配列；

（ｅ）（ａ）のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列；

（ｆ）（ａ）のヌクレオチド配列の変異体、ホモログ、誘導体、またはフラグメントとハイブリダイズし得るヌクレオチド配列；

（ｇ）（ａ）のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列の相補体であるヌクレオチド配列；

（ｈ）（ａ）のヌクレオチド配列の変異体、ホモログ、誘導体、またはフラグメントとハイブリダイズし得るヌクレオチド配列の相補体であるヌクレオチド配列；

（ｉ）（ａ）のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列；

（ｊ）（ａ）のヌクレオチド配列の変異体、ホモログ、誘導体、またはフラグメントの相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列；

（ｋ）（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）、（ｉ）、および／または（ｊ）のいずれか１つを含むヌクレオチド配列。

【００１５】

本発明の別の局面には、本発明の単離されたヌクレオチド配列が含まれる。

【００１６】

（好ましい局面）

好ましい１つの実施形態では、本発明は、以下の（ｉ）～（ｘｉｉｉ）：

【００１７】

【化３】

(i) KPHCEPEQPAALPLFQPQLVQGGRPDXYWVEAFPFRSDSSK または
KPHXEPEQPAALPLFQPQLVV(Q)GGRPDXY;

(ii) SDIQMFVNPYATTNNQSSXWTPVSLAKLDFPVAMHYADITK;

(iii) VSWLENPGELR;

(iv) DGVDCLWYDGAR;

(v) PAGSPTGIVRAEWTRHVLDVFGXLXXK;

(vi) HTGSIHQVVCADIDGDGEDEFLVAMMGADPPDFQRTGVWCYK;

(vii) TEMEFLDVAGK;

(viii) KLTLVVLPPFARLDVERNVSGVK;

(ix) SMDELVAHNLFPAYVPDSVR;

(x) NDATDGTPVLALLDLDGGPSPQAWNISHVPPGTDMYEIAHAK;

(xi) TGSLVCARWPPVK;

(xii) NQRVAGTHSPAAMGLTSRWAVTK;

(xiii) GQITFRLPEAPDHGPLFLSVSAIRHQ;

から選択される少なくとも１つのアミノ酸配列（ここで、Ｘは未知のアミノ酸残基である）を含む、単離ポリペプチド、またはその変異体、ホモログ、もしくは誘導体に関する。

【００１８】

１つの好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される１つの配列を含む。

【００１９】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される２つの配列を含む。

【００２０】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される３つの配列を含む。

【００２１】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される４つの配列を含む。

【００２２】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される５つの配列を含む。

【００２３】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される６つの配列を含む。

【００２４】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される７つの配列を含む。

【００２５】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される８つの配列を含む。

【００２６】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される９つの配列を含む。

【００２７】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される１０の配列を含む。

【００２８】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される１１の配列を含む。

【００２９】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される１２の配列を含む。

【００３０】

別の好ましい実施形態では、上記ポリペプチドは、上記配列（ｉ）～（ｘｉｉｉ）から選択される１３の配列を含む。

【００３１】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、ピラノゾン脱水酵素活性を有する。

【００３２】

１つの好ましい実施形態は、本発明の精製されたアミノ酸配列に対して惹起される抗体に免疫反応を示すポリペプチドに関する。

【００３３】

別の局面は、本発明のポリペプチド、またはその変異体、ホモログ、フラグメント、もしくは誘導体をコードする単離されたポリヌクレオチド配列に関する。

【００３４】

好ましくは、単離ポリヌクレオチドは、以下；

（ｉ）配列番号１のヌクレオチド配列またはその相補体を含むポリヌクレオチド；

（ｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド；

（ｉｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；および

（ｉｖ）配列番号１のポリヌクレオチドに対する遺伝コードの結果として縮重するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

から選択される。

【００３５】

好ましくは、ヌクレオチド配列は、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ、Ｐｏｌｙｐｏｒｕｓ ｏｂｔｕｓｕｓ、またはＣｏｒｔｉｃｉｕｍ ｃａｅｒｕｌｅｕｍから得ることができる。

【００３６】

１つの好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、Ｐｅｚｉｚａｌｅｓ目、より好ましくは、Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ、Ｐｅｚｉｚａ ｂａｄｉａ、Ｐ．ｓｕｃｃｏｓａ、Ｓａｒｃｏｐｈａｅｒａ ｅｘｉｍｉａ、Ｍｏｒｃｈｅｌｌａ ｃｏｎｉｃａ、Ｍ．ｃｏｓｔａｔａ、Ｍ．ｅｌａｔａ、Ｍ．ｅｓｃｕｌｅｎｔａ、Ｍ．ｅｓｃｕｌｅｎｔａ ｖａｒ．ｒｏｔｕｎｄａ、Ｍ．ｈｏｒｔｅｎｓｉｓ、またはＧｙｒｏｍｉｔｒａ ｉｎｆｕｌａから得ることができる。

【００３７】

別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、Ａｕｒｉｃｕｌａｒｉａｌｅｓ、より好ましくはＡｕｒｉｃｕｌａｒｉａ ｍｅｓｅｎｔｅｒｉｃａから得ることができる。

【００３８】

別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、Ａｐｈｙｌｌｏｐｈｏｒａｌｅｓ目、より好ましくは、Ｐｕｌｃｈｅｒｒｉｃｉｕｍ ｃａｅｒｕｌｅｕｍ、Ｐｅｎｉｏｐｈｏｒａ ｑｕｅｒｃｉｎａ、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｓｏｒｄｉｄａ、Ｖｕｉｌｌｅｍｉｎｉａ ｃｏｍｅｄｅｎｓ、Ｓｔｅｒｅｕｍ ｇａｕｓａｐａｔｕｍ、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｎｏｌｅｎｔｕｍ、Ｌｏｐｈａｒｉａ ｓｐａｄｉｃｅａ、Ｓｐａｒａｓｓｉｓ ｌａｍｉｎｏｓａ、Ｂｏｌｅｔｏｐｓｉｓ ｓｕｂｑｕａｍｏｓａ、Ｂｊｅｒｋａｎｄｅ

ｒａ ａｄｕｓｔａ、Ｔｒｉｃｈａｐｔｕｍ ｂｉｆｏｒｍｉｓ、Ｃｅｒｒｅｎａ ｕｎｉｃｏｌｏｒ、Ｐｙｃｎｏｐｏｒｕｓ ｃｉｎｎａｂａｒｉｎｕｓ、Ｐ．ｓａｎｇｕｉｎｅｕｓ、Ｊｕｎｇｈｕｎｉａ ｎｉｔｉｄａ、Ｒａｍａｒｉａ ｆｌａｖａ、Ｃｌａｖｕｌｉｎｏｐｓｉｓ ｈｅｌｖｏｌａ、Ｃ．ｈｅｌｖｏｌａ ｖａｒ．ｇｅｏｇｌｏｓｓｏｉｄｅｓ、またはＶ．ｐｕｌｃｈｒａから得ることができる。

【００３９】

別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、Ａｇａｒｉｃａｌｅｓ目、より好ましくは、Ｃｌｉｔｏｃｙｂｅ ｃｙａｔｈｉｆｏｒｍｉｓ、Ｃ．ｄｉｃｏｌｏｒ、Ｃ．ｇｉｂｂａ、Ｃ．ｏｄｏｒａ、Ｌｅｐｉｓｔａ ｃａｅｓｐｉｔｏｓａ、Ｌ．ｉｎｖｅｒｓａ、Ｌ．ｌｕｓｃｉｎａ、Ｌ．ｎｅｂｕｌａｒｉｓ、Ｍｙｃｅｎａ ｓｅｙｎｉｉ、Ｐｌｅｕｒｏｃｙｂｅｌｌａ ｐｏｒｒｉｇｅｎｓ、Ｍａｒａｓｍｉｕｓ ｏｒｅａｌｅｓ、またはＩｎｏｃｙｂｅ ｐｙｒｉｏｄｏｒａから得ることができる。

【００４０】

別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、Ｇｒａｃｉｌａｒｉａｌｅｓ目、より好ましくは、Ｇｒａｃｉｌａｒｉａ ｖａｒｒｕｃｏｓａ、Ｇｒａｃｉｌａｒｉａ ｔｅｎｕｉｓｔｉｐｉｔａｔａ、Ｇｒａｃｉｌａｒｉｏｐｓｉｓ ｓｐ．、またはＧｒａｃｉｌａｒｉｏｐｓｉｓ ｌｅｍａｎｅｉｆｏｒｍｉｓから得ることができる。

【００４１】

別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、Ｍｅｌａｎｏｓｐｏｒａｃｅａｅ目、より好ましくは、Ｍｅｌａｎｏｓｐｏｒａ ｏｒｎａｔａ、Ｍｉｃｒｏｔｈｅｃｉｕｍ ｃｏｍｐｒｅｓｓｕｍ、Ｍｉｃｒｏｔｈｅｃｉｕｍ ｓｏｂｅｌｉｉから得ることができる。

【００４２】

本発明の別の局面は、以下：

（ｉ）配列番号１のヌクレオチド配列またはその相補体を含むポリヌクレオチド；

（ｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド；

（ｉｉｉ）配列番号１のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；および

（ｉｖ）配列番号１のポリヌクレオチドに対する遺伝コードの結果として縮重するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

から選択される単離されたヌクレオチドに関する。

【００４３】

好ましくは、ヌクレオチド配列は、プロモーターに作動可能に連結されている。

【００４４】

本発明の別の局面は、上記ポリヌクレオチド配列を含む構築物に関する。

【００４５】

さらに別の局面は、上記ポリヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【００４６】

さらなる局面は、本発明のポリヌクレオチド配列が組み込まれた宿主細胞に関する。

【００４７】

別の局面は、宿主細胞中での上記ポリヌクレオチド発現を指示することができる調節配列に作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターに関する。

【００４８】

さらなる局面は、配列番号１のポリヌクレオチド配列、またはその変異体、ホモログ、フラグメント、もしくは誘導体によってコードされる単離ポリペプチドに関する。

【００４９】

好ましい実施形態では、単離ポリペプチドは、７個までのアミノ酸がＮ末端から除去されている。

【００５０】

より好ましくは、単離されたポリペプチドは、配列番号１によってコードされるポリペプチド配列と少なくとも７５％同一性を有する。

【００５１】

さらに別の局面は、本発明のポリペプチドに結合することができる抗体に関する。

【００５２】

別の局面は、本発明のヌクレオチド配列を発現すること、および任意に該ヌクレオチド配列を単離および／または精製する工程を包含する、本発明のアミノ酸配列を調製する方法に関する。好ましくは、本発明のヌクレオチド配列は、発現酵素の基質を含まない環境下（例えば、１，５－アンヒドロフルクトースが存在しない環境下）で発現される。

【００５３】

さらなる局面は、本発明のアミノ酸配列または本発明のヌクレオチド配列の発現産物を使用してミクロセシンを調製するプロセスに関する。

【００５４】

さらなる別の局面は、本発明のアミノ酸配列または本発明のヌクレオチド配列の発現産物を使用するアスコピロンＰを調製するプロセスに関する。

【００５５】

好ましくは、プロセスは、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列の上記発現産物と１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースを反応させる工程を包含する。

【００５６】

さらにより好ましくは、プロセスは、ＡＰＰシンターゼの使用をさらに含む。

【００５７】

特に好ましい局面では、プロセスは、ＡＰＰシンターゼおよび上記アミノ酸配列またはヌクレオチド配列の上記発現産物と１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する。

【００５８】

別の好ましい実施形態では、ミクロセシンを作製する上記プロセスは、本発明のポリペプチドと、グルカンリガーゼおよびデキストリンデンプンとを接触させる工程を包含する。

【００５９】

本発明のさらなる局面は、本発明のアミノ酸配列または本発明のヌクレオチド配列の発現産物を使用するミクロセシンを調製するプロセスに関する。

【００６０】

好ましくは、上記プロセスは、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列の発現産物と、グルコソンとを反応させる工程を包含する。

【００６１】

別の好ましい実施形態では、ミクロセシンを作製する上記プロセスは、本発明のポリペプチドと、グルコースおよびピラノース２－オキシダーゼとを反応させる工程を包含する。

【００６２】

本発明の別の局面は、ピラノゾン脱水酵素と、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する、ミクロセシンを調製するプロセスに関する。

【００６３】

本発明のさらに別の局面は、ピラノゾン脱水酵素およびＡＰＰシンターゼと、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースとを反応させる工程を包含する、アスコピロンＰを調製するプロセスに関する。

【００６４】

本発明の１つの局面は、ピラノゾン脱水酵素とグルコースおよびデキストリンデンプンを反応させる工程を包含する、ミクロセシンを調製するプロセスに関する。

【００６５】

本発明の別の局面は、ピラノゾン脱水酵素とグルコソンとを反応させる工程を包含する

、コルタルセロンを調製するプロセスに関する。

【００６６】

本発明のさらに別の局面は、ピラノゾン脱水酵素とグルコースおよびピラノース２－オキシダーゼを反応させる工程を包含する、コルタルセロンを調製するプロセスに関する。

【００６７】

本発明の別の局面は、物質中の微生物の増殖の阻止および／または阻害および／または死滅のためのミクロセシンの使用に関する。

【００６８】

本発明の別の局面は、物質中の微生物の増殖の阻止および／または阻害および／または死滅のためのコルタルセロンの使用に関する。

【００６９】

本発明はまた、物質中の微生物の増殖の阻止および／または阻害および／または死滅のための１つまたは複数のミクロセシン、コルタルセロン、またはその誘導体もしくは異性体の使用に関する。

【００７０】

好ましくは、物質は食品である。

【００７１】

好ましくは、コルタルセロンおよび／またはミクロセシンが活性を示す微生物は、植物真菌性病原体（ｐｌａｎｔ　ｆｕｎｇａｌ　ｐａｔｈｏｇｅｎ）である。

【００７２】

好ましくは、コルタルセロンおよび／またはミクロセシンが活性を示す微生物は、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ目、Ｐｙｔｈｉｕｍ目、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ目、およびＣｅｒｃｏｓｐｏｒａ目から選択される微生物から選択される。

【００７３】

好ましくは、コルタルセロンおよび／またはミクロセシンが活性を示す微生物は、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ　ｓｏｌａｎｉ、Ｐｙｔｈｉｕｍ　Ｕｌｔｉｍｕｍ、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ　ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓ、およびＣｅｒｃｏｓｐｏｒａ　ｂｅｔｉｃｏｌａから選択される微生物から選択される。

【００７４】

本発明のさらなる局面は、病原体Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓの増殖の阻止および／または阻害および／または死滅のためのミクロセシン、コルタルセロン、またはその誘導体もしくは異性体の使用に関する。

【００７５】

好ましくは、病原体は、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ　ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓである。

【００７６】

好ましい実施形態では、ミクロセシンの誘導体は、２－フリル－ヒドロキシメチル－ケトンまたは４－デオキシ－グリセロ－ヘキソ－２，３－ジルオースである。

【００７７】

好ましい実施形態では、コルタルセロン誘導体は、２－フリルグリオキサールである。

【００７８】

特に好ましい実施形態では、ミクロセシン、コルタルセロン、またはその誘導体もしくは異性体を、植物または植物種子の処置、さらにより好ましくは、サトウダイコン、エンドウマメ植物、またはエンドウマメ植物の種子の処置で使用する。

【００７９】

別の局面では、本発明は、植物または種子の保護剤としての、ミクロセシン、コルタルセロン、またはその誘導体もしくは異性体の使用に関する。

【００８０】

本発明のさらに別の局面は、植物成長調節因子としての、ミクロセシン、コルタルセロン、またはその誘導体もしくは異性体の使用に関する。

【００８１】

（利点）
本発明は、ピラノゾン脱水酵素に関して以前に開示されていないアミノ酸配列およびヌクレオチド配列の情報を提供する。
【００８２】
本発明は、さらに、ＡＦのＡＰＰおよびミクロセシンへの転換およびコルタルセロンの生成におけるピラノゾン脱水酵素の使用に関する。現在まで、ＰＤがこれらのいずれかの転換に関与するか、この転換をもたらすことができることは当該技術分野で教示も示唆もされていなかった。
【００８３】
従って、本発明は、ミクロセシン、ＡＰＰ、およびコルタルセロンの大規模生成を容易にすることができる。本発明は、さらに、ミクロセシンおよびコルタルセロンが抗菌薬、より詳細には食品における抗菌薬としての適用に有用であることを教示する。
【００８４】
（アッセイ）
以下のアッセイを使用して、本発明の実際および推定のアミノ酸配列を特徴付けおよび同定することができる。
【００８５】
（単離）
１つの局面では、配列は単離された形態であることが好ましい。用語「単離された」は、配列がその天然の環境下にない（すなわち、天然では見出されない）ことを意味する。典型的には、用語「単離された」は、配列が天然に会合し、天然に見出される少なくとも１つの他の構成要素（ｃｏｍｐｎｅｎｔ）を少なくとも実質的に含まないことを意味する。ここで、配列は、天然に会合した少なくとも１つの他の構成要素から分離され得る。
【００８６】
（精製）
１つの局面では、配列は精製された形態であることが好ましい。用語「精製された」はまた、配列がその天然の環境下にない（すなわち、天然では見出されない）ことを意味する。典型的には、用語「精製された」は、配列が天然に会合し、天然に見出される少なくとも１つの他の構成要素から少なくとも実質的に分離されていることを意味する。
【００８７】
（ヌクレオチド配列）
本発明は、本明細書中に定義される特定の性質を有する酵素をコードするヌクレオチド配列を含む。本明細書中で使用される、用語「ヌクレオチド配列」は、オリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列ならびにその変異体、ホモログ、フラグメント、および誘導体（その一部など）をいう。ヌクレオチド配列は、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかを示す二本鎖または一本鎖であり得る、ゲノム起源、合成起源、または組換え起源であり得る。
【００８８】
本発明に関する用語「ヌクレオチド配列」は、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡ、およびＲＮＡを含む。好ましくは、これは、ＤＮＡ、より好ましくは、本発明のコード配列のｃＤＮＡを意味する。
【００８９】
好ましい実施形態では、本発明のヌクレオチド配列自体は、天然の環境下にも存在するその天然に会合した配列に作動可能に連結した場合、天然の環境にある本発明の天然のヌクレオチド配列を包含しない。参照を簡単にするために、本発明者らは、この好ましい実施形態を、「非天然ヌクレオチド配列」と呼ぶ。これに関して、用語「天然のヌクレオチド配列」は、天然に会合するプロモーター全体に作動可能に連結し、プロモーターもまた天然の環境下に存在する場合、天然の環境下に存在するヌクレオチド配列全体を意味する。しかし、本発明のアミノ酸配列を、その天然の生物におけるヌクレオチド配列の発現後に単離および／または精製することができる。しかし、好ましくは、本発明のアミノ酸配

列を、天然の生物においてヌクレオチド配列によって発現することができるが、それは、このヌクレオチド配列は、その生物内で天然に会合するプロモーターの制御下にはない場合である。

【００９０】

典型的には、本発明のヌクレオチド配列を、組換えＤＮＡ技法（すなわち、組換えＤＮＡ）を使用して調製する。しかし、本発明の別の実施形態では、ヌクレオチド配列を、当該技術分野で周知の化学的方法を使用して全体的または部分的に合成することができる（Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ ＭＨ ｅｔ ａｌ （１９８０） Ｎｕｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ Ｓｙｍｐ Ｓｅｒ ２１５－２３３およびＨｏｒｎ Ｔ ｅｔ ａｌ （１９８０） Ｎｕｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ Ｓｙｍｐ Ｓｅｒ ２２５－２３２を参照のこと）。

【００９１】

（ヌクレオチド配列の調製）

本明細書中に定義される特定の性質を有する酵素または改変に適した酵素のいずれかをコードするヌクレオチド配列を、上記酵素を産生する任意の細胞または生物から同定および／または単離および／または精製することができる。ヌクレオチド配列の同定および／または単離および／または精製についての種々の方法は、当該技術分野で周知である。例として、一旦適切な配列が同定および／または単離および／または精製されると、多数の配列を調製するために、ＰＣＲ増幅技術を使用することができる。

【００９２】

さらなる例として、ゲノムＤＮＡおよび／またはｃＤＮＡライブラリーを、酵素を産生する生物由来の染色体ＤＮＡまたはメッセンジャーＤＮＡを使用して構築することができる。酵素のアミノ酸配列が既知である場合、標識オリゴヌクレオチドプローブを合成し、これを使用して生物から調製したゲノムライブラリー由来の酵素コードクローンを同定することができる。あるいは、別の既知の酵素遺伝子に対して相同な配列を含む標識オリゴヌクレオチドプローブを使用して、酵素コードクローンを同定することができる。後者の場合、低ストリンジェンシーのハイブリッド形成および洗浄条件を使用する。

【００９３】

あるいは、酵素コードクローンを、プラスミドなどの発現ベクターへゲノムＤＮＡフラグメントを挿入し、得られたゲノムＤＮＡライブラリーで酵素陰性細菌を形質転換し、その後、形質転換細菌を酵素の基質（すなわち、マルトース）を含む寒天へプレーティングし、それにより酵素発現クローンを同定することによって同定することができる。

【００９４】

なおさらに別の局面では、酵素をコードするヌクレオチド配列を、確立された標準的方法（例えば、Ｂｅｕｃａｇｅ Ｓ． Ｌ． ｅｔ ａｌ （１９８１） Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２２， ｐ １８５９－１８６９に記載のホスホルアミダイド法またはＭａｔｔｈｅｓ ｅｔ ａｌ （１９８４） ＥＭＢＯ Ｊ． ３， ｐ ８０１－８０５に記載の方法）によって合成的に調製することができる。ホスホロアミダイト法では、オリゴヌクレオチドを、例えば自動ＤＮＡ合成機で合成し、精製、アニーリング、ライゲーション、および適切なベクター中でクローニングする。

【００９５】

ヌクレオチド配列は、標準的技術により、合成ＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、またはｃＤＮＡ起源（必要に応じて）のフラグメントのライゲーションによって調製した、ゲノム起源および合成起源の混合、合成起源およびｃＤＮＡ起源の混合、またはゲノム起源およびｃＤＮＡ起源の混合であり得る。ライゲーションした各フラグメントは、ヌクレオチド配列全体の種々の部分に対応する。ＤＮＡ配列を、例えば、米国特許第４，６８３，２０２号またはＳａｉｋｉ Ｒ Ｋ ｅｔ ａｌ（Ｓｃｉｅｎｃｅ （１９８８） ２３９， ｐｐ ４８７－４９１）に記載の特定のプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって調製することもできる。

【００９６】

（アミノ酸配列）

本発明はまた、本明細書中に定義される特定の特性を有する酵素のアミノ酸配列を含む。

【００９７】

本明細書中で使用される、用語「アミノ酸配列」は、用語「ポリペプチド」および／または用語「タンパク質」と同義である。いくつかの例では、用語「アミノ酸配列」は、用語「ペプチド」と同義である。いくつかの例では、用語「アミノ酸配列」は、用語「酵素」と同義である。

【００９８】

アミノ酸配列は、適切な供給源から調製／単離してもよく、合成してもよく、組換えＤＮＡ技術の使用によって調製してもよい。

【００９９】

本発明の酵素は、他の酵素と組み合わせて使用してもよい。従って、本発明はまた、本発明の酵素および本発明の別の酵素であり得る別の酵素を含む酵素の組み合わせを包含する。この局面を、以下の節で考察する。

【０１００】

好ましくは、酵素は、天然の酵素ではない。これに関して、用語「天然の酵素」は、その天然の環境下に存在し、その天然のヌクレオチド配列によって発現した場合の酵素全体を意味する。

【０１０１】

（変異体／ホモログ／誘導体）

本発明はまた、本発明の酵素の任意のアミノ酸配列の変異体、ホモログ、および誘導体またはこのような酵素をコードする任意のヌクレオチド配列の使用を含む。本明細書中の用語「ホモログ」は、本発明のアミノ酸配列および本発明のヌクレオチド配列と一定の相同性を有する実体を意味する。本明細書中の用語「相同性」は、「同一性」と同等であり得る。

【０１０２】

本発明の状況では、相同配列には、本発明の配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、または９０％同一、好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり得るアミノ酸が含まれるとみなされる。典型的には、ホモログは、本発明のアミノ酸配列と同一の活性部位などを含む。相同性は、類似性（すなわち、類似の化学的性質／機能を有するアミノ酸残基）とみなすこともできるが、本発明の状況では、配列同一性に関しては相同性と表現することが好ましい。

【０１０３】

本発明の状況では、相同配列には、本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列（本発明の配列）と少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、または９０％同一、好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり得るヌクレオチド配列が含まれるとみなされる。典型的には、ホモログは、本発明の配列と同一の活性部位をコードする配列などを含む。相同性はまた、類似性（すなわち、類似の化学的性質／機能を有するアミノ酸残基）とみなすことができるが、本発明の状況では、配列同一性に関しては相同性と表現することが好ましい。

【０１０４】

相同性の比較を、目視によって、またはより通常には容易に利用可能な配列比較プログラムの支援によって行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムにより、２つ以上の配列間の相同性％を計算することができる。

【０１０５】

連続した配列の相同性％を計算することができる（すなわち、一方の配列を他方の配列と整列させ、一方の配列中の各アミノ酸を他方の配列中の対応するアミノ酸と一度に１残基ずつ直接比較する）。これを、「非ギャップ（ｕｎｇａｐｐｅｄ）」アラインメントと呼ぶ。典型的には、このような非ギャップアラインメントを、比較的少数の残基でのみ行う。

【０１０６】
これは非常に単純且つ一貫した方法であるにもかかわらず、例えば、他の点では同一の配列対に１つの挿入または欠失があることにより、それ以降のアミノ酸残基がアラインメントから除外されることを考慮できないので、アラインメント全体で行った場合相同性％は大きく減少する可能性がある。従って、ほとんどの配列比較法は、全体の相同性スコアに過度にペナルティーを科すことなく考えられる挿入および欠失を考慮する最適なアラインメントが得られるように設計されている。局所相同性を最大にしようとするために配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することによってこれを行う。
【０１０７】
しかし、これらのより複雑な方法では、同数の同一のアミノ酸について、可能な限り少数のギャップ（２つの比較配列間でより高い関連性を反映する）を含む配列アラインメントが多数のギャップを含む配列アラインメントよりも高いスコアを得るように、アラインメント中に生じる各ギャップに「ギャップペナルティー」を割り当てる。典型的には、ギャップの存在に比較的高いコストを課し、ギャップ中のその後の各残基のペナルティーをより小さくする「アフィン（Ａｆｆｉｎｅ）ギャップコスト」を使用する。これは、最も一般的に使用されているギャップスコアリングシステムである。勿論、高いギャップペナルティーにより、より少ないギャップを含む最適化されたアラインメントが得られる。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティーを修正可能である。しかし、配列比較のためにこのようなソフトウェアを使用する場合、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージを使用した場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティーは、ギャップについては－１２であり、各伸長については－４である。
【０１０８】
従って、最大相同性％の計算には、最初にギャップペナルティーを考慮した最適なアラインメントの作製が必要である。このようなアラインメントを実行するための適切なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ １９８４ Ｎｕｃ. Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２ ｐ３８７）である。配列比較を実施できる他のソフトウェアの例には、比較ツールのＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ １９９９ Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ, ４th Ｅｄ － Ｃｈａｐｔｅｒ １８を参照のこと）、ＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ １９９０ Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. ４０３－４１０）、およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳ統合ソフトウェア（ｓｕｉｔｅ）が含まれるが、これらに限定されない。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡは共にオフラインおよびオンライン検索で利用可能である（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ １９９９, ｐａｇｅｓ ７－５８ ｔｏ ７－６０を参照のこと）。しかし、いくつかの適用については、ＧＣＧ Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ましい。ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓと呼ばれる新規のツールも、タンパク質およびヌクレオチド配列の比較に利用可能である（ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ １９９９ １７４（２）： ２４７－５０、ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ １９９９ １７７（１）： １８７－８およびｔａｔｉａｎａ@ｎｃｂｉ.ｎｌｍ.ｎｉｈ.ｇｏｖを参照のこと）。
【０１０９】
最終相同性％を同一性に関して測定することができるが、アラインメントプロセス自体は、典型的には、全か無かの対形式の比較に基づかない。その代わり、一般に、スコアを化学的類似性または進化距離に基づいた各対比較に割り当てるスケール変換（ｓｃａｌｅｄ）類似性スコア行列を使用する。一般的に使用されるこのような行列の例は、ＢＬＯＳＵＭ６２行列（プログラムのＢＬＡＳＴ統合ソフトウェア用のデフォルト行列）である。ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎプログラムは、一般に、公的なデフォルト値または供給されている場合にはカスタムシンボル比較テーブルのいずれかを使用する（さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照のこと）。いくつかの適用については、ＧＣＧパッケー

ジについては公的なデフォルト値を使用し、他のソフトウェアの場合は、デフォルト行列（ＢＬＯＳＵＭ６２など）を使用することが好ましい。

【０１１０】

あるいは、相同性％を、ＣＬＵＳＴＡＬ（Ｈｉｇｇｉｎｓ ＤＧ ＆ Ｓｈａｒｐ ＰＭ （１９８８）， Ｇｅｎｅ ７３ （１）， ２３７－２４４）に類似する、アルゴリズムに基づくＤＮＡＳＩＳ（商標）（Ｈｉｔａｃｈｉ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）のマルチプルアラインメント機能を使用して計算することができる。

【０１１１】

一旦ソフトウェアによって最適なアラインメントが得られると、相同性％、好ましくは配列同一性％を計算することが可能である。ソフトウェアは、典型的には、配列比較の一部としてこれを計算し、数値で結果が得られる。

【０１１２】

配列はまた、サイレント変化をもたらし機能的に等価な物質が得られるアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を有し得る。物質の二次結合活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および／または両親媒性の性質に基づいて意図的なアミノ酸置換を行うことができる。例えば、負電荷のアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正電荷のアミノ酸にはリジンおよびアルギニンが含まれ、類似の親水性値を有する非荷電極性ヘッド基を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。

【０１１３】

例えば以下の表に従って、保存的置換を行うことができる。２列目中の同一のブロックおよび好ましくは３列目中の同一の行中のアミノ酸を互いに置換することができる。

【０１１４】

【表１】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性－非荷電性	CSTM
		NQ
	極性－荷電性	DE
		KR
芳香族		HFWY

本発明はまた、起こり得る相同的置換（置換（ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）および置換（ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ）は共に既存のアミノ酸残基の別の残基との交換、すなわち、類似物同士の置換（塩基性と塩基性、酸性と酸性、極性と極性など）を意味するために本明細書中で使用される）を含む。非相同的置換（すなわち、あるクラスの残基から別のクラスの残基への置換、または非天然アミノ酸（オルニチン（以後Ｚという）、ジアミノ酪酸オルニチン（以後Ｂという）、ノルロイシンオルニチン（以後Ｏという）、ピリルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、およびフェニルグリシンなど）の封入を含む置換）もまた起こり得る。

【０１１５】

以下の非天然アミノ酸によってこの置換を行うこともできる：α＊およびα二置換＊アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸＊、乳酸＊、天然アミノ酸のハライド誘導体（トリフルオロチロシン＊など）、ｐ－Ｃｌ－フェニルアラニン＊、ｐ－Ｂｒ－フェニルアラニン＊、ｐ－Ｉ－フェニルアラニン＊、Ｌ－アリル－グリシン＊、β－アラニン＊、Ｌ－α－アミノ酪酸＊、Ｌ－γ－アミノ酪酸＊、Ｌ－α－アミノイソ酪酸＊、Ｌ－ε－アミノカプロン

酸[#]、７－アミノヘプタン酸[*]、Ｌ－メチオニンスルホン[#*]、Ｌ－ノルロイシン[*]、Ｌ－ノルバリン[*]、ｐ－ニトロ－Ｌ－フェニルアラニン[*]、Ｌ－ヒドロキシプロリン[#]、Ｌ－チオプロリン[*]、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）のメチル誘導体（４－メチル－Ｐｈｅ[*]、ペンタメチル－Ｐｈｅ[*]、Ｌ－Ｐｈｅ（４－アミノ）[#]、Ｌ－Ｔｙｒ（メチル）[*]など）、Ｌ－Ｐｈｅ（４－イソプロピル）[*]、Ｌ－Ｔｉｃ（１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸）[*]、Ｌ－ジアミノプロピオン酸[#]、およびＬ－Ｐｈｅ（４－ベンジル）[*]。記号[*]は誘導体の疎水性を示すために（相同性または非相同性置換に関する）上記の説明に使用し、[#]は誘導体の親水性を示すために使用し、[#*]は両親媒性を示す。

【０１１６】

変異アミノ酸配列は、配列の任意の２つのアミノ酸残基の間に挿入することができる適切なスペーサー基を含むことができ、これらには、アミノ酸スペーサー（グリシンまたはβアラニン残基など）に加えてアルキル基（メチル、エチル、またはプロピル基など）が含まれる。さらなる変異形態は、ペプトイド形態の１以上のアミノ酸残基の存在に関連し、これは当業者には十分に理解されている。疑問を避けるために、「ペプトイド形態」は、α炭素置換基がα炭素ではなく残基の窒素原子上に存在する、変異アミノ酸残基をいうために使用される。ペプトイド形態のペプチドを調製するプロセスは、当該技術分野で公知である（例えば、Ｓｉｍｏｎ ＲＪ ｅｔ ａｌ．, ＰＮＡＳ （１９９２） ８９（２０）, ９３６７－９３７１およびＨｏｒｗｅｌｌ ＤＣ, Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（１９９５） １３（４）, １３２－１３４）。

【０１１７】

本発明で使用するヌクレオチド配列には、ヌクレオチド配列内に合成または改変ヌクレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドに対するいくつかの異なる改変型が当該技術分野で既知である。これらには、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート骨格、ならびに／あるいは分子の３’および／もしくは５’末端でのアクリジンまたはポリリジン鎖の付加が含まれる。本発明の目的のために、本明細書中に記載のヌクレオチド配列を当該技術分野で利用可能な任意の方法によって改変することができると理解すべきである。本発明のヌクレオチド配列のインビボ活性の増大または寿命の延長のためにこのような改変を行うことができる。

【０１１８】

本発明はまた、本明細書中に記載の配列、または任意のその誘導体、フラグメント、あるいは誘導体と相補的なヌクレオチド配列の使用を含む。配列がそのフラグメントと相補的である場合、配列を、他の生物などにおける類似のコード配列を同定するためのプローブとして使用することができる。

【０１１９】

本発明の配列に１００％相同ではないが本発明の範囲内に含まれるポリヌクレオチドを、多くの方法で得ることができる。本明細書中に記載の配列の他の変異体を、例えば、一定範囲の個体（例えば、異なる集団由来の個体）から作製したＤＮＡライブラリーの探索によって得ることができる。さらに、他のウイルス／細菌または細胞ホモログ、特に哺乳動物細胞（例えば、ラット、マウス、ウシ、および霊長類細胞）中に見出される細胞ホモログを得ることができ、このようなホモログおよびそのフラグメントは、一般に、本明細書中の配列表に示す配列と選択的にハイブリダイズし得る。このような配列を、他の動物種から作製したｃＤＮＡライブラリーまたはゲノムＤＮＡライブラリーを探索すること、およびこのようなライブラリーを中程度から高程度のストリンジェンシー条件下で、添付の配列表の配列のいずれか１つの全てまたは一部を含むプローブで探索することによって得ることができる。類似の検討材料を適用して、本発明のポリペプチド配列またはヌクレオチド配列の種ホモログおよび対立遺伝子変異体を得る。

【０１２０】

変異体および株／種ホモログを、本発明の配列内の保存アミノ酸配列をコードする変異体およびホモログ内の配列を標的するように設計したプライマーを使用する縮重ＰＣＲを

使用して得ることもできる。保存配列を、例えば、いくつかの変異体／ホモログ由来のアミノ酸配列のアラインメントによって推定することができる。当該技術分野で公知のコンピュータソフトウェアを使用して配列アラインメントを行ってもよい。例えば、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ ＰｉｌｅＵｐプログラムが広く使用されている。

【０１２１】

縮重ＰＣＲで使用したプライマーは、１つ以上の縮重位置を含み、既知の配列に対して１つの配列プライマーを使用する配列のクローニングに使用した条件よりも低いストリンジェンシー条件で使用する。

【０１２２】

あるいは、このようなポリヌクレオチドを、特徴付けた配列の部位特異的変異誘発によって得ることができる。これは、例えば、ポリヌクレオチド配列が発現している特定の宿主細胞のコドン優先度を最適化するためにサイレントなコドン配列の変化を必要とする場合に有用であり得る。制限酵素認識部位を導入するためまたはポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの性質または機能を変化させるために、他の配列の変化が所望される得る。

【０１２３】

本発明はまた、無作為なプロセス、選択変異誘発、またはインビトロ組換えによって分子進化を受けたポリヌクレオチドを含む。非限定的な例として、インビボまたはインビトロのいずれかで、ヌクレオチド配列への多くの部位特異的またはランダムな変異を行い、その後種々の手段によってコードされたポリペプチドの改良された機能性をスクリーニングすることが可能である。さらに、ポリヌクレオチド配列の変異または天然の変異体を、野生型または他の変異もしくは天然の変異体のいずれかで組換えて新規の変異体を産生することができる。このような新規の変異体を、コードされたポリペプチドの改良された機能性についてスクリーニングすることもできる。当該技術分野で十分に確立された種々の方法（例えば、エラー閾値変異誘発（Ｅｒｒｏｒ Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（ＷＯ９２／１８６４５）、オリゴヌクレオチド媒介ランダム変異誘発（米国特許第５，７２３，３２３号）、ＤＮＡシャフリング（米国特許第５，６０５，７９３号）、エクソ媒介遺伝子アセンブリ（ＷＯ００／５８５１７））によって、新規の好ましい変異体を産生することができる。これらおよび類似のランダム指向性分子進化法（ｒａｎｄｏｍ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）の適用により、タンパク質の構造または機能のいかなる予備知識がなくても、好ましい特徴を有する本発明の酵素の変異体を同定および選択することが可能であり、予想不可能であるが有利な変異または変異体を産生可能である。酵素活性の最適化または変更のための当該技術分野の分子進化の適用例は多数存在し、このような例には、以下の１以上が含まれるが、これらに限定されない：宿主細胞中またはインビトロでの発現および／または活性の最適化、酵素活性の増大、基質特異性および／または産生物特異性の最適化、酵素安定性または構造安定性の増化もしくは減少、好ましい環境条件下（例えば、温度、ｐＨ、基質）での酵素活性／特異性の変更。

【０１２４】

本発明のポリヌクレオチド（ヌクレオチド配列）を使用して、プライマー（例えば、ＰＣＲプライマー（別の増幅反応用のプライマー））、プローブ（例えば、放射性または非放射性標識を使用した従来の手段によって明らかな標識を使用して標識する）を作製してもよく、またはポリヌクレオチドをベクターにクローニングしてもよい。このようなプライマー、プローブ、および他のフラグメントは、少なくとも１５、好ましくは少なくとも２０、例えば少なくとも２５、３０、または４０ヌクレオチド長であり、これらもまた本明細書中で使用される本発明の用語「ポリヌクレオチド」に含まれる。

【０１２５】

本発明によるＤＮＡポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドおよびプローブを、組換え、合成、または当業者が利用可能な任意の手段によって作製することができる。これらを、標準的な技術によってクローニングすることもできる。

【０１２６】
一般に、プライマーを、所望の核酸配列の一度に１ヌクレオチドの段階的製造を含む合成手段によって産生する。自動化技術を使用してこれを行う技術は、当該技術分野で容易に利用可能である。
【０１２７】
一般に、組換え手段を使用して、例えば、ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）クローニング技術を使用して、より長いポリヌクレオチドを産生する。これは、クローニングを所望する脂質標的配列領域に隣接するプライマー対（例えば、約１５～３０ヌクレオチド）を作製すること、プライマーを動物またはヒト細胞から得たｍＲＮＡまたはｃＤＮＡと接触させること、所望の領域を増幅する条件下でポリメラーゼ連鎖反応を行うこと、増幅フラグメントを単離すること（例えば、アガロースゲルでの反応混合物の精製による）、および増幅ＤＮＡを回収する工程を包含する。プライマーを、増幅ＤＮＡを適切なクローニングベクターにクローニングすることができるように、適切な制限酵素認識部位を含むように設計してもよい。
【０１２８】
（生物学的に活性な）
好ましくは、変異配列などは、本明細書中に記載の配列と少なくとも同等に生物学的に活性である。
【０１２９】
本明細書中で使用される、「生物学的に活性な」は、天然に存在する配列と類似の構造機能（必ずしも同程度とは限らない）および／または類似の調節機能（必ずしも同程度とは限らない）、および／または類似の生化学的機能（必ずしも同程度とは限らない）を有する配列をいう。
【０１３０】
（アイソザイム）
本発明のポリペプチドは、１以上の異なるアイソザイムの形態で存在し得る。本明細書中で使用される、用語「アイソザイム」は、同一の反応を触媒するが、基質親和性および酵素－基質反応の最大速度などの特性が互いに異なるポリペプチドの変異体を含む。アミノ酸配列の相違により、電気泳動または等電点電気泳動などの技術によってアイソザイムを区別することができる。組織が異なれば、しばしばアイソザイムも異なる。一般に、配列の相違により、特定のアイソザイムが見出される細胞型の特定の要件に対する微調整と解釈することができる異なる酵素速度パラメータが付与される。
【０１３１】
（アイソフォーム）
本発明はまた、本明細書中に記載のポリペプチドの異なるアイソフォームを含む。用語「アイソフォーム」は、類似または同一のアミノ酸配列を有するが異なる遺伝子産物である、同一の機能（すなわち、ピラノゾン脱水酵素活性）を有するタンパク質をいう。
【０１３２】
（ハイブリダイゼーション）
本発明はまた、本発明の配列と相補的な配列、または本発明の配列もしくは本発明の配列と相補的な配列のいずれかとハイブリダイズし得る配列を含む。
【０１３３】
本明細書中で使用される、用語「ハイブリダイゼーション」は、「核酸の鎖が塩基対合によって相補鎖と連結するプロセス」ならびにポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術で実施される増幅プロセスを含む。
【０１３４】
本発明はまた、本明細書中に記載の配列、またはその任意の誘導体、フラグメント、もしくは誘導体と相補的な配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列の使用を含む。
【０１３５】
用語「変異体」はまた、本明細書中に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る

配列と相補的な配列を含む。

【０１３６】

好ましくは、用語「変異体」は、ストリンジェントな条件下（例えば、５０℃および０．２×ＳＳＣ｛１×ＳＳＣ＝０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１５Ｍクエン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）｝）で本明細書中に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る配列と相補的な配列を含む。

【０１３７】

より好ましくは、用語「変異体」は、高ストリンジェントな条件下（例えば、６５℃および０．１×ＳＳＣ｛１×ＳＳＣ＝０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１５Ｍ　クエン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）｝）で本明細書中に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る配列と相補的な配列を含む。

【０１３８】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列（本明細書中に記載のヌクレオチド配列の相補配列を含む）とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列に関する。

【０１３９】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列（本明細書中に記載のヌクレオチド配列の相補配列を含む）とハイブリダイズし得る配列と相補的なヌクレオチド配列に関する。

【０１４０】

中程度から最大のストリンジェンシー条件下で本明細書中に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド配列もまた、本発明の範囲内である。

【０１４１】

好ましい局面では、本発明は、ストリンジェントな条件下（例えば、５０℃および０．２×ＳＳＣ）で本発明のヌクレオチド配列またはその相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を包含する。

【０１４２】

より好ましい局面では、本発明は、高ストリンジェントな条件下（例えば、６５℃および０．１ｘＳＳＣ）で本発明のヌクレオチド配列またはその相補体とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を包含する。

【０１４３】

（部位特異的変異誘発）

一旦酵素コードヌクレオチド配列が単離されるか、または推定酵素コードヌクレオチド配列が同定されると、本発明の酵素を調製するために配列を変異させることが望ましい。

【０１４４】

合成オリゴヌクレオチドを使用して、変異を導入することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、所望の変異部位に隣接するヌクレオチド配列を含む。

【０１４５】

酵素遺伝子を保有するベクター中でＤＮＡ（酵素コード配列）の一本鎖ギャップを作製する適切な方法が、Ｍｏｒｉｎａｇａら（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｏｇｙ　（１９８４）　２，　ｐ６４６－６４９）に開示されている。次いで、所望の変異を有する合成ヌクレオチドを、一本鎖ＤＮＡの相同部分にアニーリングする。次いで、残存するギャップにＤＮＡポリメラーゼＩ（クレノウフラグメント）を充填し、Ｔ４リガーゼを使用して構築物にライゲーションする。

【０１４６】

米国特許第４，７６０，０２５号は、カセットの小さな変更を行うことによる、複数の変異をコードするオリゴヌクレオチドの導入を開示する。しかし、種々の長さの多数のオリゴヌクレオチドを導入することができるので、上記のＭｏｒｉｎａｇａの方法によっていつでもさらに多様な変異を導入することができる。

【０１４７】

酵素コードヌクレオチド配列への変異の別の導入方法は、Ｎｅｌｓｏｎ　ａｎｄ　Ｌｏｎｇ（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　（１９８９），　１８０，

ｐ　１４７－１５１）に記載されている。この方法は、ＰＣＲ反応におけるプライマーの１つとして化学合成ＤＮＡ鎖を使用することによって導入された所望の変異を含むＰＣＲフラグメントの３工程作製を含む。ＰＣＲ作製フラグメントから、制限エンドヌクレアーゼでの切断によって変異を保有するＤＮＡフラグメントを単離し、発現プラスミドに再挿入することができる。

【０１４８】

例として、Ｓｉｅｒｋｓら（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ　（１９８９）　２，　６２１－６２５およびＰｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ　（１９９０）　３，　１９３－１９８）は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓグルコアミラーゼにおける部位特異的変異誘発を記載している。

【０１４９】

（組換え）

本発明の１つの局面では、配列は、組換え配列（すなわち、組換えＤＮＡ技法を使用して調製された配列）である。

【０１５０】

（合成）

本発明の１つの局面では、配列は、合成配列（すなわち、インビトロ化学または酵素合成によって調製された配列）である。これには、メチロトローフ酵母ＰｉｃｈｉａおよびＨａｎｓｅｎｕｌａなどの宿主生物についての最適なコドン使用法を使用して作製した配列が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５１】

（酵素の発現）

本発明で使用するヌクレオチド配列を、組換え複製可能なベクターに組み込むことができる。このベクターを使用して、酵素形態で、適合可能な宿主細胞中でおよび／または宿主細胞からヌクレオチド配列を複製および発現することができる。同種および異種発現の両方が含まれる。

【０１５２】

同種発現のために、好ましくは、目的の遺伝子または目的のヌクレオチド配列は、天然に存在する遺伝的状況下にない。目的の遺伝子または目的のヌクレオチド配列が天然に存在する遺伝的状況下にある場合、好ましくは、発現は、その天然に存在する発現機構以外またはそれに加えた手段（例えば、遺伝子介入による目的の遺伝子の過剰発現）によって駆動される。

【０１５３】

プロモーター／エンハンサーおよび他の発現調節シグナルを含む制御配列を使用して、発現を制御することができる。原核細胞プロモーターおよび真核細胞で機能的なプロモーターを使用することができる。組織特異的または刺激特異的プロモーターを使用することができる。２つ以上の本明細書中に記載の異なるプロモーター由来の配列エレメントを含むキメラプロモーターも使用することができる。

【０１５４】

ヌクレオチド配列の発現による宿主組換え細胞によって産生された酵素を分泌してもよいし、使用した配列および／またはベクターに応じて細胞内に含めてもよい。特定の原核細胞膜および真核細胞膜を介した本発明のコード配列の分泌を指示するシグナル配列を使用して、コード配列を設計することができる。

【０１５５】

（発現ベクター）

用語「発現ベクター」は、インビボまたはインビトロ発現が可能な構築物を意味する。

【０１５６】

好ましくは、発現ベクターを、適切な宿主生物のゲノムに組み込む。用語「組み込まれた」は、好ましくは、ゲノムへの安定な組込みを包含する。

【０１５７】

宿主生物は、目的の供給源生物の遺伝子と同一であっても異なっていてもよく、同種お

よび異種それぞれの発現を引き起こす。

【０１５８】

好ましくは、本発明のベクターは、本発明の構築物を含む。あるいは、本発明の発現されるヌクレオチドは、好ましくはベクター中に存在し、調節配列が適切な宿主生物によってヌクレオチド配列を発現することができるように、ヌクレオチド配列が調節配列に作動可能に連結されている（すなわち、ベクターは発現ベクターである）

本発明のベクターを、以下に記載のように適切な宿主細胞に形質転換して、本発明のポリペプチドを発現させることができる。従って、さらなる局面では、本発明は、ポリペプチドをコードするコード配列のベクターによって発現するための条件下で、発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞を培養すること、および発現したポリペプチドを回収する工程を包含する、本発明によるその後に使用するためにポリペプチドを調製するプロセスを提供する。

【０１５９】

ベクターは、例えば、複製起点、任意に上記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、および必要に応じてプロモーターのレギュレーターを備えるプラスミドベクター、ウイルスベクター、またはファージベクターであり得る。ベクターの選択は、しばしばベクターが導入される宿主細胞に依存する。

【０１６０】

本発明のベクターは、１つ以上の選択マーカー遺伝子を含み得る。産業用微生物に最も適した選択系は、宿主生物において変異を必要としない選択マーカー群によって形成される系である。適切な選択マーカーは、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓまたは Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ由来のｄａｌ遺伝子、あるいはアンピシリン耐性、カナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性、また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であり得る。別の選択マーカーは、ａｍｄＳ、ａｒｇＢ、ｎｉａＤ、およびｓＣなどのＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ選択マーカーまたはハイグロマイシン耐性が得られるマーカーであり得る。他の真菌選択マーカーの例は、ＡＴＰシンターゼ、サブユニット９（ｏｌｉＣ）、オロチジン－５’－リン酸デカルボキシラーゼ（ｐｖｒＡ）、フレオマイシン、およびベノミル耐性（ｂｅｎＡ）の遺伝子である。非真菌選択マーカーの例は、細菌Ｇ４１８耐性遺伝子（これは、酵母でも使用することができるが、糸状菌で使用することはできない）、アンピシリン耐性遺伝子（Ｅ．ｃｏｌｉ）、ネオマイシン耐性遺伝子（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、およびβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）をコードするＥ．ｃｏｌｉ ｕｉｄＡ遺伝子である。さらに適切な選択マーカーには、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓまたはＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ由来のｄａｌ遺伝子が含まれる。あるいは、同時形質転換（ＷＯ９１／１７２４３に記載）によって選択することができる。

【０１６１】

ベクターを、例えば、ＲＮＡの産生のためにインビトロで使用するか、宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換するために使用することができる。

【０１６２】

従って、本発明で使用するヌクレオチド配列を、組換えベクター（典型的には、複製可能なベクター）、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターに組み込むことができる。ベクターを使用して、適合可能な宿主細胞中で核酸を複製させることができる。従って、さらなる実施形態では、本発明は、複製可能なベクターへの本発明のヌクレオチド配列の導入、適合可能な宿主細胞へのベクターの導入、およびベクターの複製をもたらす条件下での宿主細胞の増殖による、本発明のヌクレオチド配列を作製する方法を提供する。宿主細胞からベクターを回収することができる。適切な宿主細胞を、発現ベクターと共に以下に記載する。

【０１６３】

本明細書中に定義される特定の特性を有する酵素をコードする本発明のＤＮＡ構築物および調節配列をライゲーションし、これらを複製に必要な情報を含む適切なベクターに挿入するために使用する手順は、当業者に周知である（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ

al Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed. （１９８９）を参照のこと）。

【０１６４】

ベクターはさらに、該当する宿主細胞でベクターを複製させることができるヌクレオチド配列を含み得る。このような配列の例は、プラスミドｐＵＣ１９、ｐＡＣＹＣ１７７、ｐＵＢ１１０、ｐＥ１９４、ｐＡＭＢ１、およびｐＩＪ７０２の複製起点である。

【０１６５】

発現ベクターは、典型的には、例えば、選択した宿主生物中でベクターを自律複製させるエレメント、および選択のために１つ以上の表現型を検出可能なマーカーなどのクローニングベクター成分を含む。発現ベクターは、通常、プロモーター、オペレーター、リボゾーム結合部位、翻訳開始シグナル、および必要に応じて、リプレッサー遺伝子あるいは１つ以上のアクチベーター遺伝子をコードする制御ヌクレオチド配列を含む。さらに、発現ベクターは、ペルオキシソームなどの宿主細胞オルガネラまたは特定の宿主細胞区画にアミノ酸配列をターゲティングすることができるアミノ酸配列をコードする配列を含み得る。本発明の状況では、用語「発現シグナル」には、任意の上記制御配列、リプレッサー配列、またはアクチベーター配列が含まれる。制御配列の指示下での発現のために、ヌクレオチド配列は、発現に関して適切な様式で制御配列に作動可能に連結される。

【０１６６】

（調節配列）

いくつかの提供では、本発明で使用するヌクレオチド配列は、選択された宿主細胞などによってヌクレオチド配列を発現させることができる調節配列に作動可能に連結されている。例として、本発明は、このような調節配列に作動可能に連結された本発明のヌクレオチド配列を含むベクター（すなわち、ベクターは、発現ベクターである）を包含する。

【０１６７】

用語「作動可能に連結された」は、記載の成分が意図する様式で機能することができる関係にある近位の位置をいう。コード配列に「作動可能に連結された」調節配列は、制御配列と適合する条件下でコード配列が発現するような方法でライゲーションされている。

【０１６８】

用語「調節配列」には、プロモーターおよびエンハンサーならびに他の発現調節シグナルが含まれる。

【０１６９】

用語「プロモーター」は、当該技術分野における通常の意味で使用される（例えば、ＲＮＡポリメラーゼ結合部位）。

【０１７０】

発現、および所望ならば選択した発現宿主からの目的のタンパク質の分泌レベルを増大させ、かつ／または本発明の酵素発現を誘導的に制御する役目を果たす異種調節領域（例えば、プロモーター領域、分泌リーダー領域、および終結領域）の選択によって、本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列発現を増強することもできる。真核生物では、ポリアデニル化配列を、酵素をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結させることができる。

【０１７１】

好ましくは、本発明のヌクレオチド配列を、少なくともプロモーターに作動可能に連結させることができる。

【０１７２】

本発明のヌクレオチド配列をコードする遺伝子に対してネイティブのプロモーターのほかに、他のプロモーターを使用して、本発明のポリペプチド発現を指示することができる。プロモーターを、所望の発現宿主における本発明のヌクレオチド配列の発現を指示する効率について選択することができる。

【０１７３】

別の実施形態では、本発明の所望のヌクレオチド配列の発現を指示するために構成性プ

ロモーターを選択することができる。このような発現構築物は、誘導基質を含む培地で発現宿主を培養する必要性が回避されるので、さらなる利点を提供し得る。

【０１７４】

細菌宿主中でのヌクレオチド配列の転写を指示するのに適したプロモーターの例には、Ｅ．ｃｏｌｉのｌａｃオペロンのプロモーター、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｃｏｅｌｉｃｏｌｏｒアガラーゼ遺伝子ｄａｇＡプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓのα－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＬ）のプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓマルトース産生（ｍａｌｔｏｇｅｎｉｃ）アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＭ）のプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓのαアミラーゼ遺伝子（ａｍｙＱ）のプロモーター、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ ｘｙｌＡおよびｘｙｌＢ遺伝子のプロモーター、およびＰ１７０プロモーターを含むＬａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．由来のプロモーター由来のプロモーターが含まれる。ヌクレオチド配列がＥ．ｃｏｌｉなどの細菌種で発現する場合、例えば、Ｔ７プロモーターおよびλファージプロモーターを含むバクテリオファージプロモーターから適切なプロモーターを選択することができる。

【０１７５】

真菌種での転写のために、有用なプロモーターの例は、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α－アミラーゼ、Ａ．ｎｉｇｅｒ酸安定性α－アミラーゼ、Ａ．ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉリパーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅアルカリプロテアーゼ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼまたはＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓアセトアミダーゼをコードする遺伝子由来のプロモーターである。

【０１７６】

真菌発現宿主での使用に好ましい強力な構成性および／または誘導性プロモーターの例は、キシラナーゼ（ｘｌｎＡ）、フィターゼ、ＡＴＰ－シンセターゼ、サブユニット９（ｏｌｉＣ）、トリオースリン酸イソメラーゼ（ｔｐｉ）、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡｄｈＡ）、α－アミラーゼ（ａｍｙ）、アミログルコシダーゼ（ＡＧ－ｇｌａＡ遺伝子由来）、アセトアミダーゼ（ａｍｄＳ）、およびグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ｇｐｄ）のプロモーターの真菌遺伝子から得ることができるプロモーターである。真菌宿主での転写に有用なプロモーターの他の例は、Ａ．ｏｒｙｚａｅ ＴＡＫＡアミラーゼ、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来のＴＰＩ（トリオースリン酸イソメラーゼ）プロモーター（Ａｌｂｅｒ ｅｔ ａｌ （１９８２） Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．１，ｐ４１９－４３４）、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉアスパラギン酸プロテイナーゼ、Ａ．ｎｉｇｅｒの中性α－アミラーゼ、Ａ．ｎｉｇｅｒ酸安定性α－アミラーゼ、Ａ．ｎｉｇｅｒグルコアミラーゼ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉリパーゼ、Ａ．ｏｒｙｚａｅアルカリプロテアーゼ、Ａ．ｏｒｙｚａｅトリオースリン酸イソメラーゼ、またはＡ．ｎｉｄｕｌａｎｓアセトアミダーゼをコードする遺伝子由来のプロモーターである。

【０１７７】

酵母種での発現に適したプロモーターの例には、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＧａｌ１およびＧａｌ１０プロモーターならびにＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓのＡＯＸ１またはＡＯＸ２プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【０１７８】

ハイブリッドプロモーターを使用して、発現構築物の誘導調節を改良することもできる。

【０１７９】

プロモーターは、さらに、適切な宿主での発現を確実にするか増大させる特徴を含み得

る。例えば、特徴は、ＰｒｉｂｎｏｗボックスまたはＴＡＴＡボックスなどの保存領域であり得る。プロモーターは、さらに、本発明のヌクレオチド配列の発現レベルに影響を与える（維持する、増強する、減少させるなど）他の配列を含み得る。例えば、適切な他の配列には、Ｓｈ１－イントロンまたはＡＤＨイントロンが含まれる。他の配列には、誘導エレメント（温度、化学薬品、光、ストレスで誘導可能なエレメント）が含まれる。また、転写または翻訳の増強に適したエレメントが存在し得る。後者のエレメントの例は、ＴＭＶ５’シグナル配列である（Ｓｌｅａｔ　１９８７　Ｇｅｎｅ　２１７，　２１７－２２５およびＤａｗｓｏｎ　１９９３　Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　２３：　９７を参照のこと）。

【０１８０】

（構築物）

用語「構築物」（「結合体」、「カセット」、および「ハイブリッド」などの用語と同義である）には、プロモーターに直接または間接的に結合する本発明で使用されるヌクレオチド配列が含まれる。間接的結合の例は、Ｓｈ１イントロンまたはＡＤＨイントロンなどのイントロン配列などの適切なスペーサー群の供給であり、本発明のプロモーターとヌクレオチド配列の間に入る。これは、直接または間接的な結合を含む本発明に関する用語「融合した」にも当てはまる。場合によっては、この用語は、通常の状態で野生型遺伝子プロモーターと会合したタンパク質をコードするヌクレオチド配列、およびこれらが共に天然の環境下に存在する場合の天然の組み合わせを対象としない。

【０１８１】

構築物は、例えば、移入された細菌、好ましくはＢａｃｉｌｌｕｓ属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓなど）または植物で遺伝子構築物が選択されることを可能にするマーカーを含むか発現することができる。例えば、マンノース－６－リン酸イソメラーゼをコードするマーカー（特に、植物用）または抗生物質耐性（例えば、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシン、およびゲンタマイシンに対する耐性）を示すマーカーなど、使用することができる種々のマーカーが存在する。

【０１８２】

いくつかの用途のために、好ましくは、本発明の構築物は、プロモーターに作動可能に連結された本発明のヌクレオチド配列を少なくとも含む。

【０１８３】

（宿主細胞）

本発明に関する用語「宿主細胞」には、上記のヌクレオチド配列または発現ベクター、および本明細書中で定義される特定の特性を有する酵素の組換え産生で使用されるヌクレオチド配列または発現ベクターのいずれかを含む任意の細胞が含まれる。目的のヌクレオチドは、宿主細胞に対して同種であっても異種であってもよい。

【０１８４】

従って、本発明のさらなる実施形態は、本発明の酵素を発現するヌクレオチド配列で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を提供することである。好ましくは、ヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の複製および発現のためのベクター中に含まれる。細胞は、ベクターと適合可能であるように選択され、例えば、原核細胞（例えば、細菌）、真菌細胞、酵母細胞、または植物細胞であり得る。

【０１８５】

適切な細菌宿主生物の例は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｅｎｔｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｂｒｅｖｉｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｌｋａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌａｕｔｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ、およびＢａｃｉｌｌｕｓ　ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓを含むＢａｃｉｌｌａｃｅａｅ科、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｍｕｒｉｎｕｓなどのＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ種、Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓなどのＬａｃ

tococcus spp.、Lactobacillus reuteriを含むLactobacillus spp.、Leuconostoc spp、Pediococcus spp.、およびStreptococcus spp.を含む乳酸細菌類などのグラム陽性細菌種である。あるいは、E.coliを含むEnterobacteriaceaeまたはPseudomonadaceaeに属するグラム陰性細菌種の株を、宿主生物として選択することができる。

【０１８６】

グラム陰性細菌E.coliは、異種遺伝子発現の宿主として広範に使用されている。しかし、細胞内に大量の異種タンパク質が蓄積される傾向がある。大量のE.coliの細胞内タンパク質からその後所望のタンパク質を精製することは、しばしば困難であり得る。

【０１８７】

E.coliと対照的に、Bacillus属由来のグラム陽性細菌（B. subtilis、B.licheniformis、B. lentus、B. brevis、B. stearothermophilus、B. alkalophilus、B. amyloliquefaciens、B. coagulans、B.circulans、B. lautus、B. megaterium、B. thuringiensisなど）、Streptomyces lividans、またはS.murinusは、培養培地にタンパク質を分泌する能力により、異種宿主として非常に適切であり得る。宿主として適切であり得る他の細菌は、Streptomyces属およびPseudomonas属由来のものである。

【０１８８】

本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列の性質および／または発現するタンパク質のさらなるプロセシングの望ましさに応じて、酵母または他の真菌などの真核生物宿主が好ましい。一般に、操作が容易であるので、真菌細胞よりも酵母細胞が好ましい。しかし、いくつかのタンパク質は、酵母細胞からあまり分泌されないか、場合によっては適切にプロセシングされない（例えば、酵母における過剰グリコシル化）。これらの場合、異なる真菌宿主生物を選択すべきである。

【０１８９】

典型的な真菌発現宿主を、Aspergillus niger、Aspergillus niger var.tubigenis、Aspergilus niger var.awamori、Aspergillus aculeatis、Aspergillus nidulans、Aspergillus oryzae、Trichoderma reesei、Bacillus subtilis、Bacillus licheniformis、Bacillus amyloliquefaciens、Kluyveromyces lactis、およびSaccharomyces cerevisiaeから選択することができる。

【０１９０】

適切な糸状菌は、例えば、Aspergillus oryzaeまたはAspergillus nigerなどのAspergillus種に属する株、またはFusarium oxysporium、Fusarium graminearum（完全な状態では、Gribberella zeae、以前にはSphaeria zeaeと呼ばれ、Gibberella roseumおよびGibberella roseum f.sp.Cerealisと同義）、またはFusarium sulphureum（完全な状態では、Gibberella puricarisと呼ばれ、Fusarium trichothercioides、Fusarium bactridioides、Fusarium sambucium、Fusarium roseum、およびFusarium roseum var.graminearumと同義）、Fusarium cerealis（Fusarium crokkwellnseと同義）、またはFusarium venenatumの株であり得る。

【０１９１】
適切な酵母生物を、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、またはＳｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、またはＨａｎｓｅｎｕｌａ類から選択することができる（英国特許出願第９９２７８０１．２に開示）。
【０１９２】
適切な宿主細胞（酵母、真菌、および植物宿主細胞など）の使用により、本発明の組換え発現産物に最適な生物活性を付与するのに必要であり得る翻訳後修飾（例えば、ミリストイル化、グリコシル化、トランケーション、脂質化（ｌａｐｉｄａｔｉｏｎ）、およびチロシン、セリン、またはトレオニンのリン酸化）を行うことができる。
【０１９３】
宿主細胞は、プロテアーゼ欠損またはプロテアーゼ欠乏（ｍｉｎｕｓ）株であり得る。これは、例えば、「ａｌｐ」と呼ばれるアルカリプロテアーゼ遺伝子が欠失したプロテアーゼ欠損株Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ ＪａＬ１２５であり得る。この株は、ＷＯ９７／３５９５６に記載されている。
【０１９４】
（生物）
本発明に関する用語、「生物」には、本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列および／またはこれから得られる産物を含み得、かつ／またはプロモーターが生物中に存在する場合、プロモーターにより本発明のヌクレオチド配列を発現することができる任意の生物が含まれる。
【０１９５】
適切な生物は、原核生物、真菌、酵母、または植物を含み得る。
【０１９６】
本発明に関する用語「トランスジェニック生物」には、本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列および／またはこれから得られる産物を含み、かつ／またはプロモーターにより生物内で本発明のヌクレオチド配列を発現することができる任意の生物が含まれる。好ましくは、ヌクレオチド配列を、生物のゲノムに組み込む。
【０１９７】
用語「トランスジェニック生物」は、天然環境下でも存在する天然のプロモーターの制御下に存在する場合、天然の環境下での天然のヌクレオチドコード配列は対象としない。
【０１９８】
従って、本発明のトランスジェニック生物には、本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列、本発明の構築物、本発明のベクター、本発明のプラスミド、本発明の細胞、本発明の組織、またはその産物の任意の１つまたは組み合わせを含む生物が含まれる。例えば、トランスジェニック生物はまた、異種プロモーターの制御下で本発明の酵素をコードするヌクレオチド配列を含み得る。
【０１９９】
（宿主細胞／生物の形質転換）
先に示したように、宿主生物は、原核生物または真核生物であり得る。適切な原核生物宿主の例には、Ｅ．ｃｏｌｉおよびＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓが含まれる。
【０２００】
原核生物宿主の形質転換に関する教示は、当該技術分野で十分に報告されており、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ， ２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ， １９８９， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）およびＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．， Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ （１９９５）， Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ， Ｉｎｃ．を参照のこと。原核生物宿主を使用する場合、ヌクレオチド配列は、形質転換前にイントロンの除去などによって適切に改変される必要があり得る。

【０２０１】
プロトプラストの形成およびプロトプラストの形質転換、その後の公知の様式での細胞壁の再生を含むプロセスによって、糸状菌細胞を形質転換することができる。宿主微生物としてのＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓの使用は、ＥＰ　０２３８０２３に記載されている。
【０２０２】
別の宿主生物は、植物であり得る。遺伝子改変植物の構築の基本的原理は、植物ゲノムに遺伝情報を挿入して、挿入された遺伝物質を安定に維持することである。遺伝情報の挿入のためのいくつかの技法が存在し、２つの主な原理は、遺伝情報の直接導入およびベクター系の使用による遺伝情報の導入である。一般的技術の概説を、Ｐｏｔｒｙｋｕｓ（Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌｏ　Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ［１９９１］　４２：　２０５－２２５）およびＣｈｒｉｓｔｏｕ（Ａｇｒｏ－Ｆｏｏｄ－Ｉｎｄｕｓｔｒｙ　Ｈｉ－Ｔｅｃｈ　Ｍａｒｃｈ／Ａｐｒｉｌ　１９９４　１７－２７）の論文に見出すことができる。植物形質転換に関するさらなる教示を、ＥＰ－Ａ－０４４９３７５号に見出すことができる。
【０２０３】
真菌、酵母、および植物の形質転換についての一般的教示を、以下の節に示す。
【０２０４】
（形質転換真菌）
宿主生物は、真菌（カビなど）であり得る。適切なこのような宿主の例には、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ属、Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ属、Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ属、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ属、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ属、Ｍｕｃｏｒ属、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ属、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ属などに属する任意のメンバー（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓｉｓ、Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ　ｃｈｒｙｓｏｇｅｎｕｍ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ、Ａｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ａｗａｍｏｒｉ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎｕｍ　ｃｈｒｙｓｏｇｅｎｅｍ、Ｍｕｃｏｒ　ｊａｖａｎｉｏｕｓ、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｖｉｒｉｄａｅ、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍなど）が含まれる。
【０２０５】
１つの実施形態では、宿主生物は、糸状菌であり得る。
【０２０６】
ほぼ１世紀の間、有機化合物および酵素を生産する多くのタイプの産業で糸状菌が広範に使用されてきた。例えば、伝統的な日本のコウジおよびダイズ発酵では、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓｐが使用されてきた。また、本世紀では、産業で使用される有機酸（特に、クエン酸）の生産および種々の酵素の生産にＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒが使用されている。
【０２０７】
なぜ糸状菌が産業で非常に広範に使用されているのかについては２つの主な理由が存在する。第１に、糸状菌は、大量の菌体外産物（例えば、酵素および抗生物質または有機酸などの有機化合物）を産生することができる。第２に、糸状菌は、穀類、ふすま、ビートパルプなどの低コストの基質で増殖することができる。同一の理由が、糸状菌を本発明の異種発現用宿主として魅力的な生物にしている。
【０２０８】
トランスジェニックＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓを調製するために、糸状菌での発現のために設計した構築物への本発明のヌクレオチド配列の挿入によって発現構築物を調製する。
【０２０９】
異種発現に使用されるいくつかの型の構築物が開発されている。これらの構築物は、好ましくは、１つ以上の典型的には真菌起源の分泌すべきアミノ酸配列を指示するシグナル配列および発現系を終結させるターミネーター（典型的には、真菌で活性）を含む。
【０２１０】

本発明のヌクレオチド配列を安定なタンパク質をコードする真菌遺伝子の小部分または大部分に融合することができる別の型の発現系が真菌で開発されている。これにより、アミノ酸配列を安定化することができる。このような系では、特定のプロテアーゼによって認識される切断部位を、真菌タンパク質とアミノ酸配列との間に導入することができ、それにより、産生された融合タンパク質を、この位置で特定のプロテアーゼで切断して、アミノ酸配列を遊離させることができる。例として、少なくともいくつかのＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓで見出されるＫＥＸ－２様ペプチダーゼによって認識される部位を導入することができる。このような融合よってインビボで切断されて、発現産物が産生されるが、より大きな融合タンパク質は産生されない。

【０２１１】

細菌、真菌、脊椎生物、および植物のタンパク質をコードするいくつかの遺伝子についてのＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓにおける異種発現が報告されている。本発明のヌクレオチド配列がシグナル配列と融合していない場合、細胞内にタンパク質が沈積し得る。このようなタンパク質は、細胞質に蓄積し、通常、グリコシル化されず、これはいくつかの細菌タンパク質で有利であり得る。本発明のヌクレオチド配列がシグナル配列を備えている場合、タンパク質は細胞外に蓄積する。

【０２１２】

産物安定性および宿主株の改変に関して、いくつかの異種タンパク質は、真菌の培養液に分泌された場合にあまり安定ではない。ほとんどの真菌は、異種タンパク質を分解するいくつかの細胞外プロテアーゼを産生する。この問題を回避するために、プロテアーゼ産生が減少した特別な新規株を異種産生の宿主として使用した。

【０２１３】

糸状菌の形質転換についての教示は、米国特許第５７４１６６５号に概説されており、糸状菌の標準的な形質転換技法および真菌の培養が当該技術分野で周知であることが記載されている。Ｎ．ｃｒａｓｓａに適用した技法の広範な概説は、例えば、Ｄａｖｉｓ ａｎｄ ｄｅ Ｓｅｒｒｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ（１９７１）１７Ａ：７９－１４３で見出される。一般に、株の維持および分生子の調製には標準的手順が使用される。Ｌａｍｂｏｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ （１９７９）８２：１７－３１に記載のように、菌糸体は、典型的には、約１４時間（２５℃）の液体培養で増殖する。宿主株は、一般に、適切な栄養素（例えば、任意の１つ以上のｈｉｓ、ａｒｇ、ｐｈｅ、ｔｙｒ、ｔｒｐ、ｐ－アミノ安息香酸、およびイノシトールなど）を補充したフォーゲル最少培地またはフリース最少培地のいずれかで増殖することができる。

【０２１４】

糸状菌の形質転換についてのさらなる教示は、米国特許第５６７４７０７号に概説されており、一旦構築物が得られると、ＤＮＡ媒介形質転換、エレクトロポレーション、遺伝子銃撃ち込み（ｐａｒｔｉｃｌｅ ｇｕｎ ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、およびプロトプラスト融合などの技法を使用して、選択された糸状菌宿主に線状形態またはプラスミド形態（例えば、ｐＵＣベースのベクターまたは他のベクター）のいずれかで導入することができることが記載されている。さらに、Ｂａｌｌａｎｃｅ、１９９１（同節）は、形質転換真菌の調製のための形質転換プロトコールは、プロトプラストの調製およびＰＥＧおよびＣａ$^{2+}$イオンを使用したプロトプラストへのＤＮＡの導入に基づくことを記載している。次いで、形質転換プロトプラストを再生し、種々の選択マーカーを使用して形質転換真菌を選択する。

【０２１５】

得られた形質転換体を選択するために、形質転換は、典型的には、遺伝子マーカーが選択可能な宿主株に、同一ベクター上または同時形質転換によってのいずれかで発現カセットを導入された選択可能な遺伝子マーカーを含む。種々のマーカー／宿主系が利用可能であり、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓの栄養要求性株との使用のためのｐｙｒＧ、ａｒｇＢ、およびｎｉａＤ遺伝子；Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｏｒｙｚａｅ栄養要求性株のｐｙｒＧおよびａｒｇＢ遺伝子；Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｃｈｒｙｓｏｇｅｎ

um栄養要求性株のｐｙｒＧ、ｔｒｐＣ、およびｎｉａＤ遺伝子；ならびにＴｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ栄養要求性株のａｒｇＢ遺伝子が含まれる。ａｍｄＳ、ｏｌｉＣ、ｈｙｇ、およびｐｈｌｅｏを含む優性選択可能マーカーもまた、Ａ．ｎｉｇｅｒ、Ａ．ｏｒｙｚａｅ、Ａ．ｆｉｃｕｕｍ、Ｐ．ｃｈｒｙｓｏｇｅｎｕｍ、Ｃｅｐｈａｌｏｓｐｏｒｉｕｍ ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｈｅｔｅｒｏｓｔｒｏｐｈｕｓ、Ｇｌｏｍｅｒｅｌｌａ ｃｉｎｇｕｌａｔａ、Ｆｕｌｖｉａ ｆｕｌｖａ、およびＬｅｐｔｏｓｐｈａｅｒｉａ ｍａｃｕｌａｎｓ（概説として、Ｗａｒｄ ｉｎ Ｍｏｄｅｒｎ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９９１，Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，４５５－４９５を参照のこと）などの糸状菌との使用に利用可能である。一般的に使用されている形質転換マーカーは、唯一の窒素源としてアクリルアミドを使用して高コピー数の真菌を増殖させることができるＡ．ｎｉｄｕｌａｎｓのａｍｄＳ遺伝子である。

【０２１６】

糸状菌の形質転換のために、多数の糸状菌のためのいくつかの形質転換プロトコールが開発されている。マーカーのうち、ａｒｇＢ、ｔｒｐＣ、ｎｉａＤ、およびｐｙｒＧなどの多くの栄養要求性マーカー、ベノミル耐性、ハイグロマイシン耐性、およびフレオマイシン耐性などの抗生物質耐性マーカーを形質転換に使用する。

【０２１７】

１つの局面では、宿主生物は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒなどのＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ属の宿主生物であり得る。

【０２１８】

本発明のトランスジェニックＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓを、以下の教示によって調製することもできる：Ｒａｍｂｏｓｅｋ Ｊ．ａｎｄ Ｌｅａｃｈ，Ｊ．１９８７（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ ｉｎ ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ ｆｕｎｇｉ：Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ａｎｄ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｓ．ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：３５７－３９３）、Ｄａｖｉｓ Ｒ．Ｗ．１９９４（Ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ ｉｎ Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ．Ｉｎ：Ｍａｒｔｉｎｅｌｌｉ Ｓ．Ｄ．，Ｋｉｎｇｈｏｒｎ Ｊ．Ｒ．（Ｅｄｉｔｏｒｓ）Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ：５０ ｙｅａｒｓ ｏｎ．Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌ ２９．Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，１９９４．ｐｐ ５２５－５６０）、Ｂａｌｌａｎｃｅ，Ｄ．Ｊ．１９９１（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ Ｆｕｎｇｉ ａｎｄ ａｎ Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ Ｆｕｎｇａｌ Ｇｅｎｅ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ．Ｉｎ：Ｌｅｏｎｇ，Ｓ．Ａ．，Ｂｅｒｋａ Ｒ．Ｍ．（Ｅｄｉｔｏｒｓ）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｍｙｃｏｌｏｇｙ．Ｓｙｓｔｅｍｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ Ｆｕｎｇｉ．Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １９９１．ｐｐ １－２９）、およびＴｕｒｎｅｒ Ｇ．１９９４（Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ．Ｉｎ：Ｍａｒｔｉｎｅｌｌｉ Ｓ．Ｄ．Ｋｉｎｇｈｏｒｎ Ｊ．Ｒ．（Ｅｄｉｔｏｒｓ）Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ：５０ ｙｅａｒｓ ｏｎ．Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌ ２９．Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ａｍｓｔｅｒｄａｍ １９９４．ｐｐ．６４１－６６６）。

【０２１９】

（形質転換酵母）

別の実施形態では、トランスジェニック生物は、酵母であり得る。

【０２２０】

これに関して、異種遺伝子発現用の媒体として酵母もまた広範に使用されている。

【０２２１】

例として、種Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、異種遺伝子発現での使用を含む工業的用途の長い歴史がある。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅでの異種遺伝子の発現は、Ｇｏｏｄｅｙら（１９８７，Ｙｅａｓｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄ Ｒ Ｂｅｒｒｙ ｅｔ ａｌ，ｅｄｓ，ｐｐ ４０１－４２９，Ａｌｌｅｎ ａｎｄ Ｕｎｗｉｎ，Ｌｏｎｄｏｎ）およびＫｉｎｇら（１９８９，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｙｅａｓｔｓ，Ｅ．Ｆ．Ｗａｌｔｏｎ ａｎｄ Ｇ．Ｔ．Ｙａｒｒｏｎｔｏｎ，ｅｄｓ，ｐｐ １０７－１３３，Ｂｌａｃｋｉｅ，Ｇｌａｓｇｏｗ）によって概説されている。

【０２２２】

いくつかの理由のために、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、異種遺伝子発現に十分に適している。第１に、ヒトに対して病原性がなく、一定の内毒素を産生することができない。第２に、種々の目的のための商業的開発後の長期にわたって安全に使用されている歴史がある。これにより、広範に公的に承認されている。第３に、生物の幅広い商業的使用および研究により、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの遺伝学および生理学ならびに大規模発酵特性についての豊富な知識が得られている。

【０２２３】

Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおける異種遺伝子発現および遺伝子産物分泌の原理の概説は、Ｅ．Ｈｉｎｃｈｃｌｉｆｆｅ Ｅ Ｋｅｎｎｙ（１９９３，「Ｙｅａｓｔ ａｓ ａ ｖｅｈｉｃｌｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ ｇｅｎｅｓ」，Ｙｅａｓｔｓ，Ｖｏｌ ５，Ａｎｔｈｏｎｙ Ｈ Ｒｏｓｅ ａｎｄ Ｊ Ｓｔｕａｒｔ Ｈａｒｒｉｓｏｎ，ｅｄｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｌｔｄ．）によって記載されている。

【０２２４】

いくつかの酵母ベクター型が利用可能であり、その維持のために宿主ゲノムとの組換えを必要とする組み込みベクターおよび自律複製プラスミドベクターが含まれる。

【０２２５】

トランスジェニックＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓを調製するために、酵母での発現のために設計された構築物への本発明のヌクレオチド配列の挿入によって発現構築物を調製する。異種発現で使用するいくつかの構築物型が開発されている。構築物は、酵母起源のプロモーターなどの酵母で活性なプロモーターを含み、ＧＡＬ１プロモーターなどを使用する。通常、ＳＵＣ２シグナルペプチドをコードする配列などの酵母起源のシグナル配列を使用する。酵母で活性なターミネーターは、発現系を停止させる。

【０２２６】

酵母の形質転換のために、いくつかの形質転換プロトコールが開発されている。例えば、本発明のトランスジェニックＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓを、以下のＨｉｎｎｅｎら（１９７８，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ＵＳＡ ７５，１９２９）；Ｂｅｇｇｓ，Ｊ Ｄ（１９７８，Ｎａｔｕｒｅ，Ｌｏｎｄｏｎ，２７５，１０４）；およびＩｔｏ，Ｈら（１９８３，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ １５３，１６３－１６８）の教示によって調製することができる。

【０２２７】

種々の選択マーカーを使用して、形質転換酵母細胞を選択することができる。マーカーのうち、ＬＥＵ２、ＨＩＳ４、およびＴＲＰ１などのいくつかの栄養要求性マーカーならびにアミノグリコシド抗生物質マーカー（例えば、Ｇ４１８）などの優性抗生物質耐性マーカーを形質転換に使用する。

【０２２８】

（形質転換植物／植物細胞）

本発明に適切な好ましい宿主生物は、植物である。

【０２２９】

この局面では、遺伝子改変植物の構築物における基本的原理は、植物ゲノムに遺伝情報を挿入して、挿入遺伝物質を安定に維持することである。

【０２３０】

遺伝情報の挿入のためのいくつかの技法が存在し、２つの主な原理は、遺伝情報の直接導入およびベクター系の使用による遺伝情報の導入である。一般的技法の概説を、Ｐｏｔｒｙｋｕｓ（Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ［１９９１］４２：２０５－２２５）およびＣｈｒｉｓｔｏｕ（Ａｇｒｏ－Ｆｏｏｄ－Ｉｎｄｕｓｔｒｙ Ｈｉ－Ｔｅｃｈ Ｍａｒｃｈ／Ａｐｒｉｌ，１９９４，１７－２７）の論文に見出すことができる。

【０２３１】

本発明のプロモーターは、ＥＰ－Ｂ－０４７０１４５およびＣＡ－Ａ－２００６４５４で開示されていないとしても、これら２つの文献は、本発明のトランスジェニック植物の調製で使用することができる技法のタイプについてのいくつかの有用なバックグラウンドを解説している。これらのバックグラウンドの教示のいくつかは、以下の解説に含まれる。

【０２３２】

遺伝子改変植物構築の基本的原理は、植物ゲノムに遺伝情報を挿入して、挿入された遺伝物質を安定に維持することである。

【０２３３】

従って、１つの局面では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列または構築物を含み、植物などの生物のゲノムにヌクレオチド配列または構築物を導入することができるベクター系に関する。

【０２３４】

ベクター系は、１つのベクターを含み得るが、２つのベクターを含んでいてもよい。２つのベクターの場合、通常ベクター系はバイナリベクター系と呼ばれる。バイナリベクター系は、Ｇｙｎｈｅｕｎｇ Ａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８０），Ｂｉｎａｒｙ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｍａｎｕａｌ Ａ３，１－１９にさらに詳述されている。

【０２３５】

所与のプロモーターもしくはヌクレオチド配列または構築物を使用した１つの広範に使用されている植物細胞の形質転換系は、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ由来のＴｉプラスミドまたはＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓ由来のＲｉプラスミドの使用に基づく（Ａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６），Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．８１，３０１－３０５およびＢｕｔｃｈｅｒ Ｄ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｐａｔｈｏｌｏｇｉｓｔｓ，ｅｄｓ．：Ｄ．Ｓ．Ｉｎｇｒａｍｓ ａｎｄ Ｊ．Ｐ．Ｈｅｌｇｅｓｏｎ，２０３－２０８）。

【０２３６】

上記の植物または植物細胞構築物の構築に適したいくつかの異なるＴｉおよびＲｉプラスミドが構築されている。このようなＴｉプラスミドの非限定的な例は、ｐＧＶ３８５０である。

【０２３７】

少なくとも１つのこれらの領域が植物ゲノムへの改変Ｔ－ＤＮＡの挿入に不可欠であるようなので、Ｔ－ＤＮＡ境界のすぐ周囲の配列の崩壊を回避するために、本発明のヌクレオチド配列または構築物を、好ましくはＴ－ＤＮＡの末端配列の間の、またはＴ－ＤＮＡ配列に隣接したＴｉ－プラスミドに挿入すべきである。

【０２３８】

上記説明から理解されるように、生物が植物である場合、本発明のベクター系は、好ま

しくは、植物の感染に必要な配列（例えば、ｖｉｒ領域）およびＴ－ＤＮＡ配列の少なくとも１つの境界部分（境界部分は、遺伝子構築物と同一のベクター上に存在する）を含むものである。好ましくは、ベクター系は、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ Ｔｉ－プラスミドまたはＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓ Ｒｉ－プラスミドまたはその誘導体であるが、それは、これらのプラスミドが周知であり、且つトランスジェニック植物の構築で広範に使用されており、これらのプラスミドまたはその誘導体に基づいた多数のベクター系が存在するからである。

【０２３９】

トランスジェニック植物の構築では、本発明のヌクレオチド配列または構築物を、ベクターを複製することができ、且つ植物への挿入前の操作が容易な微生物中で最初に構築することができる。有用な微生物の例はＥ．ｃｏｌｉであるが、上記性質を有する他の微生物を使用することができる。上記定義のベクター系のベクターがＥ．ｃｏｌｉ中に構築されている場合、必要に応じて、これを適切なＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ株（例えば、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）に移入する。従って、本発明のヌクレオチド配列または構築物を有するＴｉ－プラスミドを、好ましくは、適切なＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ株（例えば、Ａ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）に移入して、本発明のヌクレオチド配列または構築物を有するＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ細胞を得て、その後そのＤＮＡを改変すべき植物細胞に移入する。

【０２４０】

ＣＡ－Ａ－２００６４５４号で報告されているように、Ｅ．ｃｏｌｉ中の複製系および形質転換細胞の選択が可能なマーカーを含む、大量のクローニングベクターが利用可能である。ベクターは、例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣシリーズ、Ｍ１３ｍｐシリーズ、ｐＡＣＹＣ１８４などを含む。

【０２４１】

このように、本発明のヌクレオチドまたは構築物を、ベクター中の適切な制限部位に導入することができる。含まれるプラスミドを、Ｅ．ｃｏｌｉでの形質転換に使用する。Ｅ．ｃｏｌｉ細胞を、適切な栄養培地中で培養し、回収および溶菌する。次いで、プラスミドを回収する。分析法として、一般的に使用される配列分析、制限分析、電気泳動、およびさらに生化学的分子生物学法が存在する。各操作の後、使用したＤＮＡ配列を制限消化し、次のＤＮＡ配列に連結することができる。各配列を、同一または異なるプラスミドにクローニングすることができる。

【０２４２】

植物における本発明の所望のプロモーター、構築物、またはヌクレオチド配列の各導入法の後に、さらなるＤＮＡ配列の存在および／または挿入が必要であり得る。例えば、形質転換のために、植物細胞のＴｉ－プラスミドまたはＲｉ－プラスミドを使用する場合、導入遺伝子領域が隣接しているのでＴｉ－プラスミドおよびＲｉ－プラスミドのＴ－ＤＮＡの右の境界、しかし多くの場合は左右の境界を連結することができる。植物細胞の形質転換のためのＴ－ＤＮＡの使用が広く研究されており、ＥＰ－Ａ－第１２０５１６；Ｈｏｅｋｅｍａ，ｉｎ：Ｔｈｅ Ｂｉｎａｒｙ Ｐｌａｎｔ Ｖｅｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍ Ｏｆｆｓｅｔ－ｄｒｕｋｋｅｒｉｊ Ｋａｎｔｅｒｓ Ｂ．Ｂ．，Ａｌｂｌａｓｓｅｒｄａｍ，１９８５，Ｃｈａｐｔｅｒ Ｖ；Ｆｒａｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉ．，４：１－４６；およびＡｎ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．（１９８５）４：２７７－２８４に記載されている。

【０２４３】

Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍによる植物組織の直接感染は、広範に使用され、Ｂｕｔｃｈｅｒ Ｄ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．（１９８０），Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｐａｔｈｏｌｏｇｉｓｔｓ，ｅｄｓ．：Ｄ．Ｓ．Ｉｎｇｒａｍｓ ａｎｄ Ｊ．Ｐ．Ｈｅｌｇｅｓｏｎ，２０３－２０８に記載されている簡単な技法である。この主題に関するさらなる教示については、Ｐｏｔｒｙｋｕｓ（Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂ

ｉｏｌ［１９９１］４２：２０５－２２５）およびＣｈｒｉｓｔｏｕ（Ａｇｒｏ－Ｆｏｏｄ－Ｉｎｄｕｓｔｒｙ Ｈｉ－Ｔｅｃｈ Ｍａｒｃｈ／Ａｐｒｉｌ １９９４ １７－２７）を参照のこと。この技法を使用して、植物の一定の部分または組織（すなわち、葉、根、幹の一部または植物の別の部分）に対して植物を感染させることができる。

【０２４４】

典型的には、プロモーターおよび／またはＧＯＩを保有するＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍによる植物組織の直接感染を使用して、例えば、カミソリでの植物の切断、ニードルでの植物の穿刺、または研磨材での植物の摩擦によって、感染させるべき植物に傷をつける。次いで、傷にＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを接種する。次いで、接種された植物または植物部分を、適切な培養培地で増殖させ、成熟植物に成長させる。

【０２４５】

植物細胞が構築された場合、これらの細胞を、アミノ酸、植物ホルモン、ビタミンなどの必要な成長因子を供給した適切な培養培地での細胞の培養などの周知の組織培養法に従って成長させ、維持することができる。細胞または組織培養から植物を再生する公知の方法（例えば、抗生物質を使用した形質転換シュートの選択および適切な栄養素、植物ホルモンなどを含む培地でのシュートの継代培養による）を使用して、形質転換細胞を遺伝子改変植物に再生することができる。

【０２４６】

他の植物の形質転換技法には、弾道的（ｂａｌｌｉｓｔｉｃ）形質転換、シリコンウィスカーカーバイド（ｓｉｌｉｃｏｎ ｗｈｉｓｋｅｒ ｃａｒｂｉｄｅ）技法（Ｆｒａｍｅ ＢＲ, Ｄｒａｙｔｏｎ ＰＲ, Ｂａｇｎａａｌｌ ＳＶ, Ｌｅｗｎａｕ ＣＪ, Ｂｕｌｌｏｃｋ ＷＰ, Ｗｉｌｓｏｎ ＨＭ, Ｄｕｎｗｅｌｌ ＪＭ, Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ＪＡ & Ｗａｎｇ Ｋ（１９９４）Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｆｅｒｔｉｌｅ ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ ｍａｉｚｅ ｐｌａｎｔｓ ｂｙ ｓｉｌｉｃｏｎ ｃａｒｂｉｄｅ ｗｈｉｓｋｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ, Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｊｏｕｒｎａｌ ６：９４１－９４８を参照のこと）およびウイルス形質転換技法（例えば、Ｍｅｙｅｒ Ｐ, Ｈｅｉｄｍａｎｎ Ｉ & Ｎｉｅｄｅｎｈｏｆ Ｉ（１９９２）Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｃａｓｓａｖａ ｍｏｓａｉｃ ｖｉｒｕｓ ａｓ ａ ｖｅｃｔｏｒ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｐｌａｎｔｓ, Ｇｅｎｅ, １１０：２１３－２１７を参照のこと）が含まれる。弾道的形質転換技法は、以下の節に示す。

【０２４７】

さらなる植物形質転換技法を、ＥＰ－Ａ－０４４９３７５に見出すことができる。

植物および植物組織の弾道的形質転換

示唆するように、トランスジェニック植物の産生技法は、当該技術分野で周知である。典型的には、植物全体、細胞、またはプロトプラストのいずれかを、ジンクフィンガー分子または標的ＤＮＡ（例えば、上記の核酸構築物を参照のこと）をコードする適切な核酸構築物で形質転換することができる。多数の形質転換ＤＮＡ構築物の細胞への導入方法が存在するが、全てが植物細胞へのＤＮＡの送達に適しているわけではない。適切な方法には、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ感染（特に、Ｔｕｒｐｅｎ ｅｔ ａｌ., １９９３, Ｊ. Ｖｉｒｏｌ. Ｍｅｔｈｏｄｓ, ４２：２２７－２３９を参照のこと）または例えば、ＰＥＧ媒介形質転換、エレクトロポレーション、またはＤＮＡ被覆粒子の加速などの直接ＤＮＡ送達が含まれる。一般に加速法が好ましく、例えば、微粒子銃が含まれる。

【０２４８】

Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓによる形質転換に抵抗する植物種の安定な形質転換体の産生のために最初に開発された、金属粒子の表面上の細胞にＤＮＡを導入する植物組織の弾道的形質転換は、一過性発現における遺伝子構築物の性能の試験に有用性がある。この方法では、目的の遺伝子を安定に組み込むことなく一過的に形質転換した細胞における遺伝子発現を研究することができるので、時間のかかる安定な形質

転換体の作製が必要ない。

【０２４９】

より詳細には、弾道的形質転換技法（遺伝子銃技法としても既知）は、Ｋｌｅｉｎら（１９８７）、Ｓａｎｆｏｒｄら（１９８７）、およびＫｌｅｉｎら（１９８８）によって最初に記載され、簡単な取り扱いおよび目的の細胞または組織の前処理の不要により広まった。

【０２５０】

遺伝子銃技法の原理は、駆動力（例えば、放電または圧縮空気）によるインタクトな植物細胞へのＤＮＡ被覆微粒子（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅ）の直接的送達である。小さな損傷のみで微粒子が細胞壁および細胞膜を貫通し、その後に形質転換細胞がプロモーター構築物を発現する。

【０２５１】

実施することができる１つの遺伝子銃技法は、Ｆｉｎｅｒら（１９９２）およびＶａｉｎら（１９９３）によって開発および記載されているＰａｒｔｉｃｌｅ　Ｉｎｆｌｏｗ　Ｇｕｎ（ＰＩＧ）を使用する。ＰＩＧは、不完全真空によってヘリウム流中で微粒子を植物細胞中に加速させる。

【０２５２】

ＰＩＧの１つの利点は、微粒子の加速をタイマー中継ソレノイドおよび供給されるヘリウム圧の調節によって制御することができることである。駆動力としての加圧ヘリウムの使用は、不活性であり、残渣が生じず、再現性のある加速を与えるという利点を有する。真空によって粒子の吸い込みが減少し、衝突前のヘリウムガスの拡散によって組織の損傷が減少する（Ｆｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．　１９９２）。

【０２５３】

場合によっては、ＰＩＧシステムの有効性および容易さにより、一過性形質転換グアール組織の作製のための良好な選択が行われ、プロモーター／レポーター遺伝子融合物の一過性発現について試験した。

【０２５４】

米国特許第５，８７４，２６５号から得た典型的なトランスジェニック植物（特に、単子葉植物）の産生プロトコールを以下に記載する。

【０２５５】

植物細胞への形質転換ＤＮＡセグメントの送達方法の例は、微粒子銃である。この方法では、非生物学的粒子を核酸で被覆して、推進力によって細胞に送達させることができる。粒子の例には、タングステン、金、および白金などから構成される粒子が含まれる。

【０２５６】

遺伝子銃の特定の利点は、双子葉植物および単子葉植物の両方を再生可能に安定に形質転換する有効な手段であることに加えて、プロトプラストの単離もＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ感染に対する感受性も必要ないことである。加速による植物細胞へのＤＮＡの送達方法の例示的実施形態は、ステンレス鋼またはＮｙｔｅｘスクリーンなどのスクリーンを介して、ＤＮＡで被覆した粒子を懸濁液中で培養した植物細胞で被覆したフィルター表面上に推進するため使用することができるＢｉｏｌｉｓｔｉｃｓ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍである。スクリーンにより、タングステン－ＤＮＡ粒子が巨大な凝集物としてレシピエント細胞に送達されないように分散される。発射装置と撃ち込まれる細胞との間に介在するスクリーンを使用しないと、発射物が凝集し、高頻度の形質転換の達成には大きすぎると考えられる。これは、大きすぎる発射物によるレシピエント細胞の損傷に起因し得る。

【０２５７】

撃ち込みのために、懸濁液中の細胞を、フィルターで濃縮することが好ましい。撃ち込まれる細胞を含むフィルターを、微粒子ストッピングプレート下に適切な距離で置く。所望ならば、１つまたは複数のスクリーンを、銃と撃ち込まれる細胞との間にも置く。本明細書中に記載の技法の使用により、撃ち込まれたフィルター上にマーカー遺伝子（「フォ

ーカス」）を一過的に発現する１０００個以上の細胞クラスターを得ることができる。撃ち込みから４８時間後に外因性遺伝子産物を発現するフォーカス中の細胞数は、しばしば１から１０個および平均２から３個の範囲である。

【０２５８】

上記で考察された任意の方法によるレシピエント細胞への外因性ＤＮＡの送達後、好ましい工程は、さらなる培養および植物再生のための形質転換細胞の同定である。この工程は、スクリーニング可能な形質について培養物を直接アッセイすること、または選択薬へ撃ち込んだ培養物を曝露することによりアッセイすることを含み得る。

【０２５９】

スクリーニング可能なマーカー形質の例は、トウモロコシのＲ遺伝子座の制御下で産生される赤色の色素である。この色素を、この段階の成長を補助することができる栄養培地を含む固体支持体での細胞の培養、例えば１８℃で１８０μＥｍ$^{-2}$ｓ$^{-1}$を超えて細胞のインキュベーション、および着色したコロニー（視覚可能な細胞の凝集体）からの細胞の選択によって検出することができる。これらの細胞を、さらに懸濁液または固体培地のいずれかで培養することができる。

【０２６０】

形質転換細胞を同定する方法の例示的実施形態は、撃ち込んだ培養物の選択薬（代謝インヒビター、抗生物質、除草剤など）への曝露を含む。形質転換されて使用した選択薬への耐性を付与するマーカー遺伝子を安定に組み込んだ細胞が培地中で増殖し、分裂する。感受性細胞は、さらなる培養に供さない。

【０２６１】

ｂａｒ－ビアラホス選択系を使用するために、フィルター上に撃ち込んだ細胞を非選択液体培地に再懸濁し、培養し（例えば、１～２週間）、１～３ｍｇ／ｌのビアラホスを含む固体培地を重層したフィルターに移した。典型的には１～３ｍｇ／ｌの範囲が好ましいが、本発明の実施において０．１～５０ｍｇ／ｌの範囲が有用であることが提唱される。撃ち込み用のフィルターのタイプは、特に重大ではないと考えられるが、任意の固体で多孔質の不活性支持体を含み得る。

【０２６２】

選択薬への曝露で生存した細胞を、植物の再生を補助する培地で培養することができる。組織を、ホルモンを含む基本培地で約２～４週間維持し、その後ホルモンを含まない培地に移す。２～４週間後、シュートの成長が別の培地へ移す時間の合図となる。

【０２６３】

再生は、典型的には、形質転換カルスからより成熟した植物への連続的な成長段階で適切な栄養素およびホルモンシグナルが得られるようにその組成が改変された培地に順次移していくことが必要である。成長途上の小植物を、例えば、約８５％の相対湿度、６００ｐｐｍのCO_2、および２５０μＥｍ$^{-2}$ｓ$^{-1}$の光で環境を制御されたチャンバー内で土壌に移し、土壌を固める。好ましくは、植物を、成長チャンバーまたは温室のいずれかで成熟させる。典型的には、再生には、約３～１２週間を要する。再生中に、細胞を、組織培養容器中の固体培地で成長させる。このような容器の例示的な実施形態は、ペトリ皿である。再生植物を、好ましくは、約１９℃～２８℃で成長させる。再生後、植物がシュートおよび根の発達段階に達し、さらなる成長および試験のために温室に移すことができる。

【０２６４】

ＰＣＲおよび／またはサザンブロッティングなどの当業者に周知の技法の使用によって外因性遺伝子の存在を決定するために、ゲノムＤＮＡをカルス細胞株および植物から単離することができる。

【０２６５】

遺伝情報の挿入のためのいくつかの技法が存在し、２つの主な原理は、遺伝情報の直接導入およびベクター系の使用による遺伝情報の導入である。一般的技法の概説は、Ｐｏｔｒｙｋｕｓ（Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．

Ｂｉｏｌ［１９９１］４２：２０５－２２５）およびＣｈｒｉｓｔｏｕ（Ａｇｒｏ－Ｆｏｏｄ－Ｉｎｄｕｓｔｒｙ Ｈｉ－Ｔｅｃｈ Ｍａｒｃｈ／Ａｐｒｉｌ １９９４ １７－２７）の論文に見出すことができる。

【０２６６】

（培養および産生）

ヌクレオチド配列で形質導入した宿主細胞を、コードされた酵素の産生に有益であり、細胞および／または培養培地からの酵素の回収が容易になる条件下で培養することができる。

【０２６７】

細胞培養で使用した培地は、該当する宿主細胞の増殖および酵素の発現に適した任意の従来の培地であり得る。適切な培地は、市販されているか、公開されたレシピ（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎのカタログに記載）に従って調製することができる。

【０２６８】

組換え細胞によって産生されたタンパク質を、細胞表面にディスプレイすることができる。所望ならば、当業者に理解されるように、コード配列を含む発現ベクターを、特定の原核細胞膜または真核細胞膜によるコード配列の分泌を指示するシグナル配列を使用して設計することができる。他の組換え構築物は、コード配列を可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に連結することができる（Ｋｒｏｌｌ ＤＪ ｅｔ ａｌ（１９９３）ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １２：４４１－５３）。

【０２６９】

宿主細胞から酵素を分泌することができ、遠心分離または濾過による培地からの細胞の分離、および硫酸アンモニウムなどの塩による培地のタンパク質成分の沈殿、およびその後のイオン交換クロマトグラフィまたはアフィニティクロマトグラフィなどのクロマトグラフ手順の使用を含む周知の手順によって培養培地から都合よく回収することができる。

【０２７０】

（分泌）

しばしば、酵素をより容易に回収することができる培養培地に発現宿主から酵素を分泌させることが望ましい。本発明によれば、所望の発現宿主に基づいて、分泌リーダー配列を選択することができる。本発明の状況によってハイブリッドシグナル配列を使用することもできる。

【０２７１】

異種分泌リーダー配列の典型的な例は、真菌アミログルコシダーゼ（ＡＧ）遺伝子（ｇｌａＡ－例えば、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ由来の１８アミノ酸および２４アミノ酸のバージョン）、ａ因子遺伝子（酵母、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ、およびＨａｎｓｅｎｕｌａ）、またはα－アミラーゼ遺伝子（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）由来の配列である。

【０２７２】

（検出）

アミノ酸配列発現の種々の検出および測定プロトコールが当該技術分野で既知である。例には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、および蛍光標示式細胞分取法（ＦＡＣＳ）が含まれる。ＰＯＩ上の２つの非妨害エピトープに反応性を示すモノクローナル抗体を使用する２部位モノクローナルベースの免疫アッセイを使用するか、競合結合アッセイを使用することができる。これらおよび他のアッセイはとりわけ、Ｈａｍｐｔｏｎ Ｒら（１９９０，Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＡＰＳ Ｐｒｅｓｓ，Ｓｔ Ｐａｕｌ ＭＮ）およびＭａｄｄｏｘ ＤＥら（１９８３，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １５，８：１２１ １）中に記載されている。

【０２７３】

広範な種々の標識および結合技法は当業者に既知であり、種々の核酸およびアミノ酸アッセイで使用することができる。アミノ酸配列検出用の標識ハイブリッド形成またはＰＣＲプローブの産生手段には、標識ヌクレオチドを使用したオリゴ標識、ニック翻訳、末端標識、またはＰＣＲ増幅が含まれる。あるいは、ＮＯＩまたはその任意の部分を、ｍＲＮＡプローブの産生のためにベクターにクローニングすることができる。このようなベクターは当該技術分野で既知であり、市販されており、Ｔ７、Ｔ３、またはＳＰ６などの適切なＲＮＡポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドの付加によるインビトロでのＲＮＡプローブの合成に使用することができる。

【０２７４】

多数の企業（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ （Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ, ＮＪ）、Ｐｒｏｍｅｇａ （Ｍａｄｉｓｏｎ, ＷＩ）、およびＵＳ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ （Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ, ＯＨ）など）が市販のキットおよびこれらの手順についてのプロトコールを提供している。適切なレポーター分子またはラベルには、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光剤、または発色剤、ならびに基質、補因子、インヒビター、および磁性粒子などが含まれる。このような標識の使用を教示する特許には、米国特許第３，８１７，８３７号、同第３，８５０，７５２号、同第３，９３９，３５０号、同第３，９９６，３４５号、同第４，２７７，４３７号、同第４，２７５，１４９号、および同第４，３６６，２４１号が含まれる。また、組換え免疫グロブリンを、米国特許第４，１８６，５６７号に記載のように産生することができる。

【０２７５】

アミノ酸配列のさらなる発現定量法には、放射性標識（Ｍｅｌｂｙ ＰＣ ｅｔ ａｌ １９９３ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １５９：２３５－４４）またはビオチン処理（Ｄｕｐｌａａ Ｃ ｅｔ ａｌ １９９３ Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２２９－３６）ヌクレオチド、制御核酸の同時増幅、および実験結果を補間した検量線が含まれる。複数のサンプルの定量を、目的のオリゴマーを種々の希釈度で提供して分光光度計または熱量応答によって迅速に定量するＥＬＩＳＡ形式でのアッセイの実施によって高速化することができる。

【０２７６】

マーカー遺伝子発現の有無によりヌクレチド配列も存在することが示唆されるが、その存在および発現を確認しなければならない。例えば、ヌクレオチド配列をマーカー遺伝子配列内に挿入する場合、ヌクレオチド配列を含む組換え細胞をマーカー遺伝子機能の非存在によって同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子を、本発明のプロモーターまたは別のプロモーター（好ましくは、本発明の同一のプロモーター）の制御下でヌクレオチド配列と共に縦列に置くことができる。誘導または選択に応答するマーカー遺伝子の発現は、同様に通常アミノ酸配列の発現を示す。

【０２７７】

あるいは、ヌクレオチド配列を含む宿主細胞を、当業者に既知の種々の手順によって同定することができる。これらの手順には、ＤＮＡ－ＤＮＡまたはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド形成、ならびに核酸またはタンパク質の検出および／または定量のための膜ベース、溶液ベース、またはチップベースのテクノロジーが含まれるタンパク質バイオアッセイまたは免疫アッセイ技法が含まれるが、これらに限定されない。

【０２７８】

（融合タンパク質）

本発明のアミノ酸配列を、例えば、抽出および精製を補助するために融合タンパク質として産生することができる。融合タンパク質パートナーの例には、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、６ｘＨｉｓ、ＧＡＬ４（ＤＮＡ結合および／または転写活性化ドメイン）、およびβ－ガラクトシダーゼが含まれる。融合タンパク質配列を除去するため、融合タンパク質パートナーと目的のタンパク質配列との間のタンパク質分解性切断部位を含むことも便利であり得る。好ましくは、融合タンパク質は、タンパク質配列の活性を妨害しない。

【０２７９】
融合タンパク質は、本発明の物質と融合した抗原または抗原決定基を含み得る。この実施形態では、融合タンパク質は、免疫系の全身刺激の提供という意味でアジュバントとして作用することができる物質を含む天然に存在しない融合タンパク質であり得る。抗原または抗原決定基を、物質のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに結合することができる。
【０２８０】
本発明の別の実施形態では、融合タンパク質をコードするために、アミノ酸配列を異種配列にライゲーションすることができる。例えば、物質活性に影響を与えることができる作用因子についてのペプチドライブラリーのスクリーニングのために、市販の抗体によって認識される異種エピトープを発現するキメラ物質をコードすることが有用であり得る。
【０２８１】
（さらなるＰＯＩ）
本発明の配列を、１つまたは複数のさらなる目的のタンパク質（ＰＯＩ）または目的のヌクレオチド配列（ＮＯＩ）と組み合わせて使用することができる。
【０２８２】
ＰＯＩの非限定的な例には、デンプン代謝に関連するタンパク質もしくは酵素、グリコーゲン代謝に関与するタンパク質もしくは酵素、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、α－ガラクトシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、α－グルカナーゼ、グルカンリサーゼ（ｌｙｓａｓｅ）、エンド－β－グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、α－グルコシダーゼ、β－グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、フィターゼ、ポリガラクツロナーゼ、プロテアーゼ、ラムノガラクツロナーゼ、リボヌクレアーゼ、タウマチン、トランスフェラーゼ、輸送タンパク質、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ（Ｄ－ヘキソース：O_2－オキシドレダクターゼ、ＥＣ１．１．３．５）、またはその組み合わせが含まれる。ＮＯＩは、さらに、任意のこれらの配列のアンチセンス配列であってもよい。
【０２８３】
ＰＯＩは、さらに、例えば、抽出および精製を補助するための融合タンパク質であってもよい。
【０２８４】
融合タンパク質パートナーの例には、マルトース結合タンパク質、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、６ｘＨｉｓ、ＧＡＬ４（ＤＮＡ結合および／または転写活性化ドメイン）、およびβ－ガラクトシダーゼが含まれる。融合成分との間にタンパク質分解性切断部位を含むことも便利であり得る。
【０２８５】
ＰＯＩを、さらに、分泌配列に融合することもできる。分泌リーダー配列の例は、アミログルコシダーゼ遺伝子、α因子遺伝子、α－アミラーゼ遺伝子、リパーゼＡ遺伝子、キシラナーゼＡ遺伝子由来のものである。
【０２８６】
他の配列もまた、分泌されたＰＯＩの分泌を促進するか、または収量を増大させることができる。このような配列は、例えば、英国特許出願第９８２１１９８．０に記載のＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ　ｃｙｐ　Ｂ遺伝子産物としてシャペロンタンパク質をコードすることができる。
【０２８７】

ＮＯＩを、多数の理由のためにその活性を変化させるように操作することができる（その発現産物のプロセシングおよび／または発現を改変する変化が含まれるが、これに限定されない）。例えば、新規の制限部位を挿入するためか、グリコシル化パターンを変化させるためか、コドン優先度を変化させるために当該技術分野で周知の技法（例えば、部位特異的変異誘発）を使用して、変異を導入することができる。さらなる例として、特定の宿主細胞での発現を最適化するためにＮＯＩを改変することもできる。制限酵素認識部位を導入するために、他の配列の変化が望ましい場合もある。

【０２８８】

ＮＯＩは、合成または改変ヌクレオチドをその中に含むことができる。オリゴヌクレオチドに対する多数の異なる改変型が当該技術分野で既知である。これらには、ホスホン酸メチルおよびホスホロチオエート骨格、分子の３’および／または５’末端でのアクリジンまたはポリリジン鎖の付加が含まれる。本発明の目的のために、ＮＯＩを当該技術分野で利用可能な任意の方法によって改変することができると理解すべきである。ＮＯＩのインビボ活性の増大または寿命の延長のためにこのような改変を行うことができる。

【０２８９】

ＮＯＩを、細胞内の安定性および半減期の増大のために改変することができる。可能な改変には、分子の５’および／または３’末端の隣接配列の付加、あるいは分子の骨格内のホスホジエステラーゼ結合よりもむしろホスホロチオエートまたは２’Ｏ－メチルの使用が含まれるが、これらに限定されない。

【０２９０】

（抗体）

本発明の１つの局面は、請求項１に記載のアミノ酸配列のうちの１つまたは複数と免疫反応を示すアミノ酸配列に関する。

【０２９１】

標準的技法（本発明の物質での免疫化またはファージディスプレイライブラリーの使用など）によって、抗体を産生することができる。

【０２９２】

本発明の目的のために、用語「抗体」には、反対であることを特記しない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生されたフラグメント、ならびにその模倣物が含まれるが、これらに限定されない。このようなフラグメントには、標的物質に対する結合活性が保持されている完全な抗体のフラグメント（Ｆｖ、Ｆ（ａｂ’）、およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント）ならびに抗体の抗原結合部位を含む単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、融合タンパク質、および他の合成タンパク質が含まれる。さらに、抗体およびそのフラグメントは、ヒト化抗体であり得る。中和抗体（すなわち、物質ポリペプチドの生物活性を阻害する抗体）は、診断および治療に特に好ましい。

【０２９３】

ポリクローナル抗体が望ましい場合、選択された哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど）を、本発明の配列（またはその免疫エピトープを含む配列）で免疫化する。宿主の種に依存して、種々のアジュバントを使用して、免疫応答を増大させることができる。このようなアジュバントには、フロイントのアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、およびリゾレシチンなどの界面活性剤、プルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが含まれるが、これらに限定されない。ＢＣＧ（Ｂａｃｉｌｌｉ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍは、物質を精製した場合にポリペプチドを全身防御の刺激のために免疫無防備個体に投与することを使用することができる潜在的に有用なヒトアジュバントである。

【０２９４】

免疫化動物由来の血清を回収し、既知の手順に従って処置する。本発明の配列（または

その免疫エピトープを含む配列）に対するポリクローナル抗体を含む血清が他の抗原に対する抗体を含む場合、ポリクローナル抗体を免疫親和性クロマトグラフィによって精製することができる。ポリクローナル抗血清の産生およびプロセシング技法は、当該技術分野で既知である。このような抗体を作製することができるように、本発明はまた、本発明のポリペプチド、あるいは動物またはヒトにおける免疫源として使用する別のポリペプチドにハプテン化した（ｈａｐｔｅｎｉｓｅｄ）そのフラグメントを提供する。

【０２９５】

本発明の配列（またはその免疫エピトープを含む配列）に指向するモノクローナル抗体も、当業者は容易に産生することができる。ハイブリドーマによる一般的なモノクローナル抗体作製方法は、周知である。不死化抗体産生細胞株を、細胞融合、および発癌性ＤＮＡでのＢリンパ球の直接形質転換またはエプスタイン－バーウイルスでのトランスフェクションなどの他の技法によってもまた作製することができる。オービット（ｏｒｂｉｔ）エピトープに対して産生されたモノクローナル抗体のパネルを、種々の性質（すなわち、アイソフォームおよびエピトープ親和性）についてスクリーニングすることができる。

【０２９６】

本発明の配列（またはその免疫エピトープを含む配列）に対するモノクローナル抗体を、培養における連続細胞株によって抗体分子が産生される任意の技法を使用して調製することができる。これらには、Ｋｏｅｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５ Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７）に最初に記載されたハイブリドーマ技法、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技法（Ｋｏｓｂｏｒ ｅｔ ａｌ（１９８３） Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ ４：７２； Ｃｏｔｅ ｅｔ ａｌ（１９８３） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８０：２０２６－２０３０）、およびＥＢＶ－ハイブリドーマ技法（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ（１９８５） Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ, Ａｌａｎ Ｒ Ｌｉｓｓ Ｉｎｃ, ｐｐ ７７－９６）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、「キメラ抗体」の産生のために開発された技法（適切な抗原特異性および生物活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシング）を使用することができる（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ（１９８４） Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８１：６８５１－６８５５； Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ（１９８４） Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８； Ｔａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ（１９８５） Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２－４５４）。あるいは、単鎖抗体産生について記載した技法（米国特許第４，９４６，７７９号）を、物質特異的単鎖抗体の産生に適合させることができる。

【０２９７】

リンパ球集団におけるインビボ産生の誘導またはＯｒｌａｎｄｉら（１９８９， Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８６：３８３３－３８３７）に記載の組換え免疫グロブリンライブラリーまたは高度に特異的な結合試薬のパネルのスクリーニング、およびウィンターＧおよびミルスタインＣ（１９９１；Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９）によって抗体を産生することもできる。

【０２９８】

物質の特異的結合部位を含む抗体フラグメントを、作製することもできる。例えば、このようなフラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって産生することができるＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントのジスルフィド結合の還元によって作製することができるＦａｂフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、Ｆａｂ発現ライブラリーを、所望の特異性を有するモノクローナルＦａｂフラグメントが迅速且つ容易に同定されるように構築することができる（Ｈｕｓｅ ＷＤ ｅｔ ａｌ（１９８９） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：１２７５－１２８１）。

【０２９９】

（大規模適用）

本発明の１つの好ましい実施形態では、大規模適用のためにアミノ酸配列を使用する。

【０３００】

好ましくは、宿主生物の培養後の１リットルの総細胞培養体積あたり１ｇ～約２ｇの量でアミノ酸配列を産生する。

【０３０１】

好ましくは、宿主生物の培養後の１リットルの総細胞培養体積あたり１００ｍｇ～約９００ｍｇの量でアミノ酸配列を産生する。

【０３０２】

好ましくは、宿主生物の培養後の１リットルの総細胞培養体積あたり２５０ｍｇ～約５００ｍｇの量でアミノ酸配列を産生する。

【０３０３】

（まとめ）

まとめると、本発明は、アミノ酸配列およびヌクレオチド配列、またこれを含む構築物に関する。本発明はまた、既知の酵素の新規の使用に関する。

【０３０４】

本発明を、以下の非限定的な実施例において、以下の図面を参照してさらに説明する。

【実施例】

【０３０５】

（真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍから精製したピラノゾン脱水素酵素）

Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ（白色腐朽菌）は、その高い最適成長温度（４０℃）および一定範囲の菌体外酸化酵素の産生能力により、生物工学的に重要な真菌である。従って、この真菌は、種々の廃棄物（爆発性汚染物質、殺虫剤、および有毒廃棄物が含まれる）の処理に使用されている。さらに、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍは、配列決定された最初のｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｅｔｅゲノムである（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ　ａｎｄ　Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｅｎｅｒｇｙ，　ＵＳＡ）。

【０３０６】

アンヒドロフルクトース（ＡＦ）を代謝する酵素の研究では、Ｐ．ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍから精製された熱安定性ピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）が得られた。研究により、この精製ＰＤは基質としてＡＦを使用するだけでなく、その天然の基質であるグルコソンよりもより有効に使用することが示された。さらに、生成物は、植物保護剤において有用な抗真菌剤ミクロセシンであることが示された。

【０３０７】

ＰＤのＮ末端配列および２つのプロテイナーゼでの加水分解後のＰＤのエンド－Ｎ末端配列を解明した。これらは共に３３２アミノ酸、すなわち、Ｍｒが９７ｋＤａであるという想定に基づいてＰＤタンパク質の全長の３７％を占める。

【０３０８】

真菌ゲノムについて上記部分的アミノ酸配列を使用したデータベース検索によって、Ｓｃａｆｆｏｌｄ６２で全長ＰＤ遺伝子を同定した（図４）。共に３つのイントロンを含む転写開始および終止コドンが同定された（図４）。精製ＰＤはＮ末端の７つのアミノ酸が短縮されているが、依然として機能的であるようである。培養培地中に酵素ＰＤは見出されなかったので、シグナルペプチドを含み得ない。

【０３０９】

（アッセイ方法）

（ＰＤ活性の測定）

反応混合物は、２５μｌのアンヒドロフルクトース溶液（３．０％）、１０μｌのＰＤ調製物、９３μｌの０．１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．５）、および最終体積を１ｍｌにする水からなっていた。反応物を混合し、５分毎または３０分後にＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｌａｍｂｄａ１８ｕｖ／ｖｉｓ分光光度計にて室温（２２℃）で１９０～３２０ｎｍをスキャンした。２６５ｎｍおよび２３０ｎｍの吸光度を記録した。ＰＤの１活性単位を、２２℃で１分あたり２３０ｎｍでの０．０１吸光単位の増加と定義する。

【０３１０】
Ｂｉｏ－Ｒａｄ ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓからの試薬および説明書を使用したＢｉｏ－Ｒａｄ法（Ｂｒａｄｆｏｒｄ法）を使用してタンパク質アッセイを行った（Ｐｅｔｅｒｓｏｎ，ＧＬ：Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｏｔａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．９１，９５－１１９（１９８３））。
【０３１１】
グルコース、ＡＦ、およびミクロセシンを分離するために、以前に記載のように、酢酸エチル、酢酸、メタノール、および水（１２：３：３：２）の溶媒系を使用してＴＬＣを行った（Ｙｕ Ｓ，Ａｈｍａｄ Ｔ，Ｐｅｄｅｒｓｅｎ Ｍ，Ｋｅｎｎｅ Ｌ：α－１，４－Ｇｌｕｃａｎ ｌｙａｓｅ，ａ ｎｅｗ ｃｌａｓｓ ｏｆ ｓｔａｒｃｈ／ｇｌｙｃｏｇｅｎ ｄｅｇｒａｄｉｎｇ ｅｎｚｙｍｅ．ＩＩＩ．Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ，ｍｏｄｅ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ，ａｎｄ ｃｌｅａｖａｇｅ ｍｅｃｈａｎｉｓｍ，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １２４４；１－９（１９９５））。厚さ０．１５ｍｍのＭｅｒｃｋシリカゲル６０（２０×２０ｃｍ）プレートを使用した。１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースを、ＤＮＳ法によってアッセイした（Ｙｕ Ｓ，Ｏｌｓｅｎ ＣＥ，Ｍａｒｃｕｓｓｅｎ Ｊ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ａｓｓａｙ ｏｆ １，５－ａｎｈｙｄｒｏ－Ｄ－Ｆｒｕｃｔｏｓｅ ａｎｄ α－１，４－ｇｌｕｃａｎ ｌｙａｓｅ，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．３０５：７３－８２（１９９８））。
【０３１２】
（ＰＤの精製）
使用した精製手順は、使用株が異なること以外は本質的にＧａｂｒｉｅｌら（１９９３）に記載の手順と同一であった。さらに、過剰硫酸アンモニウム分画工程を含んでいた。本適用で使用した株は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ ＣｏｌｌｅｃｔｉｏｎのＰｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ（ＡＴＣＣ３２６２９）および（ＡＴＣＣ２４７２５）であり、Ｇａｂｒｉｅｌら（１９９３）が使用した株は、Ｃｚｅｃｈｉｓｈ ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｃｅｎｔｒｅから入手したＰｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ ｋ－３であった。
【０３１３】
Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ ｃｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍの無細胞抽出物を、５５％までの飽和硫酸アンモニウムに供した。次いで、２時間穏やかにブレンドし、４℃にて１０００×ｇで２０分間遠心分離した。ＰＤ活性を有する沈殿物を、同体積の抽出緩衝液に溶解し、再度遠心分離し、上清を、Ｇａｂｒｉｅｌら（１９９３）に記載の手順を使用してＰＤの精製に使用した。
【０３１４】
ＰＤの精製手順後に、製造者の説明書に従って、８～２５％の勾配ゲルを使用して、ＰｈａｓｔＳｙｓｔｅｍ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を使用してＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびｎａｔｉｖｅ－ＰＡＧＥを行った。クーマシーブリリアントブルー染色（ＰｈａｓｔＧｅｌ Ｂｌｕｅ Ｒ）によってゲル上のタンパク質バンドを視覚化した。図１Ａから、ＰＤ１は、分子量が９７ｋＤａを有すると推定され、タンパク質マーカーであるホスホリラーゼｂと類似の移動度を有した（９７．４ｋＤａ）。
【０３１５】
（アミノ酸配列決定）
アミノ酸配列決定に精製ＰＤを使用した。ＰＤのアミノ酸配列決定を、以前に記載のように行った（Ｙｕ．Ｓ．；Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ ＴＭＩＥ，Ｋｒａｇｈ ＫＭ，Ｂｏｊｓｅｎ Ｋ，Ｍａｒｃｕｓｓｅｎ Ｊ：Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐａｒｔｉａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｏｆ ｔｗｏ α－１，４－ｇｌｕｃａｎ ｌｙａｓｅｓ ｆｒｏｍ ｆｕｎｇｉ．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １３３９：３１１－３２０（１９９７））。ＰＤを、最初にプロテイナーゼで部分

的に加水分解した。作製されたペプチドフラグメントを、ＨＰＬＣで分離した。各ポリペプチドを回収し、質量分析器で分子量を決定し、パルス－液体ファーストサイクルを使用したＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ４７６Ａシークエンサーにて配列決定した。ＰＤを、その最適ｐＨおよび最適温度、活性についてのイオン要件、安定性、および他の動力学的特性についてもさらに特徴付けた。

【０３１６】

（真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍから精製したピラノゾン脱水素酵素から得たアミノ酸配列）

トリプシンまたはエンドプロテイナーゼＬｙｓＣ消化のいずれかによって、以下のアミノ酸配列を得る。逆相ＨＰＬＣによってペプチドを精製し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によって分子量情報を得る。次いで、得られた配列を、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａで着手された白色腐朽ゲノム（Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ）プロジェクトで見出されたＤＮＡ配列と比較する。ＢＬＡＳＴアルゴリズムを使用して、配列類似性アラインメントを行う。

【０３１７】

有意なアラインメントが得られた全てのペプチドは、Ｓｃａｆｆｏｌｄ６２で見出される。

【０３１８】

（ＬｙｓＣペプチド）

ペプチド２７．３（Ｎ末端）

ＫＰＨＣＥＰＥＱＰＡＡＬＰＬＦＱＰＱＬＶＱＧＧＲＰＤＸＹＷＶＥＡＦＰＦＲＳＤＳＳＫ（Ｖは、異種可能性を示す）

このペプチドは、塩基対３８６２０～３８７４２から見出される。塩基対３８５９９に開始コドンが存在し、３８３１７は、可能なシグナルペプチドを示す。タンパク質ＰＤ２（アイソザイム）の配列決定によって、これはタンパク質のＮ末端であるという独立した確認を行う。

【０３１９】

残基２７のＸは、データベースのＧであり、これはＭＳデータと十分に適合する。

ＭＳｃ＋＝４６６９．１０　ＭＳｏ＋＝４６６８．０１－０．０２３％

Ｎ末端

ピラノゾン脱水素酵素アイソザイムＩ（ＰＤＩ）のＮ末端は、以下であることを見出した。

ＫＰＨＸＥＰＥＱＰＡＡＬＰＬＦＱＰＱＬＶＶ（Ｑ）ＧＧＲＰＤＸＹ

（Ｘは未知であり、Ｖ（Ｑ）はＶまたはＱまたはその両方であり得ることを意味する（異種性による））

上記のＮ末端配列（ペプチド２７．３）は、アイソザイムＩＩ（ＰＤＩＩ）であった。ＰＤＩおよびＰＤＩＩのＮ末端は、非常に類似しているか、同一である。

ペプチド３１．４ｂ

ＳＤＩＱＭＦＶＮＰＹＡＴＴＮＮＱＳＳＸＷＴＰＶＳＬＡＫＬＤＦＰＶＡＭＨＹＡＤＩＴＫ（Ｄは異種性可能性を示す）

このペプチドは、塩基対３８７８８～３８９６３から見出される。データベースの配列は、塩基対３８８３６～３８８８９由来のイントロンが介在している。残基２８～４１の配列を、トリプシンペプチド８．４によって確認する。

【０３２０】

残基１９のＸは、データベース配列中のＳであり、これは、ＭＳデータと適合する。

ＭＳｃ＋＝４５９１．２２　ＭＳｏ＋＝４５９１．５５＋０．００７％

トリプシンペプチド

ペプチド６ａ

ＶＳＷＬＥＮＰＧＥＬＲ

このペプチドは、塩基対３９０９６～３９１２８から見出される。

ＭＳｃ＋＝１３００．４４　ＭＳｏ＋＝１３００．４５＋０．００１％
ペプチド５
ＤＧＶＤＣＬＷＹＤＧＡＲ
　このペプチドは、塩基対３９４２６～３９４６１から見出される。
ＭＳｃ＋＝１４２７．４８　ＭＳｏ＋＝１４２７．４８
ＬｙｓＣペプチド
ペプチド２７．４ａ
ＰＡＧＳＰＴＧＩＶＲＡＥＷＴＲＨＶＬＤＶＦＧＸＬＸＸＫ
　このペプチドは、塩基対３９６７３～３９７５３から見出される。
３つのＸ’は、データベース中のＰＮＧであり、これはＭＳデータと十分に適合する。
ＭＳｃ＋＝２８７６．２７　ＭＳｏ＋＝２８７６．８０＋０．０２１％
ペプチド２９．４．８
ＨＴＧＳＩＨＱＶＶＣＡＤＩＤＧＤＧＥＤＥＦＬＶＡＭＭＧＡＤＰＰＤＦＱＲＴＧＶＷＣＹＫ
　このペプチドは、塩基対３９７５４～３９８７９から見出される。
ＭＳｃ＋＝４７２７．１３　ＭＳｏ＋＝４７２７．７０＋０．０１２％
ペプチド１３．１１
ＴＥＭＥＦＬＤＶＡＧＫ
　このペプチドは、塩基対４０２４４～４０２７６から見出される。
ＭＳｃ＋＝１２４０．４２　ＭＳｏ＋＝１２４０．５３＋０．００９％
ペプチド１４．２
ＫＬＴＬＶＶＬＰＰＦＡＲＬＤＶＥＲＮＶＳＧＶＫ
　このペプチドは、塩基対４０２７７～４０３４５から見出される。
ＭＳｃ＋＝２５５２．０８　ＭＳｏ＋＝２５５５１．３５－０．０２９％
トリプシンペプチド
ペプチド１０．５
ＳＭＤＥＬＶＡＨＮＬＦＰＡＹＶＰＤＳＶＲ
　このペプチドは、塩基対４０５２６～４０５８５から見出される。
ＭＳｃ＋＝２２５９．５５　ＭＳｏ＋＝２２５９．７７＋０．００９％
ＬｙｓＣペプチド
ペプチド３１．４ａ
ＮＤＡＴＤＧＴＰＶＬＡＬＬＤＬＤＧＧＰＳＰＱＡＷＮＩＳＨＶＰＰＧＴＤＭＹＥＩＡＨＡＫ
　このペプチドは、塩基対４１２９３～４１４６９から見出され、塩基対４１３６２～４１４１６からのイントロンを含有する。
ＭＳｃ＋＝４２８９．７３　ＭＳｏ＋＝４２８９．４５－０．００７％
ペプチド２ｂ
ＴＧＳＬＶＣＡＲＷＰＰＶＫ
　このペプチドは、塩基対４１４７０～４１５０８から見出される。
ＭＳｃ＋＝１４７１．７１　ＭＳｏ＋＝１４７２．６２＋０．０６２％
ペプチド２ａ
ＮＱＲＶＡＧＴＨＳＰＡＡＭＧＬＴＳＲＷＡＶＴＫ
　このペプチドは、塩基対４１５０９～４１５７７から見出される。
ＭＳｃ＋＝２４４０．７１　ＭＳｏ＋＝２４４１．５８＋０．０３６％
ペプチド１１．３
ＧＱＩＴＦＲＬＰＥＡＰＤＨＧＰＬＦＬＳＶＳＡＩＲＨＱ
　このペプチドは、塩基対４１６４１～４１７１８から見出される。
ＭＳｃ＋＝２８８８．３４　ＭＳｏ＋＝２８８８．２５－０．０３１％
このペプチドは、Ｃ末端の指標であるＫで終結していない。この配列の後にも終止コドンが続く。

【０３２１】
このタンパク質の分子量は、約９７ＫＤである。アミノ酸の平均分子量が１１０との推定に基づいて、予想残基数は８８０であり、塩基対の総数は２６４０であろう。
【０３２２】
データベースから計算した塩基対数は、３１００である。２つの既知のイントロンは、５３および５４塩基対から構成されるため、この数字が正常と推定される場合、データベースの配列は約８個のイントロンを含むと予想される。
【０３２３】
本発明で配列決定した総残基数は、３３２アミノ酸であり、タンパク質の３７％を占める。
【０３２４】
（実施例１：ミクロセシン生成のための１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースおよびＰＤの使用）
反応混合物は、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトース５μｌ（３．０％）、ＰＤ調製物５μｌ、６５μｌのリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、および最終体積を０．７ｍｌにする水からなっていた。反応物を、３５０～１９０ｎｍのスキャニングによってモニターした。反応時間０分を、ブランクとして使用した。約２３０ｎｍの吸収ピークは、ミクロセシンの形成を示す。２６５ｎｍの吸収は、ミクロセシンに転換する前のＡＦからの第１の中間体の形成を示す。
【０３２５】
形成されたミクロセシンを、ＴＬＣでの相対移動度、および２７５ｎｍで典型的な吸収ピークを示す２－フリルヒドロキシメチルケトンの転換によってさらに確認した（Ｂａｕｔｅ Ｍ．－Ａ．ｅｔ ａｌ．，１９８６）。
【０３２６】
より大規模なミクロセシンの生成では、使用したＡＦは、０．４％から２０％であった。反応後、ＤＮＳ法を使用して反応混合物からＡＦは消滅していた（Ｙｕ．Ｓ．；Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ ＴＭＩＥ，Ｋｒａｇｈ ＫＭ，Ｂｏｊｓｅｎ Ｋ，Ｍａｒｃｕｓｓｅｎ Ｊ，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １３３９：３１１－３２０（１９９７））。ミクロセシンの形成を、２６５ｎｍでモニターし、これは２３０ｎｍにシフトし、ＴＬＣ法でさらにモニターした。
【０３２７】
１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースは、その天然の基質であるグルコソンよりも非常に良好なピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）の基質であることを見出した。ＡＦのＶｍａｘは、グルコソンの約４．７倍である（表１）。
【０３２８】

【表２】

表１

最終基質濃度 (μg/ml 反応混合物)	基質としてAFを使用するOD226nm	基質としてグルコースを使用するOD226nm
13.7	0.308	0.069
27.4	0.534	0.104
41.1	0.76	0.141
68.4	1.246	0.238
95.8	1.764	0.323
137	2.43	0.484
205	2.943	0.634

反応系は、ＡＦまたはグルコソン１～１５μｌ、２５μｌのリン酸ナトリウム緩衝液（６．５、０．１Ｍ）、水、１．４μｌのＰＤ（最終体積２００μｌ）からなっていた。２２℃で５．５時間反応させた。ＡＦからのミクロセシンの形成およびグルコソンからのコルタルセロンの形成を、２２６ｎｍでモニターした。

【０３２９】

（実施例２：コルタルセロンの生成）

コルタルセロンは、デンプン型基質（デンプン、糊状（ｗａｘｙ）デンプン、デキストリンなど）のデンプン加水分解酵素（アミノグルコシダーゼおよび脱分岐酵素またはシクロデキストリントランスフェラーゼ、ピラノース２－オキシダーゼ、およびＰＤなど）とのインキュベーションによる１工程で生成することができる。インキュベーション後、カットオフ３００～３０，０００、好ましくは１０，０００のメンブレンを使用した限外濾過によって、コルタルセロンを反応混合物から分離することができる。

【０３３０】

（実施例３：ＡＰＰ生成のための１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトース、ＰＤ、およびアスコピロンＰ合成酵素の使用）

反応混合物は、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトース５０μｌ（３．０％）、ＰＤ調製物５μｌ、アスコピロンＰ合成酵素５μｌ、０．１ｍｌのリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、および最終体積を０．８ｍｌにする水からなっていた。反応を、分光学的に２８９ｎｍでのＡＰＰの形成によってモニターした。反応温度は、２２℃であり、反応時間は２４時間であった。終了時に、９０％のＡＦがＡＰＰに転換した。ＡＰＰの構造を、以前に記載のＮＭＲを使用して確認した（１９９９年３月１９日提出の英国出願第９９０６４５７．８号の優先権を主張した２０００年３月１６日に提出したＷＯ００／５６８３８）。

【０３３１】

（ＰＤ遺伝子の発現）

当該技術分野で周知であり、本明細書中前記に参照した技法によって、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ、およびＨａｎｓｅｎｕｌｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈなどの産生生物中でＰＤ遺伝子を発現させることができる。

【０３３２】

（抗体産生）

Ｎ Ｈａｒｂｏｅ ａｎｄ Ａ Ｉｎｇｉｌｄ（「免疫グロブリンの免疫化、単離、抗体力価の評価」、Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｉｍｍｕｎｏｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ， Ｎ

Ｈ Ａｘｅｌｓｅｎら編、Ｕｎｖｅｒｓｉｔｅｔｓｆｏｒｌａｇｅｔ，Ｏｓｌｏ，１９７３）およびＴＧ Ｃｏｏｐｅｒ（「生化学ツール」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７７）に記載の手順にしたがった、ウサギへの精製酵素の注射および抗血清からの免疫グロブリンの単離によって、本発明のアミノ酸に対する抗体を惹起した。

【０３３３】

（抗真菌薬としてのミクロセシン）

植物中での真菌の成長により、多大な経済的打撃を受ける。例は、サトウダイコンの苗木およびその葉に対する被害である。サトウダイコンの種子は、土壌での発芽の直後に、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍ、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓなどの種による真菌攻撃にあう。本発明では、ミクロセシンがこれらの病原菌の成長を阻害することができることが見出された。従って、経済的穀物（砂糖）の種子（サトウダイコンの種子など）を、５０～２０００ｐｐｍのミクロセシンを含むペーストでコートし、植付けに使用する前に乾燥させる。あるいは、ミクロセシンの水溶液を、植物およびその葉に直接噴霧することができる。

【０３３４】

（実験）

ミクロセシン基本溶液：２４ｍｇ／ｍｌ、バッチ番号Ｍｉｃ２００１１０１６

使用した希釈物

【０３３５】

【表３】

希釈因子	濃度
5	4.8 mg/ml
10	2.4 mg/ml
20	1.2 mg/ml
50	0.48 mg/ml
100	0.24 mg/ml

全ての溶液を、滅菌のために０．２２μｍのフィルターで濾過した。

【０３３６】

溶液を、以下の真菌に対して試験した。

【０３３７】

【表４】

真菌	テンサイの疾患
Rhizoctonia solani	根朽病
Pythium ultimum	根朽病
Aphanomyces cochlioides	根朽病
Cercospora beticola	白斑病

新鮮な菌糸体の円形のプラグ（直径１０ｍｍ）を、ＰＤＡ培地を含むペトリ皿（直径９ｃｍ）の中央に置いた。（ＰＤＡ＝ポテトデキストロース寒天、Ｄｉｆｃｏ番号２１３４００）。寒天プレートの周囲に沿って直径５ｍｍのウェルを切り出した。各ウェルに、５０μｌの試験溶液を入れた。あるいは、２０μｌの各試験溶液を、プレート周囲に沿って寒天上に直接置いた。また、５０μｌの各試験溶液を、真菌の菌糸プラグ（ｐｌｕｇ）の上部に直接置いた。

【０３３８】

寒天プレートを、室温で日光の下に置くが、直射日光からは保護した。

【０３３９】
試験物質に対する真菌の反応（阻害域）を、以下のように判断した。
Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ：　成長２～３日後
Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍ：　成長１～２日後
Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓ：成長３～４日後
Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｂｅｔｉｃｏｌａ：　成長３～４週後
（結果）
真菌成長調節因子としてのミクロセシンは、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍ、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓ、およびＣｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｂｅｔｉｃｏｌａに阻害性を示した。これらの真菌に対するミクロセシンの最少阻害濃度（ｍｉｃ）は、それぞれ、２４０、４８０、１２００、および２４００ｐｐｍであった。
【０３４０】
（実施例４：ペレット化サトウダイコン種子に対するミクロセシンの効果）
植物真菌病原体Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ、およびＡｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓに対するインビトロでのミクロセシンの効果を、寒天プレート上での病原体の成長阻害についてのスクリーニングによって調査した（図６、図７、図８）。
【０３４１】
図７は、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓに対する異なる濃度のミクロセシンのスクリーニング効果を示し、図８および図９はそれぞれ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍおよびＲｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉに対するスクリーニング効果を示す。それぞれの場合、ミクロセシンを水に溶解し、周囲のウェルに置いた。病原体を含む寒天ブロックを、中央に置いた。病原体を、ＰＤＡ－寒天プレート上で３～５日間成長させた。これらの調査は、非常に低濃度のミクロセシンでもＡｐｈａｎｏｍｙｃｅｓの成長を減少させることができることを示した。
【０３４２】
他の微生物を使用した類似の試験は、ミクロセシンは、Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａでは効果が無く、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｄｓ（Ｐ．ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ ＤＳ９６．５７８、Ｐ．ｍｅｎｄｏｃｉｎａ ＤＳ９８．１２４）ではわずかに効果があるが、Ｂａｃｉｌｌｕｓ（Ｂ．Ｐｕｍｉｌｕｓ ＤＳ９６．７３４、Ｂ．ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ ＤＳ９８．１２４）の成長に対する効果はないことを示した。
【０３４３】
これらの所見に基づいて、現場出現試験（ｆｉｅｌｄ ｅｍｅｒｇｅｎｃｅ ｔｒｉａｌ）においてミクロセシンの有効性をさらに調査した。この試験は、比較的後期に種をまいて、試験現場における病原体Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓが存在する機会をより多くした。
【０３４４】
（材料と方法）
【０３４５】
【表４Ｂ】

		ペレット	TKW
1. マンハッタン	CAC-7-2306 kb5, 3,0-4,25mm,	19,2 (7)	19,1 (1)
2. タワー	MIT-1-0290 kb5, 3,0-4,25mm.	17,3 (8)	17,8 (2)

チラムを含む（１，２）または含まない（７，８）標準的なＰ１ペレット化量で種子をペレット化した。
標準的な種子コーティング
内部コーティング
０．５％水溶液としての０．３ｇａｉ／Ｕミクロセシン
１４．７ｇａｉ／Ｕヒメキサゾール

６０ｇａｉ／Ｕイミダクロプリド
標準的なメタリックグリーンの種子のカバーフィルム
試験には以下の組み合わせが含まれた。
Ｒ　ＦＯ　殺真菌薬なし
Ｒ　ＦＴ　チラウムあり（ペレット中）
Ｒ　ＦＨ　ヒメキサゾールあり
Ｒ　ＦＭ　ミクロセシンあり
Ｒ　Ｐ１　ＳＴＤ　チラウムあり（ペレット中）＋ヒメキサゾール
Ｒ　ＦＴＭ　チラウムあり（ペレット中）＋ミクロセシン
試験場所　Ｂｕｋｋｅｈａｖｅ，　ＤＫ．（４ｒｅｐｓ、２００種子／プロット）
試験種まき　２００２年５月２１日
１．計数（Ｃｏｕｎｔ）　２００２年５月２８日（高速）
２．計数　２００２年５月２９日（高速）
３．計数　２００２年６月２４日（最終）
（結果）
実験室および現場出現の数値を、表２に見出すことができる（試験ＦＥＨＣＰ０３４、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ）。最終の出現を図６に示す。
【０３４６】
【表５】

表 2

											TSV						相対的 FE		
FE名入力	FEno	種類	型	3d	4d	4d>15	7d	MM	Tvil	Abn	7d	14d	21d	FE1	FE2	FE3	1	2	3
Aphanom-yces PLACE: Buk																			
1 R F0	700	1マンハッタン	P		83	9	99	100	0,3	0,3				36,3	96,5	183,0			
1 R F0	701	2 Tower	P		92	41	100	99	1	0				33,3	98,7	191,7			
1 R F0					87,5	25,0	99,5	100	0,7	0,2				34,8	97,6	187,3	100	100	99
2 R FT	702	1マンハッタン	P		82	10	99	100	0,3	0				38,0	100,8	176,3			
2 R FT	703	2タワー	P		94	40	99	99	0,5	0				38,5	108,5	188,0			
2 R FT					88,0	25,0	99,0	100	0,4	0,0				38,3	104,6	182,1	110	108	97
3 R FH	704	1マンハッタン	P		88	6	100	99	0,5	0				23,8	77,8	186,5			
3 R FH	705	2タワー	P		87	24	99	99	0,8	0,3				28,3	94,3	191,3			
3 R FH					87,5	15,0	99,5	99	0,7	0,2				26,0	86,0	188,9	75	88	100
4 R FM	706	1マンハッタン	P		68	15	96	100	0	0,3				37,0	101,3	188,5			
4 R FM	707	2タワー	P		76	37	97	99	0,5	0				38,3	103,5	195,8			
4 R FM					72,0	26,0	96,5	100	0,3	0,2				37,6	102,4	192,1	108	105	102
5 STD P1	1	1マンハッタン	P		82	3	99	100	0	0	95	88	90	30,0	82,8	188,5			
5 STD P1	2	2タワー	P		88	15	99	100	0	0	116	84	81	35,0	94,3	193,3			
5 STD P1					85,0	9,0	99,0	100	0,0	0,0	105,	86,0	85,5	32,5	88,5	190,9	94	91	101
6 R FTM	708	1マンハッタン	P		64	13	100	100	0	0				39,3	98,5	185,0			
6 R FTM	709	2タワー	P		71	45	99	99	0,5	0				39,5	110,8	194,3			
6 R FTM					67,5	29,0	99,5	100	0,3	0,0				39,4	104,6	189,6	113	108	101
'Place' に対する Opsummering = Buk (12 detaljeposter) Gnsnt				3d	4d	4d>15	7d	MM	Tvil	Abn	7d	14d	21d	FE1	FE2	FE3			
					81,3	21,5	98,8	100	0,4	0,1	105,	86,0	85,5	34,8	97,3	188,5			

実験室での研究結果は、ミクロセシンの含有によって実験室での発芽速度が減少することを示すが（４ｄ）、これは４ｄ＞１５ｍｍの数字で反映されない。これは、低い４ｄ＞１５ｍｍ発芽を有するヒメキサゾールの逆効果を示す。

【０３４７】
発芽速度に関して、現場出現試験は、ヒメキサゾールを含むペレット（単独またはチラウムとの組み合わせ）により発芽が比較的遅くなることを示す（４ｄ＞１５ｍｍ実験室発芽から予想される）。ミクロセシンを含むペレットは、チラウムのみを含むペレットに匹敵する発芽速度を示す。
【０３４８】
チラウム含有ペレットでの発芽の速さと対照的に、ミクロセシンを含むペレットは、高い最終発芽を示す（ヒメキサゾール含有ペレットに匹敵する）。
【０３４９】
根腐れ病原体による実際の攻撃がむしろ制限されているにもかかわらず、ヒメキサゾールによって制御することができる病原体（最も好ましくは、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ）による小植物の攻撃に起因するＦＴ－プロットにおける小植物の喪失は４％（およそ）である。ＦＴ－プロットにおける小植物の最終数は、Ｆ０（殺真菌薬なし）プロットでの小植物数よりも少なかった。これを、他の微生物を制御するがＡｐｈａｎｏｍｙｃｅｓを制御しないので小植物へのＡｐｈａｎｏｍｙｃｅｓのアクセスがより容易になるチラウムの作用によって説明することができる。
【０３５０】
ミクロセシン含有ペレットは、早い発芽と高い最終発芽の両方を示す唯一のペレットである。従って、ミクロセシンは、少々高価な化学薬品ヒメキサゾールの代替物であり得ると考えられる。
【０３５１】
上記明細書に記載の全ての刊行物は、本明細書中で参考として援用される。本発明の記載の方法および系の種々の修正形態および変形形態が本発明の範囲および意図を逸脱することなく当業者に明らかとなろう。本発明は、特定の好ましい実施形態と共に説明しているが、このような特定の実施形態によって特許請求の範囲に記載の本発明が過度に制限されないことを理解すべきである。実際、分子生物学または関連分野の当業者に明らかな本発明を実施する実施形態の種々の記載される修正形態は、以下の特許請求項の範囲内であることが意図される。
【図面の簡単な説明】
【０３５２】
【図１】図１は、８～２５％の勾配ゲルでのＰＤ１（ピラノゾン脱水素酵素アイソフォーム１）の電気泳動を示す。より詳細には、図１Ａは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す：レーン１および２（左から）、それぞれＮｏｖｅｘおよびＰｈａｒｍａｃｉａのタンパク質マーカー；レーン３、４、および５、精製ＰＤ１。図１Ｂは、ＮａｔｉｖｅＰＡＧＥを示す：レーン１、２、３、精製ＰＤ１；レーン４、Ｐｈａｒｍａｃｉａのタンパク質マーカー、レーン５、部分精製されたＰｈａｒｍａｃｉａのタンパク質マーカー。ゲルを、ＰｈａｒｍａｃｉａのＰｈａｓｔＧｅｌ　Ｂｌｕｅ　Ｒで染色した。
【図２】図２は、ピラノゾン脱水素酵素の部分アミノ酸配列を示す。
【図３】図３Ａは、ミクロセシン産生のための１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトースおよびＰＤの使用を示す。反応混合物は、１，５－アンヒドロ－Ｄ－フルクトース５μｌ（３．０％）、ＰＤ調製物５μｌ、６５μｌのリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、および最終容量０．７ｍｌへの水からなっていた。３５０～１９０ｎｍの間のスキャニングによって反応をモニターした。反応時間０分は、ブランクとして使用した。２３０ｎｍ付近の吸収ピークは、ミクロセシンの形成を示す。２６５ｎｍの吸収は、ミクロセシンに転換する前のＡＦ由来の中間体の第１の形成を示す。図３Ｂは、ミクロセシンおよびその中間体の産生を示す。反応混合物は、１０μｌの部分精製ＰＤ（Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来の無細胞抽出物の２５～５０％飽和での硫酸アンモニウム画分）、２５μｌのＡＦ（３．０％、重量／容量）、１００μｌのリン酸ナトリウム緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ６．５）、および０．８４ｍｌの水からなっていた。基質ＡＦの添加によって反応を開始させた。２２℃で反応を行った。ミクロセシンおよびその中間

体の形成を、２３０ｎｍおよび２６０ｎｍそれぞれでモニターした。中間体が最初に形成され、約２０分後に停止することが認められる。ミクロセシン形成は遅延するが、反応混合物中のほとんど全てのＡＦが消費されるまでその形成が継続された。

【図４－１】図４は、配列番号１（上流調節領域（－１～－２８８）、コード領域（１～３１４６）、および下流領域（３１４７～３４４４）を含む真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）をコードする遺伝子）を示す。推定デンプンコドンは、ＡＴＧ（太字）であり、終止コドンはＴＧＡ　ＴＡＧ（太字）である。太字のコドンＡＴＧから翻訳を開始すると予想される場合、精製した機能的ＰＤは、Ｎ末端の７－アミノ酸トランケートＰＤに相当する。

【図４－２】図４は、配列番号１（上流調節領域（－１～－２８８）、コード領域（１～３１４６）、および下流領域（３１４７～３４４４）を含む真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）をコードする遺伝子）を示す。推定デンプンコドンは、ＡＴＧ（太字）であり、終止コドンはＴＧＡ　ＴＡＧ（太字）である。太字のコドンＡＴＧから翻訳を開始すると予想される場合、精製した機能的ＰＤは、Ｎ末端の７－アミノ酸トランケートＰＤに相当する。

【図５－１】図５は、　真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）遺伝子の上流領域、コード領域、および下流領域を示す。ＤＮＡ配列は、理論的に、異なるアミノ酸配列を有する３つのタンパク質をコードすることができる。太字のアミノ酸は、精製した機能的ＰＤのアミノ酸配列決定によって見出されたものである。同定されたイントロンに下線を引く。

【図５－２】図５は、　真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）遺伝子の上流領域、コード領域、および下流領域を示す。ＤＮＡ配列は、理論的に、異なるアミノ酸配列を有する３つのタンパク質をコードすることができる。太字のアミノ酸は、精製した機能的ＰＤのアミノ酸配列決定によって見出されたものである。同定されたイントロンに下線を引く。

【図５－３】図５は、　真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）遺伝子の上流領域、コード領域、および下流領域を示す。ＤＮＡ配列は、理論的に、異なるアミノ酸配列を有する３つのタンパク質をコードすることができる。太字のアミノ酸は、精製した機能的ＰＤのアミノ酸配列決定によって見出されたものである。同定されたイントロンに下線を引く。

【図５－４】図５は、　真菌Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ　ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ由来のピラノゾン脱水素酵素（ＰＤ）遺伝子の上流領域、コード領域、および下流領域を示す。ＤＮＡ配列は、理論的に、異なるアミノ酸配列を有する３つのタンパク質をコードすることができる。太字のアミノ酸は、精製した機能的ＰＤのアミノ酸配列決定によって見出されたものである。同定されたイントロンに下線を引く。

【図６】図６は、実施例３に従って処置したサトウダイコン種子の最終の出現を示す。

【図７】図７は、サトウダイコンを根腐れさせる病原体Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ　ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓに対する種々の濃度のミクロセシンの効果のスクリーニングを示す。

【図８】図８は、サトウダイコンを根腐れさせる病原体Ｐｙｔｈｉｕｍ　ｕｌｔｉｎｕｍおよびＲｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ　ｓｏｌａｎｉそれぞれに対する種々の濃度でのミクロセシンの効果のスクリーニングを示す。

【図９】図９は、サトウダイコンを根腐れさせる病原体Ｐｙｔｈｉｕｍ　ｕｌｔｉｎｕｍおよびＲｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ　ｓｏｌａｎｉそれぞれに対する種々の濃度でのミクロセシンの効果のスクリーニングを示す。

【図１Ａ】

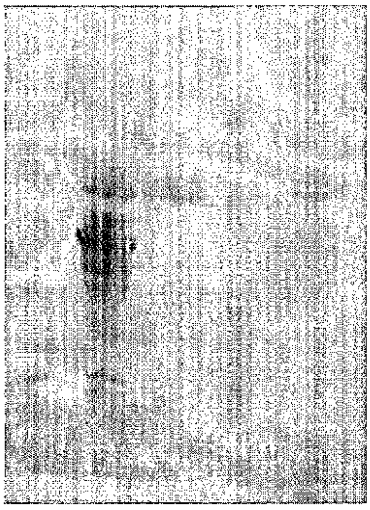


FIGURE 1A

【図１Ｂ】

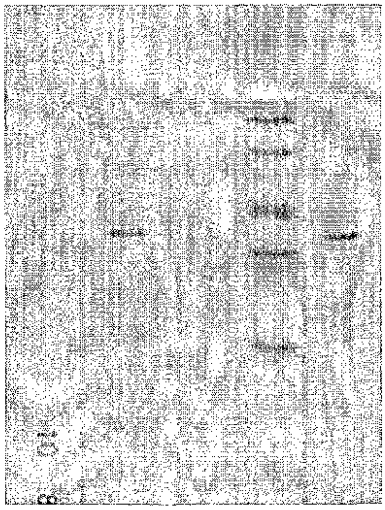


FIGURE 1B

【図２】

FRAGMENT (i)	KPHCEPEQPAALPLFQPQLVQGGRPDXYWVEAFPFRSDSSK;
FRAGMENT (ii)	SDIQMFVNPYATTNNQSSXWTPVSLAKLDFPVAMHYADITK;
FRAGMENT (iii)	VSWLENPGELR;
FRAGMENT (iv)	DGVDCLWYDGAR;
FRAGMENT (v)	PAGSPTGIVRAEWTRHVLDVFGXLXXK;
FRAGMENT (vi)	HTGSIHQVVCADIDGDGEDEFLVAMMGADPPDFQRTGVWCYK;
FRAGMENT (vii)	TEMEFLDVAGK;
FRAGMENT (viii)	KLTLVVLPPFARLDVERNVSGVK;
FRAGMENT (ix)	SMDELVAHNLFPAYVPDSVR;
FRAGMENT (x)	NDATDGTPVLALLDLDGGPSPQAWNISHVPPGTDMYEIAHAK;
FRAGMENT (xi)	TGSLVCARWPPVK;
FRAGMENT (xii)	NQRVAGTHSPAAMGLTSRWAVTK;
FRAGMENT (xiii)	GQITFRLPEAPDHGPLFLSVSAIRHQ;
FRAGMENT (xiv)	KPHXEPEQPAALPLFQPQLVV(Q)GGRPDXY

X は、未知のアミノ酸；またはその改変体、ホモログもしくは誘導体である。

FIGURE 2

【図３】

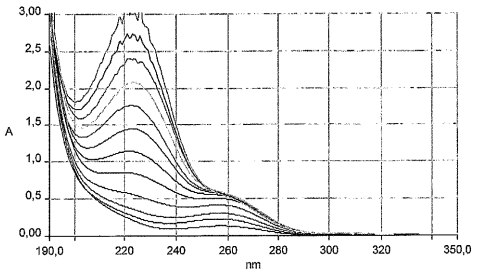


FIGURE 3A

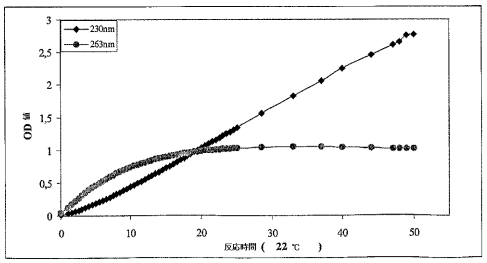


FIGURE 3B

【図４－１】



FIGURE 4

【図４－２】

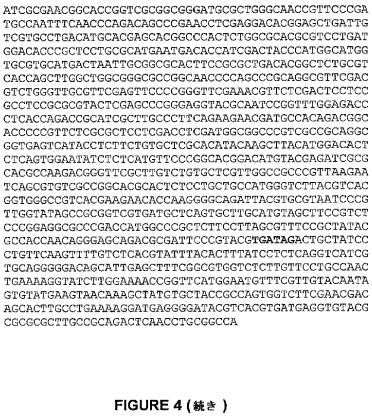


FIGURE 4 (続き)

【図５－１】

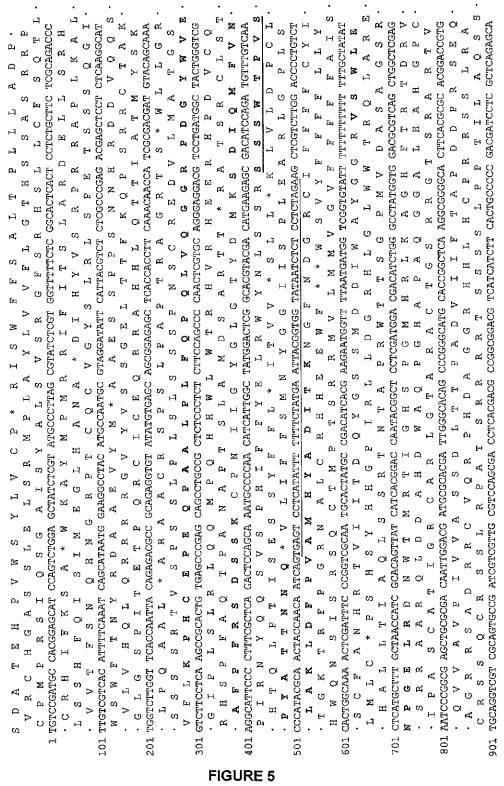


FIGURE 5

【図５－２】

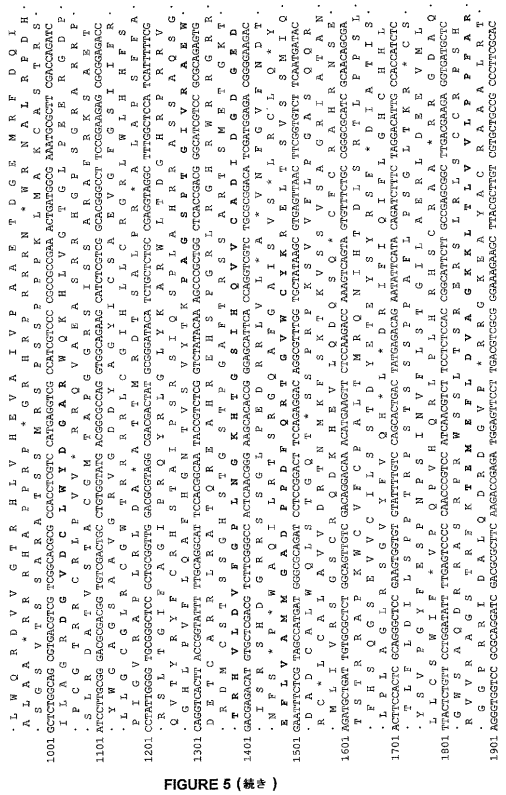


FIGURE 5 (続き)

【図５－３】

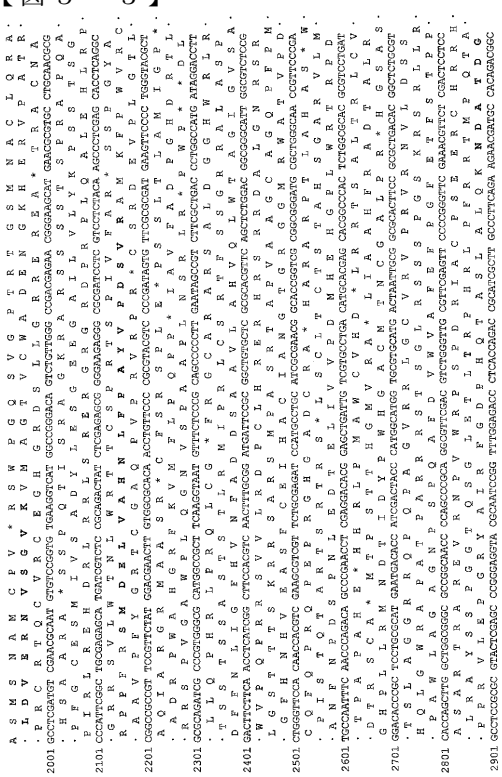


FIGURE 5（続き）

【図５－４】

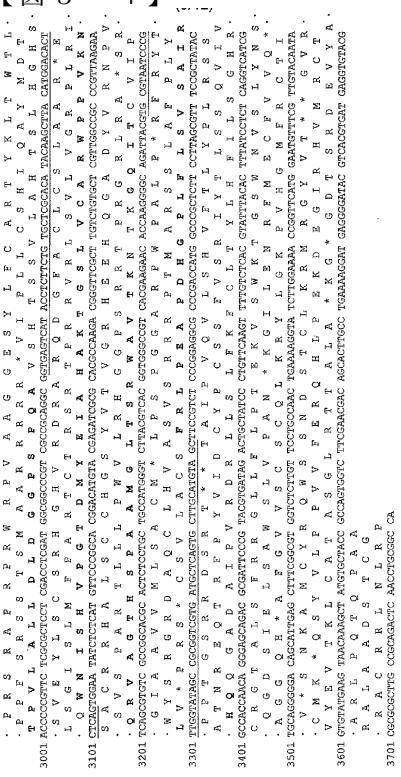


FIGURE 5（続き）

【図６】

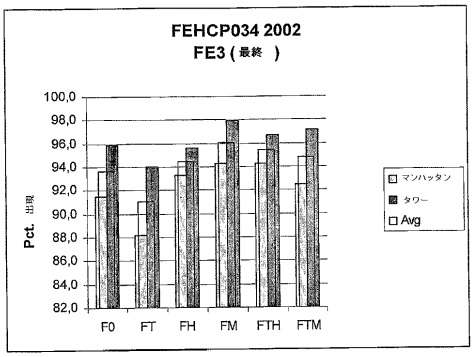


FIGURE 6

【図７】

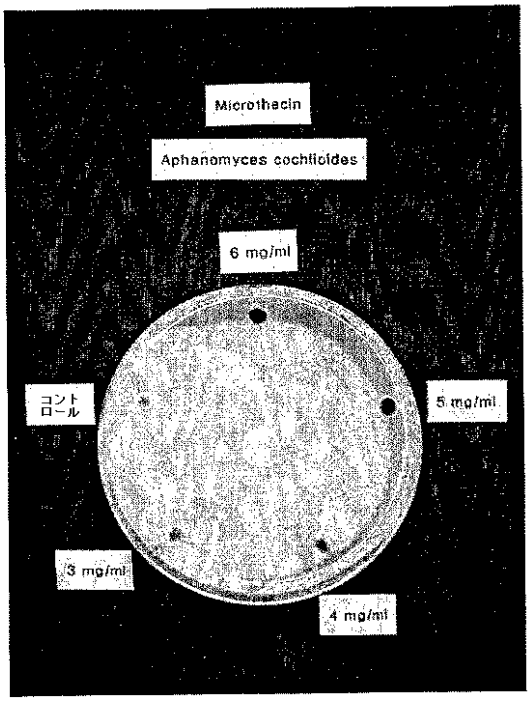


FIGURE 7

【図８】

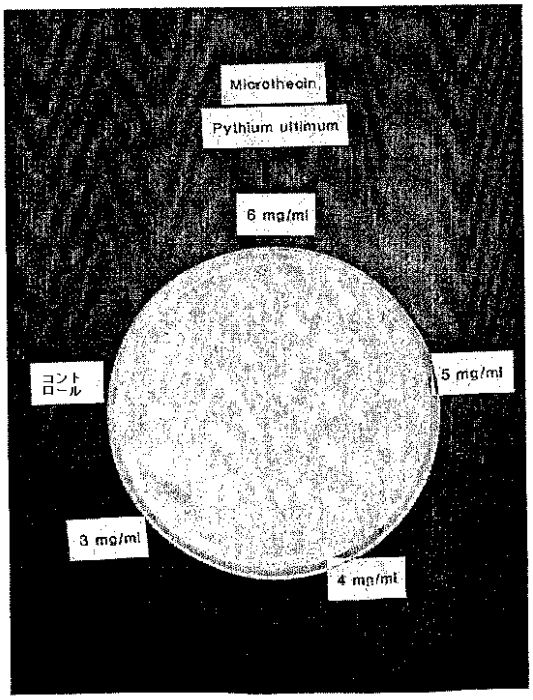


FIGURE 8

【図９】

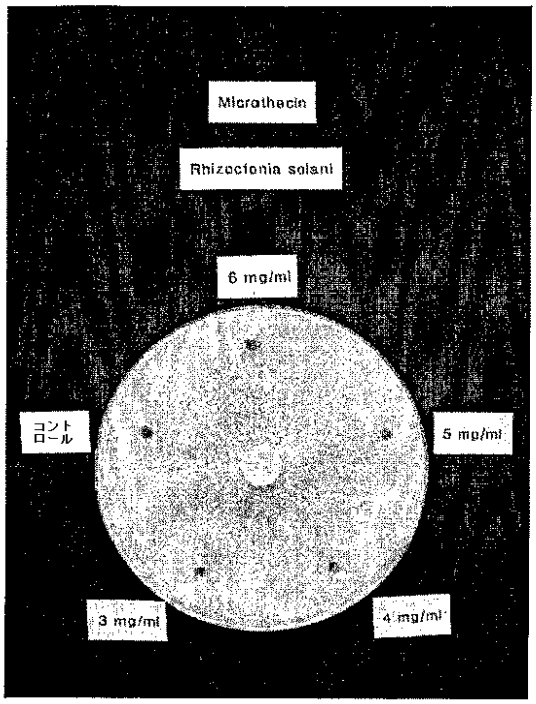


FIGURE 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No
PCT/GB 02/04916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/88 C12N15/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)
BIOSIS, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GABRIEL JIRI ET AL: "Pyranosone dehydratase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium: Improved purification, and identification of 6-deoxy-D-glucosone and D-xylosone reaction products." ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, vol. 160, no. 1, 1993, pages 27-34, XP009009664 ISSN: 0302-8933 the whole document	1-19, 26-28, 32,33, 41,42,45

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 June 2003	02/09/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bassias, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 02/04916

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GABRIEL, JIRI ET AL: "Process for preparing cortalcerone antibiotic by enzyme transformation of D-glucose or D-glucosan" retrieved from STN Database accession no. 121:55987 XP002240157 abstract	1-19, 26-28, 32,33, 41,42,45
X	& CS 276 695 B (MIKROBIOLOGICKY USTAV CSAV, CZECH.) 15 July 1992 (1992-07-15) the whole document, in particular the abstract	1-19, 26-28, 32,33, 41,42,45
X	KOTHS K ET AL: "SYNTHESIS OF THE ANTIBIOTIC CORTALCERONE FROM D-GLUCOSE USING PYRANOSE 2-OXIDASE AND A NOVEL FUNGAL ENZYME, ALDOS-2-ULOSE DEHYDRATASE" CARBOHYDRATE RESEARCH, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING COMPANY. AMSTERDAM, NL, vol. 232, no. 1, 1992, pages 59-75, XP009005251 ISSN: 0008-6215 the whole document, in particular Fig. 5	26-28, 32,33, 41,42,45
P,X	THOMAS L V ET AL: "Ascopyrone P, a novel antibacterial derived from fungi" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 93, no. 4, 2002, pages 697-705, XP002230019 ISSN: 1364-5072 the whole document	21-24, 31,41-43
A	BAUTE R ET AL: "PROPOSED PATHWAY TO THE PYRONES CORTALCERONE AND MICROTHECIN IN FUNGI" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 26, no. 5, 1987, pages 1395-1397, XP009005230 ISSN: 0031-9422	
A	BAUTE M-A ET AL: "ENZYME ACTIVITY DEGRADING 1,4-ALPHA-D-GLUCANS TO ASCOPYRONES P AND T IN PEZIZALES AND TUBERALES" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 33, no. 1, 1993, pages 41-45, XP000925242 ISSN: 0031-9422	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati Application No
PCT/GB 02/04916

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CS 276695 B	15-07-1992	CS 9005172 A3	15-07-1992

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/19		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 9/02	Ｃ１２Ｎ 9/02		
Ｃ１２Ｐ 1/02	Ｃ１２Ｐ 1/02	Ｂ	
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ユ, シュクン
スウェーデン国 マルメ エスー２１２ ４０, ヘイデマンスガタン ２９ ジー.
(72)発明者 ヴァイエルガング, インゲ
デンマーク国 コペンハーゲン ヴィー ディーケイー１７２９, ３ティーエイチ, シーガーステットガーデ ７
(72)発明者 ペーデルセン, ハンス クリスチャン
デンマーク国 ナクスコフ ディーケイー４９００, ソルシクケーヴェイ ４３

Ｆターム(参考) 4B024 AA03 BA08 CA02 CA04 CA05
4B050 CC03 DD05 LL05
4B064 AF02 AH19 CA05 CA19 CB11 CD09 CD19 DA12
4B065 AA60X AA71Y AA79X AA88X AB01 BA02 CA28 CA47
4H011 AA01 AA03 DD03
4H045 AA11 CA10 DA75 EA60 FA71