

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年7月28日(28.07.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/117549 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12P 19/44 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/051416
- (22) 国際出願日: 2016年1月19日(19.01.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-008508 2015年1月20日(20.01.2015) JP
- (71) 出願人: サントリーホールディングス株式会社
(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒
5308203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番4
0号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 落合 美佐(OCHIAI Misa); 〒6190284 京
都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サント
リー ワールド リサーチセンター内 Kyoto
(JP). 小埜 栄一郎(ONO Eiichiro); 〒6190284 京
都府相楽郡精華町精華台8-1-1 サントリー
ワールド リサーチセンター内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI Hiroshi et al.);
〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号
福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所
Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PREPARING MOGROSIDE

(54) 発明の名称: モグロシドの調製方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for preparing a mogroside that does not have a β 1,6-glucoside bond, said method comprising a step for reacting glycosidase ASBGL2, AOBGL2, AOBGL1, ASBGL1, or a variant thereof with a mogroside having at least one β 1,6-glucoside bond so as to cut the β 1,6-glucoside bond.

(57) 要約: 本発明は、グリコシダーゼASBGL2、AOBGL2、AOBGL1もしくはASBGL1またはその変異体と、少なくとも1つの β 1,6-グルコシド結合を有するモグロシドを反応させて、前記 β 1,6-グルコシド結合を切断する工程を含む、 β 1,6-グルコシド結合のないモグロシドの調製方法を提供する。



WO 2016/117549 A1

明 細 書

発明の名称：モグロシドの調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、モグロシドの調製方法に関する。

背景技術

[0002] ラカンカ (*Siraitia grosvenorii*) は、中国広西チワン族自治区を原産地とするウリ科の植物である。ラカンカの果実は、強い甘味を呈し、その抽出物は、人工甘味料として利用されている。また、ラカンカの果実を乾燥したものは、漢方の生薬としても利用されている。

[0003] ラカンカの果実は、甘味成分として、モグロシドを含むことが知られている。モグロシドは、アグリコンであるモグロールにグルコースが結合した配糖体である。モグロシドは、グルコースの結合位置や数の違いで各種モグロシドに分類される。ラカンカの果実に含まれるモグロシドは、モグロシドV、モグロシドIV、シアメノシドIおよび11-オキシモグロシドである。この他、モグロシドには、モグロシドI、モグロシドIVA、モグロシドII、モグロシドIII A₁、モグロシドIII A₂、モグロシドIIIE、モグロシドIIA、モグロシドIIA₁、モグロシドIIA₂、モグロシドIIB、モグロシドIIE、モグロシドIA₁、モグロシドIE₁などがあることが知られている。

[0004] これらのモグロシドには、様々な生理活性があることが明らかになっている。例えば、モグロシドVには、*in vitro*でインスリン分泌を調節する働きがあるとの報告がある（非特許文献1：Yao Xue Xue Bao, 2009, 44, 1252-1257）。また、モグロシドIIIは、腸管のマルターゼ阻害活性を示し、血糖値上昇を抑制するとの報告がある（非特許文献2：J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2941-2946）。

[0005] このような、モグロシドは、ラカンカの果実の抽出物を精製することによ

り調製することができるが、その他にも、いくつかの調製方法が知られている。例えば、UDP-グルコース転移酵素を用いて、モグロールをグリコシル化し、各種モグロシドを調製する方法が開示されている（特許文献1：WO2013/076577）。さらに、*Aspergillus niger*由来のペクチナーゼにより、ラカンカ抽出物から、各種モグロール配糖体を調製する方法が開示されている（特許文献1：WO2013/076577）。

[0006] ここで、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) にモグロシドVをモグロシドIII Eに変換する活性があること、また、その活性を担う酵素の遺伝子がEXG1（GH5ファミリー、 β -1, 3グルカナーゼ）であることが開示されている（非特許文献3：J. Agric. Food Chem, 2013, 61, 7127-7134）。

[0007] また、麹菌は様々な加水分解酵素を分泌する生物として知られており、ゲノム情報も公知である。 β -グルコシダーゼ様のタンパク質をコードすると考えられる遺伝子が、およそ40あるが、それぞれの遺伝子がコードするタンパク質の基質特異性についての情報は、ほとんどない。麹菌のAO090009000356遺伝子にコードされるグリコシドヒドロラーゼ（GH）3ファミリーの β -グルコシダーゼは、 β -グルコシド結合を有する二糖類を加水分解するとの報告がある（非特許文献4：Biosci. Biotech. Biochem. 1764 972-978（2006））。具体的には、 β -1, 3結合を有するラミナリビオース、 β -1, 6結合を有する β -ゲンチオビオース、 β -1, 4結合を有するセロビオース、 β -1, 2結合を有するソホロースの順に加水分解の特異性が高い。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：WO2013/076577

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Yao Xue Xue Bao, 2009, 44, 1252

－ 1 2 5 7

非特許文献2：J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2941－2946

非特許文献3：J. Agric. Food Chem, 2013, 61, 7127－7134

非特許文献4：Biosci. Biotech. Biochem. 1764972－978 (2006)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 上記のような状況の下、モグロシドの新たな生産方法が求められていた。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、麴菌由来のグリコシドヒドロラーゼASBGL2、AOBGL2、AOBGL1およびASBGL1が、モグロシドVの β -1,6グルコシド結合を切断する活性を有することなどを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明は、以下の通りである。

[1]

以下の(a)～(c)からなる群から選択されるタンパク質と、少なくとも1つの β 1,6-グルコシド結合を有するモグロシドを反応させて、前記 β 1,6-グルコシド結合を切断する工程を含む、 β 1,6-グルコシド結合のないモグロシドの調製方法。

(a) 配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質；

(b) 配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1,6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる

群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β 1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質

[2]

前記(a)～(c)からなる群から選択されるタンパク質が、さらに、分泌シグナルペプチドを含む、前記[1]に記載の方法。

[3]

前記少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドが、さらに、少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有する、前記[1]または[2]に記載の方法。

[4]

前記少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合および少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドが、モグロシドV、シアメノシドI、モグロシドIV、およびモグロシドIIIA₁から選択される、前記[3]に記載の方法。

[5]

前記 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドが、モグロシドIIIEおよびモグロシドIIAから選択される、前記[4]に記載の方法。

[6]

少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを生成する宿主に、以下の(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換体を培養することを含む、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの生産方法。

(a) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列から

なるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[7]

前記(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが、さらに、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド含む、前記[6]に記載の方法。

[8]

前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチ

ドが、配列番号 1 の 1 番目～60 番目、配列番号 5 の 1 番目～60 番目、配列番号 9 の 1 番目～57 番目、配列番号 13 の 1 番目～57 番目、配列番号 43、配列番号 45 および配列番号 47 のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである、前記 [7] に記載の方法。

[9]

前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 14、および配列番号 17～配列番号 25 のいずれかに記載の塩基配列からなる、前記 [8] に記載の方法。

[10]

前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターに挿入されたものである、前記 [6]～[9] のいずれか 1 項に記載の方法。

[11]

前記形質転換体が、形質転換酵母または形質転換植物である、前記 [6]～[10] のいずれか 1 項に記載の方法。

[12]

宿主細胞に、以下の (a)～(e) からなる群から選択されるポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換細胞に由来する酵素剤を、少なくとも 1 つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドと接触させて、前記 β 1, 6-グルコシド結合を切断する工程を含む、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの調製方法。

(a) 配列番号 1 の 61 番目～2601 番目、配列番号 2 の 61 番目～2707 番目、配列番号 5 の 61 番目～2601 番目、配列番号 6 の 61 番目～2708 番目、配列番号 9 の 58 番目～2586 番目、配列番号 10 の 58 番目～2891 番目、配列番号 13 の 58 番目～2586 番目、および配列番号 14 の 58 番目～2892 番目からなる群から選択される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[13]

前記(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが、さらに、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む、上記[12]に記載の方法。

[14]

前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドが、配列番号1の1番目～60番目、配列番号5の1番目～60番目、配

列番号 9 の 1 番目～57 番目、配列番号 13 の 1 番目～57 番目、配列番号 43、配列番号 45 および配列番号 47 のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである、上記 [13] に記載の方法。

[15]

前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 14、および配列番号 17～配列番号 25 のいずれかに記載の塩基配列からなる、上記 [14] に記載の方法。

[16]

前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターに挿入されたものである、上記 [12]～[15] のいずれか 1 項に記載の方法。

[17]

前記形質転換細胞が、形質転換細菌または形質転換酵母である、上記 [12]～[16] のいずれか 1 項に記載の方法。

[18]

前記少なくとも 1 つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドが、さらに、少なくとも 1 つの β 1, 2-グルコシド結合を有する、上記 [12]～[17] に記載の方法。

[19]

前記少なくとも 1 つの β 1, 6-グルコシド結合および少なくとも 1 つの β 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドが、モグロシド V、シアメノシド I、モグロシド IV、およびモグロシド IIIA₁ から選択される、上記 [18] に記載の方法。

[20]

前記 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドが、モグロシド IIIIE およびモグロシド IIIA から選択される、上記 [19] に記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明の方法により、モグロシドの新たな調製方法が提供される。また、本発明の形質転換体は、 β -1,6 グルコシド結合のないモグロシドを製造することができる。本発明の形質転換体は、 β -1,6 グルコシド結合のないモグロシドの含有量が高いため、これらの形質転換体から、効率よく β -1,6 グルコシド結合のないモグロシドを抽出および精製することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]酵母の分泌タンパク質の分泌シグナルペプチド配列（DNA配列およびアミノ酸配列）を示す。Aは、MF（ALPHA）1（YPL187W）である。Bは、PHO5（YBR093C）である。Cは、SUC2（YIL162W）である。

[図2]モグロシドVを酵素液で反応して得られた反応産物のLC分析の結果を示す。Aは、酵素液ASBGL2での結果であり、Bは、酵素液AOBGL1での結果であり、Cは、コントロールである。（1）はモグロシドVであり、（2）はモグロシドIII Eである。

[図3]モグロシドIII Eを酵素液で反応して得られた反応産物のLC分析の結果を示す。Aは、酵素液AOBGL1での結果であり、Bはコントロールである。（1）はモグロシドIII Eであり、（2）はモグロール配糖体（2糖）である。

[図4]モグロシドIII Eを酵素液で反応して得られた反応産物のLC-MS分析の結果を示す。Aは、酵素液AOBGL1での結果であり、Bはコントロールである。（1）はモグロシドIII Eであり、（2）はモグロール配糖体（2糖）であり、（3）はモグロール配糖体（1糖）である。

[図5-1]AOBGL1タンパク質（AOBGL1 p）、ASBGL1タンパク質（ASBGL1 p）AOBGL2タンパク質（AOBGL2 p）とASBGL2（ASBGL2 p）タンパク質のアミノ酸配列のアライメントを示す。二重下線部分は、推定分泌シグナル配列である。

[図5-2]図5-1の続きである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2015年1月20日に出願された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願（特願2015-008508号）の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

[0016] 「A S B G L 2」は、麴菌由来の β -グルコシダーゼであり、そのc D N A配列、ゲノムD N A配列、アミノ酸配列、および成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号1、配列番号2、配列番号3、および配列番号4に示される。

「A O B G L 2」は、麴菌由来の β -グルコシダーゼであり、そのc D N A配列、ゲノムD N A配列、アミノ酸配列、および成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8に示される。

「A O B G L 1」は、麴菌由来の β -グルコシダーゼあり、そのc D N A配列、ゲノムD N A配列、アミノ酸配列、および成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12に示される。

「A S B G L 1」は、麴菌由来の β -グルコシダーゼであり、そのc D N A配列、ゲノムD N A配列、アミノ酸配列、および成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号13、配列番号14、配列番号15、および配列番号16に示される。

これらのポリヌクレオチドおよび酵素は、後述の実施例に記載した手法、公知の遺伝子工学的手法、公知の合成手法等によって取得することが可能である。

[0017] 1. モグロシドの調製方法

本発明は、以下の（a）～（c）からなる群から選択されるタンパク質（以下、「本発明のタンパク質」という）と、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを反応させて、前記 β 1, 6-グルコシド結合を切断する工程を含む、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの調製方法を提供する。

[0018] （a）配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質；

（b）配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質；

（c）配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質

[0019] 上記（b）または（c）に記載のタンパク質は、代表的には、配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異体であるが、例えば、” Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012”、” Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997”、” Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)”、” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)”、” Gene, 34, 315 (1985)”、” Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)”、” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)” 等に記載の部位特異

的変異導入法を用いて、人為的に取得することができるものも含まれる。

[0020] 「配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1,6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質」としては、配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、例えば、1～84個、1～80個、1～75個、1～70個、1～65個、1～60個、1～55個、1～50個、1～49個、1～48個、1～47個、1～46個、1～45個、1～44個、1～43個、1～42個、1～41個、1～40個、1～39個、1～38個、1～37個、1～36個、1～35個、1～34個、1～33個、1～32個、1～31個、1～30個、1～29個、1～28個、1～27個、1～26個、1～25個、1～24個、1～23個、1～22個、1～21個、1～20個、1～19個、1～18個、1～17個、1～16個、1～15個、1～14個、1～13個、1～12個、1～11個、1～10個、1～9個（1～数個）、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1,6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入および／または付加の数は、一般的には小さい程好ましい。

[0021] また、このようなタンパク質としては、配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列と90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1,6グルコシド結

合を切断する活性を有するタンパク質が挙げられる。上記配列同一性の数値は一般的に大きい程好ましい。

[0022] 「配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの $\beta-1,6$ グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質」としては、配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列と90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの $\beta-1,6$ グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質が挙げられる。上記配列同一性の数値は一般的に大きい程好ましい。

[0023] ここで、「モグロシドの $\beta-1,6$ グルコシド結合を切断する活性」とは、アグリコンであるモグロールにグルコースが結合した配糖体であるモグロシドにおいて、モグロシド中のグルコース同士が形成する $\beta-1,6$ グルコシド結合を切断する活性を意味する。本発明のタンパク質は、モグロシドにおいて、 $\beta-1,2$ グルコシド結合を切断する活性を有していてもよいが、この場合でも、本発明のタンパク質は、 $\beta-1,2$ グルコシド結合と比較して、 $\beta-1,6$ グルコシド結合を優先的に切断する。

[0024] モグロシドの $\beta-1,6$ グルコシド結合を切断する活性は、本発明のタンパク質と、少なくとも1つの $\beta-1,6$ グルコシド結合を有するモグロシドを反応させて、得られた反応生成物を精製し、精製したものを液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography: LC) 等の公知の手法により分析することで確認することができる。少なくとも1つの $\beta-1,6$ グルコシド結合に加えて、 $\beta-1,2$ グルコシド結合を有するモグロシドを本発明のタンパク質との反応に用いることで、 $\beta-1,2$ グルコシ

ド結合と比較して、 $\beta-1$, 6 グルコシド結合を優先的に切断しているかも確認することができる。

[0025] 「配列番号 4、配列番号 8、配列番号 12 および配列番号 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84 個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および／または付加された」とは、同一配列中の任意かつ 1～84 個のアミノ酸配列中の位置において、1～84 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および／または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入および付加のうち 2 種以上が同時に生じてよい。

[0026] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

[0027] A 群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、 α -メチルセリン、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン；

B 群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸；

C 群：アスパラギン、グルタミン；

D 群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4-ジアミノブタン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸；

E 群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン；

F 群：セリン、スレオニン、ホモセリン；

G 群：フェニルアラニン、チロシン。

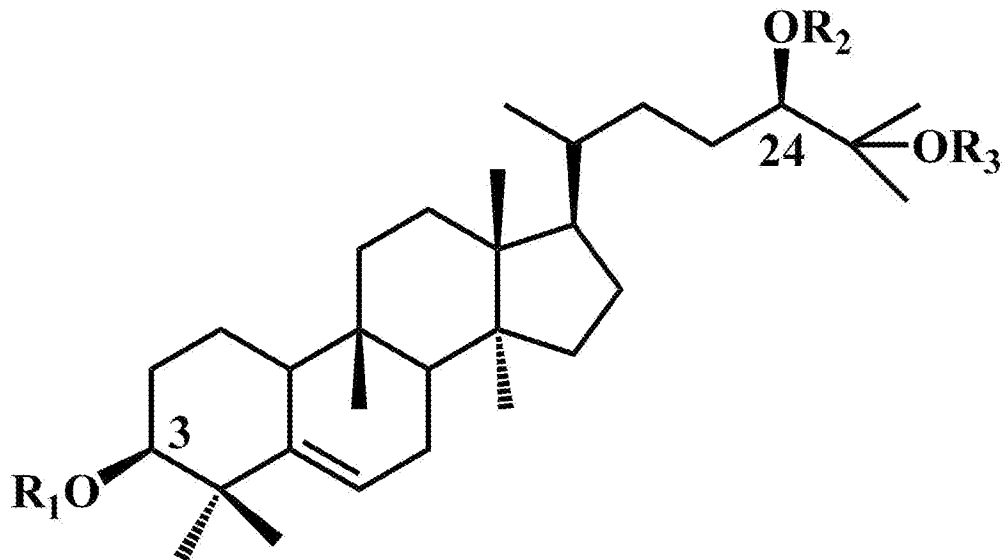
[0028] 本発明のいくつかの態様のタンパク質は、分泌シグナルペプチドが切断されており、分泌シグナルペプチドを含まない。本発明の別のいくつかのタンパク質は、分泌シグナルペプチドが切断されずに残り、このため、さらに、分泌シグナルペプチドを含んでもよい。分泌シグナルペプチドを含む場合、好ましくは、分泌シグナルペプチドは、本発明のタンパク質の N 末端に含まれる。分泌シグナルペプチドとは、当該分泌シグナルペプチドに結合されたタンパク質を、細胞外へ分泌させる役割を担うペプチド領域を意味する。こ

のような分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列およびそれをコードするポリヌクレオチド配列は、当技術分野において周知であり、報告されている。

[0029] 本発明のタンパク質は、これをコードするポリヌクレオチド（後述する「本発明のポリヌクレオチド」を参照）を適切な宿主細胞内で発現させることなどにより得ることができるが、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、AAPPTec LLC製、Perkin Elmer Inc. 製、Protein Technologies Inc. 製、PerSeptive Biosystems製、Applied Biosystems製、SHIMADZU CORPORATION製等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0030] 本発明において、「モグロシド」とは、アグリコンであるモグロールにグルコースが結合した配糖体である。モグロールおよびモグロシドの例を、以下に示す。

[0031] [化1]



[0032]

[化2]

化合物名	R ₁	R ₂	R ₃
モグロシドV	Glc6-Glc-	Glc6Glc2 (Glc) -	H
シアメノシドI	Glc-	Glc6Glc2 (Glc) -	H
モグロシドIV	Glc6-Glc-	Glc2-Glc-	H
モグロシドIVA ₁	Glc6-Glc-	Glc6-Glc-	H
モグロシドIII	Glc-	Glc6-Glc-	H
モグロシドIIIA ₁	H	Glc6Glc2 (Glc) -	H
モグロシドIIIA ₂	Glc6-Glc-	Glc-	H
モグロシドIIIE	Glc-	Glc2-Glc-	H
モグロシドIIA	H	Glc2-Glc-	H
モグロシドIIA ₁	H	Glc6-Glc-	H
モグロシドIIA ₂	Glc6-Glc-	H	H
モグロシドIIB	Glc-	H	Glc-
モグロシドIIE	Glc-	Glc-	H
モグロシドIA ₁	H	Glc-	H
モグロシドIE ₁	Glc-	H	H
モグロール	H	H	H

[0033] 尚、上記において、「Glc6-Glc-」は、 β 1, 6-グルコシド結合を含むことを示す。「Glc2-Glc-」は、 β 1, 2-グルコシド結合を含むことを示す。「(Glc6Glc2 (Glc) -)」は、 β 1, 6-グルコシド結合と β 1, 2-グルコシド結合を含むことを示す。

[0034] モグロシドのうち、少なくとも1つ（例えば、1または2）の β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドは、例えば、モグロシドV、シアメノシドI、モグロシドIV、モグロシドIVA、モグロシドIII、モグロシドIIIA₁、モグロシドIIIA₂、モグロシドIIA₁、およびモグロシドIIA₂から選択されるモグロシドである。少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドは、さらに、少なくとも1つ（例えば、1つ）の β 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドを有するのが好ましい。少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合と少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドは、例えば、モグロシドV、シアメノシドI、モグロシドIV、およびモグロシドIIIA₁から選択されるモグロシドであり、好ましくは、モグロシドVである。

[0035] 本発明に係るモグロシドの調製方法によって、 β 1, 6-グルコシド結合が切断され、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシド（以下、「本発明のモグロシド」という）が得られる。 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドは、出発物質の「 β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシド」に応じて次のように変わる。以下に、その例を示す。

[0036] [化3]

出発物質	本発明のモグロシド
モグロシドV	モグロシドI I I E
シアメノシドI	モグロシドI I I E
モグロシドI V	モグロシドI I I E
モグロシドI I I I	モグロシドI I E
モグロシドI I I I A ₁	モグロシドI I A
モグロシドI I I I A ₂	モグロシドI I E
モグロシドI I A ₁	モグロシドI A ₁
モグロシドI I A ₂	モグロシドI E ₁

[0037] 本発明のモグロシドの調製方法において、出発物質となる少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドは、ラカンカの果実から抽出し、精製することによって入手することができるし、あるいは、公知の方法（例えば、特許文献1に記載の方法）またはそれに準ずる方法によって調製してもよい。あるいは、出発物質となる少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドは、市販のものでもよい。

本発明のいくつかの態様では、モグロシドV、シアメノシドI、モグロシドI V、およびモグロシドI I I A₁から選択されるモグロシドの β 1, 6-グルコシド結合が切断され、モグロシドI I I EおよびモグロシドI I Aから選択されるモグロシドが得られる。本発明の最も好ましい態様では、モグロシドVの β 1, 6-グルコシド結合が切断され、モグロシドI I I Eが得られる。

[0038] 前述のように、本発明のタンパク質は、モグロシドにおいて、さらに、 β 1, 2-グルコシド結合を切断する活性を有する場合がある。その場合は、

本発明のモグロシドは、 β 1, 6-グルコシド結合および β - 1, 2-グルコシド結合のいずれもないモグロシドを含んでもよい。 β 1, 6-グルコシド結合および β - 1, 2-グルコシド結合のいずれもないモグロシドは、例えば、モグロシド I I B、モグロシド I I E、モグロシド I A₁、およびモグロシド I E₁であり、好ましくは、モグロシド I I Eである。例えば、モグロシド I I I Eの β - 1, 2-グルコシド結合がさらに切断されると、モグロシド I I Eが得られる。また、モグロシド I I Aの β - 1, 2-グルコシド結合がさらに切断されると、モグロシド I A₁が得られる。

[0039] 本発明に係るモグロシドの調製方法は、本発明のタンパク質と、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを反応させて、前記 β 1, 6-グルコシド結合を切断する工程を含む。本発明の方法は、さらに、前記工程で生成した β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドを精製する工程を含んでもよい。

β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドは、適切な溶媒（水等の水性溶媒、またはアルコール、エーテル、アセトン等の有機溶媒）による抽出、酢酸エチルその他の有機溶媒：水の勾配、高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography : HPLC）、ガスクロマトグラフィー、飛行時間型質量分析（Time-of-Flight mass spectrometry : TOF-MS）、超高性能液体クロマトグラフィー（Ultra (High) Performance Liquid chromatography : UPLC）等の公知の方法によって精製することができる。

[0040] 本発明のモグロシドが、 β 1, 6-グルコシド結合はないが少なくとも1つの β - 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドと、 β 1, 6-グルコシド結合および β - 1, 2-グルコシド結合のいずれもないモグロシドとを含む場合には、これらのモグロシドを、必要に応じて、公知の方法により分離および精製するようにしてもよい。 β 1, 6-グルコシド結合はないが少なくとも1つの β - 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドは、例えば、モグ

ロシド I I I E および モグロシド I I A である。β 1, 6-グルコシド結合 および β-1, 2-グルコシド結合のいずれもないモグロシドは、前述の通りである。

[0041] 2. 非ヒト形質転換体を用いた本発明のモグロシドの生産方法

本発明のタンパク質は、麴菌に由来する分泌型の酵素またはその変異体であり、麴菌と同様に細胞外環境において高い活性を有することが期待される。この場合、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（後述する「本発明のポリヌクレオチド」を参照）を、細菌、真菌類、植物、昆虫、ヒトを除く哺乳動物などに由来する宿主細胞に導入して本発明のタンパク質を細胞外に発現させ、本発明のタンパク質と、β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドとを反応させることにより本発明のモグロシドを生成することができる。あるいは、宿主によっては、本発明のタンパク質を宿主細胞内で発現させ、本発明のモグロシドを生成することもできる。

[0042] そこで、本発明は、少なくとも1つのβ 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを生成する宿主に、以下の（a）～（e）からなる群から選択されるポリヌクレオチド（以下、「本発明のポリヌクレオチド」という）が導入された非ヒト形質転換体（以下、「本発明の形質転換体」という）を培養することを含む、β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの生産方法を提供する。

[0043] （a）配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（b）配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[0044] 本明細書中、「ポリヌクレオチド」とは、DNAまたはRNAを意味する。

[0045] 配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1の61番目～2601番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号8のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号5の61番目～2601番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号12のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号9の58番目～2586番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号16のアミノ酸配列から

なるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 13 の 58 番目～2586 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。

[0046] 「配列番号 4、配列番号 8、配列番号 12、および配列番号 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6 グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質」としては、前述のものが挙げられる。

[0047] 「配列番号 4、配列番号 8、配列番号 12 および配列番号 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6 グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質」としては、前述のものが挙げられる。

[0048] 本明細書中、「高ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば、配列番号 1 の 61 番目～2601 番目、配列番号 2 の 61 番目～2707 番目、配列番号 5 の 61 番目～2601 番目、配列番号 6 の 61 番目～2708 番目、配列番号 9 の 58 番目～2586 番目、配列番号 10 の 58 番目～2891 番目、配列番号 13 の 58 番目～2586 番目、および配列番号 14 の 58 番目～2892 番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド、または配列番号 4、配列番号 8、配列番号 12、および配列番号 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドの全部または一部をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法またはサザンハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイゼーションの方法としては、例えば、” Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 4, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2012”、” Ausub

el, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997”などに記載されている方法を利用することができる。

本明細書中、「高ストリンジেন্টな条件」とは、例えば、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハルト溶液、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 50% ホルムアミド、 50°C 、または $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 60°C 、または $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 62°C 、または $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 65°C の条件であるが、これに限定されるものではない。これらの条件において、温度を上げるほど高い配列同一性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度等の複数の要素が考えられ、当業者であればこれらの要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0049] なお、ハイブリダイゼーションに市販のキットを用いる場合は、例えばAlkphos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare)を用いることができる。この場合は、キットに添付のプロトコルにしたがい、標識したプローブとのインキュベーションを一晩行った後、メンブレンを $55\sim 60^\circ\text{C}$ の条件下で $0.1\% (w/v)$ SDSを含む1次洗浄バッファーで洗浄後、ハイブリダイズしたDNAを検出することができる。あるいは、配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列、または配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と相補的な塩基配列の全部または一部に基づいてプローブを作製する際に、市販の試薬（例えば、PC

Rラベリングミックス（ロシュ・ダイアグノスティクス社）等）を用いて該プローブをジゴキシゲニン（DIG）ラベルした場合には、DIG核酸検出キット（ロシュ・ダイアグノスティクス社）を用いてハイブリダイゼーションを検出することができる。

[0050] 上記以外にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、BLASTの相同性検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメーターを用いて計算したときに、配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列のDNA、または配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするDNAと60%以上、61%以上、62%以上、63%以上、64%以上、65%以上、66%以上、67%以上、68%以上、69%以上、70%以上、71%以上、72%以上、73%以上、74%以上、75%以上、76%以上、77%以上、78%以上、79%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の配列同一性を有するDNAをあげることができる。

[0051] なお、アミノ酸配列や塩基配列の配列同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90:5873, 1993）を用いて決定でき

る。BLASTを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

[0052] 本発明のポリヌクレオチドは、さらに、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含んでもよい。好ましくは、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの5'末端に含まれる。分泌シグナルペプチドは、前述の通りである。このような分泌シグナルペプチドは、本発明のポリヌクレオチドを導入する宿主に応じて、適宜選択することができる。例えば、宿主が酵母の場合には、酵母菌由来の分泌シグナルペプチド、例えば、MF (ALPHA) 1シグナルペプチド、PHO5シグナルペプチド、およびSUC2シグナルペプチドが挙げられる。MF (ALPHA) 1シグナルペプチド、PHO5シグナルペプチド、およびSUC2シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、それぞれ、配列番号43、配列番号45および配列番号47の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。MF (ALPHA) 1シグナルペプチド、PHO5シグナルペプチド、およびSUC2シグナルペプチドのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号44、配列番号46および配列番号48のアミノ酸配列である。また、宿主が麹菌の場合には、麹菌由来のシグナルペプチド、例えば、配列番号3の1番目～20番目のアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号7の1番目～20番目のアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号11の1番目～19番目のアミノ酸配列からなるペプチド、および配列番号15の1番目～19番目のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。配列番号3の1番目～20番目のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号7の1番目～20番目のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号11の1番目～19番目のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチド、および配列番号15の1番目～19番目のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、それぞれ、配列番号1の1番目～60番目、配列番号5の1番目～60番

目、配列番号 9 の 1 番目～57 番目、および配列番号 13 の 1 番目～57 番目からなる群から選択される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0053] 分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む本発明のポリヌクレオチドは、例えば、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 14、および配列番号 17～25 のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、好ましくは、配列番号 17～25 のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0054] 上記した本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子工学的手法または公知の合成手法によって取得することが可能である。

[0055] 本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、適切な発現ベクターに挿入された状態で宿主に導入される。

[0056] 適切な発現ベクターは、通常、

(i) 宿主細胞内で転写可能なプロモーター；

(i i) 該プロモーターに結合した、本発明のポリヌクレオチド；および

(i i i) RNA 分子の転写終結およびポリアデニル化に関し、宿主細胞内で機能するシグナルを構成要素として含む発現カセット

を含むように構成される。

[0057] 発現ベクターの作製方法としては、プラスミド、ファージまたはコスミドなどを用いる方法が挙げられるが特に限定されない。

[0058] ベクターの具体的な種類は特に限定されず、宿主細胞中で発現可能なベクターが適宜選択され得る。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に本発明のポリヌクレオチドを発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明のポリヌクレオチドを各種プラスミド等に組み込んだベクターを発現ベクターとして用いればよい。

[0059] 本発明の発現ベクターは、導入されるべき宿主の種類に依存して、発現制御領域（例えば、プロモーター、ターミネーターおよび／または複製起点等）を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、慣用的なプロ

モーター（例えば、*t r c*プロモーター、*t a c*プロモーター、*l a c*プロモーター等）が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、*P H O 5*プロモーター等が挙げられ、糸状菌用プロモーターとしては、例えば、アミラーゼ、*t r p C*等が挙げられる。また、植物細胞内で目的遺伝子を発現させるためのプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウィルスの35S RNAプロモーター、*r d 2 9 A*遺伝子プロモーター、*r b c S*プロモーター、前記カリフラワーモザイクウィルスの35S RNAプロモーターのエンハンサー配列をアグロバクテリウム由来のマンノピン合成酵素プロモーター配列の5'側に付加した*m a c - 1*プロモーター等が挙げられる。動物細胞宿主用プロモーターとしては、ウイルス性プロモーター（例えば、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター等）が挙げられる。

[0060] 発現ベクターは、少なくとも1つの選択マーカを含むことが好ましい。このようなマーカーとしては、栄養要求性マーカー（*u r a 5*、*n i a D*）、薬剤耐性マーカー（*h y g r o m y c i n e*、ゼオシン）、ジェネチシン耐性遺伝子（*G 4 1 8 r*）、銅耐性遺伝子（*C U P 1*）（*M a r i n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , v o l . 8 1 , p . 3 3 7 , 1 9 8 4*）、セルレニン耐性遺伝子（*f a s 2 m*, *P D R 4*）（それぞれ、猪腰淳嗣ら、生化学、*v o l . 6 4 , p . 6 6 0 , 1 9 9 2*；*H u s s a i n e t a l . , G e n e , v o l . 1 0 1 , p . 1 4 9 , 1 9 9 1*）などが利用可能である。

[0061] 本発明の形質転換体の作製方法（生産方法）は特に限定されないが、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主に導入して形質転換する方法が挙げられる。ここで用いられる宿主は、少なくとも1つの $\beta 1, 6$ -グルコシド結合を有するモグロシドを生成するものであれば特に限定されるものではなく、ラカンカのように少なくとも1つの $\beta 1, 6$ -グルコシド結合を有するモグロシドを生成する植物だけではなく、本来少なくとも1つの $\beta 1, 6$ -グルコシド結合を有するモグロシドを生成しない細胞また

は生物に少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドの生成に必要な遺伝子を導入したものを宿主として用いることができる。「少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドの生成に必要な遺伝子」は、例えば、WO2013/076577、WO2014/086842などに記載のモグロールやモグロシド合成活性を有する遺伝子が挙げられる。形質転換の対象となる細胞または生物としては、従来公知の各種細胞または生物を好適に用いることができる。形質転換の対象となる細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*)、糸状菌 (麹菌 *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus sojae*)、植物細胞、ヒトを除く動物細胞等が挙げられる。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は当分野で周知である。また、形質転換の対象となる生物も、特に限定されるものではなく、上記宿主細胞で例示した各種微生物または植物またはヒトを除く動物が挙げられる。形質転換体は、好ましくは、酵母または植物である。

[0062] 宿主細胞の形質転換方法としては一般に用いられる公知の方法が利用できる。例えば、エレクトロポレーション法 (Mackenzie, D. A. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, p. 4655-4661, 2000)、パーティクルデリバリー法 (特開2005-287403「脂質生産菌の育種方法」に記載の方法)、スフェロプラスト法 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 75, p. 1929, 1978)、酢酸リチウム法 (*J. Bacteriology*, vol. 153, p. 163, 1983)、*Methods in yeast genetics*, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manualなどに記載の方法) で実施可能であるが、これらに限定されない。

[0063] その他、一般的な分子生物学的な手法に関しては、”Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012”、”Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)”等を参照することができる。

[0064] 形質転換体が、酵母である場合、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターを、当該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが発現され得るように酵母中に導入することによって取得される。本発明のポリヌクレオチドで形質転換された酵母は、野生型と比べて本発明のタンパク質を多く発現する。このため、発現した本発明のタンパク質が、酵母で生成された少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドと反応し、 β 1, 6-グルコシド結合が切断され、 β 1, 6-グルコシド結合のない本発明のモグロシドが酵母の細胞内または培養液中、好ましくは、培養液中に生成される。

[0065] 形質転換体が、植物である場合、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターを、当該ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が発現され得るように植物中に導入することによって取得される。本発明において形質転換の対象となる植物は、植物体全体、植物器官（例えば葉、花卉、茎、根、種子など）、植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織など）または植物培養細胞、あるいは種々の形態の植物細胞（例えば、懸濁培養細胞）、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどのいずれをも意味する。形質転換に用いられる植物としては、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを生成する植物、または本来少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを生成しないものの必要な遺伝子を導入することで少なくとも β 1, 6-グルコシ

ド結合を有するモグロシドを生成することができる植物であれば特に限定されず、単子葉植物綱または双子葉植物綱に属する植物のいずれでもよい。植物への遺伝子の導入には、当業者に公知の形質転換方法（例えば、アグロバクテリウム法、遺伝子銃法、PEG法、エレクトロポレーション法など）が用いられる。遺伝子が導入された細胞または植物組織は、まずハイグロマイシン耐性などの薬剤耐性で選択され、次いで定法によって植物体に再生される。形質転換細胞から植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。本発明のポリヌクレオチドが植物に導入されたか否かの確認は、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法などによって行うことができる。本発明のポリヌクレオチドがゲノム内に組み込まれた形質転換植物体が一旦取得されれば、当該植物体の有性生殖または無性生殖によって子孫を得ることができる。また、当該植物体またはその子孫、あるいはこれらのクローンから、例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなどを得て、それらを基に当該植物体を量産することができる。本発明のポリヌクレオチドで形質転換された植物（以下、「本発明の植物」）は、その野生型と比べて本発明のタンパク質を多く含む。このため、本発明のタンパク質が、本発明の植物で生成された少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドと反応し、 β 1, 6-グルコシド結合が切断され、 β 1, 6-グルコシド結合のない本発明のモグロシドが植物中に生成される。

[0066] 本発明のいくつかの態様の形質転換体またはその培養液は、その野生型と比べて本発明のモグロシドの含有量が高く、その抽出物または培養液には、本発明のモグロシドが高濃度で含まれる。本発明の形質転換体の抽出物は、形質転換体をガラスビーズ、ホモジェナイザーまたはソニケーター等を用いて破碎し、当該破碎物を遠心処理し、その上清を回収することにより、得ることができる。本発明のモグロシドが培養液中に蓄積される場合には、培養終了後、通常の方法（例えば、遠心分離、ろ過など）により形質転換体と培養上清とを分離することにより、本発明のモグロシドを含む培養上清を得る

ことができる。

[0067] このようにして得られた抽出液もしくは培養上清は、さらに精製工程に供してもよい。本発明のモグロシドの精製は、通常の分離および精製方法に従って行うことができる。具体的な方法は、前記と同様である。

[0068] 3. 非ヒト形質転換細胞に由来する酵素剤を用いた本発明のモグロシドの調製方法

本発明のポリヌクレオチドを、細菌、真菌類、植物、昆虫、ヒトを除く哺乳動物などに由来する宿主細胞に導入して本発明のタンパク質を発現させ、本発明のタンパク質を発現する形質転換細胞に由来する酵素剤を用いること、すなわち、本発明のタンパク質を発現する形質転換細胞に由来する酵素剤を、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドと接触させることにより本発明のモグロシドを生成することができる。「形質転換細胞に由来する酵素剤」は、形質転換細胞を用いて調製され、本発明のタンパク質を含むものであれば限定されないが、例えば、形質転換細胞自体、形質転換細胞の粉碎物自体、形質転換細胞の培養上清自体、およびこれらの精製物である。そこで、本発明は、宿主細胞に、以下の(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換細胞に由来する酵素剤を、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドと接触させて、前記 β 1, 6-グルコシド結合を切断する工程を含む、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの調製方法を提供する。

(a) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌク

レオチド；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[0069] 上記(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドであり、前記と同様である。

[0070] 本発明のポリヌクレオチドは、さらに、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含んでもよい。好ましくは、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの5'末端に含まれる。分泌シグナルペプチドおよびそれをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、前記と同様である。

[0071] 分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む本発明のポリヌクレオチドは、例えば、配列番号1、配列番号2、配列

番号5、配列番号6、配列番号9、配列番号10、配列番号13、配列番号14、および配列番号17～25のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、好ましくは、配列番号17～25のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0072] 本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、適切な発現ベクターに挿入された状態で宿主細胞に導入される。適切な発現ベクターは、前記と同様である。

[0073] 本発明の形質転換細胞の作製方法は、特に限定されないが、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換する方法が挙げられる。形質転換の対象となる細胞としては、従来公知の各種細胞または生物を好適に用いることができる。形質転換の対象となる細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*)、糸状菌 (麹菌 *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus sojae*)、植物細胞、ヒトを除く動物細胞等が挙げられる。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は当分野で周知である。形質転換細胞は、好ましくは、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌または酵母である。

宿主細胞の形質転換方法は、前述の通りである。

[0074] 本発明の形質転換細胞は、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターを、当該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが発現され得るように宿主細胞に導入することによって取得される。本発明のポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞は、野生型と比べて本発明のタンパク質を多く発現する。このため、本発明のタンパク質を発現する形質転換細胞に由来する酵素剤を用いること、すなわち、本発明のタンパク質を発現する形質転換細胞に由来する酵素剤を、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドと接触させることにより本発明のモグロシド

を生成することができる。

[0075] 「接触」とは、本発明の形質転換細胞に由来する酵素剤と少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドとを同一の反応系または培養系に存在させることを意味し、例えば、本発明の形質転換細胞に由来する酵素剤を含む容器に少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを添加すること、本発明の形質転換細胞に由来する酵素剤と少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドとを混合すること、本発明の形質転換細胞に由来する酵素剤を少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを含む容器に添加することが含まれる。

[0076] 「モグロシド」、「少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシド」および「 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシド」は、前記と同様である。

[0077] 少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドは、さらに、少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有するのが好ましい。少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合と少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドは、前記と同様である。

[0078] このようにして得られた本発明のモグロシドは、常法に従って、例えば、食品、甘味料、香料、医薬品、工業原料（化粧料、石鹼等の原料）の製造等の用途に使用することができる。

[0079] 食品の例としては、栄養補助食品、健康食品、機能性食品、幼児用食品、老人用食品等が挙げられる。本明細書中、食品は、固体、流動体、および液体、並びにそれらの混合物であって、摂食可能なものの総称である。

[0080] なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

実施例

[0081] 以下、実施例を用いて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって限定されない。

[0082] 材料

以下の実施例において、5-Bromo-4-chloro-3-indlyl β -D-glucopyranoside (以下、X- β -Glc)、および4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (以下、pNP- β -Glc) は、SIGMA-Aldrich Corporationから入手したものを用いた。

[0083] 分泌型 β -グルコシダーゼホモログの検索

麹菌ゲノムデータ (PRJNA28175) より、 β -グルコシダーゼホモログを探索した。その結果、GH2ファミリーモチーフを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子が5個、GH3ファミリーモチーフを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子が28個、GH5ファミリーモチーフを有するアミノ酸配列をコードする遺伝子が7つ見つかった。その中で、GH3ファミリーモチーフを有し、分泌シグナルを有するタンパク質をコードする配列の中に、A0090001000544とA0090009000356があり、これらをクローン化した。

[0084] 麹菌のcDNAの合成

麹菌 *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* (IFO30102) または *Aspergillus sojae* (NBR C4239) をGYプレート (2%グルコース、0.5%酵母エキス、2%アガー) に植菌し、25℃で3日間培養した。生育した菌体をGYプレートから回収し、RNeasy (QIAGEN) でトータルRNAを抽出した。SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (ライフテクノロジーズ) により、cDNAを合成した。

[0085] A0090001000544のDNA配列をもとに、以下のプライマーを設計した。

[0086] AOBGL2-1 : 5' -GCGGCCGCATGGCTGCCTTCCCGGCCTA (配列番号26)
AOBGL2-2 : 5' -GTCGACCTACAAAGTAGAACATCCCTCTCCAACC (配列番号27)

[0087] *Aspergillus sojae*のA0090001000544のホモログをクローン化するために、*Aspergillus sojae*のゲノムデータ (DNA Res. 18 (3), 165-176 (2011) 参照) から、BLAST検索により該当する配列を抽出した (配列番号2)。このDNA配列をもとに、以下のプライマーを設計した。

[0088] ASBGL2-1 : 5' -GCGGCCGCATGGCTGCCTTTCCGGCCTAC (下線部は制限酵素BglIIサイトである) (配列番号28)

ASBGL2-2 : 5' -GTCGACCTATAAAGTAGAACATCCCTCCCCTACT (配列番号29)

[0089] A0090009000356のDNA配列をもとに、以下のプライマーを設計した。

[0090] AOBGL1-1 : 5' -AGATCTATGAAGCTTGGTTGGATCGAGGT (下線部は制限酵素BglIIサイトである) (配列番号30)

AOBGL1-2 : 5' -GTCGACTTACTGGGCCTTAGGCAGCGA (下線部は制限酵素SalIサイトである) (配列番号31)

[0091] 上述のとおり合成したcDNAを鋳型として、ExTaq (タカラバイオ) を用いて、PCRにより増幅された約2.6 kbpのDNA断片をTOPOTA cloning Kit (ライフテクノロジーズ) を用いてクローニングした。鋳型、プライマーの組み合わせと、ここで得られた遺伝子は表1のとおりである。ここで得られたプラスミドをそれぞれ、pCR-AOBGL2、pCR-ASBGL2、pCR-AOBGL1またはpCR-ASBGL1とした。

[0092] [表1]

表1 : 鋳型、プライマーの組み合わせと、得られた遺伝子

鋳型	プライマー1	プライマー2	得られた遺伝子
<i>A. oryzae</i> cDNA	AOBGL2-1	AOBGL2-2	AOBGL2
<i>A. sojae</i> cDNA	ASBGL2-1	ASBGL2-2	ASBGL2
<i>A. oryzae</i> cDNA	AOBGL1-1	AOBGL1-2	AOBGL1
<i>A. sojae</i> cDNA	AOBGL1-1	AOBGL1-2	ASBGL2

[0093] クローニングした各遺伝子の同一性および各遺伝子がコードする推定アミノ酸配列の同一性（％）は、下記表２および表３のとおりである。

[0094] [表2]

表２：DNA配列の同一性

	AOBGL 2	ASBGL 2	AOBGL 1	ASBGL 1
AOBGL 2				
ASBGL 2	95.8			
AOBGL 1	53.7	53.4		
ASBGL 1	53.6	52.9	97.6	

[0095] [表3]

表３：推定アミノ酸配列の同一性

	AOBGL 2 p	ASBGL 2 p	AOBGL 1 p	ASBGL 1 p
AOBGL 2 p				
ASBGL 2 p	98.2			
AOBGL 1 p	42.7	42.5		
ASBGL 1 p	42.7	42.5	98.7	

[0096] ここで、図５－１および図５－２に、AOBGL 2タンパク質（AOBGL 2 p）、ASBGL 2タンパク質（ASBGL 2 p）、AOBGL 1タンパク質（AOBGL 1 p）およびASBGL 1タンパク質（ASBGL 1 p）のアミノ酸配列のアライメントを示す。

[0097] [表4]

	cDNA	ゲノムDNA	アミノ酸配列	成熟タンパク質 アミノ酸配列
ASBGL 2	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 4
AOBGL 2	配列番号 5	配列番号 6	配列番号 7	配列番号 8
AOBGL 1	配列番号 9	配列番号 10	配列番号 11	配列番号 12
ASBGL 2	配列番号 13	配列番号 14	配列番号 15	配列番号 16

[0098] 酵母用発現ベクターの構築

酵母用発現ベクター pYE22m (Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1221-1228, 1995) を制限酵素 BamHI と SalI で消化して得られた DNA 断片と、pCR-ASBGL 2、p

CR-AOBGL1、またはpCR-ASBGL1を制限酵素BglIIとSalIで消化して得られた約2.6kbpのDNA断片を、DNA Ligation Kit Ver. 1 (タカラバイオ)を用いて、連結し、得られたプラスミドをpYE-ASBGL2、pYE-AOBGL1、またはpYE-ASBGL1とした。

[0099] 酵母形質転換株の取得

形質転換の親株として、*S. cerevisiae*のEH13-15株 (*trp1*, MAT α) (Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 515-520, 1989)を用いた。

[0100] プラスミドpYE22m (コントロール)、pYE-ASBGL2 (ASBGL2発現用)、pYE-AOBGL1 (AOBGL1発現用)、pYE-ASBGL1 (ASBGL1発現用)をそれぞれ用いて酢酸リチウム法により、EH13-15株を形質転換した。形質転換株は、SC-Trp (1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7g、グルコース20g、およびアミノ酸パウダー (アデニン硫酸塩1.25g、アルギニン0.6g、アスパラギン酸3g、グルタミン酸3g、ヒスチジン0.6g、ロイシン1.8g、リジン0.9g、メチオニン0.6g、フェニルアラニン1.5g、セリン11.25g、チロシン0.9g、バリン4.5g、スレオニン6g、ウラシル0.6gを混合したもの) 1.3gを含む) 寒天培地 (2%アガー) 上で生育するものを選抜した。

[0101] 選抜した株を、0.004% X- β -Glcを含むSC-Trp寒天培地に塗布し、30℃で3日間培養したが、pYE-ASBGL2、pYE-AOBGL1p、pYE-ASBGL1いずれのプラスミドで形質転換した株も、コントロールであるpYE22mで形質転換した株もどちらも青色を呈さず、X- β -Glc分解活性を確認できなかった。

[0102] 一方、選抜した株を、1Mリン酸カリウムバッファーを1/10量添加したSC-Trp液体培地10mLに1白金耳植菌し、30℃、125rpm

で2日間振とう培養した。得られた培養物を遠心分離により、培養上清と菌体に分けた。菌体は、50 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0)、0.1% CHAPS 溶液に懸濁して、ガラスビーズにて菌体を破碎し、遠心分離して得られた上清を菌体破碎液とした。得られた培養上清または菌体破碎液の pNP- β -Gal 活性を検討した。

[0103] その結果、コントロールを含めて、いずれの形質転換株の培養上清および菌体破碎液の両方に、pNP- β -Gal 分解活性があり、両者の間で、活性に大きな差はなかった。

[0104] これらのことから、プラスミド pYE-ASBGL2、pYE-AOBGL1p、pYE-ASBGL1 を酵母 EH13-15 株に導入しても、 β -グルコシダーゼ活性を有する活性型のタンパク質を発現させることができないことが示唆された。また、酵母の内在性の β -グルコシダーゼ活性を担う遺伝子を欠失させておく必要があることも分かった。

[0105] 分泌シグナル配列の置換

AOBGL2p や ASBGL2p の N 末端の 20 アミノ酸は分泌シグナル配列であると推定され、また、AOBGL1p や ASBGL1p の N 末端の 19 アミノ酸は、分泌シグナル配列であると推定される。ここで、図 5-1 中の二重下線部分が、AOBGL1、ASBGL1、AOBGL2、ASBGL2 の推定分泌シグナル配列である。

[0106] そこで、ASBGL2、AOBGL1 または ASBGL1 を酵母で分泌発現させるために、推定分泌シグナル配列を酵母の分泌タンパク質の分泌シグナル配列に置換することにした。

[0107] まず、以下のオリゴ DNA を合成し、アニーリングさせたのち、ベクター pYE22m の EcoRI サイトに挿入し、pYE-PacNhe を作成した。

[0108] PacI-NheI-F : 5' -AATTAATTAAGAGCTAGCG-3' (配列番号 32)

PacI-NheI-R : 5' -TTAATTCTCGATCGCTTAA-3' (配列番号 33)

)

[0109] プラスミド pCR-ASBGL2 を鋳型にして、以下のプライマー Sac-ASBGL2-F とプライマー Sal-ASBGL2-R で、KOD-Plus (東洋紡) を用いて PCR を行った。PCR により増幅した DNA 断片を制限酵素 SacI と SalI で消化して得られた約 2.6 kbp の DNA 断片を、ベクター pYE-PacNhe を制限酵素 SacI と SalI サイトに挿入し、プラスミド pYE-PN-ASBGL2 を構築した。

[0110] Sac-ASBGL2-F : 5' -AAGAGCTCGAGTCTCTGACATCAAGAGCCTCTACAGA-3' (配列番号 34)

Sal-ASBGL2-R : 5' -GGGTCGACCTATAAAGTAGAACATCCCTCCCCTACTACAC-3' (配列番号 35)

[0111] プラスミド pCR-AOBGL1 または pCR-ASBGL1 を鋳型にして、以下のプライマー Bgl2-AOBGL1-F とプライマー AOBGL1-2 で、KOD-Plus (東洋紡) を用いて PCR を行った。PCR により増幅した DNA 断片を制限酵素 BglII と SalI で消化して得られた約 2.5 kbp の DNA 断片を、ベクター pYE-PacNhe を制限酵素 BamHI と SalI サイトに挿入し、プラスミド pYE-PN-AOBGL1 または pYE-PN-ASBGL1 を構築した。

[0112] Bgl2-AOBGL1-F : 5' -TAAGATCTAAGGATGATCTCGCGTACTCCCC-3' (配列番号 36)

AOBGL1-2 : 5' -GTCGACTTACTGGGCCTTAGGCAGCGA-3' (配列番号 31)

[0113] ASBGL2p、AOBGL2p、AOBGL1p または ASBGL1p の推定分泌シグナル配列 (それぞれ、配列番号 3 の 1~20 番目の配列、配列番号 7 の 1~20 番目の配列、配列番号 11 の 1~19 番目の配列、または配列番号 15 の 1~19 番目の配列) を酵母の分泌タンパク質の分泌シグナル配列 MF (ALPHA) 1 (YPL187W) (図 1A に記載のアミノ酸配列の 1~19 番目の配列)、PHO5 (YBR093C) (図 1B に記

載アミノ酸配列の1～17番目の配列)、SUC2 (YIL162W) (図1Cに記載のアミノ酸配列の1～19番目の配列)に置き換えたタンパク質を発現させるためのプラスミドを構築するために、以下のプライマーを設計した。

- [0114] ここで、分泌シグナル配列MF (ALPHA) 1 (YPL187W) のDNA配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号43および配列番号44に示す。分泌シグナル配列PHO5 (YBR093C) のDNA配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号45および配列番号46に示す。分泌シグナル配列SUC2 (YIL162W) のDNA配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号47および配列番号48に示す。
- [0115] ScPHO5-F: 5' -TAAATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTTAGCCGCTTCTTTGCCAATGCAG-3' (配列番号37)
- ScPHO5-R: 5' -CTAGCTGCATTGGCCAAAGAAGCGGCTAAAAATTGAATAACAACAGATTTAAACATTTAAT-3' (配列番号38)
- ScSUC2-F: 5' -TAAATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCTGCAG-3' (配列番号39)
- ScSUC2-R: 5' -TAAATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCTCCTCCGATTAGCTG-3' (配列番号40)
- ScMF1-F: 5' -TAAATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCTCCTCCGATTAGCTG-3' (配列番号41)
- ScMF1-R: 5' -CTAGCAGCTAATGCGGAGGATGCTGCGAATAAACTGCAGTAAAAATTGAAGGAAATCTCATTTAAT-3' (配列番号42)
- [0116] ScPHO5-FとScPHO5-Rの組み合わせ、ScSUC2-FとScSUC2-Rの組み合わせ、およびScMF1-FとScMF1-Rの組み合わせでアニーリングさせたものをそれぞれ、プラスミドpYE-PN-AOBGL1またはpYE-PN-ASBGL1を制限酵素PacIとNheIで消化したものと連結し、以下のプラスミドを得た。
- [0117] pYE-PHO5s-ASBGL2 (PHO5s-ASBGL2発現用)

pY E - SUC 2 s - ASBGL 2 (SUC 2 s - AOBGL 2 発現用)

pY E - MF 1 s - ASBGL 2 (MF 1 s - AOBGL 2 発現用)

pY E - PHO 5 s - AOBGL 1 (PHO 5 s - AOBGL 1 発現用)

pY E - SUC 2 s - AOBGL 1 (SUC 2 s - AOBGL 1 発現用)

pY E - MF 1 s - AOBGL 1 (MF 1 s - AOBGL 1 発現用)

pY E - PHO 5 s - ASBGL 1 (PHO 5 s - ASBGL 1 発現用)

pY E - SUC 2 s - ASBGL 1 (SUC 2 s - ASBGL 1 発現用)

pY E - MF 1 s - ASBGL 1 (MF 1 s - ASBGL 1 発現用)

[0118] ここで、PHO 5 s - ASBGL 2、SUC 2 s - ASBGL 2、MF 1 s - ASBGL 2 の DNA 配列を配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19 に示した。また、PHO 5 s - AOBGL 1、SUC 2 s - AOBGL 1、MF 1 s - AOBGL 1 の DNA 配列を配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 に、PHO 5 s - ASBGL 1、SUC 2 s - ASBGL 1、MF 1 s - ASBGL 1 の DNA 配列を配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25 に示した。

[0119] 宿主株の作成

形質転換の宿主株としては、酵母の菌体外 β -グルコシダーゼ活性の大半を担っていると考えられている EXG 1 (YLR300w) 遺伝子とそのホモログである EXG 2 (YDR261c) 遺伝子を欠損させた株を使用することとし、以下のとおり作成した。

Δ exg 1 株 (Δ exg 1 : KanMX MATalpha his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0, クローン ID15210、Open Bio Systems) と、 Δ exg 2 株 (Δ exg 2 : KanMX MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0, クローン ID3620、Open Bio Systems) をそれぞれ YPD 寒天培地に塗布し、30℃で2日間培養した。それぞれの菌体を白金耳でかきとり、SC-Met, Lys (1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFC

0) 6.7 g、グルコース20 g、およびアミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25 g、アルギニン0.6 g、アスパラギン酸3 g、グルタミン酸3 g、ヒスチジン0.6 g、ロイシン1.8 g、フェニルアラニン1.5 g、セリン11.25 g、チロシン0.9 g、バリン4.5 g、スレオニン6 g、トリプトファン1.2 g、ウラシル0.6 gを混合したもの）1.3 gを含む）寒天培地（2%アガー）上で混合し、30℃で2日間培養した。生育してくる株は、2つの株が掛け合わされたヘテロ二倍体であると考えられた。得られた株をYPD寒天培地に塗布し、30℃で2日間培養した後、菌体を白金耳でかきとって、0.5% 酢酸カリウム寒天培地（2%アガー）に塗布し、室温で5日間培養し、胞子を形成させた。四分子分離を行い、一倍体株を分離した。得られた株の遺伝子型をPCRにより確認し、 $\Delta exg1$ $\Delta exg2-1$ 株（ $\Delta exg1: KanMX$ $\Delta exg2: KanMX$ $his3\Delta1$ $leu2\Delta0$ $lys2\Delta0$ $ura3\Delta0$ ）であるものを選抜した。

[0120] 酵母S288C株のゲノムDNAを鋳型として、以下のプライマーTRP1-FとプライマーTRP1-Rで、KOD-Plus（東洋紡）を用いてPCRを行った。増幅された約2.7 kbpのDNA断片をZero Blunt TOPO PCR cloning Kit（ライフテクノロジーズ）を用いてクローニングし、プラスミドpCR-TRP1を得た。

[0121] TRP1-F: TACTATTAGCTGAATTGCCACTGCTATCG（配列番号49）

TRP1-R: TCTACAACCGCTAAATGTTTTTGTTCG（配列番号50）

[0122] pPRGINFRT3-103（特開2001-120276）を制限酵素EcoRIとHindIIIで消化して得られた2.7 kbpのDNA断片をBlunting Kit（タカラバイオ）により末端を平滑化したのち、プラスミドpCR-TRP1を制限酵素HpaIとStuIで消化して得られたSNA断片とLigation High（東洋紡）を使って連結させ、プラスミドpCR- $\Delta trp1: URA3-FRT$ を得た。これを鋳型として、プライマーTRP1-FとプライマーTRP1-Rで、KOD

ーPlus（東洋紡）を用いてPCRを行い、得られた4.4 kbpのDNA断片を用いて、 $\Delta exg1 \Delta exg2-1$ 株を酢酸リチウム法により形質転換し、SC-Ura（1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids（DIFCO）6.7g、グルコース20g、およびアミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25g、アルギニン0.6g、アスパラギン酸3g、グルタミン酸3g、ヒスチジン0.6g、ロイシン1.8g、リジン0.9g、メチオニン0.6g、フェニルアラニン1.5g、セリン11.25g、チロシン0.9g、バリン4.5g、スレオニン6g、トリプトファン1.2gを混合したもの）1.3gを含む）寒天培地（2%アガー））に生育するものを、形質転換株として選抜した。形質転換株をYPGal培地（酵母エキス2%、ポリペプトン1%、ガラクトース2%）で培養した後、SC+5-FOA（1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids（DIFCO）6.7g、グルコース20g、およびアミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25g、アルギニン0.6g、アスパラギン酸3g、グルタミン酸3g、ヒスチジン0.6g、ロイシン1.8g、リジン0.9g、メチオニン0.6g、フェニルアラニン1.5g、セリン11.25g、チロシン0.9g、バリン4.5g、スレオニン6g、トリプトファン1.2g、ウラシル0.6gを混合したもの）1.3gを含む）寒天培地（2%アガー））に塗布し、生育してきた株を、 $\Delta exg1 \Delta exg2-2$ 株（ $\Delta exg1 : KanMX \Delta exg2 : KanMX \Delta trp1 his3 \Delta 1 leu2 \Delta 0 lys2 \Delta 0 ura3 \Delta 0$ ）として、以下の形質転換の宿主とした。

[0123] $\Delta exg1 \Delta exg2-2$ 株をプラスミドpYE-PHO5s-ASBGL2、pYE-SUC2s-ASBGL2、pYE-MF1s-ASBGL2、pYE-PHO5s-AOBGL1、pYE-SUC2s-AOBGL1、pYE-MF1s-AOBGL1、pYE-PHO5s-ASBGL1、pYE-SUC2s-ASBGL1で酢酸リチウム法により形質転換し

、S C - T r p 寒天培地上で生育するものを形質転換株として選抜した。

[0124] X - β - G l c 活性の確認

得られた形質転換株を 0. 004 % X - β - G l c を含む S D - T r p 寒天培地に塗布し、30℃で3日間培養したところ、p Y E - P H O 5 s - A O B G L 1、p Y E - S U C 2 s - A O B G L 1、p Y E - M F 1 s - A O B G L 1、p Y E - P H O 5 s - A S B G L 1、p Y E - S U C 2 s - A S B G L 1、p Y E - M F 1 s - A S B G L 1 で形質転換した株は、菌体およびその周りが青く染まり、X - β - G l c を加水分解する活性を有することが示唆された。

[0125] コントロールベクターを導入した株では、菌体およびその周辺は青く染まらず、X - β - G l c を加水分解する活性はなかった。

[0126] p N P - β - G l c 活性の確認

得られた形質転換株を S D - T r p 液体培地 10 mL と 1 M リン酸カリウムバッファー 1 mL を混合した液体培地に 1 白金耳植菌し、30℃で2日間振とう培養した。培養物を遠心分離により菌体と培養上清に分離した。

[0127] 培養上清をアミコンウルトラ 15 50 k (メルク) で、限外ろ過により、およそ 500 μ L まで濃縮し、0. 1 % C H A P S を含む 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (p H 7. 0) でバッファー置換し、祖酵素液とした。祖酵素液 50 μ L、0. 2 M クエン酸ナトリウムバッファー 50 μ L、20 mM p N P - β G l c 水溶液 50 μ L、水 50 μ L を混合し、37℃で反応させ、405 nm の吸光度変化を調べた。

結果を以下の表 5 に示す。

[0128] 表 5 : 405 nm の吸光度変化

[表5-1]

プラスミド	$\Delta 405\text{nm}$
pYE-MF1s-ASBGL2	0.614
pYE-PHO5s-ASBGL2	0.781
pYE-SUC2s-ASBGL2	1.126
pYE-ASBGL2	0.002
pYE22m	0.002

[表5-2]

プラスミド	$\Delta 405\text{nm}$
pYE-MF1s-AOBGL1	0.508
pYE-PHO5s-AOBGL1	0.37
pYE-SUC2s-AOBGL1	0.369
pYE22m	0

[表5-3]

プラスミド	$\Delta 405\text{nm}$
pYE-MF1s-ASBGL1	0.278
pYE-PHO5s-ASBGL1	0.259
pYE-SUC2s-ASBGL1	0.279
pYE22m	0.028

[0129] 粗酵素液の調製

pYE-SUC2s-ASBGL2 導入株、pYE-MF1s-AOBGL1

導入株とコントロールベクター pY E 2 2 m 導入株を、S C - T r p 液体培地に 1 M リン酸カリウムバッファー (p H 6 . 0) を 1 / 1 0 量加えた液体培地で、それぞれ 3 0 ° C で 3 日間振とう培養した。得られた培養物 (2 0 0 m l) を遠心分離し、培養上清を得た。培養上清を硫酸アンモニウム 8 0 % 飽和にし、1 0 0 0 0 × g にて遠心分離した。上清を捨て、得られた沈澱を 0 . 1 % C H A P S を含む 5 0 m M リン酸ナトリウムバッファー (p H 7 . 0) 1 5 m L に溶解した。アミコン ウルトラ-1 5 1 0 0 k D a で脱塩、濃縮を行い、最終的に約 5 0 0 μ L のサンプルを得た。

[0130] モグロシド V に対する活性

モグロシド V を 5 0 μ g / m L 、 5 0 m M クエン酸ナトリウムバッファー (p H 5 . 0) 、上記酵素液 2 0 μ L で、全量 1 0 0 μ L とし、5 0 ° C で、4 時間反応させた。反応液を、メタノールで洗浄し水で平衡化した S e p P a k C 1 8 5 0 0 m g (W a t e r s) に供した。4 0 % メタノールで洗浄後、8 0 % メタノールで溶出し、スピードバックで乾固した。1 0 0 μ L の水に溶解し、H P L C に供した。

H P L C の条件は、以下の通りである。

[0131] カラム : コスモシル 5 C₁₈-A R - I I 4 . 6 m m I . D . × 2 5 0 m m (ナカライテスク)

移動相 : A ; アセトニトリル、B ; 水

B c o n c . 9 0 % → 3 0 % 6 0 分 l i n e a r g r a d i e n t

流速 : 1 m l / 分

温度 : 4 0 ° C

検出 : U V 2 0 3 n m

[0132] その結果、A S B G L 2 と A O B G L 1 にはモグロシド V をモグロシド I I I E (β - 1 , 6 グルコシド結合を加水分解) に完全に加水分解する強い活性が検出されたが (図 2 A 、 B) 、コントロールでは、モグロシド V から新たに生成したものはなかった (図 2 B) 。

[0133] モグロシド I I I E に対する活性

AOBGL 1 酵素液を、モグロシド I I I E と反応時間を 16 時間にして、上記と同様の条件で作用させた。その結果、AOBGL 1 はモグロシド I I I E をモグロール 2 糖配糖体、モグロール 1 糖配糖体に加水分解する活性も検出されたが（図 3 A、図 4 A）、コントロールでは、モグロシド I I I E から新たに生成したものはなかった（図 3 B、図 4 B）。

配列表フリーテキスト

- [0134] [配列番号 1] ASBGL 2 の cDNA 配列である。
- [配列番号 2] ASBGL 2 のゲノム DNA 配列である。
- [配列番号 3] ASBGL 2 のアミノ酸配列である。
- [配列番号 4] ASBGL 2 成熟タンパク質のアミノ酸配列である。
- [配列番号 5] AOBGL 2 の cDNA 配列である。
- [配列番号 6] AOBGL 2 のゲノム DNA 配列である。
- [配列番号 7] AOBGL 2 のアミノ酸配列である。
- [配列番号 8] AOBGL 2 成熟タンパク質のアミノ酸配列である。
- [配列番号 9] AOBGL 1 の cDNA 配列である。
- [配列番号 10] AOBGL 1 のゲノム DNA 配列である。
- [配列番号 11] AOBGL 1 のアミノ酸配列である。
- [配列番号 12] AOBGL 1 成熟タンパク質のアミノ酸配列である。
- [配列番号 13] ASBGL 1 の cDNA 配列である。
- [配列番号 14] ASBGL 1 のゲノム DNA 配列である。
- [配列番号 15] ASBGL 1 のアミノ酸配列である。
- [配列番号 16] ASBGL 1 成熟タンパク質のアミノ酸配列である。
- [配列番号 17] PHO5 s - ASBGL 2 の DNA 配列である。
- [配列番号 18] SUC2 s - ASBGL 2 の DNA 配列である。
- [配列番号 19] MF1 s - ASBGL 2 の DNA 配列である。
- [配列番号 20] PHO5 s - AOBGL 1 の DNA 配列である。
- [配列番号 21] SUC2 s - AOBGL 1 の DNA 配列である。
- [配列番号 22] MF1 s - AOBGL 1 の DNA 配列である。

- [配列番号 23] PHO5s-ASBGL1 の DNA 配列である。
- [配列番号 24] SUC2s-ASBGL1 の DNA 配列である。
- [配列番号 25] MF1s-ASBGL1 の DNA 配列である。
- [配列番号 26] 実施例で用いたプライマーである (AOBGL2-1)。
- [配列番号 27] 実施例で用いたプライマーである (AOBGL2-2)。
- [配列番号 28] 実施例で用いたプライマーである (ASBGL2-1)。
- [配列番号 29] 実施例で用いたプライマーである (ASBGL2-2)。
- [配列番号 30] 実施例で用いたプライマーである (AOBGL1-1)。
- [配列番号 31] 実施例で用いたプライマーである (AOBGL1-2)。
- [配列番号 32] 実施例で用いたオリゴ DNA である (PacI-NheI-
-F)。
- [配列番号 33] 実施例で用いたオリゴ DNA である (PacI-NheI-
-R)。
- [配列番号 34] 実施例で用いたオリゴ DNA である (Sac-ASBGL
2-F)。
- [配列番号 35] 実施例で用いたオリゴ DNA である (Sal-ASBGL2
-R)。
- [配列番号 36] 実施例で用いたプライマーである (Bgl2-AOBGL
1-F)。
- [配列番号 37] 実施例で用いたプライマーである (ScPHO5-F)。
- [配列番号 38] 実施例で用いたプライマーである (ScPHO5-R)。
- [配列番号 39] 実施例で用いたプライマーである (ScSUC2-F)。
- [配列番号 40] 実施例で用いたプライマーである (ScSUC2-R)。
- [配列番号 41] 実施例で用いたプライマーである (ScMF1-F)。
- [配列番号 42] 実施例で用いたプライマーである (ScMF1-R)。
- [配列番号 43] 分泌シグナル配列 MF (ALPHA) 1 (YPL187W
) の DNA 配列である。
- [配列番号 44] 分泌シグナル配列 MF (ALPHA) 1 (YPL187W

) のアミノ酸配列である。

〔配列番号 45〕 分泌シグナル配列 P H O 5 (Y B R 0 9 3 C) の DNA 配列である。

〔配列番号 46〕 分泌シグナル配列 P H O 5 (Y B R 0 9 3 C) のアミノ酸配列である。

〔配列番号 47〕 分泌シグナル配列 S U C 2 (Y I L 1 6 2 W) の DNA 配列である。

〔配列番号 48〕 分泌シグナル配列 S U C 2 (Y I L 1 6 2 W) のアミノ酸配列である。

〔配列番号 49〕 実施例で用いたプライマーである (T R P 1 - F) 。

〔配列番号 50〕 実施例で用いたプライマーである (T R P 1 - R) 。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）～（c）からなる群から選択されるタンパク質と、少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを反応させて、前記 β 1, 6-グルコシド結合を切断する工程を含む、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの調製方法。
- （a）配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質；
- （b）配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6-グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質；
- （c）配列番号4、配列番号8、配列番号12および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6-グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質
- [請求項2] 前記（a）～（c）からなる群から選択されるタンパク質が、さらに、分泌シグナルペプチドを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドが、さらに、少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有する、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合および少なくとも1つの β 1, 2-グルコシド結合を有するモグロシドが、モグロシドV、シアメノシドI、モグロシドIV、およびモグロシドIIIA₁から選択される、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドが、モグロシドIIIEおよびモグロシドIIIAから選択される、請求項4に記載の方法。

[請求項6]

少なくとも1つの β 1, 6-グルコシド結合を有するモグロシドを生成する宿主に、以下の(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換体を培養することを含む、 β 1, 6-グルコシド結合のないモグロシドの生産方法。

(a) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6-グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6-グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる

る群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつモグロシドの $\beta-1, 6$ グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[請求項7] 前記(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが、さらに、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド含む、請求項6に記載の方法。

[請求項8] 前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドが、配列番号1の1番目～60番目、配列番号5の1番目～60番目、配列番号9の1番目～57番目、配列番号13の1番目～57番目、配列番号43、配列番号45および配列番号47のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである、請求項7に記載の方法。

[請求項9] 前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号5、配列番号6、配列番号9、配列番号10、配列番号13、配列番号14、および配列番号17～配列番号25のいずれかに記載の塩基配列からなる、請求項8に記載の方法。

[請求項10] 前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターに挿入されたものである、請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

[請求項11] 前記形質転換体が、形質転換酵母または形質転換植物である、請求項6～10のいずれか1項に記載の方法。

[請求項12] 宿主細胞に、以下の(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換細胞に由来する酵素剤を、少なくとも1つの $\beta-1, 6$ -グルコシド結合を有するモグロシドと接触させて、前記 $\beta-1, 6$ -グルコシド結合を切断する工程を含む、 $\beta-1, 6$ -グルコシド結合のないモグロシドの調製方法。

(a) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目

～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1～84個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4、配列番号8、配列番号12、および配列番号16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の61番目～2601番目、配列番号2の61番目～2707番目、配列番号5の61番目～2601番目、配列番号6の61番目～2708番目、配列番号9の58番目～2586番目、配列番号10の58番目～2891番目、配列番号13の58番目～2586番目、および配列番号14の58番目～2892番目からなる群から選択される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつモグロシドの β -1, 6グルコシド結合を切断する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[請求項13]

前記(a)～(e)からなる群から選択されるポリヌクレオチドが

、さらに、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド含む、請求項12に記載の方法。

[請求項14] 前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドが、配列番号1の1番目～60番目、配列番号5の1番目～60番目、配列番号9の1番目～57番目、配列番号13の1番目～57番目、配列番号43、配列番号45および配列番号47のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 前記分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号5、配列番号6、配列番号9、配列番号10、配列番号13、配列番号14、および配列番号17～配列番号25のいずれかに記載の塩基配列からなる、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターに挿入されたものである、請求項12～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] 前記形質転換細胞が、形質転換細菌または形質転換酵母である、請求項12～16のいずれか1項に記載の方法。

[請求項18] 前記少なくとも1つの β 1,6-グルコシド結合を有するモグロシドが、さらに、少なくとも1つの β 1,2-グルコシド結合を有する、請求項12～17に記載の方法。

[請求項19] 前記少なくとも1つの β 1,6-グルコシド結合および少なくとも1つの β 1,2-グルコシド結合を有するモグロシドが、モグロシドV、シアメノシドI、モグロシドIV、およびモグロシドIIIA₁から選択される、請求項18に記載の方法。

[請求項20] 前記 β 1,6-グルコシド結合のないモグロシドが、モグロシドIIIEおよびモグロシドIIIAから選択される、請求項19に記載の方法。

[図1]

A

MF(ALPHA)1 signal peptide

```
5' ATGAGATTTG CTTCAATTTT TACTGCAGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCT 3'
   M R F P S I F T A V L F A A S S A L A
```

B

PHO5 signal peptide

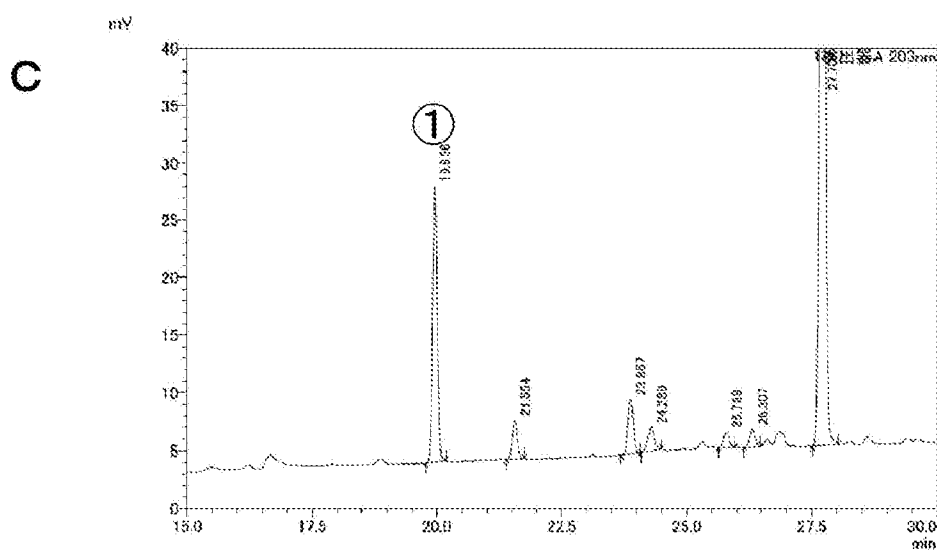
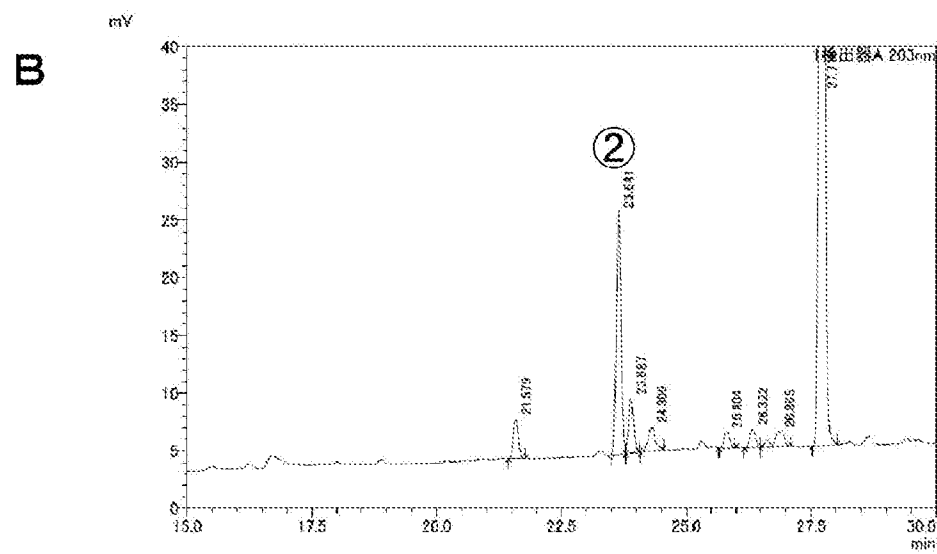
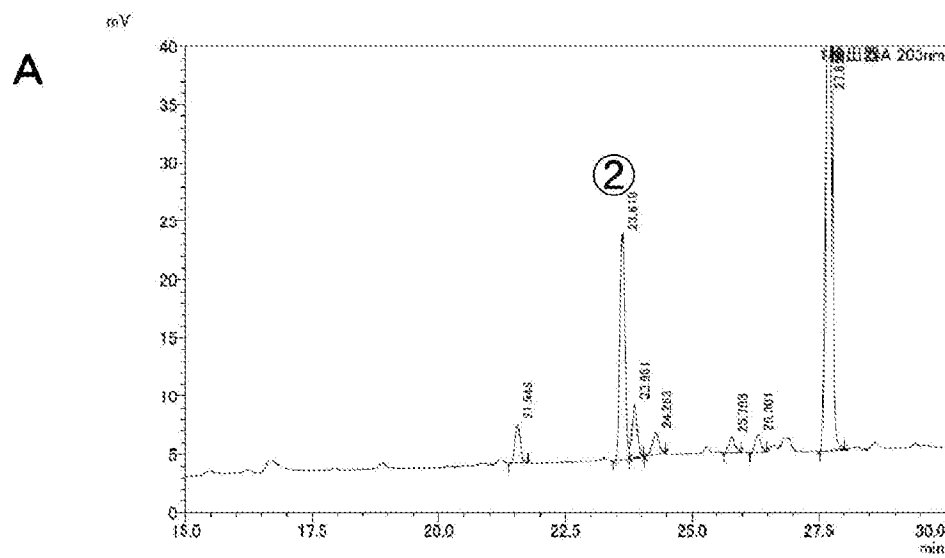
```
5' ATGTTTAAAT CTGTTGTTTA TTCAATTTTA GCCGCTTCTT TGGCCAATGC A 3'
   M F K S V V Y S I L A A S L A N A
```

C

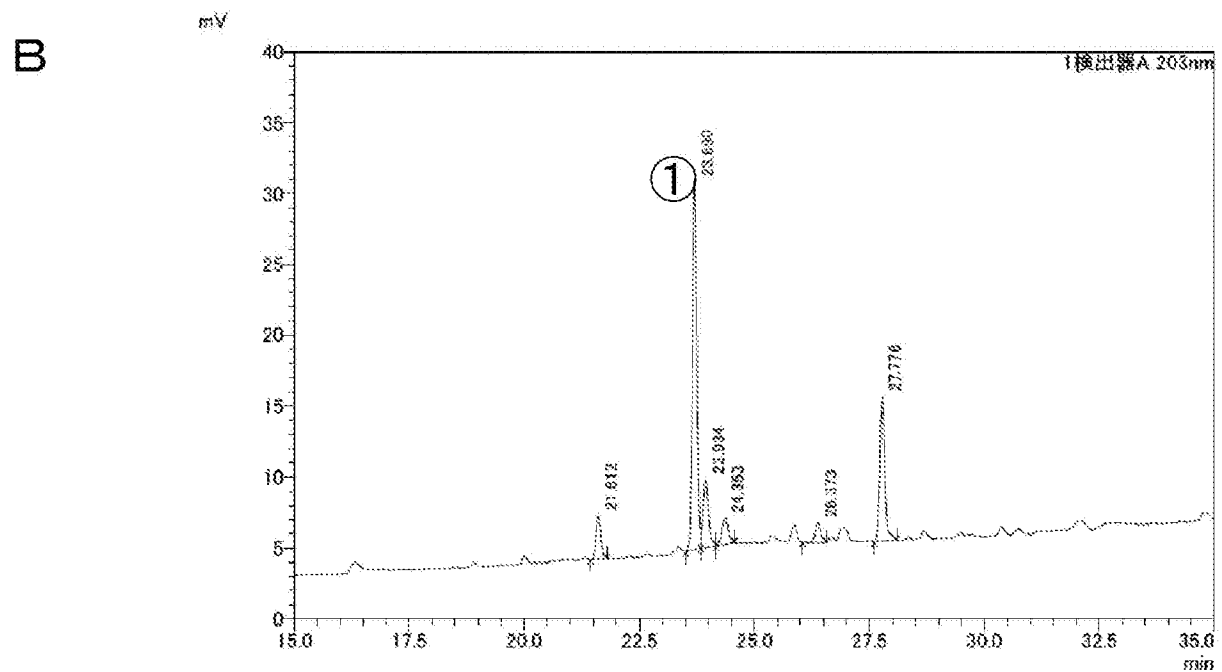
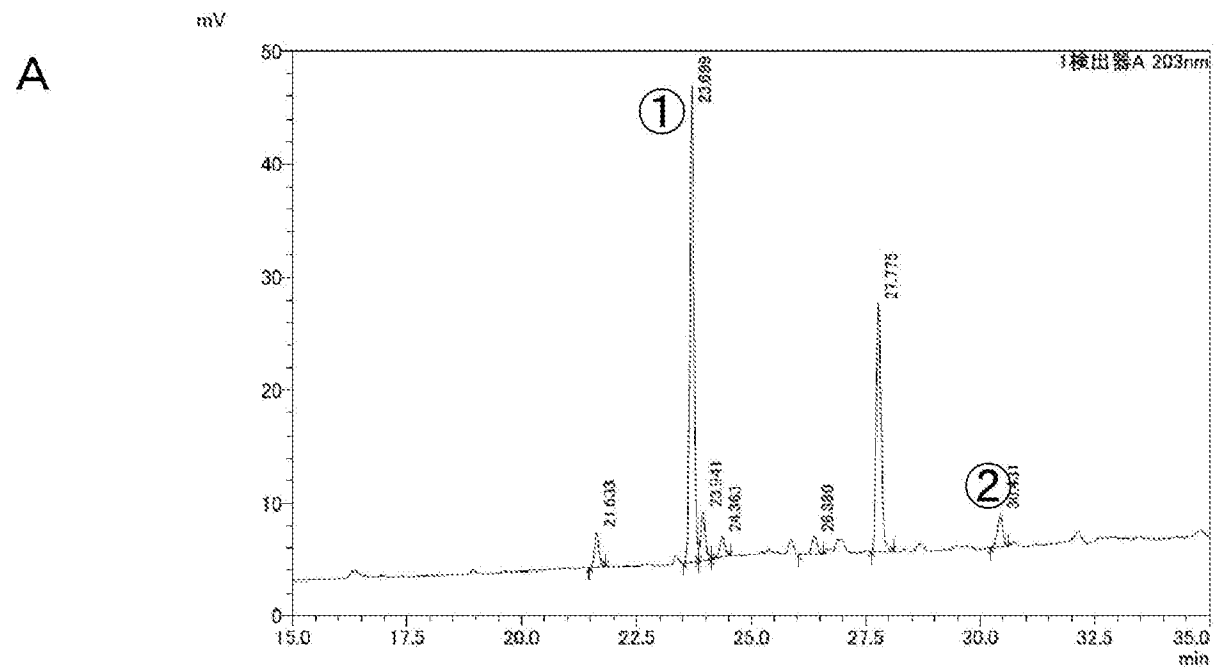
SUC2 signal peptide

```
5' ATGCTTTTGC AAGCTTTCCT TTTCCTTTTG GCTGGTTTTG CAGCCAAAAT ATCTGCA 3'
   M L L Q A F L F L L A G F A A K I S A
```

[図2]

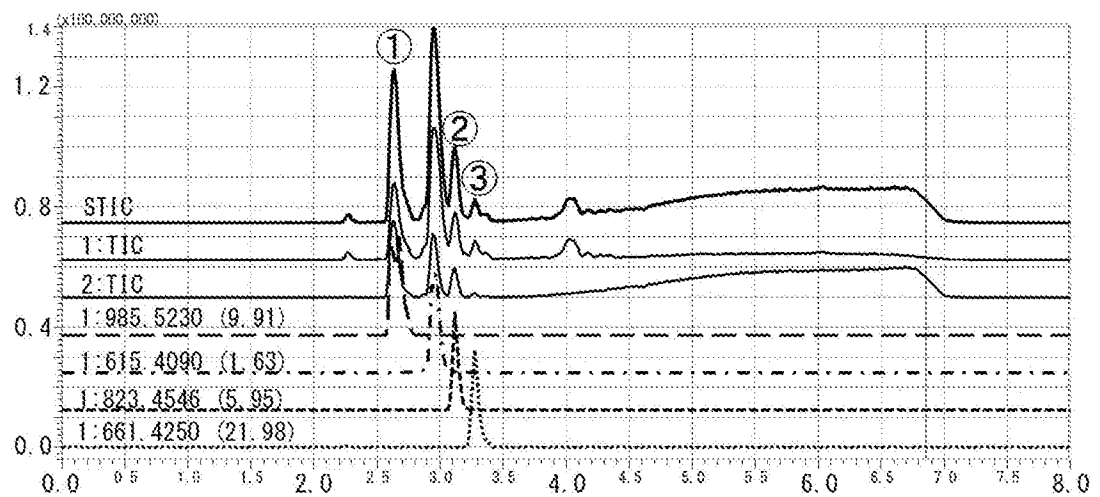


[図3]

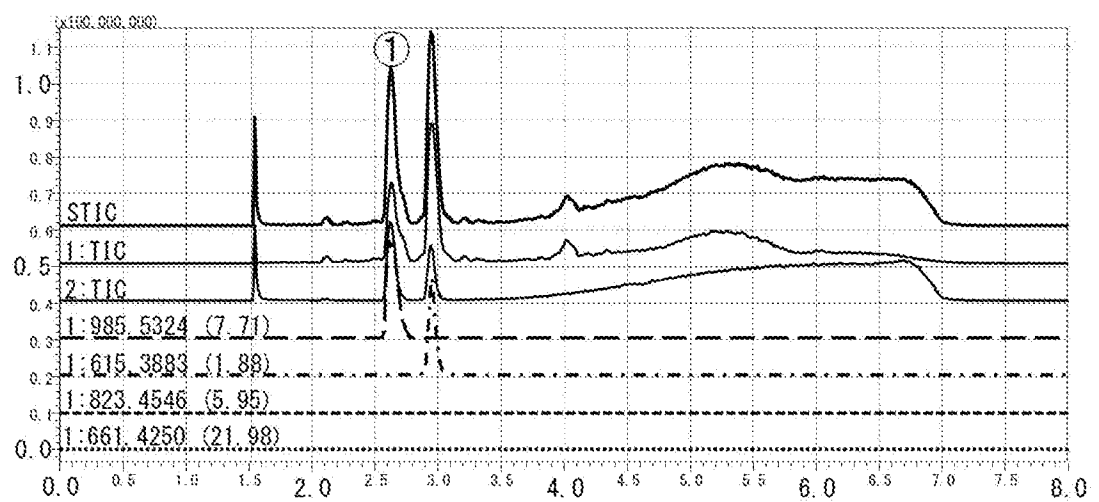


[図4]

A



B



[図5-1]

	1	80
AOBGL1p	-----MKLGWIEVAALAAASVVSAKDDLAYSPPFYSPWADGGGEWAEEVYKRAVDIVSQMTLTKVNLTTGTGW	
ASBGL1p	-----MKLGWIEVAALVAASVVSAKDDLAYSPPFYSPWADGGGEWAEEVYKRAVDIVSQMTLTKVNLTTGTGW	
AOBGL2p	MAAFPAYLALLSYLVPGALSHPEAKLTLSRASTEAYSPPYYPAPNGGWI SEWASAYEK AHRVVSMTLAEKYNLTSGTGI	
ASBGL2p	MAAFPAYLALLSYLVPGALSHPEAESLTLSRASTEAYSPPYYPAPNGGWI SEWASAYEK AHRVVSMTLAEKYNLTSGTGI	
	81	160
AOBGL1p	QLERGVGGTGSVPRLNTPSLCLQDSPLGIRFSDYNSAFPAGVNVAAATWDKTLAYLRGQAMGEEFSDKGTIDVQLGPAAGPL	
ASBGL1p	QLERGVGGTGSVPRLNTPSLCLQDSPLGIRFSDYNSAFPAGVNVAAATWDKTLAYLRGQAMGEEFSDKGTIDVQLGPAAGPL	
AOBGL2p	YMGPGAGGTGSVPRFGIPNLCLHDSPLGVRNSDHNTAFPAGITVGATFDKOLMYERGVGLGEEARGKGINVLLGPSVGP	
ASBGL2p	YMGPGAGGTGSVPRFGIPNLCLHDSPLGVRNSDHNTAFPAGITVGATFDKOLMYERGVGLGEEARGKGINVLLGPSVGP	
	161	240
AOBGL1p	GAHPDGGFNWEGFSPDPALTGVLFAETIKGTQDAQVIATAKHITMNEGEHFROQPEAAGYGFNVSDSLSSNVDDKTMHEL	
ASBGL1p	GAHPDGGFNWEGFSPDPALTGVLFAETIKGTQDAQVIATAKHITMNEGEHFROQPEAAGYGFNVSDSLSSNVDDKTIHEL	
AOBGL2p	GRKPRGGFNWEGFADPSLQAFGGSLTIKMGSTGATASLKHILGNEGECHRMSS-----VITQGYSSNIDRTLHEL	
ASBGL2p	GRKPRGGFNWEGFADPSLQAFGGSLTIKMGSTGATASLKHILGNEGECHRMSS-----VITQGYSSNIDRTLHEL	
	241	320
AOBGL1p	YLWPFADAVRAGVGAVMCSYNQINNSYGCENSETLNKLKAEFGGFGVMSDWTAHHSQVGAALAGLDMSMPGD-VTFDS	
ASBGL1p	YLWPFADAVRAGVGAVMCSYNQINNSYGCENSETLNKLKAEFGGFGVMSDWTAHHSQVGAALAGLDMSMPGD-VTFDS	
AOBGL2p	YLWPF AESVRAGAGSVMIAYNDVNRSAACSONSKLINGILKDELFGGFGVVTDLAHIIGVSSALAGLDMSMPGDGAIPLL	
ASBGL2p	YLWPF AESVRAGAGSVMIAYNDVNRSAACSONSKLINGILKDELFGGFGVVTDLAHIIGVSSALAGLDMSMPGDGAIPLL	
	321	400
AOBGL1p	GTSFNGANLTVGVNGTIPQWRVDDMAVRIMAAYYKVGROTKYTTPNFSSWTRDEYGF AHNHVSEGAYERVNEFVDVORD	
ASBGL1p	GTSFNGANLTVGVNGTIPQWRVDDMAVRIMAAYYKVGROTKYTTPNFSSWTRDEYGF AHNHVSEGAYERVNEFVDVORD	
AOBGL2p	GTSYHAWELSRSVLNGSVVERLNDMVTIRIVATWYKMGQDKDYPLPNFSSNTEDETQPLYPGALFSPSGIYNQYVWQGN	
ASBGL2p	GTSYHAWELSRSVLNGSVVERLNDMVTIRIVATWYKMGQDKDYPLPNFSSNTEDETQPLYPGALFSPSGIYNQYVWQGN	
	401	480
AOBGL1p	HADLIRRTGAQSTVLLKNK-GALPLSRKEKLVALLGEDAGNSWANGGDDRGCDNGTLAMWGSGTANFPYLVTREQAI	
ASBGL1p	HADLIRRTGAQSTVLLKNK-GALPLSRKEKLVALLGEDAGNSWANGGDDRGCDNGTLAMWGSGTANFPYLVTREQAI	
AOBGL2p	HNVTARATARDAITLLKHNENVLPLKRN-DTLKIFGTDAQTNSDGINSGTDKGCNKQVLTMGWGSQTSRLPYLITPQEA	
ASBGL2p	HNVTARATARDAITLLKHNENVLPLKRN-ASLKIFGTDAQTNSDGINSGTDKGCNKQVLTMGWGSQTSRLPYLITPQEA	

[図5-2]

	481		560
AOBGL1p	QNEVLQGRGNVFAVTDSWALDKIAAAARQASVSLVFVNSDSGEGYLSVDGNEGDR	NNITLWKNGDNVVKTAANN CNNT	
ASBGL1p	QNEVLQGRGNVFAVTDSWALDKIAAAARQASVSLVFVNSDSGEGYLSVDGNEGDR	NNITLWKNGDNVVKTAANN CNNT	
AOBGL2p	ANISSN—AEFHI TDIFPLG—VTAGPDDIAIVFINSDSGENYITVDGNPGDRTL	AGLHAWHNGDNLVKAAAEKFSNV	
ASBGL2p	ANISSN—AEFHI TDIFPLG—VTAGLDDIAIVFINSDSGENYITVDGNPGDRTL	AGLTAHNGDNLVKAAAEKFSNV	
	561		640
AOBGL1p	VVI IHSVGPVLI DEHYDHPNVTGILWAGLPGGESGNSIADVL YGRVNP	GAKSPFTWGKTRESYGSPLVKDANNGNGAPQS	
ASBGL1p	VVI IHSVGPVLI DEHYDHPNVTGILWAGLPGGESGNSIADVL YGRVNP	GAKSPFTWGKTRESYGSPLVKDANNGNGAPQS	
AOBGL2p	VVVVHTVGPILMEEWIDLDSVKAVLVAHLPGGEAGWSLTDILFGDYSPSGHL	PYTIPHSESDYPE SVGLIAQP—FGQIQD	
ASBGL2p	VVVVHTVGPILMEEWIDLDSVKAVLVAHLPGGEAGWSLTDILFGDYSPSGHL	PYTIPRSESDYPE SVGLIAQP—FGQIQD	
	641		720
AOBGL1p	DFTQGVFIDYRHFDKFNETPIYELGYGLSYTTFELSDLHVQPLNASRYTPTSG	—MTEAAKNFGEIGDASEYVYREGLE	
ASBGL1p	DFTQGVFIDYRHFDKFNETPIYELGYGLSYTTFELSDLHVQPLNASRYTPTSG	—MTEAAKNFGEIGDASEYVYREGLE	
AOBGL2p	DYTEGLYIDYRHFLKANI TPYPFGHGLSYTTFNFTEPNLSIIKALDTAYPAARPPKGS	TPTYPTAKPDASEVAMPKNFN	
ASBGL2p	DYTEGLYIDYRHFLKANI TPYPFGHGLSYTTFNFTEPNLSIIKPLDTAYPAARPPKGS	TPTYPTTKPAASEVAMPKNFN	
	721		800
AOBGL1p	RIHEFIYPWINSTDLKASSDDSNYGWEDSKYIPEGATDGSAGPRLPASGGAGGNPGL	YEDLFRVSVKVKNTGNVAGDEV	P
ASBGL1p	RIHEFIYPWINSTDLKASSDDSNYGWEDSEYIPEGATDGSAGPRLPASGGAGGNPGL	YEDLFRVSVKVKNTGNVAGDEV	P
AOBGL2p	RIWRYLRYLDNPEGAAANSKITYPDPGYTTEP	—KPA PRAGGAEGGNPALWDVTF SVGVKVTINTGSRDGRAVA	
ASBGL2p	RIWRYLRYLDNPEGAAANSKITYPDPGYTTEP	—KPA PRAGGAEGGNPALWDVAF SVGVKVTINTGSRDGRAVA	
	801		880
AOBGL1p	QLYVSLG—GPNERKVVLRFERIH LAPSQE—AVWTTTLTRRDLANWDVSAQDW	TVTPYPKTIYVGNSSRKLP	QASLP
ASBGL1p	QLYVSLG—GPNERKVVLRFERIH LAPSQE—VWTTTLTRRDLANWDVSAQDW	AVTPYPKTIYVGNSSRKLP	QVSLP
AOBGL2p	QLYVELPSSGLDTPSRQLRGFEKTKILAAGESEVLTDVTRKDL	SVWDV VQDHWKAPVNGEGVKI	WVGESVADLRVGCV
ASBGL2p	QLYVELPSSGLDTPSRQLRGFEKTKILAAGESEVLTDVTRKDL	SANDV VQDHWKAPVNGEGVKI	WVGESVADLRVGCV
	881		
AOBGL1p	KAQ—		
ASBGL1p	KAQ—		
AOBGL2p	VGEGCSTL—		
ASBGL2p	VGEGCSTL—		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/051416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12P19/44(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)n

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)

C12N15/09, C12P19/44, C12N9/24

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/150127 A1 (TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, LLC), 25 September 2014 (25.09.2014), claim 1; table 4 & GB 201310060 D	1-20
Y	WO 2011/046768 A1 (BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE), 21 April 2011 (21.04.2011), example 11 & US 2012/0232166 A1	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 application or patent 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

14 April 2016 (14.04.16)

Date of mailing of the international search report

26 April 2016 (26.04.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/051416

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LANGSTON J., et al., Substrate specificity of <i>Aspergillus oryzae</i> family 3 beta-glucosidase, Biochim. Biophys. Acta., 2006, Vol. 1764, No. 5, pp. 972-978, Materials and methods, Table 1, Fig. 2	1-20
Y	WO 2004/099228 A1 (NOVOZYMES BIOTECH, INC.), 18 November 2004 (18.11.2004), pages 49 to 50, 'Host Cells'; examples 6, 7 & US 2004/0253702 A1 & EP 1622921 A & CN 1816631 A	1-20
Y	Database GenBank [online], Accession No. XP_001819055, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/169769170?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=2&RID=E46G622B015 >, 03-MAR-2011 uploaded, [retrieved on 11-APR-2016], DEFINITION: beta-glucosidase F [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40], 'FEATURES', 'ORIGIN'	1-20
Y	Database GenBank [online], Accession No. EIT73097, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/391863798?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=3&RID=E46G622B015 >, 18-JUN-2012 uploaded, [retrieved on 11-APR-2016], DEFINITION: beta-glucosidase-related glycosidase [<i>Aspergillus oryzae</i> 3.042], 'FEATURES', 'ORIGIN'	1-20
Y	Database GenBank [online], Accession No. XP_002382041, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/238501614?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=5&RID=E46G622B015 >, 19-JAN-2010 uploaded, [retrieved on 11-APR-2016], DEFINITION: beta glucosidase, putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357], 'FEATURES', 'ORIGIN'	1-20
Y	JP 2007-167062 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 05 July 2007 (05.07.2007), paragraphs [0125] to [0129] & US 2007/0117186 A1 paragraphs [0163] to [0165] & EP 1790661 A2	8,9,14,15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12P19/44(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12P19/44, C12N9/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2014/150127 A1 (TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS, LLC) 2014.09.25, Claim 1、Table 4 等 & GB 201310060 D	1-20
Y	WO 2011/046768 A1 (BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE) 2011.04.21, Example 11 & US 2012/0232166 A1	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.04.2016

国際調査報告の発送日

26.04.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 崇之

4B

4152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LANGSTON J., et al., Substrate specificity of <i>Aspergillus oryzae</i> family 3 beta-glucosidase, Biochim. Biophys. Acta., 2006, Vol. 1764, No. 5, pp. 972-978, Materials and methods、Table 1、Fig. 2 等	1-20
Y	WO 2004/099228 A1 (NOVOZYMES BIOTECH, INC.) 2004.11.18, pp. 49-50 「Host Cells」、Example 6、Example 7 等 & US 2004/0253702 A1 & EP 1622921 A & CN 1816631 A	1-20
Y	Database GenBank [online], Accession No. XP_001819055, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/169769170?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=2&RID=E46G622B015 >, 03-MAR-2011 uploaded, [retrieved on 11-APR-2016], DEFINITION: beta-glucosidase F [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40], 「FEATURES」, 「ORIGIN」	1-20
Y	Database GenBank [online], Accession No. EIT73097, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/391863798?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=3&RID=E46G622B015 >, 18-JUN-2012 uploaded, [retrieved on 11-APR-2016], DEFINITION: beta-glucosidase-related glycosidase [<i>Aspergillus oryzae</i> 3.042], 「FEATURES」, 「ORIGIN」	1-20
Y	Database GenBank [online], Accession No. XP_002382041, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/238501614?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=5&RID=E46G622B015 >, 19-JAN-2010 uploaded, [retrieved on 11-APR-2016], DEFINITION: beta glucosidase, putative [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357], 「FEATURES」, 「ORIGIN」	1-20
Y	JP 2007-167062 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2007.07.05, [0125]-[0129] & US 2007/0117186 A1, [0163]-[0165] & EP 1790661 A2	8, 9, 14, 15