

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6084983号
(P6084983)

(45) 発行日 平成29年2月22日(2017.2.22)

(24) 登録日 平成29年2月3日(2017.2.3)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 19/18 (2006.01)

C 1 2 P 19/18 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 13 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2014-542951 (P2014-542951)	(73) 特許権者	514034102
(86) (22) 出願日	平成24年11月19日(2012.11.19)		エヴォルヴァ エスアー.
(65) 公表番号	特表2014-533518 (P2014-533518A)		E V O L V A S A .
(43) 公表日	平成26年12月15日(2014.12.15)		スイス国、ツェーハー 4 1 5 3 ライナ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/002857		ハ、ドゥギンゲルシュトラッセ 2 3
(87) 国際公開番号	W02013/076577		D u g g i n g e r s t r a s s e 2 3
(87) 国際公開日	平成25年5月30日(2013.5.30)		, C H - 4 1 5 3 R e i n a c h , S w
審査請求日	平成27年11月19日(2015.11.19)		i t z e r l a n d
(31) 優先権主張番号	61/563,303	(74) 代理人	100102842
(32) 優先日	平成23年11月23日(2011.11.23)		弁理士 葛和 清司
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	リウ, ヤオクァン
早期審査対象出願			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
			3 0 3 パロ アルト、エンバーカデロ
			ウェイ 2 4 4 0
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モグロシド化合物の酵素的合成のための方法および材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウリジン - 5 ' - ジホスホ (U D P) 依存性グルコシルトランスフェラーゼ (U G T)
ポリペプチドに、モグロールを接触させ、グリコシル化することを含み、前記 U G T ペプ
チドが、

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する U G T
7 3 C 3 ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する U G T
7 3 C 5 ポリペプチド；

(c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する U G T
7 3 C 6 ポリペプチド；

(d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する U G T
7 3 E 1 ポリペプチド；または

(e) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する U G T
8 5 C 2 ポリペプチド

である、モグロシド化合物を生産する方法。

【請求項 2】

U G T ポリペプチドを発現する組み換え宿主から調製された細胞溶解物に、モグロール
を接触させ、グリコシル化することを含み、前記 U G T ペプチドが、

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する U G T

10

20

7 3 C 3 ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 C 5 ポリペプチド；

(c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 C 6 ポリペプチド；

(d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 E 1 ポリペプチド；または

(e) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

8 5 C 2 ポリペプチド

である、モグロシド化合物を生産する方法。

10

【請求項 3】

モグロシド生産物を生産する方法であって、以下：

(A) 1 または 2 以上のウリジン - 5' - ジホスホ (U D P) 依存性グルコシルトランスフェラーゼ (U G T) ポリペプチドに、モグロール基質を接触させ、グリコシル化すること；

(B) 1 または 2 以上の U G T ポリペプチドを発現する組み換え宿主から調製された細胞溶解物に、モグロール基質を接触させ、グリコシル化すること；

(C) (i) 1 または 2 以上のモグロシド化合物を生産するための第 1 の反応槽中、1 または 2 以上のウリジン - 5' - ジホスホ (U D P) 依存性グルコシルトランスフェラーゼ (U G T) ポリペプチドに、モグロール基質を接触させ、グリコシル化すること；

20

(i i) 1 または 2 以上のモグロシド生産物を生産するための第 2 の反応槽中、1 または 2 以上の他の U G T ポリペプチドに、ステップ (i) において生産され、前記反応槽の中に導入されたモグロシド化合物を接触させ、グリコシル化すること；および

(i i i) ステップ (i i) において生産された 1 または 2 以上のモグロシド生産物を回収すること；

あるいは

(D) (i) 1 または 2 以上のモグロシド化合物を生産するための第 1 の反応槽中、1 または 2 以上の U G T ポリペプチドを発現する組み換え宿主から調製された細胞溶解物に、モグロール基質を接触させ、グリコシル化すること；

(i i) 1 または 2 以上のモグロシド生産物を生産するための第 2 の反応槽中、1 または 2 以上の他の U G T ポリペプチドに、ステップ (i) において生産され、前記反応槽の中に導入されたモグロシド化合物を接触させ、グリコシル化すること；および

30

(i i i) ステップ (i i) において生産された 1 または 2 以上のモグロシド生産物を回収すること；

を含み、前記 U G T ポリペプチドが、

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 C 3 ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 C 5 ポリペプチド；

(c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 C 6 ポリペプチド；

(d) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

7 3 E 1 ポリペプチド；および

(e) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する U G T

8 5 C 2 ポリペプチド

から選択される、前記方法。

【請求項 4】

モグロシド化合物が、モグロシド I a、モグロシド I b または C 2 5 - H でグリコシル化されたモグロシド化合物である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

50

UGTポリペプチドが、組み換えUGTポリペプチドである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

UGTポリペプチドが、化学合成により生産されるUGTポリペプチドである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

組み換えUGTポリペプチドが、組み換え宿主の細胞溶解物において生産される、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

UGTポリペプチドが、UGTポリペプチドのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかに位置付けられるタグ配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

タグ配列が、緑色蛍光タンパク質（GFP）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、HISタグ、FLAGタグ、葉緑体輸送ペプチド、ミトコンドリア輸送ペプチド、アミロプラストペプチド、シグナルペプチドまたは分泌タグを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

組み換え宿主が、組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNAの発現ベクターにより形質転換された微生物である、請求項2、3および7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

組み換え宿主が、組み換えウイルス発現ベクターにより感染された昆虫細胞システムである、請求項2、3および7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

組み換え宿主が、組み換えウイルス発現ベクターにより感染されたか、または、組み換えプラスミド発現ベクターにより形質転換された、植物細胞システムである、請求項2、3および7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

組み換え宿主が、哺乳動物細胞のゲノムまたは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含む組み換え発現構築物を持つ哺乳動物発現システムである、請求項2、3および7のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年11月23日に出願された米国第61/563,303号の優先権を主張するものであり、参照によりその全開示が組み込まれる。

【0002】

技術分野

本発明は、モグロシド化合物の酵素的合成のための方法および材料に関し、より詳細には、様々なモグロシド化合物を生産するために、ウリジン-5'-ジホスホ（UDP）依存性グルコシルトランスフェラーゼ（UGT）を使用して、モグロールをグリコシル化することに関する。

【背景技術】

【0003】

背景

モグロシドは、*Momordica grosvenori* (Swingle) としても知られている *Siraitia grosvenorii* (Swingle) の果実から単離されたトリテルペン配糖体のファミリーである。その果実の抽出物は、天然甘味料として商業的に使用される。4つの主要な化合物であるモグロシド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Vは、*Siraitia*

10

20

30

40

50

ia grosvenorii (Swingle) の果実から同定され、その果実の甘さの原因となっている。図 1 を参照。モグロシド V は、乾果の約 0.57% (w/w) で、これら 4 つの化合物のうち最も豊富にあり、モグロシド I V およびシアメノシド I がこれに続き、夫々が 4 つのグルコース部分を含む。11 - オキシモグロシド V は、C - 11 に、ヒドロキシルの代わりにケトン基を有する。例えば、Takemoto, et al., Yakugaku Zasshi, 103, 1151-1154; 1155-1166; 1167-1173, (1983); Kasai, et al., Agric. Biol. Chem. 53, 3347-3349 (1989); Matsumoto, Chem. Pharm. Bull. 38, 2030-2032 (1990); および Prakash, et al., J. Carbohydrate Chem. 30, 16-26 (2011) を参照。

【0004】

全てのモグロシドは、モグロールと名付けられた同じトリテルペン母核を共有する。アグリコンであるモグロールは、様々なモグロシド化合物を形成するために、異なる個数のグルコース部分によりグリコシル化される。モグロシドは、以下のやり方で合成されるものと考えられる：共通のトリテルペン前駆体であるスクアレンからのククルピタジエノールの合成；アグリコンであるモグロールを生産するためのククルピタジエノールの P450 酸化；および、モグロシド V を生産するために、5 個のグルコースを次々に加えるモグロールのグリコシル化。Tang, et al., BMC Genomics, 12, 343 (2011) を参照。ククルピタジエノールとモグロールとの両者の中間体は、微量な生産物として、それらが単離される果実中に存在する。Ukiya, et al., J. Agric. Food Chem. 50, 6710-6715 (2002) を参照。配糖体の中間体は、11 - ヒドロキシと 11 - オキシとの両系列に存在し、果実が成熟するにつれ、モグロシド I からモグロシド V に徐々に変化する。これは、トリテルペン母核が、続くグリコシル化の前に、P450 酵素により完全に酸化されることを意味する。しかしながら、モグロシドを生産する原因となるその酵素は同定されていない。

【発明の概要】

【0005】

概要

一側面において、この文書は、モグロシド化合物を生産する方法を取り上げるものである。本方法は、モグロシド化合物（例えば、モグロシド I a、モグロシド I b または C25 - H でグリコシル化されたモグロシド化合物）を生産するため、モグロールをウリジン - 5' - ジホスホ (UDP) 依存性グルコシルトランスフェラーゼ (UGT) とともにインキュベートすることを含む。UGT は、73C3、73C6、85C2、73C5 および 73E1 からなる群から選択され得る。UGT は、組み換えで生産され得るか、または組み換え宿主の細胞溶解物中にあり得る。

【0006】

本文書はまた、モグロシド化合物を生産する方法も取り上げるものである。本方法は、モグロシド化合物（例えば、モグロシド I a、モグロシド I b または C25 - OH でグリコシル化されたモグロシド化合物）を生産するため、モグロールを、UGT を発現する組み換え宿主から調製された細胞溶解物に接触させることを含む。UGT は、73C3、73C6、85C2、73C5 および 73E1 からなる群から選択され得る。

【0007】

別段の定めがない限り、本明細書に使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似の、または等価な方法および材料が本発明を実施するのに使用され得るが、好適な方法および材料が以下に記載されている。本明細書中に言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりそれら全体が組み込まれる。矛盾する場合、本明細書が、定義を含め、支配するものである。加えて、本材料、本方法および本例は、一例に過ぎず、限定することを意図していない。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかであろう。出願人は、特許法の標準的な実務に従い、移行句である「含む」、「本質的にからなる」または「からなる」を使用し、開示されたいずれの発明も択一的に主張する権利を保有する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 8 】

図面の説明

【図 1】図 1 は、モグロシド V、モグロシド I V、シアメノシド I および 1 1 - オキシモグロシド V の化学構造を含む。

【 0 0 0 9 】

【図 2】図 2 には、UGT を使用する、モグロールからのモグロシド I a およびモグロシド I b の生合成が描かれている。

【 0 0 1 0 】

【図 3 - 1】図 3 - 1 は、以下の UGT : UGT 7 3 C 3、UGT 7 3 C 5、UGT 7 3 C 6、UGT 7 3 E 1 および UGT 8 5 C 2 のアミノ酸配列（夫々、配列番号 1 ~ 5）を含む。

10

【図 3 - 2】図 3 - 2 は、以下の UGT : UGT 7 3 C 3、UGT 7 3 C 5、UGT 7 3 C 6、UGT 7 3 E 1 および UGT 8 5 C 2 のアミノ酸配列（夫々、配列番号 1 ~ 5）を含む。

【 0 0 1 1 】

【図 4】図 4 は、ペクチナーゼおよびノまたはセルラーゼとともにインキュベートした後、モグロシド V から得られる生産物の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

詳細な説明

20

この文書は、1 または 2 以上のウリジン - 5' - ジホスホ (UDP) 依存性グルコシルトランスフェラーゼ (UGT) を使用するモグロールのグルコシル化のための方法および材料を提供する。以下に示すとおり、アグリコンであるモグロールをグリコシル化する少なくとも 5 つの UGT が同定された。図 2 を参照。本明細書において同定された UGT の夫々は、グリコシルトランスフェラーゼファミリー I に入るものである。UGT の 7 3 C 3、7 3 C 6、8 5 C 2 および 7 3 E 1 は、C 2 4 - OH の位置でグリコシル化する（図 2 中、UGT # 2）が、UGT 7 3 C 5 は、C 3 - OH（図 2 中、UGT # 1）と C 2 4 - OH（UGT # 2）との両位置でグリコシル化する。UGT の 7 3 C 3、7 3 C 5 および 7 3 C 6 は、*Arabidopsis thaliana* に由来する。UGT の 7 3 E 1 および 8 5 C 2 は、*Stevia rebaudiana* に由来する。UGT の 7 3 C 3、7 3 C 5、7 3 C 6、7 3 E 1 および 8 5 C 2 のアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 5）は、図 3 に記載されている。

30

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載の UGT ポリペプチドは、任意の好適な方法を使用して生産され得る。例えば、UGT ポリペプチドは、化学合成により生産され得る。代わりに、本明細書に記載の UGT ポリペプチドは、その UGT ポリペプチドをコードする異種発現ベクターを使用する標準的な組み換え技術により生産され得る。発現ベクターは、コードされたポリペプチドの発現のために、（例えば、形質転換またはトランスフェクションにより）宿主細胞に導入され得る。UGT ポリペプチドの小規模または大規模の生産のために使用される発現システムは、制限されることなく、本明細書に記載の核酸分子を含む組み換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA またはコスミド DNA の発現ベクターにより形質転換された細菌（例えば *E. coli* および *B. subtilis*）等の微生物を含む。有用な発現システムはまた、本明細書に記載の核酸分子を含む組み換えウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）により感染された昆虫細胞システム、および、本明細書に記載の核酸分子を含む、組み換えウイルス発現ベクター（例えばタバコモザイクウイルス）により感染されたか、または、組み換えプラスミド発現ベクター（例えば Ti プラスミド）により形質転換された、植物細胞システムも含む。UGT ポリペプチドはまた、本明細書に記載の核酸の他に、哺乳動物細胞のゲノム（例えばメタロチオネインのプロモーター）または哺乳動物ウイルス（例えばアデノウイルスの後期プロモーターおよびサイトメガロウイルスのプロモーター）に由来するプロモーターを含む組み換え発現構築物を持つ哺乳動物発現システムを使用しても生産され得る。UGT ポリペプチドは、後述するような N 末端

40

50

またはC末端のタグを有し得る。

【0014】

この文書はまた、UGTポリペプチドをコードする単離された核酸も提供する。「単離された核酸」は、ゲノム中に存在する他の核酸分子から分離された核酸を指し、ゲノム中の該核酸の片側または両側に通常隣接する核酸も含む。本明細書に使用される「単離される」という用語はまた、核酸に関して、非天然起源の核酸配列のいずれも含む。それは、かかる非天然起源の配列は、自然界に見出されず、天然起源のゲノムにおいて直に近接する配列を有さないからである。

【0015】

単離された核酸は、例えば、天然起源のゲノム中、DNA分子と直に隣接することが通常見出された核酸配列の1つが除去されたか、またはないならば、そのDNA分子であり得る。よって、単離された核酸は、制限することなく、ベクター、自律複製プラスミド、ウイルス（例えば、パラミクソウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスのいずれか）または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAの中に組み込まれたDNAと同様、他の配列と独立して、分離された分子（例えば、化学的に合成された核酸、またはPCRもしくは制限酵素処置により生産されたcDNAもしくはゲノムDNAフラグメント）として存在するDNA分子を含む。加えて、単離された核酸は、ハイブリッド核酸または融合核酸の一部であるDNA分子等の人工的な核酸を含み得る。例えば、cDNAライブラリもしくはゲノムライブラリ、またはゲノムDNA制限消化を含むゲル薄片の中の、数百から数百万の他の核酸の中に存在する核酸は、単離された核酸とは見なされない。

【0016】

いくつかの態様において、UGTポリペプチドをコードする核酸配列は、その後の操作を容易にする（例えば精製または検出を容易にする）か、コードされたポリペプチドの分泌または局在化を容易にするために設計された「タグ」をコードするタグ配列を含み得る。タグ配列は、コードされたタグがUGTポリペプチドのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかに位置付けられるように、UGTポリペプチドをコードする核酸配列に挿入され得る。コードされたタグの非限定例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、HISタグおよびFlag（商標）タグ（Kodak, New Haven, CT）が挙げられる。タグの他の例としては、葉緑体輸送ペプチド、ミトコンドリア輸送ペプチド、アミロプラストペプチド、シグナルペプチドまたは分泌タグが挙げられる。

【0017】

機能相同体

先に記載のポリペプチドの機能相同体もまた、本明細書に記載の方法および組み換え宿主における使用に好適である。機能相同体は、参照ポリペプチドと配列類似性を有し、参照ペプチドの生化学的または生理学的な機能の1または2以上を達成するポリペプチドである。機能相同体および参照ポリペプチドは、天然起源のポリペプチドであってもよく、配列類似性は、収束進化的または分岐進化的な事象に起因してもよい。機能相同体それ自体は、文献において、時に、相同体またはオルソログまたはパラログと指定される。野生型コード配列の突然変異体にコードされるポリペプチド等の天然起源の機能相同体のバリエーションは、それら自体が、機能相同体であってもよい。機能相同体はまた、ポリペプチドのコード配列の部位特異的突然変異誘発を介するか、または異なる天然起源のポリペプチドのコード配列に由来するドメインを組み合わせること（「ドメインスワッピング」）によっても、創出され得る。本明細書に記載の機能UGTポリペプチドをコードする遺伝子を修飾するための技術は、知られており、とりわけ、定向進化技術、部位特異的突然変異誘発技術およびランダム突然変異誘発技術を含むものであり、ポリペプチドの特定の活性を増大し、基質特異性を変え、発現レベルを変え、細胞内位置を変え、または、所望のやり方でポリペプチド：ポリペプチド相互作用を修飾するのに有用であり得る。かかる修飾ポリペプチドは、機能相同体と見なされる。「機能相同体」という用語は、時には、機能的

に相同なポリペプチドをコードする核酸に適用される。

【0018】

機能相同体は、ヌクレオチドおよびポリペプチドの配列アライメントの分析により同定され得る。例えば、ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のデータベース上でクエリを実行することによって、U G T ポリペプチドの相同体が同定され得る。配列分析は、参照配列としてU G T アミノ酸配列を使用する、非重複のデータベースBLAST、Reciprocal BLASTまたはPSI-BLASTの分析を含み得る。アミノ酸配列は、場合によっては、ヌクレオチド配列から推定される。40%を超える配列同一性を有するデータベース中のそれらのポリペプチドは、U G T ポリペプチドとして好適な、さらなる評価のための候補である。アミノ酸配列の類似性は、1つの疎水性残基の他への置換または1つの極性残基の他への置換等の保存的アミノ酸の置換を可能にする。所望する場合、さらなる評価のために候補の数を絞るため、かかる候補の手検測が行われ得る。手検測は、U G T ポリペプチド中に存在するドメイン、例えば保存的機能ドメインを有するように見えるそれらの候補を選択することによって実行され得る。

10

【0019】

保存的領域は、繰り返し配列であるか、二次構造（例えばヘリックスおよびベータシート）を形成するか、正もしくは負に帯電したドメインを確立するか、またはタンパク質モチーフもしくはドメインを表す、ポリペプチドの一次アミノ酸配列内の領域を位置付けることによって同定され得る。例えば、ワールドワイドウェブ上の様々なタンパク質モチーフおよびドメインのためのコンセンサス配列を記載するウェブサイトPfam (sanger.ac.uk/Software/Pfam/ and pfam.janelia.org/) を参照。Pfamデータベースに含まれる情報は、Sonnhammer et al., Nucl. Acids Res., 26:320-322 (1998); Sonnhammer et al., Proteins, 28:405-420 (1997); およびBateman et al., Nucl. Acids Res., 27:260-262 (1999) に記載されている。保存的領域もまた、近縁種と同じか、または関連するポリペプチドの配列をアライメントさせることによって決定され得る。近縁種は、好ましくは、同じファミリー由来である。いくつかの態様において、2つの異なる種に由来する配列のアライメントが適する。

20

【0020】

典型的には、少なくとも約40%のアミノ酸配列同一性を呈するポリペプチドが、保存的領域を同定するのに有用である。関連するポリペプチドの保存的領域は、少なくとも45%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%のアミノ酸配列同一性）を呈する。いくつかの態様において、保存的領域は、少なくとも92%、94%、96%、98%または99%のアミノ酸配列同一性を呈する。配列同一性は、前記のとおり決定され得る。

30

【0021】

モグロシド化合物を生産する方法

モグロシド化合物は、モグロール基質を、本明細書に記載のU G T ポリペプチドの1または2以上とともにインキュベートし、その結果モグロシド生産物が生産されることによって生産され得る。いくつかの態様において、複数のグリコシル化が反応槽中で起こるように、反応混合物は、複数のU G T ポリペプチドを含む。他の態様において、反応混合物は、単一のU G T ポリペプチドを含み、そのポリペプチドによって触媒される1または2以上のグリコシル化が起こる。例えば、第1の反応槽は、中間体を生産するための基質および1または2以上のU G T ポリペプチドを含み得、該中間体は、次の中間体またはモグロシド生産物を生産するため、1または2以上の他のU G T ポリペプチドを含む第2の反応槽の中に導入され得る。第2の反応槽中で生産された生産物は、その後、回収され得る。

40

【0022】

U G T ポリペプチドの夫々は、精製されたポリペプチドであり得、例えば、所望のU G T を重量で80%、90%、95%または99%超含む溶液として反応混合物に加え得る。代わりに、U G T ポリペプチドは、U G T を発現する組み換え宿主から調製される細胞

50

溶解物中に存在し得、モグロール基質とのインキュベートのために、細胞溶解物として反応混合物に加え得る。

【0023】

生産物、基質および中間体のレベルは、公開された方法に従い、分析のための反応槽から試料を抽出することによって決定され得る。モグロシド化合物は、当該技術分野において知られている様々な技術を使用して反応槽から回収され得る。

本発明を以下の例においてさらに説明するが、当該例は、クレームに記載の本発明の範囲を限定するものではない。

【0024】

例

10

例1 - モグロシドVの精製

モグロシドVを、以下のようにして、市販のモンク(monk)果実抽出物(PureLo(登録商標), Swanson)から精製した。3つの瓶のPureLo(登録商標)(240グラム)を水(900mL)に溶解した後、HP-20レジン(400グラムのレジン)のカラムにロードした。カラムを水(2.5リットル)で洗浄し;その後、さらに20%メタノール-水で洗浄した。生産物をメタノールで溶出した。溶媒を蒸発後、高真空下で乾燥させ、モグロシドV(2.5グラム、~80%の純度、11-オキシモグロシドVが主な不純物であった)を得た。

【0025】

例2 - モグロシドVからモグロールの酵素的合成

20

モグロシドV(300mg)を、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5、100mL)に溶解し、*Aspergillus niger*由来の粗ペクチナーゼ(25mL、Sigma P2736)を加えた。混合物を50で48時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出した(2x100mL)。有機抽出物を、真空下で乾燥させた後、分取HPLCで精製した。純モグロール(40mg)を得、その構造をNMRと質量分析で確認した。図4を参照。

【0026】

例3 - モグロシドVからの、モグロール3-O-グルコシド(モグロシドIa)およびモグロール24-O-グルコシド(モグロシドIb)の酵素的合成

モグロシドV(300mg)を0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5、100mL)に溶解し、*Aspergillus niger*由来の粗ペクチナーゼ(25mL、Sigma P2736)を加えた。混合物を50で6.5時間撹拌した。反応混合物を、酢酸エチルで抽出した(2x100mL)。有機抽出物を真空下で乾燥させた後、分取HPLCで精製した。純モグロシドIa(11.0mg)およびモグロシドIb(8.0mg)を得た。それらの構造は、NMRと質量分析により確認した。図4を参照。

30

【0027】

例4 - in vitroでのUGTのスクリーニングおよび反応

230のUGT酵素の一群によるモグロールのin vitroでの反応を実行し、生産物をLC-MSで分析した。in vitroでのUGT反応混合物には、4xTris緩衝液、モグロール(250μM)、UDP-グルコース(750μM)および1%アルカリホスファターゼが含まれた。部分的に精製されたUGT酵素または粗酵素の各5μLを反応物に加え、反応体積を水で50μLにした。反応物を30で終夜インキュベートし、滅菌された96ウェルプレート中で実行した。インキュベート後、25μLのDMSOを各反応物に加え、反応プレートを5分間遠心分離した。40μLの試料を各ウェルから取り、濾過し、LC-MS分析用に使用した。

40

【0028】

UGTの73C3、73C6および85C2は、全てのモグロール基質をモグロシドIbへ変換したことが見出された。UGT73C5は、モグロシドIaおよびIbの両者を生成する。UGT73E1による反応において、該反応が完了しなかったにもかかわらず、新規のグリコシル化モグロール(モグロシドIaでもIbでもなく;正確な質量からモグロシドIであることが示され、好ましくはC25-OH上のグリコシル化事象に起因す

50

る)と一緒にモグロシド I b が主要な生産物として見出された。

【 0 0 2 9 】

他の態様

本発明がその詳細な説明と併せて記載されているが、このような記載は説明することを意図し、添付のクレームの範囲により定義される本発明の範囲を限定するものではないことは理解されるべきである。他の側面、利点および修飾は、以下のクレームの範囲内である。

【 図 1 】

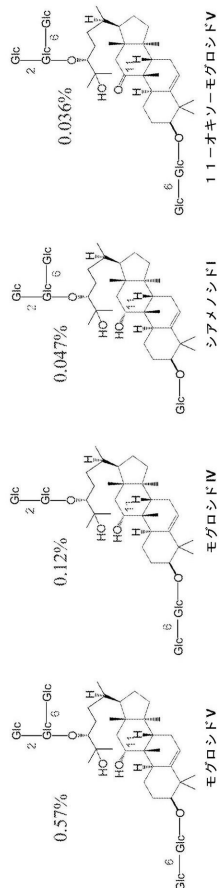


図 1

【 図 2 】

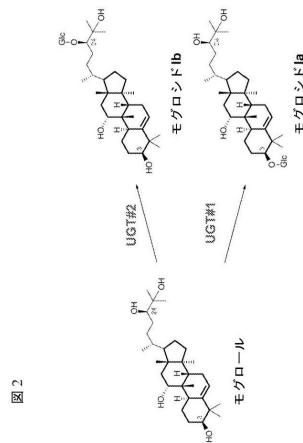


図 2

【図 3 - 1】

図 3

UGT73C3 (配列番号 0.1.)

MAYTEKTHQHPHSLHFVLPFMAQGHMIPMDIARLLAQRGVITITVTPHNAARFKNVLRNRAIESGLAINLHVFPYQEEGLP
EGKENDSLDSTELMVPFFKAVNLLEDVPMKLMMEEMKPRPSCLISDWCLPYTSHAKNPNPKVHFHMGCGFCLLMHVLRRN
LEILENVSKDEEYFLVPSFDRVFTKLQIPVKANASGDWKEIMDEMVAEYTSYGVIVNTFQLEPPYVYKDYKEAMDGKV
WSIGPVSLCNKAGADKAERGSKAADQDECLQWLDKSEGSVLYVCLGSCINPLSOLKELGLGLEESRSFVWIRGSEKYK
ELFEWMLSESGFEERKERGLIKGWAPQVLLSHPSVGGFLTHCGWNSTLEGITGLITWPLFGDFQCNQKLVVQVLKAGV
SAGVEEVMKWGEEDKIGLYVDKEGVKKA VEELMGDSDDAKERRRRVKELGELAHKA VEKGGSSHSNITLLQDIMQLAQF
KN

UGT73C5 (配列番号 0.2.)

MVSETTKSSPLHFVLPFMAQGHMIPMDIARLLAQRGVITITVTPHNAARFKNVLRNRAIESGLPMLVQVKFPYLEAGLQEG
QENIDSLDTERMIPPKAVNLEEPVQKLEEMNPRPSCLISDFCLPYTSKIAKKNPKILFHGMGCTCLCMHVLRRNREIL
DNLKSDKELFTVPDPDRVFTQVPVETVYPAGDWKDFDGMVEANETSYGVIVNSFQLEPAPYAKDYKEVRSGKAWTI
GPVSLCNKVGADKAERGNKSDQDECLKWLDSKSHGVSVLYVCLGSCINPLSOLKELGLGLEESQRPFWVIRGWEKYKEL
VEVFSSEGFEDRIQDRGLIKGWSPQMLILSHPSVGGFLTHCGWNSTLEGITAGLPLTWPLFADQFCNEKLVVEVLKAGVR
SGVEQPMKWGEEEKIGLYVDKEGVKKA VEELMGESDDAKERRRRAKELGELSAHKA VEEGGSSHSNITLLQDIMELAEPPN

UGT73C6 (配列番号 0.3.)

MAFEKNNEPPLHFVLPFMAQGHMIPMDIARLLAQRGVITITVTPHNAARFKNVLRNRAIESGLPMLVQVKFPYQEAGLQ
EQENMDLLTMEQITSEFFKAVNLLKEPVQNLEEMSPRPSCLISDMCLSYTSEIAKKFKPKILFHGMGCTCLLCVNLKKNR

【図 3 - 2】

図 3 - 続き

EILDNLKSDKEYFVFPDRVFTQVPVETVYPAGWKEILEDVMEADKTSYGVIVNSFQLEPAPYAKDFEARSKAWTI
GPVSLCNKVGVDKAERGNKSDQDECLWLDKSEKPGSVLYVCLGSCINPLSOLKELGLGLEESQRPFWVIRGWEKYKEL
VEVFSSEGFEDRIQDRGLIKGWSPQMLILSHPSVGGFLTHCGWNSTLEGITAGLPLTWPLFADQFCNEKLVVQILKVGVS
AEVKEVMKWGEEEKIGLYVDKEGVKKA VEELMGESDDAKERRRRAKELGELSAHKA VEEGGSSHSNITLLQDIMQLAQSN
N

UGT73E1 (配列番号 0.4.)

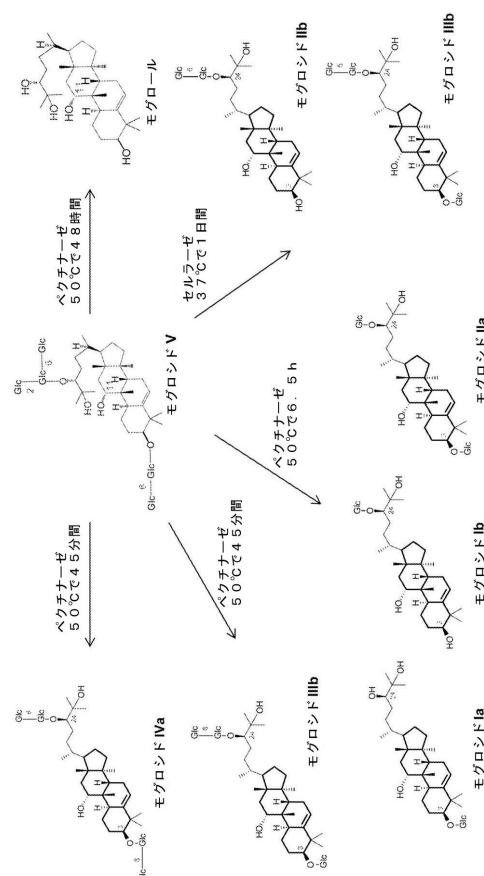
MSPKMVAPPTNLHFVLPPLMAQGHLPVPMVDIARLLAQRGATVTHITTPYHANRVPVISAIAIATNLKQLLELQLRSTEAGLPE
GCESFDQLPSFEYWKNIATAIDLLQPAEDLLRELSPDPDISDFLPWTTDVARRLNPRLVFNGPCFYLLCHVATSNILG
ENEPVSSNTERVVLPGLPDRIEVTKLQVGGSRPANVDEMGSWLRAVEAKASGVIVNTFEELEPEYVEEYKTVKDKKMWCV
IGPVSLCNKTGPDLAERGNKAAITEHNKCLWLDERKLGVSVLYVCLGSLARISAAQAEHLGLGLSINRPFVWCRNETDELKT
WFLDGEFVRDRGLIVHGWAPQVLLSHPTIGGFLTHCGWNSTHESITAGVPMITWPFADQFLNEAFIVEVLKIGVIGVER
ACLFGEEDKVGVLVKKEDVKKAVECLMDEDEGDQRRRKRRIELAKMAKIAMAEAGSSSYENVSSLRDVTETVTRAPH

UGT85C2 (配列番号 0.5.)

MDAMATTEKKPHVIFIPPAQSHIUKAMLKLAQLLHHKGLQITFVNTDFHNOFLESSGPHCLDAGPGRFETIPDGVNSHSPASAI
PIRESLLSIETNFDLFDLVTKLDPDPTCISDGLFSVFTDAAKKLGPVMMYWTLAACGFMGYHHLSLEKGFAPLKDASY
LTNGYLDTVDWVRPMEGIRLKDFTDLNDKVLMTTEAPQRSHKSHIHFTDELEPSHKITLSLRYNHYITGTPQL
LLDQPEEKOTGTHLHGYSLVKKEEPCFQVLQSKSPNSVYVNGSTTVMLEDMTEFGWGLANSNHYFLWIRSNLVIGE
NAVLPPELEEHKKRGFIASWCSQEKVLKHPVSGFLTHCGWGSTIESLSAGVPMICWPSWDQLTNCRICYKEWEVEGLEMG
TKVKRDEVKRLVQELMGECHMKRNKAKDWKEKARIAIAPNGSSSLNIDKMKVEITLARN

【図 4】

図 4



【配列表】

0006084983000001.app

 フロントページの続き

(72)発明者 イ, ジョン ヨブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95014 クパチーノ、アルパイン ドライブ #2 1
0243

(72)発明者 クハレ, モニカ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95014 クパチーノ、ペア ツリー レーン 1998
0

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2008/062165(WO, A1)

国際公開第2008/065370(WO, A1)

国際公開第2010/106318(WO, A1)

国際公開第2005/021740(WO, A1)

BMC GENOMICS, 2011年 7月 5日, Vol. 12, No. 343, pp. 1-13

THE PLANT JOURNAL, 2005年 1月 1日, Vol. 41, No. 1, pp. 56-67

CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY, 2005年 6月 1日, Vol. 8, No. 3, pp. 254-263

Database GenBank, [online], Accession No. Q6VAA9, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/75292641?sat=35&satkey=1084956>>, 公知日: 2004年7月5日, [2016年8月19日
検索], DEFINITION: UDP-glycosyltransferase 73E1.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 19/18

C12N 15/09

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

DWPI(Thomson Innovation)