

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4571862号
(P4571862)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月20日(2010.8.20)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 P 33/00	(2006.01)	C 1 2 P 33/00	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/88	(2006.01)	C 1 2 N 9/88	

請求項の数 17 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2004-541126 (P2004-541126)	(73) 特許権者	390009287
(86) (22) 出願日	平成15年10月2日(2003.10.2)		ファイルメニツヒ ソシエテ アノニム
(65) 公表番号	特表2006-500942 (P2006-500942A)		F I R M E N I C H S A
(43) 公表日	平成18年1月12日(2006.1.12)		スイス国 ジュネーヴ 8 ルート デ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2003/005072		ジュネ 1
(87) 国際公開番号	W02004/031376		1, route des Jeunes,
(87) 国際公開日	平成16年4月15日(2004.4.15)		CH-1211 Geneve 8,
審査請求日	平成18年10月2日(2006.10.2)		Switzerland
(31) 優先権主張番号	60/415,765	(74) 代理人	100061815
(32) 優先日	平成14年10月4日(2002.10.4)		弁理士 矢野 敏雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100094798
(31) 優先権主張番号	PCT/IB02/05070		弁理士 山崎 利臣
(32) 優先日	平成14年12月2日(2002.12.2)	(74) 代理人	100099483
(33) 優先権主張国	国際事務局 (IB)		弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セスキテルペン合成及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バレンセンの製造方法であって、

A) ファルネシルピロリン酸と、

(a) 配列番号 9 又は配列番号 10 に少なくとも 90% 同一であるヌクレオチド配列を有する核酸並びに(b) 配列番号 4 又は配列番号 5 に少なくとも 90% 同一であるポリペプチドをコードする核酸

から選択される核酸によってコードされる少なくとも1種のバレンセン合成酵素とを接触させ、あるいは更に

B) A) で産生されたバレンセンを単離する

ことを含む方法。

【請求項 2】

核酸が、配列番号 9 又は配列番号 10 に 少なくとも 95% 同一であるヌクレオチド配列を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

核酸が、配列番号 9 又は配列番号 10 に示されるヌクレオチド配列を有する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

核酸が、配列番号 9 又は配列番号 10 に示されるヌクレオチド配列からなる、請求項 3

記載の方法。

【請求項 5】

核酸が、配列番号 4 又は配列番号 5 に少なくとも 95% 同一であるポリペプチドをコードする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

核酸が、配列番号 4 又は配列番号 5 のポリペプチドをコードする、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

接触時間において pH が 7 又は 7 未満である、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 8】

バレンセン合成酵素をその核酸を有する宿主細胞の培養によって製造し、その際、宿主細胞が細菌細胞、酵母細胞、植物細胞及び動物細胞から選択される、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

宿主細胞が大腸菌細胞である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

バレンセン合成酵素の製造方法であって、少なくとも 1 つの核酸配列を有する改変された宿主を、バレンセン合成酵素の産生に導く条件下に培養させることを含み、その際、前記の少なくとも 1 つの核酸が、バレンセン合成酵素をコードし、かつ

20

(a) 配列番号 9 又は配列番号 10 に少なくとも 90% 同一であるヌクレオチド配列を有する核酸並びに

(b) 配列番号 4 又は配列番号 5 に少なくとも 90% 同一であるポリペプチドをコードする核酸

から選択される方法。

【請求項 11】

核酸が、配列番号 9 又は配列番号 10 に少なくとも 95% 同一であるヌクレオチド配列を有する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

核酸が、配列番号 9 又は配列番号 10 に示されるヌクレオチド配列を有する、請求項 11 記載の方法。

30

【請求項 13】

核酸が、配列番号 9 又は配列番号 10 に示されるヌクレオチド配列からなる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

核酸が、配列番号 4 又は配列番号 5 に少なくとも 95% 同一であるポリペプチドをコードする、請求項 10 記載の方法。

【請求項 15】

核酸が、配列番号 4 又は配列番号 5 のポリペプチドをコードする、請求項 14 記載の方法。

40

【請求項 16】

宿主細胞が細菌細胞、酵母細胞、植物細胞及び動物細胞から選択される、請求項 10 から 15 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

宿主細胞が大腸菌細胞である、請求項 16 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2002年10月4日に出願された米国の仮出願番号第60/415,765号の利益を特許請求の範囲とし、その内容はこの参照により開示に含まれる。また本願は

50

、2002年12月2日に出願された国際出願PCT/IB02/05070号の優先権の利益を特許請求の範囲とし、その内容はこの参照により開示に含まれる。

【0002】

本発明はセスキテルペン合成及びその製造方法及び使用に関する。一実施態様において、本発明は、本願に記載される少なくとも1種のセスキテルペン合成酵素をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。更なる実施態様において、本発明はまたセスキテルペン合成酵素及びこれらの酵素の製造方法及び使用方法を提供する。例えば本発明のセスキテルペン合成酵素はファルネシルピロリン酸を種々の酸素化された脂肪族のセスキテルペン、例えばパレンセン、ピシクロゲルマクレン、クベボール及び -カジネン に変換するために使用できる。

10

【0003】

発明の背景

テルペン化合物は、大きな構造多様性を有する広範な天然分子を表す。植物界は非常に多様なモノテルペン及びセスキテルペンを有している。しばしばこれらのテルペンは、病原、昆虫及び草食動物に対する植物の防衛において、かつ花粉媒介昆虫の誘引のために重要である。

【0004】

テルペンの生合成は多くの生物において広い範囲にわたって研究されてきている。通常のテルペンの前駆体はイソペンテニルピロリン酸 (IPP) であり、IPPに導く工程を触媒する多くの酵素が特徴付けられている。2種の異なるIPP生合成経路は近年に知ら

20

【0005】

例えばIPPはIPPイソメラーゼにより異性体化されて、ジメチルアリルニリン酸となり、そしてこれらの2種のC₅化合物はフェニルトランスフェラーゼによって縮合されて、種々のクラスのテルペンのための非環式のピロリン酸テルペン前駆体、すなわちモノテルペンのためのゲラニルピロリン酸 (GPP)、セスキテルペンのためのファルネシルピロリン酸 (FPP)、ジテルペンのためのゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) が形成される。非環式前駆体の環化工程を触媒する酵素はテルペンシクラーゼ又はテルペン

30

【0006】

これらの酵素は複雑な多段階の環化を触媒して、テルペン又はセスキテルペン化合物の炭素骨格を形成しうることがある。例えば触媒される環化の最初の工程はニリン酸基をイオン化してアリルカチオンを形成させることであってよい。次いで、酵素の活性部位によって調節できるその基質の異性体化及び転位を行う。生成物は、例えば非環式、単環式、二環式又は三環式であってよい。次いでプロトンがカルボカチオンから遊離されうるか、又はカルボカチオンは水分子と反応し、そしてテルペン炭化水素又はアルコールが遊離される。幾つかのテルペン合成酵素は単一の生成物を産生するが、多くは複数の生成物を産生する。

40

【0007】

多様性の大きなテルペン構造及びセスキテルペン合成酵素は天然に見られる。幾つかのセスキテルペン合成酵素をコードするcDNA又は遺伝子はクローニングされており、かつ種々の植物源から特徴付けられている、例えば5-エピ-アリストロチエン合成酵素はタバコ (Facchini, P.J. and Chappell, J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1088-11092.) 及びトウガラシ (Back, K., et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39 (9), 899-904) から、ベチスピラジエン (vetispiradiene) 合成酵素はヒヨスシウムス・ムチクス (Hyoscyamus muticus) (Back, K. and Chappell, J. (1995) J. Biol. Chem. 270 (13), 7375-7381.) から、(E)--ファルネセン合成酵素はセイヨウハッカ (Crock, J., et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (24), 12833-12838.) から、

50

- セリネン合成酵素及び - フムレン合成酵素はグランドファー (Steele, C.L., et al. (1998) J. Biol. Chem. 273 (4), 2078-2089) から、 - カンジネン合成酵素はキダチワタ (Chen, X.Y., et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys. 324 (2), 255-266; Chen, X.Y., et al. (1996) J. Nat Prod. 59, 944-951) から、 E - - ピサボレン合成酵素はグランドファー (Bohlmann, J., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (12), 6756-6761.) から、ゲルマクレン C 合成酵素はトマト (Colby, S.M., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (5), 2216-2221.) から、エピ - セドロール合成酵素及びアモルファ - 4, 11 - ジエン合成酵素はクソニンジン (Mercke, P., et al. (1999) Arch. Biochem. Biophys. 369 (2), 213-222; Mercke, P., et al. (2000) Arch. Biochem. Biophys. 381 (2), 173-180.) から、そしてゲルマクレン A 合成酵素はレタス、チコリー及びソリダゴ・カナデンシス (Bennett, M.H., et al. (2002) Phytochem. 60, 255-261; Bouwmeester, H.J., et al. (2002) Plant Physiol. 129 (1), 134-144; Prosser I, et al. (2002) Phytochem. 60, 691-702) から特徴付けられている。

10

【 0 0 0 8 】

多くのセスキテルペン化合物は香料に使用され (例えばパチョウロール (patchoulol)、ヌートカトン、サンタロール、ベチボン、セネンサール)、そして多くは植物から抽出される。結果として、それらの利用性及び価格は植物の入手性及び産生国の安定性に関連して変動に付されることがある。従って植物に頼らないセスキテルペンの製造系の有効性に関心が持たれうる。幾つかのセスキテルペンの構造の複雑性のため、許容できる費用でのそれらの化学合成はいつも実行可能とはいえない。

20

【 0 0 0 9 】

発明の要旨

一実施態様では、本発明はセスキテルペン合成酵素をコードする単離された核酸に関する。本願で使用される場合には、セスキテルペン合成酵素は、該酵素により非環式のピロリン酸テルペン前駆体、例えばファルネシルピロリン酸と接触させることで生成する少なくとも 1 種の化合物によって指示されることもある。例えばビシクロゲルマクレンを生成物の 1 つとして生成しうるセスキテルペン合成酵素はビシクロゲルマクレン合成酵素と呼ばれることがある。この慣習を用いると、本発明の核酸の例は、例えばクベボール合成酵素 (G F T p s C) (配列番号 1) をコードする c D N A ; - カジネン合成酵素 (G F T p s E) (配列番号 2) をコードする c D N A ; ビシクロゲルマクレン合成酵素 (G F T p s B) (配列番号 3) をコードする c D N A ; バレンセン合成酵素 (G F T p s D 1 と G F T p s D 2) (配列番号 4 と配列番号 5) をコードする c D N A である。

30

【 0 0 1 0 】

一実施態様では、本発明は、(a) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 に実質的に示されたヌクレオチド配列を有する核酸 ; (b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸並びに (c) 低いストリンジェンシー条件下に (a) 又は (b) の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である単離された核酸を提供する。有利には、本発明は、(a) 配列番号 6 又は配列番号 7 に実質的に示されたヌクレオチド配列を有する核酸 ; (b) 配列番号 1 又は配列番号 2 に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸並びに (c) 低いストリンジェンシー条件下に (a) 又は (b) の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である単離された核酸を提供する。一実施態様において、規定の条件は中程度のストリンジェンシー条件であり、そして更なる実施態様では高いストリンジェンシー条件である。他の実施態様は、例えば本発明の核酸によってコードされるポリペプチド ; 本発明の核酸を有する宿主細胞 ; 本発明の核酸を有する改変された非ヒト生物 ; 並びに本発明の宿主細胞を培養することを含むポリペプチドの製造方法である。

40

【 0 0 1 1 】

もう一つの実施態様では、本発明は配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4

50

又は配列番号 5 に実質的に示されたアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドを提供する。有利には、本発明は、配列番号 1 又は配列番号 2 に実質的に示されたアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドを提供する。

【 0 0 1 2 】

更なる一実施態様では、本発明は、(a) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 に実質的に示されたヌクレオチド配列を有する核酸；(b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸並びに(c) 低いストリンジェンシー条件下に(a) 又は(b) の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である少なくとも 1 つの核酸を有するベクターを提供する。別の実施態様は、例えば組み換え宿主細胞の作成方法であって、本発明のベクターを宿主細胞に導入することを含む方法である。

10

【 0 0 1 3 】

一実施態様では、本発明は少なくとも 1 種のセスキテルペン合成酵素の製造方法であって、少なくとも 1 つの核酸配列を有する改変された宿主を、少なくとも 1 種のセスキテルペン合成酵素の製造に寄与する条件下に培養することを含む方法を提供する。一実施態様では、少なくとも 1 つの核酸は、(a) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 に実質的に示されたヌクレオチド配列を有する核酸；(b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸並びに(c) 低いストリンジェンシー条件下に(a) 又は(b) の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、その際、該核酸によってコードされるポリペプチドはセスキテルペン合成酵素である。宿主は、例えば植物、微生物、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞及び動物細胞から選択してよい。

20

【 0 0 1 4 】

もう一つの実施態様では、本発明は、少なくとも 1 種のテルペノイドの製造方法であって、1) 少なくとも 1 種の非環式のピロリン酸テルペン前駆体を、核酸によってコードされる少なくとも 1 種のポリペプチドと接触させることを含む方法を提供する。一実施態様では、核酸は、(a) 配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 に実質的に示されたヌクレオチド配列を有する核酸；(b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸並びに(c) 低いストリンジェンシー条件下に(a) 又は(b) の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、その際、該核酸によってコードされるポリペプチドはセスキテルペン合成酵素であり、2) (1) で生成された少なくとも 1 種のテルペノイドが単離される。一実施態様では、少なくとも 1 種のテルペノイドはセスキテルペンから選択される。更なる一実施態様において、少なくとも 1 種の非環式のピロリン酸テルペン前駆体はファルネシルピロリン酸である。本発明の方法により製造されたセスキテルペンは、制限されないが、例えばビシクロゲルマクレン、クベボール、バレンセン、 α -クベベン、ゲルマクレン D 及び β -カジネンである(図 3)。

30

【 0 0 1 5 】

前記の一般的記載と以下の詳細な説明の両者は例示し、かつ説明するだけのものであって、特許請求の範囲としての本発明を制限するものではないと解すべきである。ここで本発明の例示の実施態様を詳細に言及する。

40

【 0 0 1 6 】

図面の簡単な説明

図 1：イソペンテニルピロリン酸の生合成経路の例(メバロン酸経路(A)及びデオキシキシルロース経路(B))。

【 0 0 1 7 】

図 2：イソペンテニルピロリン酸からのテルペン生合成の例。

【 0 0 1 8 】

図 3：セスキテルペン化合物の例の構造。

50

【 0 0 1 9 】

図 4 : 2 つの群のセスキテルペン合成酵素のアライメントの中心部分 (ゲルマクレン C トマト 8 - カジネン合成酵素 (配列番号 1 1) ; (E) - - ファルネセン セイヨウ ハッカ (配列番号 1 2) ; - セリネン グランドファー (配列番号 1 3) ; セスキテルペン合成酵素 ユズ (配列番号 1 6) ; 5 - エピ - アルストロチェン タバコ (配列番号 1 5) ; 5 - エピ - アリストロチェン トウガラシ (配列番号 1 6) ; ベチスピラジエン ジャガイモ (配列番号 1 7) ; ベチスピラジエン ヒヨスシウムス・ムチクス (配列番号 1 8) ; - カジネン キダチワタ (配列番号 1 9) ; アモルファ - 4 , 1 1 - ジエン クソニンジン (配列番号 2 0) ; エピ - セドロール クソニンジン (配列番号 2 1) ; - フムレン グランドファー (配列番号 2 2)) 並びに推測された縮重プライマーの配列 (T p s V F 1 (配列番号 2 3) ; T p s V F 2 (配列番号 2 4) ; T p s V R 3 (配列番号 2 5) ; T p s C F 1 (配列番号 2 6) ; T p s C F 2 (配列番号 2 7) ; T p s C R 3)) 各アライメントの下にある矢印は縮重プライマーの設計に使用したアライメントの領域とその方向を示している。

10

【 0 0 2 0 】

図 5 : グレープフルーツの全 RNA での RT - PCR によって得られた増幅産物から推測されたアミノ酸配列のアライメント (G F T p s A (配列番号 2 9) ; G F T p s B (配列番号 3 0)) 及び G F T p s C (配列番号 3 1)) 。

【 0 0 2 1 】

図 6 : グレープフルーツ由来のセスキテルペン合成酵素 G F T p s A (部分的クローン) (配列番号 3 2) 、 G F T p s B (配列番号 3) 、 G F T b s C (配列番号 1) 、 G F T p s D 1 (配列番号 4) 、 G F T p s D 2 (配列番号 5) 及び G F T p s E (配列番号 2) のアミノ酸配列アライメント。

20

【 0 0 2 2 】

図 7 : 組み換えグレープフルーツセスキテルペン合成酵素によって産生されるセスキテルペンの GC プロファイル。

【 0 0 2 3 】

図 8 : 以下のそれぞれのアミノ酸及びヌクレオチドの配列 : (a) G F T p s A (配列番号 3 2 及び配列番号 3 3) 、 (b) G F T p s B (配列番号 3 及び配列番号 8) 、 (c) G F T b s C (配列番号 1 及び配列番号 6) 、 (d) G F T p s D 1 (配列番号 4 及び配列番号 9) 、 (e) G F T p s D 2 (配列番号 5 及び配列番号 1 0) 並びに (f) G F T p s E (配列番号 2 及び配列番号 7) 。

30

【 0 0 2 4 】

発明の記載

テルペンは、非環式又は環式であってよいイソブレン単位 (C_5H_8) を基礎とする不飽和炭化水素である。テルペン誘導体は、制限されないが、例えばカンファー、メントール、テルピネオール及びボルネオール、ゲラニオールである。本願で使用されるテルペン又はテルペノイドは、例えばテルペン及びテルペン誘導体であり、例えば 1 段階以上の官能化工程、例えばヒドロキシル化、異性体化、酸化還元又はアシル化がなされた化合物である。本願で使用される場合に、セスキテルペンは C_{15} 構造を基礎とするテルペンであり、かつ例えばセスキテルペン及びセスキテルペン誘導体、例えば 1 段階以上の官能化工程、例えばヒドロキシル化、異性体化、酸化還元又はアシル化がなされた化合物である。

40

【 0 0 2 5 】

本願で使用される場合に、誘導体は、公知の又は仮想的な化合物から得られ、かつ親物質の必須構成を有する任意の化合物である。

【 0 0 2 6 】

本願で使用される場合には、セスキテルペン合成酵素はセスキテルペンの合成を触媒する任意の酵素である。

【 0 0 2 7 】

表現 “ 同一 ” 、 “ 実質的に同一 ” 又は “ 実質的に示された ” とは、関連配列が所定の配

50

列に少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であることを意味する。例としては、かかる配列はアレル変異体、様々な種から得られた配列であってよく、又はこれらの配列は所定の配列から欠損、欠失、アミノ酸置換又は付加によって得ることもできる。ポリペプチドに関しては、比較配列の長さは一般に少なくとも20アミノ酸、30アミノ酸、50アミノ酸、100アミノ酸又はそれ以上のアミノ酸である。核酸に関しては、比較配列の長さは一般に少なくとも20ヌクレオチド、100ヌクレオチド、150ヌクレオチド、300ヌクレオチド又はそれ以上のヌクレオチドである。2つの配列間の同一性のパーセンテージは標準的なアライメントアルゴリズム、例えばAltschulら(1990年) J.Mol.Biol., 215:403-410に記載されるBasic Local Alignment Tool (BLAST)、Needlemanら(1970年) J.Mol.Biol., 48:444-453のアルゴリズム又はMeyersら(1988年) Comput.Appl.Bio sci., 4:11-17のアルゴリズムによって測定される。

10

【0028】

このように本発明は、一実施態様では、(a)配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9又は配列番号10に実際に示されるヌクレオチド配列を有する核酸；(b)配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4又は配列番号5に実際に示されるポリペプチドをコードする核酸並びに(c)低いストリンジェンシー条件下に(a)又は(b)の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である単離された核酸を提供する。一実施態様において、規定の条件は中程度のストリンジェンシー条件であり、そして更なる実施態様では高いストリンジェンシー条件である。

20

【0029】

本願で使用される場合に、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素であるかどうかは、本願実施例に記載される酵素特徴付けアッセイによって測定される。

【0030】

本願で使用される場合に、一定の条件下でのハイブリダイゼーション又はその条件下でハイブリダイズするという用語は、互いに顕著な同一性又は相同性を示すヌクレオチド配列が互いに結合した状態にあるハイブリダイゼーション及び洗浄のための条件を説明することを意図している。前記条件は、少なくとも約70%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約85~90%の同一性を示す配列が互いに結合した状態にある条件であってよい。低いストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー及び高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の定義は本願で提供されている。

30

【0031】

適切なハイブリダイゼーション条件は最低限の実験、例えばSambrookら(1989年) Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Press、第7章、第9章及び第11章に例示される実験により当業者によって選択できる。更に、ストリンジェンシー条件は、Sambrookら(1989年) Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Press、第7章、第9章及び第11章に記載されている。本願で使用される場合に、低いストリンジェンシーの規定の条件は以下のとおりである。DNAを含有するフィルタを、35%のホルムアミド、5×SSC、50mMのトリス塩酸(pH7.5)、5mMのEDTA、0.1%のPVP、0.1%のフィコール、1%のBSA及び500µg/mlの変性サケ精子DNAを含有する溶液中で40において6時間前処理する。ハイブリダイゼーションは、同じ溶液中であるが以下の変更を加えて実施する：0.02%のPVP、0.02%のフィコール、0.2%のBSA、100µg/mlのサケ精子DNA、10%(質量/容量)のデキストラン硫酸及び5~20×10⁶の³²P標識されたプローブを使用する。フィルタをハイブリダイゼーション混合物中で18~20時間40でインキュベートし、次いで2×SSC、25mMのトリス塩酸(pH7.4)、5mMのEDTA及び0.1%のSDSを含有する溶液中で1.5時間55で洗浄する。洗浄溶液を新鮮な溶液と取り替え、そして更に60で1.

40

50

5時間インキュベートする。フィルタをプロットドライし、そしてオートラジオグラフィーのために露出する。

【0032】

本願で使用される場合に、中程度のストリンジェンシーの規定の条件は以下のとおりである。DNAを含有するフィルタを、35%のホルムアミド、5×SSC、50mMのトリス塩酸(pH7.5)、5mMのEDTA、0.1%のPVP、0.1%のフィコール、1%のBSA及び500µg/mlの変性サケ精子DNAを含有する溶液中で50において7時間前処理する。ハイブリダイゼーションは、同じ溶液中であるが以下の変更を加えて実施する：0.02%のPVP、0.02%のフィコール、0.2%のBSA、100µg/mlのサケ精子DNA、10%(質量/容量)のデキストラン硫酸及び5~2

10

0×10⁶の³²P標識されたプローブを使用する。フィルタをハイブリダイゼーション混合物中で30時間50でインキュベートし、次いで2×SSC、25mMのトリス塩酸(pH7.4)、5mMのEDTA及び0.1%のSDSを含有する溶液中で1.5時間55で洗浄する。洗浄溶液を新鮮な溶液と取り替え、そして更に60で1.5時間インキュベートする。フィルタをプロットドライし、そしてオートラジオグラフィーのために露出する。

【0033】

本願で使用される場合に、高いストリンジェンシーの規定の条件は以下のとおりである。DNAを含有するフィルタのプレハイブリダイゼーションを、6×SSC、50mMのトリス塩酸(pH7.5)、1mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のフィコール、0.02%のBSA及び500µg/mlの変性サケ精子DNAから構成されるバッファー中で60において8時間から一晩で実施する。フィルタを、100µg/mlの変性サケ精子DNA及び5~20×10⁶cpmの³²P標識されたプローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合物中で65で48時間ハイブリダイズさせる。フィルタの洗浄は、2×SSC、0.01%のPVP、0.01%のフィコール及び0.01%のBSAを含有する溶液中で37において1時間実施する。これに引き続き0.1×SSC中で50において45分間洗浄する。

20

【0034】

この分野でよく知られる低いストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー及び高いストリンジェンシーの他の条件(例えば種間ハイブリダイゼーションについて使用される場合)は、前記の条件が不適切であれば(例えば種間ハイブリダイゼーションについて使用される場合)使用してよい。

30

【0035】

一実施態様では、本発明の核酸及び/又はポリペプチドは柑橘類、例えばグレープフルーツ又はオレンジから単離される。特定の一実施態様では、本発明は一定の単離されたヌクレオチド配列、例えば内在不純物質を実質的に含まない単離されたヌクレオチド配列に関する。用語“核酸”又は“核酸分子”は、一本鎖又は二本鎖の形のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを示し、そして特に限定がなければ、天然のヌクレオチドと同様に機能しうる天然ヌクレオチドの公知のアナログを含む。また“ヌクレオチド配列”は、個々の断片の形の又はより大きな核酸の構成要素としてのポリヌクレオチド分子又はオリゴヌクレオチド分子を示す。またヌクレオチド配列又は分子は“ヌクレオチドプローブ”とも呼ばれることがある。幾つかの本発明の核酸分子は、少なくとも一回、実質的に純粋な形で、かつ標準的な生化学的手法によりヌクレオチド配列成分の同定、操作及び回収が可能な量又は濃度で単離されたDNA又はRNAから誘導される。かかる方法、例えば本願で使用できるPCRプロトコールのための方法は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1989年)、F.A. Ausubelらにより編集されたCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc.(1987年)、及びInnis, Mら編、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press(1990年)に開示されている。

40

50

【 0 0 3 6 】

本願で記載される場合に、本発明の核酸分子は、例えば一本鎖又は二本鎖の両者の形の DNA 並びにそれらの相補 RNA である。DNA は、例えば cDNA、ゲノム DNA、化学合成 DNA、PCR によって増幅された DNA 及びその組合せである。翻訳される領域、非翻訳領域及び調節領域を含むゲノム DNA は、慣用の技術によって、例えば本発明の任意の cDNA の 1 つ又はその適当な断片をプローブとして用いて単離して、ゲノム DNA の一部を同定し、次いで通常この分野で知られる方法を用いてクローニングできる。一般に本発明の範囲内での核酸分子は、例えば本発明の配列に、前記の、かつ本発明の配列の DNA 対の融解温度の 5 未満、10 未満、15 未満、20 未満、25 未満又は 30 未満のハイブリダイゼーション及び洗浄条件下に、例えばこれらの範囲内に含まれる任意の範囲の条件下にハイブリダイズする配列である。

10

【 0 0 3 7 】

別の実施態様では、本発明の核酸は、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 に実質的に示された配列を有する。一実施態様では、核酸は、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 のヌクレオチドに少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である。一実施態様では、核酸は、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 のヌクレオチド配列を有する。更なる一実施態様では、核酸はセスキテルペン合成酵素であるタンパク質をコードし、これは例えば実施例に記載される酵素アッセイで裏付けられている。一実施態様では、該核酸は配列番号 1 又は配列番号 2 に実質的に示されたポリペプチドをコードする。異種間で保存された領域を有する核酸も提供される。

20

【 0 0 3 8 】

なおも別の実施態様では、核酸は、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 の少なくとも 50 個、100 個、250 個、500 個、750 個の連続ヌクレオチドの連続配列を有する。これらのヌクレオチドのかかる連続断片は、突然変異配列が本来の配列の機能を保持し、かつ低い又は高いストリンジェンシー条件、例えば中程度又は高いストリンジェンシー条件下に前記のヌクレオチドにハイブリダイズする能力を保持する限りは少なくとも 1 つの突然変異を有してもよい。かかる断片は、例えば配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 又は配列番号 10 のヌクレオチド (nt) 200 ~ nt 1600、nt 800 ~ nt 1600、nt 1000 ~ nt 1600、nt 200 ~ nt 1000、nt 200 ~ nt 800、nt 400 ~ nt 1600 又は nt 400 ~ nt 1000 から得ることができる。

30

【 0 0 3 9 】

前記のように、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドは本発明に含まれる。本発明の単離された核酸は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸から選択してよい。一実施態様では、ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 と少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である。

【 0 0 4 0 】

一実施態様では、本発明のポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に示されたアミノ酸配列を有する。有利には、本発明のポリペプチドは配列番号 1 又は配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有する。別の実施態様では、ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に実質的に示されたアミノ酸配列を有する。更なる別の実施態様では、ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又は配列番号 5 に少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一である。一実施態様では、ポリペプチドはセスキテルペン合成酵素であり、これは、例えば以下に記載される酵素アッセイにおいて裏付けられている。

40

【 0 0 4 1 】

1 以上のコドンが同じアミノ酸をコードできるという遺伝コードの縮重のゆえに、複数

50

のDNA配列が同じポリペプチドをコードできる。かかる変異DNA配列は、遺伝的浮動又は人工操作（例えばPCR増幅の間に又は本来の配列の故意の突然変異誘発の産物として生じる）から得ることができる。このように本発明は、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9又は配列番号10から得られるタンパク質をコードしうる任意の核酸又はその変異体を含む。

【0042】

本来の配列の故意の突然変異誘発は、この分野でよく知られる多数の技術を用いて実施できる。例えば、オリゴヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発手法を使用でき、その際特に、遺伝子を、予め決められた制限ヌクレオチド又はコドンが置換、欠失又は挿入によって改変されるように突然変異させることが望ましい。かかる改変をもたらす方法の例は、Walderら（Gene 42: 133, 1986）；Bauerら（Gene 37: 73, 1985）；Craik（BioTechniques, January 12-19, 1985）；Kunkel（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488, 1985）；Kunkelら（Methods in Enzymol. 154: 367, 1987）；及び米国特許第4,518,584号及び同第4,737,462号によって開示されている。

【0043】

一実施態様では、本発明は単離されたポリペプチドを提供している。本願で使用される場合に、用語“ポリペプチド”は、本願に定義されるアミノ酸を包含するポリペプチド又はペプチド断片の類型並びにより小さい断片を示す。選択的に、ポリペプチドは、本発明の核酸配列によってコードされる任意のペプチドに対する抗原性関連の点で定義することができる。このように一実施態様では、本発明の範囲内でのポリペプチドは、本発明の核酸配列によってコードされる任意のペプチドと共通する線状又は三次元のエピトープを含むアミノ酸配列として定義される。選択的に、本発明の範囲内でのポリペプチドは、本発明の核酸によってコードされる任意のペプチドを特異的に認識する抗体によって認識される。抗体は、これらが本発明のポリペプチドと約 $10^7 M^{-1}$ 以上の K_a 、例えば $10^8 M^{-1}$ 以上の K_a で結合する場合に特異的な結合であると定義される。

【0044】

本願で呼称されるポリペプチド“変異体”とは、本来のポリペプチドと実質的に相同であるが、1つ以上の欠失、挿入又は置換のため本発明の任意の核酸配列によってコードされる配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。

【0045】

変異体は、保存的に置換された配列を含むことがあり、これは所定のアミノ酸前記が類似の生理化学的特徴を有する残基によって交換されていることを意味する。保存的置換の例は、例えばある脂肪族残基を別の脂肪族残基に置換すること、例えばIle、Val、Leu又はAlaを別の1つに置換すること、又はある極性残基を別の極性残基に置換すること、例えばLysとArg；GluとAsp；又はGlnとAsnの間での置換である。Zubay, Biochemistry, Addison-Wesley Pub.Co., (1983)を参照のこと。かかる置換の効果は、Altschul（J. Mol. Biol. 219: 555-65, 1991）で議論されるPAM-120、PAM-200及びPAM-250のような置換スコア行列を用いて計算できる。他のかかる保存的置換、例えば類似の疎水特性を有する全領域の置換はよく知られている。

【0046】

天然に存在するペプチド変異体も本発明に含まれる。かかる変異体の例は、選択的なmRNAスプライシング事象又は本願に記載されるポリペプチドのタンパク質分解から得られるタンパク質である。タンパク質分解を原因とする変異は、例えば種々の宿主細胞型で発現されることによるN末端又はC末端における差異であり、これは1つ以上の末端アミノ酸が本発明の配列によってコードされるポリペプチドからタンパク質分解により除去されることによるものである。

【0047】

本発明のセスキテルペン合成酵素の変異体を用いることで、所望の増強された又は減衰された酵素活性、変更された位置化学性又は立体化学性又は変更された基質利用性又は生

10

20

30

40

50

成物分布を達成することができる。変異体又は部位特異的突然変異体は、この分野で公知の任意の方法によって作成してよい。

【0048】

前記のように、本発明は組み換え及び非組み換えの、例えば柑橘類植物から単離された及び精製されたポリペプチドを提供する。本来のポリペプチドの変異体及び誘導体は、天然に存在する変異体を単離するか、又は変異体のヌクレオチド配列、他のもしくは同じ植物株又は植物種のヌクレオチド配列を単離することによって、又は本来の柑橘類のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の人工的にプログラムされた突然変異によって得ることができる。本来のアミノ酸配列の改変は、多くの任意の慣用の方法によって達成できる。突然変異は、特定の遺伝子座で、突然変異配列とそれに隣接して本来の配列の断片にライゲーションが可能な制限部位を有するオリゴヌクレオチドを合成することによって導入できる。ライゲーションの後に、得られた再構築された配列は、所望のアミノ酸挿入、置換又は欠失を有するアナログをコードする。選択的に、オリゴヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発の手法を用いて、予め決められたコドンが置換、欠失又は挿入によって改変されていてよい改変された遺伝子が提供される。

10

【0049】

一実施態様では、本発明は本発明の核酸を有するベクターを考慮している。例えば、ベクターは、(a)配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9又は配列番号10に実際に示されるヌクレオチド配列を有する核酸；(b)配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4又は配列番号5に実際に示されるポリペプチドをコードする核酸並びに(c)低いストリンジェンシー条件下に(a)又は(b)の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である少なくとも1つの核酸を有する。

20

【0050】

本願で使用されるベクターは、任意の組み換えベクター、制限されないが例えばウイルスベクター、バクテリオファージ及びプラスミドである。

【0051】

本発明の核酸配列を有する組み換え発現ベクターは、よく知られた方法を用いて調製できる。一実施態様では、発現ベクターは、適当な転写調節ヌクレオチド配列又は翻訳調節ヌクレオチド配列、例えば哺乳動物、微生物、ウイルス又は昆虫の遺伝子から得られたものに機能的に結合されたポリペプチドをコードするcDNA配列を含む。調節配列の例は、例えば転写プロモーター、オペレーター又はエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、及び転写と翻訳の開始及び終結を調節する適切な配列である。ヌクレオチド配列は、調節配列が本発明のcDNA配列に機能的に対応づけられている場合に“機能的に結合”されている。このように、プロモーターのヌクレオチド配列は、プロモーターのヌクレオチド配列がcDNA配列の転写を調節する場合にcDNA配列に機能的に結合されている。所望の宿主細胞中での、通常は複製起点によって与えられる複製能及び形質転換体を同定する選択遺伝子は、発現ベクターに付加的に導入されてよい。

30

【0052】

付加的に、本発明のポリペプチドと本来関連がない好適なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクターに導入してもよい。例えばシグナルペプチド(分泌リーダー)のためのDNA配列を枠内で本発明のヌクレオチド配列に融合してよく、結果として本発明のポリペプチドは該シグナルペプチドを有する融合タンパク質として翻訳される。意図される宿主細胞中で機能的なシグナルペプチドは、発現されるポリペプチドの細胞外分泌を促進する。該シグナルペプチドは、細胞からの分泌後にポリペプチドから分解されうる。

40

【0053】

本発明のポリペプチドのアミノ末端部及びカルボキシ末端部での付加的なペプチド配列の融合を用いて、ポリペプチドの発現を促進するか、又はタンパク質の精製において補助として使用することができる。

【0054】

50

一実施態様では、本発明は、例えば本発明の核酸を有する宿主細胞を含む。別の実施態様は、本発明のベクターを宿主細胞に導入することを含む組み換え宿主細胞の作成方法である。更なる一実施態様では、本発明の宿主細胞をポリペプチド産生条件下に培養することを含むポリペプチドの製造方法を考慮している。一実施態様ではそのポリペプチドが回収される。本発明の方法は、例えば少なくとも1種の本発明のセスキテルペン合成酵素の製造方法であって、本発明の核酸を有する宿主細胞を培養し、そして蓄積されたセスキテルペン合成酵素を回収することを含む方法である。

【0055】

本発明のポリペプチドの発現のために適当な宿主細胞は、例えば原核生物、酵母又は高等真核細胞である。細菌宿主、菌類宿主、酵母宿主及び哺乳動物細胞宿主で使用するために好適なクローニングベクター及び発現ベクターは、例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1985)に記載されている。無細胞翻訳系を用い、本願に開示されるDNA構築物から得られるRNAを使用して開示されたポリペプチドを製造することもできる。

10

【0056】

原核生物は、例えばグラム陰性又はグラム陽性の生物、例えば大腸菌又は桿菌である。形質転換のために適当な原核性宿主細胞は、例えば大腸菌、バシラス・サチリス、サルモネラ・チフィリウム及び、シュードモナス属、ストレプトマイセス属及びスタフィロコッカス属内の他の種々の種である。原核性宿主細胞、例えば大腸菌では、ポリペプチドは原核性宿主細胞における組み換えポリペプチドの発現を促すためにN-末端メチオニン残基を含んでよい。N-末端メチオニンは、発現された組み換えポリペプチドから分解してよい。

20

【0057】

原核性宿主細胞のために有用な発現ベクターの例は、例えば商業的に入手可能なプラスミド、例えばクローニングベクターpETプラスミド(ノバジェン、マジソン、WI、米国)又はpBR322(ATCC37017)から誘導されるベクターである。pBR322は、アンピシリン耐性及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を有し、従って形質転換された細胞の同定のための簡単な手段が提供される。pBR322を用いて発現ベクターを構築するために、適当なプロモーターと1つ以上の本発明のポリペプチドをコードするDNA配列をpBR322ベクターに挿入する。他の商業的に入手可能なベクターは、例えばpKK223-3(ファルマシアファインケミカル社、Uppsala、スウェーデン)及びpGEM-1(プロメガバイオテック、マジソン、WI、米国)である。他の商業的に入手可能なベクターは、例えば、タンパク質の発現のために特別に設計されたベクターであり、これらは、例えばマルトース結合タンパク質に融合されたタンパク質の発現に使用されるpMAL-p2及びpMAL-c2ベクター(ニューイングランドバイオラボ、Beverly, MA、米国)である。

30

【0058】

組み換え原核性宿主細胞発現ベクターに通常使用されるプロモーター配列は、例えばバクテリオファージT7プロモーター(Studier F.W. and Moffatt B.A., J.Mol.Biol. 189: 113, 1986)、p-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトースプロモーター系(Changら、Nature 275: 615, 1978;及びGoeddelら、Nature 281: 544, 1979)、トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddelら、Nucl.Acids Res. 8: 4057, 1980及びEP-A 36776号)及びtacプロモーター(Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p.412, 1982)である。特に有用な原核性宿主細胞発現系は、ファージPLプロモーター及びcI857ts易熱性リプレッサー配列を使用する。米国微生物系統保存機関("ATCC")から入手できるPLプロモーターの誘導体を導入するプラスミドベクターは、例えばプラスミドpHUB2(大腸菌株JMB9(ATCC37092)に内在)及びpPLc28(大腸菌RR1(ATCC53082)に内在)である。

40

【0059】

50

本発明のポリペプチドは、酵母宿主細胞、有利にはサッカロマイセス属（例えば *S. セレビシエ*）からの宿主細胞において発現させてもよい。他の酵母の属、例えば *ピチア* 又は *クルイベロマイセス*（例えば *K. ラクティス*）を使用してもよい。酵母ベクターは屢々、 2μ 酵母プラスミドからの複製起点配列、自律複製配列（ARS）、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列及び選択可能なマーカー遺伝子を有する。酵母ベクターのために好適なプロモーター配列は、例えばなかでも、メタロチオニン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（Hitzemanら、*J. Biol. Chem.* 255: 2073, 1980）又は他の解糖系酵素（Hessら、*J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149, 1968；及びHollandら、*Biochem.* 17: 4900, 1978）、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼのためのプロモーターである。酵母発現において使用するために適当な他のベクター及びプロモーターは、更にHitzemanのEP-A-73,657号又はFleerら、*Gene*, 107: 285-195 (1991)；及びvan den Bergら、*Bio/Technology*, 8: 135-139 (1990)に記載されている。別の代替物は、Russellら（*J. Biol. Chem.* 258: 2674, 1982）及びBeierら（*Nature* 300: 724, 1982）によって記載されるグルコース抑制性のADH2プロモーターである。酵母と大腸菌の両者において複製可能なシャトルベクターは、pBR322からの大腸菌における選択及び複製のためのDNA配列（Amp^r遺伝子及び複製起点）を前記の酵母ベクターに挿入することによって構築できる。

【0060】

本発明の一実施態様は、本発明の核酸を有する改変された非ヒト生物である。非ヒト生物及び/又は宿主細胞は、遺伝子移入のためにこの分野で知られる任意の方法、例えば輸送措置、例えば脂質及びウイルスベクター、裸のDNAの使用、エレクトロポレーション及び粒子媒介遺伝子移入によって改変してよい。一実施態様では、非ヒト生物は、植物、昆虫又は微生物である。

【0061】

例えば一実施態様では、本発明は、少なくとも1種のセスキテルペン合成酵素の製造方法であって、少なくとも1つの核酸を有する改変された宿主を、少なくとも1種のセスキテルペン合成酵素の産生に導く条件下に培養させることを含み、その際、前記の少なくとも1つの核酸が、(a)配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9又は配列番号10に実質的に示されたヌクレオチド配列を有する核酸；(b)配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4又は配列番号5に実質的に示されたポリペプチドをコードする核酸並びに(c)低いストリンジェンシー条件下に(a)又は(b)の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である方法を提供する。

【0062】

更なる一実施態様では、その宿主は、植物、例えばタバコ、動物又は微生物、また制限されないが例えば細菌細胞、酵母細胞、植物細胞及び動物細胞である。本願で使用される場合に、植物細胞及び動物細胞は、例えば植物及び動物を宿主として使用することを含む。例えば本発明の幾つかの実施態様では、発現は遺伝子改変された非ヒト生物において行われる。

【0063】

一実施態様では、哺乳動物又は昆虫の宿主細胞培養系を使用して、本発明の組み換えポリペプチドを発現させる。昆虫細胞における異種タンパク質の製造のためのバキュウロウイルス系は、Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6: 47 (1988)によって調査されている。また哺乳動物起源の樹立細胞株も使用できる。適当な哺乳動物宿主細胞株の例は、例えばサル腎臓細胞のCOS-7株（ATCC CRL 1651）（Gluzmanら、*Cell* 23: 175, 1981）、L細胞、C127細胞、3T3細胞（ATCC CCL 163）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞及びBHK（ATCC CRL 10）

細胞株及びMcMahanら (EMBO J. 10: 2821, 1991) によって記載されるアフリカミドリザル腎臓細胞株 C V 1 から得られる C V - 1 / E B N A - 1 細胞株 (A T C C C R L 1 0 4 7 8) である。

【 0 0 6 4 】

D N A を哺乳動物細胞に導入するための確立された方法は、記載されている (Kaufman, R.J. Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp.15-69)。商業的に入手可能な試薬、例えばリポフェクタミン (ギブコ / B R L) 又はリポフェクタミン - プラスを用いる付加的なプロトコールを使用して、細胞のトランスフェクションを行ってよい (Felgner ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417, 1987)。付加的に、エレクトロポレーションを使用して、慣用の手法、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、第1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)の手法を用いて哺乳動物細胞のトランスフェクションを行ってよい。安定な形質転換体の選択は、細胞毒性薬剤に対する耐性を用いて選択法として実施できる。Kaufmanら、Meth. in Enzymology 185: 487-511, 1990は、幾つかの選択計画、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) 耐性を記載している。D H F R 選択のために適当な宿主株は、D H F R に欠失がある C H O 株 D X - B 1 1 であってよい (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980)。D H F R の c D N A を発現するプラスミドは株 D X - B 1 1 に導入でき、そしてそのプラスミドを有する細胞だけが適当な選択培地中で増殖できる。

10

【 0 0 6 5 】

哺乳動物宿主細胞発現ベクターのための転写調節配列及び翻訳調節配列はウイルスゲノムから切り出すことができる。通常使用されるプロモーター配列及びエンハンサー配列はポリオーマウイルス、アデノウイルス2、シミアンウイルス40 (S V 4 0) 及びヒトのサイトメガロウイルスから得られる。S V 4 0 ウイルスゲノムから得られる D N A 配列、例えば S V 4 0 の起点、早期及び後期プロモーター、エンハンサー、スプライシング部位及びポリアデニル化部位を用いて、哺乳動物宿主細胞における構造遺伝子配列の発現のための他の遺伝子エレメントを提供できる。ウイルスの早期及び後期プロモーターは、その両者はウイルスゲノムから容易に、ウイルス複製起点も有する断片として得られるので有用である (Fiersら、Nature 273: 113, 1978; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990)。

20

30

【 0 0 6 6 】

遺伝子導入植物の作成についてこの分野で知られる幾つかの方法が存在する。これらは、制限されないが例えば：植物プロトプラストのエレクトロポレーション、リポソーム媒介形質転換、ポリエチレングリコール媒介形質転換、植物細胞のマイクロインジェクション及びウイルスを用いる形質転換である。一実施態様では、粒子衝撃による直接的な遺伝子移入が用いられる。

【 0 0 6 7 】

粒子衝撃による直接的な遺伝子移入は、植物組織の形質転換についての例を提供する。この技術では、D N A で被覆された粒子又は発射体が細胞の物理的障壁を通して打ち込まれる。粒子衝撃を用いて、D N A 被覆粒子により貫通可能な任意の標的組織中に D N A を導入できるが、安定な形質転換のためには、再生可能な細胞を使用することが必須である。一般に、その粒子は金又はタングステンからなる。該粒子は、通常この分野で知られる C a C l ₂ 又はエタノール沈殿法のいずれかを用いて D N A で被覆される。

40

【 0 0 6 8 】

D N A 被覆粒子はパーティクルガンから打ち込まれる。適当なパーティクルガンは、バイオドラボラトリーズ社 (Hercules, CA) から入手できる。粒子貫通は、種々のパラメータ、例えば爆発強度、粒径又は粒子が標的組織に到達するまでに経由せねばならない距離によって制御される。

【 0 0 6 9 】

粒子の被覆のために使用される D N A は、当該遺伝子に機能的に結合されたプロモータ

50

ーを有する当該遺伝子発現を駆動するのに適当な発現カセットを有してよい。

【0070】

粒子衝撃による直接的な遺伝子移入を実施する方法は、Tomesらに対する米国特許第5,990,387号に開示されている。

【0071】

一実施態様では、本発明のcDNAは、センスRNA又はアンチセンスRNAのいずれかを産生するように発現させてよい。アンチセンスRNAは、遺伝子によってコードされるmRNA(センスRNA)の逆相補である配列を有するRNAである。アンチセンスRNAの発現を駆動するベクターは、cDNAがプロモーターに関して“逆方向”で配置され、その結果、非コード鎖(コーディング鎖ではなく)が転写されるベクターである。アンチセンスRNAの発現を用いて、アンチセンスRNAに相補的なmRNAによってコードされるタンパク質の発現を下方調節することができる。アンチセンスRNAを産生するベクターを用いて、前記のように遺伝子導入植物を作成できる。

10

【0072】

一実施態様では、トランスフェクションされたDNAを非ヒト生物の染色体に組み込み、その結果、安定な組み換え系が得られる。この分野で公知の任意の染色体組み込み方法、制限されないが例えば、レコンビナーゼ媒介カセット交換(RMCE)、ウイルス部位特異的染色体挿入、アデノウイルスと前核注入を本発明の実施において使用してよい。

【0073】

本発明の更なる実施態様は、テルペノイド及びセスキテルペン化合物を、本発明のヌクレオチド及びポリペプチドを用いて製造する方法である。例としては、少なくとも1種のテルペノイドの製造方法であって、少なくとも1種の非環式のピロリン酸テルペン前駆体と、(a)配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9又は配列番号10に実際に示されるヌクレオチド配列を有する核酸；(b)配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4又は配列番号5に実際に示されるポリペプチドをコードする核酸並びに(c)低いストリンジェンシー条件下に(a)又は(b)の核酸にハイブリダイズする核酸から選択され、該核酸によってコードされるポリペプチドがセスキテルペン合成酵素である少なくとも1つの核酸によってコードされる少なくとも1種のポリペプチドとを接触させる方法がある。もう一つの例としては、少なくとも1種のテルペノイドの製造方法であって、少なくとも1種の非環式のピロリン酸テルペン前駆体と、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4又は配列番号5に実質的に示された少なくとも1種のポリペプチドとを接触させ、そして産生された少なくとも1種のテルペノイドを単離する方法がある。

20

30

【0074】

本願で使用される場合に、非環式のピロリン酸テルペン前駆体は、少なくとも1種のテルペン、制限されないが例えばゲラニルピロリン酸(GPP)、ファルネシルピロリン酸(FPP)及びゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)の産生への前駆体である任意の非環式のピロリン酸化合物である。

【0075】

一実施態様では、少なくとも1種のテルペノイドはセスキテルペンから選択される。一実施態様において、少なくとも1種の非環式のピロリン酸テルペン前駆体はファルネシルピロリン酸である。更なる一実施態様では、少なくとも1種のセスキテルペンは、ビシクロゲルマクレン((E,E)-3,7,11,11-テトラメチル-ビシクロ[8.1.0]ウンデカ-2,6-ジエン)、クベボール((1R,4S,5R,6R,7S,10R)-7-イソプロピル-4,10-ジメチルトリシクロ[4.4.0.0(1,5)]デカン-4-オール、パレンセン((+)-(1R)-1,2,3,5,6,7,8,8A-オクタヒドロ-7-イソプロペニル-1@、8A@-ジメチルナフタレン)、-クベベン、ゲルマクレンD及び-カジネン(1R,8AS)-1,2,3,5,6,8A-ヘキサヒドロ-1-イソプロピル-4,7-ジメチルナフタレン)から選択される(図2)。本発明のテルペノイドは、この分野で使用される任意の方法、制限されないが例えばクロマトグラフィー、抽出及び蒸留によって単離してよい。

40

50

【 0 0 7 6 】

一実施態様では、生成物の分布又は形成される実際上の生成物を、該合成酵素が非環式のピロリン酸テルペン前駆体、例えばファルネシルピロリン酸と接触するpHを変化させることによって改変してよい。一実施態様では、pHは7である。更なる一実施態様では、pHは7未満、例えば6、5、4及び3である。

【 0 0 7 7 】

また本発明の実施内では、セスキテルペン合成酵素の基質（例えばFPP）の高レベルの産生のための及び本発明の核酸を生物に導入するための基盤を構築するために使用される生物（例えば微生物又は植物）である。例えば、セスキテルペン合成酵素をコードする本発明の少なくとも1つの核酸は、FPPを産生する非ヒト生物に導入され、それによりFPPはセスキテルペンに変換され、そして引き続きセスキテルペンの代謝による産生がなされる。一実施態様では、このころは、セスキテルペンの高レベルの産生のための基盤をもたらす。

【 0 0 7 8 】

一実施態様では、本発明の核酸を使用して、セスキテルペン合成酵素をコードする他の核酸を作成できる。例えば本発明は、セスキテルペン合成酵素を同定する方法であって、本発明の核酸を用いてDNAライブラリーを構築し、少なくとも1種のセスキテルペン合成酵素をコードする核酸について該ライブラリーをスクリーニングすることを含む方法を提供する。本発明の核酸を使用するDNAライブラリーは、この分野で公知の任意の方法によって構築してよく、その際、DNA配列は出発点として本発明の核酸を用いて、例えば制限されないがDNAシャフリングで作成される。かかる方法において、該ライブラリーをセスキテルペン合成酵素について機能的アッセイを用いてスクリーニングして、セスキテルペン合成酵素をコードする標的核酸を見出してよい。セスキテルペン合成酵素の活性は、例えば本願に記載の方法を用いて分析してよい。一実施態様では、高処理量スクリーニングを用いて、コードされるポリペプチドの活性を分析する。

【 0 0 7 9 】

本願で使用される場合に、“ヌクレオチドプローブ”は、相補配列の標的核酸に1種以上の化学結合を介して、相補塩基対又は水素結合形成により結合可能なオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとして定義される。前記のように、オリゴヌクレオチドプローブは天然の塩基（すなわちA、G、C又はT）又は修飾塩基（7-デアザグアノシン、イノシンなど）を含んでいてよい。付加的にオリゴヌクレオチドプローブにおける塩基を、ホスホジエステル結合以外の結合によって、それがハイブリダイゼーションを抑制しない限りは結合させてよい。このようにオリゴヌクレオチドプローブは、ホスホジエステル結合ではなくペプチド結合によって結合された構成塩基を有してよい。

【 0 0 8 0 】

本願の“標的核酸”は、ヌクレオチドプローブ又は分子が特異的にハイブリダイズできる核酸を示している。該プローブは、標的核酸の存在又は不在及び標的核酸の量を測定するように設計される。標的核酸は、その標的に向けられる相応のプローブの核酸配列に相補的な配列を有する。当業者に理解されるように、プローブはまた、標的に特異的に結合しなくてよい付加的な核酸又は他の成分、例えば標識を有してもよい。核酸という用語は、プローブが向けられる大きな核酸の特定のヌクレオチド配列又は全配列（例えば遺伝子又はmRNA）を示してよい。当業者は、種々の条件下での完全な利用性を理解するはずである。

【 0 0 8 1 】

実施例又はそれ以外の指示を別として、成分の量を表す全ての数、反応条件、明細書及び特許請求の範囲で使用されるこれらは、全ての場合に“約”という用語によって変更されると解されるべきである。従って、それに対する指示がない限り、明細書及び特許請求の範囲に示される数値的なパラメータは近似値であり、これは本発明によって得られることが求められる所望の特性に依存して変更してよい。最少に見て、かつ特許請求の範囲の均等理論の適用の制限を試みることとしてではなく、各々の数値パラメータは有効数字

10

20

30

40

50

の見方で、かつ通常の丸めの手法で解釈すべきである。

【0082】

本発明の広い範囲で示される数的範囲及び数的パラメータは近似値であるが、特定の実施例に示される数値はできる限り正確なものとして報告される。しかしながら任意の数値は本質的に、そのそれぞれの試験測定で見られる標準偏差から必然的に生ずる一定の誤差を含む。以下の実施例は本発明を説明することを意図するもので、結果としてその範囲を制限するものではない。パーセンテージは質量に対するものである。

【0083】

以下の実施例は本発明を説明することを意図するもので、結果としてその範囲を制限するものではない。

【0084】

実施例

材料

グレープフルーツ (*Citrus paradisi*) のフラベドを実施例に記載される実験のための出発物質として使用した。そのフラベド (外側の果皮の有色部分) はテルペン合成の部位である油腺を有する。グレープフルーツのフラベドはシモーネガット (Simone Gatto) (シシリー) で摘み取られたばかりの成熟果実から調製した。フラベド (3 ~ 4 mm 厚) を切り取り、直ちに凍結させ、かつ変質を回避するために輸送の間中及び全ての後続工程の間中凍結させたままにした。

【0085】

実施例 1 : セスキテルペン合成酵素の cDNA の RT - PCR を用いた単離

植物のセスキテルペン合成酵素の推測されたアミノ酸配列のアライメントを行い、保存された領域を同定し、そして植物のセスキテルペン合成酵素特異的なオリゴヌクレオチドを設計した。より良好な配列相同性を得るために、これらの配列を 2 つの群に分けた (図 4)。第一の群は、トマト栽培品種 VFNT cherry 由来のゲルマクレン C 合成酵素 (Colby ら、1998 年)、セイヨウハッカ由来の (E) - - フェルネセン合成酵素 (Crock ら、1997 年)、グランドファー由来の - セリネン合成酵素 (Steele ら、1998 年)、ユズ由来のセスキテルペン合成酵素 (Gen Bank アクセション番号 AF288465)、タバコ由来 (Facchini and Chappell、1992 年) 及びトウガラシ由来 (Back ら、1998 年) の 5 - エピ - アリストロチエン合成酵素、ジャガイモ由来及びヒヨスシラムス・ムチクス由来 (Back and Chappel、1995 年) のベチスピラジエン合成酵素の配列を含む。第二の群は、キダチワタ由来 (Chen ら、1995 年) の (+) - 8 - カジネン合成酵素、クソニンジン由来のエピ - セドロール合成酵素 (Merck ら、1999 年) 及びグランドファー由来 (Steele ら、1998 年) の - フムレン合成酵素の配列を含む。最も高い配列相同性は配列の中央部に見出された。十分に保存されたアミノ酸を有する 3 つの領域を選択し、そしてこれらの領域に特異的な縮重オリゴヌクレオチドを設計した (すなわち 2 つのフォワードプライマーと 1 つのリバースプライマーをそれぞれのアライメントから推定した) (図 4)。

【0086】

RT - PCR を高温ホウ酸塩技術 (Hot Borate technique) によって調製されたグレープフルーツのフラベドからの全 RNA を用いて実施した。全 RNA 抽出のための高温ホウ酸塩技術は、Wan と Wilkins (Wan ら (1994 年) Anal. Biochem. 223, 7-12) から改変した。組織を、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で微粉末に粉砕した。その粉末を、80 に予熱された 5 ml の抽出緩衝液 (200 mM のホウ酸塩、30 mM の EGTA、10 mM の DTT、1% の SDS、1% のデオキシコール酸ナトリウム、2% の PVP、0.5% のノニデット NP - 40) に添加した。該混合物をウルトラツラックス (Ultraturax) (商標) ホモジナイザを用いて均質化し、そして 2 層のミラクロス (Miracloth) (商標) フィルタ (カルピオケム) を通して濾過した。該混合物を 0.5 mg/ml のプロテイナーゼ K (タンパク質 / リボヌクレアーゼ消化のため) の存在下に 42 で 90 分間インキュベートした。次いで KCl を 1 M の最終濃度にまで添加し、氷上で 1 時間インキュベ

10

20

30

40

50

トした後に、該混合物を10000g及び4℃で10分間遠心分離器に入れた。上清を回収し、そして1/3容量の8MのLiClを添加した。該混合物を4℃で一晩インキュベートし、そして10000g及び4℃で20分間遠心分離器中に入れた。上清を廃棄し、そしてペレットを2MのLiClで洗浄し、そして前記と同様に再度遠心した。次いでペレットをRNアーゼ不含の蒸留水中に再懸濁し、そして0.15容量の2Mの酢酸カリウム溶液と2.5容量の無水エタノールを添加した。RNAを-20℃で2時間インキュベートすることにより沈殿させ、そして前記と同様に遠心分離によりペレット化させた。そのRNAペレットを80%のエタノールで洗浄し、そしてRNアーゼ不含の蒸留水中に再懸濁した。

【0087】

RNAの濃度を260nmでのODから見積もった。RNAの完全性を、アガロースゲル上でリボソームRNAバンドの完全性の検査により評価した。

【0088】

RT-PCRを、キアゲン社製のOneStepRT-PCRキットとエッペンドルフ社製のマスターサイクラーグラジエント型のサーマルサイクラーを用いて実施した。典型的な反応混合物は、10μlの5xキアゲン社製OneStepRT-PCR緩衝液、400μMの各dNTP、400nMの各プライマー、2μlのキアゲン社製のOneStepRT-PCR酵素ミックス、1μlのRNasinX（登録商標）リボヌクレアーゼ阻害剤（プロメガ社）及び1μgの全RNAを最終容量50μl中に有していた。サーマルサイクラー条件は50℃で30分間（逆転写）；95℃で15分間（DNAポリメラーゼ活性化）；94℃で45秒間、42~45℃で10秒間（使用されるプライマーによる）、72℃で45~90秒間（増幅されるべきDNA断片のサイズによる）を40周期；及び72℃で10分間であった。

【0089】

PCR産物のサイズを1%のアガロースゲル上で評価した。期待されたサイズに相当するバンドをゲルから切り出し、QIAquick（登録商標）ゲル抽出キット（キアゲン社）を用いて精製し、そしてpCR（登録商標）2.1-TOPOベクター中にTOPO-TAクローニングキット（インビトロジェン社）を用いてクローニングした。次いで挿入されたcDNAのDNA配列決定を行い、そして該配列をGenBankの重複のないタンパク質データベース（NCBI）に対しBLASTXアルゴリズム（Altschulら、1990年）を用いて比較した。

【0090】

期待された長さ（80~240塩基対のサイズ）を有するPCR産物のDNA配列決定及びBLAST検索による分析により、3種の異なるセスキテルペン合成酵素の断片が明らかになり、これらをGFTPsA、GFTPsB及びGFTPsCと名付けた。180塩基対のGFTPsA断片をプライマーTPsVF1とTPsVR3で増幅させ、115塩基対のGFTPsB断片をプライマーTPsVF2とTPsVR3で増幅させ、そして115塩基対のGFTPsA断片をプライマーTPsVF1とTPsVR3で増幅させた。推定されたアミノ酸配列により、これら3種の断片の間に大きな差異が明らかになった（図5）。

【0091】

実施例2：セスキテルペン合成酵素の5'/3'-RACEを用いた単離

セスキテルペン合成酵素の全長の配列を単離するために、まず5'/3'-RACE法を使用した。cDNAをMarathon（商標）cDNA増幅キット（クロンテック社）を用いて、かつ高温ホウ酸塩技術で調製された全RNAから精製された1μgのmRNAから出発して合成した。合成されたcDNAの量は少なく、本質的に小さいサイズのcDNAが得られた（平均サイズ0.5キロ塩基）しかしながら、このcDNAを用いて、GFTPsBとGFTPsCの3'末端を、遺伝子特異的なプライマーGFTPsBRF1とGFTPsBRF2をGFTPsBについて用い、そして遺伝子特異的プライマーGFTPsCRF1とGFTPsCRF2をGFTPsCについて用いて得た（第1表を参

10

20

30

40

50

照のこと)。チオシアン酸グアニジニウム/フェノール抽出により調製されたmRNAから、より高質の平均サイズ2キロ塩基を有するcDNAが得られ、これにより遺伝子特異的プライマーGFTpsCRR1とGFTpsRR2を用いるGFTpsCの5'末端配列の単離が可能となり、このクローンの全長配列が完成された。GFTpsBの5'末端とGFTpsAの5'末端及び3'末端は前記の手法により得られなかった。

【0092】

チオシアン酸グアニジニウム/フェノール抽出法は、ChomczynskiとSacchiによって記載されたThermoHybaid社製のRNA Clean (商標) 溶液を用いる技術に基づくものである(Chomczynski, P., and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159)。手短に言えば、2gの凍結組織を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で微粉末に粉砕した。該粉末を20mlのRNA Clean (商標) 溶液に移し、そして該懸濁液をウルトラツラックス (商標) ホモジナイザを用いて均質化し、かつミラクロス (商標) フィルタ (カルビオケム社) を通して濾過した。0.1容量のクロロホルムを添加した後に、該試験管を氷上に置き、そして12000g及び4'で20分間遠心分離した。上方の水相を回収し、そして1容量のイソプロパノールを添加した。-20'で20分間インキュベートした後に、試料を12000g及び4'で20分間遠心分離した。得られた多量の白色ペレットを70%エタノールで洗浄し、そして室温で乾燥させた。全RNAを含有するこのペレットを、オリゴdTセルロース親和性クロマトグラフィーによるmRNA精製をFastTrack (登録商標) 2.0 mRNA単離キット (インビトロジェン社) を用いて実施した。製造元のプロトコールに従うが、但し、溶解緩衝液中で全RNAを再懸濁した後に、試料を65'の代わりに100'で加熱した。

【0093】

cDNA末端の3'及び5'高速増幅をMarathon (商標) cDNA増幅キット (クロンテック社) を用いて実施した。該方法は、mRNAから出発する第一鎖cDNA合成を1つのオリゴ(dT)プライマーを用いて開始した。第二鎖合成の後に、特定のアダプターを二本鎖cDNA(ds cDNA)末端にライゲーションした。この方法により、アダプターとライゲーションされたds cDNAの未知のクローンライブラリーが得られた。精製されたグレープフルーツのmRNA(1µg)を出発材料として使用した。cDNAの質と量とをアガロースゲル上で評価した。

【0094】

特定のcDNAの3'末端又は5'末端をアドバンテージ (Advantage) (登録商標) 2ポリメラーゼミックスにより遺伝子特異的オリゴヌクレオチドとアダプター特異的なオリゴヌクレオチドとの組合せを用いて増幅させた。典型的なRACE反応混合物は、最終容量50µlにおいて、5µlの10×cDNA PCR反応緩衝液 (クロンテック社)、200nMの各dNTP、1µlのアドバンテージ (登録商標) 2ポリメラーゼミックス、200µMのアダプター特異的なプライマー (クロンテック社)、200µMの遺伝子特異的なプライマー (第1表を参照のこと) 及び5µlの50~250倍に希釈されたアダプターにライゲーションされたcDNAを含有していた。増幅は、エッペンドルフ社製のマスターサイクラーグラジエント型のサーマルサイクラーで実施した。熱周期条件は以下のとおりである: 94'で1分間、94'で30秒間と72'で2~4分間を5周期、94'で30秒間と70'で2~4分間を5周期、94'で30秒間と68'で2~4分間を20周期。必要であれば、二回目の増幅を、内側のアダプター特異的なプライマー (nested adaptor-specific primer) (クロンテック社) 及び内側の遺伝子特異的なプライマー (nested gene-specific primer) を用いて実施した。

【0095】

増幅産物を評価し、サブクローニングし、そしてRT-PCR産物に関して前述したように配列分析を行った。

【0096】

第1表: 3' / 5' - RACE実験で以下のプライマーを使用した:

【0097】

10

20

30

40

50

【表1】

名称	説明	配列 (5' to 3')
GFTpsARF1 (配列番号:34)	3'-RACE フォワードプライマー	CTGGGAGTGTCTATGAGCT CAATTTGG
GFTpsARF2 (配列番号35)	GFTpsA 3'-RACE フォワードネステッドプライマー	GTAGAATTTTTGCATCCAAAG TGGTGTGC
GFTpsARR1 (配列番号 36)	GFTpsA 5'-RACE リバースプライマー	CACACCACTTTGGATGCAAA AATTCATC
GFTpsARR2 (配列番号 37)	GFTpsA 5'-RACE リバースネステッドプライマー	CCAAATTGGGCTCATAGGAC ACTCCCAG
GFTpsBRF1 (配列番号38)	GFTpsB 3'-RACE フォワードプライマー	TAGGGACGTATTTTGAACCA AAGTAC
GFTpsBRF2 (配列番号 39)	GFTpsB 3'-RACE フォワードネステッドプライマー	AAATAATGACCAAAACAATTT ACACGG
GFTpsBRR1 (配列番号40)	GFTpsB 5'-RACE リバースプライマー	GCACTTTCATGTATTCTGGAA G
GFTpsBRR2 (配列番号41)	GFTpsB 5'-RACE リバースネステッドプライマー	GTTTGAGCTCTTCAAAGAAA CC
GFTpsCRF1 (配列番号 42)	GFTpsC 3'-RACE フォワードプライマー	AATGGGAGTGTATTTTGAGC CTCGATACTCC
GFTpsCRF2 (配列番号 43)	GFTpsC 3'-RACE フォワードネステッドプライマー	GATATTTTCCAAAGTAATTGC AATGGCATCC
GFTpsCRR1 (配列番号44)	GFTpsC 5'-RACE リバースプライマー	GTTGCTAATATCCCACCTTTT GATAGC
GFTpsCRR2 (配列番号45)	GFTpsC 5'-RACE リバースネステッドプライマー	AAGTGTGCCATAGGCGTCGT AGG
GFTpsDRR1 (配列番号46)	GFTpsD 5'-RACE リバースプライマー	CTGTTCCGCAAGCTTAGGGG TTACATG
GFTpsDRR2 (配列番号47)	GFTpsD 5'-RACE リバースネステッドプライマー	CTGAGCTACCAATGACTTCA GGTGAGTGG
GFTpsERR1 (配列番号 48)	GFTpsE 5'-RACE リバースプライマー	CAATTTTGCCATACACATCAT AGATATCATC
GFTpsERR2 (配列番号49)	GFTpsE 5'-RACE リバースネステッドプライマー	AACAGAAGTCATGGAGATCA CTTTCGTC
GFTpsERR3 (配列番号50)	GFTpsE 5'-RACE リバースプライマー	CGCAAGAGATGTTTTAAAGTT CCCATCC
GFTpsERR4 (配列番号51)	GFTpsE 5'-RACE リバースネステッドプライマー	TGAACATCAGCGGAAATTTTA TAGCC

【0098】

3 - R A C E により得られた部分的な G F T p s B の c D N A は、公共のデータベースで見出された推定のテルペン合成酵素の c D N A との高い配列同一性が明らかにされ、それをユズから単離した。このテルペン合成酵素の配列に特異的なプライマーを設計した：1対のフォワードプライマーとリバースプライマー（junosF1及びjunosR1）はユズのテルペン合成酵素の非コード領域に対して設計され、そして1対のフォー

10

20

30

40

50

ドプライマーとリバースプライマー (junos F 2 及び junos R 2) は開始コドンと停止コドンを含むコーディング領域中で設計された。グレープフルーツの Marathon (商標) cDNAライブラリーでプライマー junos F 1 と junos R 1 を用いる PCR によりアンプリコンは作製されなかった。junos F 2 及び junos R 2 プライマーを用いて 1.6 キロ塩基の断片が増幅された。DNA 配列決定により、この PCR 産物が GFTps B クローンの 1669 塩基対の全長セスキテルペン合成酵素であることが確認された。(図 6)。

【0099】

実施例 3 : cDNAライブラリーのスクリーニング及び EST 配列決定

PCR 法により得られた部分的クローンの全長 cDNA を得るために、グレープフルーツのフラベドの mRNA から作製された cDNAライブラリーを構築した。

10

【0100】

cDNA 合成及びライブラリーの構築を、Uni-ZAP (登録商標) XRライブラリー構築キット (ストラタジェン社) を用いて製造元のプロトコルに従って、7.5 µg のグレープフルーツのフラベドの mRNA (チオシアン酸グアニジニウム/フェノール法により調製した) から出発して実施した。そのライブラリーの本来の力価は 2×10^7 PFU (ブランク形成単位) であり、そして平均挿入サイズは 1.1 キロ塩基であった。

【0101】

2つの手法を用いて、該 cDNAライブラリーからセスキテルペン合成酵素をコードする cDNA を単離した: EST 配列決定及び DNAプローブを用いるスクリーニング。EST (発現配列タグ) 配列決定のために、ライブラリーの一部分を用いて、ストラタジェン社の多量切り出しプロトコル (mass excision protocol) に従って Uni-ZAP XRベクターから pBluescriptファージミドを切り出した。得られた形質転換された細菌コロニー (576) を無作為に拾い、そしてプラスミドを精製した。各クローンについて 1 回の配列決定反応を T3プライマーを用いて実施した。その配列をまず編集し、ベクター配列を除去し、そして該配列を GenBank の重複のないタンパク質データベース (NCBI) に対し BLASTX アルゴリズム (Altschulら、1990年) を用いて比較した。

20

【0102】

該ライブラリーをジゴキシゲニン (DIG) 標識 DNA プローブでスクリーニングした。DIG-dUTP を DNA断片中に PCR によって PCR DIG (ジゴキシゲニン) プローブ合成キット (ロシェ・ディアグノスティクス社) を用いてプローブを合成した。149 塩基対の GFTps A 由来の DNA プローブを、ライブラリーの一部分から、フォワードプライマー GFTps Apr o F (配列番号 52) (5'-ACGATTTAGGCCTTCCCTAAAGG-3') 及びリバースプライマー GFTps Apr o R (配列番号 53) (5'-TATTATGGAATATTATGCACACCAC-3') を用いて増幅させた。1036 塩基対の GFTps B 由来の DNA プローブを、pET-GFTps B 2-2 プラスミドから、フォワードプライマー junos F 2 (配列番号 54) (5'-AAATGTC CGCTCAAGTTCTAGCAACGG-3') 及びリバースプライマー GFTps BRR 2 (配列番号 41) を用いて増幅させた。1008 塩基対の GFTps C 由来の DNA プローブを、pET-GFTps C プラスミドから、フォワードプライマー GFTps C pet F 1 (配列番号 55) (5'-ATGGCACTTCAAGATTTCAGAAAGTTCC-3') 及びリバースプライマー GFTps CR 1 (配列番号 44) を用いて増幅させた。

30

40

【0103】

プローブを、5000 ~ 25000 PFU を有するプレートから調製されたブランクリフトに、40 で Dig Easy Hyb ハイブリダイゼーション溶液 (ロシェ・ディアグノスティクス社) 中でハイブリダイズさせた。プローブに標的されたハイブリッドをメンブレン上で検出することは、抗ジゴキシゲニンアルカリ性ホスファターゼ (ロシェ・

50

ディアグノスティクス社)を用いる化学発光によって実施し、そしてVersaDoc画像作製装置(バイオラド)で可視化させた。

【0104】

陽性シグナルからのファージを、寒天プレートから抜き出し、第二のスクリーニング、必要であれば第三のスクリーニングを行い、単一ブランクの陽性シグナルが得られた。陽性の単離物をインビボ切り出しし、そして挿入物を前記のように配列決定した。

【0105】

該ライブラリーを、GFTpsA、GFTpsB及びGFTpsCから作製されたDNAプローブを用いてスクリーニングした。この手法により、3種の異なるセスキテルペン合成酵素のcDNAが得られた。そのうち2種は今までに見出されていたクローンであった：第一のクローンはGF2-30-1と命名され、これはGFTpsCのcDNAの5末端300塩基対が欠損した形であり；第二のクローンは9-13-6と命名され、これはGFTpsAの部分的クローンであり、他のセスキテルペン合成酵素と比較した結果、その5末端で約168塩基対だけ欠損していた。クローン9-13-6は、RT-PCRによって得られた前記の部分的GFTpsAクローンと比較して618塩基対の付加的な5末端の配列情報を提供している。その3末端では、クローン9-13-6も不完全であった。約680ヌクレオチドを欠いており、そして機能が定義されない600塩基対の断片によって置換されている。GF2-5-11のスクリーニングによって得られた、第三のセスキテルペン合成酵素をコードするcDNAは新規のセスキテルペン合成酵素をコードし、これをGFTpsDと命名した。このクローンは5末端で欠損しているが、欠けている414塩基対は第1表に記載されるプライマーを用いる5'-RACEによって回復された。次いでその全長のGFTpsDをMarathon(商標)cDNAライブラリーから増幅させ、そして前記のように細菌性発現ベクターにクローニングした。幾つかの全長GFTpsDのcDNAのDNA配列の分析により、小さい配列差異を有する2種の密接に関連したセスキテルペン合成酵素が存在することが明らかとなり、これらをGFTpsD1とGFTpsD2と命名した(図6)。2種のこれらの変異体の推定されたアミノ酸配列は互いに4残基だけ異なっていた。

【0106】

EST配列決定法のために、576個のクローンの配列決定を行った。それらのうち、3つだけのクローンが推定上のテルペン合成酵素様タンパク質をコードし、そしてより厳密には2種の異なるセスキテルペン合成酵素様のタンパク質と1種のモノテルペン合成酵素様のタンパク質をコードしていた。2種のセスキテルペン合成酵素様のクローンの1つ(クローンGF002-G3)は上記で同定されたクローンGFTpsD1であった。第二のクローン(クローンGF006-G7)は新規のセスキテルペン合成酵素をコードする欠損したcDNAであり、これをGFTpsEと命名した。このクローンはまた5末端に欠損(約800塩基対だけ)があり、そしてその失われた断片は以下のように2段階の5'-RACEによって増幅できた。プライマーGFTpsERR1とGFTpsERR2(第1表を参照)を用いる第一の5'-RACEにより、500個の付加的な5末端ヌクレオチドが提供され、そしてプライマーGFTpsERR3とGFTpsERR4(第1表を参照)を用いる第二の5'-RACEにより、失われた5末端DNAが提供され、それにより全長GFTpsEのcDNAが再構築された(図6)。

【0107】

実施例4：プラスミドの構築と酵素発現

発現プラスミドの構築

該cDNAを、セスキテルペン合成酵素の機能的発現のためにpET11a発現プラスミド(ノバジェン社)にサブクローニングした。GFTpsB、GFTpsD及びGFTpsEのために、全長のcDNAをPCRによって増幅させ、開始コドンを含めて5末端にNdeI部位を導入し、そして3末端で停止コドン直後にBamHI部位を導入した。GFTpsBについては、フォワードプライマーGFTpsBNdeI(配列番号56)5'-GCA T G T T C C A T A T G T C C G C T C A A G T T C T A G C A A C G

10

20

30

40

50

G T T T C C - 3 (N d e I 部位はイタリックで、開始コドンは下線を引いた) 及びリ
 バースプライマー G F T p s B B a m (配列番号 5 7) 5 - C G C G G A T C C T C A
 G A T G G T A A C A G G G T C T C T G A G C A C T G C - 3 (B a m H I 部位はイ
 タリックで、開始コドンは下線を引いた) を使用した。同様に、フォワードプライマー G
 F T p s D N d e 1 (配列番号 5 8) 5 - G C A T G T T C C A T A T G T C G T C T
 G G A G A A A C A T T T C G T C C - 3 及びリバースプライマー G F T p s D B a m
 (配列番号 5 9) 5 - C G C G G A T C C T C A A A A T G G A A C G T G G T C T C
 C T A G - 3 を G F T p s D のために使用し、そしてフォワードプライマー G F T p s
 E N d e 1 (配列番号 6 0) 5 - G C A T G T T C C A T A T G T C T T T G G A A G
 T T T C A G C C T C T C C T G - 3 及びリバースプライマー G F T p s E B a m (配
 列番号 6 1) 5 - C G C G G A T C C T C A T A T C G G C A C A G G A T T A A T A
 A A C A A A G A A G C - 3 を G F T p s E のために使用した。

【 0 1 0 8 】

増幅は、P f u DNAポリメラーゼ(プロメガ)を用いて、5 μ l の P f u DNA ポ
 リメラーゼ 1 0 \times 緩衝液、2 0 0 μ M の各 d N T P、0 . 4 μ M の各フォワードプライマ
 ー及びリバースプライマー、2 . 9 単位の P f u DNAポリメラーゼ及び 5 μ l の 1 0
 0 倍希釈された c D N A (前記のように M a r a t h o n (商 標) c D N A 増幅キット (ク
 ロンテック社) を用いて調製した) を含有する 5 0 μ l の最終容量で実施した。熱周期
 条件は以下のとおりである : 9 5 で 2 分間 ; 9 5 で 3 0 秒間、5 5 で 3 0 秒間及び
 7 2 で 4 分間を 2 5 周期 ; 及び 7 2 で 1 0 分間。P C R 産物をアガロースゲル上で精
 製し、Q I A q u i c k (登録商標) ゲル抽出キット (キアゲン社) を用いて溶出させ、
 N d e I 及び B a m H I で消化し、そして同様に消化された p E T 1 1 a プラスミド中に
 ライゲーションした。

【 0 1 0 9 】

G F T p s C - p E T 1 1 a 発現ベクターの構築のために、2 つの別個の P C R を用い
 て、N d e I と B a m H I 接着端に隣接した挿入物を作製した。第一の P C R は前記と同
 じ条件中で、フォワードプライマー G F T p s C p E T F 1 (配列番号 6 2) 5 - T A
 A T G G C A C T T C A A G A T T C A G A A G T T C C T C - 3 及びリバースプライ
 マー G F T p s C p E T R 1 (配列番号 6 3) 5 - A A A A G G G A A C A G G C T T
 C T C A A G C A A T G - 3 を用いて行い、そして第二の P C R を、フォワードプライ
 マー G F T p s C p E T F 2 (G F T p s C p E T F 1 と比較して 5 末端で A T だけ短
 い) (配列番号 6 4) 5 - A T G G C A C T T C A A G A T T C A G A A G T T C C T
 C - 3 及びリバースプライマー G F T p s C p E T R 2 (G F T p s C p E T R 1 と比
 較して 5 末端で G A T C だけ長い) (配列番号 6 5) 5 - G A T C A A A A G G G A
 A C A G G C T T C T C A A G C A A T G - 3 を用いて実施した。2 種の P C R 産物を
 前記のように精製し、合し、5 分間煮沸することによって変性させ、そして氷上で 5 分間
 冷却した。得られた c D N A を、p E T 1 1 a プラスミド中にライゲーションするために
 直接使用した。

【 0 1 1 0 】

ライゲーション産物をまず J M 1 0 9 大腸菌細胞中に形質転換させ、そしてその構築物
 を制限消化と DNA 配列決定によって検査した。セスキテルペン合成酵素の発現

タンパク質発現のために、セスキテルペン合成酵素の c D N A と空の p E T 1 1 a プラ
 スミドを有する p E T 1 1 a プラスミドを B L 2 1 (D E 3) 大腸菌細胞 (ノバジェン社
) 中に形質転換させた。単独のコロニーを用いて、5 m l の L B 培地に接種した。3 7
 で 5 ~ 6 時間インキュベートした後に、その培養を 2 0 のインキュベーターに移し、そ
 して平衡化のために 1 時間置いた。次いでタンパク質の発現を 0 . 5 m M の I P T G の添
 加によって誘導し、そして培養を 2 0 で一晩インキュベートした。

【 0 1 1 1 】

翌日、細胞を遠心分離によって回収し、0 . 5 m l の抽出緩衝液 (5 0 m M の M O P S
 O、p H 7、5 m M の E D T A、5 m M の E D T A、1 0 % のグリセロール) 中に再懸濁

10

20

30

40

50

し、そして30秒間の超音波処理を3回行った。細胞破壊片を18000gで30分間遠心分離することによって沈殿させ、そして可溶性タンパク質を含有する上清を回収した。セスキテルペン合成酵素の発現をタンパク質抽出物の分離によってSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)を行い、クーマシーブルーで染色し、かつ空のプラスミドで形質転換された細胞から得られたタンパク質抽出物と比較することで評価した。

【0112】

期待された計算分子量を有する明瞭なバンドが全ての構築物について観察され、そして該バンドは空のプラスミドで形質転換された大腸菌からの可溶性タンパク質中には存在しなかった。

10

【0113】

実施例4：酵素機能アッセイ

酵素的アッセイを密封されたガラス試験管中で、15mMのMgCl₂及び100~250μMのFPP (シグマ社)を加えた抽出緩衝液の最終容量50~100μlのタンパク質抽出物を用いて行った。その培地を1mlのペンタンで成層させ、そして試験管を30で一晩インキュベートした。ペンタン相はセスキテルペンを含有し、これを回収し、そして培地を第二容量のペンタンで抽出した。合したペンタン画分を窒素下に濃縮し、そしてガスクロマトグラフィーによってヒューレット-パッカート社6890シリーズのGCシステムにおいて0.25mmの内径の30mのSPB-1 (スベルコ社)キャピラリーカラムを用いて分析した。キャリアーガスはHeであり、1.6ml/分の一定流であった。注入を2:1のスプリット比で、インジェクター温度を200に設定して行き、オーブンを7.5/分で80(0分固定)にしてから200(0分固定)にし、引き続き20/分で280(2分固定)にするようにプログラムした。検出は火炎イオン化検出器で行った。化合物の同定は、利用できれば基準スタンダードとの滞留時間の一致に基づくものである。生成物の一致の確認のために、試料を、0.25mmの内径の30mのSPB-1 (スベルコ社)キャピラリーカラムを備えたヒューレット-パッカート社6890シリーズのGCシステムを用いて組み合わされたキャピラリーGC-MSによって分析した。オーブンは、1.5ml/分の一定流のHeで80(0分固定)から7.5/分で280になるようにプログラムした。スペクトルを70eVで2200Vの電子倍増管電圧を用いて記録した。

20

30

【0114】

種々の組み換え酵素の酵素活性をこのアッセイにおいて可溶性タンパク質画分と基質としてのファルネシルニリン酸を用いて評価した。セスキテルペン合成酵素活性を試験される全てのクローンについて得て、そして形成された産物を滞留時間とGC-MSによって特徴付けした(図7)GFTpsBのcDNAは、主要産物としてビシクロゲルマクレン(図3)を、かつ少なくとも15種の少量のセスキテルペンオレフィン又は酸素化セスキテルペン、例えば - カジネン(図3)を産生するセスキテルペン合成酵素をコードする(ビシクロエレメン(図3)はビシクロゲルマクレンの熱転位により得られ、これもGC微量分中に観察された)。GFTpsCのcDNAは多数の産物を形成するセスキテルペン合成酵素をコードし、主要産物はクベボールであると同定された(図3)。該酵素はまた、比較的高い割合の() - - クベペンと2種の酸素化セスキテルペンとの3種の他のセスキテルペンを産生し、そして少量で、少なくとも11種のセスキテルペンオレフィン又は酸素化セスキテルペンを産生する。GFTpsDは主要産物としてバレンセンを産生するセスキテルペン合成酵素をコードする。10種の他の少量のピークはまたセスキテルペンオレフィン又はアルコールとして同定された。これらのうち、 - エレメンはゲルマクレンAの熱分解生成物である。GFTpsEはセスキテルペン化合物の複雑な混合物を産生し、その際、 - カジネン(図3)が僅かに最も豊富なものである。クベボールとゲルマクレンD(図3)はGFTpsEにより形成される産物の混合物中にも同定された。

40

【0115】

50

単離されたセスキテルペン合成酵素は、前記の実験において多数の産物を形成する特性を裏付けた。例えばクベボール合成酵素と α -カジネンは比較的高い割合で3又は5種の産物を産生する。ピシクロゲルマクレン合成酵素は、主にセスキテルペンを産生し、そして幾つかの二次産物を微量に産生した。

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1】図1は、イソペンテニルピロリン酸の生合成経路の例（メバロン酸経路（A）及びデオキシキシルロース経路（B））を示す

【図2】図2は、イソペンテニルピロリン酸からのテルペン生合成の例を示す

【図3】図3は、セスキテルペン化合物の例の構造を示す

【図4】図4は、2つの群のセスキテルペン合成酵素のアライメントの中心部分（ゲルマクレンC トマト 8 - カジネン合成酵素（配列番号11）；（E） - α -ファルネセンセイヨウハッカ（配列番号12）； α -セリネン グランドファー（配列番号13）；セスキテルペン合成酵素 ユズ（配列番号16）；5 - エピ - アルストロチェン タバコ（配列番号15）；5 - エピ - アリストロチェン トウガラシ（配列番号16）；ベチスピラジエン ジャガイモ（配列番号17）；ベチスピラジエン ヒヨスシウムス・ムチクス（配列番号18）； α -カジネン キダチワタ（配列番号19）；アモルファ - 4, 11 - ジエン クソニンジン（配列番号20）；エピ - セドロール クソニンジン（配列番号21）； α -フムレン グランドファー（配列番号22））並びに推測された縮重プライマーの配列（T p s V F 1（配列番号23）；T p s V F 2（配列番号24）；T p s V R 3（配列番号25）；T p s C F 1（配列番号26）；T p s C F 2（配列番号27）；T p s C R 3））を示す

【図5】図5は、グレープフルーツの全RNAでのRT - PCRによって得られた増幅産物から推測されたアミノ酸配列のアライメント（G F T p s A（配列番号29）；G F T p s B（配列番号30）及びG F T p s C（配列番号31））を示す

【図6】図6は、グレープフルーツ由来のセスキテルペン合成酵素G F T p s A（部分的クローン）（配列番号32）、G F T p s B（配列番号3）、G F T b s C（配列番号1）、G F T p s D 1（配列番号4）、G F T p s D 2（配列番号5）及びG F T p s E（配列番号2）のアミノ酸配列アライメントを示す

【図7】図7は、組み換えグレープフルーツセスキテルペン合成酵素によって産生されるセスキテルペンのGCプロファイルを示す

【図8】図8は、以下のそれぞれのアミノ酸及びヌクレオチドの配列：（a）G F T p s A（配列番号32及び配列番号33）、（b）G F T p s B（配列番号3及び配列番号8）、（c）G F T b s C（配列番号1及び配列番号6）、（d）G F T p s D 1（配列番号4及び配列番号9）、（e）G F T p s D 2（配列番号5及び配列番号10）並びに（f）G F T p s E（配列番号2及び配列番号7）を示す

10

20

30

【 5 】

VCII
 40 NLALGRIFAS
 KRTI
 FSS
 30 MMLI
 SYE
 IV
 20 ARDRVETI
 10 DLGFPKVPY
 ARDRVETI
 GFTpsA
 DLGFPKVPY
 GFTpsB
 GFTpsC

FIG. 5

【 6 B 】

310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 GFTpsA
 GFTpsB
 GFTpsC
 GFTpsD1
 GFTpsD2
 GFTpsE

410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 GFTpsA
 GFTpsB
 GFTpsC
 GFTpsD1
 GFTpsD2
 GFTpsE

510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 GFTpsA
 GFTpsB
 GFTpsC
 GFTpsD1
 GFTpsD2
 GFTpsE

FIG. 6B

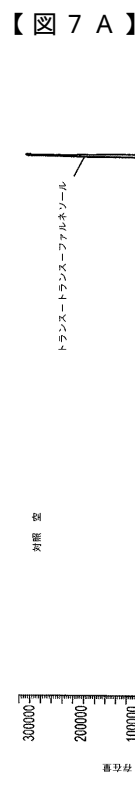
【 6 A 】

10
 20
 30
 40
 50
 60
 70
 80
 90
 100
 GFTpsA
 GFTpsB
 GFTpsC
 GFTpsD1
 GFTpsD2
 GFTpsE

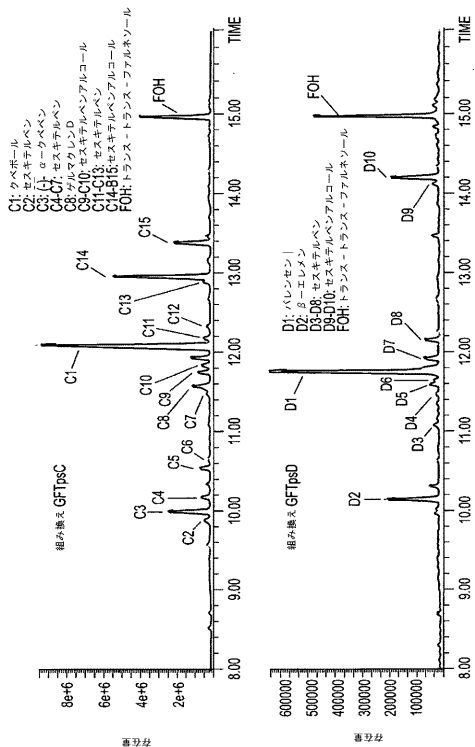
110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 GFTpsA
 GFTpsB
 GFTpsC
 GFTpsD1
 GFTpsD2
 GFTpsE

210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 GFTpsA
 GFTpsB
 GFTpsC
 GFTpsD1
 GFTpsD2
 GFTpsE

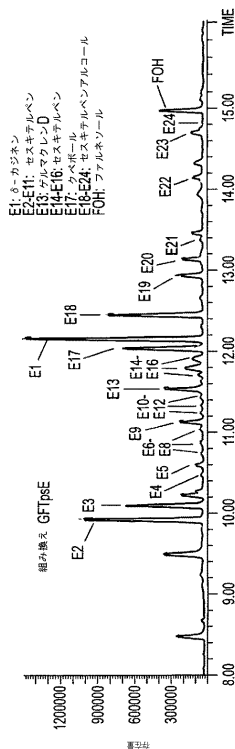
FIG. 6A



【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 a 】

配列番号30	配列番号32	GFTpsA	
1	1	CBA AAA CTA CAC AIC HPT GAT GCA GCA GAA CGA TTA GCT CTC GCI	45
45	45	TAT CAT TTT GAA AAA GAC ACT CEA GAT GAA TFG GGA AGA GAT TCI	90
15	15	CAT CAT TTT GAA AAA GAC ACT CEA GAT GAA TFG GGA AGA GAT TCI	30
91	91	CAT GAT CTT GAC AGT GAT GAT CIA TAC GAT CTT TCI CTT CGT TTT	135
31	31	H D L D D S D D D GAT CIA TAC GAT CTT TCI CTT CGT TTT	45
136	136	CGA CTT TTT GAA CAG CAA GGA GAT AGG AAT TTA TGI CAT CAG TTT	180
46	46	R L I R R G C M S S L V E A A Y L L	60
181	181	GAC AAG TTC AAA GAT GAC GAT AAA TTC AAG GAA TCA TFC ATC	225
61	61	L K P R K Q D E G A A A Y L L	75
226	226	NAC GAT AIA CGA GGC ATG TGC AGT TFG TAC GCA GCA CAC CTA	270
76	76	N D I R R G C M S S L V E A A Y L L	30
271	271	CCA AIT CGC GGC GAA GAC AIT TTA GAT GAA GCC AIT CTT CTC ACT	315
91	91	A I R R G C M S S L V E A A Y L L	135
316	316	AGC ACT CAC CTT AAG TCA GTA ATG TCT TCT GAT CAT TCT CAT	360
106	106	T F H L K S V I S V S D H S H	120
361	361	GTA AAG TCT GAT CTT GCT GAA CBA ATA CCT GAT TCI CTG CAA AIT	405
121	121	V W S D L K S S V I S V S D H S H	135
406	406	CCT CTC CCF AAA GCC CCA GCA AAG TTA GAG GCA AGC TAT TIT TTG	450
136	136	P L R K K A A A A R L E A A Y L L	150
451	451	GAT ATC TAT TCA AGG GAT GAT ITG CAT GAT GAA ACT ITG CIG AAG	495
151	151	D H R K R Q D E G A A Y L L	165
496	496	TIT GCA AAG TTA GGC TIT AIT AIT TTA CBA GCA CCA CAC AAG AAG	540
162	162	A A S R R K Q D E G A A Y L L	180
541	541	GAA GCA AIT AIC ATC ACC AGC TGC TGC AAC GAT TTA GGC TIT CCT	585
181	181	E A S R R K Q D E G A A Y L L	195
586	586	AAA AAG CCG CCT TAT CCA AGA GAT AGA GTA CTA GAG ACA TAT AIT	630
196	196	K F L R K Q D E G A A Y L L	210
631	631	TGG AIG TTC CTC GSA GIG TCC TAT GAC CEC AAT ITG GCA TTT GGT	675
211	211	M L L R K Q D E G A A Y L L	225
676	676	AGA ACT TTT GCA TCC AAA GIG GIG TCC AIT AIA TCC AIT AIA GAC	720
226	226	R F L R K Q D E G A A Y L L	240
721	721	GHC ACA TIT GAT GCT TFC GAT ACT TIT GAA GAG CIG ACA CTT TTT	765
241	241	D F L R K Q D E G A A Y L L	255
766	766	ACT GAA GCA CTC ACA	780
255	255	V E A A G C A Y L L	

【 図 8 b - 1 】

配列番号9	配列番号3	GFTpsB	
1	1	ATG TCC GCT CAA GTT CTA GCA ACG GAT TTC AGT TCG ACA GAA AAA	45
46	46	ACT GTT GAT CCC ATT GCT GGT TTC CMT CCT AAC TTA TCG GGA GAC	90
16	16	T T V R P I A G F H P H L K G D	30
91	91	TAT TTC CTG ACC CTC GCT TCT GAT TCC AAC ACA GAT CAT ACT ACC	135
31	31	H S A D V I A G F H P H L K G D	45
136	136	CAC CAA GAG GAA TAC GAA CCG CTG AAG CAA GAA CAC AAG AGC ATG	180
46	46	H Q E G A Y G A I K Q E V A G A S M	60
181	181	ATA ACG GCT ACC CCA GAT ACA CTT GGC CAG AAG TTC CAA TTG GAT	225
61	61	I T A D G A D A G A G A A Y L L	75
226	226	GAT GCA GTC CAA GAA TFG GGT GIG GGC TAT CAC TTC GAA CAG GAG	270
76	76	D A V Q R L G V A A Y L L	30
271	271	ATA GAA GAT GCA ATC GAA AAG AIT TAT CAC GAT CAC TIT CAT AAT	315
91	91	I E A D A M E K I T H N D D F D A T	135
316	316	AAC GAT GAT GTC GAT CTC TAC ACT GPT TCT CTT CGT TIT CGA CTG	360
106	106	N D D V D L Y T V S L R F R L	120
361	361	CTT ACG CAG CAA GGA TTT AAG GTT CCG TGT GAT CTG TCC CCG AAG	405
121	121	L R Q Q C F K V P C D V F A K	135
406	406	TTC AAA GAT GAT GAA GGT AAA TTC AAG CCA TCA TTG GIG CCG GAT	450
136	136	F R D J E G K F X A S L V R D	150
451	451	GTT CAT GGC AIT CTA AGT TFG VAT GAG GCA GCA CAC TFG GCC AIT	495
151	151	V H G I L S L Y E A G H L A I	165
496	496	CGC GGA GAA GGG ATA TTA GAT GAA GCC AAT GCT TTC ACT AGA ACT	540
162	162	R G E G I L D E A I A F T R T	180
541	541	CAC CTT CCA ATG ATA TCT CAG GAT GTA TGC CCT AAT AAT CTT	585
181	181	H L Q S N V S Q J V C P N N L	195
586	586	GCT GAA CAA AIT AAT CAT ACT CTC GAC TGT CTT CTC CCG AGA GCC	630
196	196	A E Q I N H T L D C P L R R A	210
631	631	CTT CCA AGH CTC GAG ACA AGA TTT TTC TFG TCG GTC TAT CCA AGA	675
211	211	L P R V T R P Z L TCG V Y P R A	225
676	676	GAT GAT AAA CAC GAT AAA ACT TTC TTA AAG TTT TCA AAG TTA GAC	720
226	226	D D X H B K T L L K F S R L D	240
721	721	TIT AAC CTT GCG CAA ACA ATA CAT CAG AAG GAA TTA AAT GGC ATC	765
241	241	L V G H I Q E F S R L D	255
766	766	ACA CCG TGG TGG AAA GAT TTA GAC TTC ACT ACA AAG CTA CCT TAT	810
255	255	T S W H R D L D P T T A K C T T	270

【 8 b - 2 】

811	GCA AGA GAC AGA R ITC GTA GAG TIG TAT TTT TGG ATT GTA CGG AGC	855
271	A R A D R A T C V A G T G T T W A M G	285
856	TAT TTT GAA CCA AAG TAC ACT TTA GCA AGA AAA ATA ATG ACC AAA	900
286	Y F E P R A G T A G A R A A M Y K	300
901	ACA ATT TAC ACC GCA TCT ATC ATA ATG TCA GAC ACT TTC GAC GCT TAT	945
301	T I Y T A S I T A D T F D A Y	315
946	GGT TTC TTT GAA GAG CTC AAA CTT TTT GCA GAA GCA GTC CAG AGG	990
316	G T F T E G E L K L T T A E A G V Q R	330
991	TGG GAC ATT GGA GCC ATG GAT ATA CTT GCA GAA TAC ATG AAA GTC	1035
331	W D I G A M D I L P E Y M R V	345
1036	CTT TAT AAG GCC CTT TTA GAT ACT TTC AAT GAA ATT GAG CBA GAC	1080
346	L V R A L T L D T F N E I E Q D	360
1081	TTG GCC AAG GAA GGA AGA TGG TCC TAC TTA CCT TAT GGC AAA GAA	1125
361	L A K E G R S L M Y F V Q A X W	375
1126	AAG ATG CAA GAC CTT GTT CAA ATG TAC TTT GTT CAA GCC AAG TGG	1170
376	K W Q E I V Q M Y F V Q A X W	390
1171	TTC CGT GAA GGT TAT GAT CCG ACA TGG GAC GAA TAT TAT CCG GTT	1215
391	F S E G E Y F T W D E E A T P F V	405
1216	GGA CTT GTA AGT TCC GCG TAC TTC ATG CTT CCG ACA AAC TCC TTC	1260
406	G L V S S T G C T A N G A F A S T C	420
1261	CTT GGC ATG TGT GAT GTT GCA AAC GAG GAA CCT TTT GAA TGG ATA	1305
421	L G M C D V A N E A A S S G T I C R	435
1306	TCC AAG GAC CCT AAG ATC TCA ACA GAG TCA TCA CTA GTT ATC TGC AGA	1350
436	S K G D P R K I T A S S T A S S G T I C R	450
1351	CTT AGG AAT GAC ATT GAT TCC CAG CAG TTT GAA CAG AAG AGA GGA	1395
451	L R N D I I V S H Q Y V G V	465
1396	CAT ATT GCC TGA GCG TAT GAA TGC TAC TAT AAG CAG TAT GGT GTT	1440
466	H I A N D I V S H Q Y V G V	480
1441	TCA GAA GAA GAG GTA GGT ACA GTT TTT ACT GAA GAA GAT GAG AAT	1485
481	S E E A G E N T F T T A T G A G A G T G A A T	510
1486	GCA TGG AAA GAT AAG AAT GAG GAA TTC CTG AAA CCA ACT GCT TTT	1530
486	A N D A R G E E G Q T A E A E V A E N	510
1531	CGT GTC GCT TTG ATT GAG AGA CTT TTT AAT APC CCA GGT GTG ATT	1575
511	P V A R M A M A S C I T A A P C G A G T A T	525
1576	GAA TTT CTA AAC AAG AAG GGT GAT TGG TAC ACT CAT TCT CMT GCG	1620
526	E F L N R K A G S H D T G R H S N A	540
1621	ATT AAA GAC CAG ATT GCC ACA CCG CTC AGA GAC CCT GTT ACC ATC	1665
541	I K A D Q T A G A V L R G A D C T V T I	555

【 8 c - 2 】

811	TAT GCT AGA AAG ACA GAT TTA GAA TGC TAT TTT TGG CCA ATG GGA	855
271	Y A R N R V V A E T T W A M G	285
856	GTG TAT TTT GAG CCT CGA TAC TCC TTT GCA AGA AAG ATA TTG TCC	900
286	T Y F E P R A G T A G A R A A M Y K	300
901	AAA GTA ATT GCA ATG ACA TCC ATT TTA GAT GAT ACC TAC GAC GCC	945
301	K V A J A M A S I L L D A T T Y D A	315
946	TAT GGC ACA CTT GAA GAC CTT GAC TTT TTT GCA GAA GCA GTC CAG AGG	990
316	V G T L E E G I L F T A N A I K	330
991	AGG TGG GAT ATT AGC AAG ATA GAT GTA CTT CCG AAG TAC ATG AAA	1035
331	R W D I T S N I A D T P G T T P G A A G T M K	345
1036	CTG ATT TAT CAA GCA CTC TTG GAT GTT TTT GGT GAA GCT GAG CAG	1080
346	L I T Y Q A G C L L D Q V T F G E A E G E	360
1081	GAA ATC TCA AAG GAA GGA CAG ACA TAT TGC ATG TCA TAT CTC ATA	1125
361	E I T S A R E G Q T T T C M S Y V I	375
1126	CBA GCG GTG AAG AAA GAT GTC CAA GCC TAC TTT GAG GAA GCC AAG	1170
376	Q A V K R V V Q A A T P F E E A C A	390
1171	TGC TGC AGT GAA GGT TAT TTT CCA AAA GTC AAG GAG TAT ATG CBA	1215
391	W C S E G Y T F T A G C V G E G E T M Q	405
1216	GTT TCA CTT GTC ACA ACT TCC TAT CAT ATG CTG GCA ACC GCT TCT	1260
406	V S C T F S G A T H A M L T A A T A	420
1261	TTT CTT GGC ATG GGA AAG ATT GCT GAT AAG CAG GCC TTT GAA TGG	1305
421	F L G M C P K A T R Q A F E W	435
1306	ATC TCC AAT TAC CCT AAA ACT GTC AAA GCC TCC CAA GAT ATT TGC	1350
436	S A A T P K A T G A A S C C A Q V T C	450
1351	AGA CTT AAG GAT GAT ATA GTC TCT CAC GAG TTT GAA CAA AAA AGA	1395
451	R C T M D A S H G T E G A A H A A A	465
1396	AAG CAT GTT GGC TGC GGT ATT GAA TGT TAC ATG AAG CAG CAT GGC	1440
466	K H T G D V N E G F M K Q H G	480
1441	GTC TCT GAT GAA GAG GTA ATT AAA GTA TTC CCG AAA CAA ATA TCA	1485
481	V C T D V N E G F M K Q H G	510
1486	AAT GCA TGG AAA GAT GTA AAT GAA GGA TTC ATG AAG CCA ACA GAA	1530
486	W C D V N E G F M K Q H G	510
1531	GTG GCA ATG CTT CTC CTT GAC GCG APT CTC AAT CTT GCA CCA GTC	1575
511	V A W P E L E R I L M L A R V	525
1576	ATA GAT GAT ATT TAC AAG GAT GAT GAT GGC TAC APT AAG TCT TAT	1620
526	I D V E R I L M L A R V	540
1621	GTG ATC AAA GAC TAC APT GCC ACA TTC CTT GAG AAG CTT GTL CCG	1665
541	V I R D Y T I A T L R G A G C T V T I	555
1666	TTT TGA	1671
556	F	

【 8 c - 1 】

		GFTpsc	
配列番号4	1	ATG GCA CTT CAA GAT TCA GAA GCT CCT TCT TCC ATT CTG AAT CCT	45
配列番号4	1	M A L Q D S E V P S I L N A	15
46	16	ACA GCC GGC AAC CCG CCA GCA GCT AGT TAT CAT ACC ACC CTC TGG	90
		T A G N R P T A S Y H P S T L W	30
91	31	GGG GCA AAA TTC CTT GAC TAT TCT TCT GTC GAC GAC TGT GAG GCA	135
		G G X F L D Y S S S T G C A C T G A E	45
136	46	ATG GAT GGC ACA ATT CAT CAA GAC GAA TTT GAA GCA CTT AAG CAA	180
		M E A T I D C D E F T E A L X Q	60
181	61	AAA ATA AAG AAC ATG TTA ATC TCA ACA ACC GAT AAG TCT TTT CAA	225
		X I X M M L I S P T D R S F Q	75
226	76	AAA ATG AAG TTG ATT GAT GCC GTC CAA CCG TTA GCA GTG GCT TAC	270
		X L W L I D A V Q R G A L X Q	90
271	91	CAT TTT GAG AAG GAG ATA GAA GAT GAA CTA GAA AAA CTA TCT CCI	315
		H F S R S I E D E L R R K L S F	105
316	106	GAT GAG TAT GAT GGC AAG GAT GTA CAG TCC GTT GCT CTT GAA TTI	360
		D E Y D G W D V H S V A L R F	120
361	121	CGG TTA CTC AGA CAA CAA GAT CCG AFA TCA TGC GAT ATT TTI	405
		R L L R Q Q G Y A S C D F	135
406	136	GCC GGT TTC AAA GAT GAT GGA AAG TTC AAG GTA TCC TTA ATT	450
		G G T F R D R E G A G P A G V L N I	150
451	151	AAT GAT CTG ACC GGC ATG CTA AGT TTG TAT GAG CCA GCA GAT CTT	495
		N D V P R G G A T A S T L Y T A C A H L	165
496	166	CGC ATT CCG GGG GAA GAT ATC CTG GAT GAA GCC CAA GCT TTC ACT	540
		R I R G G E D I L D E G A L A F Y	180
541	181	ACT TCT CAC CTG GAA TCA ATG GTT ACT CAA GTA AAG CCA CCA CTT	585
		T S H L E S A M V T Q A V S C T C A T L	195
586	196	TCT GAT GAA ATA CTT CAT CCG TTG AAT GAA CCA ATC CCG ACA GGC	630
		S D E I L H A L M R R P I R X G	210
631	211	TTA CCA AAG CTG GAC GCA GAT TAT CTA ATT GAT CTC TAC TCA CCA	675
		L P R L E G A V Y Y I D L Y S R	225
676	226	GAT GAT TCA AAG GAT AAA GAA ATA TTA CTA AAG TTT GCA AAA CTA	720
		D D S K D K A I L M R F A A X L	240
721	241	GAT TTT TGC ATG CTT CAA GTA ATT CAG CCG AAG GAT TTA AAT AAT	765
		D F C M L Q V Y I H N R K E L S I	255
766	256	ATC ACA GAG TGG TGC AAA AAT TTA GAT CTT GAA ATA AAT CTC CCA	810
		I T E W W A N L D V Y G A A T N L P	270

【 8 d - 1 】

		GFTpsd1	
配列番号4	1	ATG TCG TCT GGA GAA ACA TTT CGT ACT GCA GAT TTC CAT CPT	45
配列番号4	1	S T S G G A A T P C T G A A S D F C H H	15
46	16	AGT TTA TGG AGA AAC CAT TTC CTC AAA GGT GCT TCT GAT TAC AAG	90
		S L T W R R A C F L T C R A A G A S D F C H H	30
91	31	ACA CTT GAT CAT ACT GCA ACT CAA GAA CAG GAC GCA CTA AAA	135
		T V G D H A T Q E R G A R H A G C A C T A A A	45
136	46	GAA GAG GTA ACG AAG ATA GAT ACA GAT CAA GAT AAG CTT GTT	180
		E G A V R A M A T A G T D C A A G A T A G C T G T	60
181	61	CAG AAG TTA CEC TTT ATT GAT GAA GTA CCA CCG GTC GTC GCT	225
		Q K L R L L I D E V Q A R L G V G A	75
226	76	TAT CAC TTT GAG AAA GAA ATA GAT GAA ATA CAA AAA TTA TGT	270
		Y H F E K E I E D A I Q K L T C	90
271	91	CCA ATC TAT ATT GAC ACT AAT AGA GCT AAT CCG CAC ACC GCT TCC	315
		P I Y I D S N R A D L H T V S	135
316	106	CIT CAT TTT CCA TIG CTT AGC CAG CAA GCA ATC AAG ATT TCA TGT	360
		L H F R L L L R Q G Q G K I S C	120
361	121	GAT GTC TTT GAG AAG TTC AAA GAT GAT GAG GGT AGA TTC AAG TCA	405
		D V F E X F X A D D E G G T R F K S	135
406	136	TGG TTA AAG AAG GAT CAA CCG AAG TTA AGT TTG TAC GAG GCA	450
		S L T N J V Q G E M L S L Y E A	150
451	151	GCA TAC ATG GCA GTC CCG GEA GAA CAT ATA TTA GAT GAA GCC AAT	495
		A Y M A V R G E H I L A D E A I	165
496	166	GCT TTC ACT ACC ACT CAC CTG AAG TCA TTG GAA CCG CAG GAT CAT	540
		A F T T T C H L R S L L G A C Q D H	180
541	181	GTA ACC CCT AAG CTT GCG GAA CAG ATA AAT GAT CCA TAC CCG	585
		V T P R L A E Q I N H A L Y R	195
586	196	CCT CTT CTT AAA ACC CTA CCA AGA TTA GAG GCG AAG TAT TTT ATG	630
		P L K K T E A G A T A B G C G T Y F H	210
631	211	TCC AUG AIC AAT TCA AAG AGT GAT CAT TTA TAC AAT AAA ACT CTG	675
		L M F A R L D F N L L S L H	225
676	226	CTG AAT TTT GCA AAG TTA GAT TTT AAT ATA TTG CTA GAG CTG CAC	720
		L M F A R L D F N L L S L H	240
721	241	AAG GAG GAA CTT AAT GAA TTA ACA AAG TGG TGG AAA GAT TTA GAC	765
		K B E L N E L A R W T D L G C	255
766	256	TTC ACT AAG AAA CTA CTT TAT GCA AAG GAC AGA TTA GTG GAG TCA	810
		T T P K L L C T Y A A R D R A G V E L	270

【 8 d - 2 】

811	TAT TTT TGG GAT TTA GGC ACA TAC TTC GAG CCT	
271	T T F W D L G A C T T G B C C T C A A T A T T	855
856	GGG AGA AAG ATA ATG ACC CAA TTA AAT TAC ATA TTA TCC ATC ATA	900
286	G R K M G A T A T Q L N A T T A T I L S I I	300
901	GAT GAT ACT TAT TAT GAT CCG TAT GGT ACA CTT GAA GAA CTC AGC CTC	945
301	D D A T T D A T G A T G A C T T G A A C T C L S L	315
946	TTT ACT GAA GCA GTT CAA AGA TGG AAT ATT GAG GCC CTA GAT ATG	990
316	T T E A V Q C A R W T A T A T T G C C A V D M	330
991	CTT CCA GAA TAC ATG AAA TTG AIT TAC AGG ACA CTC TTA TAT GCT	1035
331	L P E Y M K L T I Y R T L L D A	345
1036	TTT AAT GAA ATT GAG GAA GAT ATG GCC AAG CAA GGA AGA TCA CAC	1080
346	F N E I E G E D M A K Q G R S H	360
1081	TGC GTA CGT TAT GCA AAA GAG GAG AAT CAA AAA GTA ATT GGA GCA	1125
361	C V R Y A K X E G E N T Q K V I G A	375
1126	TAC TCT GTT CAA GCC AAA TGG TTC CTT GCA CTA ACA AGT TGT GCT TAC ACA	1170
376	Y S V Q A K W F S E G Y V P T	390
1171	ATT GAG GAG TAT ATG CCT ATT GCA CTA ACA AGT TGT GCT TAC ACA	1215
391	I E R Y M P I A L T S C A Y T	405
1216	TTC GTC ATA ACA AAT TCC TTC CTT GGC ATG GGT GAT TTT GCA ACT	1260
406	F V I T N S T F L G M G D F A T	420
1261	AAA GAG GTT TTT GAA TGG ATC TCC AAT AAC CCT AAG GTT GTA AAA	1305
421	R E V T F E W I T S N N P R V V K	435
1306	GCA GCA TCA GTT ATC TGC AGA CTC ATG GAT GAC ATG CAA GGT CAT	1350
436	A A S V I C R C T A L M D G C M Q G H	450
1351	GAG TTT GAG CAG AAG ACA GAT GTT GCG TCA CCT ATT GAA TGT	1395
451	E T E Q K R G H V A S A I E C	465
1396	TAC AGC AAG CAG CAT GCT CTC TCT AAG GAA GAG GCA ATT AAA ATG	1440
466	Y T K Q H G T V S R E E A I R M	480
1441	TTT GAA GAA GAA GTT GCA AAT CCA TGG AAN GAT ATT AAC GAG GAG	1485
481	F E E E V A N A W K D I N E E	495
1486	TTG ATG ATG AAG CCA ACC GTC GTT GCG CCA CCA CTG CTC GGG AGC	1530
496	L M M X P T V A R Q R C T G G Y H I	510
1531	ATT CTT AAT CTT GCT GCT GCA ATT GAT TTT ATT TAC AAA GAG GAC	1575
511	I L N L T A T S F L W G D I X E D	525
1576	GAC GGC TAT ACC CAT TCT TAC CTA ATT AAA GAT CAA ATT GCT TCT	1620
526	D G Y T H S Y L I A A D Q I A S	540
1621	GTG CTA GGA GAC CAC GTT CCA TTT TGA	1647
541	V L G D H V T P F T G A	

【 8 e - 1 】

		GFTpsD2	
1	ATC TCG TCT GGA GAA ACA TTT CCG CCT ACT GAA GAT TTC CAT CCT	45	
1	M S S G E T F R P F A D F H P	15	
46	AGT TTA TGG AGA AAC CAT TTC CTC AAA GGT GCT TCT GAT TTC AAG	90	
16	S L W R N H F L K G A C S D F R	30	
91	ACA GCT GAT CAT ACT GCA ACT CAA GAA CGA GAC GCA CTG AAA	135	
31	T V D H T A T Q E R H E A L R	45	
136	GAA GAG GTA AGG AGA ATG ATA ACA GAT GCT GAA GAT AAG CCT GTT	180	
46	E E V R R M I T D A E D R P V	60	
181	CAG AAG TTA CCG TTG AIT GAT GAA CTA CCA CCG CTG GCG GTC GCT	225	
61	Q K L R L I D E V Q R L G V A	75	
226	TAT CAC TTT GAG AAA GAA ATA GAA GAT GCA ATA CAA AAA TTA TCT	270	
76	Y H F E K E I E D A I Q X L C	90	
271	CCA AAC TAT AAT CAC AGT AAT AGC CCT GAT CTT CAC ACC GTP TCT	315	
91	P N Y I H S N S P D L H T V S	105	
316	CCT CAT TTT CGA TTG CTT AGG CAG CAA GCA ATC AAG AIT TCA TGT	360	
106	L H F R L L R Q Q C I K I S C	120	
361	GAT GTG TTT GAG AAG TTC AAA GAT GAT GAG GGT AGA TTC AAG TCA	405	
121	D V F E R K R D D E G R F R S	135	
406	TTG TTG ATA AAG GAT GTT CAA GGG AIG GTA AGT CTC TAC GAG CCA	450	
136	S L J N D V Q G M L E L TAC GCA	150	
451	GCA TAC ATG CCA GTT CCG GCA GAA CAT ATA TTA GAT CCA GCC AIT	495	
151	A Y M A V R G E H I T L D G A C C A T	165	
496	GCT TTC ACT ACC ACT CAC CTC AAG TCA TTG LTA GAT CAG GAT CAT	540	
166	A F T T H L E S L V A Q D H	180	
541	GTA ACC CCT AAG CTT GCG GAA GAT ATA AAT GAT GCT TTA CAC CST	585	
181	V T P K L A E Q I N A T G A R L Y R	195	
586	CCT CTT GGT AAA ACC CTA CCA AGA TTA GAG CCG AGG TGT TTT ATG	630	
196	P L R K T C A R L S G A S L Y T B	210	
631	TCC ATG ATC AAT TCA ACA AGT GAT CAT TTA TAC AAT AAA ACT CTG	675	
211	S M I K N S D H L W L R K T L	225	
676	CTG AAT TTT GAA AAG TTA GAT TTT AAG ATA TTG CTA GAG CTC CAC	720	
226	L N F A R L D F N R L V A H K A S	240	
721	AAG GAG GAA CTC AAT GAA TTA ACA AAG TGG TGG AAA GAT TTA GAC	765	
241	L N F A R L D F N R L V A H K A S	255	
766	TTC ACT ACA AAA CTA CTT TAT CCA AAG GAC AGA TTA GTC GAG TTA	810	
256	F T A K L T Y A R G C A L Y V P L	270	

【 8 e - 2 】

811	TAT TTT TGG GAT TTA GGC ACA TAC TTC GAG CCT CAA TAT GCA TTT	855
271	T T F W D L G A C T T G B C C T C A A T A T T	285
856	GGG AGA AAG ATA ATG ACC CAA TTA AAT TAC ATA TTA TCC ATC ATA	900
286	G R K M G A T A T Q L N A T T A T I L S I I	300
901	GAT GAT ACT TAT TAT GAT CCG TAT GGT ACA CTT GAA GAA CTC AGC CTC	945
301	D D A T T D A T G A T G A C T T G A A C T C L S L	315
946	TTT ACT GAA GCA GTT CAA AGA TGG AAT ATT GAG GCC CTA GAT ATG	990
316	T T E A V Q C A R W T A T A T T G C C A V D M	330
991	CTT CCA GAA TAC ATG AAA TTG AIT TAC AGG ACA CTC TTA TAT GCT	1035
331	L P E Y M K L T I Y R T L L D A	345
1036	TTT AAT GAA ATT GAG GAA GAT ATG GCC AAG CAA GGA AGA TCA CAC	1080
346	F N E I E G E D M A K Q G R S H	360
1081	TGC GTA CGT TAT GCA AAA GAG GAG AAT CAA AAA GTA ATT GGA GCA	1125
361	C V R Y A K X E G E N T Q K V I G A	375
1126	TAC TCT GTT CAA GCC AAA TGG TTC CTT GCA CTA ACA AGT TGT GCT TAC ACA	1170
376	Y S V Q A K W F S E G Y V P T	390
1171	ATT GAG GAG TAT ATG CCT ATT GCA CTA ACA AGT TGT GCT TAC ACA	1215
391	I E R Y M P I A L T S C A Y T	405
1216	TTC GTC ATA ACA AAT TCC TTC CTT GGC ATG GGT GAT TTT GCA ACT	1260
406	F V I T N S T F L G M G D F A T	420
1261	AAA GAG GTT TTT GAA TGG ATC TCC AAT AAC CCT AAG GTT GTA AAA	1305
421	R E V T F E W I T S N N P R V V K	435
1306	GCA GCA TCA GTT ATC TGC AGA CTC ATG GAT GAC ATG CAA GGT CAT	1350
436	A A S V I C R C T A L M D G C M Q G H	450
1351	GAG TTT GAG CAG AAG ACA GAT GTT GCG TCA CCT ATT GAA TGT	1395
451	E T E Q K R G H V A S A I E C	465
1396	TAC AGC AAG CAG CAT GCT CTC TCT AAG GAA GAG GCA ATT AAA ATG	1440
466	Y T K Q H G T V S R E E A I R M	480
1441	TTT GAA GAA GAA GTT GCA AAT CCA TGG AAN GAT ATT AAC GAG GAG	1485
481	F E E E V A N A W K D I N E E	495
1486	TTG ATG ATG AAG CCA ACC GTC GTT GCG CCA CCA CTG CTC GGG AGC	1530
496	L M M X P T V A R Q R C T G G Y H I	510
1531	ATT CTT AAT CTT GCT GCT GCA ATT GAT TTT ATT TAC AAA GAG GAC	1575
511	I L N L T A T S F L W G D I X E D	525
1576	GAC GGC TAT ACC CAT TCT TAC CTA ATT AAA GAT CAA ATT GCT TCT	1620
526	D G Y T H S Y L I A A D Q I A S	540
1621	GTG CTA GGA GAC CAC GTT CCA TTT TGA	1647
541	V L G D H V T P F T G A	

【 8 f - 1 】

		GFTpsE2	
1	ATC TCT TTC GAA GAT TCA CCA TCC CCT AAA GTT AIC CAA AAT	45	
1	M S S L E V S A S P A X V I Q N	15	
46	GCT GCG AAA GAT TCT ACT CCG TCC CCA AAT TAT CAT CCA AGC	90	
16	A G K D S T H R S A N W Y L H P S	30	
91	AIC TGC GCG GAT CAT TTC CTT CAA TAT AGT TGT GAC ACC CAG GAA	135	
31	T D A T Q E R H E A L R K R	45	
136	ACT GAT CAT GCG ACG AAT GTA AAG CAT CTA GCG CTS AAG AAA GAA	180	
46	T H D A T C R H H A Q N E P S L R T L	60	
181	AIT AGA AAG ATG CTA AAA GCT GAT AAG ACC CTT TCA GCT ACA CTT	225	
61	I R W L R A D N R E P S R T L	75	
226	GAA TTG AIT GAT GAA AIT CAG CBT ITA GGA GTC TAC CAT TTT	270	
76	Q L I D A I C D H E N L G V S Y H I	90	
271	GAA AGT GAG AIT GAT GAA ATA TTG GAA AAG AUG CAI AAG GCT TGC	315	
91	E S E I D E L C D H E N L G V S Y H I	105	
316	CAG GAC TCT GAT CTT TGT GAT AAT GAA AAT GAT GTC CTC TAT TAT	360	
106	Q S S D L C D H E N L G V S Y H I	120	
361	AIC TCT CTT CAT TTT CGA TTA CTT AGA CAA AAT GGC TAT AAA AIT	405	
121	I S S D L C D H E N L G V S Y H I	135	
406	TCC GGT GAT GTC TTC AAA AAG TTC AAA GAC ACG GAT GGG AAC TTT	450	
136	C E W F R K D T V G E W F	150	
451	AAA ACA TCT CTT GCG AAA GAT GTT CCA GGA ATG TTA AGC TCG TAT	495	
151	X I S L L C R A A G P G T T G A A T G T A A C T G S L T	165	
496	GAA GGT ACG CAT CTC GGG GTA CAT GAA GAA GAT ATA CAT GAA	540	
166	E A T H L C G G V H E G A D I A T A T D G A	180	
541	GGC CTT GCT TTC ACC ACT AGT CAC CTA GAG TCA ATA GCG ACT CAT	585	
181	A L A T T C A C T T S H L E S L V A Q D H	195	
586	CAA AIC AAG TCT CCA CTT GIT GAA CAA GTC CAC AAT CCA GAT TTA GGT	630	
196	Q I R S P L G V E A Q V A A C H A C T T A V	210	
631	CAG CTT CAC ACG GTC TTC CAA AAG CTT GAG GCA AGA CAG TAC	675	
211	Q P I H R G C F Q R L E A R Q Y	225	
676	ATT CCT AIC TAT CAA GAA TCC CAC AAT CCA AAG CCA GCT CTG TTA	720	
226	I P I Y Q E F S P H R E A L L V	240	
721	ACT TTT CCA AAG TTA GAT TTT AAC AAA TTG CCA AAG CCT CAC CAG	765	
241	T F A K L D F N W K L G A X C C T C A C G	255	
766	AAG GAA CTC GGT GAT TTA AAG TGG TGG AAA GAA TTA GAC TTT	810	
256	K E L G D I S R W W K E L D P	270	

【 8 f - 2 】

811 GCA CAT AAG CTA CTT TTC ATA AGA GAT AGA GTT GCG GAG TGC TAC 855
271 A H R L F T T A R D R V A E C Y 285
856 TTT TGG ATA TTA GGA GCG TAT TTC GAG CCC CAA TAT TCA TTT GCA 900
286 F W A T L G G G T T E G P Q S F A 300
901 AGA AGA ATA TTG AGG AAA GCG ATC TCC ATG ACT TCT GTT ATT GAT 945
R A A T L G G A R G C H S M F S V I D 960
946 GAT ATC TAT CAT CTG TAT GCG AAA ATT GAA GAA CTT GCG CTT TTT 990
301 D T U D T Y L R A I T E S A E L E L F 315
991 ACT TCA GCT ATT GAG AGG TGG GAT ATC AGT GCC ATA GAT CAA CTT 1035
331 S A I E R D L A P G A L L D S A 345
1036 CCT GCG TAT ATG AAA TTG TGT TAT AGG GCC CTT CTT GAT GTT TTT 1080
346 P Z Y W K L C Y R A L L D V F 360
1081 AGT GAA GCA GCG AAG GAT TTG GCC CCC CAA GGA AAA TCA TGC GCG 1125
351 S E A E K D L A M K N W V K N Y 365
1126 CTC TAT TAT GCA AAA GAA GCG ATG AAG AAT ATG GTT AAG AAT TAC 1170
L V V A E E A M K N W V K N Y 380
1171 TTC TAC GAA CCT AAA TGG TGT CTT CAG AAT TAT GTA CTT ACA GTG 1215
381 F V E A K W C L Q M V T A C T F V 405
1216 GAT GCG TAC ATG AGC GGT GCA TTA GTT ACA TGT GCG TCC CCA ATG 1260
406 D E V W F V A L V T S S S M 420
1261 TTG TCA ACC ACA TCC TTT GTT GCC ATG GGA GAC ATT GTA ACT AAA 1305
421 L R P T V V G C G D S G A C T A C T A A 435
1306 GAA TCT TTT GCG TGG TTA TTC AGC AAT CCT AGA TTT AIT AGG CCT 1350
436 E A Q S R L T S N P R A T T I T R A 450
1351 TCT TCT ATA GTT TGC CGA CTC ATG GAT GAC ATA GTG TCA CAC AAG 1395
451 T C T A V T G C A L M D T S A H C H S C Y 465
1396 TTT GAA CAA AGC AGA GGC CAC GTT GCC TCA AGC GTT GAG TGT TAC 1440
482 F E Q S A G G C H S S S A G C T T G S E L C Y 480
1441 ATG AAA CAA CAT CGA CCA ACA GAA GAG GAA GCA TGC AAT GAG TTT 1485
481 M A Q S H T A E A E A C N E F 495
1486 CGG AAA CAA GTT TCA AAT GCC TCG AAG GAT ATA AAT GAG GAC TGC 1530
496 R K Q S T N A R K D I N E D C 510
1531 CTA CGC CCA AGC GTT GTG CCA ATG CCA CTT CTG ATG GGA ATT CTC 1575
511 L R P T V V P M E L L M R I L 525
1576 AAT CTT ACA CGC GTT ATA GAT CTC ATT TAC AAG TAT GAA GAT GGC 1620
526 N T F R R V I D V I V R K T A E D G 540
1621 TAC ACT CAT TCC GCA GGT GTG CTG AAA GAT TTT CTT CCT TCT TTC 1665
541 Y K H S A V V L R A D T T V A S T T 555
1666 TTT AAT AAT CCT GTG CCG ATA TGA 1689
536 F I N P T G P A T 1689

フロントページの続き

- (74)代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (72)発明者 ミシェル シャルク
フランス国 コローニュ - スウ - サレーヴ アレー デ レズィダンス デュ サレーヴ 195
- (72)発明者 アンソニー クラーク
フランス国 モネティエ モルネー エサート サレーヴ シェマン デュ ムーランド ナズ
125

審査官 富永 みどり

- (56)参考文献 Biol.Pharm.Bull. , 2001年, Vol.24, No.10, p.1171-1175
Proc Natl Acad Sci USA , 1998年, Vol.95, No.8, p.4126-4133
DATABASE UniProtKB [online] accession no.Q8RVR, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/75247551>> 2002-06-01 uploaded, [retrieved on 2009-08-07], XIA, D. et al. DEFINITION: Putative terpene synthase.

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JDreamII)