

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-536157

(P2015-536157A)

(43) 公表日 平成27年12月21日(2015.12.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 19/18 (2006.01)	C 1 2 P 19/18 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-545996 (P2015-545996)	(71) 出願人	514034102
(86) (22) 出願日	平成25年12月4日 (2013.12.4)		エヴォルヴァ エスアー.
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月31日 (2015.7.31)		E V O L V A S A .
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/075510		スイス国、ツェーハー 4 1 5 3 ライナ
(87) 国際公開番号	W02014/086842		ハ、ドゥギンゲルシュトラッセ 2 3
(87) 国際公開日	平成26年6月12日 (2014.6.12)		D u g g i n g e r s t r a s s e 2 3
(31) 優先権主張番号	61/733, 220		, C H - 4 1 5 3 R e i n a c h , S w
(32) 優先日	平成24年12月4日 (2012.12.4)		i t z e r l a n d
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102842
			弁理士 葛和 清司
		(72) 発明者	リウ, ヤオクアン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
			5 4 6 カストロ バレー、ジェームス
			アベニュー 4 4 1 5
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モグロシド化合物の生合成のための方法および材料

(57) 【要約】

本発明は、酵素の助けによりモグロシドを製造する方法に関する。特に本発明は、モグロシドの製造に有用な様々な生合成経路を提唱し、モグロシドの製造に有用な酵素を提供する。さらに本発明は、本発明の方法を実施する際に有用な組換え宿主を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モグロシド化合物の製造方法であって、本方法が、1または2以上の以下のステップ：
ステップ I I b. ジオキシドスクアレンを、ジオキシドスクアレン→24, 25エポキシ
ククルビタジエノールへの変換を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I V a. 11-ヒドロキシ-ククルビタジエノールを、11-ヒドロキシ-ク
クルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可能な酵素または酵素混合物と接触させる
こと；

ステップ I V b. 11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノールを、11
-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可
能な酵素と接触させること；

ステップ V. モグロールおよび／またはグルコシル化モグロールを、モグロールおよび／
またはグルコシル化モグロールのグルコシル化を触媒することができてモグロシドを形成
する酵素または酵素混合物と接触させること、ここで前記酵素または酵素混合物は、U G
T 1576、U G T 98およびU G T S K 98からなる群から選択されるU G Tを含ん
でいる；

を含む、前記方法。

【請求項 2】

方法が以下のステップを含む、請求項 1 に記載の方法：

ステップ I I a. オキシド-スクアレンを、オキシド-スクアレン→ククルビタジエノ
ールへの変換を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I I I a. 前記ククルビタジエノールを、ククルビタジエノール→11-ヒドロ
キシ-ククルビタジエノールへのヒドロキシル化を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I V a. 前記11-ヒドロキシ-ククルビタジエノールを、11-ヒドロキシ-
ククルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ V. 前記モグロールを、モグロール→モグロシドへのグルコシル化を触媒可能な
酵素または酵素混合物と接触させること；

および任意に、前記モグロシドを単離すること。

【請求項 3】

方法が以下のステップを含む、請求項 1 に記載の方法：

ステップ I I b. ジオキシド-スクアレンを、ジオキシド-スクアレン→24, 25エポ
キシククルビタジエノールへの変換を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I I I b. 前記24, 25エポキシククルビタジエノールを、24, 25エポキ
シククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール
へのヒドロキシル化を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I V b. 前記11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノールを、
11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロールへの変換を触
媒可能な酵素と接触させること；

ステップ V. 前記モグロールを、モグロール→モグロシドへのグルコシル化を触媒可能な
酵素または酵素混合物と接触させること；

および任意に、前記モグロシドを単離すること。

【請求項 4】

方法が以下のステップを含む、請求項 1 に記載の方法：

ステップ I I I a. ククルビタジエノールを、ククルビタジエノール→11-ヒドロキシ
-ククルビタジエノールへのヒドロキシル化を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I V a. 前記11-ヒドロキシ-ククルビタジエノールを、11-ヒドロキシ-
ククルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ V. 前記モグロールを、モグロール→モグロシドへのグルコシル化を触媒可能な
酵素または酵素混合物と接触させること；

および任意に、前記モグロシドを単離すること。

10

20

30

40

50

【請求項 5】

方法が以下のステップを含む、請求項 1 に記載の方法：

ステップ I I I b. 2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノールを、2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノール→1 1-ヒドロキシ-2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノールへのヒドロキシ化を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ I V b. 前記 1 1-ヒドロキシ-2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノールを、1 1-ヒドロキシ-2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可能な酵素と接触させること；

ステップ V. 前記モグロールを、モグロール→モグロシドへのグルコシル化を触媒可能な酵素または酵素混合物と接触させること；

および任意に、前記モグロシドを単離すること。

10

【請求項 6】

方法が以下のステップを含む、請求項 1 に記載の方法：

ステップ V. モグロールおよび／またはグルコシル化モグロールを、モグロールおよび／またはグルコシル化モグロールのグルコシル化を触媒することができてモグロシドを形成する酵素または酵素混合物と接触させること、ここで前記酵素または酵素混合物は、U G T 1 5 7 6、U G T 9 8 および U G T S K 9 8 からなる群から選択される U G T を含んでいる。

【請求項 7】

モグロシドが C 2 4 でグリコシル化される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

モグロシドが C 3 でグリコシル化される、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

モグロシドが、モグロシド I E 1、モグロシド I A 1、モグロシド I I E、モグロシド I I I A 2、モグロシド I I I、モグロシド I V およびモグロシド V からなる群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

モグロシドが、モグロシド I A 1、モグロシド I I A、モグロシド I I I A 1、シアメノシドおよびモグロシド V からなる群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 1】

以下の 1 または 2 種以上の異種核酸を含む、組換え宿主細胞：

I I b. ジオキシドースクアレン→2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノールへの変換を触媒可能な酵素をコードする異種核酸；

I V a. 1 1-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

I V b. 1 1-ヒドロキシ-2 4, 2 5 エポキシククルビタジエノール→モグロールへの変換を触媒可能な酵素をコードする異種核酸；

V. モグロールおよび／またはグルコシル化モグロールのグルコシル化を触媒することができてモグロシドを形成する酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）、ここで前記酵素または酵素混合物は、U G T 1 5 7 6、U G T 9 8 および U G T S K 9 8 からなる群から選択される U G T を含んでいる。

40

【請求項 1 2】

組換え宿主細胞が以下の異種核酸を含む、請求項 1 1 に記載の組換え宿主：

I I a. ステップ I I a（オキシドースクアレン→ククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

I I I a. ステップ I I I a（ククルビタジエノール→1 1-ヒドロキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

50

I V a. ステップ I V a (11-ヒドロキシ-ククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

V. ステップ V (モグロール→モグロシド) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) 。

【請求項 13】

組換え宿主が以下の異種核酸を含む、請求項 11 に記載の組換え宿主：

I I I a. ステップ I I I a (ククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-ククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

I V a. ステップ I V a (11-ヒドロキシ-ククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

V. ステップ V (モグロール→モグロシド) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) 。

【請求項 14】

組換え宿主が以下の異種核酸を含む、請求項 11 に記載の組換え宿主：

I I b. ステップ I I b (ジオキシド-スクアレン→24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

I I I b. ステップ I I I b (24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

I V b. ステップ I V b (11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

V. ステップ V (モグロール→モグロシド) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) 。

【請求項 15】

組換え宿主が以下の異種核酸を含む、請求項 11 に記載の組換え宿主：

I I I b. ステップ I I I b (24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

I V b. ステップ I V b (11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシ-ククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ;

V. ステップ V (モグロール→モグロシド) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) 。

【請求項 16】

組換え宿主が以下の異種核酸を含む、請求項 11 に記載の組換え宿主：

V. モグロールおよび／またはグルコシル化モグロールのグルコシル化を触媒することができてモグロシドを形成する酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)、ここで前記酵素または酵素混合物は、U G T 1576、U G T 98 および U G T S K 98 からなる群から選択される U G T を含んでいる。

【請求項 17】

組換え宿主が、スクアレンエポキシダーゼをコードする異種核酸をさらに含む、請求項 11～16 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

【請求項 18】

組換え宿主が、ラノステロールシンターゼの発現を低下するように改変されている、請求項 11～7 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

【請求項 19】

方法が、以下：

i) 請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主を提供すること；

i i) 前記組換え宿主を、培養培地中で培養すること；
i i i) 任意に、前記モグロシドを培養培地および／または組換え宿主から単離すること；
を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

オキシドースクアレン→ククルビタジエノールの変換を触媒可能な酵素が、配列番号 43 のククルビタジエノールシンターゼ、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

10

【請求項 21】

ジオキシドースクアレン→24, 25 エポキシククルビタジエノールの変換を触媒可能な酵素が、配列番号 43 のククルビタジエノールシンターゼ、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

【請求項 22】

ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノールの変換を触媒可能な酵素が、配列番号 44 の CYP5491、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

20

【請求項 23】

24, 25 エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノールの変換を触媒可能な酵素が、配列番号 44 の CYP5491、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

30

【請求項 24】

11-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロールの変換を触媒可能な酵素または酵素混合物が、配列番号 38 のエポキシドヒドロラーゼ 1、配列番号 40 のエポキシドヒドロラーゼ 2、およびこれらと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するこれらの機能的相同体、からなる群から選択されるポリペプチドを含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

【請求項 25】

11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノール→モグロールの変換を触媒可能な酵素が、配列番号 38 のエポキシドヒドロラーゼ 1、配列番号 40 のエポキシドヒドロラーゼ 2、およびこれらと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するこれらの機能的相同体、からなる群から選択されるポリペプチドである、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

40

【請求項 26】

モグロール→モグロシドの変換を触媒可能な酵素または酵素混合物が、配列番号 48 の UGT1675、配列番号 53 の UGT98、配列番号 50 の UGT SK98、およびこれらと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば

50

少なくとも 95%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を共有するこれらの機能的相同体、からなる群から選択される UGT を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 11～18 のいずれか一項に記載の組換え宿主。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モグロシド化合物の生合成のための方法および材料に関し、より具体的には、シトクロム P450 酵素を使用してモグロールを製造すること、および／またはウリジン-5'-ニリン酸 (UDP) 依存性グリ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し、種々のモグロールグリコシド (モグロシド) を製造することが関与する方法に関する。方法はまた、モグロール製造用の基質の生合成に関与する酵素の使用も含んでよい。

10

【背景技術】

【0002】

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、トリテルペングリコシドのファミリーである。果実の抽出物は、商業的に天然の甘味料として使用されている。4 種の主要な化合物であるモグロシド V、モグロシド I V、シアメノシド I、および 11-オキシモグロシド V が *Siraitia grosvenorii* (Swingle) の果実から同定されており、これらは果実の甘みの素である (図 1 参照)。モグロシド V は、これら 4 種の化合物のうち最も豊富であり、乾燥果実の約 0.57% (w/w) を占め、続いてモグロシド I V、およびシアメノシド I であり、これらはそれぞれ 4 つのグルコース部分を含む。11-オキシモグロシド V は、ヒドロキシルの代わりにケトン基を C-11 に有する。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。しかし、モグロシドの製造に関与する酵素は、未だに同定されていない。

20

Tang et al. *BMC Genomics* 2011, 12:343 には、7 種の CYP450 および 5 種の UDP G が、モグロシド生合成に関与する可能性のある候補として記載されている。しかしこの文献では、モグロシド生合成に関与するいかなる CYP および UDP G も、具体的に同定されていない。

30

【発明の概要】

【0003】

本発明は、モグロシド化合物の生合成のための方法および材料を提供する。興味深いことに、本発明は、モグロシド生合成に関与する酵素を提供する。

モグロシド生合成にはいくつかのステップが関与し得るため、本発明の一側面は、これらの各ステップを触媒することができる酵素を提供することである。しかし本方法はまた、いくつかのステップのみを酵素的に実施し、一方で他のステップは別の手段により行うことも予想されている。

一側面において、本明細書は、モグロシド化合物の製造方法の特徴とする。

40

【0004】

したがって本発明は、1 または 2 以上の以下のステップを含む、モグロシドの製造方法を提供する：

ステップ I a. オキシドースクアレンのレベルを強化すること

ステップ I b. ジオキシドースクアレンのレベルを強化すること

ステップ I I a. オキシドースクアレン→ククルビタジエノール

ステップ I I b. ジオキシドースクアレン→24, 25 エポキシククルビタジエノール

ステップ I I I a. ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノール

ステップ I I I b. 24, 25 エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノール

50

ステップ I V a. 11-ヒドロキシ-ククルビタジエノール→モグロール

ステップ I V b. 11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロール

ステップ V. モグロール→モグロシド

上記の各ステップを実行するための方法は、本明細書の以下に記載される。特に、上記の各ステップのために有用な酵素または酵素混合物は、本明細書において以下に詳細に記載される。

【0005】

本発明はまた、1または2以上の以下の異種核酸を含む組換え宿主を特徴とする：

I I a. ステップ I I a (オキシド-スクアレノール→ククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

I I b. ステップ I I b (ジオキシド-スクアレノール→24, 25エポキシククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

I I I a. ステップ I I I a (ククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-ククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

I I I b. ステップ I I I b (24, 25エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

I V a. ステップ I V a (11-ヒドロキシ-ククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

I V b. ステップ I V b (11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

V. ステップ V (モグロール→モグロシド) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数)

【0006】

異種核酸に加えて、組換え宿主は、ステップ I a および／またはステップ I b を達成するために改変されていてもよい。

特に別に定義しない限り、本明細書で使用す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の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を、本発明を実施するために用いることができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書で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、その全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含み、本明細書が支配する。さらに、材料、方法、および実施例は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。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になるであろう。出願人は、特許法における標準的な慣行に従い、移行句「含む」、「から本質的になる」、「または「からなる」」を使用して、開示された全ての発明を代替的に請求する権利を留保する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【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 11-オキソモグロシド V の化学構造を示す図である。

【図2】図2は、モグロシドのグルコースからの製造経路の概略図である。

【図3】図3は、モグロールグリコシド (モグロシド) の、スクアレノールからの製造の概略図である。

【図4】図4は、モグロールのククルビタジエノールからの形成のための P 4 5 0 経路であって、発明者により提唱された経路 (上)、および公開されている経路 (下) の概略図である。

【図5】図5は、モグロシド I E 1、モグロシド I A 1、モグロシド I I E、モグロシド I I I A 2、モグロシド I I I、モグロシド I V、およびモグロシド V の、モグロールか

10

20

30

40

50

らの UGT を使用した生合成を示す図である。

【0008】

【図6】図6は、ペクチナーゼおよび／またはセルラーゼとのインキュベーション後の、モグロシドVから得られる生成物の概略図である。

【図7】図7は、S grosvenorii エポキシドヒドロラーゼ2を発現するプラスミドで形質転換された酵母株EFSC3027からの試料中の、テトラヒドロキシスクアレノンのプロトン+Na⁺付加体に対応する、LC-MS質量ピーク501を示す図である。

【図8】図8は、酵母株におけるラノステロールのLC-MSクロマトグラムのピーク（上パネル）、および、ククルビタジエノールシンターゼを発現する酵母株EFSC3498における、ククルビタジエノールとラノステロールのLC-MSクロマトグラムのピーク（下のパネル）を示す図である。

10

【図9】図9は、CYP5491とCPR4497が酵母株EFSC3498中で発現された場合の、3つのピークを有するLC-MSクロマトグラム（上のパネル）を示し、一方下のパネルには、これらの3つのピークの断片化スペクトルを示す。3つのピークの質量（443.38、441.37および457.36）は、それぞれヒドロキシル化ククルビタジエノール、オキソククルビタジエノールおよびヒドロキシ+オキソククルビタジエノールの、プロトン付加体の重量に対応する。

【0009】

【図10A】図10Aは、本発明が提案する、オキシドースクアレノからモグロールおよび11-オキソモグロールへの経路を示す図である。

20

【図10B】図10Bは、本発明が提案する、ジオキシドースクアレノからモグロールおよび11-オキソモグロールへの経路を示す図である。

【図11】図11Aは、参照モグロシドIA1のLC-MSクロマトグラムを示し、一方図11Bは、50μMのモグロールを供給した培養物中でUGT1576を発現する酵母株EFSC1563の試料の、LC-MSクロマトグラムを示す。

【図12】図12Aは、UGT SK98とUGT1576を共発現する酵母株EFSC1563からの試料のLC-MSクロマトグラムであり、ジグリコシル化モグロール（モグロシドIIA）の製造を示す。図12Bは、UGT98とUGT1576を共発現する酵母株EFSC1563からの試料のLC-MSクロマトグラムであり、ジおよびトリグリコシル化モグロールの製造を示す（中および下のフレーム）。

30

【図13】図13は、本発明により提案された、モグロールからモグロシドIIIA1への経路を示す図である。

【0010】

発明の詳細な説明

モグロシドの製造方法

本文書は、微生物、植物細胞、または植物などの組換え宿主を、モグロール（トリテルペンコア）および種々のモグロールグリコシド（モグロシド）の生合成に有用なポリペプチドを発現するように発達させ得るといふ、本発明に基づく。アグリコンモグロールは、異なる数のグルコース部分でグリコシル化されて、様々なモグロシド化合物を形成する。組換え微生物は、特に有用な宿主である。組換え宿主は、本明細書の以下のセクション「組換え宿主」に記載された、任意の組換え宿主であってよい。様々な微生物のシャーシ内でのこれらの生合成ポリペプチドの発現は、モグロールおよびそのグリコシドが、糖、グリセロール、CO₂、H₂および太陽光等のエネルギーおよび炭素源から、一貫した再現可能な方法で製造されることを可能にする。図2は、モグロールおよび様々なモグロシドの、グルコースからの製造のための経路の概略図を提供する。

40

【0011】

本発明の一側面は、1または2以上の以下のステップを含む、モグロシドの製造方法を提供することである：

ステップI a. オキシドースクアレノのレベルを強化すること

ステップI b. ジオキシドースクアレノのレベルを強化すること

50

ステップ I I a. オキシドースクアレン→ククルビタジエノール

ステップ I I b. ジオキシドースクアレン→24, 25エポキシククルビタジエノール

ステップ I I I a. ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノール

ステップ I I I b. 24, 25エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール

ステップ I V a. 11-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロール

ステップ I V b. 11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロール

ステップ V. モグロール→モグロシド

これらの各ステップを実行するための方法および材料は、本明細書において以下により詳細に記載される。方法のステップの各々は、生成物の生成をもたらす。前記生成物はまた、本明細書において「中間生成物」と呼んでもよい。各ステップは、「前駆体分子」とも称される基質を使用する。中間生成物はまた、続くステップのための前駆体分子として機能できることが、上記から明らかである。

【0012】

したがって本発明は、次のステップを含んでもよい、モグロシドの製造方法を提供する：

ステップ I a. オキシドースクアレンのレベルを強化すること

ステップ I I a. オキシドースクアレン→ククルビタジエノール

ステップ I I I a. ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノール

ステップ I V a. 11-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロール

ステップ V. モグロール→モグロシド

および任意に、前記モグロシドを単離すること。

本発明はまた、次のステップを含んでもよい、モグロシドの製造方法を提供する：

a) オキシドースクアレンを提供すること

b) 上記定義のステップ I I a、I I I a、I V aおよびVを実行すること

c) 任意に、前記モグロシドを単離すること。

【0013】

本発明はまた、次のステップを含んでもよい、モグロシドの製造方法を提供する：

ステップ I b. ジオキシドースクアレンのレベルを強化すること

ステップ I I b. ジオキシドースクアレン→24, 25エポキシククルビタジエノール

ステップ I I I b. 24, 25エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール

ステップ I V b. 11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロール

ステップ V. モグロール→モグロシド

および任意に、前記モグロシドを単離すること。

本発明はまた、次のステップを含み得る、モグロシドの製造方法を提供する：

a) ジオキシドースクアレンを提供すること

b) 上記定義のステップ I I b、I I I b、I V bおよびVを実行すること

c) 任意に、前記モグロシドを単離すること。

【0014】

本発明はまた、モグロシドが高度グリコシル化モグロシドである、モグロシドの製造方法であって、方法が次のステップを含んでもよい、前記方法を提供する：

a) ククルビタジエノールを提供すること

b) 上記定義のステップ I I I a、I V aおよびVを実行すること

c) 任意に、前記モグロシドを単離すること。

本発明はまた、モグロシドが高度グリコシル化モグロシドである、モグロシドの製造方法であって、方法が次のステップを含んでもよい、前記方法を提供する：

a) 24, 25エポキシククルビタジエノールを提供すること

- b) 上記定義のステップ I I I b、I V b および V を実行すること
- c) 任意に、前記モグロシドを単離すること。

【0015】

本発明は、方法が次のステップを含んでもよい、モグロシドの製造方法を提供する：

- a) モグロールを提供すること
- b) 上記定義のステップ V を実行すること
- c) 任意に、前記モグロシドを単離すること。

本発明は、方法が次のステップを含んでもよい、モグロールの製造方法を提供する：

- a) ジオキシドースクアレンを提供すること
- b) 上記定義のステップ I I b、I I b、および I V b を実行すること
- c) 任意に、前記モグロールを単離すること。

10

【0016】

一般に方法は、*in vitro* または *in vivo* のいずれかで実施されてよい。いくつかのステップが *in vitro* で実施され、他は *in vivo* で行うことも、本発明内に含まれる。したがって例えば、最初のステップは *in vitro* で実施され、その後中間生成物を、この方法の残りのステップを実施可能な組換え宿主細胞に供給することができる。代替的に、最初のステップは *in vivo* で実施され、その後中間生成物を、*in vitro* で実施される続く 1 または 2 以上のステップのための基質として用いることができる。他の組み合わせも考えられる。

前記方法を *in vitro* で実施する場合、方法のステップの各々は、別々に行ってもよい。代替的に、ステップの 1 または 2 以上を、同じ混合物内で実施してもよい。方法のステップの一部または全てを別々に実施する態様において、各ステップの中間生成物は、次のステップを実施する前に、精製または部分的に精製してもよい。

20

【0017】

前記方法を *in vivo* で実施する場合、方法は、1 または 2 以上の前記酵素を発現する 1 つの組換え宿主の使用を採用するか、または、1 または 2 以上の前記酵素を発現するいくつかの組換え宿主の使用を採用してもよい。方法はまた、組換えおよび非組換え宿主の混合物を使用することもできる。1 より多くの宿主を使用する場合、宿主は共培養してもよく、またはそれらは別々に培養してもよい。宿主を別々に培養する場合、中間生成物を回収し、任意に精製または部分的に精製し、中間生成物を基質として使用して、組換え宿主に供給することができる。本発明で使用する有用な組換え宿主は、以下に記載されている。

30

前記オキシドースクアレン、ジオキシドースクアレン、ククルビタジエノール、24, 25 エポキシククルビタジエノールまたはモグロールは、任意の適切な様式で提供することができる。例えば前記オキシドースクアレン、ジオキシドースクアレン、ククルビタジエノール、24, 25 エポキシククルビタジエノールまたはモグロールは、単離された形態で、または組成物もしくは抽出物の一部として提供することができる。方法を *in vivo* で実施する本発明の態様において、前記オキシドースクアレン、ジオキシドースクアレン、ククルビタジエノール、24, 25 エポキシククルビタジエノールまたはモグロールを、培養培地に添加することができる。また、オキシドースクアレン、ジオキシドースクアレン、ククルビタジエノール、24, 25 エポキシククルビタジエノールまたはモグロールを内因的に発現する組換え宿主を使用することも、本発明の範囲内に含まれる。

40

【0018】

本明細書の以下に記載の組換え宿主は、モグロシド化合物を製造するための方法において使用することができる。例えば、組換え宿主が微生物である場合、方法は、本発明の方法のステップ（単数または複数）を触媒する 1 または 2 種以上の酵素、例えばシンターゼ、ヒドロラーゼ、CYP450 および／または UGT が発現する条件下で、組換え微生物を培養培地中で増殖させることを含むことができる。組換え微生物は、流加培養または連続プロセスで増殖させることができる。一般的には、組換え微生物は発酵槽中で、規定の 1 または 2 以上の温度において所望の時間、増殖させる。

細胞溶解物は、1 または 2 以上の酵素を発現する組換え宿主から調製することができ、

50

モグロシド化合物を製造できるように、基質と接触させるために使用することができる。例えば、細胞溶解物は、1または2種以上のUGTを発現する組換え宿主から調製し、モグロシド化合物を製造できるように、モグロールと接触させるために使用することができる。

【0019】

いくつかの態様において、モグロシド化合物は、例えばモグロールなどの前駆体分子を含む原材料を供給された、全細胞を用いて製造することができる。原材料は、細胞増殖の間または細胞増殖後に、供給してよい。全細胞は、懸濁液中にあってよい、または固定化されていてもよい。全細胞は、発酵プロセス中または反応緩衝液中であってもよい。いくつかの態様において、透過化剤が、基質を細胞内へ効率的に移動させるために必要とされることもある。

製品、基質および中間体のレベルは、公開された方法に従い、分析用に培養培地から試料を抽出することにより、決定することができる。モグロシド化合物は、培養物または培養培地から、当技術分野で知られている様々な技術を用いて回収することができる。

【0020】

組換え宿主

本文書はまた、組換え宿主を特徴とする。本明細書で使用する用語「組換え宿主」は、そのゲノムが、少なくとも1つの組み込まれたDNA配列により増強されているところの宿主を指すことを意図する。前記組み込まれたDNA配列は、1または2以上のポリペプチドをコードする異種核酸であってよい。かかるDNA配列としては、限定はされないが、天然に存在しない遺伝子、通常はRNAに転写されたりタンパク質に翻訳されたりしない（「発現されない」）DNA配列、および非組換え宿主中に導入することが望まれるその他の遺伝子またはDNA配列が挙げられる。典型的には、本明細書に記載の組換え宿主のゲノムは、1または2以上の組換え遺伝子の安定な導入により増強されることが理解されるであろう。前記組換え遺伝子は、1または2以上のポリペプチドをコードする異種核酸であってよい。一般的には、導入されたDNAまたは異種核酸は、DNAのレシピエントである宿主に元々は存在していないものであるが、与えられた宿主からのDNA断片を単離すること、および続いて同じ宿主にそのDNAの1または2以上の追加のコピーを導入して、例えば遺伝子の産物の産生を増強し、または遺伝子の発現パターンを変化させることは、本発明の範囲内である。いくつかの例において、導入されたDNAまたは異種核酸は、例えば相同組換えまたは部位特異的突然変異誘発によって、内因性遺伝子もしくはDNA配列を改変するかまたは置き換える。

【0021】

特に、本発明による組換え宿主は、以下の1または2種以上の異種核酸を含む：

II a. ステップII a（オキシドースクアレン→ククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

II b. ステップII b（ジオキシドスクアレン→24, 25エポキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸；

III a. ステップIII a（ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

III b. ステップIII b（24, 25エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

IV a. ステップIV a（11-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

IV b. ステップIV b（11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

V. ステップV（モグロール→モグロシド）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコード

する異種核酸（単数または複数）。

【0022】

異種核酸に加えて、前記組換え宿主は、ステップ I a および／またはステップ I b を達成するために改変されていてもよい。

これらのステップの各々を触媒可能な酵素は、本明細書の以下にさらに詳細に記載される。

本発明の一態様において、本発明による組換え宿主は、以下の異種核酸を含んでよい：

II a. ステップ II a（オキシドスクアレン→ククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

III a. ステップ III a（ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

IV a. ステップ IV a（11-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

V. ステップ V（モグロール→モグロシド）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）、

および任意に、前記組換え宿主はさらに、ステップ I a を達成するために改変されていてもよい。

前記組換え宿主細胞は特に、モグロシドを製造する方法において有用である。

【0023】

本発明の一態様において、本発明による組換え宿主は、以下の異種核酸を含んでよい：

III a. ステップ III a（ククルビタジエノール→11-ヒドロキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

IV a. ステップ IV a（11-ヒドロキシククルビタジエノール→モグロール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

V. ステップ V（モグロール→モグロシド）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）。

前記組換え宿主細胞は特に、ククルビタジエノールを提供するステップを含む、モグロシドを製造する方法において有用である。

【0024】

本発明の一態様において、本発明による組換え宿主は、以下の異種核酸を含んでよい：

V. ステップ V（モグロール→モグロシド）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）。

前記組換え宿主細胞は特に、モグロールを提供するステップを含む、モグロシドを製造する方法において有用である。

本発明の一態様において、本発明による組換え宿主は、以下の異種核酸を含んでよい：

II b. ステップ II b（ジオキシドスクアレン→24, 25エポキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

III b. ステップ III b（24, 25エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

IV b. ステップ IV b（11-ヒドロキシ-24, 25エポキシククルビタジエノール→モグロール）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）；

V. ステップ V（モグロール→モグロシド）を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）。

および任意に、前記組換え宿主は、ステップ I b を達成するために改変されていてもよい。

前記組換え宿主細胞は特に、モグロシドを製造する方法において有用である。

【0025】

本発明の一態様において、本発明による組換え宿主は、以下の異種核酸を含んでよい：

I I I b. ステップ I I I b (24, 25 エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ；

I V b. ステップ I V b (11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ；

V. ステップ V (モグロール→モグロシド) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) 。

10

前記組換え宿主細胞は特に、24, 25 エポキシククルビタジエノールを提供するステップを含む、モグロシドを製造する方法において有用である。

【0026】

本発明の一態様において、本発明による組換え宿主は、以下の異種核酸を含んでよい：

I I b. ステップ I I b (ジオキシド-スクアレン→24, 25 エポキシククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ；

I I I b. ステップ I I I b (24, 25 エポキシククルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 (単数または複数) ；

I V b. ステップ I V b (11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシククルビタジエノール→モグロール) を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸 ；

20

および任意に、前記組換え宿主は、ステップ I b を達成するために改変されていてもよい。

前記組換え宿主細胞は特に、モグロールを製造する方法において有用である。

適切な組換え宿主は、微生物、植物細胞および植物を含む。

【0027】

したがって、一態様において、モグロシド化合物を製造する組換え宿主は、73C3、73C6、85C2、73C5 および 73E1 からなる群から選択される少なくとも第1のUGTをコードする組換え遺伝子、およびUGT98、UGT1495、UGT1817、UGT5914、UGT8468 および UGT10391 からなる群から選択される少なくとも第2のUGTをコードする組換え遺伝子を含むことができる。例えば、組換え宿主は、73C3、73C6、85C2 および 73E1 から選択される少なくとも1つのUGTをコードする組換え遺伝子；73C5をコードする組換え遺伝子；およびUGT98、UGT1495、UGT1817、UGT5914、UGT8468 および UGT10391 からなる群から選択される少なくとも1つのUGTをコードする組換え遺伝子を含むことができる。以下の1または2以上もまた、組換え宿主に含めることができる：ククルビタジエノールシンターゼをコードする組換え遺伝子 (例えば *Cucurbita pepo* または *モンクフルーツ* (ラカンカ) より) ；CYP533、CYP937、CYP1798、CYP1994、CYP2048、CYP2740、CYP3404、CYP3968、CYP4112、CYP4149、CYP4491、CYP5491、CYP6479、CYP7604、CYP8224、CYP8728、CYP10020、およびCYP10285から選択されるシトクロムP450ポリペプチドをコードする組換え遺伝子 (それぞれ、配列番号3~20) ；およびスクアレンシンターゼをコードする組換え遺伝子 (例えば、*Gynostemma pentaphyllum* または *Arabidopsis thaliana* より) 。CYP5491は、以前にはCYP87とも称されている。

30

40

【0028】

組換え宿主中の遺伝子の少なくとも1つは、組換え遺伝子であり、使用のために選択された種または株に依存する、特定の1または2以上の組換え遺伝子である。追加の遺伝子または生合成モジュールを含むことにより、モグロールおよびモグロシドの収率を増加させ、エネルギーおよび炭素源をモグロールおよびモグロシドに変換する効率を向上させ、

50

および／または細胞培養物もしくは植物からの生産性を向上させることができる。

組換え宿主はさらに、ククルビタジエノールシンターゼをコードする組換え遺伝子、および／またはシトクロム P 4 5 0 ポリペプチドをコードする組換え遺伝子（例えば、CYP 5 3 3、CYP 9 3 7、CYP 1 7 9 8、CYP 1 9 9 4、CYP 2 0 4 8、CYP 2 7 4 0、CYP 3 4 0 4、CYP 3 9 6 8、CYP 4 1 1 2、CYP 4 1 4 9、CYP 4 4 9 1、CYP 5 4 9 1、CYP 6 4 7 9、CYP 7 6 0 4、CYP 8 2 2 4、CYP 8 7 2 8、CYP 1 0 0 2 0、または CYP 1 0 2 8 5）、および／またはスクアレニンシンターゼをコードする組換え遺伝子を含むことができる。

【0029】

また本発明に含まれるのは、組換え宿主を改変し得て、グルカナーゼ活性、特にモグロシドの脱グルコシル化をもたらし得るグルカナーゼ活性を、減少させることである。したがって組換え宿主は、例えばエキソ-1, 3-β-グルカナーゼ活性を低減する、または消滅させるために改変することができる。組換え宿主が酵母である本発明の態様において、これは、EXG1遺伝子および／またはEXG2遺伝子の欠失により達成することができ、これらは両者とも、エキソ-1, 3-β-グルカナーゼをコードする遺伝子である。

用語「組換え遺伝子」とは、レシピエント宿主に導入される遺伝子またはDNA配列を指し、これは、同一または類似の遺伝子またはDNA配列がすでに宿主に存在しているかどうかには関係しない。用語「異種核酸」とは、レシピエント宿主に導入される核酸を指し、ここで該宿主は、該核酸を内因的に含まないものである。この文脈における「導入される」または「増強される」とは、当技術分野において、人の手によって導入または増強されることを意味することが知られている。したがって、組換え遺伝子は別の種からのDNA配列であってもよく、または同じ種に由来するかもしくはこれに存在するが、組換え方法によって宿主に組み込まれて、組換え宿主を形成するものであってもよい。宿主に導入された組換え遺伝子は、形質転換される宿主に通常存在するDNA配列と同一であることができ、DNAの1または2以上の追加のコピーを提供するために導入されて、このDNAの遺伝子産物の過剰発現または改変された発現を可能とすることが、理解される。

【0030】

本明細書に記載の、ポリペプチドをコードする組換え遺伝子は、ポリペプチドを発現するのに適した1または2以上の調節領域にセンス方向で作動可能に連結した、そのポリペプチドのコード配列を含む。多くの微生物は、ポリシストロン性mRNAからの複数の遺伝子産物を発現することができるため、所望であれば、複数のポリペプチドを、それらの微生物のための単一の調節領域の制御下で発現させることができる。コード配列および調節領域は、調節領域とコード配列が、調節領域が配列の転写または翻訳を調節するのに有効であるように配置されている場合に、作動可能に連結されていると考えられる。典型的には、コード配列の翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位は、モノシストロン性遺伝子のための調節領域の下流1〜約50ヌクレオチドの間に配置される。多くの場合、本明細書に記載のポリペプチドのコード配列は、組換え宿主以外の種において同定された、すなわち異種の、核酸である。したがって組換え宿主が微生物である場合、コード配列は、他の原核微生物または真核微生物から、植物から、または動物からのものであることができる。いくつかの場合にはしかし、コード配列は、宿主に対してネイティブであって、その生物に再導入された配列である。ネイティブ配列の、天然に存在する（naturally occurring）配列からの識別は、多くの場合、外因性核酸に連結された非天然（non-natural）配列の存在により、例えば、組換え核酸構築物中のネイティブ配列に隣接する非ネイティブ調節配列の存在により、行うことができる。かかる配列もまた、異種核酸と考えることができる。さらに、安定に形質転換された外因性核酸は、典型的には、ネイティブ配列が見出される位置以外の位置に組み込まれている。

【0031】

「調節領域」とは、転写または翻訳の開始または速度、および転写または翻訳産物の安定性および／または移動性に影響を与えるヌクレオチド配列を有する核酸を指す。調節領域は、限定することなく、プロモーター配列、エンハンサー配列、応答エレメント、タン

パク質認識部位、誘導性エレメント、タンパク質結合配列、5'および3'非翻訳領域（UTR）、転写開始部位、終結配列、ポリアデニル化配列、イントロン、およびそれらの組み合わせを含む。調節領域は、典型的には、少なくともコア（基礎）プロモーターを含む。調節領域はまた、少なくとも1つの制御エレメント、例えばエンハンサー配列、上流エレメントまたは上流活性化領域（UAR）を含んでよい。調節領域がコード配列に作動可能に連結されるのは、調節領域が配列の転写または翻訳を調節するのに有効であるように、調節領域とコード配列を配置することによる。例えば、コード配列とプロモーター配列を作動可能に連結するために、コード配列の翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位は、典型的にはプロモーターの1～約50ヌクレオチド下流に配置される。しかし調節領域は、さらに離れて、例えば翻訳開始部位の約5,000ヌクレオチドも上流に、または転写開始部位の約2,000ヌクレオチド上流に、配置することもできる。

10

【0032】

含める調節領域の選択は、限定することなく、効率、選択性、誘導性、所望の発現レベル、および一定の培養段階における優先的発現を含む、いくつかの要因に依存する。当業者にとって、調節領域をコード配列に対して適切に選択して配置することにより、コード配列の発現を調節することは、ルーチンの事柄である。1つより多くの調節領域、例えばイントロン、エンハンサー、上流活性化領域、転写ターミネーター、および誘導性エレメントなどが存在してよいことが、理解されるであろう。1または2以上の遺伝子を、組換え核酸構築物中に、モグロシド製造の個別の側面のために有用な「モジュール」として組み合わせることができる。モジュール、特にポリシストロン性モジュール内に複数の遺伝子を組み合わせることで、様々な種におけるモジュールの使用を容易にする。モグロシド製造に有用な遺伝子に加えて、組換え構築物は、典型的には、複製起点および、適切な種における構築物の維持のための1または2以上の選択マーカーも含有する。

20

【0033】

遺伝コードの縮重により、多数の核酸が、特定のポリペプチドをコード可能であることが理解されるであろう；すなわち、多くのアミノ酸について、このアミノ酸のためのコドンとして機能する複数のヌクレオチドトリプレットが存在する。したがって、所与のポリペプチドのコード配列中のコドンは、特定の宿主における最適な発現が、その宿主（例えば、微生物）に対する適切なコドンバイアス表を使用して得られるように、変更することができる。核酸はまた、特定の宿主に好ましいGC含量に関して、および／または反復配列の数を減らすために、最適化することができる。単離された核酸として、これらの改変された配列は精製された分子として存在することができ、組換え核酸構築物のモジュールを構成する際に使用するベクターまたはウイルスに組み込むことができる。

30

【0034】

多数の原核生物および真核生物が、本発明の組換え宿主として使用するのに適している。したがって、組換え宿主は、例えばグラム陰性細菌、酵母および真菌からなる群から選択されてよい。モグロシド生産株として使用するために選択された種および株を、どの生産遺伝子が株に対して内因性であり、どの遺伝子が存在しないかを決定するために分析する。内因性の対応物が株に存在しない遺伝子を、1または2以上の組換え構築物中に集合させて、これを次に、欠落した機能（単数または複数）を供給するために、株に形質転換する。こうして、ステップI Ia、I I I a、I V aおよびVのどれが宿主によって既に実施されたかを分析することができ、次にこの宿主を、残りのステップを触媒する酵素をコードする異種核酸の導入によって、改変することができる。同様に、ステップI I b、I I I b、I V bおよびVのどれが宿主によって既に実施されたかを分析することができ、次にこの宿主を、残りのステップを触媒する酵素をコードする異種核酸の導入によって、改変することができる。前に述べたように、組換え宿主はまた、オキシドースクアレンおよび／またはジオキシドースクアレンのレベルを増加させるために、改変することができる。

40

【0035】

本発明の組換えとして有用な、例示の原核生物および真核生物の種を、以下により詳細

50

に記載する。しかし、他の種も適切であり得ることが理解されるであろう。例えば、組換え宿主は、*Agaricus*（ハラタケ属）、*Aspergillus*（アスペルギルス属）、*Bacillus*（バチルス属）、*Candida*（カンジダ属）、*Corynebacterium*（コリネバクテリウム属）、*Escherichia*（大腸菌属）、*Fusarium*/*Gibberella*（フザリウム属/ジベレラ属）、*Kluyveromyces*（クルイベロミセス属）、*Laetiporus*（ラエチポルス属）、*Lentinus*（マツオウジ属）、*Phaffia*（ファフィア属）、*Phanerochaete*（ファネロカエテ属）、*Pichia*（ピキア属）、*Physcomitrella*（ニセツリガネゴケ属）、*Rhodoturula*、*Saccharomyces*（サッカロミセス属）、*Schizosaccharomyces*（シゾサッカロミセス属）、*Sphaceloma*、*Xanthophyllomyces*および*Yarrowia*（ヤロウィア属）からなる群から選択される属のものであってよい。組換え宿主として有用な、かかる属からの例示の種としては、*Lentinus tigrinus*、*Laetiporus sulphureus*、*Phanerochaete chrysosporium*、*Pichia pastoris*、*Physcomitrella patens*、*Rhodoturula glutinis*、*Rhodoturula mucilaginosus*、*Phaffia rhodozyma*、*Xanthophyllomyces dendrorhous*、*Fusarium fujikuroi*/*Gibberella fujikuroi*、*Candida utilis*および*Yarrowia lipolytica*が挙げられる。いくつかの態様において、組換え宿主は微生物であってよく、例えば、*Gibberella fujikuroi*、*Kluyveromyces lactis*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Aspergillus niger*または*Saccharomyces cerevisiae*などの子囊菌類であってよい。いくつかの態様において、組換え宿主は微生物であってよく、例えば*Escherichia coli*、*Rhodobacter sphaeroides*または*Rhodobacter capsulatus*などの原核生物である。特定の微生物を用いて、目的の遺伝子をハイスループット様式でスクリーニングおよび試験することができ、一方所望の生産性や増殖特性を有する他の微生物を、モグロシド化合物の大規模生産のために使用できることが理解されるであろう。特に、食品グレードの微生物は、大規模生産のために有用となり得る。

【0036】

Saccharomyces cerevisiae

前述のように、組換え宿主は例えば、*Saccharomyces cerevisiae*であってよい。*Saccharomyces cerevisiae*は、合成生物学において広く使用されているシャーシ生物であり、組換え微生物プラットフォームとして使用することができる。*S. cerevisiae*に対して利用可能な変異体のライブラリー、プラスミド、代謝についての詳細なコンピュータモデルおよびその他の情報があり、生成物の収率を高めるための様々なモジュールの合理的設計を可能にしている。組換え微生物を作製するための方法が知られている。Brochado et al. 2010 (Microb Cell Fact. 9:84)からの*S. cerevisiae*のVG4株は特に有用である。VG4は

cdlΔgdh1Δ↑GDH2の遺伝子型を有する。*S. cerevisiae*の別の非常に有用な株は、以下の例9に記載されているBY4742、またはKirby、J et al in FEBS Journal 275 (2008) 1852-1859に記載の酵母株である。

【0037】

Aspergillus spp.

組換え宿主はまた、*A. oryzae*、*A. niger*および*A. sojae*などの*Aspergillus*種であってよい。例えば前述のものなどのアスペルギルス属は、食品生産において広く使用されている微生物であり、組換え微生物プラットフォームとしても使用することができる。*A. nidulans*、*A. fumigatus*、*A. oryzae*、*A. clavatus*、*A. flavus*、*A. niger*、および*A. terreus*のゲノムに対するヌクレオチド配列が利用可能であり、フラックスを強化し生成物の収率を高めるための内因性経路の合理的な設計および改変を可能にする。これらのいずれも、組換え宿主として使用することができる。代謝モデルが、*Aspergillus*について、ならびにトランスクリプトーム研究およびプロテオミクス研究のために開発されている。*A. niger*は、クエン酸およびグルコン酸などの多くの食品成分の工業的生産のために培養され、したがって、*A. niger*などの種は、食品成分の製造に一般に適している。

【0038】

Escherichia coli

組換え宿主はまた、合成生物学において広く使用されている別のプラットフォームの生物である*Escherichia coli*であってよい。*Saccharomyces*と同様に、*E. coli*に対して利

用可能な変異体のライブラリー、プラスミド、代謝の詳細なコンピュータモデルおよびその他の情報があり、生成物の収率を高めるための様々なモジュールの合理的設計を可能にしている。Saccharomycesについて上述したものと類似の方法を、組換えE. coli微生物を作製するために使用することができる。

Rhodobacter spp.

組換え宿主はまた、Rhodobacterであってもよい。大腸菌と同様に、利用可能な変異体のライブラリー、および適切なプラスミドベクターがあり、生成物の収率を向上させるために様々なモジュールの合理的設計を可能にする。E. coliについて上述したものと類似の方法を、組換えRhodobacter微生物を作製するために使用することができる。

Physcomitrella spp.

組換え宿主はまた、Physcomitrellaコケ類であってもよい。Physcomitrellaコケ類は、懸濁培養中で増殖させた場合、酵母または他の真菌の培養物に類似した特性を有する。この属は、細胞の他の種類における生産が困難となり得る、植物の二次代謝産物の生産のための、細胞の重要な種類となっている。

【0039】

ステップ I a – オキシドースクアレンのレベルの強化

本明細書に上述したように、本発明の方法は、オキシドースクアレンのレベルを強化するステップを含んでよい。これは、ステップ I I aを含み、該ステップ I I aをin vivoで実施する方法に特に関連する。ステップ I aは特に、方法で使用する組換え宿主を、前記組換え宿主中のオキシドースクアレンのレベルを強化するような様式で改変することにより、実施することができる。本発明はまた、オキシドースクアレンのレベルを強化するように改変された、組換え宿主にも関する。

したがって、方法はまた、オキシドースクアレン、特に2, 3-オキシドースクアレンの形成をもたらす1または2以上のステップを含んでもよい。前記ステップは、好ましくは、以下に記載のステップ I I aの前に、またはこれと同時に実施される。図3は、スクアレンからモグロシドへの経路の概略図を提供する。

【0040】

オキシドースクアレンの製造における1つのステップは、ファルネシルピロリン酸からのスクアレンの製造である。スクアレンのファルネシルピロリン酸からの製造を触媒する酵素の1つは、スクアレンシンターゼ（スクアレンシンターゼとも称される）である。前記スクアレンシンターゼは、EC 2.5.1.21に分類される任意の酵素であってよい。反応は、典型的にはNADPHを補基質として使用して進行すると考えられている。したがってこの方法は、NADPHの存在下で、スクアレンシンターゼによって触媒される、ファルネシルピロリン酸からスクアレンを製造するステップを含むことができる。方法がin vivoで実施される本発明の態様において、組換え宿主はしたがって、スクアレンシンターゼをコードする異種核酸を含むことができる。いくつかの組換え宿主は内因性スクアレンシンターゼを含んでよく、この場合内因性の酵素で十分である。内因性スクアレン生産経路は酵母の代謝に存在し、したがって組換え宿主が酵母である場合には、本ステップは、組換え宿主に対して内因性となり得る。

【0041】

スクアレンシンターゼは、任意の有用なスクアレンシンターゼであってよい。例えばスクアレンシンターゼは、別のウリ科植物であるGynostemma pentaphyllum（タンパク質受入番号C4P9M2）からのスクアレンシンターゼであってもよい。スクアレンシンターゼは例えば、以下からなる群：Arabidopsis thaliana（タンパク質受入番号C4P9M2）、Brassica napus、Citrus macrophylla、Euphorbia tirucalli（タンパク質受入番号B9WZW7）、Glycine max、Glycyrrhiza glabra（タンパク質受入番号Q42760、Q42761）、Glycyrrhiza uralensis（タンパク質受入番号D6QX40、D6QX41、D6QX42、D6QX43、D6QX44、D6QX45、D6QX47、D6QX39、D6QX55、D6QX38、D6QX53、D6QX37、D6QX35、B5AID5、B5AID4、B5AID3、C7EDD0、C6KE07、C6KE08、C7EDC9）、Lotus japonicas（タンパク質受入番号Q84LE3）、Medicago truncatula（タンパク質受入番号Q8GSL6）、Pisum sativum、Ricinus communis（タン

10

20

30

40

50

パク質受入番号B9RHC3)、およびPrunus mumeからのスクアレニンシンターゼ、ならびに上述の任意の機能的相同体であって、これらと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するものから、選択されてよい。増加したコピー数、スクアレニンシンターゼをコードする異種核酸、またはネイティブスクアレニンシンターゼの発現の増加は、組換え宿主において製造されるモグロシドのレベルを改善することができる。

【0042】

オキシドースクアレニンの製造における別のステップは、オキシドースクアレニンのスクアレニンからの製造であってよい。オキシドースクアレニンのスクアレニンからの製造を触媒する酵素の1つは、スクアレニンエポキシダーゼ(スクアレニンモノオキシゲナーゼとも称される)である。前記スクアレニンエポキシダーゼは、EC 1.4.99.7に分類される任意の酵素であってよい。反応は、典型的にはNADPHを補基質として使用して進行すると考えられている。したがってこの方法は、NADPHの存在下で、スクアレニンエポキシダーゼによって触媒される、オキシドースクアレニンをスクアレニンから製造するステップを含むことができる。方法がin vivoで実施される本発明の態様において、組換え宿主はしたがって、スクアレニンエポキシダーゼをコードする異種核酸を含むことができる。いくつかの組換え宿主は内因性スクアレニンエポキシダーゼを含んでよく、この場合内因性の酵素で十分である。内因性オキシドースクアレニン生産経路は酵母の代謝に存在し、したがって組換え宿主が酵母である場合には、本ステップは、組換え宿主に対して内因性となり得る。しかし、オキシドースクアレニンのレベルを強化するためには、それでも、追加のスクアレニンエポキシ

【0043】

スクアレニンエポキシダーゼは、任意の有用なスクアレニンエポキシダーゼであってよい。スクアレニンエポキシダーゼは例えば、ウリ科植物であるGynostemma pentaphyllum(タンパク質受入番号C4P9M2)からのスクアレニンエポキシダーゼであってもよい。スクアレニンエポキシダーゼはまた、以下からなる群: Arabidopsis thaliana(タンパク質受入番号Q9SM02、065403、065402、065404、081000、またはQ9T064)、Brassica napus(タンパク質受入番号065727、065726)、Euphorbia tirucalli(タンパク質受入番号A7VJN1)、Medicago truncatula(タンパク質受入番号Q8GSM8、Q8GSM9)、Pisum sativum、およびRicinus communis(タンパク質受入番号B9R6V0、B9S7W5、B9S6Y2、B9T0Y3、B9S7T0、B9SX91)からのスクアレニンエポキシダーゼ、ならびに上述の任意の機能的相同体であって、これらと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するものから選択されてよい。増加したコピー数、スクアレニンエポキシダーゼをコードする異種核酸、またはネイティブスクアレニンエポキシダーゼの発現の増加は、組換え宿主において製造されるモグロシドのレベルを改善することができる。

【0044】

スクアレニンエポキシダーゼはまた、S. cerevisiaeのERG1遺伝子の産物であってよい。したがってスクアレニンエポキシダーゼは、配列番号54のポリペプチドまたはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

一態様において、組換え宿主は、該宿主細胞においてスクアレニンエポキシダーゼの高発現を導く配列に作動可能に連結された、スクアレニンエポキシダーゼをコードする異種核酸を含む。したがって、スクアレニンエポキシダーゼは組換え宿主に対して内因性であってもよいが、発現レベルは、スクアレニンエポキシダーゼをコードする核酸の追加のコピーにより、および/またはより強力なプロモーターの使用により、高めることができる。

【0045】

オキシドースクアレニンは、ラノステロール製造のための基質として機能する。したがって、一態様において、オキシドースクアレニンのレベルは、ラノステロールシンターゼの活性を低下させることによって高めることができる。内因性ラノステロールシンターゼを発

現する組換え宿主において、これは、ラノステロールシンターゼの発現を指向する内因性プロモーターを、より低いレベルのラノステロールシンターゼの発現を指向するより弱いプロモーターと置換することにより、達成され得る。酵母において、ERG7遺伝子はラノステロールシンターゼをコードする。したがって組換え宿主が酵母である場合、ERG7遺伝子のプロモーターを、ERG7の内因性発現レベルより低い発現レベルを導く別のプロモーターに置換してもよい。ラノステロールシンターゼは、このように、*S. cerevisiae*のERG7遺伝子の産物であってよく、ここでこの配列は本明細書において配列番号55として提供され、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

10

【0046】

便利な弱いプロモーターの例は、MET3遺伝子のメチオニン抑制性プロモーターまたはCUP1銅誘導性プロモーターを含む。ラノステロールシンターゼの活性を低下させる方法の非限定的な例は、本明細書の以下の例9において、またはKirby et al., 2008（上記参照）に記載され、これらは本明細書に参照により組み込まれる。*S. cerevisiae*のラノステロールシンターゼの配列は、配列番号55として提供される。したがって、組換え宿主が*S. cerevisiae*である場合、配列番号55のポリペプチドは、野生型*S. cerevisiae*における前記ポリペプチドのレベルよりも低いレベルで発現される。同様に、組換え宿主が配列番号55のポリペプチドと類似のポリペプチド（例えば配列番号55と少なくとも70%同一）を発現する場合、配列番号55と少なくとも70%同一の前記ポリペプチドが、野生型宿主における前記ポリペプチドのレベルよりも低いレベルで発現されるのが好ましい。

20

さらに、酵素3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAレダクターゼの切断型（tHMG1）の発現もまた、オキシドースクアレンの強化されたレベルをもたらし得る。酵母HMGレダクターゼの有用な切断型（tHMG1）は、Donald et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3341-3344に記載されている。

【0047】

ステップI b - ジオキシドースクアレンのレベルの強化

本明細書に上述したように、本発明の方法は、ジオキシドースクアレンのレベルを強化するステップを含んでよい。これは、ステップI I bを含み、該ステップI I bをin vivoで実施する方法に特に関連する。ステップI bは特に、方法で使用する組換え宿主を、前記組換え宿主中のジオキシドースクアレンのレベルを強化するような様式で改変することにより、実施することができる。本発明はまた、ジオキシドースクアレンのレベルを強化するように改変された、組換え宿主にも関する。

30

したがって方法はまた、ジオキシドースクアレンのレベルの強化をもたらす1または2以上のステップを含んでもよい。前記ステップは、好ましくは、以下に記載のステップI I bの前に、またはこれと同時に実施される。

【0048】

本発明は、特にジオキシドースクアレンのレベルが、スクアレンエポキシダーゼの高発現によって強化され得ることを記載する。前記スクアレンエポキシダーゼは、本明細書上記のセクション「ステップI a - オキシドースクアレンのレベルの強化」に記載の任意のスクアレンエポキシダーゼであってよい。具体的には、スクアレンエポキシダーゼは、*S. cerevisiae*のERG1遺伝子の産物であってよい。したがって、スクアレンエポキシダーゼは、配列番号54のポリペプチド、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。高発現レベルは、スクアレンエポキシダーゼをコードする異種核酸を、宿主細胞における前記スクアレンエポキシダーゼの高発現を導く配列に作動可能に連結された宿主細胞に導入することによって、達成することができる。したがって、スクアレンエポキシダーゼは、組換え宿主に対して内因性であってもよいが、しかし発現レベルは、スクアレンエポキシダーゼをコードする核酸の追加

40

50

のコピーにより、および／またはより強力なプロモーターの使用により、高めることができる。

【0049】

ジオキシドースクアレンのレベルは、ラノステロールシンターゼの活性を低下させることによって強化することができる。ラノステロールシンターゼの活性は、本明細書上記のセクション「ステップ I a – オキシドースクアレンのレベルの強化」に記載の任意の方法のいずれかによって低減することができる。

ジオキシドースクアレンのレベルはまた、酵素 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA レダクターゼの切断型 (t H M G 1) の発現によって強化することができ、これはオキシドースクアレンのレベルの強化ももたらし得る。酵母 H M G レダクターゼの有用な切断型 (t H M G 1) は、Donald et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3341-3344 に記載されている。

10

【0050】

ステップ I I a – オキシドースクアレン→ククルビタジエノール

本明細書に上述したように、本発明の方法は、オキシドースクアレンから、特に 2, 3-オキシドースクアレンから、オキシドースクアレンの変換を触媒することができてククルビタジエノールを形成する酵素または酵素混合物を使用して、ククルビタジエノールを製造するステップを含んでよい。本発明はまた、オキシドースクアレンのククルビタジエノールへの変換を触媒可能な酵素をコードする異種核酸を含む組換え宿主にも関する。

ステップは、in vitro にて、オキシドースクアレンを含む組成物を、オキシドースクアレンの変換を触媒することができてククルビタジエノールを形成する前記酵素または酵素混合物と共にインキュベートすることにより、実施することができる。

20

【0051】

ステップはまた in vivo で、オキシドースクアレンの変換を触媒することができてククルビタジエノールを形成する酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主がオキシドースクアレン生合成経路の 1 または 2 以上の酵素を発現することによって、オキシドースクアレンを製造可能であってもよい。代替的に、オキシドースクアレンを、例えば培養培地中の前記組換え宿主に提供してもよい。

オキシドースクアレンの変換を触媒することができてククルビタジエノールを形成する酵素または酵素混合物は好ましくは、ククルビタジエノールシンターゼを含むか、またはこれからなる。

30

前記ククルビタジエノールシンターゼは、任意の有用なククルビタジエノールシンターゼであってよく、例えば、オキシドースクアレンシクラーゼとして分類されているククルビタジエノールシンターゼ、例えば Shibuya, Tetrahedron, Vol 60: pp. 6995-7003 (2004) に記載のオキシドースクアレンシクラーゼである。

【0052】

Cucurbita pepo からのククルビタジエノールシンターゼのアミノ酸配列は、本明細書に配列番号 1 として提供され、さらに GenBank においてタンパク質受入番号 BAD34645.1 として提供される。本発明の一態様において、ククルビタジエノールシンターゼは、配列番号 1 のポリペプチド、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である。

40

例 5 に記載したように、モンクフルーツからのククルビタジエノールシンターゼを同定し、ポリペプチドの C 末端部分の配列を決定した。モンクフルーツポリペプチドの C 末端部分のアミノ酸配列は、本明細書に配列番号 2 として提供される。配列番号 2 は、配列番号 1 に示す C. pepo ポリペプチドの残基 515 ~ 764 と 97.5 % 同一である。したがって、本発明の一態様において、ククルビタジエノールシンターゼは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0053】

50

好ましい態様において、ククルビタジエノールシンターゼは、配列番号 43 のポリペプチド、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である。

他の相同タンパク質で、同様の長さで配列番号 1 と約 70 % 以上の相同性を有するものを見出すことができる。かかる相同体は、*Lotus japonicas* (BAE53431)、*Populus trichocarpa* (XP_002310905)、*Actaea racemosa* (ADC84219)、*Betula platyphylla* (BAB83085)、*Glycyrrhiza glabra* (BAA76902)、*Vitis vinifera* (XP_002264289)、*Centella asiatica* (AAS01524)、*Panax ginseng* (BAA33460)、および *Betula platyphylla* (BAB83086) からのポリペプチドを含む。ククルビタジエノールシンターゼは、上記のいずれか、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

【0054】

ステップ I I b — ジオキシドースクアレン → 24, 25 エポキシククルビタジエノール

本明細書に上述したように、本発明の方法は、ジオキシドースクアレンから、オキシドースクアレンの変換を触媒することができてククルビタジエノールを形成する酵素または酵素混合物を用いて、24, 25 エポキシククルビタジエノールを製造するステップを含んでよい。本発明はまた、ジオキシドースクアレンの 24, 25 エポキシククルビタジエノールへの変換を触媒可能な酵素をコードする異種核酸を含む組換え宿主にも関する。

ステップは *in vitro* で、ジオキシドースクアレンを含む組成物を、ジオキシドースクアレンの変換を触媒することができて 24, 25 エポキシククルビタジエノールを形成する酵素または酵素混合物と共にインキュベートすることによって、実施することができる。

【0055】

ステップはまた *in vivo* で、ジオキシドースクアレンから 24, 25 エポキシククルビタジエノールへの変換を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主がジオキシドースクアレン生合成経路の 1 または 2 以上の酵素を発現することによって、ジオキシドースクアレンを製造可能であってもよい。しかし、前記組換え宿主は、本明細書上記のセクション「ステップ I b ジオキシドースクアレンのレベルの強化」に記載した方法のいずれかで、ジオキシドースクアレンのレベルを強化するように改変されていることが好ましい。代替的に、ジオキシドースクアレンは、例えば培養培地中の前記組換え宿主に提供されてもよい。

ジオキシドースクアレンから 24, 25 エポキシククルビタジエノールへの変換を触媒可能な前記酵素または酵素混合物は好ましくは、ククルビタジエノールシンターゼを含むか、これからなる。

【0056】

前記ククルビタジエノールシンターゼは、任意の有用なククルビタジエノールシンターゼであってよく、例えば、オキシドースクアレンシクラーゼとして分類されているククルビタジエノールシンターゼ、例えば Shibuya, Tetrahedron, Vol 60: pp. 6995-7003 (2004) に記載のオキシドースクアレンシクラーゼである。本発明の一態様において、ククルビタジエノールシンターゼは、配列番号 1 のポリペプチド、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である。

好ましい態様において、ククルビタジエノールシンターゼは、配列番号 43 のポリペプチド、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体である。

【0057】

他の相同タンパク質で、同様の長さで配列番号 1 と約 70 % 以上の相同性を有するもの

を見出すことができる。かかる相同体は、*Lotus japonicas* (BAE53431)、*Populus trichocarpa* (XP_002310905)、*Actaea racemosa* (ADC84219)、*Betula platyphylla* (BAB83085)、*Glycyrrhiza glabra* (BAA76902)、*Vitis vinifera* (XP_002264289)、*Centella asiatica* (AAS01524)、*Panax ginseng* (BAA33460)、および *Betula platyphylla* (BAB83086) からのポリペプチドを含む。ククルビタジエノールシンターゼは、上記のいずれか、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

【0058】

ステップ I I I a — ククルビタジエノール → 11-ヒドロキシククルビタジエノール

10

本明細書に上述したように、本発明の方法は、ククルビタジエノールから、ククルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて 11-ヒドロキシククルビタジエノールを形成する酵素または酵素混合物を用いて、11-ヒドロキシククルビタジエノールを製造するステップを含んでよい。

ステップは *in vitro* で、ククルビタジエノールを含む組成物を、ククルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて 11-ヒドロキシククルビタジエノールを形成する酵素と共にインキュベートすることによって、実施することができる。

ステップはまた *in vivo* で、ククルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて 11-ヒドロキシククルビタジエノールを形成する酵素をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主がククルビタジエノール生合成経路の 1 または 2 以上の酵素を発現することによって、ククルビタジエノールを製造可能であってもよい。代替的に、ククルビタジエノールは、例えば培養培地中の前記組換え宿主に提供されてもよい。

20

【0059】

ククルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて 11-ヒドロキシククルビタジエノールを形成する前記酵素は、シトクロム P 450 酵素の群から選択される。

例 7 に示すように、CYP533、CYP937、CYP1798、CYP1994、CYP2048、CYP2740、CYP3404、CYP3968、CYP4112、CYP4149、CYP4491、CYP5491、CYP6479、CYP7604、CYP8224、CYP8728、CYP10020、および CYP10285（それぞれ、配列番号 3～20 によりコードされる）の 1 または 2 以上を用いて、モグロールを製造することができる。eYAC 技術を用いて、例 8 に記載のように、シトクロム P 450 酵素の活性を評価することができる。代替的に、*in vitro* 反応を用いて、活性を評価することができる。したがって、本発明の一態様において、少なくとも 1 つのシトクロム P 450 酵素は、以下からなる群から選択される：配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 の核酸配列によりコードされるポリペプチド、またはアミノ酸レベルにおいてこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体。

30

40

【0060】

本発明の好ましい態様において、ククルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて 11-ヒドロキシククルビタジエノールを形成する酵素は、CYP5491 である。したがって、ククルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒して 11-ヒドロキシククルビタジエノールを形成する酵素は、配列番号 44 のポリペプチド、またはこれと少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 98 % の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

50

本発明の一態様において、このステップは、少なくとも1つのCYP活性剤により補助されてもよい。本発明の方法のこのステップはしたがって、少なくとも1つのCYP活性剤と組み合わせた、上記のシトクロムP450酵素の使用を含むことができる。したがって、組換え宿主は、本明細書上記のシトクロムP450酵素をコードする異種核酸を含むことに加えて、CYP活性剤をコードする異種核酸を含んでもよい。前記CYP活性剤は、任意の有用なCYP活性剤であってよく、例えば、配列番号46のポリペプチド、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

【0061】

ステップI I I b - 24, 25エポキシクルビタジエノール→11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノール

本明細書に上述したように、本発明の方法は、24, 25エポキシクルビタジエノールから、24, 25エポキシクルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノールを形成する酵素を用いて、11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノールを製造するステップを含んでよい。

ステップはin vitroで、24, 25エポキシクルビタジエノールを含む組成物を、24, 25エポキシクルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノールを形成する前記酵素と共にインキュベートすることによって、実施することができる。

ステップはまたin vivoで、24, 25エポキシクルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノールを形成する酵素をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主が24, 25エポキシクルビタジエノール生合成経路の1または2以上の酵素、例えばクルビタジエノールシンターゼを発現することによって、24, 25エポキシクルビタジエノールを製造可能であってもよい。代替的に、24, 25エポキシクルビタジエノールは、例えば培養培地中の前記組換え宿主に提供されてもよい。

クルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて11-ヒドロキシクルビタジエノールを形成する前記酵素は、シトクロムP450酵素の群から選択される。

【0062】

本発明の好ましい態様において、24, 25エポキシクルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒することができて11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノールを形成する酵素は、CYP5491である。したがって、24, 25エポキシクルビタジエノールのヒドロキシル化を触媒して11-ヒドロキシ-24, 25エポキシクルビタジエノールを形成する酵素は、配列番号44のポリペプチド、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

本発明の一態様において、このステップは、少なくとも1つのCYP活性剤により補助されてもよい。本発明の方法のこのステップはしたがって、少なくとも1つのCYP活性剤と組み合わせた、上記のシトクロムP450酵素の使用を含むことができる。したがって、組換え宿主は、本明細書上記のシトクロムP450酵素をコードする異種核酸を含むことに加えて、CYP活性剤をコードする異種核酸を含んでもよい。前記CYP活性剤は、任意の有用なCYP活性剤であってよく、例えば、配列番号46のポリペプチド、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

【0063】

ステップ I V a - 1 1 - ヒドロキシククルビタジエノール → モグロール

本明細書に上述したように、本発明の方法は、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールから、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する酵素または酵素混合物を用いて、モグロールを製造するステップを含んでよい。

ステップはin vitroで、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールを含む組成物を、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する前記酵素または酵素混合物と共にインキュベートすることによって、実施することができる。

ステップはまたin vivoで、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主が1 1 - ヒドロキシククルビタジエノール合成経路の1または2以上の酵素を発現することによって、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールを製造可能であってもよい。代替的に、1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールは、例えば培養培地中の前記組換え宿主に提供されてもよい。

【0064】

1 1 - ヒドロキシククルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する前記酵素または酵素混合物は好ましくは、CYP450活性およびエポキシドヒドロラーゼ活性を共に有する、1または2以上の酵素を含む。

シトクロムP450を有する酵素は、例えば以下を含む：配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20の核酸配列によりコードされるポリペプチド、またはアミノ酸レベルにおいてこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体。

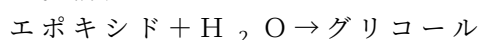
CYP450活性を有する別の酵素は、CYP5491である。したがって、CYP450活性を有する酵素は、配列番号44のポリペプチド、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

【0065】

本発明の一態様において、このステップは、少なくとも1つのCYP活性剤により補助されてもよい。本発明の方法のこのステップはしたがって、少なくとも1つのCYP活性剤と組み合わせた、上記のシトクロムP450酵素の使用を含むことができる。したがって、組換え宿主は、本明細書上記のシトクロムP450酵素をコードする異種核酸を含むことに加えて、CYP活性剤をコードする異種核酸を含んでもよい。前記CYP活性剤は、任意の有用なCYP活性剤であってよく、例えば、配列番号46のポリペプチド、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体であってよい。

【0066】

エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素は、例えば、EC3.3.1.1に分類された酵素であってよい。前記エポキシドヒドロラーゼは、好ましくは、以下の反応を触媒する：



エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素の例は、S. grosvenoriiのエポキシドヒドロラーゼ1およびS. grosvenoriiのエポキシドヒドロラーゼ2を含む。したがって、エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素は、配列番号38、配列番号40のポリペプチド、およびこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体

10

20

30

40

50

からなる群から選択することができる。

【0067】

ステップ I V a – 11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノール→モグロール

本明細書に上述したように、本発明の方法は、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールから、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する酵素または酵素混合物を用いて、モグロールを製造するステップを含んでよい。

ステップはin vitroで、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールを含む組成物を、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する前記酵素または酵素混合物と共にインキュベートすることによって、実施することができる。

10

【0068】

ステップはまたin vivoで、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主が11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノール生合成経路の1または2以上の酵素を発現することによって、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールを製造可能であってもよい。代替的に、11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールは、例えば培養培地中の前記組換え

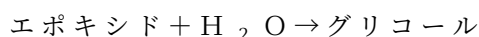
20

宿主に提供されてもよい。

11-ヒドロキシ-24, 25 エポキシクルビタジエノールの変換を触媒することができてモグロールを形成する前記酵素または酵素混合物は、好ましくは、エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素を含む。

【0069】

エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素は、例えば、EC3.3.1.1に分類された酵素であってよい。前記エポキシドヒドロラーゼは、好ましくは、以下の反応を触媒する：



エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素の例は、S. grosvenoriiのエポキシドヒドロラーゼ1およびS. grosvenoriiのエポキシドヒドロラーゼ2を含む。したがって、エポキシドヒドロラーゼ活性を有する酵素は、配列番号38、配列番号40のポリペプチド、およびこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体からなる群から選択することができる。

30

【0070】

ステップ V – モグロール→モグロシド

本発明の方法は、モグロールをグリコシル化してモグロシドを形成するステップを含んでよい。このステップは一般的に、モグロールおよび／またはグリコシル化モグロールのグリコシル化を触媒可能な酵素または酵素混合物の支援で達成される。

モグロシドは、本明細書の以下のセクション「モグロシド」に記載のモグロシドのいずれであってもよい。

40

ステップVはin vitroで、モグロールを含む組成物を、モグロールのグリコシル化を触媒可能な前記酵素または酵素混合物と共にインキュベートすることによって、実施することができる。ステップはまた、それぞれのステップがモグロールまたはグリコシル化モグロールのグリコシル化を含む、別のステップに分けてもよい。

【0071】

ステップはまたin vivoで、モグロールの、および任意にグリコシル化モグロールのグリコシル化を触媒可能な酵素または酵素混合物をコードする異種核酸（単数または複数）を含む組換え宿主において、行うことができる。前記組換え宿主は、例えば組換え宿主がモグロール生合成経路の1または2以上の酵素を発現することによって、モグロールを製

50

造可能であってもよい。代替的に、モグロールは、例えば培養培地中の前記組換え宿主に提供されてもよい。

モグロールのグリコシル化を触媒可能な前記酵素または酵素混合物は好ましくは、ウリジン-5'-ニリン酸 (UDP) 依存グリコシルトランスフェラーゼ (UGT) 含む。特に、ステップ V が UGT の使用を含むことが好ましい。

【0072】

したがって、ステップ V は、モグロールを、少なくとも 1 つのウリジン-5'-ニリン酸 (UDP) 依存グリコシルトランスフェラーゼ (UGT) とインキュベートして、モグロシド化合物 (例えばモグロシド IE1、モグロシド IA1、モグロシド IIE、モグロシド IIIA2、モグロシド III、モグロシド IV、モグロシド V、または C24-OH でグリコシル化されたモグロシド化合物) を製造することを含んでよい。

UGT は、例えば 73C3、73C6、85C2、73C5、および 73E1 からなる群から選択することができる。UGT はまた、配列番号 21 の UGT 73C3、配列番号 23 の UGT 73C6、配列番号 25 の UGT 85C2、配列番号 22 の UGT 73C5、配列番号 24 の UGT 73E1、またはこれらと少なくとも 70%、例えば少なくとも 80%、例えば少なくとも 90%、例えば少なくとも 95%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体であってもよい。

【0073】

UGT はまた、UGT 98、UGT 1495、UGT 1817、UGT 5914、UGT 8468 および UGT 10391 からなる群から選択することができる。UGT はまた、配列番号 53 の UGT 98、配列番号 27 によりコードされた UGT 1495、配列番号 28 によりコードされた UGT 1817、配列番号 30 によりコードされた UGT 5914、配列番号 31 によりコードされた UGT 8468、および配列番号 32 によりコードされた UGT 10391、またはこれらとアミノ酸レベルで少なくとも 70%、例えば少なくとも 80%、例えば少なくとも 90%、例えば少なくとも 95%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体からなる群から、選択することができる。

方法が *in vitro* で実施される場合、UGT は例えば、組換え的に生産されるか、または組換え宿主の細胞溶解物であることができる。本文書はまた、モグロシド化合物を製造する方法であって、該方法が、モグロールを、UGT を発現する組換え宿主から調製した細胞溶解物と接触させて、モグロシド化合物 (例えば、モグロシド IE1、モグロシド IA1、モグロシド IIE、モグロシド IIIA2、モグロシド III、モグロシド IV、モグロシド V、または C24-OH でグリコシル化されたモグロシド化合物) を製造することを含む、前記方法の特徴とする。UGT は、上記 UGT のいずれかであることができる。

【0074】

本文書は、1 または 2 以上のウリジン-5'-ニリン酸 (UDP) 依存グリ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ための、方法および材料を提供する。以下に示すように、アグリコンモグロールをグリコシル化する少なくとも 5 つの UGT が同定されている。本明細書に同定されている UGT の各々は、グリコシルトランスフェラーゼファミリー I のものである。したがって、好ましい一態様において、UGT はグリコシルトランスフェラーゼファミリー I の UGT である。

UGT である 73C3、73C6、85C2 および 73E1 は、モグロールまたはモグロシドの C24-OH の位置においてグリコシル化を触媒することができる (図 4 中の UGT #2)。したがって、製造すべきモグロシドが C24-OH の位置においてグリコシル化を含む本発明の方法において、少なくとも 1 つの UGT は、配列番号 21 の UGT 73C3、配列番号 23 の UGT 73C6、配列番号 25 の UGT 85C2、または配列番号 24 の UGT 73E1、またはこれらと少なくとも 70%、例えば少なくとも 80%、例えば少なくとも 90%、例えば少なくとも 95%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体であってよい。

【0075】

UGT73C5は、モグロールまたはモグロシドのC3-OH（図4のUGT#1）およびC24-OH位置（UGT#2）の両方において、グリコシル化を触媒することができる。したがって、製造すべきモグロシドがC24-OH位置（UGT#2）におけるグリコシル化および／またはC3-OH位置におけるグリコシル化を含む本発明の方法において、少なくとも1つのUGTは、配列番号22のUGT73C5、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体であってよい。

UGTの73C3、73C5および73C6は、*Arabidopsis thaliana*からのものである。UGTの73E1および85C2は、*Stevia rebaudiana*からのものである。UGTの73C3、73C5、73C6、73E1および85C2のアミノ酸配列は、本明細書においてそれぞれ、配列番号21～25として提供される。したがって、UGTの73C3、73C6、85C2、または73E1を、モグロシドIE1をモグロールから製造するために使用することができ、UGT73C5は、モグロシドIA1をモグロールから製造するために使用することができる。モグロシドIE1は、UGT73C5を使用してモグロシドII Eに変換することができる。モグロシドIA1は、UGTの73C3、73C6、85C2、または73E1を使用してモグロシドII Eに変換することができる。

【0076】

本発明の好ましい一態様において、少なくとも1つのUGTは、配列番号48のUGT1576、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体であってよい。これは特に、製造すべきモグロシドがC24-OH位置におけるグリコシル化を含む本発明の態様においてそうであり、何故ならば、UGT1576は、モグロール24-OH UDP-グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するグリコシルトランスフェラーゼだからである。

本発明の好ましい一態様において、少なくとも1つのUGTは、配列番号53のUGT98、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体である。これは特に、製造すべきモグロシドが、C24-OH位置におけるグルコースの1, 2グリコシル化および1, 6グリコシル化を含んでモグロシドII IA1を形成する、本発明の態様においてそうである。

【0077】

本発明の好ましい一態様において、少なくとも1つのUGTは、配列番号50のUGTSK98、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有する任意の前述のものの機能的相同体である。これは特に、製造すべきモグロシドが、C-24位置におけるグルコースの1, 2グリコシル化を含んでモグロシドII Aを形成する、本発明の態様においてそうである。

図4に示すように、3種類の酵素的グリコシル化により、モグロシドII EはモグロシドVまたは11-オキソモグロシドVに変換される。まず2つのグルコースを1, 6結合により、モグロシドII Eに既に存在する2つのグルコース分子に付着させる。第2に、別のグルコースをC24結合グルコースへ、1, 2結合によって添加する。モグロシドIVは、1, 2結合したグルコースがC24結合グルコースで欠落している中間体である。シアメノシドにおいてはこのグルコースが存在するが、C3結合したグルコースにおける1, 6結合グルコースは欠けている。11-オキソモグロシドVはモグロシドVと同一であるが、ただし11-OHが酸化されている。以下のUGTの1または2以上を使用して、モグロシドII EをモグロシドIV、モグロシドV、11-オキソモグロシドV、およびシアメノシドに変換することができる：UGT98、UGT1495、UGT1817、UGT3494、UGT5914、UGT8468、UGT10391、UGT

10

20

30

40

50

11789、UGT11999、UGT13679およびUGT15423（それぞれ配列番号26～36）、または機能性。例えば、UGT98、UGT1495、UGT1817、UGT5914、UGT8468およびUGT10391の1または2以上を使用して、モグロシドIV、モグロシドV、11-オキソーモグロシドV、またはシアメノシドIを製造することができる。

【0078】

本発明の一態様において、ステップVは、以下のステップの1または2以上を含む：

- a) モグロールのC24におけるグルコシル化により、モグロシドIA1を形成
- b) モグロシドIA1のC24結合グルコースの1, 6グルコシル化により、モグロシドIIAを形成
- c) モグロシドIIaのC24結合グルコースの1, 2グルコシル化により、モグロシドIIIA1を形成
- d) モグロシドIIIA1のC3におけるグルコシル化により、シアメノシド1の形成
- e) シアメノシド1のC3結合グルコースの1, 6グルコシル化により、モグロシドVを形成

【0079】

これらのステップはそれぞれ、前記ステップを触媒可能なUGTによって触媒することができる。したがって、例えばステップa)は、配列番号48のUGT1576、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体によって、例えば触媒することができる。ステップb)は、配列番号53のUGT98、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体によって、例えば触媒することができる。ステップc)は、配列番号53のUGT98、配列番号50のUGT SK98またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有する、任意の前述のものの機能的相同体によって、例えば触媒することができる。ステップd)は、配列番号22のUGT73C5、またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体によって、例えば触媒することができる。ステップe)は、UGT91ファミリーのUGTによって例えば触媒することができる。例えばステップe9は、配列番号53のUGT98またはこれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するその機能的相同体によって、触媒することができる。

【0080】

UGTの活性をin vitroで評価することができる。例えば、in vitroでのUGT反応混合物は、UGT酵素、4Xトリス緩衝液、基質（250 μM）、UDPグルコース（750 μM）および1%のアルカリホスファターゼを、約50 μlの総反応容量中に含むことができる。反応は、滅菌96ウェルプレート中で行うことができ、30℃で一晩インキュベートする。インキュベーション後、25 μLのDMSOを各反応に添加し、反応プレートを5分間遠心分離する。試料を各ウェルから採取し、濾過し、次いでLC-MSにより分析することができる。

【0081】

ポリペプチドの製造

本明細書で前述したように、本発明の方法は、in vitroまたはin vivoで実施することができる。方法をin vitroで実施する本発明の態様において、方法で使用する1または2以上の酵素は、ポリペプチドを製造するための任意の従来の方法を用いて調製することができる。

したがって、本明細書に記載のシンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTおよびCYP450

ポリペプチドなどの酵素は、任意の方法を用いて製造することができる。例えば、シンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TまたはC Y P 4 5 0 ポリペプチドなどの酵素は、化学合成により製造することができる。代替的に、本明細書に記載のシンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TまたはC Y P 4 5 0 ポリペプチドなどの酵素は、標準的な組換え技術により、シンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TまたはC Y P 4 5 0 ポリペプチドなどの酵素をコードする異種発現ベクターを用いて、製造することができる。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の宿主細胞に（例えば、形質転換またはトランスフェクションによって）導入することができ、これは次に任意に、精製または部分的に精製することができる。酵素を含む粗抽出物もまた、本発明の方法で使用することができる。シンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TおよびC Y P 4 5 0 ポリペプチドなどの酵素の小規模または大規模生産のために使用することができる発現系としては、限定はされないが、例えば本明細書に記載の核酸分子を含有するバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターなどの組換えDNAで形質転換された細菌（例えば、E. coliおよびB. subtilis）などの微生物、または本明細書に記載の核酸分子を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、S. cerevisiaeまたはS. pombe）が挙げられる。

【0082】

有用な発現系は、本明細書に記載の核酸分子を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染された昆虫細胞系、または、本明細書に記載の核酸分子を含有する組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）に感染された植物細胞系、または本明細書に記載の核酸分子を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系も含む。シンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TまたはC Y P 4 5 0 ポリペプチドなどの酵素はまた、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（アデノウイルス後期プロモーターおよびサイトメガロウイルスプロモーター）と、本明細書に記載の核酸分子とを含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物発現系を用いて、製造することができる。本発明の方法で使用するシンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TまたはC Y P 4 5 0 ポリペプチドなどの酵素は、以下に説明するように、N末端またはC末端タグを有していてもよい。

【0083】

また、本文書では、ステップI a、I b、I I a、I I b、I I I a、I I I b、I V a、I V bおよびVの各々において使用する酵素、例えばシンターゼ、ヒドロラーゼ、U G TまたはC Y P 4 5 0 ポリペプチドなど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意味し、これはゲノム中の核酸の片側または両側に通常隣接する核酸を含む。核酸に関して本明細書で使用する用語「単離された」とは、任意の天然に存在しない核酸配列を含み、その理由は、かかる天然に存在しない核酸配列は天然には見出されず、天然に存在するゲノム中に、直接隣接する配列（immediately contiguous sequence）を有しないからである。したがって、単離された核酸は、本発明の方法で使用する酵素のいずれかをコードするcDNAであってもよい。

【0084】

単離された核酸は、天然に存在するゲノムにおいてそのDNA分子に直接隣接して通常見出される核酸配列の1つが、除去されたか、または存在しない場合には、例えばDNA分子であってもよい。したがって、単離された核酸は、限定することなく以下を含む：他の配列から独立して、別の分子として存在するDNA分子（例えば、化学的に合成された核酸、またはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって産生されるcDNAまたはゲノムDNA断片）、ならびに、ベクター、自己複製プラスミド、ウイルス（例えば、任意の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）、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれているDNA。さらに、単離された核酸は、ハイブリッドまたは融合核酸の一部であるDNA

分子等の、操作された核酸を含むことができる。例えばcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリー、またはゲノムDNAの制限酵素消化を含有するゲルスライス内などの、何百万もの他の核酸の間に存在する1つの核酸は、単離された核酸とはみなされない。

【0085】

いくつかの態様において、本発明の方法で使用するシンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTまたはCYP450ポリペプチドなどの酵素をコードする核酸配列は、コードされたポリペプチドのその後の操作（例えば精製または検出の促進）、分泌または局在化を促進するよう設計された「タグ」をコードするタグ配列を含むことができる。タグ配列は、コードされたタグが、酵素のカルボキシルまたはアミノ末端のいずれかに位置するように、酵素をコードする核酸配列に挿入することができる。コードされたタグの非限定的な例としては、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、およびフラグ（登録商標）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、または分泌タグが含まれる。

【0086】

機能的相同体

上述のポリペプチドの機能的相同体は、本明細書に記載の方法および組換え宿主での使用にも適している。機能的相同体は、参照ポリペプチドに対して配列類似性を有し、参照ポリペプチドの1または2以上の生化学的または生理学的機能を実行するポリペプチドである。したがって、本明細書に記載の酵素の機能的相同体は、参照酵素に対して配列類似性を有し、かつ参照酵素と同様に、本発明の方法と同一のステップまたはステップの一部を触媒することができる、ポリペプチドである。

一般に、機能的相同体は、参照ポリペプチドと少なくともある程度の配列同一性を共有することが好ましい。したがって、本明細書に記載の任意のポリペプチドの機能的相同体は、これと少なくとも70%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%の配列同一性を共有するのが好ましい。

【0087】

アミノ酸配列の同一性は、2つの整列配列間で同一のアミノ酸配列を必要とする。したがって、参照配列と80%のアミノ酸同一性を共有する候補配列は、アラインメント後に、候補配列中のアミノ酸の80%が参照配列中の対応するアミノ酸と同一であることを必要とする。本発明の同一性は、コンピュータ解析の助けにより決定され、これは例えば、限定することなく、ClustalWコンピュータアラインメントプログラム（Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680）、およびそこに提案されているデフォルトのパラメータである。ClustalWソフトウェアは、European Bioinformatics InstituteのClustalW WWW Service <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>から入手可能である。デフォルトの設定でこのプログラムを使用して、クエリと参照ポリペプチドの成熟（生理活性）部分を整列させる。完全に保存された残基の数を数え、参照ポリペプチドの長さによって割り算する。配列同一性は、参照ポリペプチドの全長にわたって決定される。

【0088】

機能的相同体および参照ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドであってよく、配列類似性は、収束または発散進化的事象に起因するものであってよい。このように、機能的相同体は、しばしば相同体、またはオルソログ、またはパラログとして文献に示されている。天然に存在する機能的相同体の変異体、例えば野生型コード配列の変異体によってコードされるポリペプチドなどは、それ自体が機能相同体であり得る。機能的相同体はまた、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して、または別の天然に存在するポリペプチドのコード配列からのドメインを組み合わせるにより（「ドメイ

ン交換」)、作製することができる。本発明の方法で使用されるシンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTまたはCYP450ポリペプチドなどの酵素の機能的相同体をコードする遺伝子を改変するための技術は知られており、特に指向性進化技術、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み、これらは、ポリペプチドの特定の活性を増加させ、基質特異性を変更し、発現レベルを変化させ、細胞内位置(subcellular location)を変化させ、またはポリペプチド:ポリペプチドの相互作用を所望の様式で改変するのに使用することができる。かかる改変されたポリペプチドは、機能的相同体と考えられる。用語「機能的相同体」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場合がある。

【0089】

機能的相同体は、ヌクレオチドおよびポリペプチド配列のアラインメントの分析によって同定することができる。例えば、ヌクレオチド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り、本発明の方法で使用する、シンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTまたはCYP450ポリペプチドなどの酵素の相同体を同定することができる。

配列分析は、本発明の方法で使用するシンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTまたはCYP450アミノ酸などの酵素をコードする本明細書中で同定された配列の1つを参照配列として用いた、非冗長データベースのBLAST、相互BLAST、またはPSI-BLAST分析を含むことができる。アミノ酸配列は、いくつかの例では、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内のこれらのポリペプチドは、シンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTまたはCYP450ポリペプチドとしての適合性の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、保存的アミノ酸置換、例えば1つの疎水性残基の別のものとの置換、または1つの極性残基の別のものとの置換などを可能とする。所望であれば、かかる候補の手動検査を実施して、さらに評価すべき候補の数を絞ることができる。手動検査は、本発明の方法で使用するシンターゼ、ヒドロラーゼ、UGTまたはCYP450ポリペプチドなどの酵素に存在する領域、例えば保存された機能的ドメインを有するように見えるこれらの候補の選択により、行うことができる。

【0090】

保存領域の同定は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列内の領域であって、反復配列である、いくつかの二次構造(例えば、ヘリックスおよびβシート)を形成する、正または負に帯電したドメインを確立する、またはタンパク質モチーフもしくはドメインを表す、前記領域の位置を特定することにより、実施することができる。例えば、World Wide Web at sanger.ac.uk/Software/Pfam/およびpfam.janelia.org/の、さまざまなタンパク質モチーフおよびドメインについてのコンセンサス配列を記述するPfamウェブサイトを参照されたい。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。保存領域はまた、密接に関連する種からの同一または関連するポリペプチドの配列を整列させることにより、決定することもできる。密接に関連する種は、好ましくは、同一の科(family)からのものである。いくつかの態様において、2つの異なる種からの配列のアラインメントが適切である。典型的には、少なくとも約40%のアミノ酸配列同一性を示すポリペプチドは、保存領域を同定するのに有用である。関連ポリペプチドの保存領域は、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)を示す。いくつかの態様において、保存領域は、少なくとも92%、94%、96%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性を示す。配列同一性は、上記のように決定することができる。

【0091】

モグロシド

本発明は、かかる方法における使用のためにモグロシドおよび材料を製造する方法に関する。本明細書で使用する用語「モグロシド」は、1つまたは2つ以上の位置でグリコシル化されたモグロールを指す。特に、本発明によるモグロシドは、3および/または24

10

20

30

40

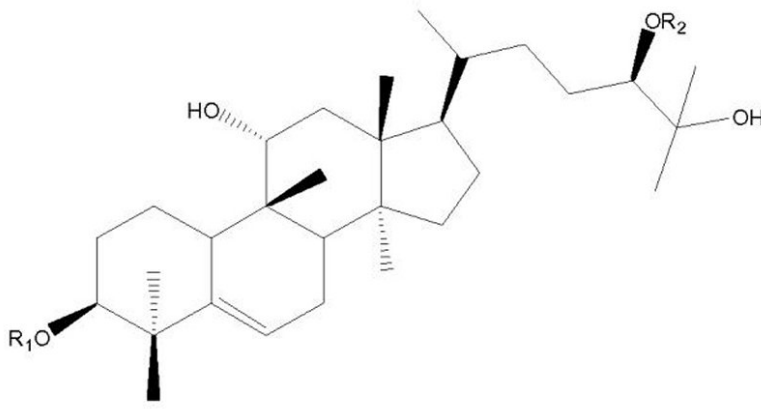
50

の位置で1または2個以上のグルコース残基によりグリコシル化されたモグロールであってよい。モグロシドが11および25の位置でグリコシル化されているものは、あまり好ましくない。モグロールは、次の式Iの化合物であり、式中 R_1 および R_2 の両方は-Hである。

【0092】

モグロシドは、下記式Iの化合物であることが好ましい：

【化1】



式中、 R_1 および R_2 は独立して、-H、モノグルコース、ジグルコース、トリグルコースであり、少なくとも R_1 および R_2 の1つは-Hではない。

特に、モグロシドは、本明細書下記の表1に記載のモグロシドの1つであってよい。

【0093】

【表1】

表1. 式Iのモグロシド

名称	R_1	R_2
モグロシドV	Glc6-Glc-	Glc6-Glc2-Glc
シアメノシドI	Glc-	Glc6-Glc2-Glc-
モグロシドIV	Glc6-Glc-	Glc2-Glc-
モグロシドIVA	Glc6-Glc-	Glc6-Glc-
モグロシドIII	Glc-	Glc6-Glc-
モグロシドIIIA1	H	Glc6-Glc2-Glc-
モグロシドIIIA2	Glc6-Glc-	Glc-
モグロシドIIIE	Glc-	Glc2-Glc-
モグロシドIIA	H	Glc2-Glc-
モグロシドIIA1	H	Glc6-Glc-
モグロシドIIA2	Glc6-Glc-	H
モグロシドIIIE	Glc-	Glc-
モグロシドIIA1	H	Glc-
モグロシドIE1	Glc-	H

Glc = グルコース

【0094】

モグロシド I A 1 は、モグロシド I b と称される場合もある。モグロシド I E 1 は、モグロシド I a と称される場合もある。モグロシド I I E は、モグロシド I I と称される場合もある。モグロシド I I I A 2 は、モグロシド I I I a と称される場合もある。モグロシド I I I は、モグロシド I I I b と称される場合もある。この代替命名法は、例えば US SN61/733220 で使用される。

本発明はさらに以下の実施例に記載されるが、これらは特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 9 5 】

配列表

【表 2】

10

配列番号 1	<i>C. pepo</i> ククルビタジエノールシンターゼのアミノ酸配列
配列番号 2	<i>Siraitia grosvenorii</i> ククルビタジエノールシンターゼの C 末端部分のアミノ酸配列
配列番号 3	CYP533 をコードする DNA 配列 (CYP533 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 4	CYP937 をコードする DNA 配列 (CYP937 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 5	CYP1798 をコードする DNA 配列 (CYP1798 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 6	CYP1994 をコードする DNA 配列 (CYP1994 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 7	CYP2048 をコードする DNA 配列 (CYP2048 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 8	CYP2740 をコードする DNA 配列 (CYP2740 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 9	CYP3404 をコードする DNA 配列 (CYP3404 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 10	CYP3968 をコードする DNA 配列 (CYP3968 遺伝子のヌクレオチド配列)

20

30

【 0 0 9 6 】

【表 3】

配列番号 1 1	CYP4112 をコードする DNA 配列 (CYP4112 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 2	CYP4149 をコードする DNA 配列 (CYP4149 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 3	CYP4491 をコードする DNA 配列 (CYP4491 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 4	CYP5491 をコードする DNA 配列 (CYP5491 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 5	CYP6479 をコードする DNA 配列 (CYP6479 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 6	CYP7604 をコードする DNA 配列 (CYP7604 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 7	CYP8224 をコードする DNA 配列 (CYP8224 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 8	CYP8728 をコードする DNA 配列 (CYP8728 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 1 9	CYP10020 をコードする DNA 配列 (CYP10020 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 2 0	CYP10285 をコードする DNA 配列 (CYP10285 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 2 1	UGT73C3 のアミノ酸配列
配列番号 2 2	UGT73C5 のアミノ酸配列
配列番号 2 3	UGT73C6 のアミノ酸配列
配列番号 2 4	UGT73E1 のアミノ酸配列
配列番号 2 5	UGT85C2 のアミノ酸配列
配列番号 2 6	<i>Siraitia grosvenorii</i> UGT98 をコードするヌクレオチド配列
配列番号 2 7	<i>Siraitia grosvenorii</i> UGT1495 をコードするヌクレオチド配列
配列番号 2 8	<i>Siraitia grosvenorii</i> UGT1817 をコードするヌクレオチド配列
配列番号 2 9	部分遺伝子配列— <i>Siraitia grosvenorii</i> UGT3494 の断片をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 0	<i>Siraitia grosvenorii</i> UGT5914 をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 1	<i>Siraitia grosvenorii</i> UGT8468 をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 2	<i>Siraitia grosvenorii</i> UGT10391 をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 3	部分遺伝子配列— <i>Siraitia grosvenorii</i> UGT11789 の断片をコードするヌクレオチド配列

【表 4】

配列番号 3 4	部分遺伝子配列— <i>Siraitia grosvenorii</i> UGT11999 の断片をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 5	部分遺伝子配列— <i>Siraitia grosvenorii</i> UGT13679 の断片をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 6	部分遺伝子配列— <i>Siraitia grosvenorii</i> UGT15423 の断片をコードするヌクレオチド配列
配列番号 3 7	<i>S. cerevisiae</i> での発現についてコドン最適化された <i>S. grosvenorii</i> エポキシドヒドロラーゼ 1 をコードする DNA 配列
配列番号 3 8	<i>S. grosvenorii</i> エポキシドヒドロラーゼ 1 のアミノ酸配列
配列番号 3 9	<i>S. cerevisiae</i> での発現についてコドン最適化された <i>S. grosvenorii</i> エポキシドヒドロラーゼ 2 をコードする DNA 配列
配列番号 4 0	<i>S. grosvenorii</i> エポキシドヒドロラーゼ 2 のアミノ酸配列
配列番号 4 1	CYP10969 をコードする DNA 配列 (CYP10969 遺伝子のヌクレオチド配列)
配列番号 4 2	<i>S. cerevisiae</i> での発現についてコドン最適化された <i>Siraitia grosvenorii</i> ククルビタジエノールシンターゼをコードする DNA 配列
配列番号 4 3	<i>Siraitia grosvenorii</i> ククルビタジエノールシンターゼのアミノ酸配列
配列番号 4 4	<i>S. grosvenorii</i> CYP5491 のアミノ酸配列
配列番号 4 5	<i>S. grosvenorii</i> CPR4497 をコードする DNA 配列
配列番号 4 6	<i>S. grosvenorii</i> CPR4497 のアミノ酸配列
配列番号 4 7	<i>S. grosvenorii</i> UGT1576 をコードする DNA 配列
配列番号 4 8	<i>S. grosvenorii</i> UGT1576 のアミノ酸配列
配列番号 4 9	<i>S. grosvenorii</i> UGT SK98 をコードする DNA 配列
配列番号 5 0	<i>S. grosvenorii</i> UGT SK98 のアミノ酸配列
配列番号 5 1	<i>S. grosvenorii</i> UGT98 をコードする DNA 配列
配列番号 5 2	<i>S. Cerevisiae</i> での発現についてコドン最適化された <i>S. grosvenorii</i> UGT98 をコードする DNA 配列
配列番号 5 3	<i>S. grosvenorii</i> UGT98 のアミノ酸配列
配列番号 5 4	ERG1 遺伝子によりコードされる <i>S. cerevisiae</i> スクアレンエポキシダーゼのアミノ酸配列
配列番号 5 5	ERG7 遺伝子によりコードされる <i>S. cerevisiae</i> ラノステロールシンターゼのアミノ酸配列

【0098】

例1ー モグロシドVの精製

モグロシドVを、市販のモンクフルーツ抽出物（PureLo（登録商標）、Swanson）から以下のようにして精製した。3本のPureLo（登録商標）（240g）を水（900mL）に溶解し、ついでHP-20樹脂（400gの樹脂）カラムにロードした。カラムを水（2.5L）で洗浄し；その後、20%メタノール-水でさらに洗浄した。生成物をメタノールで溶出した。溶媒を蒸発させ高真空での乾燥後に、モグロシドV（2.5g、純度～80%、11-オキシモグロシドVが主要な不純物）を得た。

【0099】

例2ー モグロールのモグロシドVからの酵素的合成

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*からの粗ペクチナーゼ（25mL、Sigma P2736）を添加した。混合物を50℃で48時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル（2×100mL）で抽出した。有機抽出物を真空下で乾燥し、次いで分取HPLCで精製した。純粋なモグロール（40mg）を得て、その構造をNMRおよび質量分析で確認した。図6参照。

【0100】

例3ー モグロール3-O-グルコシド（モグロシドIE1）およびモグロール24-O-グルコシド（モグロシドIA1）のモグロシドVからの酵素的合成

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*からの粗ペクチナーゼ（25mL、Sigma P2736）を添加した。混合物を50℃で6.5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル（2×100mL）で抽出した。有機抽出物を真空下で乾燥し、次いで分取HPLCで精製した。純粋なモグロシドIE1（11.0mg）およびモグロシドIA1（8.0mg）を得た。それらの構造をNMRおよび質量分析で確認した。図6参照。

【0101】

例4ー in vitroでのUGTのスクリーニングおよび反応

モグロールと230のUGT酵素のパネルのin vitro反応を行い、生成物をLC-MSで分析した。in vitroUGT反応混合物は、4Xトリス緩衝液、モグロール（250μM）、UDP-グルコース（750μM）および1%のアルカリホスファターゼを含む。5μLの各部分精製UGT酵素または粗酵素抽出液を反応物に添加し、反応容量を水で50μLとした。反応物は30℃で一晩インキュベートし、滅菌96ウェルプレート中で行った。インキュベーション後、25μLのDMSOを各反応物に添加し、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採取し、濾過し、LC-MS分析に使用した。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IA1に変換することが見出された。UGT73C5はモグロシドIE1とIA1の両方を生産した。UGT2073E1との反応では、反応は完了しなかったが、モグロシドIA1が、新規なグリコシル化モグロール（モグロシドIE1でもIA1でもない；正確な質量はモグロシドIとして示されたが、これはおそらく、C11-OH上のグリコシル化事象による）と共に、主生成物として見出された。

【0102】

例5ー モンクフルーツのククルビタジエノールシンターゼの同定

ククルビタジエノールシンターゼをコードするモンクフルーツの遺伝子はCirCSであり、推定で764アミノ酸の338個をカバーする部分的遺伝子配列を、アセンブルされたデータのtBLASTn解析をCucurbita pepoからのククルビタジエノールシンターゼクエリ（受入番号BAD34645.1、配列番号1）を用いて行うことにより、同定した。CirCSの一部は、C. pepo遺伝子とタンパク質レベルで97.5%同一である（配列番号2；配列番号1の残基515～764から）。

【0103】

例6ー ククルビタジエノールからのモグロールの形成を触媒するP450酵素に対する、モンクフルーツの候補遺伝子の同定

10

20

30

40

50

ククルビタジエノールからモグロールへの経路は、Tang et al., BMC Genomics, 12, 343 (2011)によって提案されている。ククルビタジエノールとモグロールの中間体が果実内に存在するが、これらはマイナーな産物として単離されている。Ukiya, et al., J. Agric. Food Chem. 50, 6710-6715 (2002)を参照。グリコシド中間体は、11-ヒドロキシ系および11-オキソ系の両方に存在し、果実が熟すにつれて、モグロシドIからモグロシドVへと徐々に変化するが、これはトリテルペンコアが、その後のグリコシル化の前にP450酵素によって完全に酸化されることを示している。Tangらにより提案されたスキームによれば、3つの独立シトクロムP450酵素触媒酸化は、ククルビタジエノールからのモグロールの形成をもたらす(図4の下側の経路)。本発明者らは、提案された一次反応が非常に可能性が低いことを見出した。したがって経路には、1つのシトクロムP450酵素によるエポキシ化と、続いて自発的または酵素が触媒する水和、および別のP450酵素が触媒する酸化(図4の上側の経路に視覚化)が伴い得ることが、または経路が、図10Aに示すような別の順序での類似のステップを含み得ることが、提示される。本発明者らはまた、図10Bに示すような、ジオキシドスクアレンから開始される別の経路も提唱する。

【0104】

モンクフルーツから最も可能性の高い候補P450遺伝子を同定するために、最も知られている酵素のサブファミリーおよび変異を表す、パブリックドメインのArabidopsis thalianaの239のシトクロムP450酵素のポリペプチド配列からなる、BLASTデータベースを作成した。配列を、アセンブルされたモンクフルーツトランスクリプトームデータのtBLASTn(翻訳ヌクレオチドデータベース)分析に使用して、10E-10以下のE値を有するデータベースクエリー配列のいずれかと相同性を有する全ての配列を同定した。72の配列が同定された。典型的には、トランスクリプトーム研究において発現配列タグの完全長または長い遺伝子の長さをアセンブルする能力は、問題の遺伝子に多くの配列タグが存在したことを意味する。現在の実験において、これは、この遺伝子がモンクフルーツ組織で高発現されたことを示し、したがって、目的の2つのP450酵素のうち1つについての候補である可能性が高い。72の配列のうち、18は、完全長またはほぼ完全長であった。アセンブルされた遺伝子は、CYP533、CYP937、CYP1798、CYP1994、CYP2048、CYP2740、CYP3404、CYP3968、CYP4112、CYP4149、CYP4491、CYP5491、CYP6479、CYP7604、CYP8224、CYP8728、CYP10020、およびCYP10285と命名した。

【0105】

これらは、ククルビタジエノールのモグロールへの変換の触媒に関与する2つのP450酵素に対する、候補遺伝子である。完全長遺伝子配列は、次の遺伝子コンティグについてPCRにより増幅した：CYP533、CYP937、CYP1798、CYP1994、CYP2740、CYP4112、CYP4149、CYP4491、CYP5491、CYP7604、CYP8224、およびCYP10285；ここでモンクフルーツの葉のゲノムDNAまたは根のcDNAを用い、および配列重複拡張技術を使用して常在イントロン配列を除去した。CYP533、CYP937、CYP1798、CYP1994、CYP2048、CYP2740、CYP3404、CYP3968、CYP4112、CYP4149、CYP4491、CYP5491、CYP6479、CYP7604、CYP8224、CYP8728、CYP10020、およびCYP10285のヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号3~20として提供されている。

【0106】

例7ー モグロシドV、11-オキソ-モグロシドV、モグロシドIV、モグロシドII IA2およびb、およびシアメノシドの、モグロシドII Eからの形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼについてのモンクフルーツの候補遺伝子の同定

3つの酵素的グリコシル化が、モグロシドII EをモグロシドVまたは11-オキソ-モグロシドVに変換するために必要である。2つのグルコースは、モグロシドII Eに既

に存在する2つのグルコース分子に1, 6結合で結合する。これは1つのUGT酵素により行うことができる。別のグルコースを、C24結合グルコースに1, 2結合で添加する。モグロシドIVは、1, 6結合グルコースがC24結合グルコースで欠落している中間体である。シアメノシドでは、このグルコースは存在するが、しかしC3結合グルコースにおける1, 6結合グルコースは欠落している。11-オキソモグロシドVは、11-OHが酸化されていることのみを除き、モグロシドVと同一である。モグロシドIV、モグロシドV、11-オキソモグロシドV、およびシアメノシドの構造について、図1を参照されたい。

【0107】

アセンブルされたモンクフルーツのトランスクリプトームデータ内の全ての可能なUGT遺伝子を同定するために、全ての既知のサブファミリーのグリコシルトランスフェラーゼ(UGT)のポリペプチド配列からなる、全部で160個の配列のデータベースをアセンブルした。tBLASTn分析を、このデータベースとアセンブルされたモンクフルーツデータの間で実施した。ジグリコシル化(すなわち、糖を、アグリコン上に存在する別の糖に順に付着させること)を行うUGTは常に、ファミリー1のUGTのサブファミリー76、79、91または94から来る(後者の3つは「オルソロジー群8」を形成する)。サブファミリー76の酵素は通常1, 3結合を作るが、オルソロジー群8のUGTは常に1, 2または1, 6結合を作る。

【0108】

オルソロジー群8酵素に対して、他の全てのUGT酵素または全ての非UGT遺伝子よりも高い相同性を示す配列が同定された。こうして、11のコンティグが、モグロシドIEをモグロシドVに変換するのに必要な2つのグリコシルトランスフェラーゼをコードする有望な候補として同定された: UGT98、UGT1495、UGT1817、UGT3494、UGT5914、UGT8468、UGT10391、UGT11789、UGT11999、UGT13679およびUGT15423(それぞれ配列番号26~36)。これらの中で、UGT98、UGT1495、UGT1817、UGT5914、UGT8468およびUGT10391を、モンクフルーツの葉のゲノムDNAまたは根のcDNAを使用して、PCRにより増幅することができた。増幅された遺伝子は、大腸菌発現プラスミドベクターに挿入した。

【0109】

酵素を発現させ、ニッケルカラム上で精製した。モグロシドIA1、IE1およびIEの、6つの精製UGT酵素のパネルとのin vitro反応を実施し、生成物をLC-MSで分析した。in vitroUGT反応混合物は、4Xトリス緩衝液、基質(250 μM)、UDP-グルコース(750 μM)および1%のアルカリホスファターゼを含む。5 μlのそれぞれの部分精製UGT酵素を反応物に添加し、反応容量を水で50 μlとした。反応物は、30℃で一晩インキュベートし、滅菌96ウェルプレート中で行った。インキュベーション後、25 μlのDMSOを各反応物に添加し、反応プレートを5分間遠心分離した。40 μlの試料を各ウェルから採取し、濾過し、LC-MSで分析した。1, 6結合の形成を触媒するUGTのみでなく、1, 2結合の形成を触媒する酵素も、LC-MS分析に基づいて同定した。

【0110】

例8 — eYAC技術を用いて、ククルビタジエノールのモグロールへの変換に関与するシトクロムP450酵素を同定

eYAC遺伝子発現技術を用いて、候補遺伝子のコレクション内の活性なシトクロムP450酵素を同定した。以下の遺伝子を、「エントリーベクター」(異なるヌクレオチド配列を有するが、全てアミノ酸メチオニンの添加によって30抑制性である、遺伝子プロモーターおよびターミネーター配列を含むプラスミドベクターのコレクション)に挿入した: Cucurbita pepoククルビタジエノールシンターゼ遺伝子、CYP533(配列番号3)、CYP937(配列番号4)、CYP1798(配列番号5)、CYP1994(配列番号6)、CYP2740(配列番号8)、CYP4112(配列番号11)、CYP

10

20

30

40

50

4 1 4 9 (配列番号 1 2)、C Y P 4 4 9 1 (配列番号 1 3)、C Y P 5 4 9 1 (配列番号 1 4)、C Y P 7 6 0 4 (配列番号 1 6)、C Y P 8 2 2 4 (配列番号 1 7)、および C Y P 1 0 2 8 5 (配列番号 2 0) ; *Arabidopsis thaliana*からの 2 つのシトクロム P 4 5 0 オキシドレダクターゼ (C P R) 遺伝子 (A T R 1 および A T R 2) ; *Stevia rebaudiana*からの C P R (C P R 8) ; モンクフルーツから単離された C P R ; および *A. thaliana*からのグリコシルトランスフェラーゼ U G T 7 3 C 5 (配列番号 2 2) および U G T 7 3 C 6 (配列番号 2 3)、*S. rebaudiana*からのグリコシルトランスフェラーゼ U G T 8 5 C 2 (配列番号 2 5)。

【0111】

これらの 1 7 のプラスミドからの発現カセットは、AscI+SrfI消化後に切除し、精製し、ライゲーション反応でランダムに連結して、酵母人工染色体 (「e Y A C」) を作成した。3 0 ~ 2 0 0 μ g の D N A を、それぞれ 1 0 の、カセットを含むエントリーベクターから調製し、カセットは、3 時間の反応で T 4 リガーゼでのライゲーションにより e Y A C に連結する。連結反応の成功は、連結された D N A が高粘性であるため、反応混合物の粘度によって評価する。セントロメア、2 つのテロメアおよび LEU2 および TRP1 選択マーカを含む D N A 断片 (「アーム」) を、1 5 の連結発現カセットの最後に追加し、これにより、機能性 e Y A C を作製する。e Y A C を、酵母細胞壁のザイモリナーゼ消化により、erg7 酵母株の形質転換コンピテントスフェロプラストに形質転換し、次いで C a C l 2 / P E G 緩衝液で処理して、e Y A C などの大きな分子に対して透過性のスフェロプラストを作成した。形質転換後、酵母スフェロプラストを、細胞壁の再生を生じ得る「ノーブル寒天 (noble agar)」系固体増殖培地中に埋め込む。コロニーは、接種後 4 ~ 8 日から現れる。再生培地はアミノ酸のロイシンおよびトリプトファンを欠き、こうして酵母細胞中で二重武装 e Y A C の存在について選択される。1 0 0 個の形質転換体を選択し、モグロシド I E 1、I A 1 および I I E の生産について分析する (液体クロマトグラフィー結合質量分析 (トリプル四重極型))。

【0112】

各形質転換体を画線培養し、酵母株のマーカおよび e Y A C の両方のアームの遺伝的存在、すなわち LEU2 および TRP1 マーカーについて試験する。形質転換体の 9 5 % 以上が正しい遺伝子型を有している。各形質転換体には、C E Y 指定番号が与えられる。当初 4 8 の C E Y を、1 0 0 m l のエルレンマイヤーフラスコ内の 5 0 m l の合成完全培地 (S C) 中にて、メチオニンなしで増殖させて e Y A C からの遺伝子発現を誘導するようにし、およびトリプトファン、ロイシンおよびヒスチジンなしで e Y A C の損失に対して逆選択 (counter-select) するようにした。培養物は、0 . 2 5 の O D 6 0 0 に対応する開始密度を有し、3 0 $^{\circ}$ C で 4 8 時間、ゆっくり振盪 (1 5 0 r p m) して接種した。2 4 時間後、それぞれの培養物から 1 m l の上清を回収し、L C - M S 分析に供した。陽性の C E Y (すなわち、アッセイしたいいずれかのモグロシドを生産するもの) を P C R 分析に供して、どの C Y P 遺伝子が保有 e Y A C 上に存在するかを評価し、こうして、モグロール経路 P 4 5 0 酵素を同定した。

【0113】

例 9 - モグロール経路前駆体の利用可能性の増強

本研究で用いたバックグラウンド株は、TRP1 遺伝子が欠失した BY4742 株である。この株は EFSC301 と呼ばれる。この実験室酵母株におけるオキシドスクアレンとジオキシドスクアレンの利用可能性を向上させるために、内因性 ERG7 遺伝子のプロモーターを、Nurseothricin マーカー (N a t M X) および C U P 1 の銅誘導性プロモーターからなる P C R 断片で置き換えた。この置換は低い転写をもたらし、これにより、酵母株を合成完全培地 (S C 培地) などの通常の増殖培地中で増殖させた場合に、ERG7 の低い発現を与える。ERG7 はラノステロールシンターゼをコードし、低い発現は、パン酵母でオキシドスクアレンとジオキシドスクアレンの蓄積をもたらすことが知られている。オキシドスクアレンは、一般的にトリテルペノイドの前駆体であり、モグロール経路の前駆体の可能性もある。さらにオキシドスクアレンとジオキシドスクアレンの利用可能性を向上させるために、ERG1 に

よってコードされるスクアレノエポキシダーゼを、ゲノムに組み込まれた遺伝子のコピーから、GPD1プロモーターによって過剰発現させた。ERG1によってコードされるスクアレノエポキシダーゼの配列は、本明細書中に配列番号54として提供される。さらに、酵母HMGレダクターゼの切断型コピー（tHMG1）は、GPD1プロモーターからの発現により、遺伝的に組み込まれた遺伝子コピーから発現させた。得られた株はEFSC3027と呼ばれる。

【0114】

EFSC3027株における、オキシドスクアレノとジオキシドスクアレノの製造の増強の成功は、2つの可溶性*S. grosvenorii*エポキシドヒドロラーゼのどちらか1つがこの株で発現された場合の、テトラヒドロキシスクアレノの生産によって実証された。1つのエポキシドヒドロラーゼは、配列番号38の*S. grosvenorii*エポキシドヒドロラーゼ1であった。これを発現する酵母を調製するために、*S. cerevisiae*用にコドン最適化された*S. grosvenorii*エポキシドヒドロラーゼ1の配列番号37の遺伝子配列を、酵母株EFSC3027に導入した。他のエポキシドヒドロラーゼは、配列番号40の*S. grosvenorii*エポキシドヒドロラーゼ2であった。これを発現する酵母を調製するために、*S. cerevisiae*用にコドン最適化された*S. grosvenorii*エポキシドヒドロラーゼ1の配列番号39の遺伝子配列を、酵母株EFSC3027に導入した。図7は、*S. grosvenorii*エポキシドヒドロラーゼ2を発現するプラスミドで形質転換された酵母株EFSC3027からの試料中の、テトラヒドロキシスクアレノのプロトン+Na⁺付加体に対応するLC-MS質量ピーク501を示す。テトラヒドロキシスクアレノは、ジオキシドスクアレノの2, 3および2, 2, 2, 3エポキシド結合により作製される。テトラヒドロキシスクアレノの蓄積は、EFSC301バックグラウンド株では検出されなかった。試料は、培養物アリコートに50%DMSO中で煮沸した後、遠心分離で細胞材料をペレット化することにより作製した。上清をその後ESI-LC-MSにより測定した。

βアミリンの製造用にオキシドスクアレノの利用可能性を増強するための同様のシステムは、Kirby, J et al in FEBS Journal 275 (2008) 1852-1859に記載されている。

【0115】

例10－酵母株EFSC3027でのククルビタジエノールの製造

*Siraitia grosvenorii*ククルビタジエノールシンターゼ、受入番号HQ128567（本明細書に配列番号42として提供される配列）の*S. cerevisiae*用にコドン最適化された遺伝子のコピーを、酵母株EFSC3027のゲノムに組み込み、この遺伝子の転写をGPD1プロモーターで駆動すると、ククルビタジエノールシンターゼの発現により、ESI-LC-MSによって容易に検出可能な量のククルビタジエノールが酵母株で発現される（図8参照）。*Siraitia grosvenorii*ククルビタジエノールシンターゼのアミノ酸配列は、本明細書において配列番号43として提供される。ククルビタジエノールを製造する配列番号42を含む株は、EFSC3498と呼ばれる。酵母株を、2%グルコースを含有する合成完全培地中で30℃にて5日間増殖させ、ククルビタジエノールの抽出を、培養物試料を50%エタノール/20%KOH中で5分間煮沸し、次いで等量のヘキサンで抽出し、その後ヘキサンを蒸発させ、乾燥抽出物をメタノール中に再懸濁することにより、実施する。図8は、EFSC3027でのラノステロールのLC-MSクロマトグラムピーク（上フレーム）、およびEFSC3498でのククルビタジエノールとラノステロールのLC-MSクロマトグラムピーク（下フレーム）を示す。ラノステロールに対応するピークは～8.05の保持時間を示し、一方ククルビタジエノールに対応するピークは7.85の保持時間を有する。ラノステロールとククルビタジエノール両方は、LC-MSクロマトグラムでの質量409.4を示す（プロトン付加体マイナス1個のH₂O）。

【0116】

例11－*S. cerevisiae*におけるオキソおよびヒドロキシククルビタジエノールの製造

ククルビタジエノール生産酵母株EFSC3498（実施例10に記載のように調製）を、2つのプラスミド、1つはTEF1プロモーターから*S. grosvenorii*CYP5491を発現するもの、もう1つもTEF1プロモーター（配列番号14として提供されている、CPR

4497をコードするDNA配列)から*S. grosvenorii* C P R 4497を発現するもので形質転換すると、3つの明らかなピークが出現する(LC-MSクロマトグラムのピークについて図9を参照)。*S. grosvenorii* C Y P 5491のアミノ酸配列は、本明細書中に配列番号44として提供され、*S. grosvenorii* C Y P 5491をコードするDNA配列は、配列番号14として提供される。*S. grosvenorii* C P R 4497のアミノ酸配列は、本明細書中に配列番号46として提供され、*S. grosvenorii* C P R 4497をコードするDNA配列は、配列番号45として提供される。図9の上部フレームは、C Y P 5491とC P R 4497がEFSC3498に発現された場合に現れる3つのピークのLC-MSクロマトグラムを示し、一方3つの下部フレームは、これらの3つのピークの断片化スペクトルを示す。C Y P 5491は、受入番号HQ128570およびHQ128571に対して、アミノ酸およびヌクレオチド配列レベルの両方で99%同一である。3つのピークの質量(443.38、441.37および457.36)は、それぞれ、ヒドロキシル化ククルビタジエノール、オキソククルビタジエノールおよびヒドロキシ+オキソククルビタジエノールのプロトン付加体の重量に対応する。理論に束縛されるものではないが、ヒドロキシル化ククルビタジエノール(プロトン化質量443.38)および酸化ククルビタジエノール(プロトン化質量441.37)は、それぞれ、11-ヒドロキシククルビタジエノールおよび11-オキソククルビタジエノールであると考えられる。オキソ+ヒドロキシククルビタジエノール(プロトン化質量457.36)の両方に対応するピークは、11-オキソ24, 25エポキシククルビタジエノールであって、次のどちらかから形成されたものである可能性がある:ククルビタジエノールシンターゼによるジオキシドスクアレンの環化およびC Y P 5491による11ヒドロキシル化(図10B)、または、C Y P 5491が多機能性であることにより、11-酸化および24, 25-エポキシ化の両方を行う(図10A)。

【0117】

例12- *S. grosvenorii* U G Tの発現による*S. cerevisiae*におけるモグロールのグリコシル化

U G Tの98、S K 98および1576を、イルミナの配列データからアセンブルしたフルーツ遺伝子コンティグから設計されたプライマーにより、*S. grosvenorii*の葉と根のcDNAからクローニングした。*S. grosvenorii*は、Horizon Herbs, LLC, United Statesから購入した。U G T 98のDNA配列およびタンパク質配列は、それぞれ本明細書において配列番号51および53として提供され、一方配列番号52は、*S. cerevisiae*における発現のためにコドン最適化されたU G T 98をコードするDNA配列を提供する。U G T S K 98のDNA配列およびタンパク質配列は、それぞれ本明細書において配列番号49および50として提供され、U G T 1576のDNA配列およびタンパク質配列は、それぞれ本明細書において配列番号47および48として提供される。酵母株EFSC1563は、両方ともエキソ-1, 3-β-グルカナーゼをコードするEXG1遺伝子とEXG2遺伝子の欠失を有する。酵母株EFSC1563(EFSC301 exg1 exg2)を、G P D 1プロモーターによって駆動され、成長培地中10~100 μMの濃度までモグロールを供給された、U G T 1576を発現するプラスミドで形質転換した場合、モグロシド I A 1の明確な形成がLC-MSによって検出された(図11B)。製造されたモグロシド I A 1は、LC-MS分析において参照モグロシド I A 1と同じ保持時間を示す。図11Aは、参照モグロシド I A 1のLC-MSクロマトグラムを示し、一方図11Bは、50 μMのモグロールを供給した培養物中の、U G T 1576を発現するEFSC1563の試料からのピークを示す。これらのデータは、U G T 1576遺伝子がモグロール24-OH UDP-グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するグリコシルトランスフェラーゼをコードすることを示す。試料は、培養物アリコートにDMSOと1:1で混合し、次に5分間煮沸し(80℃)、遠心分離によってペレット化することにより、作製した。上清をその後、E S I LC-MSに供した。

【0118】

G P D 1プロモーターからの発現により酵母発現プラスミドにクローニングされたU G

Tの98およびSK98を、UGT1576発現プラスミドの共形質転換なしでFSC1563に形質転換すると、供給されたモグロールの変換は検出されない。これとは対照的に、UGT98またはUGT SK98をUGT1576と共にモグロール供給EFSC1563で共発現すると、モグロシドIIA1の更なるグリコシル化がもたらされる。UGT1576と共に共発現されたUGT SK98は、ジグリコシル化モグロールの製造をもたらす（モグロシドIIA、図12A）、一方UGT SK98のUGT98との共発現は、ジおよびトリグリコシル化モグロールの製造をもたらす（中央と下部フレーム、図12B）。UGT98とUGT SK98の両方によって形成されるジグリコシル化モグロールは、LC-MS中のモグロシドIIEおよびモグロシドIIA1とは異なる保持時間を有し、これがモグロシドIIAであることをより確からしくする。これは、UGT98とUGT SK98の両方が、モグロシドIIA1のグルコースの1, 2グリコシル化を触媒できることを意味する。UGT98は多機能性であるらしく、モグロシドIIA1の1, 2グリコシル化を触媒して、モグロシドIIAの形成をもたらす、続いて、モグロシドIIAのおそらくは1, 6グリコシル化を触媒して、モグロシドIIIA1を形成する（図12B）。UGT98はモグロール自体をグリコシル化しないため、我々は、UGT98はモグロシドIIの1, 6グリコシル化を触媒すると考えている。したがって、UGT98は多機能性であり、モグロシドの24グルコース部分の1, 2および1, 6UDP-グルコースグリコシルトランスフェラーゼの両方である可能性が高い。UGTの98およびSK98は、UDP-グルコースグリコシルトランスフェラーゼのUGT91ファミリーに属し、このファミリーのメンバーは1, 2および1, 6グリコシルトランスフェラーゼであることが知られている。

10

20

図13は、モグロールからモグロシドIIIA1へのグリコシル化反応を概略的にまとめたものである。

【0119】

その他の実施形態

本発明は、その詳細な説明との関連で記載されているが、前述の説明は例示を意図しており、添付の特許請求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を理解すべきである。他の側面、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲内である。

【図 1】

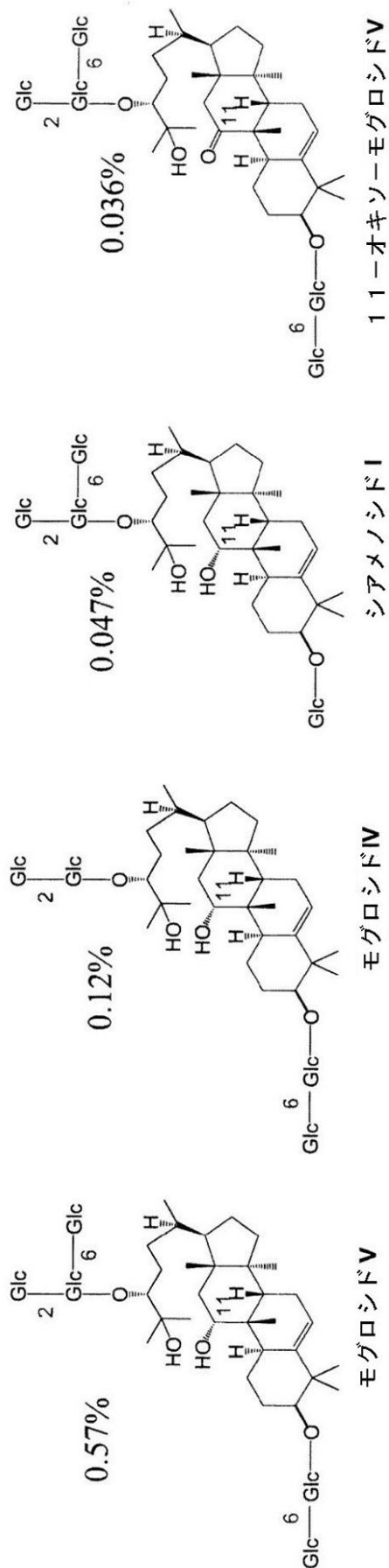


図 1

【図 2】

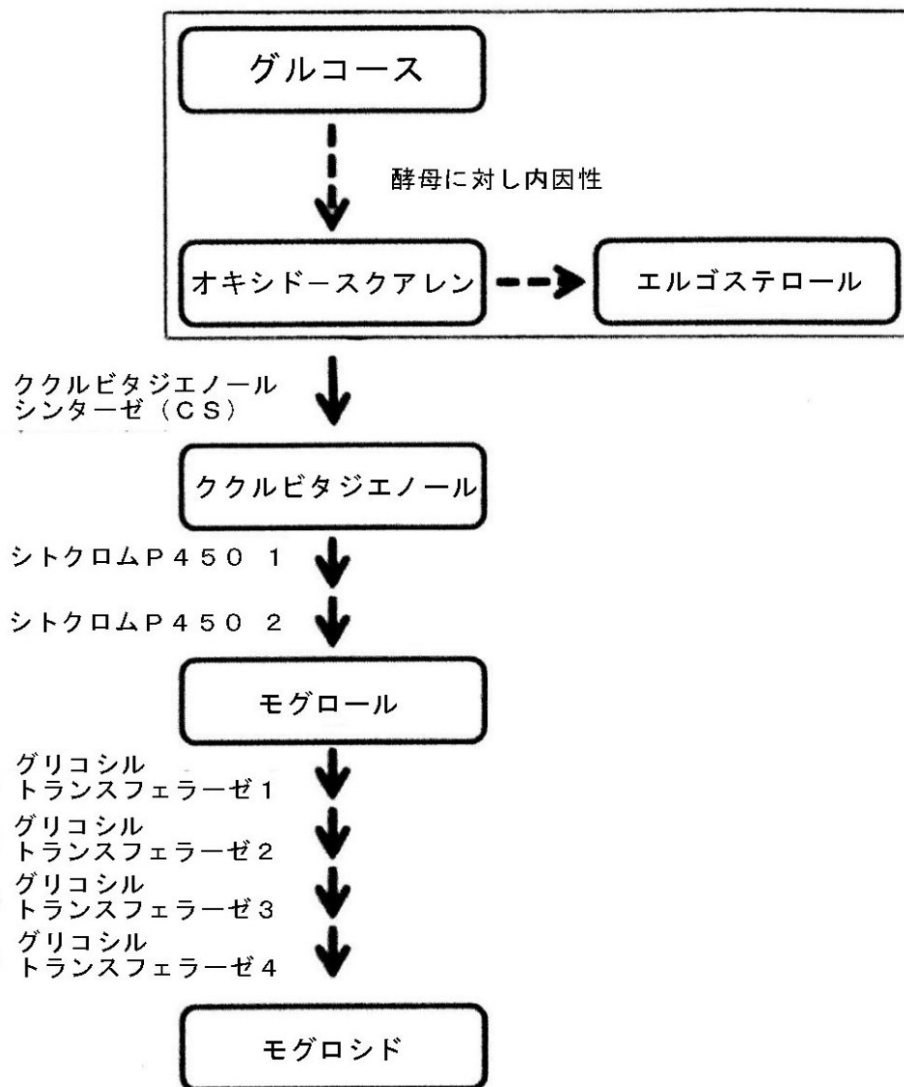


図 2

【図 3】

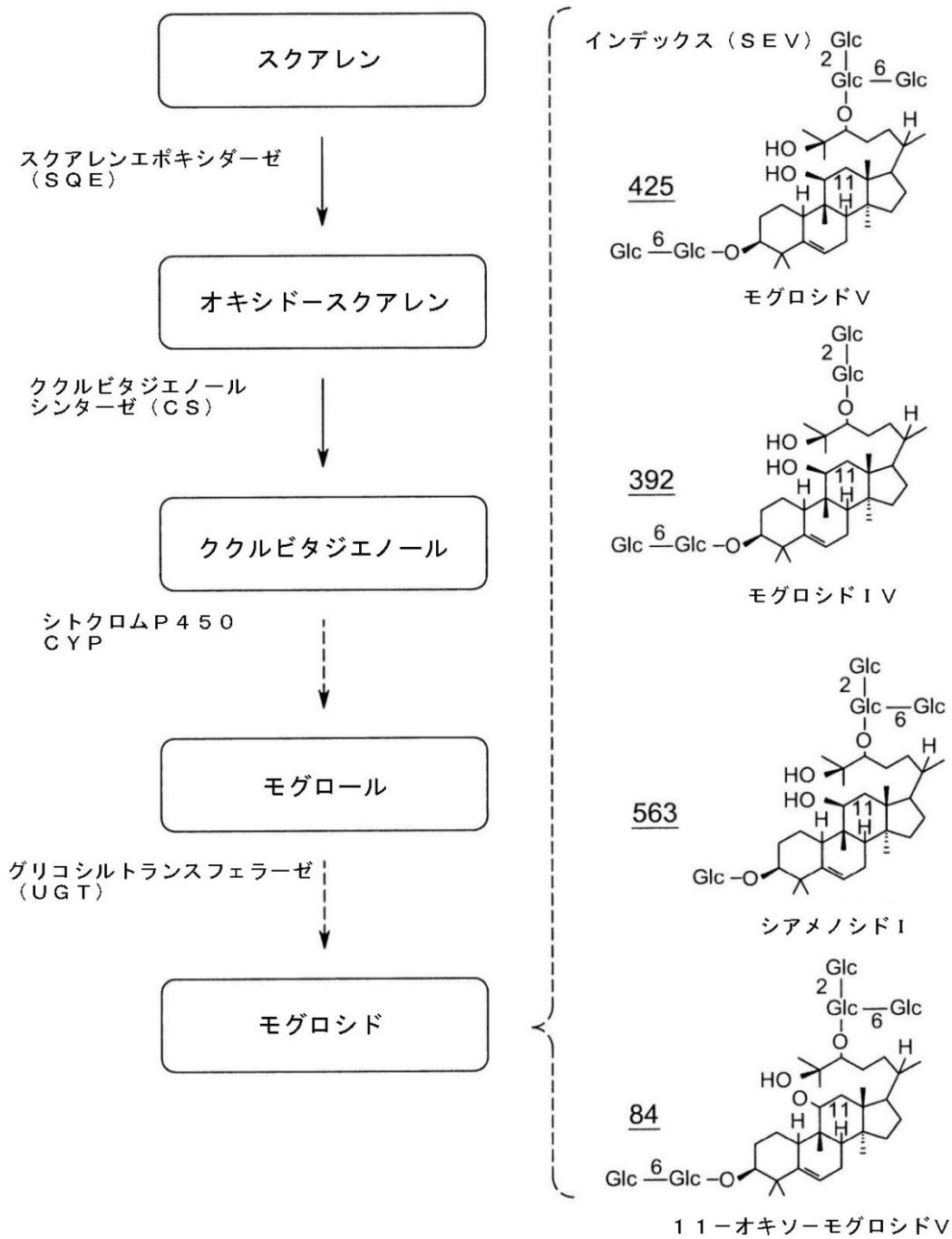
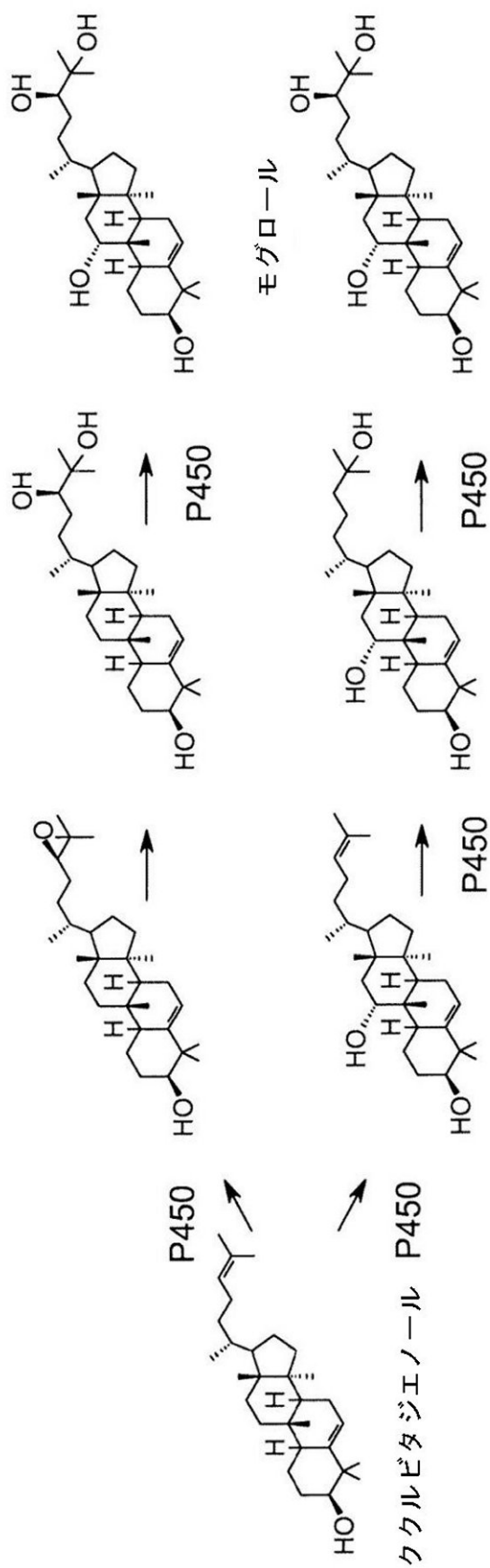
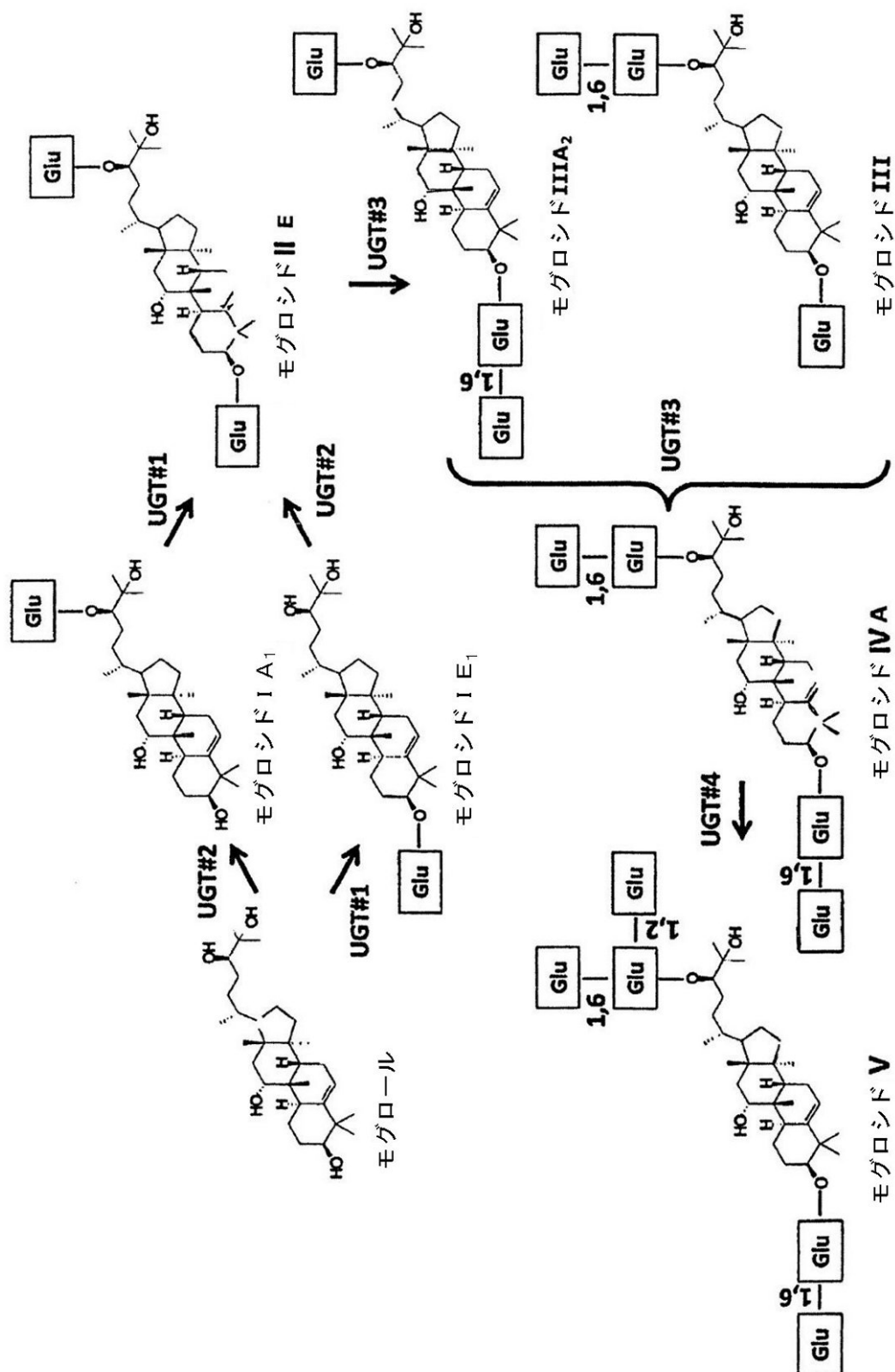


図 3

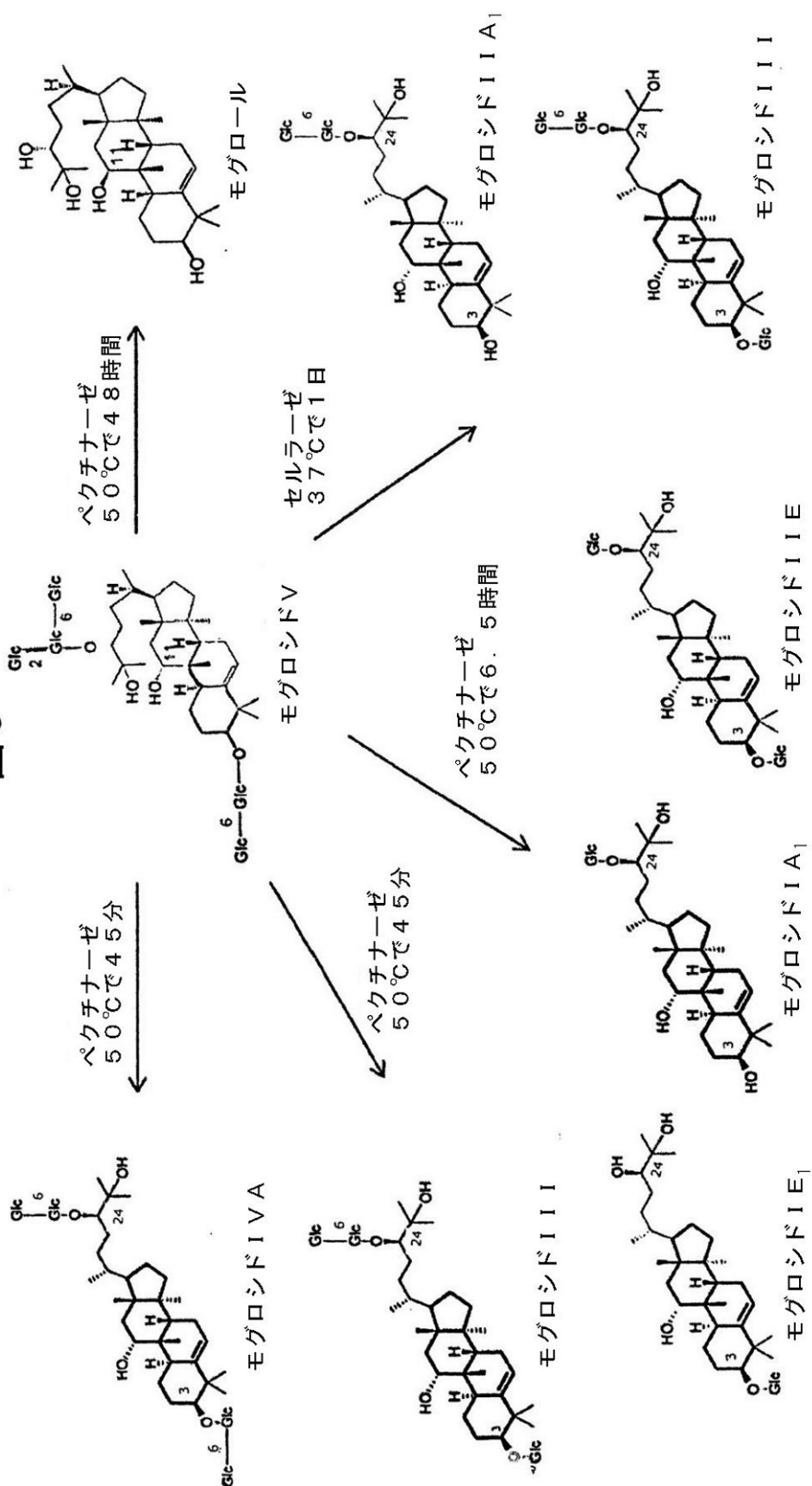
4
✕



5



9
✕



【図 7】

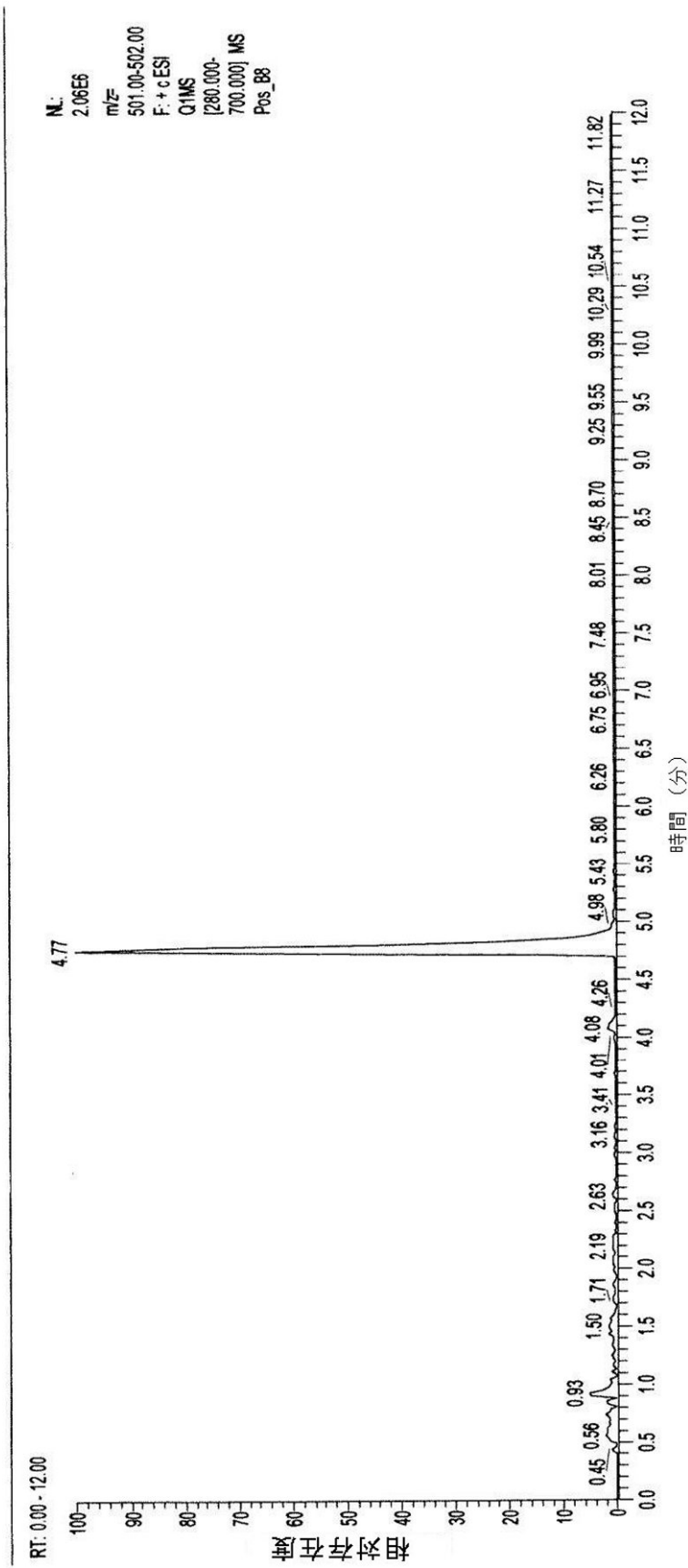
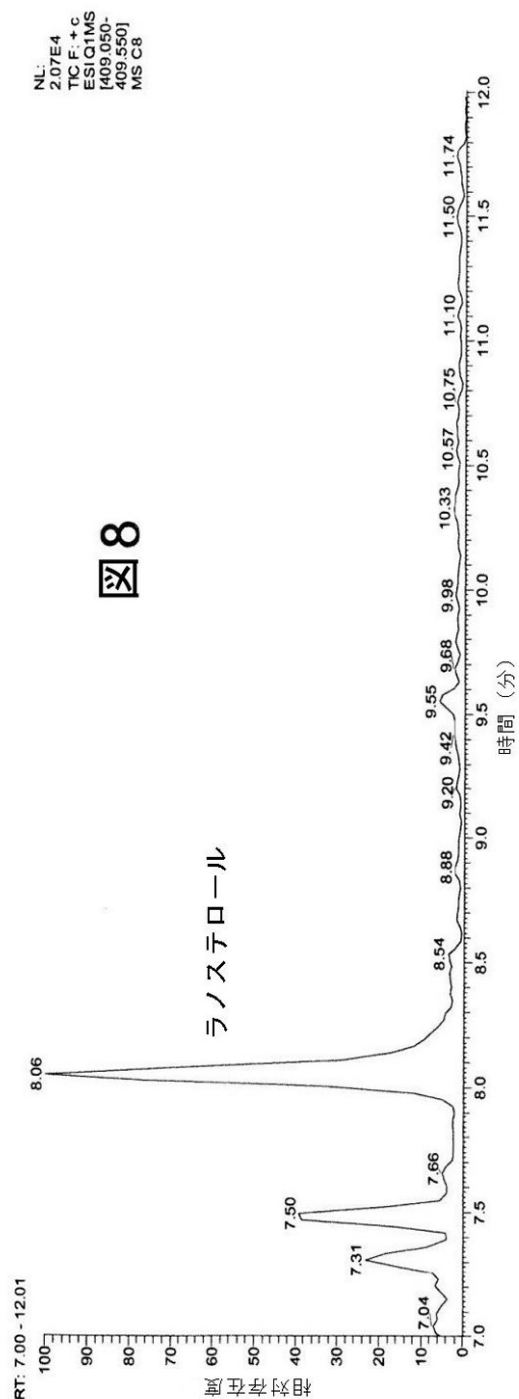
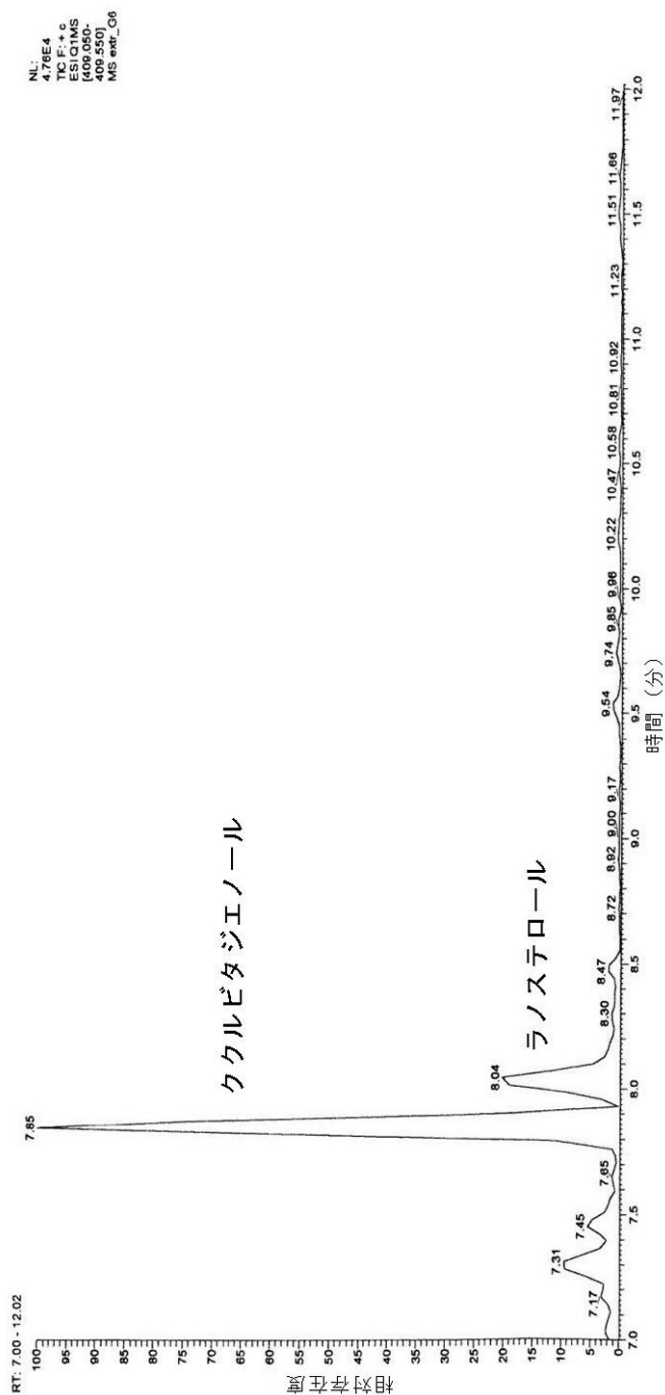


図 7



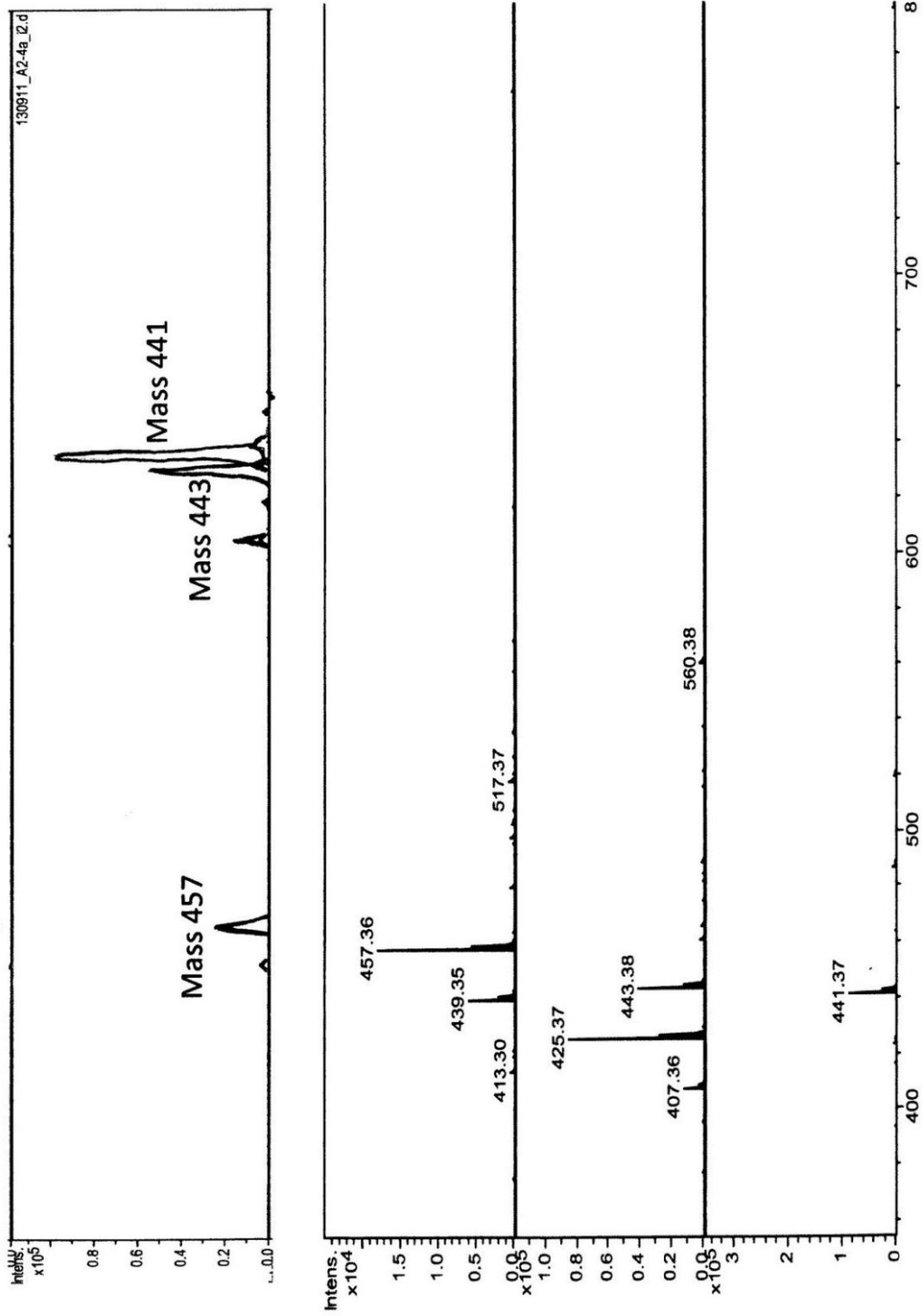
8



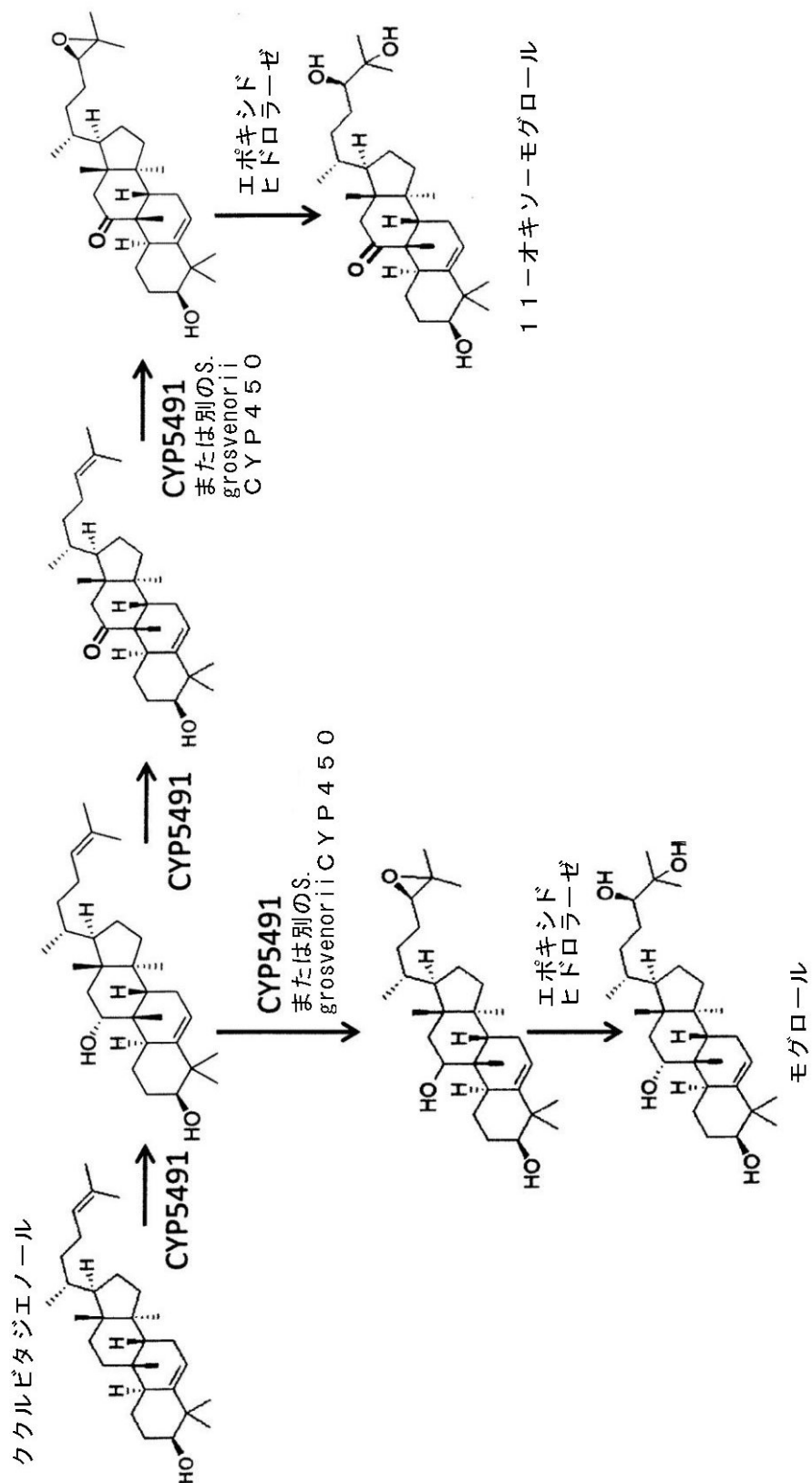
ラノステロール

【図 9】

図 9



【図 10 A】



【図 10 B】

図 10B

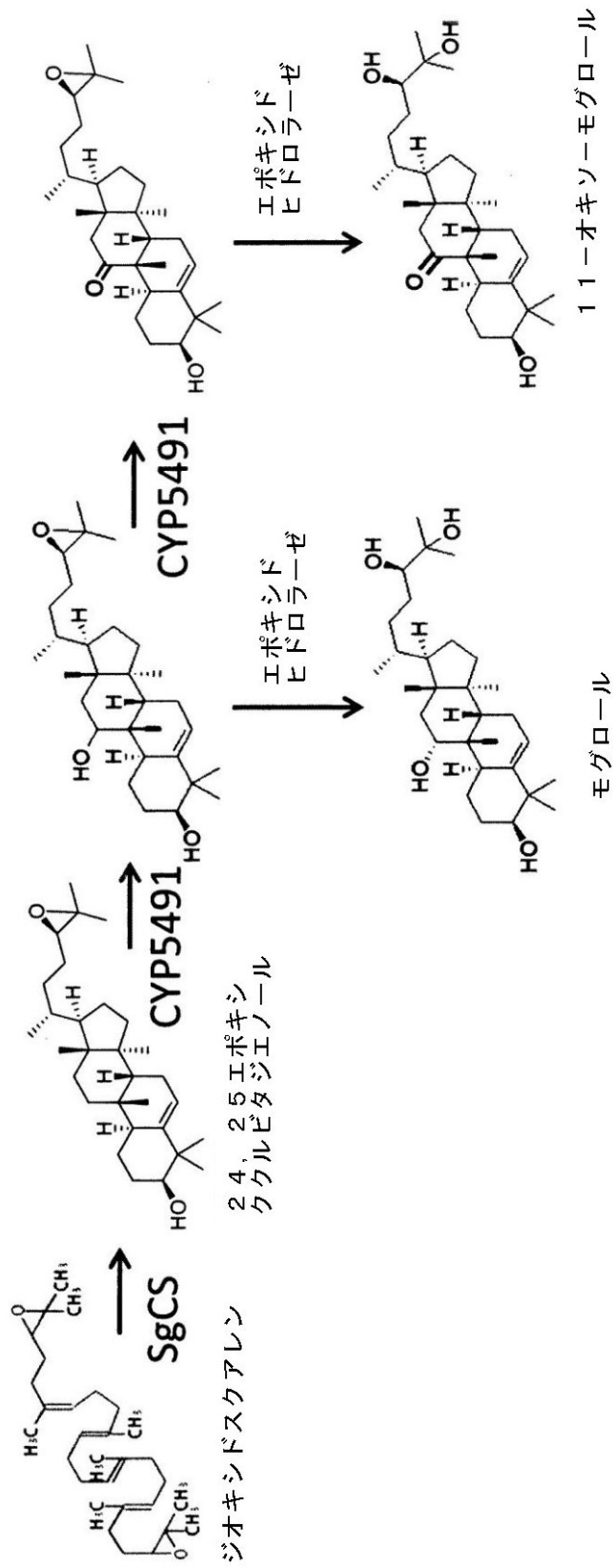
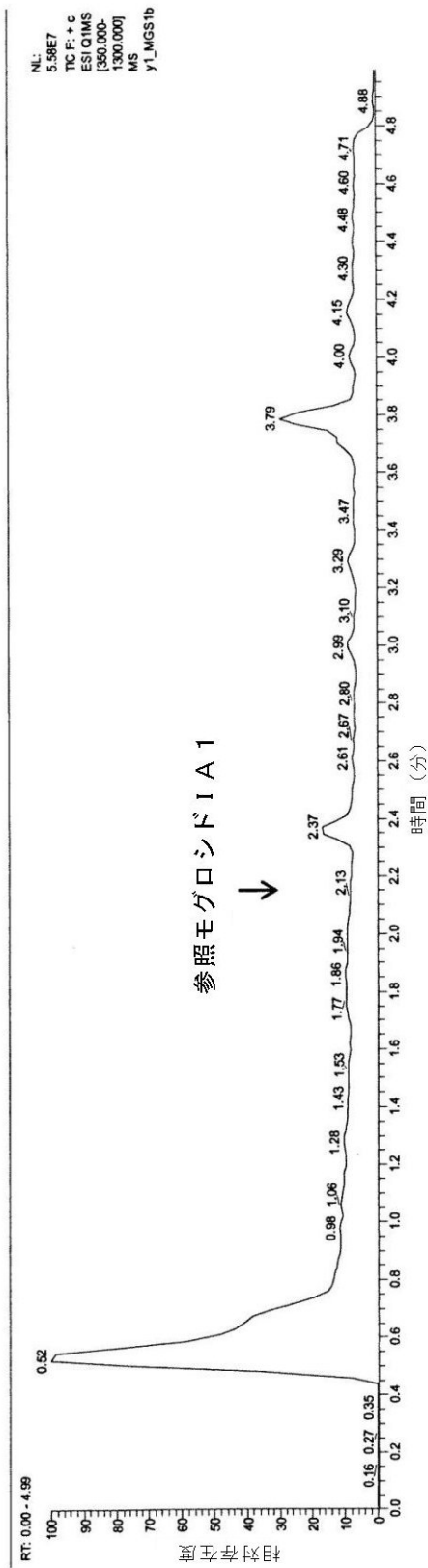
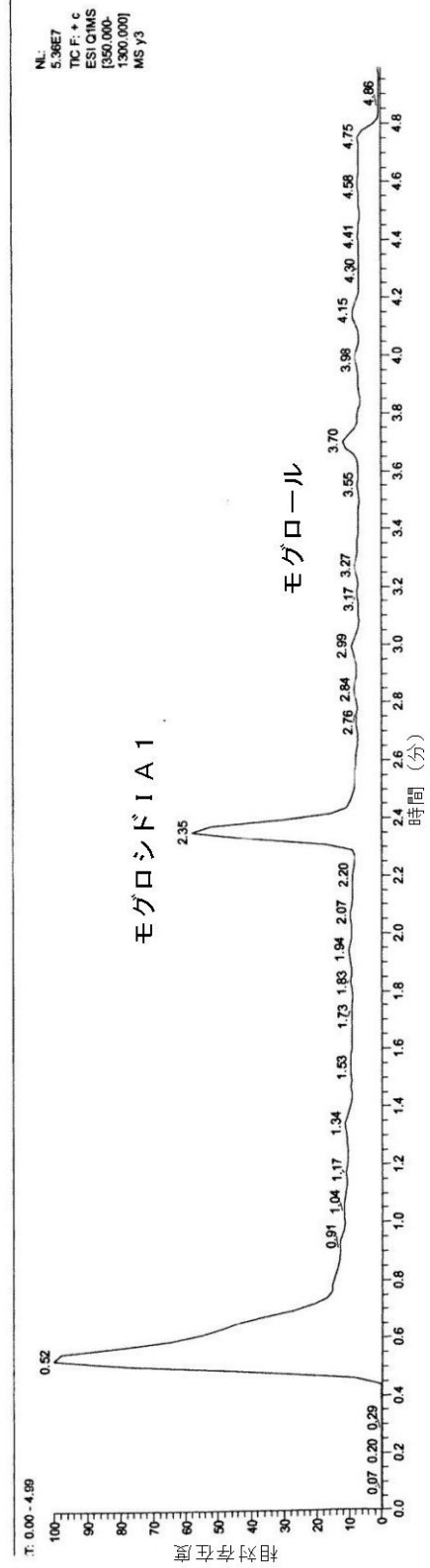


図 11

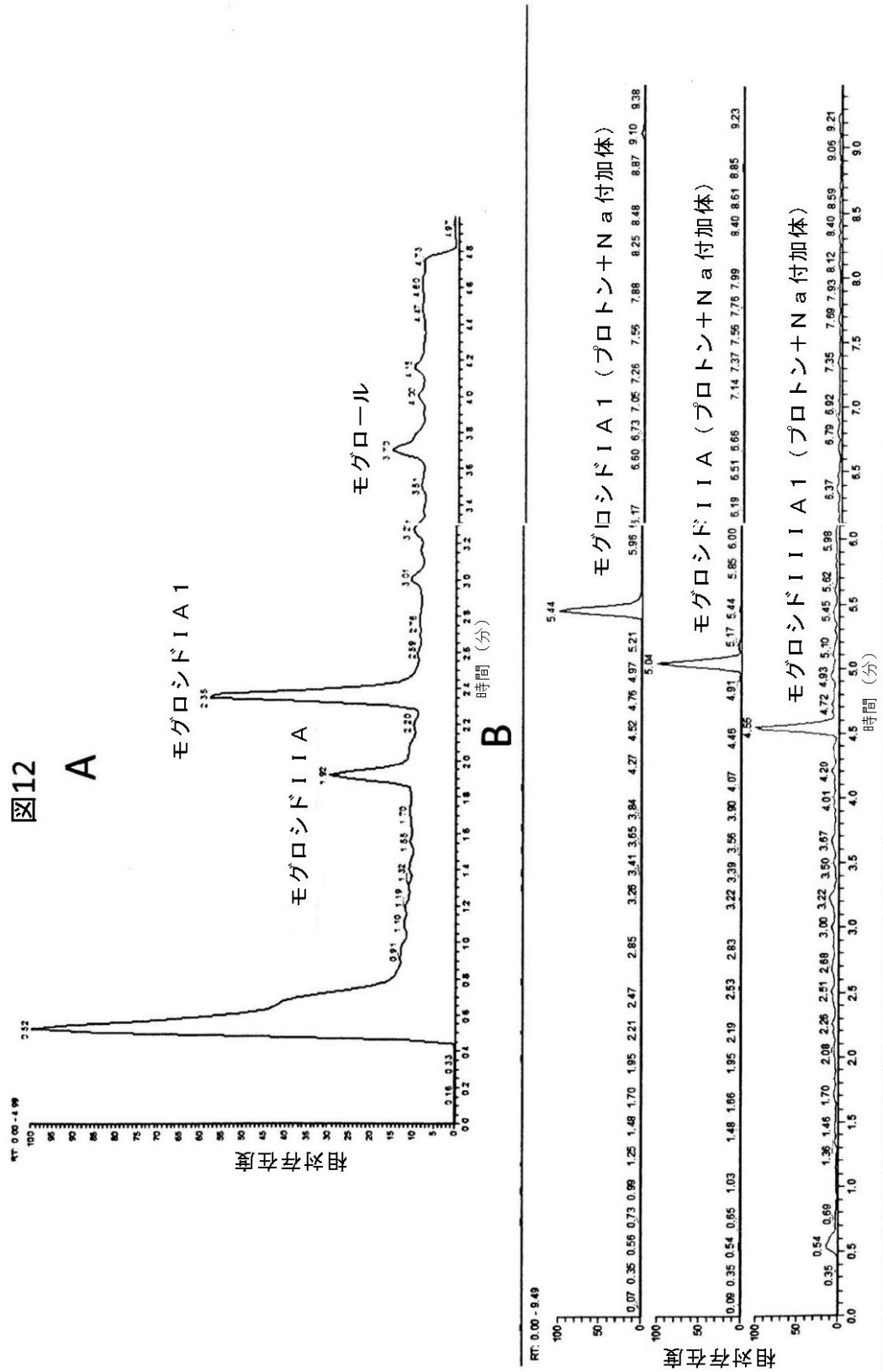
A



B

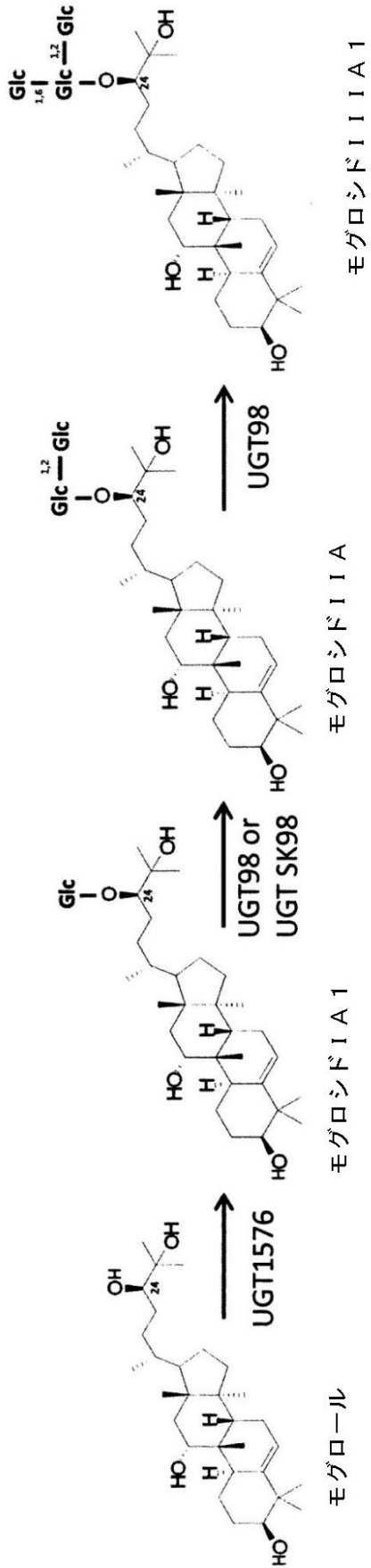


【図 12】



【図 13】

図 13



【図 14】

図 14

```

1   mwrlkvgaes vgeedekwvk svsnhlgrqv wefcadaaad tphqlqlqgn arnhfhhnrf
61  hrkqssdlfl aiqyekeiak gakggavkvk egeevgkeav kstleralgf ysavqtrdgn
121 wasdlggplf llpglivialh vtgvlnsvls khhrvemcry lynhqnedgg wglhiegtst
181 mfgsalnyva lrligedadg gdggamtkar awilerggat aitswgklwl svlgvyewsg
241 nnplppefwl lpyslfpfhpz rmwchcrmvz lpmsylygkr fvgpitpkvl slrqelytip
301 yheidwnksr ntcakedlyy phpkmqdilw gsiyhvyepf ftrwpgkrlr ekalqaamkh
361 ihyedensry iclgpvnkvl nmlccwvedp ysdafklhlq rvhdylwvae dgmrmqgyng
421 sqlwdtafsi qaivatklvd syaptlrkah dfvkdsqiqe dcpgdprvwf rhihkgawpl
481 strdhgwliis dctaeglkas lmlsklpstm vgepleknrl cdavnvlisl qndnggfasy
541 eltrsypwle linpaetfgd ividyppyvec taatmealtd fkkllhpghrt keidtaigka
601 anflekmgqa dgswygcwgv cftyagwfgi kglvaagrtz nscldairkac efllskelpg
661 ggwgesylsc qnkvytnleg nkphlvntaw vlmalieagq gerdpaplhr aarllmnsqf
721 engdfvqgei mgvfinkncmi tyaaayrnifp iwalgeychr vlte ( 配列番号 1 ).

```

【図 15 - 1】

図 15

CYP533

ATGGAACCTCTTCTCTACCAAACTGCAGCCGAGATCATCGCTGTTGTCTTGTCTTTCTACGCTCT
CATCCGGCTATTATCTGGAAGATTGAGCTCTCAACAGAAGAGACTGCCACCTGAAGCCGGTGGCG
CCTGGCCACTGATCGGCCATCTCCATCTCCTAGGTGGGTGCGAACCTGCACATAAAACCTTGGCG
AACATGGCGGACGCTACGGACCAGTTTTTACGTTGAACTGGGCATGCATACAGCTTTGGTTAT
GAGCAGTTGGGAAATAGCGAGAGAGTGTCTTACTAAAAACGACAGAATCTTTGCCTCCCGCCCCA
TAGTCACTGCCTCAAAGCTTCTCACCTATAACCATAACCATGTTTGGGTTCAGCCAATATGGTCCA
TTCTGGCGCCATATGCGCAAAATAGCCACGCTTCAACTCCTCTCAAACCACCGCCTCGAGCAGCT
CCAACACATCAGAATATCGGAGGTCCAGACTTCGATTAAGAACTGTACGAGTTGTGGGTCAACA
GCAGAAATAATGGAGGCGAGAAAGTGTGGTGGAGATGAAGACGTGGTTCGGAGGCATAACCTTG
AACACCATATTCAGGATGGTGGTTCGGAAAGCGATTCTCGACTGCTTTCGAAGGCAGTGGTGGCGA
ACGGTATCGGAAGGCGTTGAGGGATTCTCTGAATGGTTTGGGGCATTCGTTCCGTCAGATTTCAT
TCCCGTTTTTAAGATGGTTGGATTGAGGAGATATGAGAAGGCGATGAAGAAGACGGCGAGTGTG
CTGGACGAGGTGCTTGATAAATGGCTCAAAGAGCATCAGCAGAGGAGAACTCCGGTGAACCTGGA
GACGGAGGAGCAGACTTCATGCACGTGATGCTGTCTATTGTTAAGGATGATGAAGAAGTATCCG
GCTACGATGCCGATACAGTCAAAAAGCTACATGTTTGAATTTAATAGTTGGTGGATTTCGACACT
ACACAAGTAACTATGACATGGGCTCTTTCTTTGCTTCTCAACAATGAAGAGGTATTAATAAAGGC
CCAACCTGAACTAGACGAACAAGTTGGAAGAGAGAGGTTTGTGGAAGAGTCCGATGTTAAAAATC
TGTTATATCTCCAGGCCATCGTGAAGGAACTTTGCGTTTGTACCTTCAGCGCCAATCTCGACA
TTTCATGAGGCCATGGAAGATTGCACTGTTTCTGGCTACCACATCTTTTCAGGGACGCGTTTGAT
GGTGAATCTTCAAAGCTTCAAAGAGATCCACTTGCATGGGAGGATCCATGTGACTTTCGACCGG
AGAGATTTCTGACAACCTCATAAGGATTTGCATCTTAGAGGACATAGTCTCAATTGATACCATTT
GGGAGTGGTGAAGAATATGCCCTGGCATCTCGTTTGCCATTCAAGTTTTGCATCTTACGCTTGC
AAATCTACTTCATGGGTTTGACATTGGAAGGCCATCTCATGAACCAATCGATATGCAGGAGAGTA
AAGGACTAACGAGTATTAACAACCTCCACTTGAGGTTGTTTTAGCTCCACGCCTTGCTGCTCAA
GTTTATGAGTGA

CYP937

ATGCCGATCGCAGAAGGTGCAGTCTCTGATTTGTTTGGTTCGCCCCTCTTCTTTGCACTATATGA
TTGGTTCTTAGAGCATGGATCTGTTTATAAACTTGCCTTTGGACCAAAGCCTTTGTTGTTGTAT
CAGATCCCATTGTGGCAAGATATATTCTTCGAGAAAATGCATTTGGTTATGACAAGGGAGTGCTT
GCTGATATTTTAGAACCGATAATGGGTAAAGGACTAATACCAGCTGACCTTGGCACTTGGAGCA
GAGGAGACGAGTTATTGCTCCAGGATTCCATGCCTTGTACTTGAAGCTATGACCAAAGTATTTG
CCAATTGTTGAGAACGATCAATATTGAAATTGGAGAAGCTTCTAGGAGAAGGTGAACTACAGGAG
AATAAAACCATTGAGTTGGATATGGAAGCAGAGTTTTCAAGTTTGGCTCTTGATATCATTGGACT
CGGTGTTTTCAACTATGATTTTGGTTCTGTAAACCAAAGAATCTCCGGTGATTAAGGCTGTATATG
GGACTCTTTTTGAAGCAGAGCATAGATCGACTTCTATATCCCATATTGGAAAGTACCTTTGGCA
AGGTGGATAGTCCCAAGGCAGCGTAAATTCCATGGTGACCTTAAGGTTATTAATGAGTGTCTTGA
TGGCCTAATACGCAACGCAAGAGAAACCCGAGACGAAACGGATGTTGAGAAATTGCAGCAAAGGG
ACTACTTAAATCTCAAGGATGCCAGTCTTTTGCCTTCTTAGTTGATATGCGGGGAGCTGATGTT
GATGATCGCCAGCTTAGGGACGATCTGATGACGATGCTTATTGCTGGCCATGAAACAACCTGCTGC
TGTGCTTACATGGGCTGTTTTTTGCTTGACAAAATCCTTCAAAAATGAAAAAGCGCAAGCAG
AGATTGATTTGGTTCTTGGCATGGGGAGGCCAACTTTTTGAATCATTTAAAGCATTGAAGTACATC
AGACTTATCGTTGACAGAGACTCTTCGTTTGTTCCTCAGCCTCCATTGCTGATAAGACGAGCTCT
CAATCAGATATATTACCAGGAGGATACAATGGTGACAAAACCTGGATATGCAATTCCTGCAGGGA
CTGACATCTTCATCTCTGTTTACAATCTCCACAGATCTCCCTACTTCTGGGATAATCCTCAAGAA
TTTGAACCAGAGAGATTTCAAGTAAAGAGGGCAAGCGAGGGAATTGAAGGATGGGATGGTTTCGA
CCCATCTAGAAGCCCTGGAGCTCTATACCCGAATGAGATTGTAGCAGACTTTTCCTTCTTACCAT

【図 15 - 2】

TTGGTGGAGGCCCTAGAAAATGTGTGGGAGATCAATTTGCTCTAATGGAGTCAACTATAGCATTG
 GCCATGTTACTGCAGAAGTTTGTATGTGGAGCTAAAAGGAAGTCCAGAATCTGTAGAACTAGTTAC
 TGGAGCCACAATACATACCAAAAAGTGGGTGTGGTGCAAAGTGAAGAAGATCACAAAGTAAACT
 GA

CYP1798

ATGGAAATGTCTCAAGTGTGCGCAGCCACAATCAGTATCTGGATGGTCTGTCGTATGTATCGTAGG
 TGTAGGTTGGAGAGTCGTAAATTGGGTTTGGTTGAGACCAAAGAAATTGGAAAAGAGATTGAGAG
 AACAAAGGTTTGGCCGGTAATTCTTACAGATTGTTGTTTCGGTGACTTGAAGGAAAGAGCTGCAATG
 GAAGAACAAGCAAATTCAAAGCCTATAAACTTCTCCCATGACATCGGTCCAAGAGTTTTCCTTC
 AATGTACAAGACCATCCAAAACCTACGGTAAAACTCCTACATGTGGTTAGGTCCATACCCTAGAG
 TCCACATCATGGATCCACAACAATTGAAGACCGTTTTTACTTTGGTCTACGACATTCAAAAGCCA
 AATTTGAACCCTTTGATTAAATTCTTGTAGATGGTATCGTTACACATGAAGGTGAAAAGTGGGC
 TAAGCACAGAAAGATTATTAACCCAGCATTCCATTTGGAAAAGTTGAAGGATATGATACCTGCTT
 TCTTTCACCTCATGTAATGAAATCGTCAACGAATGGGAAAGATTGATTTCAAAGAAGGTTCTGCTG
 GAATTGGATGTAATGCCTTATTTGCAAAATTTGGCCGCTGACGCCATTTCAAGAACCGCTTTTGG
 TTCTTCATACGAAGAAGGTAAAATGATCTTCCAATTGTTGAAGGAATTGACTGATTTGGTTGTCA
 AGGTAGCTTTTGGTGTATTATATCCAGGTTGGAGATTCTTGCTACAAAGAGTAACAACAAAATG
 AAGGAAATTAATAGAAAAATCAAGTCTTTGTTGTTGGGTATCATTAAACAAGAGACAAAAGGCAAT
 GGAAGAAGGTGAAGCCGGTCAATCTGATTTGTGGGTATATTAATGAAAGTAATTCTAACGAAA
 TCCAAGGTGAAGGTAAATAACAAGGAAGATGGCATGTCTATTGAAGACGTCATCGAAGAGTGAAG
 GTATTTTATATAGGTGGTCAAGAACTACAGCAAGATTATTGATCTGGACTATGATATTGTTGTC
 CAGTCATACAGAATGGCAAGAAAGAGCCAGAACCAGTCTTGAAGGTATTTGGTAATAAGAAAC
 CAGATTTTCGACGGTTTGTCAAGATTGAAGGTAGTTACTATGATCTTGAACGAAGTTTAAAGATTG
 TACCCACCTGCTTCCATGTTGACAAGAATCATCCAAAAGGAAACAAGAGTTGGTAAATTAACCTT
 GCCAGCAGGTGTTATCTTGATAATGCCTATCATCTTGATACATAGAGATCACGACTTGTGGGGTG
 AAGATGCTAACGAGTTTAAACCAGAAAGATTCAAGTAAAGGTGTTTCTAAGGCAGCCAAAGTCCAA
 CCAGCCTTTTTCCCTTTTGGTTGGGGTCCTAGAATTTGCATGGGTCAAACCTTCGCTATGATCGA
 AGCTAAGATGGCATTGAGTTTGATCTTGCAAGATTTTCTTTCGAATTGTCTTCATCTACGTTTC
 ATGCACCAACTGTCGTCTTCACTACACAACCACAACACGGTGCCACATCGTTTTGAGAAAGTTA
 TGA

CYP1994

ATGGAACCACAACCAAGTGCAGGAATTCAACTGGAATCACAGCCTAAGCACCGTCGCTATCGGTGT
 CATTGCCATTATTTTCTTCCGTTTCTCGTCAAAGAGTCAACGGCGCCGGTGAGCGAAAGGGTC
 CGAAGCCGCCAAAAGTAGCCGGAGGGTGGCCTCTAATTGGCCACCTCCCTCTCCTCGGAGGACCT
 GAACTGCCCCATGTCAAACCTGGGTGGTTTGGCTGATAAATATGGTCCAATCTTCTCGATCCGGCT
 GGGTGTCCACTCCGCCGTCGTGATAAACAGTTGGGAGGCGCGAAACAGTTATTAACCAACCATG
 ACGTCGCCGTCTCTTCCCGCCCCCAAATGCTCGGCGGAAACCTCCTGGGCTACAACCTACGCCGTG
 TTTGGTTTCGACCCCTACGGCTCTTACTGGCGCAACATGCGCAAGATAACCACGCAAGAGCTTCT
 ATCCAATAGCAGAATCCAGCTCCTAAGAGACGTTTCGAGCGTCAGAAGTGAACCAAGGCATAAAAG
 AGCTCTACCAGCACTGGAAAGAAAGAAGAGACGGTACAGACCAAGCCTTGGTGGAAGTGCAGCAG
 TGGGTGCGGGACTTGACTATGAATCTGATTCTCGGAGTCATCGCCGGGAAAAGGTTCTTTGGAGC
 TGCAGCAACGGTAGACGAGGAAGAGGCGCGACGGAGCCATAAAGCATTGAAGGAGTTGTTACATT
 ATATGGGGCTTTTTCTACTGGGTGATGCTGTTCCATATCTAGGATGGTTGGACGTCGGCGGCCAT
 GTGAAGGCGATGAAGAAAACCTCAAAGAATTGGACCGTATGTTAACACAGTGGTTGGAGGAGCA
 CAAGAAGGAAGGACCCAAGAAAGATCATAAAGACTTCATGGACGTGATGCTTTCAGTTCTCAATG
 AAACATCCGATGTTCTTTTCAAGATAAGACCCATGGCTTCGATGCTGATACCATCATCAAAGCTACA
 TGTATGACGATGGTTTTAGGAGGGAGTGATACGACGGCGGTGGTTGTGATATGGGCAATCTCGCT
 GCTGCTGAATAATCGCCCTGCGTTGAGAAAAGTGCAAGAAGAACTGGAAGCCCATATCGGCCGAG
 ACAGAGAAGTGGAGGAATCGGATCTCGGTAAGCTAGTGTATTTGCAGGCAGTCGTGAAGGAGACA
 TTGCGGCTGTACGGAGCCGAGGCCTTTTCTTTCGTGAAACCACAGAGGATGTCACCATCGACGG

図 15 (続き)

【図 15 - 3】

ATTCCATGTCGAGAAAGGGACATGGCTGTTGCTGAACGTGGGGAAGATCCACAGAGATGGGAAGG
TGTGGCCGGAGCCAACGGAGTTCAAACCGGAGAGGTTTCTGACGACCCACAAAGATTTTGATCTG
AAGGGCCAGCGGTTTGAGCTCATCCCTTTCCGGGGGAGGAAGAAGATCGTGCCCTGGAATGTCTTT
TGGGCTCCAAATGCTACAGCTTATTTTGGGTAAACTGCTTCAGGCTTTTGATATATCGACGCCGG
GGGACGCCCGCGTTGATATGACCGGATCCATTGGACTGACGAACATGAAAGCCACTCCATTGGAA
GTGCTCATCACCCCGCGCTTGCTCTTTTCGCTTACGATTGA

CYP2048

ATGGAGACTCTTCTTCTTCATCTTCAATCGTTATTTTCATCCAATTTCTTCACTGGTTTCGTTGT
CCTCTTTAGCTTCCTGTTCTGCTCCAGAAATGGTTACTGACACGTCCAAACTCTTCATCAGAAG
CCTCACCCCTTCTCCACCAAGCTTCCCATCTTCGGACACCTTCTAAACCTGGGTCTGCATCCC
CACATCACCTCGGAGCCTACGCTCGCCGCTATGGCCCTCTCTTCTCTCCACTTCGGCAGCAA
GCCCCACATCGTCGTCCTTCTGCGGAAATCGCTCGCGATATCATGAAGACCCACGACCTCGTCT
TCGCCAACCGTCCATAAATCAAGCATCAGCGAAAAGATTCTTTACGGCTCCAAAGATTTAGCCGCA
TCTCCTTACGGCGAATACTGGAGGCAGATGAAAAGCGTTGGCGTGCTTCATCTTTTGAGCAACAA
AAGGGTTCAATCCTTTTCGCTCTGTCTAGAGAAGAAGTCGAACTGATGATCCAGAAGATCCAAC
AGAACCCCTATCAGTTAATTTAAGCGAAATATTTCTCTGGACTGACGAACGACATAGTTTGCAGG
GTGGCTTTTAGGGAGAAAGTATGGCGTGGGAGAAGACGGAAAGAAGTTCCGGTCTCTTCTGCTGGA
GTTTGGGGAAGTATTGGGAAGTTTTCAGTACGAGAGACTTCATCCCGTGGCTGGGTTGGATTGATC
GTATCAGTGGGCTGGACGCCAAAGCCGAGAGGGTAGCCAAAGAGCTCGATGCTTTCTTTGACAGA
GTGATCGAAGATCACATCCATCTAAACAAGAGAGAGAATAATCCCGATGAGCAGAAGGACTTGCT
GGATGTGCTGCTTTGTGTACAGAGAGAAGACTCCATCGGGTTTCCCTTGAGATGGATAGCAATA
AAGCTTTAATCTTGACATGTTTGCTGCAGGCACAGACACGACATACACGGTGTGGAGTGGGCA
ATGTCCCAACTGTTGAGACACCCAGAAGCGATGAAGAACTGCAGAGGGAGGTCAGAGAAATAGC
AGGTGAGAAAGAACACGTAAGTGAGGATGATTTAGAAAAGATGCATTACTTGAAGGCAGTAATCA
AAGAAACGCTGCGGCTACACCCACCAATCCCACTCCTCGTCCCCAGAGAATCAACCCAAGACATC
AGGTTGAGGGGGTACGATATCAGAGGCGGCACCCGGGTTATGATCAATGCATGGGCCATCGGAAG
A

CYP2740

ATGTCGATGAGTAGTGAAATTGAAAGCCTCTGGGTTTTTCGCGCTGGCTTCTAAATGCTCTGCTTT
AACTAAAGAAAACATCCTCTGGTCTTTACTCTTCTTTTTCTTAATCTGGGTTTCTGTTTCCATTTC
TCCACTGGGCCCATCCGGGCGGCCCGGCTTGGGGCCGCTACTGGTGGCGCCGCCGCCGAGCAAT
TCCACCGCCGCTGCTATTCCCGGCCCGAGAGGCCTCCCCCTCGTCGGCAGCATGGGCTTGATGGC
CGACTTGGCCCAACACCGGATTGCCGCCGTGGCTGACTCCTTAAACGCCACCCGCTCATGGCCT
TTTCGCTCGGCGACACTCGCGTGATCGTCACATGCAACCCCGACGTCGCCAAAGAGATTCTCAAC
AGCTCCCTCTTCGCCGACCGCCCCGTTAAGGAGTCCGCTTACTCCTTGATGTTCAACCGCGCCAT
TGGGTTCCGCCCCCTATGGCCTTTACTGGCGGACCCTCCGCCGCATCGCTTCCCACCACCTCTTCT
GCCCCAAGCAAATCAAGTCTCCAGTCCCAGCGCCGCCAAATCGCTTCCCAAATGGTCGCAATG
TTCGCAAACCGCGATGCCACACAGAGCCTCTGCGTTTCGCGACTCTCTCAAGCGGGCTTCTCTCAA
CAACATGATGGGCTCTGTTTTCGGCCGAGTTTACGACCTCTCTGACTCGGCTAACAATGACGTCC
AAGAACTCCAGAGCCTCGTCGACGAAGGCTACGACTTGCTGGGCTCCTCAACTGGTCCGACCAT
CTCCCATGGCTCGCCGACTTCGACTCTCAGAAAATCCGGTTCAGATGCTCCCGACTCGTCCCCAA
GGTGAACCACTTCGTCGGCCGGATCATCGCCGAACACCGCGCCAAATCCGACAACCAAGTCTTAG
ATTTCTGTCGACGTTTTGCTCTCTCTCCAAGAAGCCGACAAACTCTCTGACTCCGATATGATCGCC
GTTCTTTGGGAAATGATTTTTCGTGGGACGGACACGGTGGCAGTTTTAATCGAGTGGATACTGGC
CAGGATGGTACTTCACAACGATATCCAAGGAAAGTTCAAGAGGAGCTAGATAACGTGGTTGGGA
GTACACGCGCCGTCGCGGAATCCGACATTCCGTGCTGGTGTATCTAACGGCTGTGGTTAAGGAA
GTTCTGAGGTTACATCCGCCGGGCCCCACTCCTGTGCTGGGCCCCGCTAGCCATCACTGATACAAT
CATCGATGGGCATCACGTGCCCCGGGGGACCACCGCTATGGTTAACATGTGGTCGATAGCGCGGG
ACCCACAGGTCTGGTCGGACCCACTCGAATTTATGCCCCAGAGGTTTGTGTCCGACCCCGGTGAC
GTGGAGTTCTCGGTCATGGGTTCCGATCTCCGGCTGGCTCCGTTCCGGGTCGGGCAGAAGGACCTG

図 15 (続き)

【図 15 - 4】

CCCCGGGAAGGCCTTCGCCTGGACAACTGTCACCTTCTGGGTGGCCACGCTTTTACACGACTTCA
 AATGGTCGCCGTCCGATCAAAACGACGCCGTCGACTTGTGCGAGGTCCTCAAGCTCTCCTGCGAG
 ATGGCCAATCCCCTCACCGTTAAAGTACACCCAAGGCGCAGTTTAAGCTTTTAA

CYP3404

ATGGATGGTTTTCTTCCAACAGTGGCGGCGAGCGTGCCTGTGGGAGTGGGTGCAATATTGTTTAC
 GCGGTTGTGCGTCGTGCGTGGGAGGGGTTTTGGTTTTATTCTATGGACCTTACTGGGGAGTGAGAA
 GGGTGCCGTGGTCCACCAGCTATTCCACTGGTTCGGACATCTTCCCTTGCTGGCTAAGTACGGCCCA
 GACGTTTTCTCTGTCTTGGCACCCTAATATGGCCCTATCTTCAGGTTCCATATGGGTAGGCAGCC
 ATTGATAATTATAGCAGACCCTGAGCTTTGTAAAGAAGCTGGTATTAAGAAATTCAGGACATCC
 CAAATAGAAGTGTCCCTTCTCCAATATCAGCTTCCCCTCTTCATCAGAAGGGTCTTTTTCTTACA
 AGGGATGCAAGATGGTTCGACAATGCGGAACACGATATTATCGGTCTATCAGTCCTCCCATCTAGC
 GAGACTAATACCTACTATGCAATCAATCATTGAACTGCAACTCAAATCTCCATTCTCTGTCC
 AGGAAGACATCCCTTTCTCCAATCTCTCCCTCAAATTGACCACCGATGTGATTGGAACAGCAGCC
 TTCGGTGTCAACTTTGGGCTCTCTAATCCACAGGCAACCAAACTTGTGCTACCAACGGCCAAGA
 CAACAAAAATGACGAAGTTTCAGACTTCATCAATCAACACATCTACTCCACAACGCAGCTCAAGA
 TGGATTTATCAGGTTCCCTTCTCAATCATACTTGGACTGCTTGTCCCTATACTCCAAGAACCATT
 AGACAAGTCCTAAAGAGAATACCATTACCATGGACTGGAAAGTGGACCGGACAAATCAGAAATT
 AAGTGGTCGGCTTAATGAGATTGTGGAGAAGAGAATGAAGTGTAAACGATCAAGGTTCAAAGACT
 TCTTATCGCTCATTTTGAGAGCAAGAGAGTCAGAGACAGTATCAAGGAATGTCTTCACTCCAGAC
 TACATCAGTGCAGTTACGTATGAACACCTACTTGTGCTGGGTCCGCTACCAACGGCGTTTACGTTGTC
 TTCTATTGTATATTTAGTTGCTGGGCATCCAGAAGTCGAGAAGAAGTTGCTAGAAGAGATTGACA
 ACTTTGGTCCATCCGATCAGATACCAACAGCTAATGATCTTCATCAGAAGTTTCCATATCTTGAT
 CAGGTGATTAAAGAGGCTATGAGGTTCTACACTGTTTCCCCTCTAGTAGCCAGAGAAACAGCTAA
 AGATGTGGAGATTGGTGGATATCTTCTTCCAAAGGGGACATGGGTTTGGTTAGCACTTGGAGTTC
 TTGCCAAGGATCCAAAGAACTTTCCAGAACCAGATAAATTCAAACCAGAGAGGTTTGATCCAAAT
 GAAGAAGAGGAGAAACAAAGGCATCCTTATGCTTTAATCCCCTTTGGAATTGGTCTCGAGCATG
 CATTGGTAAAAAATTCGCCCTTCAGGAGTTGAAGCTCTCGTTGATTCAATTTGTACAGGAAGTTTG
 TATTTCCGCAT

CYP3968

ATGGAAATCATTTTATCATATCTCAACAGCTCCATAGCTGGACTCTTCCCTCTTGCTTCTCTTCTC
 GTTTTTTGTGTTTGAAGGCTAGAACCTGTAAACGCAGACAGCCTCCTGAAGCAGCCGGCGGAT
 GGCCGATCATCGGCCACCTGAGACTGCTCGGGGGTTCCGAACCTCCCCATGAAACCTTGGGAGCC
 ATGGCCGACAAGTATGGACCAATCTTCAGCATCCGAGTTGGTGTCCACCCATCTCTTGTTATAAG
 CAGTTGGGAAGTGGCTAAAGAGTGCTACACCACCCTCGACTCAGTTGTCTCTTCTCGTCCCAAGA
 GTTTGGGTGGAAAGTTGTTGGGCTACAACCTTCGCCGCTTTTGGGTTTCAGGCCTTATGATTCTTT
 TACCGGAGTATCCGCAAAACCATAGCCTCCGAGGTGCTGTGCAACCGCCGCTGAGGATTGCAGAG
 ACACATTGAGTTTCTGAGGTGAAGAGATCGGTGAAGGAGCTTTACAATCTGTGGACGCAGAGAG
 AGGAAGGCTCAGACCACATACTTATTGATGCGGATGAATGGATTGGTAATATTAATTTGAACGTG
 ATTCTGATGATGGTTTGTGGGAAGCGGTTTCTTGGCGGTTCTGCCAGCGATGAGAAGGAGATGAG
 GCGGTGTCTCAAAGTCTCGAGAGATTCTTCGATTTGACAGGGCAGTTTACGGTGGGAGATGCCA
 TTCCCTTTCCTGCGATGGCTGGATTTGGGTGGATATGCGAAGGCGATGAAGAAAACCTGCAAAAGAA
 ATGGACTGTCTCGTTGAGGAATGGCTGGAAGAACCCGCCGGAAGAGAGACTCCGGCGCCACCGA
 CGGTGAACGTGACTTCATGGATGTGATGCTTTGATTTCTGAAGAGATGGACCTTGCTGGCTACG
 ACGCTGACACAGTCAACAAAGCCACATGCCTGAGCATTATTTCTGGGGGAATCGATACTATAACG
 CTAACCTTGACATGGGCGATCTCGTTATTGCTGAACAATCGAGAGGCACTGCGAAGGGTTCAAGA
 GGAGGTGGACATCCATGTGCGAAACAAAGGCTTGTGGATGAATCAGACTTGAGCAAGCTGGTGT
 ATCTCAAGCCGTCGTGAAAGAGACATTAAGGTTGTACCCAGCAGGGCCGCTGTGCGGAGCTCGA
 GAGTTCAGTCGGGACTGCACGGTCGGAGGGTATGACGTGGCCGCCGGCACACGGCTCATCACAAA
 CCTTTGGAAGATACAGACGGACCCTCGGGTGTGGCCGGAGCCACTTGAGTTCAGGCCGGAGAGGT
 TTCTGAGCAGCCACCAGCAGTTGGATGTGAAGGGCCAGAAGTTTGAAGTGGCCCCATTGTTGT

図 15 (続き)

【図 15 - 5】

GGAAGAAGAGTGTGCCCTGGGGCGGGGCTTGGGGTTCAGATGACGCAGTTGGTGCTGGCGAGTCT
GATTCATTCGGTGGAACTTGGAACCTCGCTCCGATGAAGCGGTGGACATGGCTGCTAAGTTTGGAC
TCACAATGTACAGAGCCACCCCTCTTCAGGCTCTCGTCAAGCCACGCCTCCAAGCCGGTGCTTAT
TCATGA

CYP4112

ATGGGTGTATTGTCCATTTTATTATTCAGATATTCCGTCAAGAAGAAGCCATTAAGATGCGGTCA
CGATCAAAGAAGTACCACAGATAGTCCACCTGGTTCAAGAGGTTTGCCATTGATAGGTGAACTT
TGCAATTCATGGCTGCTATTAATTCTTTGAACGGTGTATACGATTTTCGTTAGAATAAGATGTTTG
AGATACGGTAGATGCTTTAAGACAAGAATCTTCGGTGAAACCCATGTTTTTGTCTCAACTACAGA
ATCCGCTAAGTTGATCTTGAAGGATGGTGGTGAAAAATTCACCAAAAAGTACATCAGATCAATCG
CTGAATTGGTTGGTGACAGAAGTTTGTATGTGCATCTCATTGCAACACAAGAGATTGAGAGGT
TTGTTGACTAATTTGTTTTCTGCCACATTCTTGGCTTCTTTCGTAACCTCAATTCGATGAACAAAT
CGTTGAAGCTTTTAGATCATGGGAATCCGGTAGTACCATAATCGTTTTTGAACGAAGCATTGAAGA
TCACTTGTAAGGCCATGTGCAAAATGGTCATGTCTTAGAAAGAGAAAACGAATTGGAAGCTTTG
CAAAGGAATTGGGTCATGTTTGTGAAGCTATGTTGGCATTTCATGCAGATTCCCTGGTACAAG
ATTTCACAATGGTTTGAAGGCAAGAAGAAGAATCATTAAAGTTGTCGAAATGGCCATTAGAGAAA
GAAGAAGATCTGAAGCTCCTAGAGAAGATTTCTTGCAAAGATTGTTGACAGAAGAAAAGGAAGAA
GAAGACGGTGGTGGTGGTTTTAAGTGATGCCGAAATTTGGTGACAACATATTGACAATGATGATCGC
AGGTCAAGATACCACTGCCTCTGCTATTACCTGGATGGTCAAGTTTTTGGAAAGAAAACCAAGATG
TATTGCAAACTTAAGAGACGAACAATTCGAAATCATGGGTAAACAAGAAGGTTGTGGTTTCATGC
TTCTTGACATTAGAAGATTGGGTAATATGTCTATGGTGCAAAGTAGTTAAGGAATCATTGAG
ATTAGCCTCCGTGCTACCATGGTTTCTAGATTGGTTTTACAAGATTCTTTGATCCAAGGTTACA
AAATTA AAAAGGGTTGGAACGTCAACATAGACGTAAGATCTTTACATTCAGATCCATCCTTGAT
AATGACCCAACAAAGTTTAACCTAGTAGATTGATGACGAAGCTAAACCTTACTCATTTTTTGGC
ATTCGGTATGGGTGGTAGACAATGTTTGGGTATGAACATGGCAAAGGCCATGATGTTGGTTTTCT
TGCACAGATTGGTCACTCATTCAGATGGAAGGTTATAGATTCCGACTCTTCAATCGAAAATGG
GCTTTGTTCTCTAAGTTGAAGTCAGGTTGCCCTATCGTAGTTACCCACATCGGTTCTTAA

CYP4149

ATGGATTTCTACTGGATCTGTGTTCTTCTGCTTTGCTTCGCATGGTTTTCCATTTTATCCCTTCA
CTCGAGAACAACAGCAGCGGCACTTCCAACTTCTCCCGGACCGAAACCTTGCCGATCATCG
GAAGCCTTTTGGCTCTCGGCCACGAGCCCCACAAGTCTTTGGCTAATCTCGCTAAATCTCATGGC
CCTCTTATGACCTTAAAGCTCGGCCAAATCACCAACGTCGTAGTTTCTCCGCTGCCATGGCTAA
GCAAGTTCTCAAACGCACGACCAAGTTTCTGTCCAGCAGGACCGTTCCAGACGCAATGACCTCTC
ACAACCACGATGCTTTCGCACTCCCATGGATTCCGGTTTACCCCTCTGGCGAAACCTTCGACGA
ATATGCAACAACCAAGTTGTTTGGCGCAAGATTCTCGACGCCAACGAGAATCTCCGGCGAACCAA
AGTGGCCGAGCTCGTATCCGATATCTCGAGAAGTGCAATTGAAAGGTGAGATGGTGGATTTTGGAA
ACGTGGTGTTCGTCACTTCGCTCAATCTGCTTTCCAATACGATTTTCTCGGTGGATTTCTTCGAC
CCAAATTCTGAAATTTGGGAAAGAGTTCAAGCACGCAGTACGAGGCTCATGGAAGAAGCTGCCAA
ACCAAATTTGGGGGATTATTTCCCTCTGCTGAAGAAGATAGATCTTCAAGGAATAAAGAGGAGAC
AGACCACTTACTTCGATCGGGTTTTTAATGTTTTGGAGCACATGATCGACCAGCGTCTTCAGCAG
CAGAAGACGACGCTTGGTTCTACCTCCAACAACAACGACTTACTGCACTACCTTCTCAACCT
CAGCAACGAAAATAGCGACATGAAATTGGGGAACTTGAGCTGAAACACTTCTTATTGGTGCTAT
TCGTGCTGGGACTGAAACGAGTTCTGCAACACTGCAATGGGCAATGGCAGAACTACTAAGAAAC
CCAGAAAAGTTAGCAAAAGCTCAAGCGGAGACCAGGCGGGTGATTGGGAAAGGGAACCCAATTGA
AGAATCAGACATTTGAGGCTGCCTTATCTGCAAGCAGTGGTGAAAGAACTTTAGATTGCACA
CACCAGCGCCATTTCTACTGCCGCGCAAAGCACTACAGGACGTGGAAATTGCAGGTTTCACAGTC
CCAAAGGACGCTCAGGTACTGGTAAATTTATGGGCTATGAGCAGAGATTCAAGCATCTGGGAGAA
CCCAGAGTGGTTCGAGCCAGAAAGGTTTTTGGAGTCGGAGCTGGACGTTAGAGGGAGAGATTTTG
AGCTGATCCCGTTTCGGCGGTGGGCGGAGGATTTGCCCCGGTCTGCCGTTGGCGATGAGAATGTTG
CATTTGATTTTGGGTTCTCTCATCCACTTCTTTGATTGGAAGCTTGAAGATGGGTGTCGGCCGA

図 15 (続き)

【図 15 - 6】

AGACGTGAAAATGGACGAAAAGCTTGGCCTCACTCTGGAGTTGGCTTTTCCCCTCACAGCCTTGC
CTGTCCTTGTCTAA

CYP4491

ATGTCCTCCTGCGGTGGTCCAACTCCTTTGAATGTTATCGGTATCTTATTACAATCAGAATCCTC
CAGAGCCTGCAACTCAGACGAAAACCTCAAGAATTTTGAGAGATTTTCGTAACAAGAGAAGTTAACG
CTTTCTTATGGTTGTCCTTGATCACTATCACAGCAGTTTGTGATCAGTAAAGTTGTCGGTTTGT
AGATTGTGGTCTAAGGCAAAGCAATTGAGAGGTCCACCTTGTCCATCATTCTACGGTCATTCTAA
GATCATCTCAAGACAAAATTTGACTGATTTGTTATATGACTCCCACAAAAAGTACGGTCCAGTAG
TTAAATTGTGGTTAGGTCCTATGCAATTGTTAGTCTCCGTAAAGGAACCAAGTTTGTGTAAGGAA
ATATTGGTTAAAGCTGAGGATAAGTTGCCTTTAACAGGTAGAGCCTTTAGATTGGCTTTTCGGTAG
ATCTTCATTATTTGCATCCAGTTTCGAAAAGGTTCAAAACAGAAGACAAAGATTGGCCGAAAAGT
TGAATAAGATCGCATTCCAAAGAGCCAAACATCATTCCAGAAAAGGCCGTAGCTTGTTCATGGGT
AGAGTTCAAGATTTGATGATAGAAGAATCTGTGCGACTGTAATAAGGTTTCTCAACATTTGGCTTT
TACTTTGTTAGGTTGCACATTGTTTGGTGACGCCTTCTTAGGTTGGTCTAAGGCTACAATCTATG
AAGAATTGTTGATGATGATCGCTAAGGACGCATCCTTTTGGGCTAGTTATAGAGTTACCCCAATC
TGGAAGCAAGGTTTCTGGAGATACCAAGATTGTGTATGAAGTTGAAGTGCTTGACTCAAGATAT
CGTTCAACAATACAGAAAGCATTACAAGTTGTTTCTCACTCACAAAACCAAACTTACACAACG
AAACCAAGTCAACTGGTGTGTAAGTCGCTTTTGATATTCACCTTGTCTGCTGCAGACGTTAGA
AATTCTTGCTTTTCTACGGTTTGAACGATCATGTTAACCCAAACGAAGAACCTTGTGGTAATAT
TATGGGTGTCATGTTTACGGTTGCTTGACTACAACCTCTTTGATCGCATCAATCTTGGAAAGAT
TGGCCACTAACCCAGAAATCCAAGAAAAGATTAATTCTGAATTGAACTTAGTTCAAAAGGGTCCA
GTCAAGGATCATAGAAAGAATGTTGACAACATGCCCTTGTTATTGGCAACAATCTATGAATCAGC
TAGATTATTGCCAGCAGGTCCCTTTATTGCAAAGATGTCCTTTGAAGCAAGATTTGGTTTTGAAAA
CAGGTATCACCATTCCAGCTGGTACCTTGGTTCGTAGTTCCCTATTAAATTGGTTCAAATGGATGAC
TCTTCATGGGGTTTCAAGATGCCAATGAGTTTAATCCATACAGATTCTTGTCCATGGCTTGTAAATGG
TATTGACATGATACAAAGAACCCTTTAGCTGGTGAAAACATTGGTGACCAAGGTGAAGGTTTCAT
TTGTCTTGAATGACCCAATTGGTAACGTAGGTTTCTTACCTTTTGGTTTCGGTGCAAGAGCCTGC
GTTGGTCAAAAGTTTATAATCCAAGGTGTCGCTACTTTGTTTCGCAAGTTTGTGGCCCATTAACA
AATTAAATTGCAATCCGAGAGTAAGAATGATTCTAAACCATCCAGTAACACCTCTGCCAGTCAAA
TCGTCCCAAACCTCAAAAATCGTATTCTGTAAGAAGAACTCATAA

CYP5491

ATGTGGACTGTCTGCTCGGTTTGGCGACGCTGTTTGTGCGCTACTACATCCATTGGATTAACAA
ATGGAGAGATTCCAAGTTCAACGGAGTTCTGCCGCCGGGCACCATGGGTTTGGCGCTCATCGGAG
AGACGATTCAACTGAGTCGACCCAGTGACTCCCTCGACGTTACCCCTTTCATCCAGAAAAAAGTT
GAAAGATACGGGCCGATCTTCAAAACATGTCTGGCCGGAAGGCCGGTGGTGGTGTGCGCGGACGC
AGAGTTCAACAACCTACATAATGCTGCAGGAAGGAAGAGCAGTGGAAATGTGGTATTTGGATACGC
TCTCCAAATTTTTCGGCCTCGACACCGAGTGGCTCAAAGCTCTGGGCCTCATCCACAAGTACATC
AGAAGCATTACTCTCAATCACTTCGGCGCCGAGGCCCTGCGGGAGAGATTTCTTCTTTTATTGA
AGCATCTTCCATGGAAGCCCTTCACTCCTGGTCTACTCAACCTAGCGTGAAGTCAAAAATGCCT
CCGCTCTCATGGTTTTTAGGACCTCGGTGAATAAGATGTTTCGGTGAGGATGCGAAGAAGCTATCG
GGAAATATCCCTGGGAAGTTACGAAGCTTCTAGGAGGATTTCTCAGTTTACCCTGAATTTTCC
CGGCACCACCTACCACAAATGCTTGAAGGATATGAAGGAAATCCAGAAGAAGCTAAGAGAGGTTG
TAGACGATAGATTGGCTAATGTGGGCCCTGATGTGGAAGATTTCTTGGGGCAAGCCCTTAAAGAT
AAGGAATCAGAGAAGTTCAATTCAGAGGAGTTCATCATCCAACCTGTTGTTTTCTATCAGTTTTGC
TAGCTTTGAGTCCATCTCCACCCTCTTACTTTGATTCTCAAGCTCCTTGATGAACACCCAGAAG
TAGTGAAAGAGTTGGAAGCTGAACACGAGGCGATTGCAAAAGCTAGAGCAGATCCAGATGGACCA
ATTACTTTGGGAAGAATACAAATCCATGACTTTTACATTACAAGTCATCAATGAAACCCTAAGGTT
GGGGAGTGTACACCTGCCTTGTGAGGAAAACAGTTAAAGATCTTCAAGTAAAGGATACATAA
TCCCGGAAGGATGGACAATAATGCTTGTACCGCTTCACGTACAGAGACCCAAAAGTCTATAAG
GACCCTCATATCTTCAATCCATGGCGTTGGAAGGACTTGGACTCAATTACCATCCAAAAGAAGTT

図 15 (続き)

【図 15 - 7】

CATGCCTTTTGGGGGAGGCTTAAGGCATTGTGCTGGTGCTGAGTACTCTAAAGTCTACTTGTGCA
CCTTCTTGACATCCTCTGTACCAAATACCGATGGACCAAACCTTGGGGGAGGAAGGATTGCAAGA
GCTCATATATTGAGTTTTGAAGATGGGTACATGTGAAGTTCACACCCAAGGAATGA

CYP6479

ATGAAGATGAAGATGGAATCCATGCGCACCTCCCTGGATATCTCCGACCATGACATACTTCCAAG
GGTTTATCCTCATGTTCACCTATGGATCAACAAATATGGGAAAACTTCATTTCAGTGAATGGCA
ACGTAGCTCAGTTGATTGTTTCGGATCCTGACACGATCAAGGAGATACTCCAAAACCGAGAACAA
GCTGTTCCCAAAATAGATCTCAGCGGAGATGCACGGAGGATATTCCGGGAATGGGCTTTTCGACTTC
TGACGGTGAAAAATGGGCTAAGGCTCGAAGAATCGCTGATTACGCTTTCACGGGGATCTCCTAA
GAAATATGGGGCCAACCATGGTTTCTGTGCTGAGGCAATGGTGAAAAAGTGGAAGCATCATCAA
GGCAAAGAGCTTGATTGTTTGAAGAGTTTAAAGGTGCTCACTTCAGATATCATTGCACATACAGC
CTTTGGAAGCAGTTATTTGGAAGGGAAAGTTATTTTTTCAGACTCTAAGTAAGCTGAGCATGATAT
TATTTAAGAATCAGTTCAAACGAAGGATTCCTGTTATCAGCAAGTTCCTTCAGATCAAAGGATGCG
AGGGAGGGAGAGGAGCTGGAAAGAAGGTTGAAAAATTCCATAATTTCAATAATGGAAAAGAGAGA
AGAGAAGGTGATAAGTGGTGAAGCAGATAACTATGGTAATGATTTTTCTTGGATTACTTTTGAAGG
CAAAGAATGAGCCTGACCAGAGGCAGAGGATTTCTGTTGATGATGTAGTGGATGAATGCAAAACA
GTTTACTTCGCTGGGCAAGAACTACAAGTGTGTTTGCTTGCTTGACCGCCTTTCTTTTAGCAAC
TCATGAGCATTGGCAAGAAGAAGCAAGAAAGGAAGTGCTGAATATGTTTGGCAACAAGAATCCAA
CTTTAGAAGGCATCACAAAATTAAAGATTATGAGCATGATCATCAAGGAATCTCTAAGATTATAT
CCTCCAGCCCCGCCATGTCAAGGAAGGTTAAAAAGGAAGTCAGATTGGGGAAGCTGGTTCTCCC
CCCCAACATTCAAGTAAGCATCTCAACTATTGCAGTTCATCATGATACTGCAATATGGGGTGAAG
ATGCCCATGTATTCAAACCAGAAAGATTTTCTGAAGGAACAGCTAAAGATATCCCATCAGCTGCA
TACATCCCATTGCGCTTTGGTCTCTCGAACTGCATCGGCAATATCTTGGCCATCAACGAAACTAA
GATTGCACTGTCGATGATTCTACAACGATTTTCTTTACCATCTCCCCGGCCTACGTCCACGCAC
CTTTCCAGTTCCTCACTATCTGCCCCAACACGGGGTTCAAGTAAAGCTTCAGTCCCTATTAAGT
GAAAGGTGA

CYP7604

ATGGAAGCTGAATTTGGTGCCGGTGCTACTATGGTATTATCCGTTGTCGCAATCGTCTTCTTTTT
CACATTTTTACACTTGTGTTGAATCTTTCTTTTTGAAGCCAGATAGATTGAGATCTAAGTTGAGAA
AGCAAGGTATTGGTGGTCCATCTCCTTCATTTTTGTTGGGTAATTTGTCAGAAATTAAATCCATC
AGAGCTTTGTCTTCACAAGCTAAGAACGCAGAAGATGCCTCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTCCGC
CAGTATAGCTCATGGTTGGACTTCAAATTTGTTTCCTCACTTAGAACAATGGAGAAACAGATATG
GTCCAATTTTCGTATACTCCAGTGGTACAATCCAAATCTTGTGTATCACAGAAATGGAAACCGTT
AAGGAAATCTCTTTGTCAACCTCCTTGAGTTTAGGTAAACCTGCTCATTTGTCTAAGGATAGAGG
TCCATTGTTAGGTTTGGGTATCTTAGCCTCTTCAGGTCTTATTTGGGTTACCAAAGAAAGATCA
TCGCTCCACAATTGTATTTGGATAAAAGTAAAGGTATGACCTCATTGATGGTTGAAAGTGCAAT
TCTATGTTAAGATCCTGGGAACTAAAGTTGAAAATCATGGTGGTCAAGCCGAAATTAACGTGCA
TGGTGACTTGAGAGCATTAAAGTGCCGATATCATTTCTAAGGCTTGCTTTGGTTCAAACCTATTCG
AAGGTGAAGAAATTTCTTGAAGTTGAGAGCATTGCAAGTTGTCATGAGTAAGGGTTCTATTGGT
ATACCTGGTTTTAGATACATAACCACTAAAAATAACAGAGAAATGTGGAAGTTGGAAAAGGAAT
CGAATCAATGATCTTGAAGGTTGCCAACGAAAGAACACAACATTCCAGTCACGAACAAGATTTGT
TGCAAAATGATTTTGAAGGTGCAAAGTCTTTGGGTGAAGACAATAAGAGTATGAACATATCAAGA
GACAAGTTTATGTTGACAATTGTAAGAACATCTATTTGCTGGTCATGAACTACAGCTATAAC
CGCATCTTGGTGCTTGATGTTGTTAGCTGCACACCCTGATTGGCAAGCAAGAGCCAGATCTGAAG
TTTTACAATGTTGCGATGACAGACCAATCGATGCAGACACAGTCAAAAATATGAAGACCTTGACT
ATGGTAATTCAAGAACTTTGAGATTGTACCCACCTGCTGTATTCTGTTACAAGACAAGCATTAGA
AGATATCAGATTCAAAAACATCACAATACCAAAGGGTATGAACCTTTCATATACCAATCCCTATGT
TGCAACAAGACTTCCACTTATGGGGTCTGATGCTTGTTCATTTGACCCACAAAGATTCTCCAAT
GGTGTCTTAGGTGCATGCAAAAACCCACAAGCCTATATGCCTTTTGGTGTGGTCCAAGAGTCTG
TGCCGGTCAACATTTGCTATGATCGAATTGAAAGTCATCGTATCATTGGTTTTGTCCAGATTCTG

【図 15 - 8】

AATTTTCTTTGTACCTTCCTACAAGCATTACCAGCCTTCAGATTAGTTGTGCGAACCCAGAAAAC
GGTGTTCATATTGCATGTCAGAAAAGTTGTGA

CYP8224

ATGGAAGTGGATATCAATATCTTCACCGTCTTTTCCTTCGTATTATGCACAGTCTTCCTCTTCTT
TCTATCCTTCTTGATCCTCCTCCTCCTCCGAACGCTCGCCGGAAAATCCATAACGAGCTCCGAGT
ACACGCCAGTGTACGGCACCGTCTACGGTCAGGCTTTCTATTTCACAACCTGTACGATCATCTA
ACGGAGGTGGCCAAAGAGACATCGAACCTTCCGGCTGCTTGCGCCGGCATAACAGCGAGATATACAC
GACCGATCCGAGAAAACATCGAGCATATGTTGAAGACGAAATTCGATAAGTATTCGAAAGGAAGCA
AGGATCAAGAAATCGTTGGGGATCTGTTTGGAGAGGGGATATTGTCAGTCGATGGAGATAAGTGG
AAGCAGCAGAGGAAGCTGGCTAGCTATGAATTCTCGACGAGGATTCTTAGGGATTTTAGCTGCTC
GGTTTTTCAGACGAAGTGCTGCTAACTTGTGGAGTTGTTTCGGAGTTTTCAGCATGGGTCTGGG
TTTTTGATATCCAGGATTTGCTAATGCGGTGCGCTTTGGACTCCATTTTCAAAGTGGGGTCTGGG
GTTGATTTGAATTGCTTGGAGGAATCAAGCAAAGAAGGGAGCGATTTTCATGAAAGCCTTCGATGA
TTCTAGCGCTCAGATTTTTTGGCGCTATATCGATCCCTTCTGGAAATTGAAGAGATTGCTTAACA
TCGGTTCGGAAGCTTCGTTTAGGAACAACATAAAAACCATAGATGCTTTTGTGCACAGTTGATC
AGAGACAAGAGAAAATTGCTTCAGCAACCGAATCACAAGAATGACAAAGAGGACATACTTTGGAG
GTTTCTGATGGAAAGTGAGAAGGATCCAACAAGAATGAATGATCAATATCTAAGGGATATAGTCC
TCAATTTTCATGTTGGCTGGCAAAGATTCAAGTGGAGGAACCTCTGTCCTGGTTCTTCTACATGCTA
TGCAAGAACCCTTTAATACAGGAAAAAGTTGCAGAAGAAGTGAGGCAAATTGTTGCGTTTGAAGG
GGAAGAAGTTGACATCAATTTGTTTCATACAAAACCTTAACCTGATTCAGCTCTTGACAAAATGCATT
ATCTTCATGCAGCATTGACCGAGACTCTGAGGCTATATCCTGCAGTCCCTTTGGATGGAAGGACT
GCAGAAATAGATGACATTCTTCTGATGGCTATAAACTAAGAAAAGGGGATGGAGTATACTACAT
GGCCTATTCCATGGGCAGGATGTCCTCCCTTTGGGGAGAAGATGCTGAAGATTTTAAACCCGAAA
GATGGCTTGAAAGTGGAACCTTTCAACCCGAATCACCTTTCAAATTCATCGCTTTTCATGCGGGT
CCTCGAATGTGTTTGGGAAAAGAGTTGCTTATCGACAAATGAAGATAGTATCTGCTGCTTTGCT
TCAATTTTTTCGATTCAAAGTAGCTGATACAACGAGGAATGTGACTTATAGGATCATGCTTACCC
TTCACATTGATGGAGGTCTCCCTCTTCTTGAATTCCGAGAATTAGAAAATTTACCTAA

CYP8728

TTGGATAGTGGAGTTAAAAGAGTGAAACGGCTAGTTGAAGAGAAACGGCGAGCAGAATTGTCTGC
CCGGATTGCCTCTGGAGAATTCACAGTCGAAAAGCTGGTTTTCCATCTGTATTGAGGAGTGGCT
TATCAAAGATGGGTGTTCCAGTGAGATTCTGGACATATTATTTGGTTTCGTTGATGCTCAAGAA
GAATATCCCAAGATTCCCGAAGCAAAAGGATCAGTAAATGCAATTCGTAGTGAGGCCCTCTTCAT
ACCTCTCTATGAGCTTTATCTCACATATGGTGGAAATTTTAGGTTGACTTTTGGGCCAAAGTCAT
TCTTGATAGTTTCTGATCCTTCCATTGCTAAACATATACTGAAGGATAATCCGAGGAATTATTCT
AAGGGTATCTTAGCTGAAATTCTAGAGTTTGTGATGGGGAAGGGACTTATACCAGCTGACGAGAA
GATATGGCGTGTACGAAGGCGGGCTATAGTCCCATCTTTGCATCTGAAGTATGTAGGTGCTATGA
TTAATCTTTTTGGAGAAGCTGCAGATAGGCTTTGCAAGAAGCTAGATGCTGCAGCATCTGATGGG
GTTGATGTGGAAATGGAGTCCCTGTTCTCCCGTTTGACTTTAGATATCATTGGCAAGGCAGTTTT
TAACTATGACTTTGATTCACTTACAAATGACACTGGCATAGTTGAGGCTGTTTACACTGTGCTAA
GAGAAGCAGAGGATCGCAGTGTGACCAATTCCAGTATGGGAAATTCCAATTTGGAAGGATATT
TCACCACGGCAAAAAAAGGTCTCTAAAGCCCTCAAATTGATCAACGACACCCTCGATCAACTAAT
TGCTATATGCAAGAGGATGGTTGATGAGGAGGAGCTGCAGTTTCATGAGGAATACATGAATGAGC
AAGATCCAAGCATCCTTCATTTCTTTTTGGCATCAGGAGATGATGTTTCAAGCAAGCAGCTTCGT
GATGACTTGATGACTATGCTTATAGCTGGGCATGAAACATCTGCTGCAGTTTTAACATGGACCTT
TTATCTTCTTTCCAAGGAGCCGAGGATCATGTCCAAGCTCCAGGAGGAGGTTGATTGAGTCTTTG
GGGATCGGTTTCCAACCTATTGAAGATATGAAGAACCCTCAAATATGCCACACGAATAATTAACGAA
TCCTTGAGGCTTTACCCACAGCCACCAGTTTTAAATACGTCGATCTCTTGACAATGATATGCTCGG
GAAGTACCCCATTA AAAAGGGT GAGGACATATTCATTTCTGTTTGGAACTTGCAATCGCAGTCCAA
AACTCTGGGATGATGCGGATAAATTTAATCCTGAAAGGTGGCCTCTGGATGGACCAATCCAAAT
GAGACAAATCAAATTTTCAGATATTTACCTTTTGGTGGCGGACCACGGAAATGTGTGGGAGACAT

図 15 (続き)

【図 15 - 9】

GTTGTGCTTCGTACGAGACTGTTGTAGCACTTGCAATGCTTGTTGCGGCGATTTGACTTCCAAATGG
 CACTTGGAGCACCTCCTGTAAAAATGACAACCTGGAGCTACAATTCACACAACAGATGGATTGAAA
 ATGACAGTTACACGAAGAATGAGACCTCCAATCATACCCACATTAGAGATGCCTGCAGTGGTCTGT
 TGAATCGTCTGTGCTGGACTCGTCCGTCGCCATTTTGAAGAAGAAACACAAATTTGGTTAG

CYP10020

CAGTTCCTCTCCTGGTCCTCCCAGTTTGGCAAGAGGTTTCATCTTCTGGAATGGGATCGAGCCCAG
 AATGTGCCTCACCGAGACCGATTGATCAAAGAGCTTCTCTCTAAGTACAGCGCCGTCTCCGGTA
 AGTCATGGCTTCAGCAACAGGGCTCCAAGCACTTCATCGGCCGCGGTCTCTTAATGGCCAACGGC
 CAAACTGGTACCACGAGCGTCACATCGTCGCCGCCGCTTCATGGGAGACAGACTCAAGAGTTA
 CGCCGGGTACATGGTGAATGCACAAAGGAGATGCTTCAGTCAATTGAAAACGAGGTCAACTCGG
 GCGATCCGAGTTCGAAATCGGTGAGTATATGACCAGACTCACCGCCGATATAATATCACGAACC
 GAGTTCGAAAGCAGCTACGAAAAGGGAAAGCAAATTTTCCATTTGCTCACCGTTTTACAGCATCT
 CTGCGCTCAGGCGAGCCGCCACCTCTGCCTTCTGGAAGCCGGTTTTTTCCGAGTAAATACAACA
 GAGAGATAAAGGCATTGAAGACGAAGGTGGAGGGGTGTTAATGGAGATAATACAGAGCAGAAGA
 GACTGTGTGGAGGTGGGGAGGAGCAGTTCGTATGGAAATGATCTGTTGGGAATGTTGCTGAATGA
 GATGCAGAAGAAGAAAGATGGGAATGGGTTGAGCTTGAATTTGCAGATTATAATGGATGAATGCA
 AGACCTTCTTCTTCGCCGCCCATGAAACCACTGCTCTTTTGCTCACTTGGACTGTAATGTTATTG
 GCCAGCAACCTTCTTGGCAACACAAGGTTTCGAGCCGAAGTTATGGCCGTCTGCAATGGAGGAAC
 TCTCTCTCTTGAACATCTCTCCAAGCTCTCTCTGTTGAGTATGGTGATAAATGAATCGTTGAGGC
 TATACCCGCCAGCAAGTATTCTTCCAAGAAATGGCATTGGAAGATATAAAGCTGGGAGATCTTGAG
 ATCCCAAAAGGGCTGTGATATGGATCCAGTGCTTGCAATTCACCACAGTGAAGAGCTATGGGG
 CAAAGATGCAAATGAGTTCAACCCAGAAAGATTTGCAAATTCAAAAGCCTTCACCTCGGGGAGAT
 TCATTCCCTTTGCTTCTGGCCCTCGCAACTGCGTTGGCCAATCATTTGCTCTCATGGAACCAAG
 ATCATTTTGGCTATGCTCATCTCCAAGTTTTCTTCACCATCTCTGACAATTATCGCCATGCACC
 CGTGGTCTCTCTCACTATAAAACCCAAATACGGAGTCCAAGTTTGCTTGAAGCCTTTCAATTAA

CYP10285

ATGGAAGACACCTTCTACTCTATCCTTCCCTCTCTCTTCTCTTTCTTCTTTTTGCTTTCAAGCT
 CATCCGTCGATCCGGAGGAGTTCGAGGAACCTACCGCCGAGTCCGCCCTCTCTTCCGGTTATCG
 GCCACCTCCATCTCTTGA AAAAGCCACTCCACCGACTTTCCAGAACTTTCCGCCAAATATGGT
 CCTGTTATGTCCCTCCGCTCGGGTCTCGCCTCGCAGTCATTGTATCGTCGTGCTCGGCGGTGGA
 CGAGTGTTCCTACTAAAACGACGTCGTGCTCGCCAACCGTCTCGTTTGCTAATTGGCAAACACC
 TCGGCTACAACTACACTACCATGGTTGGGGCTCCCTACGGCGACCACTGGCGTAGCCTCCGCCGC
 ATCGGTGCCCTCGAAATCTTCTCTTCATCTCGCCTCAACAAATTCGCCGACATCCGAAGGGATGA
 AGTAGAGGGATTGCTTCGCAACTCTCACGCAATTCGCTCCATCAATTCTCGAAAGTGAAGTTC
 AATCGGCCTTGTCGGAGCTGACGTTCAACATCTCGATGAGAATGGCGGCAGGGAAACGGTATTAC
 GGAGATGACGTGACGGACGAGGAAGAGGCGAGAAAGTTAGAGAGTTAATTAAACAGATAGTGGC
 GCTGGGCGGAGTATCAATCCAGGGGATTTGCTCCCGATTCTGAATTGGATTCCGAACGGTTTCG
 AGAGGAAGTTGATCGAGTGTGGGAAGAAGACGGATGCGTTCTTGCAAGGGCTGATCGAGGACCAC
 CGGAGAAAGAAGGAAGAGGGTAGGAACACGATGATCGATCACCTGCTCTCTCTGCAAGAATCGGA
 GCCTGCTCACTACGGAGACCAAATAATCAAAGGATTTATACTGGTGTACTGACGGCGGGGACCG
 ATACATCGGCCGTGACAATGGAGTGGGCGCTATCTCATCTCTGAAACAATCCTGAAGTGCTAAAG
 AAGGCAAGAGATGAGGTGACACTGAAATTGGACAAGAACGACTTGTCGAAGAATCAGACGTAGT
 ATCTAAGTTACCCTATCTTCAAGGGATCATCTCCGAGACTCTCCGGCTGAATCCCGCCGCTCCGA
 TGTGTTGCCCCATTACGCCCTCGGACGACTGCACGATATGTGGATACGACGTGCCACGTGACACA
 ATCGTAATGGTCAATGCATGGGCCATACATAGGGATCCAAACGAATGGGAGGAGCCACGTGTTT
 CAGACCAGAACGATATGAAAAGTCGTGCTCGGAAGCGGAGGTACACAAGTCGGTGAGTTTCGGGG
 TGGGAAGGCGAGCTTGTCCTGGGTCTGGCATGGCGCAGAGGGTGATGGGCTTGACTTTGGCGGCA
 CTGGTTTCAGTGCTTCGAGTGGGAGAGAGTTGGAGAAGAAGAGTGACATGAACGAAGGCTCAGG
 TGCCACAATGCCAAGATGGTGCCATTGGAGGCCATGTGCAGAGCTCGTCCCATCGTCCACAACC
 TTCTTTACTGA

図 15 (続き)

【図 15 - 10】

CYP10969

GTGGGGCCGTCGTCTGTTGAAGCTCCTCAGCGGACGATTTTGAAGCCTGAACAGAGGGAGCTACC
GTTGAGGAAGATTCCCGGGGACTATGGGCGCCGTTGTTGGGTCCGATTAAGGACCGACAAGACT
ATTTTTACAATCAGGGGAGGGAGGAGTTCTTGAGATCACGCATGAACAGGTACGAATCAACTGTG
TACAGAACTAATATGCCACCAGGTCCCTTTATCTCCTCCGATTCTCGTGTATCGTTTTACTCGA
CGGCAAGAGCTTCCCTGTACTCTTCGACGTTTCTAAAGTTCTGAAACAAGACGTCTTCACCGGAA
CTTATATGCCCTTAACGGAGCTCACTGGCGGCTACCGAGTTCTTTCTTATCTCGACCCCTCCGAG
CCCGATCACGAGAAGCTTAAACAGTTCTCTTCTACCTCCTCAAGTACCGTCGCGACAAGATTCT
GCCGGAGTTTCACTCTACCTTTTCGGAGCTGTTTGAGACTCTGGAGAAGGAGGTGGCTGCCGCCG
GTAGAGCAGATTATAATGATCCCGGTGAACAGGCGGCGTTTAACTTCTTGGCTCGGTCTCTGTTC
GGCGCCAACCCGCCCGACACCAAAC TGGGAAACGACGCTCCGAGTTTAATATCAAATGGGTGCT
GTTCCAGCTGGGTCCGGTTCTCACTCTTGGTCTTCCCAAGCCTGTCGAGGAGCTTCTCCTGCGAA
CCGTCCGGCTGCCACCGGCGCTTGTGAAATCGGATTACCAGCGGCTGTACGATTTCTTTTACGAG
GCGTCGGAGGCTGTGTTTGC GGAGGCGGATAGATTGGGCATTGCGAGAGAGGAAGCGTGTCAAA
CTTGGTCTTCGCCACGTGCTTCAATTCTTCGGAGGGATGAAGATCCTCTTCCCAATATGATAA
AATGGATCGGACGTGCCGGAGTGAATCTCCATACGGAGCTCGCACGGGAGATAAGATCCGCCGTC
AAAGCCCACGGCGGCAAGATCACGATGGCGGCTATGGAACAGATGCCGCTGATGAAGTCCGTAGT
GTACGAAACGCTCAGAATCGAACCCCGGTTCTGCGCAATACGGGCGAGCGAAGGAGGACCTGG
TGATCGAGAGCCACGACGCCGCTTTTCGAGATCAAAGAAGGGGAAATGTTGTGTGGGTACCAGCCA
TTCGCCACTAGAGATCCGAAAATATTTCGAGAGATCCGAAGAATTCGTACCGGATCGGTTACCGG
CGACGGCGAGGAGTTGCTGAAGCACGTGCTCTGGTCAAACGGACCGGAGACTCAATCCCCAACCG
TTAAAGACAAGCAGTGCGCTGGCAAAGACTTCATAGTCTTCGTCTCCCGCCTCCTCGTCTCGAA
CTCTTCTCCGATACGACTCCTTCGACATTGAAGTCGCAGCTTCGCCGTTGGGCGCCGCCGTCAC
CATAACTTCCCTGAAGAAGGCAAGCTTTTAA

図 15 (続き)

【 図 16 - 1 】

図 16

UGT73C3

MATEKTHQHPSLHFVLPFMAQGHMIPMVDIARLLAQRGVITITVTPHNAARFKNVNLRAIESGLAINILHVKFPYQEFGLP
 EGKENIDSLDSTELMVPFFKA VNLLEDPMKLMMEEMKPRPSCSLISDWCLPYTSHAKNFNIPKIVFHGMGCENLLCMHVLRRN
 LEILENVKSDEEYFLVPSFPDRVEFTKLQLPVKANASGDWKEIMDEMVKAEYTSYGVIVNTFQELEPPYVKDYKEAMDGKV
 WSIGPVSLCNKAGADKAERGSKAAIDQDECLQWLDKSKEGSVLVYVCLGSICNPLSQLKELGLGLEESRRSFIWVIRGSEKYK
 ELFWMLESFGEERIKERGLLIKGWAPQVLILSHPSVGGFLTHCGWNSTLEGITSGIPLITWPLFGDQFCNQKL VVQVVKAGV
 SAGVEEVMMKWGEEDKIGVLVDKEGVKKA VEELMGDSDDAKERRRRVKELGELAHKA VEKGGSSHNSNITLLQDIMQLAQF
 KN

UGT73C5

MVSEITKSSPLHFVLPFMAQGHMIPMVDIARLLAQRGVITITVTPHNAARFKNVNLRAIESGLPINLVQVKFPYLEAGLQEG
 QENIDSLDTMERMIPFFKAVNFLEEPVQKLIJEEMNPRPSCSLISDFCLPYTSKIAKKFNIPKILFHGMGCFCLLCMHVLKKNREIL
 DNLKSDKELFTVPDFPDRVEFTRTQVPVETVYPAGDWKDFDGMVEANETSYGVIVNSFQELEPAYAKDYKEVRSKGAWTI
 GPVSLCNKVGADKAERGNKSDIDQDECLKWLDKSKHGSVLVYVCLGSICNPLSQLKELGLGLEESQRPFIWVIRGWEEKYKEL
 VEWFSGESGFEDRIQDRGLLIKGWSPQMLILSHPSVGGFLTHCGWNSTLEGITAGLPLLTWPLFADQFCNEKL VVEVLKAGVR
 SGVEQPMKWGEEKIGVLVDKEGVKKA VEELMGESDDAKERRRRRAKELGDSAHKA VEEGGSSHNSISFLLQDIMELAEPPNN

UGT73C6

MAFEKNNEPPLHFVLPFMAQGHMIPMVDIARLLAQRGVITITVTPHNAARFKNVNLRAIESGLPINLVQVKFPYQEAQLQ
 EGQENMDLLTTMEQITSFFKA VNLLEKPEVQNLEEMSPRPSCSLISDMCLSYTSEIAKKFKIPKILFHGMGCFCLLCVNVLRKNR

【 図 16 - 2 】

図 16 - (続 き)

EILDNLKSDKEYFIVPYFPDRVEFTRPQVPVETYVPAGWKEILEDMEADKTSYGVIVNSFQELEPA YAKDFKEARSGKAWTI
 GPVSLCNKVGVDKAERGNKSDIDQDECLEWLDSEKPGSVLYVCLGSICNLPLSQLLELGLGLEESQRPFIWVIRGWKEYKEL
 VEWFSSEGFEDRIQDRGLLIKGWSPQMLILSHPSVGGFLTHCGWNSTLEGITAGLPMLTWPLFADQFCNEKL VVQILKVGVVS
 AEVKEVMKWGEEEEKIGVLVDKEGVKKA VEELMGESDDAKERRRRRAKELGESAHKA VEEGGSSHSNITFLQDIMQLAQSN
 N

UGT73E1

MSPKMOVAPPTNLHFVLPMAQQHLVPMVDIARILAQRGATVTHITPYHANRVRPVISRAIATNLKIQLELQLRSTEAGLPE
 GCESFDQLPSFEYWKNIATAIDLLQQPAEDLLRELSPPPDCIISDFLPWTTDVARRLNIPRLVFNGPGCFYLLCIHV AITSNILG
 ENEPVSSNTERVVLPGLPDRIEVTKLQIVGSSRPANVDEMGSWLRAVEAEKASFGIVVNTFEELEPEYVEEYKTVKDKKMW
 IGPVSLCNKTGPDLAERGNKAAITEHNCLKWLDERKLGSLYVCLGSLARISAAQAIELGLGLESINRPFIWCVRNETDELKT
 WFLDGFEEVRDRGLIVHGWAPQVLILSHPTIGGFLTHCGWNSTIESITAGVPMITWPFADQFLNEAFIVEVLKIGVRIGVER
 ACLFGEEVKVGLVKKEDVKKA VECLMDEDEDGDQRRKRRIELAKMAKIAMAEGGSSYENVSSLRDVTETVRAPH

UGT85C2

MDAMATTEKKPHVIFIPPAQSHIKAMLKLAQLLHHKGLQITFVNTDFIHNQFLESSGPHCLDGA PGFRFETIPDGVSHSPEASI
 PIRESLRSIETNFLDRFIDLVTKLDPPTCIISDGFSLVFTIDA AKKLGIPVMMYWTLAACGFMGFYHIHSLIEKGFAPLKDASY
 LTNGYLDTVIDWVPGMEGIRLKDFPLDWSTDLDNDKVLMTTEAPQRSHK VSHHIFHTFELEPSIKTLSLRYNHIYTIGPLQL
 LLDQIPEEKQTGITSLSHGYSLVKEEPECFQWLQSKEPNSVYVYVNFSGSTTVMSLEDMTFEGWGLANSNHYFLWIIRSNLVIGE
 NAVLPPELEEHKRGFIASWCSEKVLKHPSVGGFLTHCGWGSTIESLSAGVPMICWPYSWDQLTNCRYICKEWEEVGLEMG
 TKVKRDEVKRLVQELMGEKGHMKMRNKA KDWKEKARIAIAPNGSSSLNIDKMMVKEITVLARN

17

UG190
ATGGATGCCCGAGCGAGGTACACACCACCACTTTTGATGCTTCCATGGGTGGCTACGGCCATCTCTTGCCCTTCCCTCGAGCTGGCCAAAAGCCTCT
CAGGAGGAAATTAATCCACATCTACTCTGTCAACGTCTGTAGCCTCGACGCCATTAAACCAAAAGCTTCCCTCTCTATCTCTTCTGATGATTCCA
TCCAACCTGTGGAACCTTCCTCTCTCTCTGAGTTACCTCTCATCTTACACAAACACGGCTTCCCTCTCAACCTCATGCCCGCTCTCCAC
CAAAGCCTCGTCATGGCCGCCAACACTTTCAGGTCAATTTACAAACACTTGGCCCGCATCTCTCAATTAAGACATCTCCAACCTTGGGCTCTCTCA
AGTGGCTTCATCCCTCAACATTCAGCCATCAACTTCAGTACTACCGGAGCTTCAATGCTTTCTCGAACGCTTCACCCTACTCACTACCCCAAGTTCTA
AATTCCAATCTCAGAGTTGTGTTCTTCACAATCACTGGAGAGCCATGTACACCAACCGCCGATGGGCTCTTACAGAAAGAGCCACAAAATGAAGAA
ACACTTGCGAATTGCTTGTCATACTTCTGCGGGTAGTTTGTGTCATAGTTTCAGAGAGCTTGAGACGAAATATATCGATTATCTCTCTGTTCTCTT
GAACAAGAAAGTTGTCCGGTCGGTCTTTGGTTTACGAACCGAATCAAGAAAGGGAAGATGAAGGTATTCAAGCATCAAAAATTGGCTTGACAAAA
AGGAACCGTCTCAACCGTCTTCGTTTCATTTGGAACCGAATACTTCCCGTCAAAGGAAGAAATGGAAGAGATAGCGTATGGTTAGAGCTGAGCGAG
GTTAATTTCACTGGGTCTTAGATTTCCTCAAGGAGACAGCACCGACCATTTGAAGACGCTTGCAAGCGCTTCCGGAAGGGTTCTTGAGAGAGCGGGGAGAGAG
GGCGATGGTGTGAAGGTTGGCTCCTCAGCGGAAGATACTGAAGCATTTGAGCACAGGGGGCTTGTGAGTCACTGTGGATGGAACCTCGATGATGG
AGGGCATGATGTTTGGCGTACCCATAATAGCGGTCCCGATGCATCTGGACCAGCCCTTTAAACGCCGACTCTTGAAGAAGCTGGCGTCGGCGTGGAA
GCCAAGCGAGGTTCCGACGGCAAAATTCAAAGAGAAAGATTGCAAAAGTCGATCAAGAAGTGGTGATTGAGAAAAACAGGGAAGACGTGAGGAAGAA
AGCAAGAGAAATGGGTGAGATTTTGAGGAGTAAAGGAGATGAGAAAAATTGATGAGTTGGTGGCTGAAATTTCTCTTTTGGCGCAAAAAGGCTCCATGTT
CAATTTAA

0611493
ATGCTTCCATGGCTGGCTCAGGCCATGTCTCCCTTTCTTCGAGCTCGCCCAAGTTGCTCGCCGCTAGAAACTTCCACATATCTTCTGCTCCACCGG
CGTAAACCTCCGCTCCGTCGAACCAAACTCTCAGAAAGCTCTCTCCACGTGGAGCTGGTGAGCTCAACCTACCGCCCTCGCCGGAGCTCCCTC
CGCAACGCCACACCAACGCCGGCTTCCACCGCACTCATGTTCTCGCTCAAGCAGACTTTCGACATGGCCGCTCCGCCCTCGCCGCCATCCTCCGC
GACCTGAACCCGGAATTGCTCATCTACGACTTCTCGACCGCTGGCGGGCGGAGGCTCTGTCCGCCGATATTCGGCCGCTGATGTTCAAAGCAC
GGGTGCGCTCATGGCGGCCATGGTCGCTACGAGCTGACGTTCCGAACCTCTGATTTTCTCGCTTTCCTCCCTGAGATTCTGCTCTCCGAGTCCGAGA
TTAAACAGCTGAAGAACTTGTTCAAATGTTCTGTGAATGATGCGAAAGACAAAGGATTAAGGATGTTATGAGAGATCTTGGGCCATGATTTTG
GTGAAATCTTTCAGAGAAATCGAAGGCAATATATTGATTTTCTCTACTCTGCTGGCAAGAAGTTGTTCCAGTTGGTCCACTGTTTCAACAAAC
AGAAGACGACGTCGTATCAGGAAGTTTGACGAATGGCTAAATGGAAAAGATAGATCGTCTTCCATACTCGTGTCTTTTCGGAAGCGAGTTCTACCTGT
CCAGAGAAGACATGGAAGAGATCGGCATGGCTTAGAGCTGAGCCAGGTGAACCTCATATGGGTCTGTACAGTTTCCGGGGGAGAGAGAGAAACACG
ACAAAGGTGGAAGAAGAACTGCCAAAAGGTTTCTAGAGAGAGTTAGAGAGAGAGGGATGGTGGAGGGCTGGCGCCGCAAGGCTCAGATCTTGAA
ACATCCAAGCTCGCGGATTCTCAGCCACTCGGGTGGAGCTCCGTCGTGGAGAGCATGAAATTCGGCGTTCCGATCATCGCCATGCGGATGCACC
TCGACCAAGCGCTGAATTCGCGGCTCGGCGTAGTGGTGGAGAGAGACGGCCGCTCCGGGGAGAGGTGGAGAGAGTTGTC
AGAGAGGTGGTGGAGAAAAGTGGACAGACAGTGAAGAAAGGTGGAGGATTCGACAGATCATGAAGAAGAAAAAGCAATGAAGAGATGGA

【图 17-2】

CGTAGTCGTGGAAGAGTTGGTGACGCTCTGCAGGAAGAAGAAGGAGGAGGATTTACAGAGTAATTATTGGTCAGAACCGCCATTGATGACCATTT
GTTCTGAAGTCGTGAAGATTGAAGATGCTGCAGCAGCCGACGAGGAGCCCTCTTTGCAATAA

UGT1817

[illegible]

UGT3494 (部分的遺伝子配列)

CGTGGGATTCGGAAGAGACGGCTTGATGTCCCGTTTCATGGGGCAGGGCCAATCATCCCTTTTCTAGCTTTGGCCCTCCAGATTGACACAGAAA
CAGAACAATCGCCCATATACTCTCAACGTTAAGAAAAATGAGATCTTCTCCCTCCAGATTGA

UGT5914

CG15714
ATGGAAGCTAAGAACTGCAAAAAGGTTCTGATGTTCCCATGGCTGGCGCATGGTCACATATCACCAATTTGTAGAGCTGGCCAAAGAAGCTCACAGACAA
CAACTTCGCCGTTTTTCTATGTTCTTCCCTGCAAAATCTTCAAAACGTCAGCCAAACTCCCCCATCACTACTCTGATTCCTATGAACTCTGTTGAGC
TCAACCTTCCATCGTCGCCGAGCTTCCCCCTCATATGCACACCAATGGCTCCCTTTGCAATTTAGTTCCACCCCTGTTGACGCCCTTGGACATG
GCCGCTCCGCACTTCTCCGCCATTTACAGGAACGTAAATCCAGATTTTCTCATATTCGACATCTTCCAACCCTGGCGGGCTGAAATCGCTTCCCTCT
CGCGCTTCTCGCTATTTTGTGCTTATCGTTGGAATCTGTATTAACCGCTTTTAGGGGTTCAATTTGTCCGGAGCTCCGNACGGAAATCCCTTTTCCCG
AGCTTACTAAATCATTTCAAGAAAGGAGGACGCCGAAACCTCCAGGAGATTCGGCAACGATAGAGGAAACCGGCTATTCAAAATGTTCTGCTGACACTG
GAACAATCTTCAGAGACTATTTTGGTGAACAGTTTTACAGAGATAGAGGGCAATATATGGACTATCTCTCGGTCCTTACTGAAGAAGAAGATCTCTCC
GATTGGTCCCTTTGGTTCAGAAAATTGGCTCCGATGCAATCGGAATCTCCGGTGGCTTGCAAGAAGAAACCGAAATTCAACTGTGTGACGTTT
GCTTCGGGAGTGAAGTACTATTGTGACCAAGAGACATAGCAGAGCTTGGCGATGGTCTGGAATCTGGAATCAGCGGGGTCAATTTCTCTGGATTGTTCCGGTTT

図17(続七)

【 17 - 3 】

CCAAAGGGAGAGAAAATCGCCATTGAAGAGGCATTACAGATGAATTTCTTAAAGAGTCGAGAGAGAGCGCTCGTCTGATGATGGGCGCCGCA
GATGAAAAATATTAGGCATTGAGCGTCGGCGGTTTCTGTCTCACTCGGATGGAACCTCTGTCTGGAGAGTCTGGTCTCGCGTTCGCGATCATAT
CCCTGCCGATACACCTCGAACAGCCGTGGAACGCCCTTGGTAGCGGACACGTGGCGTTTGTGTAGGGCGAAGAGACACGAGGAGAAATCTTCAA
AGAGAGTTGGTGGCGGAGCCATTAAAGAAGTGGTGTGAGGAAACAGGAGCGGAACCTGAGAAGCAAAAGCAAGAGTAATTAGTGAAATCTTGAAAAA
TAAAGAAGCTGAACAATAACAAGATTGGTGGCTGAGCTTACCGGCTTCTGACGCAAGAAGAGCTTGTGA

UGT8468

ATGGAAAAAATCTTCACATAGTGATGCTTCCATGGTCGGCGTTCCGCCATCTCATACCAATTTTTCACCTCTCCATAGCCTTAGCCAAAGCCAAAGT
TTATATCTCCTTCCTCCACTCCAAGAAATATTAGAGACTYCCCCAAATCCCGCGGACTTAGCTTCTTTCATAGATTGGTGCCATTCCCTTGC
CGACTCGACGACGATCTGTTGCTAGAACTCGACAGAGCCACTTCTGATATTCCGATCGACAAGATTAGTATTGAAGCGAGCGCTCGACCTCCTC
CGCCACCCCTTCAAGAAAGTTGTGCGCGAACAAATCGCCGGAATCTGTTGATTTTCTGATTTTGGCCGGGAGATCTACAGGAGTTTCA
AGTTCCCGTCGCCCTACTTCTGTATTTCTCGGCCACTCTGTTGCTTTATCTTGACCTCCAGACGTGATTTCGAAGGATCTTCAGATCATGGCACGAA
TATCTCCGTTACCATGACGGTCCCGGAGTGGTGGTTTCCGTCGCCGTAGCTCAACTTGATGAGGCGACGGTCATGTACTCTGCTCTC
TATGAAACAAATGGGTCTGGAATAAGCGACTGCGAGAGGATTCCCGGCTCGTCTTCTGTCAAGCCGTGGCCATTGGAAGCTGCGAGGAGATTGA
AGCGAATACCTTAGGTTATGTAAGAACTGATTCCACCGCAGGGGATTGCCGTGGCTTCTCCGCCGAAAGCCACCAAAATCAGATCAGGAGC
TCATCAAATGGCTTGACGAGCAAAAGCTCCGATTCTGTCTGTACGTGACATTCCGCGAGCGAATGCAACCTGACGAAGGACCAAGTTACAGAGATAGCC
CACGGGTGGAACTGTCCGAGCTGCCATTTTATGGGCACTGAGGAAACCCAGCTGGGAGCTGAGGAAGACGATGGGCTGCCGTCTGGTTCGTGA
GAGAACGTCGGGAGAGGGTGGTGAGCATGGAGTGGGTGCCGAGTTGGAGATTCTGGCGCACAGGCCATCGGCGTCTCTTTAGTTACAGGGGGCT
GGGCTCTATTATCGAGTCGCTACAAGCTGGGCACTGTCTGGTTGTCTGCCGTTTATCATCGACACGCGCTGAACCTCAAAGCTTTTGGTGGAGAAA
GGGATGGCGCTTGAGATCAGAAGGAACGGTTCTGATGGATGGTTTATGAGAGAAGACATCGCCGGAACTTTGAGAGAAGCTATGCGGTCGTCTGAGGA
AGCGGGCAGCTGAGGAGCCGTGCAAAAGAGGGCGCGGCCATCGTTGGAGATGAGAAGCTGCAGTGGGAACAATCTTCGGCGCGTTTCGTACAGTTTC
TGAGGGACAAGTCTTGA

UGT10391

ATGTCGAGGAGAAAGGCAGAGGGCACAGCTCGTCGACGGAGAGACACACTGCTGCCGCCATGAACGCCGAGAAACGAAGCACCAAAATCTTGATGCT
CCCATGGCTGGCTCACGGCCACATATCTCCATATCTCGAGCTCGCAAGAGGCTCACCAAGAAAACTGCCACGTTTACTTGTGTCTTCGCCCTGTAA
ATCTCCAAAGGCATCAGCCGAACTCTCTGAAAATTACTCTTCCATTGAACCTTGTGAGCTTTCATCTTCCATCTCTCCCCGACCTTCTCCCCCAT
ATGCACAGACCAAGGCATCCCTCTACATCTACATCCACCCTCATCAAGCCTTCGACATGGCGGCCCTGATTTTCCGACCTGTTGCAGAACT
CGAGCCGATCTCGTCAATTTCCGATCTCTCCAGCCATGGGCGAGTTCAATTAGCGTCTCGGAACATTCGCCGTCTGTCATTTTGTGTACCCGGAG
TCGCTGTCTTATGTCGTTTGGCTCACGTTGTTTGCAACTCCGTTAAGGAATTCCTTTCCGGAACTCGATCAACCGACCATTTGGATCTCCAAGAGC
CGCCGCAAAACGTCGACGAATTAGTCCGAGTGGCGGATGGGATTTTCAACTGATGAACAATCTTCAACATCATCTTAGCCAAACACTTTCCC
CGAGTTCGAAGAAAAATACATCGATTATCTCTCTCTCTGTTTAAAGAAAAGATTTCTCCGTTTGTCTCTAGTTCTCTGAAATCGACGACGACGCG
AGAAATCGGAAATTATCGAGTGGCTTGACAAGAAACCGAAATCGACTTACGTTTGGGAGTGAGTATATCTGACGAAAGAAAGACAGG
GAAGAGCTCGCCCATGGCTTAGAAAAAGACGGCGGTGAATTTCACTCTGGGTATTAGGTTTCCAAAGGGCGGAGAGATCACCATTGAAGAGGCTTTTACC

図 17 (続き)

【 図 17 - 4 】

AGAAGGATTCTCGAGAGAGTAGGGGACAGGGGAGTGATTATCGACGGGTGGGCGCCGAGTTGAAAATATTGAGGCATTCAGCGTGGGCGGTTCTG
 TGTGCCACTGCGGGTGGAACCTCTGTGTGGAGAGCGTGTGTTGGGGTCCGATCATAGCCTTGCCGATCGAGTCGATCAGCCATGGCATGCGAAG
 GTGGCGGAGGACGGCGGTCTGTGCGGAGGCGAAGAGACGTTGAAGGAGCGTTTCAGAGAGAAAGAGTGGCGAAGGCCATTAAAGAGGTTGGTT
 TGAGAAAGAGGGGGGTTCTGAGTGGAAAGCAAGAGAGATCAGCGAGGCCCTTGAGAAAGAGGGAAGTTCATAGAGGAATTGGTTGCTGAGT
 TTCACCAAGCTCTGTGAAGCTTGA

UGT11789 (部分の遺伝子配列)

TTCTGCTCCACGCTGTAAATTTGGAAGCCATTAAACCAAGCTTTCCAAAAGCTACTCTGATTCGATCCAACTAATGAGGTTCTCTCTCGAATCGAC
 GCCGAGCTTCTCTCACTATACAGCCAAAGCCCTCCGCGCATTTAATGCCAAACTCATGAATGCCCTTAAATGGTTGCTCTCCCAATCTCG
 AATCGATCCTTAAACCCAGATCTGCTCATCGTCGACATTCCTTCCATGGATGCTTCCACTCGCTTCAATCGCTCAAAAATTCGATGGTT
 TTCTTCACTATTTCGGTGCCATGGCCATCTCCTTTATGATTATAATCGAACCGTCTCGAACGAGCTTCCATTTCCAGAAATTTGAACCTTCACGAGTG
 CTGGAAATCGAAGTGCCCTATTGTTCAAGGACCAAGCGGAAGTCAATCGTTCTTAGAATACTTGAATCAATCTTCAGGCGTAATTTTGATCAAAA
 CTTCAGAGAGATTGAGGCTAAGTATGTAGACTTCTCTACTTCGTCGTTTACGAAGAAAGTTGTGACCAACCGGTCCTCGTTTCAGCAAACCTTCTTCC
 GGGAAGACGAGAGCAGTACTCCGATATCATCGAATGGCTAGCAAGAGAGCCGTTATCGACGGTGTCTCGTTCTGTTGGGAGCGAGTATTATCT
 GTCAAAGGAAGAGATGGAAGAAATCGCTTACGGCTGGAGAGCGCCAGCAGGTGAATTCATCTGGAATGTTAGGTTCCGATGGGACAGGAAACGG
 AGGTCGAGGCGCGCTGCCGAGGGGTTTCACAGAGGCGAGAGAGAGAGGAAAGTGGTCGAGGGTGGCTCCGACGGCGGAAATAATTGGCGCAT
 CCGAGCACCGGCGCCATGTGAGCCACAACGGGTGGAGTCGATTGTGGAGTGTCTGATGTCGGTGTACCCGTGATCGGCGCGCCGATGCAACTTGA
 CGGGCCAATCGTCGAAGGCTGGTGGAGAGATCGGCGTGGTTTGGAAATCAAGAGAGATGAGGAAGGAGATCACGAGGGCGGAAAGTTGCCGATG
 CAATCAAGACGGTGGCGTGGCAAAACCGGGAAGATTTAGAAAGGAAGCAAAAATCAGCAGCATTTTGAAGATGAAAGATGAAGAAGAGGTT
 GACACTTTGGCAATGGAATTAGTGAGGTTATGCCAAATGAAAAGAGGGCAGAGTCTCAGGACTAA

UGT11999 (部分の遺伝子配列)

TCCCGGTCAACGGTAGAGGACTTCACGGAGCTTCGAGAGTGGATGCCCTTCTGGATCGAACATGGTCTACCGGTACCACGAGATTAAAAATCCTTAGA
 TGGAGCAACCGGCAACGAATCGGGGACGTCGTATCGGTCCGATTCGGAATTGTGATTGAGGAGAGTGTGCTGGCTGTAAAGAGCTCCCTGAAC
 TGGAACCGGAATGGTTCTGTCGCAAGCTTACAGAACCCAGTTGTTCCGGTAGGATTTACCTCCAGTAATTGAAGATGCGGAAGAATTG
 AGCAGCGATATCAAGGAATGGTTAGACAAACAGAGCTCAAACTCGTCTTTACGTGCGATTCGGGACCGAGGCGACTCTGAGTCAAGATGACGTCA
 TGAGTTAGCCATGGGCTTGAGCAATCTGGGATACCAATTTTCTGSGTACTGAGAACTCACCCTCGGGACGAGTCAGACATGTTACCGGCGGGTTCA
 AGGACGAGTCGAAAGGTGAGGAAGTTTACGTGGGATGGGTCGCGAGGTGAAGATACTGAGTCACGACTCGGTGGCGGTTGTTGACACACTGT
 GGATGGAACCTCGATCATAGAGGGCTCGGATTCGGGCGGTTATGGTATTTCCAGTCGTGAACGACAGGAGTGAACGCTAGATTGTTGGGGGA
 GAAGAAGCTCGGGATAGAGATAGAAAGGACGAGATGGATCGTTTCAACGCGACTCGGTGTGGAATCGGTGAGGTCGGCAATGGCGGAAGTT
 CAGCGGAGGCTTTGAGAGTGAGGCGCAGGGAATGAAGGSGTTGTTTGGAAACGGAGATGGAACGAGCATCAACTGAACAAGTTTGTACAATTTCTC
 GAGGCAACAGGAATAGGCAGTCCGAGTAA

UGT13679 (部分の遺伝子配列)

図 17 (続き)

【図 17 - 5】

CTGCTGCCGATTCCGCTGCCGAAACCGGCCCGCATCTCTTGCAGAGGTGCAGAGGCGACGGTGGATATTCCGTCCGACAAAGATTCCGTATCTGAA
 ATTGGCCCTCGATCTCGCCGAGCAGCCGTTTCGGAAAGTTCGTGTTGATCGTCCGCCGATTGGATGATCGTCGATTTTAAATGCTACTTGGGTCTGCG
 ATATTCTCGGGAGCTTCAATCCCAATCGTTTCTTTCGTGTTCTTTCGCCCTGGATTCTTTCGTCTTTCGCGCATGTTCTTGGGAGTGTCTGCCC
 CTGTCCGAGATCGAAAGCCTGATGACTCCGCCGGTGCACGGGTGCAGCGGTGCGTACCGCCGCGCATGAAGCTGCCGTTATTGTGCTGGGTTT
 TGAGAAAGACGCTTCTGGTATGAGTGCATCCGATCCGGTAACCAAAATTCCTCTGCCAGTCAAGCAATCGCAGTTCGTCTTGTCTACGAAATTGACG
 TTGAGTATTGAAATTGTACGAGAAATATTGTGAAAGAGTGCATCTCTAGGTTTCTCCCTCCAGAAAGCCCCAAAAGTCCGAGTTCGCCGCC
 GATTGCCCATGGAAACCGACCTTCGAGTGGCTTGACAAACAAAGCCCCGATCAGTGGTTCGTGCGATTCCGCGAGCAATGCAAACTCACGAAAGA
 TGATGTTTACGAGATAGCGCGGGGTGGAGCTGTCCGAGCTGCCATTTTGTGGGCTCTGAGAAACCGCATCTGGCGGCGGCGGACGATTCCGACG
 CTCTGCCCTGCCGATTCTCGAGCGGACGCGGAGAGAGGATTTGTAGCATGGGTGGCGCGCAGATGGAGATTTTAAACGACCCGTCGATTGGC
 GGCTCTCTGTTTACGCGCGGTGGGATCCGCCATTGAAGCTCTGCAATTCGGGCATTGCCCTTGTCTGTGTGCCATTTCATCGTGGATCAGCCACTGAA
 TGCAAGGCTTCTGGTGGAGAGGGTGTTCAGTTCGAAGTTGGAGAAAGGAGACGGGTCTTTTGTGGAGAGACATAGCTAAAGCTCTGAGAGAAAG
 CTATGTTTTCAGAAAGGTGAGCAGATGAGGAGGCAAGCGAGAAAG

UGT15423 (部分の遺伝子配列)

ATGGAAACGACGGCGTTTTCACGCTGGTGGTATTCCCATGGCTAGCCTTGGGTCACTCTCATTCCTTTCGCTCGACTCGCCACCTGCTTAGCCCA
 GGTCTCAGGGTTTCGTTCGTATCAACCAAGGAACCTGAGCAGAAATCCCAAAATACCCCAACATCTCTCCTCCGTCAACCTCGTCGGCTTTC
 CTCTGCCCCACGTCGACGGCTTCCGGACGCGCGGAGGCTTCCCTCCGACGTGCCTTACAACAGCAACAGTTACTGAAGAAGGCCCTTCGACTCTCTG
 GAATCACCGCTCGCCGATTTCGTTCGTGATTGAATCCGATTGGATTATCTACGATTACGCCCTCTCATTTGGCTTCCGAGCTCGCGCGGAGCTCCG
 TATCTCGTCTGTTTCTTTCAGCCTCTTTCACCGCGGGCTTCTTTCGCTTTCCTTGGCCCCACCGTCCGGCGTGTCCGGCGACGGCAGTTCCCGGTGA

図 17 (続き)

【配列表】

2015536157000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/075510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12P19/18	C12P19/56	C12N9/02
C12P33/08	C12N9/90	C12N9/14
C12N15/80		
ADD.		
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)		
C12P C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QI TANG ET AL: "An efficient approach to finding <i>Siraitia grosvenorii</i> triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis", BMC GENOMICS, vol. 12, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 343-343, XP055112412, ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1073/pnas.95.25.14863 cited in the application abstract page 6, right-hand column, paragraph 1 - page 8, left-hand column, paragraph 1; figure 1; table 3 ----- -/--	1-26
☒ 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		Date of mailing of the international search report
11 April 2014		23/04/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mateo Rosell, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/075510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHIBUYA M ET AL: "Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 60, no. 33, 9 August 2004 (2004-08-09), pages 6995-7003, XP004522108, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/J.TET.2004.04.088 cited in the application abstract page 6997, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1; figures 1,2 page 6998, right-hand column, last paragraph - page 7000, left-hand column, paragraph 2; figure 4	1-26
A	----- WO 2010/106318 A1 (UNIV YORK [GB]; LIM ENG KIAT [GB]; BOWLES DIANNA JOY [GB]) 23 September 2010 (2010-09-23) page 3, lines 1-12 page 4, lines 25-35 -----	1-26
A	RICHMAN ALEX ET AL: "Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of Stevia rebaudiana", THE PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 41, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 56-67, XP002468725, ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1111/J.1365-313X.2004.02275.X abstract page 58, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1; figure 1; table 1 -----	1-26
A	BOWLES D ET AL: "Glycosyltransferases: managers of small molecules", CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY, QUADRANT SUBSCRIPTION SERVICES, GB, vol. 8, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 254-263, XP027848092, ISSN: 1369-5266 [retrieved on 2005-06-01] abstract page 58, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1; table 1 figure 1; table 1 ----- -----	1-26
2	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/075510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEH H ET AL: "Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 105, no. 37, 16 September 2008 (2008-09-16), pages 14204-14209, XP008131547, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0803876105 [retrieved on 2008-09-08] abstract page 14207, left-hand column, paragraph 2-3; figure 1 -----	1-26
A	LI D ET AL: "Cucurbitane glycosides from unripe fruits of <i>Lo Han Kuo</i> (<i>Siraitia grosvenorii</i>)", CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, JP, vol. 54, no. 10, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 1425-1428, XP002696308, ISSN: 0009-2363, DOI: 10.1248/CPB.54.1425 abstract -----	1-26
Y,P	WO 2013/076577 A1 (EVOLVA SA [CH]) 30 May 2013 (2013-05-30) the whole document -----	1-19
Y,P	B. HAMBERGER ET AL: "Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity", THE PLANT CELL ONLINE, vol. 23, no. 2, 6 January 2013 (2013-01-06), pages 716-20120426, XP055112833, ISSN: 1040-4651, DOI: 10.1105/tpc.110.081711 the whole document -----	1-19
T	CHUN-HUI CHIU ET AL: "Biotransformation of Mogrosides from <i>Siraitia grosvenorii</i> Swingle by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 61, no. 29, 24 July 2013 (2013-07-24), pages 7127-7134, XP055113210, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf402058p the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/075510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010106318	A1	23-09-2010	NONE

WO 2013076577	A1	30-05-2013	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, LT, 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

(72)発明者 ハンセン, ヨルゲン
 デンマーク国 デーコー 2 0 0 0 フレゼレクスベア、ディルシュ パッサース アレ 1 1

(72)発明者 ホートンラーセン, ジェンス
 デンマーク国 デーコー 3 4 6 0 ビアケレズ、グロンダルスヴェイ 1 3

(72)発明者 ムラリ, ムスルワミー パンチャバゲサ
 インド国 6 0 0 1 1 3 チェンナイ、タラマーニー、ティセル バイオ パーク リミテッド、
 4 0 1 - 4 0 5、エヴォルヴァ リミテッド

(72)発明者 クマー, サティシュ
 インド国 タミル ナードゥ州 6 0 3 1 0 6 オラカトペット (ヴィア)、アランブリユール
 、7 3 番

(72)発明者 ラスムッセン, ニナ, ニコリン
 デンマーク国 デーコー 2 6 5 0 ビズオウア、グリムヴェイ 2 9

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA80 DA06 DA12 EA04 GA21
 4B064 AF02 CA19 CA21 CC15 CC24
 4B065 AA01X AA58X AA80X AA87X AB01 AC14 BA02 CA19 CA27