

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年9月19日(19.09.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/137487 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C07H 15/256 (2006.01) *C12P 19/44* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/058189
- (22) 国際出願日: 2013年3月14日(14.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-060473 2012年3月16日(16.03.2012) JP
- (71) 出願人: サントリーホールディングス株式会社
(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒
5308203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番4
0号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 小椋栄一郎(ONO, Eiichiro); 〒6188503 大
阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリー
研究センター内 Osaka (JP); 落合美佐(OCHIAI,
Misa); 〒6188503 大阪府三島郡島本町若山台1-
1-1 サントリー研究センター内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒
1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号福
- 岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所
Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))
 — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))



WO 2013/137487 A1

(54) Title: STEVIOL GLYCOSYLTRANSFERASE AND GENE ENCODING SAME

(54) 発明の名称: ステビオール配糖体化酵素およびそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a steviol glycosyltransferase; and a method for producing a steviol glycoside using the enzyme. The present invention provides: a steviol glycosyltransferase; and a method for producing a steviol glycoside using the enzyme. The present invention also provides: a transformant having, introduced therein, a steviol glycosyltransferase gene; and a method for producing the transformant.

(57) 要約: 本発明は、ステビオール配糖体化酵素及び同酵素を用いたステビオール配糖体の製造方法を提供することを目的とする。本発明は、ステビオール配糖体化酵素及び同酵素を用いたステビオール配糖体の製造方法を提供する。本発明は、ステビオール配糖体化酵素遺伝子を導入した形質転換体及び当該形質転換体の作製方法を提供する。

明 細 書

発明の名称

ステビオール配糖体化酵素およびそれをコードする遺伝子

5

技術分野

本発明は、ステビオール配糖体を合成する活性を有するタンパク質及びこれをコードするポリヌクレオチド、同タンパク質を利用したステビオール配糖体の製造方法、ステビオール配糖体化酵素を高発現する形質転換体並びに前記方法により作製されたステビオール配糖体及びその利用に関する。

10

背景技術

キク科ステビア(*Stevia rebaudiana*)の葉にはジテルペノイドの一種であるステビオール(Steviol)とよばれる二次代謝産物が含まれており、ステビオール配糖体は砂糖の約 300 倍もの甘味を呈することからカロリーレスの甘味料として食品産業に利用されている。肥満が深刻な社会問題として国際的に発展しており、健康増進および医療費削減の観点からもカロリーレスの甘味料の要望は日々大きくなっている。現在では人工的に合成されたアミノ酸誘導体のアスパルテーム(Aspartame)やアセスルファムカリウム(Acesulfame Potassium)が人工甘味料として利用されているが、ステビオール配糖体のように天然に存在するカロリーレス甘味料がより安全で消費者理解 (Public Acceptance) が得られやすいと期待される。

15

20

ステビアの葉に含まれるステビオールは最終的には 4 つの糖が付いたレバウディオシド A (Rebaudioside A)と呼ばれる配糖体にまで糖で修飾される (図 1)。その前駆体であるステビオール三糖配糖体のステビオシド(Stevioside)が量的に最も多く、レバウディオシド A とステビオシドがステビアの甘味の中心的な物質である。これら以外に反応中間体と思われる配糖体や糖の種類が異なる類縁体の存在が知られている。

25

レバウディオシド A の生合成に至る酵素遺伝子はステビアの Expressed Sequence Tag (EST) 解析を通じて単離されている (非特許文献 1 及び 2、特許文献 1)。植

物ホルモンであるジテルペノイドのジベレリン(Gibberellin)の前駆体であるエントカウレン酸(ent-kaurenoic acid)の13位がチトクロームP450酵素であるエントカウレン酸13位水酸化酵素(EK13H)によって水酸化されることでステビオールが生成する(図2)(非特許文献3、特許文献1)。ステビオールはまず13位の水酸基が

5 UGT85C2によって配糖体化(モノグルコシル化)されることでステビオールモノシド(Steviolmonoside)が生成する。ステビオールモノシドの13位のグルコースの2位が更にグルコシル化されることでステビオールビオシド(Steviolbioside)、あるいはステビオールモノシドの19位のカルボキシル基がグルコシル化されてルブソシド(Rubusoside)と呼ばれるステビアールの二糖配糖体が生じる。このように生成

10 したステビオールビオシドやルブソシドが更に配糖体化され、ステビオシドやレバウディオシドA(Rebaudioside A)のようなステビアール配糖体を生じると考えられている。ステビアール配糖体の生成に関わる酵素遺伝子としてUGT74G1やUGT76G1が知られている。

UGT74G1は、ステビオールモノシドの19位のグルコシル化を触媒することが知られている(非特許文献1)。UGT74G1は、また、ステビオールビオシドをグルコシル化し、ステビアール三糖配糖体のステビオシド(Stevioside)を生じる。このステビオシドがステビア葉で最も含有量が多く、砂糖の250~300倍程の甘味を呈することが知られている。このステビオシドがさらにUGT76G1によってグルコシル化されて、最も甘味が高く(砂糖の350~450倍)、且つ味質が良いとされるステビアール四糖配糖体であるレバウディオシドA(Rebaudioside A)が生成する。

20

ステビアール配糖体においては、特に、13位のグルコースに分枝状糖を付加することで味質および甘味度が向上することが報告されているため(非特許文献4、特許文献2)、これらの反応を触媒する配糖体化酵素は、ステビアの甘味特性を決定する重要な酵素であると考えられる。

25 先行研究(非特許文献2)ではステビアの葉のEST解析から数種類の配糖体化酵素(UGT)が報告されているが、それら全ての詳細な酵素活性は十分検討されていない。また、UGT91D1のホモログタンパク質については、不完全長配列の単離しか報告されていない(特許文献3)。

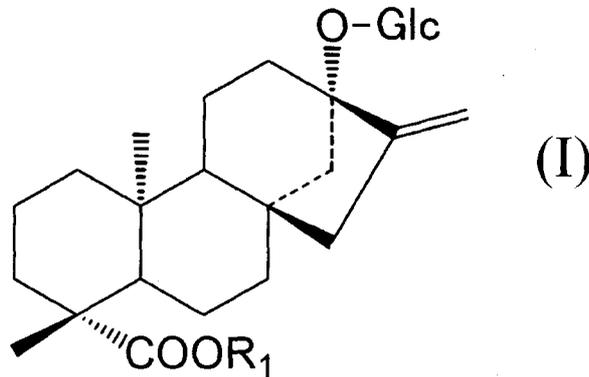
- 特許文献 1 : EP 1 897 951 B1
特許文献 2 : 特開平 5-255372
特許文献 3 : WO2011/153378A1
非特許文献 1 : Brandle and Telmer (2007) *Phytochemistry* 68, 1855-1863
5 非特許文献 2 : Richman et al (2005) *Plant J.* 41, 56-67
非特許文献 3 : Mizutani and Ohta (2010) *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 291-315
非特許文献 4 : 笠井ら (1981) *日本化学会誌* 5, 726-735

発明の開示

- 10 本発明者らは鋭意研究を遂行した結果、ステビアにおいてステピオール配糖体の 13 位グルコースへの糖付加反応を触媒する酵素及び同酵素をコードする遺伝子を同定することに成功した。本発明は、上記知見に基づくものである。

即ち、本発明は、以下のとおりである。

- 15 [1] 以下の (a) ~ (c) よりなる群より選ばれるいずれかに記載のタンパク質。
(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質；
(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~48 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質；
20 (c) 配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質



(式中、 R_1 は H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル基、 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルジエニル基、 $C_6 \sim C_{18}$ アリール基、 $C_6 \sim C_{20}$ アルキルアリール基、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルケニル基、 $(C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル) $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基又は糖残基を表す。)

[2] 前記糖分子が、ヘキソースである、前記 [1] に記載のタンパク質。

[3] 前記糖分子が、グルコース、マンノース及びガラクトースからなる群より選択されるものである、前記 [1] に記載のタンパク質。

[4] 前記 R_1 が、H 又はグルコース単量体若しくはグルコース 2 量体の糖残基である、前記 [1] に記載のタンパク質。

[5] 前記化合物が、ステビオールモノシド又はルブソシドである、前記 [1] に記載のタンパク質。

[6] 以下の (a) ~ (e) よりなる群より選ばれるポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 の塩基配列を含有するポリヌクレオチド；

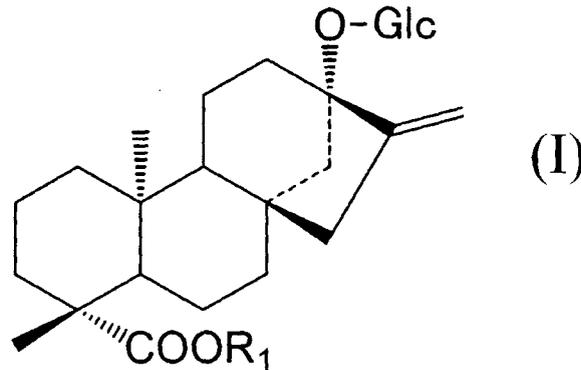
(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~48 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分

子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 1 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド



(式中、R₁はH、C₁~C₂₀アルキル基、C₂~C₂₀アルケニル基、C₂~C₂₀アルキニル基、C₄~C₂₀アルキルジエニル基、C₆~C₁₈アリール基、C₆~C₂₀アルキルアリール基、C₆~C₂₀アリールアルキル基、C₄~C₂₀シクロアルキル基、C₄~C₂₀シクロアルケニル基、(C₃~C₁₀シクロアルキル) C₁~C₁₀アルキル基又は糖残基を表す。)

[7] 前記糖分子が、グルコース、マンノース及びガラクトースからなる群より選択されるものである、前記 [6] に記載のポリヌクレオチド。

[8] 前記 R₁が、H 又はグルコース単量体若しくはグルコース 2 量体の糖残基である、前記 [6] に記載のポリヌクレオチド。

[9] 前記化合物が、ステビオールモノシド又はルブソシドである、前記 [6] に記載のポリヌクレオチド。

[10] 前記 [6] に記載のポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換体。

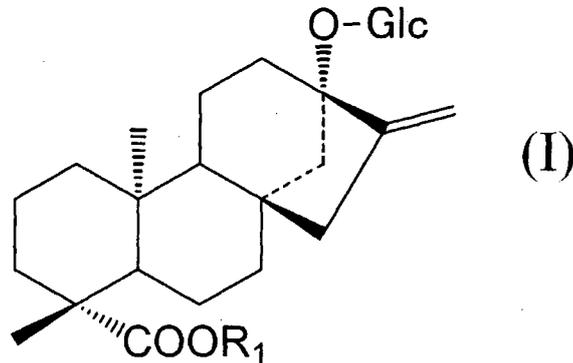
[11] 前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターに挿入されたものである、前記 [10] に記載の形質転換体。

[12] 微生物または植物体である、前記 [10] に記載の形質転換体。

[13] 前記 [10] に記載の形質転換体の抽出物。

[14] 前記 [13] に記載の抽出物を含む食品、医薬品又は工業原料。

[15] 前記 [10] に記載の非ヒト形質転換体を培養することを特徴とするタンパク質の製造方法であって、前記タンパク質が下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有する、方法。



5

(式中、 R_1 は H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル基、 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルジエニル基、 $C_6 \sim C_{18}$ アリール基、 $C_6 \sim C_{20}$ アルキルアリール基、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルケニル基、($C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル) $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基又は糖残基を表す。)

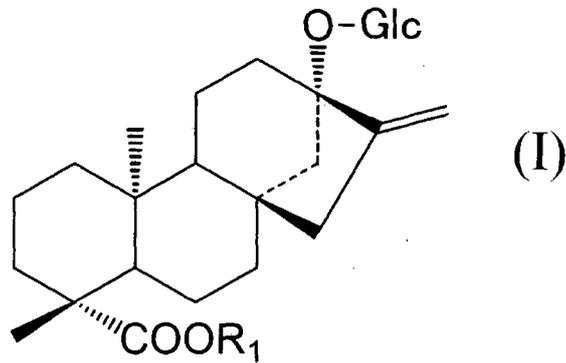
10 [16] 前記 [10] に記載の非ヒト形質転換体を用いることを特徴とするステビオール配糖体の製造方法。

[17] 前記ステビオール配糖体が、ステビオールビオシド、ステビオシド、レバウディオシド A、レバウディオシド B、レバウディオシド C、レバウディオシド D、レバウディオシド E、レバウディオシド F 又はこれらの組み合わせである、前記 [16] に記載の方法。

15

[18] 前記非ヒト形質転換体は、UGT85C2 遺伝子、UGT74G1 遺伝子、UGT76G1 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を発現するものであり、製造されるステビオール配糖体がステビオールビオシド、レバウディオシド A、ステビオシド及びレバウディオシド B である、前記 [16] に記載の方法。

20 [19] 前記 [1] に記載のタンパク質と、UDP-糖と、下記一般式 (I) で示される化合物とを反応させる工程を含む、ステビオール配糖体の製造方法。



(式中、 R_1 はH、 $C_1\sim C_{20}$ アルキル基、 $C_2\sim C_{20}$ アルケニル基、 $C_2\sim C_{20}$ アルキニル基、 $C_4\sim C_{20}$ アルキルジエニル基、 $C_6\sim C_{18}$ アリール基、 $C_6\sim C_{20}$ アルキルアリー

5 ル基、 $C_6\sim C_{20}$ アリールアルキル基、 $C_4\sim C_{20}$ シクロアルキル基、 $C_4\sim C_{20}$ シクロアルケニル基、($C_3\sim C_{10}$ シクロアルキル) $C_1\sim C_{10}$ アルキル基又は糖残基を表す。)

[20] 前記UDP-糖における糖が、グルコースである、前記[19]に記載の方法。

[21] 前記ステビオール配糖体が、ステビオールビオシド、ステビオシド、レ

10 バウディオシドA、レバウディオシドB、レバウディオシドC、レバウディオシドD、レバウディオシドE、レバウディオシドF又はこれらの組み合わせである、前記[19]に記載の方法。

本発明のタンパク質及びこれをコードするポリヌクレオチドを利用すること

15 より、高効率にステビオール配糖体(例えば、ステビオールビオシド及びステビオシド等)を製造することができる。また、本発明の形質転換体は、ステビオール配糖体(例えば、ステビオールビオシド及びステビオシド等)の含有量が高いため、これらの形質転換体から、効率よくステビオール配糖体(例えば、ステビオールビオシド及びステビオシド等)を抽出・精製することができる。

20 また、本発明のタンパク質及びこれをコードするポリヌクレオチドを、他のステビオール配糖体化酵素又は同酵素をコードするポリヌクレオチドと同一の宿主細胞内で共発現させることにより、より高度に配糖化されたステビオール配糖体(例

例えば、レバウディオシド A 及びレバウディオシド B 等) を作製することができる。

図面の簡単な説明

図 1: ステビオール配糖体群の名称と構造を示す。図 1 において「Glc-Glc
5 (β2→1)」は「Glc-Glc」が β2,1 グリコシド結合により結合していることを示し、
「Glc-Glc (β3→1)」は「Glc-Glc」が β3,1 グリコシド結合により結合していること
を示す。

図 2: 推定されているステビオール配糖体の生合成経路を示す。

図 3: 大腸菌で発現させたステビア UGT タンパク質の SDS-PAGE 結果。左は
10 ペレット画分、右はイミダゾール溶液による溶出画分の CBB 染色図。アスタリ
スクは発現した組換えタンパク質を示す。

図 4: UGT91D-like3 タンパク質の酵素活性を示す。

図 5: UGT85C2、UGT91D-like3、UGT74G1 及び UGT76G1 遺伝子を導入した
組み換え酵母の培養液の LC-MS 分析結果を示す。

15 図 6: 組換えタンパク質の発現を示す図である。ウエスタンブロットによる組
換えタンパク質を検出したところ、UGT91D-like3 および UGT91D2e はそれぞれ
HisTag 融合タンパク質として発現していることが確認できた。UGT91D2e は 12 ア
ミノ酸短いため UGT91D-like3 よりやや小さいサイズにバンドが認められる。

20 図 7: UGT91D ホモログ酵素の N 末端部分配列のアライメントを示す。上から
UGT91D1, UGT91D-like3, UGT91D2e のアミノ酸配列。アスタリスク (*) はブド
ウ由来の糖転移酵素 VvGT1 の触媒活性に必須とされているヒスチジン残基
(VvGT1_His20)に対応する位置。

発明を実施するための最良の形態

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

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他
の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2012

年 3 月 16 日に出願された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願（特願 2012-60473 号）の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

本発明者らは、ステビオール配糖体の 13 位のグルコースへの糖付加反応を担う酵素タンパク質が、UGT91D-like3 であることを初めて解明した。

- 5 UGT91D-like3 の CDS 配列及び推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 及び 2 である。前記ポリヌクレオチド及び酵素は、後述の実施例に記載した手法、公知の遺伝子工学的手法、公知の合成手法等によって取得することが可能である。

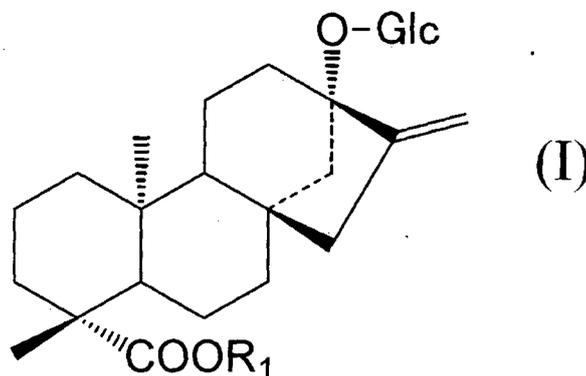
1. ステビオール配糖体化酵素

- 10 本発明は、以下の (a) ~ (c) よりなる群より選ばれるいずれかに記載のタンパク質（以下、「本発明のタンパク質」という）を提供する。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質；

- (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~48 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質



- 20 (式中、R₁はH、C₁~C₂₀アルキル基、C₂~C₂₀アルケニル基、C₂~C₂₀アルキニル基、C₄~C₂₀アルキルジエニル基、C₆~C₁₈アリール基、C₆~C₂₀アルキルアリール基、C₆~C₂₀アリールアルキル基、C₄~C₂₀シクロアルキル基、C₄~C₂₀シクロアル

ケニル基、(C₃~C₁₀シクロアルキル) C₁~C₁₀アルキル基又は糖残基を表す。)

上記 (b) 又は (c) に記載のタンパク質は、代表的には、天然に存在する配列番号 2 のポリペプチドの変異体であるが、例えば、"Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001"、
5 "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997"、
"Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982) "、"Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982) "、
"Gene, 34, 315 (1985) "、"Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985) "、"Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) "等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、人為的に取得することができるものも含まれる。

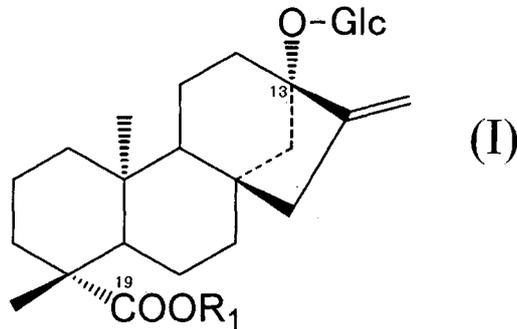
10

本明細書中、「配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~48 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質」としては、配列番号 2 のアミノ酸配列において、例えば、1~48 個、1~47 個、1
15 ~46 個、1~45 個、1~44 個、1~43 個、1~42 個、1~41 個、1~40 個、1~39 個、
1~38 個、1~37 個、1~36 個、1~35 個、1~34 個、1~33 個、1~32 個、1~31
個、1~30 個、1~29 個、1~28 個、1~27 個、1~26 個、1~25 個、1~24 個、1~
23 個、1~22 個、1~21 個、1~20 個、1~19 個、1~18 個、1~17 個、1~16 個、1
20 ~15 個、1~14 個、1~13 個、1~12 個、1~11 個、1~10 個、1~9 個(1~数個)、
1~8 個、1~7 個、1~6 個、1~5 個、1~4 個、1~3 個、1~2 個、又は 1 個のアミ
ノ酸残基が欠失、置換、挿入及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有す
るタンパク質が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び/又は付
加の数は、一般的には小さい程好ましい。

25 また、このようなタンパク質としては、配列番号 2 のアミノ酸配列と 90% 以上、
91% 以上、92% 以上、93% 以上、94% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、
98% 以上、99% 以上、99.1% 以上、99.2% 以上、99.3% 以上、99.4% 以上、99.5%
以上、99.6% 以上、99.7% 以上、99.8% 以上、又は 99.9% 以上の配列同一性を有す
るアミノ酸配列を有し、かつ一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに

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

ここで、「一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性」とは、下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコース基に、糖を付加する活性を意味する。



一般式 (I) において、Glc は、グルコース残基を表す。また、一般式 (I) において R_1 は H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ アルキル基、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルケニル基、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルキニル基、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{20}$ アルキルジエニル基、 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{18}$ アリール基、 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{20}$ アルキルアリール基、 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{20}$ アリールアルキル基、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{20}$ シクロアルキル基、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{20}$ シクロアルケニル基、($\text{C}_3 \sim \text{C}_{10}$ シクロアルキル) $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル基又は糖残基を表す。

本明細書において、「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ アルキル基」は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル基であることが好ましく、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基であることが更に好ましい。アルキル基の例としては、制限するわけではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ドデカニル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルケニル基」は、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルケニル基であることが好ましく、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルケニル基であることが更に好ましい。アルケニル基の例としては、制限するわけではないが、ビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニル、2-メチル-1-プロペニル、2-メチルアリル、2-ブテニル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル基」は、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキニル基であることが好ましく、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル基であることが更に好ましい。アルキニル基の例としては、制限するわけではないが、エチニル、2-プロピニル、2-ブチニル等を挙げることができる。

- 5 本明細書において、「 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルジエニル基」は、 $C_4 \sim C_{10}$ アルキルジエニル基であることが好ましく、 $C_4 \sim C_6$ アルキルジエニル基であることが更に好ましい。アルキルジエニル基の例としては、制限するわけではないが、1,3-ブタジエニル等を挙げることができる。

- 10 本明細書において、「 $C_6 \sim C_{18}$ アリール基」は、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基であることが好ましい。アリール基の例としては、制限するわけではないが、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、インデニル、ビフェニリル、アントリル、フェナントリル等を挙げることができる。

- 15 本明細書において、「 $C_6 \sim C_{20}$ アルキルアリール基」は、 $C_6 \sim C_{12}$ アルキルアリール基であることが好ましい。アルキルアリール基の例としては、制限するわけではないが、*o*-トリル、*m*-トリル、*p*-トリル、2,3-キシリル、2,4-キシリル、2,5-キシリル、*o*-クメニル、*m*-クメニル、*p*-クメニル、メシチル等を挙げることができる。

- 20 本明細書において、「 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル基」は、 $C_6 \sim C_{12}$ アリールアルキル基であることが好ましい。アリールアルキル基の例としては、制限するわけではないが、ベンジル、フェネチル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2,2-ジフェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチル等を挙げることができる。

- 25 本明細書において、「 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルキル基」は、 $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルキル基であることが好ましい。シクロアルキル基の例としては、制限するわけではないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルケニル基」は、 $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルケニル基であることが好ましい。シクロアルケニル基の例としては、制限するわけではないが、シクロプロペニル、シクロブテニル、2-シクロペンテン-1-イル、2-シクロヘキセン-1-イル、3-シクロヘキセン-1-イル等を挙げることができる。

本明細書において、「(C₃~C₁₀ シクロアルキル) C₁~C₁₀ アルキル基」の例としては、メチルシクロプロピル、エチルシクロプロピル、メチルシクロブチル、エチルシクロペンチル、メチルシクロヘキシル等を挙げることができる。

本明細書において、「糖残基」は、特に限定されないが、1 以上のペントース、
5 ヘキソース又はその組み合わせからなる糖の残基であってもよい(キシロース、ラムノース又はその組み合わせを除く)。

ペントース(キシロース、ラムノース又はその組み合わせを除く)の例としては
10 リポース、アラビノース及びリキソースが挙げられ、ヘキソースの例としては、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロースが挙げられる。

好ましくは「糖残基」は、1 以上のヘキソース単位からなる糖の残基であり、さらに好ましくはグルコース単量体 (-Glc) 又はグルコース 2 量体(-Glc-Glc) の糖残基である。グルコース 2 量体の糖残基において、好ましくは、グルコース同士は β 2、1 グリコシド結合により結合している。

15 好ましくは、一般式 (I) の化合物は、ステビオールモノシド又はルブソシドである。

本発明のタンパク質により一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに付加される糖分子は、特に限定されないが、1 以上のペントース、ヘキソース又は
20 その組み合わせからなる糖分子であってもよい(キシロース、ラムノース又はその組み合わせを除く)。ペントース及びヘキソースの例は上述の通りである。好ましくは前記糖分子は、ヘキソースであり、更に好ましくは、グルコース、マンノース及びガラクトースからなる群より選択されるヘキソースである。最も好ましくは、前記糖分子は、グルコースである。

25 一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性は、被検タンパク質 1~500 ng (好ましくは、50~200 ng、最も好ましくは 100 ng)、UDP 糖 (例えば、UDP-グルコース) 1~1000 μ M (好ましくは、100~700 μ M、最も好ましくは 500 μ M)、及び基質化合物 (一般式 (I) の化合物) 1~500 μ M (好ましくは、100~500 μ M、最も好ましくは 250 μ M) を含む pH6.0~8.0 の中性領域の緩衝

液（例えば、リン酸ナトリウムバッファー又はリン酸カリウムバッファー）中において、20～40℃の温度で10分間～2時間インキュベートした後に、前記基質化合物を精製し、精製したモノテルペンをLC-MS分析（Liquid Chromatography-Mass Spectrometry）等の公知の手法により分析することで検証することができる。

- 5 LC-MS分析の結果、一般式(I)で示される化合物の13位のグルコースに糖分子が付加した化合物が検出された場合、前記被検タンパク質は一般式(I)で示される化合物の13位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するものと言える。

前記糖付加反応は、一般に、1分～12時間程度で終了する。

- 10 本発明のタンパク質のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入及び/又は付加されたとは、同一配列中の任意かつ1若しくは複数個のアミノ酸配列中の位置において、1若しくは複数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び/又は付加があることを意味し、欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上が同時に生じてよい。

- 15 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、o-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン；B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸；C群：アスパラギン、グルタミン；D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸；E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン；F群：セリン、スレオニン、ホモセリン；G群：フェニルアラニン、チロシン。

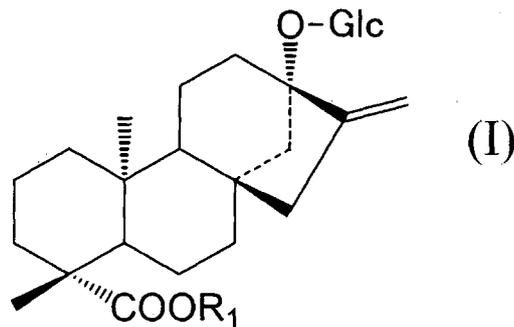
- 25 本発明のタンパク質は、これをコードするポリヌクレオチド（後述する「本発明のポリヌクレオチド」を参照）を適切な宿主細胞内で発現させることにより得ることができるが、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced Automation Peptide Protein Technologies社製、Perkin Elmer社製、

Protein Technologies 社製、PerSeptive 社製、Applied Biosystems 社製、SHIMADZU 社製等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

2. ステビオール配糖体の製造方法

- 5 本発明のタンパク質が有する、一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を利用することにより、ステビオール配糖体を容易かつ多量に製造することが可能である。

- そこで、別の実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質と、UDP-糖と、
 10 下記一般式 (I) で示される化合物とを反応させて、一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する工程を含む、ステビオール配糖体の第 1 の製造方法を提供する。



- 一般式 (I) の Glc 及び R₁ の定義は前述の通りである。好ましくは、一般式 (I)
 15 の化合物は、ステビオールモノシド又はルブソシドである。

- 本明細書において、「UDP-糖」とは、ウリジン二リン酸 (Uridine DiPhosphate :
 UDP) 結合型の糖である。UDP-糖における糖部分の好ましい例としては 1 以上の
 ペントース (キシロースを除く)、ヘキソース又はその組み合わせからなる糖が挙げ
 20 られる。ペントース (キシロースを除く) 及びヘキソースの例は上述の通りであ
 る。好ましくは UDP-糖は、UDP-ヘキソースであり、更に好ましくは、グルコース、
 マンノース及びガラクトースからなる群より選択されるヘキソースである。最も好
 ましくは、前記 UDP-糖は、UDP-グルコースである。

本発明に係るステビオール配糖体の第 1 の製造方法は、本発明のタンパク質と、

UDP 糖と、一般式 (I) で示される化合物とを反応させて、一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する工程を含む。本発明の第 1 の製造方法は、さらに、前記工程で生成したステビオール配糖体を精製する工程を含んでいてもよい。

5

第 1 の製造方法により生成されるステビオール配糖体の例としては、ステビオールピオシド、ステビオシド、レバウディオシド A、レバウディオシド B、レバウディオシド C、レバウディオシド D、レバウディオシド E、レバウディオシド F 又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

生成したステビオール配糖体は、適切な溶媒（水等の水性溶媒又はアルコール、エーテル及びアセトン等の有機溶媒）による抽出、酢酸エチルその他の有機溶媒：水の勾配、高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography : HPLC）、ガスクロマトグラフィー、飛行時間型質量分析（Time-of-Flight mass spectrometry : TOF-MS）、超高性能液体クロマトグラフィー（Ultra (High) Performance Liquid chromatography : UPLC）等の公知の方法によって精製することができる。

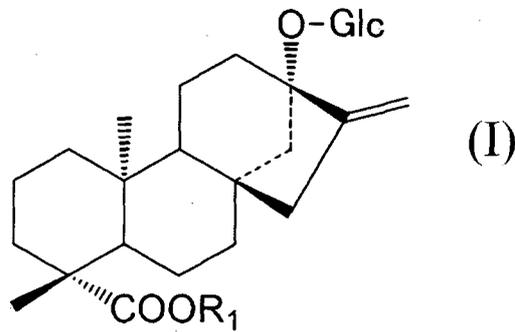
15

3. ステビオール配糖体高含有非ヒト形質転換体

20

ステビオール配糖体は、本発明のタンパク質を用いて細菌（大腸菌又は酵母など）、植物、昆虫、ヒトを除く哺乳動物などの細胞内で生成することもできる。本発明のタンパク質は、ステビアに由来する酵素又はその変異体であるため、細胞内環境においても高い活性を有することが期待されるからである。この場合、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（後述する「本発明のポリヌクレオチド」を参照）を、細菌、植物、昆虫、ヒトを除く哺乳動物などに由来する宿主

25 細胞に導入して本発明のタンパク質を発現させ、本発明のタンパク質と、前記細胞内に存在する UDP-糖及び一般式 (I) で示される化合物とを反応させることによりステビオール配糖体を生成することができる。



そこで、本発明は、以下の (a) ~ (e) よりなる群より選ばれるいずれかに記載のポリヌクレオチド（以下、「本発明のポリヌクレオチド」という）が導入された
5 非ヒト形質転換体（以下、「本発明の形質転換体」という）を提供する。

(a) 配列番号 1 の塩基配列を含有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

10 (c) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~48 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質；

(d) 配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

15 (e) 配列番号 1 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

20 一般式 (I) の定義及び具体例は既に述べた通りであり、また、一般式 (I) で示される化合物の 13 位に付加される糖分子の定義及び具体例も前述の通りである。

本明細書中、「ポリヌクレオチド」とは、DNA 又は RNA を意味する。

本明細書中、「高ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば、配列番号 1 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドの全部又は一部をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法、5 プラークハイブリダイゼーション法又はサザンハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイゼーションの方法としては、例えば、"Sambrook & Russell, Molecular Cloning : A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001"及び"Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997"などに記載さ10 れている方法を利用することができる。

本明細書中、「高ストリンジেন্টな条件」とは、例えば、(1) 5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、50℃、(2) 0.2 x SSC、0.1% SDS、60℃、(3) 0.2 x SSC、0.1% SDS、62℃、(4) 0.2 x SSC、0.1% SDS、65℃、又は(5) 0.1 x SSC、0.1% SDS、65℃の条件であるが、これに限定されるものではない。これらの条件において、温度を上げるほど高い配列同一性を有するDNAが15 効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度等の複数の要素が考えられ、当業者であればこれらの要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。20

なお、ハイブリダイゼーションに市販のキットを用いる場合は、例えば Alkphos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いることができる。この場合は、キットに添付のプロトコルにしたがい、標識したプローブとのインキュベーションを一晩行った後、メンブレンを 55~60℃の条件下で 0.1% (w/v) SDS 25 を含む1次洗浄バッファーで洗浄後、ハイブリダイズしたDNAを検出することができる。あるいは、配列番号 1 の塩基配列と相補的な塩基配列、又は配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部又は一部と相補的な配列に基づいてプローブを作製する際に、市販の試薬(例えば、PCR ラベリングミックス(ロシユ・ダイアグノスティクス社)等)を用いて該プローブをジゴキシゲニン(DIG)

ラベルした場合には、DIG 核酸検出キット（ロシュ・ダイアグノスティクス社）を用いてハイブリダイゼーションを検出することができる。

上記以外にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、FASTA、BLAST
5 等の相同性検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメーターを用いて計算したときに、配列番号1のDNA、又は配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAと80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、
10 99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、又は99.9%以上の配列同一性を有するDNAをあげることができる。

なお、アミノ酸配列や塩基配列の配列同一性は、FASTA(Science 227 (4693): 1435-1441, (1985))や、カーリン及びアルチュールによるアルゴリズム BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990;
15 Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいた blastn、blastx、blastp、tblastn や tblastx と呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990) 。blastn を用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えば score = 100、wordlength = 12 とする。
また、blastp を用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えば
20 score = 50、wordlength = 3 とする。BLASTと Gapped BLAST プログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

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

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

適切な発現ベクターは、通常、

- (i) 宿主細胞内で転写可能なプロモーター；
- (ii) 該プロモーターに結合した、本発明のポリヌクレオチド；及び

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

を含むように構成される。

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

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

いれればよい。

本発明の発現ベクターは、導入されるべき宿主の種類に依存して、発現制御領域（例えば、プロモーター、ターミネーター及び／又は複製起点等）を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、慣用的なプロモーター（例えば、*trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター等）が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、*GAL1* プロモーター、*GAL10* プロモーター、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、*PH05* プロモーター等が挙げられ、糸状菌用プロモーターとしては、例えば、*amiA* プロモーター等が挙げられる。また、植物細胞内で目的遺伝子が発現させるためのプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウィルスの 35S RNA プロモーター、*rd29A* 遺伝子プロモーター、*rbcS* プロモーター、前記カリフラワーモザイクウィルスの 35S RNA プロモーターのエンハンサー配列をアグロバクテリウム由来のマンノピン合成酵素プロモーター配列の 5' 側に付加した *mac-1* プロモーター等が挙げられる。動物細胞宿主用プロモーターとしては、ウイルス性プロモーター（例えば、SV40 初期プロモーター、SV40 後期プロモーター等）が挙げられる。

発現ベクターは、少なくとも 1 つの選択マーカーを含むことが好ましい。このようなマーカーとしては、栄養要求性マーカー（*ura5*、*niaD*、*TRP1*、*URA3*、*HIS3*、*LEU2*）、薬剤耐性マーカー（*hygromycine*、ゼオシン）、ジェネチシン耐性遺伝子（*G418r*）、銅耐性遺伝子（*CUP1*）（Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, p.

337, 1984)、セルレニン耐性遺伝子 (fas2m, PDR4) (それぞれ、猪腰淳嗣ら、生化学, vol. 64, p. 660, 1992 ; Hussain et al., Gene, vol. 101, p. 149, 1991) などが利用可能である。

5 本発明の形質転換体の作製方法 (生産方法) は特に限定されないが、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主に導入して形質転換する方法が挙げられる。

10 本発明の形質転換体は、ステビオール配糖体を高効率で生産することが期待される。形質転換に用いられる宿主細胞は、特に限定されるものではなく、公知の各種細胞を好適に用いることができる。例えば、宿主細胞の例としては、大腸菌 (Escherichia coli) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*)、植物細胞、ヒトを除く動物細胞等が挙げられる。

15 好ましくは、宿主細胞は、一般式 (I) に示される化合物を生成することのできる宿主細胞である。ここで、宿主細胞は、天然状態で一般式 (I) に示される化合物を生成することのできるものに限定されず、例えば、一般式 (I) に示される化合物を生成することができるように公知の遺伝子で組換え操作されたものであってもよい。

一般式 (I) に示される化合物の合成に寄与する酵素をコードする遺伝子としては、EK13H、UGT74G1 及び UGT76G1 (非特許文献 2) 等が公知のものとして挙げられるがこれらに限定されるものではない。

20

25 宿主細胞が一般式 (I) に示される化合物を生成することができないものである場合、同宿主細胞に本発明の遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養系に基質として一般式 (I) の化合物又は同化合物を含む植物抽出物を添加することにより、一般式 (I) に示される化合物の合成に寄与する酵素をコードする遺伝子を導入せずともステビオール配糖体を製造することが可能である。

さらに、ステビオールからレバウディオシド A までの一連の配糖体合成に関与する配糖体化酵素をコードする遺伝子を導入した宿主細胞を用い、同宿主細胞で本発明のポリヌクレオチドを発現させることにより、より高度に配糖化されたステビオール配糖体 (例えば、ステビオールピオシド、レバウディオシド A、ステビオシ

ド及びレバウディオシド B 等) を作製することができる。ステビオールからレバウディオシド A までの一連の配糖体合成に関与する配糖体化酵素及びその遺伝子の例としては、UGT85C2 (CDS 配列: 配列番号 5、アミノ酸配列: 配列番号 6)、UGT74G1 (CDS 配列: 配列番号 7、アミノ酸配列: 配列番号 8)、UGT76G1 (CDS 配列: 配列番号 9、アミノ酸配列: 配列番号 10) 等が挙げられる。

上記の宿主細胞のための適切な培養培地及び条件は当分野で周知である。また、形質転換の対象となる生物も特に限定されるものではなく、上記宿主細胞で例示した各種微生物又は植物又はヒトを除く動物が挙げられる。

宿主細胞の形質転換方法としては一般に用いられる公知の方法が利用できる。

例えば、エレクトロポレーション法 (Mackenzie, D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, p. 4655-4661, 2000)、パーティクルデリバリー法 (特開 2005-287403)、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, p. 1929, 1978)、酢酸リチウム法 (J. Bacteriology, vol. 153, p. 163, 1983)、Methods in yeast genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual などに記載の方法) で実施可能であるが、これらに限定されない。

その他、一般的な分子生物学的な手法に関しては、"Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001"、"Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)"等を参照することができる。

このようにして得られた形質転換体を培養することにより、形質転換体にステビオール配糖体を生産させることが可能である。前述の通り、形質転換体の培養系に基質として一般式 (I) の化合物又は同化合物を含む植物抽出物を添加することにより、ステビオール配糖体の製造を促進することもできる。蓄積されたステビオール配糖体を抽出・精製することにより、目的のステビオール配糖体を得ることができる。

従って、本発明は、本発明の形質転換体を用いることを特徴とするステビオール配糖体の第 2 の製造方法を提供する。適切な培養培地及び条件は当分野で周知である。また、ステビオール配糖体の抽出・精製方法については既に述べた通りである。

ステビオール配糖体は、特に限定されないが、好ましくはステビオールビオシド、ステビオシド、レバウディオシド A、レバウディオシド B、レバウディオシド C、レバウディオシド D、レバウディオシド E、レバウディオシド F 又はこれらの組み合わせからなる群より選択されるものであってもよい。

5

本発明の 1 つの態様において、形質転換体は、植物形質転換体であり得る。本実施形態に係る植物形質転換体は、本発明に係るポリヌクレオチドを含む組換えベクターを、当該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが発現され得るように植物中に導入することによって取得される。

- 10 組換え発現ベクターを用いる場合、植物体の形質転換に用いられる組換え発現ベクターは、当該植物内で本発明に係るポリヌクレオチドを発現させることが可能なベクターであれば特に限定されない。このようなベクターとしては、例えば、植物細胞内でポリヌクレオチドを構成的に発現させるプロモーターを有するベクター又は外的な刺激によって誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターが
- 15 挙げられる。

植物細胞内でポリヌクレオチドを構成的に発現させるプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウィルスの 35S RNA プロモーター、rd29A 遺伝子プロモーター、rbcS プロモーター、mac-1 プロモーター等が挙げられる。

- 20 外的な刺激によって誘導的に活性化されるプロモーターの例としては、mouse mammary tumor virus (MMTV) プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター、メタロチオネインプロモーター及びヒートショックプロテインプロモーター等が挙げられる。

- 25 本発明において形質転換の対象となる植物は、植物体全体、植物器官(例えば葉、花卉、茎、根、種子など)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織など)又は植物培養細胞、あるいは種々の形態の植物細胞(例えば、懸濁培養細胞)、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどのいずれをも意味する。形質転換に用いられる植物としては、特に限定されず、単子葉植物綱又は双子葉植物綱に属する植物のいずれでもよい。

植物への遺伝子の導入には、当業者に公知の形質転換方法（例えば、アグロバクテリウム法、遺伝子銃法、PEG 法、エレクトロポレーション法など）が用いられる。例えば、アグロバクテリウムを介する方法と直接植物細胞に導入する方法が周知である。アグロバクテリウム法を用いる場合は、構築した植物用発現ベクターを
5 適当なアグロバクテリウム（例えば、アグロバクテリウム・チュメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*））に導入し、この株をリーフディスク法（内宮博文著、植物遺伝子操作マニュアル（1990）27～31 頁、講談社サイエンティフィック、東京）などに従って無菌培養葉片に感染させ、形質転換植物を得ることができる。また、Nagel et al の方法（*Micriobiol. Lett.*, 67: 325 (1990)）が用いられ得る。この方法は、
10 まず、例えば発現ベクターをアグロバクテリウムに導入し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムを *Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S.B. et al., Academic Press Publishers) に記載の方法で植物細胞又は植物組織に導入する方法である。ここで、「植物組織」とは、植物細胞の培養によって得られるカルスを含む。アグロ
15 バクテリウム法を用いて形質転換を行う場合には、バイナリーベクター（pBI121 又は pPZP202 など）を使用することができる。

また、遺伝子を直接植物細胞又は植物組織に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法が知られている。パーティクルガンを用いる場合は、植物体、植物器官、植物組織自体をそのまま使用してもよく、切片を調製
20 した後に使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい。このように調製した試料を遺伝子導入装置（例えば PDS-1000 (BIO-RAD 社) など）を用いて処理することができる。処理条件は植物又は試料によって異なるが、通常は 450～2000psi 程度の圧力、4～12cm 程度の距離で行う。

遺伝子が導入された細胞又は植物組織は、まずハイグロマイシン耐性などの薬剤
25 耐性で選択され、次いで定法によって植物体に再生される。形質転換細胞から植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。

植物培養細胞を宿主として用いる場合は、形質転換は、組換えベクターを遺伝子銃、エレクトロポレーション法などで培養細胞に導入する。形質転換の結果得られ

るカルスやシュート、毛状根などは、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能であり、また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモン（オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライドなど）の投与などによって植物体に再生させることができる。

本発明のポリヌクレオチドが植物に導入されたか否かの確認は、PCR 法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法などによって行うことができる。例えば、形質転換植物から DNA を調製し、DNA 特異的プライマーを設計して PCR を行う。PCR は、前記プラスミドを調製するために使用した条件と同様の条件で行うことができる。その後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動などを行い、臭化エチジウム、SYBR Green 液などによって染色し、そして増幅産物を 1 本のバンドとして検出することによって、形質転換されたことを確認することができる。また、予め蛍光色素などによって標識したプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレートなどの固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応などによって増幅産物を確認する方法も採用することができる。

本発明のポリヌクレオチドがゲノム内に組み込まれた形質転換植物体が一旦取得されれば、当該植物体の有性生殖又は無性生殖によって子孫を得ることができる。また、当該植物体又はその子孫、あるいはこれらのクローンから、例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなどを得て、それらを基に当該植物体を量産することができる。従って、本発明には、本発明に係るポリヌクレオチドが発現可能に導入された植物体、若しくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫、又はこれら由来の組織も含まれる。

また、種々の植物に対する形質転換方法が既に報告されている。本発明に係る形質転換体植物としては、ナス科植物（例えば、ナス、トマト、トウガラシ、ジャガイモ、タバコ、チョウセンアサガオ、ホオズキ、ペチュニア、カリブラコア、

ニーレンベルギア等)、マメ科植物(例えば、ダイズ、アズキ、ラッカセイ、インゲンマメ、ソラマメ、ミヤコグサ等)、バラ科植物(例えば、イチゴ、ウメ、サクラ、バラ、ブルーベリー、ブラックベリー、ビルベリー、カシス、ラズベリー、テンチャ等)、ナデシコ科植物(カーネーション、カスミソウ等)、キク科植物(キク、ガーベラ、ヒマワリ、デイジー、ステビア等)、ラン科植物(ラン等)、サクラソウ科植物(シクラメン等)、リンドウ科植物(トルコギキョウ、リンドウ等)、アヤメ科植物(フリージア、アヤメ、グラジオラス等)、ゴマノハグサ科植物(キンギョソウ、トレニア等)ベンケイソウ(カラコエ)、ユリ科植物(ユリ、チューリップ等)、ヒルガオ科植物(アサガオ、モミジヒルガオ、ヨルガオ、サツマイモ、ルコウソウ、エボルブルス等)、アジサイ科植物(アジサイ、ウツギ等)、ウリ科植物(ユウガオ等)、フロウソウ科植物(ペラルゴニウム、ゼラニウム等)、モクセイ科植物(レンギョウ等)、ブドウ科植物(例えば、ブドウ等)、ツバキ科植物(ツバキ、チャノキ等)、イネ科植物(例えば、イネ、オオムギ、コムギ、エンバク、ライムギ、トウモロコシ、アワ、ヒエ、コウリヤン、サトウキビ、タケ、カラスムギ、シコクビエ、モロコシ、マコモ、ハトムギ、牧草等)、クワ科植物(クワ、ホップ、コウゾ、ゴムノキ、アサ等)、アカネ科植物(コーヒーノキ、クチナシ等)、ブナ科植物(ナラ、ブナ、カシワ等)、ゴマ科植物(ゴマ等)、ミカン科植物(例えば、ダイダイ、ユズ、ウンシュウミカン、サンショウ)及びアブラナ科植物(赤キャベツ、ハボタン、ダイコン、シロナズナ、アブラナ、キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー等)、シソ科(サルビア、シソ、ラベンダー、タツナミソウ等)が挙げられる。形質転換対象の植物として特に好ましい例としては、ステビオールをアグリコンとして種々の配糖体を生合成することが知られている植物を使用することが望ましく、このような植物としては、ステビアやテンチャ(*Rubus suauissimus*)等を挙げることができる。

25

本発明のポリヌクレオチドで形質転換された植物体(以下、「本発明の植物」又は「本発明の植物体」)は、適切な基質を有する場合、もしくは、適切な基質を外部から添加した場合、その野生型と比べてステビオール配糖体を多く生産することができる。

本発明の植物は、本発明の植物の種子、挿し木、球根等を育成することにより、容易に完全な植物体を得ることができる。

よって、本発明の植物には、植物体全体、植物器官(例えば葉、花卉、茎、根、種子、球根等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、
5 海綿状組織等)又は植物培養細胞、あるいは種々の形態の植物細胞(例えば、懸濁培養細胞)、プロトプラスト、葉の切片、カルス等が含まれる。

4. 形質転換体の抽出物及びその利用

本発明はまた、別の実施形態において、上記の形質転換体の抽出物を提供する。
10 本発明の形質転換体は、適切な基質を有する場合、もしくは、適切な基質を外部から添加した場合、その野生型と比べてステビオール配糖体の含有量が高いので、その抽出物には、ステビオール配糖体が高濃度で含まれると考えられる。

本発明の形質転換体の抽出物は、形質転換体をガラスビーズ、ホモジェナイザー又はソニケーター等を用いて破碎し、当該破碎物を遠心処理し、その上清を回
15 収することにより、得ることができる。さらに、上記で述べたステビオール配糖体の抽出方法により、さらなる抽出工程を施してもよい。

本発明の形質転換体の抽出物は、常法に従って、例えば、食品、医薬品、工業原料の製造等の用途に使用することができる。

20

本発明はまた、別の実施形態において、本発明の形質転換体の抽出物を含む食品、医薬、工業原料(食品等の原料)を提供する。本発明の形質転換体の抽出物を含む食品、医薬、工業原料の調製は、常法による。このように、本発明の形質転換体の抽出物を含む食品、医薬、工業原料等は、本発明の形質転換体を用いて生
25 成されたステビオール配糖体を含有する。

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

栄養補助食品とは、特定の栄養成分が強化されている食品をいう。健康食品と

は、健康的な又は健康によいとされる食品をいい、栄養補助食品、自然食品、ダイエット食品等を含む。機能性食品とは、体の調節機能を果たす栄養成分を補給するための食品をいい、特定保健用途食品と同義である。幼児用食品とは、約 6 歳までの子供に与えるための食品をいう。老人用食品とは、無処理の食品と比較して消化及び吸収が容易であるように処理された食品をいう。

本発明の食品は、甘味料としてカロリーレスのステビオール配糖体を使用している。このため、本発明の食品は低カロリーであり、健康増進又は健康維持に寄与するというメリットを有する。

これらの食品の形態の例としては、パン、麺類、パスタ、ごはん、菓子類（ケーキ、アイスクリーム、アイスキャンデー、ドーナツ、焼き菓子、キャンデー、チューインガム、グミ、錠菓、並びに団子及びまんじゅう等の和菓子）、豆腐及びその加工品等の農産食品、清酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、みそ等の発酵食品、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージ等の畜産食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺん等の水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶等又は調味料であってもよい。さらなる食品の形態の例としては、低カロリー飲料、ノンシュガー飲料、フルーツ缶詰、乳飲料、粉末飲料、ヨーグルト、ゼリー、ドレッシング、麺つゆ、漬物、佃煮、醤油、味噌、塩辛、バーモント酢、甘酢らっきょ漬け、甘酢生姜、酢レンコン、また、漬物、天ぷら及びカバ焼きのタレ、焼肉のタレ、ソース等、ガム、キャンディー・飴、歯磨きペースト、さつま揚げ、だし巻き、焼きそばソース、冷やし中華のタレ、しめ鯖、氷菓、シャーベット、ソフトクリーム、練り製品、スナック、米菓、コーンカップ、味付け海苔、天カス、ふりかけなどが挙げられる。

本発明の医薬品（組成物）の剤型は、特に限定されず、溶液状、ペースト状、ゲル状、固体状、粉末状等任意の剤型をとることができる。また、本発明の医薬組成物は、オイル、ローション、クリーム、乳液、ゲル、シャンプー、ヘアリンス、ヘアコンディショナー、エナメル、ファンデーション、リップスティック、おしろい、パック、軟膏、パウダー、歯磨、エアロゾル、クレンジングフォーム等の皮膚外用薬の他、浴用剤、養毛剤、皮膚美容液、日焼け防止剤等に用いることが

できる。

本発明の医薬組成物は、必要に応じてさらに、その他の医薬活性成分（例えば、消炎成分）又は補助成分（例えば、潤滑成分、担体成分）を含んでいてもよい。

5 5. ステビオール配糖体含有量の高い植物をスクリーニングする方法

本発明は、ステビオール配糖体含有量の高い植物をスクリーニングする方法を提供する。具体的には、前記方法は、以下の(1)~(3)の工程を含む。

(1) 被検植物から mRNA を抽出する工程

10 (2) 前記 mRNA 又は前記 mRNA から調製した cDNA と、本発明のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとをハイブリダイズさせる工程

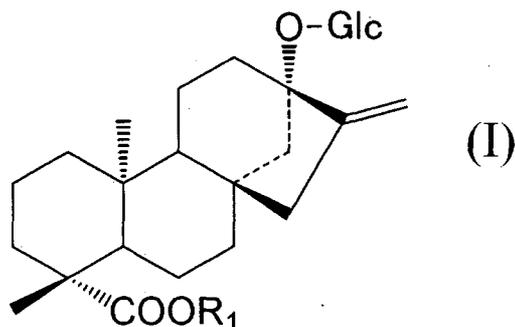
(3) 前記ハイブリダイゼーションを検出する工程

15 上記工程 (1) は、被検植物から、mRNA を抽出することにより行うことができる。mRNA を抽出する被検植物の部位は、特に限定されないが、好ましくは、花弁である。mRNA を抽出した場合には、逆転写することにより、mRNA から cDNA を調製してもよい。

20 工程 (2) は、上記で抽出した mRNA に対し、本発明のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドをプローブ又はプライマーとして、高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせることにより行うことができる。高ストリンジェントな条件は、既に述べたとおりである。ポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドは、好ましくは、5~500 bp、より好ましくは、10~200 bp、さらに好ましくは、10~100 bp の長さである。ポリ
25 リヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドは、各種自動合成装置（例えば、AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)) を用いて容易に合成することが可能であり、あるいは、第三者機関（例えば、Promega 社又は Takara 社）等に委託することもできる。

工程 (2) において本発明のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリ
 ヌクレオチドをプローブとして用いた場合には、工程 (3) は、通常のサザンブロ
 ッティング、ノーザンブロッティング (Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular
 Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press)、
 5 マイクロアレイ (Affymetrix 社 ; 米国特許第 6,045,996 号、同第 5,925,525 号、及び
 同第 5,858,659 号参照)、TaqMan PCR (Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular
 Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press)、
 又は Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) (Sieben V.J. et al., (2007-06). IET
 Nanobiotechnology 1 (3): 27-35) 等のハイブリダイゼーション検出方法により行うこ
 10 とができる。一方、工程 (2) において本発明のポリヌクレオチドと相補的な塩基
 配列からなるポリヌクレオチドをプライマーとして用いた場合には、工程 (3) は、
 PCR 増幅反応を行い、得られた増幅産物を電気泳動又はシーケンシング
 (Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd
 Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press) 等によって解析することにより、
 15 ハイブリダイゼーションを検出することができる。

ハイブリダイゼーションがより多く検出された植物体は、他の植物体と比べて
 下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を
 有するタンパク質をより多く発現しているといえるので、ステピオール配糖体含
 20 有量が高いことが予測される。



実施例

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

5

[実施例1] ステビオールピオシド配糖体化酵素の候補遺伝子の単離

本実施例において用いる分子生物学的手法は、他で詳述しない限り、Molecular Cloning (Sambrook ら, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001) に記載の方法に従った。

10 ステビア葉で見出された配糖体化酵素遺伝子の配列を基に PCR により遺伝子探索を行った。先行文献 (非特許文献 2) ではステビオールモノシドに対する活性が認められなかったと報告されている UGT91D1 (GENBANK Accession No. AY345980) と相同性の高い遺伝子を得るために、下記のプライマーセット (配列番号 3 および 4) でステビア葉から調製し cDNA を鋳型に PCR を行った。

15 ステビア葉 cDNA についてはステビア葉から RNeasy Plant Mini キット (QIAGEN) を用いて総 RNA を抽出し、そのうち 0.5 μ g を Random Oligo-dT プライマーで逆転写 (RT) 反応することによって得た。

CACC-NdeI-SrUGT91D1-Fw (下線部NdeI認識部位) :

20 5'-CACCCATATGTACAACGTTACTTATCATCA-3' (配列番号3)

BamHI-SrUGT91D1-Rv2 (下線部BamHI認識部位) :

5'-GGATCCTTAACTCTCATGATCGATGGCA-3' (配列番号4)

25 PCR 反応液 (50 μ l) は、ステビア葉由来 cDNA 1 μ l、1 \times ExTaq buffer (TaKaRaBio)、0.2mM dNTPs、プライマー各 0.4 μ mol/ μ l、ExTaq polymerase 2.5U からなる組成とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C で 3 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ C で 1 分間、50 $^{\circ}$ C で 1 分間、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の反応を計 30 サイクルの増幅を行った。PCR 産物を 0.8% アガロースゲルによる電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した結果、それぞれの鋳型 DNA
30 から推定された約 1.4kb のサイズに増幅バンドが得られた。

この PCR 産物は pENTR-TOPO Directional ベクター (Invitrogen) に製造業者が推奨する方法でサブクローニングした。DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によって配列を決定した。その結果 UGT91D1 と相同性の高い遺伝子が 4 種類存在することが明らかとなった。これらは既知の UGT91D1 とは相同性が高いもものの配列が異なる新規なステビア UGT 遺伝子であった。このうちの一つである UGT91D-like3 は、UGT91D1 と DNA レベルで 98% (27 塩基異なる)、アミノ酸レベルで 95% (18 残基異なる) の配列同一性を示すステビア新規 UGT 遺伝子であった (CDS 配列: 配列番号 1、アミノ酸配列: 配列番号 2)。

10

[実施例2] 発現ベクターの構築

プライマーに付加した NdeI および BamHI の制限酵素部位 (配列番号 3 および 4 の下線部) を利用して約 1.4kb の UGT91D-like3 の ORF 断片を切り出し、大腸菌発現ベクターである pET15b (Novagen 社) の NdeI および BamHI サイトへ連結し、本酵素遺伝子の大腸菌発現ベクターを得た。本ベクター NdeI サイト上流にある His タグと UGT91D-like3 遺伝子のオープンリーディングフレームが合っており、UGT91D-like3 と His タグの融合したキメラタンパク質が発現するよう設計した。

15

[実施例3] 組み換えタンパク質の発現および精製

本酵素の生化学的な機能を明らかにするために、本酵素を大腸菌において発現させた。上記で得られた UGT91D-like3 大腸菌発現用プラスミドを用い定法に従って大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。得られた形質転換体を、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地 (10 g/l typtone pepton, 5 g/l yeast extract, 1 g/l NaCl) 4 ml にて、37 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した。静止期に達した培養液 4 ml を同組成の培地 80 ml に接種し、37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。菌体濁度 (OD600) がおよそ 0.5 に達した時点で終濃度 0.5 mM の IPTG を添加し、18 $^{\circ}$ C で 20 hr 振盪培養した。

25

以下のすべての操作は 4 $^{\circ}$ C で行った。培養した形質転換体を遠心分離 (5,000 \times g, 10 min) にて集菌し、Buffer S [20 mM HEPESバッファー (pH 7.5), 20 mM imidazol, 14 mM β -メルカプトエタノール] 1 ml/g cell を添加して、懸濁した。続いて、超音

波破碎 (15 sec×8回) を行い、遠心分離 (15,000×g, 15 min) を行った。得られた上清を粗酵素液として回収した。粗酵素液をBuffer Sにて平衡化したHis SpinTrap (GE Healthcare) に負荷し、遠心 (70×g, 30 sec) した。Bufferで洗浄後、100mM および 500 mMのイミダゾールを含むBuffer S 各5mlにて、カラムに結合したタンパク質を段階的に溶出した。各溶出画分をMicrocon YM-30 (Amicon) を用いて20

5

mM HEPESバッファ (pH 7.5)、14 mM β-メルカプトエタノールにバッファ置換した (透析倍率1000倍)。

SDS-PAGE分離後のCBB染色の結果、500 mM イミダゾール溶出画分においてHisTag融合UGT91D-like3キメラタンパク質の推定分子量約50kDa付近にタンパク質を確認したので、この画分を酵素解析に用いた (図3)。

10

[実施例4] UGT91D-like3の酵素活性測定

標準的な酵素反応条件は以下の通りである。反応液 (2mM UDP-グルコース, 0.1 mM 糖受容体基質, 100 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.0), 精製

15

UGT91D-like3酵素溶液25μl) を蒸留水で50μlに調製し、30℃、1時間反応させた。酵素反応液5μlを下記の条件でLC-MS分析を行った。

LC condition

カラム : Waters Sunfire C18 3.5um 2.0 mm I.D.×20 mm

20 移動相 : A: MilliQ Water (+0.05% formic acid), B: MeCN

グラジエント : B濃度15%から55%への直線濃度勾配 (20分間)

流速 : 毎分0.2 ml

カラムオープン : 40℃

25 MS condition

ESI (negative mode)

Selected ion monitoring: m/z 317, 479, 641, 687, 803 and 849

UGT85C2とステビオール (ピークA) と反応させることでステビオールモノシド

(ピークB)を調製し、該ステビオールモノシドとUGT91D-like3とを反応させた結果、新たな生成物(ピークC)が認められた(図4:第1パネル)。このピークは保持時間およびマスフラグメントパターンからステビオールビオシドと判明した。さらに市販のルブソシド(ピークD)と反応させたところ、新たなピークEが得られ、その保持時間およびマスフラグメントからステビオシドであることが分かった(図4:第2パネル)。このピークEは、熱変性(99℃、3分間)により失活したUGT91D-like3を用いた場合、生成しないことから本酵素生成物であることが確認された(図4:第3パネル)。またステビオールから酵素反応で調製したステビオールモノシドには少量のステビオール(ピークA)が含まれているが(図4:第1パネル)、ステビオール(ピークA)とUGT91D-like3を反応させても生成物がみとめられなかったことから(図4:第4パネル)、UGT91D-like3はステビオールモノシド(ピークB)を配糖体化することでステビオールビオシド(ピークC)を生成する活性を有することが確認された。またステビオールビオシドを基質にした場合は新たな生成物は認められなかった(図4:第5パネル)。さらにステビアにはステビオールの13位グルコースの2位にキシロースやラムノースが付加されたステビオール配糖体が知られているが(図1)、UGT91D-like3はUDP-キシロースを糖供与体としなかった。以上の結果から、UGT91D-like3はステビオールの13位に付加されたグルコースの2位を特異的に配糖体化する活性を有する新規配糖体化酵素であることが明らかとなった。

20

[実施例5] ステビオールからレバウディオシドAの合成

ステビアから見出されたUGT91D-like3はステビオールモノシドの13位のグルコースの2位をグリコシル化(2-O-グリコシル化)してステビオールビオシドを生成する活性と、ルブソシドの13位のグルコースの2位をグリコシル化(2-O-グリコシル化)してステビオシドを生成する活性を有していることが明らかとなった。これによりステビオールから4回のグリコシル化反応を経て天然甘味料のレバウディオシドAに至る生合成経路における配糖体化酵素が明らかとなった(図2)。

25

実際にUGT85C2(CDS配列:配列番号5、アミノ酸配列:配列番号6)、UGT91D-like3(CDS配列:配列番号1、アミノ酸配列:配列番号2)、UGT74G1(CDS

配列：配列番号7、アミノ酸配列：配列番号8)、UGT76G1 (CDS 配列：配列番号9、アミノ酸配列：配列番号10) の4種の発現がレバウディオシドAの生合成に必要な十分かどうかを検証するために、これら4つの配糖体化酵素(UGT) 遺伝子を酵母において発現を試みた。

- 5 各UGT遺伝子は下記のプライマーセットによりステビア葉由来cDNAからPCR増幅した。

UGT85C2遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT85C2-Fw (下線部NdeI認識部位) :

- 10 5'-CACCCATATGGATGCAATGGCTACAACCTGAGAA-3' (配列番号11)

BglII-SrUGT85C2-Rv (下線部BglII認識部位) :

5'-AGATCTCTAGTTTCTTGCTAGCACGGTGATTT-3' (配列番号12)

- 15 UGT91D-like3遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT91D1-Fw (下線部NdeI認識部位) :

5'-CACCCATATGTACAACGTTACTTATCATCA-3' (配列番号3)

BamHI-SrUGT91D1-Rv2 (下線部BamHI認識部位) :

- 20 5'-GGATCCTTAACTCTCATGATCGATGGCA-3' (配列番号4)

UGT74G1遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT74G1-Fw (下線部NdeI認識部位) :

5'-CACCCATATGGCGGAACAACAAAAGATCAAGAAAT-3' (配列番号13)

25

BamHI-SrUGT74G1-Rv (下線部BamHI認識部位) :

5'-GGATCCTTAAAGCCTTAATTAGCTCACTTACAAATT-3' (配列番号14)

UGT76G1遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT76G1-Fw (下線部NdeI認識部位) :

5'-CACCCCATATGGAAAATAAAACGGAGACCA-3' (配列番号15)

BamHI-SrUGT76G1-Rv (下線部BamHI認識部位) :

5 5'-GGATCCTTACAACGATGAAATGTAAGAAACTA-3' (配列番号16)

PCR 反応液 (50 μ l) は、ステビア葉由来 cDNA 1 μ l、1 \times KOD plus buffer (TOYOBO)、
0.2mM dNTPs、プライマー各 0.4 μ mol/ μ l、1mM MgSO₄、1U 耐熱性 KOD
plus polymerase からなる組成とした。PCR 反応は、95 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ C
10 で 0.5 分間、50 $^{\circ}$ C で 0.5 分間、68 $^{\circ}$ C で 2 分間の反応を計 30 サイクルの増幅を行った。
各 PCR 産物を 0.8% アガロースゲルによる電気泳動し、エチジウムブロマイド染色
した結果、それぞれの鋳型 DNA から推定された約 1.4kb のサイズに増幅バンドが
得られた。

この PCR 産物は pENTR-TOPO Directional ベクター (Invitrogen) に製造業者が推
15 奨する方法でサブクローニングした。DNA Sequencer model 3100 (Applied
Biosystems) を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォー
キング法によって配列を決定し、目的の UGT 遺伝子、すなわち UGT85C2、
UGT91D-like3、UGT74G1、UGT76G1 の全ての UGT 遺伝子がクローニングできた
ことを確認した。

20

これらの 4 種の UGT 遺伝子を酵母発現ベクターに組み込むために下記のプライ
マーセットを設計した。

SrUGT85C2 セット

25 BglII-UGT85C2-F (下線部 BglII 認識部位) :

5'-ACAGATCTATGGATGCAATGGCTACAACACTGAGA-3' (配列番号 17)

Sal-UGT85C2-R (下線部 Sall 認識部位) :

5'-TAGTCGACTAGTTTCTTGCTAGCACGGTGATTTC-3' (配列番号 18)

SrUGT91D-like3 セット

NotI-UGT91DIL3-F (下線部 NotI 認識部位) :

5'-AAGCGGCCGCATGTACAACGTTACTTATCATCAAATTCAA-3' (配列番号 19)

5 Pac-UGT91D1L3-R (下線部 PacI 認識部位) :

5'-CGTTAATTAACTCTCATGATCGATGGCAACC-3' (配列番号 20)

SrUGT74G1 セット

Not-UGT74G1-F (下線部 NotI 認識部位) :

10 5'-AAGCGGCCGCATGGCGGAACAACAAAAGATCAAG-3' (配列番号 21)

Pac-UGT74G1-R (下線部 PacI 認識部位) :

5'-CGTTAATTAAGCCTTAATTAGCTCACTTACAAATTCG-3' (配列番号 22)

SrUGT76G1 セット

15 Bam-UGT76G1-F(下線部 BamHI 認識部位) :

5'-AAGGATCCATGGAAAATAAAACGGAGACCACCG-3' (配列番号 23)

Sal-UGT76G1-R(下線部 SalI 認識部位) :

5'-GCGTCGACTTACAACGATGAAATGTAAGAACTAGAGACTCTAA-3'
(配列番号 24)

20

UGT85C2 を鋳型として SrUGT85C2 セット、

UGT91D-like 3 を鋳型として SrUGT91D-like3 セット、

UGT74G1 を鋳型として SrUGT74G1 セット、

UGT76G1 を鋳型として SrUGT76G1 セット

25

のプライマーの組み合わせで、耐熱性 KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いて、PCR により増幅し、それぞれの ORF の両端に制限酵素サイトを付加した。得られた DNA 断片を、ゼロ Blunt-TOPO PCR クローニングキット (インビトロジェン) を用いてサブクローニングし、DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォー

キング法によって配列を決定し、目的の UGT 遺伝子がそれぞれクローン化されていることを確認した。

pESC 酵母発現システム（ストラタジーン）を用いて、上記 4 つの UGT 遺伝子を同時に酵母で発現させるために、次の発現ベクターを構築した。

(1) プラスミド pESC-URA-UGT-1 の構築

UGT85C2 を制限酵素 BglII と制限酵素 SalI で切り出し、ベクター pESC-URA（ストラタジーン）を制限酵素 BamHI と制限酵素 SalI で切断したものと連結して、プラスミド pESC-URA-UGT-1 を得た。このプラスミド pESC-URA-UGT-1 を制限酵素 NotI と制限酵素 PacI で切断したものと、UGT91D-like3 を制限酵素 NotI と制限酵素 PacI で切り出したものを連結し、pESC-URA-UGT-12 を得た。

(2) プラスミド pESC-HIS-UGT-34 の構築

UGT76G1 を制限酵素 BamHI と制限酵素 SalI で切り出し、ベクター pESC-HIS（ストラタジーン）を同じ制限酵素で切断したものを連結し、プラスミド pESC-HIS-UGT-4 を得た。このプラスミド pESC-HIS-UGT-4 を制限酵素 NotI と制限酵素 PacI で切断したものと、UGT74G1 を NotI と PacI で切り出したものを連結し、pESC-HIS-UGT34 を得た。

20 酵母の形質転換

Saccharomyces cerevisiae YPH500 株 (ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 α) を宿主として、酢酸リチウム法で、プラスミド pESC-URA-UGT-12 と pESC-HIS-UGT-34 により形質転換した。形質転換株として、SC-Ura&His 寒天培地（1L あたり、Yeast nitrogen base without amino acids 6.7g、グルコース 20g、アミノ酸ミックスパウダー-Ura&His 1.3g、Bacto agar 20g）で生育するものを選抜し、UGT-1234 株 #1、UGT-1234#2 株とした。なお、アミノ酸ミックスパウダー-Ura&His は、アデニン硫酸塩 2.5g、L-アルギニン塩酸塩 1.2g、L-アスパラギン酸 6.0g、L-グルタミン酸 6.0g、L-ロイシン 3.6g、L-リジン 1.8g、L-メチオニン 1.2g、L-フェニルアラニン 3.0g、L-セリン 22.5g、L-スレオニン

12g、L-トリプトファン 2.4g、L-チロシン 1.8g、L-バリン 9.0g を混ぜて調製した。一方、ベクターpESC-URA とベクターpESC-HIS により、上記と同様の方法で形質転換した株をコントロール株とした。

5 配糖体化酵素遺伝子の発現誘導と発現解析

得られた形質転換株 UGT-1234 株#1、UGT-1234#2 株、コントロール株を以下の通り培養した。まず、前培養として SC-Ura&His 液体培地 (SC-Ura&His 寒天培地の Bacto agar を除く) 10 ml に、それぞれの形質転換株を植菌し、30℃で1日間振とう培養した。次に、本培養として前培養液のうち、1 ml を 10 ml の SG-Ura&His 液体培地 (1L あたり、Yeast nitrogen baase without amino acids 6.7g、ガラクトース 20g、アミノ酸ミックスパウダー-Ura&His 1.3g) に植菌し、30℃で1日間振とう培養した。

4 つの UGT 遺伝子の発現が誘導されたかどうかを確認するため、培養液から菌体を集め、RNeasy Mini Kit を用いて、トータル RNA を精製した。

15 トータル RNA 1μg をとり、スーパースクリプト II 逆転写酵素 (インビトロジェン)、ランダムヘキサマーをプライマーとして、cDNA を合成した。

4 つの UGT 遺伝子の発現を確認するために、以下のプライマーを作製した。

UGT85C2 発現確認用

20 UGT85C2-r1 :

5'-CAAGTCCCCAACCAAATTCCGT-3' (配列番号 25)

UGT91D-like3 発現確認用

UGT91D1L3-r1 :

25 5'-CACGAACCCGTCTGGCAACTC-3' (配列番号 26)

UGT74G1 発現確認用

UGT74G1-r1 :

5'-CCCGTGTGATTTCTTCCACTTG TTC-3' (配列番号 27)

UGT76G1 発現確認用

UGT76G1-r1 :

5'-CAAGAACCCATCTGGCAACGG-3' (配列番号 28)

5

GAL10p 領域 (プロモーター領域)

PGAL10-f3 :

5'-GATTATTAAGTCTTTGCGTCCATCCA-3' (配列番号 29)

10 GAL1p 領域 (プロモーター領域)

PGAL1-f3 :

5'-CCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCC-3' (配列番号 30)

各 UGT 遺伝子が発現していることは、以下の配列番号のプライマーの組み合わせで、先に合成した cDNA を鋳型として、ExTaq (タカラバイオ) を用いて PCR を行うことにより確認した。

- 15 UGT85C2 : UGT85C2-r1 (配列番号 25) と PGAL1-f3 (配列番号 30)
 UGT91D-like3 : UGT91D1L3-r1 (配列番号 26) と PGAL10-f3 (配列番号 29)
 UGT74G1 : UGT74G1-r1 (配列番号 27) と PGAL1-f3 (配列番号 30)
 20 UGT76G1 : UGT76G1-r1 (配列番号 28) と PGAL10-f3 (配列番号 29)

UGT-1234 株#1、UGT-1234#2 株ではそれぞれ目的の大きさの PCR 産物が得られたのに対し、コントロール株では PCR 産物が得られなかった。このことから、UGT-1234 株#1、UGT-1234#2 株では、導入した 4 つの UGT 遺伝子がすべて発現し
 25 ていることが確認できた。

ステビオール配糖体の生産

培養は、本培養用の液体培地に培地 1 ml あたり 0.5 μ g のステビオール (ChromaDex Inc.) を添加した以外は、上記の「配糖体化酵素遺伝子の発現誘導と発現解析」と

同様の条件で行った。培養終了後、培養液を遠心分離により、上清と菌体に分離した。菌体は、水で懸濁してガラスビーズで破碎後遠心分離し、上清を回収した。得られた菌体破碎上清と培養上清をそれぞれアセトニトリルで洗浄後、水で平衡化した Sep-Pak C18 カラムに供し、20%アセトニトリルで洗浄後、50%アセトニトリル
5 で溶出し、乾固後、少量のアセトニトリルに溶解して配糖体サンプルを調製した。この配糖体サンプルを以下の分析に供した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) による生成物の確認

TLC 用シリカゲルプレート (メルク) に前記配糖体サンプルを供し、クロロホルム : メタノール : 水 = 65 : 35 : 10 (下層) を展開溶媒として、展開した。展開後、
10 5%硫酸を噴霧し、120℃のプレートで 5-10 分間加熱した。その結果、UGT-1234 株 #1、UGT-1234#2 株の培養上清のサンプルでは、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、ルブソシド、ステビオシド、レバウディオシド A と考えられるスポットを確認することができた。一方、UGT-1234 株#1、UGT-1234#2 株の菌体破
15 碎上清サンプルと、コントロール株の菌体破碎上清サンプル及び培養上清サンプルでは、いずれのステビオールの配糖体と考えられるスポットは確認できなかった。

LC-MS による生成物の確認

次に、下記の分析条件にて前記配糖体サンプルの LC-MS 分析を行った。

20

LC condition

カラム : CAPCELL PAK C18 (5 μ m 2.0 mm I.D.×150 mm)

移動相 : A: MilliQ Water (+0.05% ギ酸), B: アセトニトリル

15% ~67% B/(A+B) for 26 min

25

流速 : 0.2 ml/min

カラム温度: 40 °C

インジェクト量 : 5 μ l

MS condition

分析モード : Selected ion monitoring (negative)

Selected ion monitoring: m/z 849, 803, 687, 641, 479, 317, 965

分析の結果、独立した形質転換酵母 2 系統に特異的にステビオール配糖体が検出
5 された (図 5II : UGT-1234 株#1 : ピーク A は基質として添加したステビオールを
示す)。これらの配糖体は保持時間と MS 値から、ステビオールモノシド (図 5 II :
ピーク B)、ステビオールピオシド (図 5 II : ピーク C)、ルブソシド (図 5 : ピー
ク D)、レバウディオシド B (図 5 II : ピーク E)、ステビオシド (図 5 II : ピーク F)、
レバウディオシド A (図 5 II : ピーク G) であることが明らかとなった。なお、ベ
10 クターのみを導入した株 (ネガティブコントロール) を同分析に供したがこれらの
配糖体はほとんど認められなかった (図 5I)。

このため、配糖体は菌体内で合成された後に培地中へ排出されていると考えら
れる。

以上の結果から、この4種のUGT酵素により酵母でステビオールからレバウディ
15 オシドAを生産できることが示された。

[実施例 6] 組換えタンパク質の活性比較

UGT91D2e タンパク質の発現

本発明の UGT91D-like3 と先行技術文献 (特許文献 3) に記載の UGT91D2e (CDS
20 配列 : 配列番号 31、アミノ酸配列 : 配列番号 32) とで酵素活性の比較評価を行っ
た。

以下に示すように UGT91D2e の大腸菌発現コンストラクトを作製し、実施例 3
および 4 と同様の方法で UGT91D2e と UGT91D-like3 の酵素活性評価を行った。

UGT91D2e のクローン化に際しては、前述の UGT91D-like3 を鋳型とし、配列番
25 号 33 および配列番号 34 の特異的なプライマーを用いた PCR により増幅し、増幅
された UGT91D2e 断片を GeneArt シームレスシステム (Life technology 社) を用
いて製造業者が推奨する方法で pET15b 発現ベクターに組み込みこんだ。組み込ま
れた断片の塩基配列が正しいことをシーケンスにより確認した後に、この発現用
プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) 株 (Life technology 社) を形質転換し、UGT91D2e

を HisTag 融合タンパク質として発現させた。

SrUGT91D1-3-Art-NdeI-FW (下線部 NdeI 認識部位) :

5'-GTGCCGCGCGGCAGCCCATATGGCTACCAGTGACTCCATAG-3' (配列番号 33)

5

SrUGT91D1-3-Art-BamHI-RV (下線部 BamHI 認識部位) :

5'-CTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTAACTCTCATGATCGATGGCAAC-3' (配列番号 34)

10 ウエスタンブロッティングによる発現タンパク質の検出

HisTag 融合 UGT91D2e タンパク質および前述の HisTag 融合 UGT91D-like3 タンパク質は実施例 3 と同様の方法で大腸菌破碎液の上清画分を HisSpinTrap カラムで精製した。500mM イミダゾールで溶出した精製タンパク質画分をアクリルアミドゲル Multi-MiniGel II (10/20) (コスモバイオ社) で電気泳動を行った (30V、60 分間) を行った。泳動ゲルはタンパク質を Immobilon-P メンブレン (Millipore 社) に下記の手順でブロッティングした。

15

泳動ゲルをブロッティングバッファー (Tris 5.82g, Glycine 2.93g, methanol 200ml, 10%(v/v)SDS 1ml を水で 1L にメスアップ) で 20 分間平衡化し、ブロッティング機 Trans-blot SD semi-dry transfer cell (BioRad 社) を用いて予めブロッティングバッファーに浸したメンブレンに 15V で 30 分間かけてブロッティングした。

20

プロット後、TBS-T バッファー (TBS バッファー: 1M Tris-HCl 500ml に NaCl 87.5g を加え、水で 1L にメスアップし溶解させる。そこに 0.1% (v/v) Tween 20 を加えたもの) でメンブレンを軽く洗浄し、1% (w/v) スキムミルクを含む TBS-T バッファーで 1 時間ブロッキングを行い、その後、メンブレンを TBS-T バッファーで軽く洗浄した。

25

Anti-His モノクローナル抗体/mouse (Novagen 社) を TBS-T バッファーで 1000 倍希釈した液をタンパク質がプロットされた面にメンブレン全体に液が行き渡るように広げ、一時間室温でインキュベーションした (一次抗体処理)。その後、メ

ンブレンを軽く TBS-T バッファーで濯いだ後、TBS-T バッファーで 5 分洗浄を 3 回繰り返した。

次に Anti-Mouse IgG 抗体 (Horse Radish Peroxidase-linked) (GE healthcare 社) を TBS-T バッファーで 50000 倍希釈した液を調整し、その中に一抗体処理したメン
5 ブレンを入れて一時間ゆるやかに室温で振とうした (二次抗体処理)。その後、メン
ブレンを軽く TBS-T バッファーで濯いだ後、TBS-T バッファーで 5 分洗浄を 3 回
繰り返した。

検出は Amersham ECL-Prime Western Blotting Detection reagents キット (GE
10 healthcare 社) を用い、メーカーの推奨する手順に沿って実施した。発色液をブ
ロッキング面に処理し、室温で 5 分間インキュベーションし、ChemiDoc XRS+シ
ステム (BioRad 社) を用いて発現タンパク質を検出した (図 6)。pET15 のベクタ
ーコントロールにはバンドが見られないが、UGT91D-like3 では、そのアミノ酸配
列から予測されるとおり、50kDa より少し大きいサイズにバンドが検出された。同
15 様に UGT91D2e については UGT91D-like3 より僅かに小さなサイズにバンドが検出
され、12 アミノ酸短いタンパク質として発現していることが確認された。UGT91D1、
UGT91D-like3 及び UGT91D2e の N 末端部位の部分配列を図 7 に示す。

相対酵素活性の比較

20 大腸菌で発現させた UGT91D-like3 と UGT91D2e の精製タンパク質を用いて酵素
活性を比較した。基質はルブソシドを用い、実施例 4 と同様の酵素反応条件と分析
条件で行った。生成物量のステビオシドを反応に供したタンパク質量で割った相対
酵素活性を算出した結果、UGT91D2e のグルコシル化活性を 100% とすると、
UGT91D-like3 は 167% であり、タンパク質量あたりの相対酵素活性は UGT91D2e
25 よりも UGT91D-like3 の方が 67% 高いことが示された。

UGT91D-like3 タンパク質の全長が 485 アミノ酸残基であることを考慮すると、
わずかに 12 残基 (全体に占める割合: $(12/485) \times 100 = 3.09\%$) の存在によって、活
性が 67% も上昇することは非常に顕著な効果である。

結果

UGT91D1 を含む他の糖転移酵素との配列比較から明らかなように、UGT91D-like3 は完全長のステビオール配糖体の配糖体化酵素と考えられる。加えて、UGT91D-like3 は N 末端の 12 アミノ酸が存在することにより UGT91D2e より
5 67% も高い相対酵素活性を有していることが実験的に証明された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、UGT91D-like3 遺伝子を利用してステビオールモノシド、およびルブソシドの 13 位のグルコースの 2 位を配糖体化することができ、ステビオール
10 配糖体の甘味度および味質を向上させることができる。本発明により、レバウディオシド A までの生合成経路の全容が明らかになり、植物のみならず微生物においてカロリーレスの天然甘味料であるレバイディオシド A やステビオシド、その他類縁化合物を生産させるための分子ツールを与える。

15 配列表フリーテキスト

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 11 : 合成 DNA

配列番号 12 : 合成 DNA

20 配列番号 13 : 合成 DNA

配列番号 14 : 合成 DNA

配列番号 15 : 合成 DNA

配列番号 16 : 合成 DNA

配列番号 17 : 合成 DNA

25 配列番号 18 : 合成 DNA

配列番号 19 : 合成 DNA

配列番号 20 : 合成 DNA

配列番号 21 : 合成 DNA

配列番号 22 : 合成 DNA

- 配列番号 23 : 合成 DNA
- 配列番号 24 : 合成 DNA
- 配列番号 25 : 合成 DNA
- 配列番号 26 : 合成 DNA
- 5 配列番号 27 : 合成 DNA
- 配列番号 28 : 合成 DNA
- 配列番号 29 : 合成 DNA
- 配列番号 30 : 合成 DNA
- 配列番号 33 : 合成 DNA
- 10 配列番号 34 : 合成 DNA

配列表

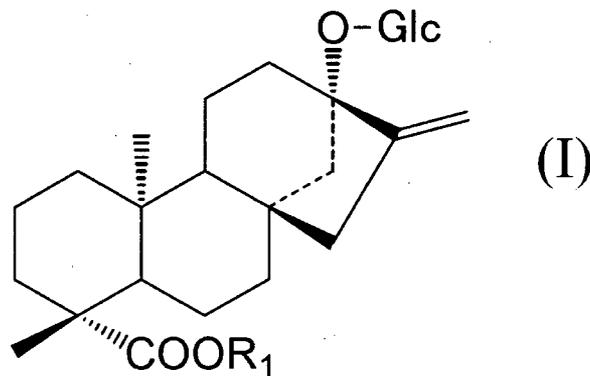
請求の範囲

1. 以下の (a) ~ (c) よりなる群より選ばれるいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質；

5 (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、1~48 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質；

10 (c) 配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質



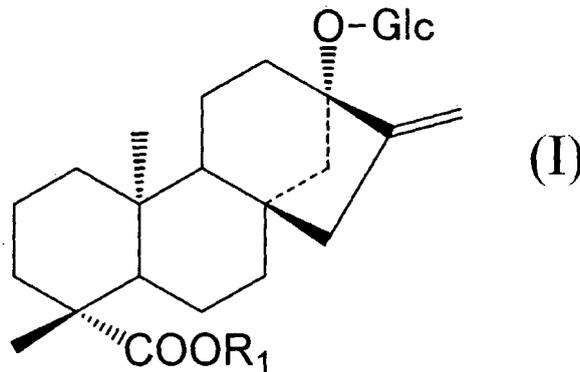
(式中、 R_1 は H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル基、 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルジエニル基、 $C_6 \sim C_{18}$ アリール基、 $C_6 \sim C_{20}$ アルキルアリール基、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルケニル基、($C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル) $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基又は糖残基を表す。)

2. 前記糖分子が、ヘキソースである、請求項 1 に記載のタンパク質。

3. 前記糖分子が、グルコース、マンノース及びガラクトースからなる群より
15 選択されるものである、請求項 1 に記載のタンパク質。

4. 前記 R_1 が、H 又はグルコース単量体若しくはグルコース 2 量体の糖残基である、請求項 1 に記載のタンパク質。

5. 前記化合物が、ステビオールモノシド又はルブソシドである、請求項1に記載のタンパク質。
6. 以下の (a) ~ (e) よりなる群より選ばれるポリヌクレオチド。
- (a) 配列番号1の塩基配列を含有するポリヌクレオチド；
- 5 (b) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号2のアミノ酸配列において、1~48個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記一般式(I)で示される化合物の13位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- 10 (d) 配列番号2のアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ下記一般式(I)で示される化合物の13位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- 15 (e) 配列番号1の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、下記一般式(I)で示される化合物の13位のグルコースに糖分子を付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

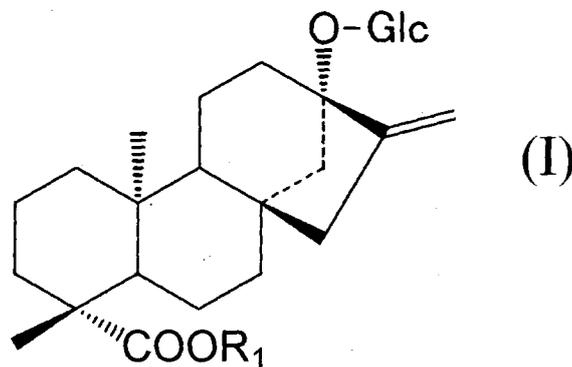


20

(式中、R₁はH、C₁~C₂₀アルキル基、C₂~C₂₀アルケニル基、C₂~C₂₀アルキニル基、C₄~C₂₀アルキルジエニル基、C₆~C₁₈アリール基、C₆

～C₂₀ アルキルアリアル基、C₆～C₂₀ アリアルアルキル基、C₄～C₂₀ シクロアルキル基、C₄～C₂₀ シクロアルケニル基、(C₃～C₁₀ シクロアルキル) C₁～C₁₀ アルキル基又は糖残基を表す。)

7. 前記糖分子が、ヘキソースである、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。
- 5 8. 前記糖分子が、グルコース、マンノース及びガラクトースからなる群より選択されるものである、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。
9. 前記 R₁ が、H 又はグルコース単量体若しくはグルコース 2 量体の糖残基である、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。
10. 前記化合物が、ステビオールモノシド又はルブソシドである、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。
- 10 11. 請求項 6 に記載のポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換体。
12. 前記ポリヌクレオチドが、発現ベクターに挿入されたものである、請求項 11 に記載の形質転換体。
13. 植物体である、請求項 11 に記載の形質転換体。
- 15 14. 請求項 11 に記載の形質転換体の抽出物。
15. 請求項 14 に記載の抽出物を含む食品、医薬品又は工業原料。
16. 請求項 11 に記載の非ヒト形質転換体を培養することを特徴とするタンパク質の製造方法であって、前記タンパク質が下記一般式 (I) で示される化合物の 13 位のグルコースに糖分子を付加する活性を有する、方法。

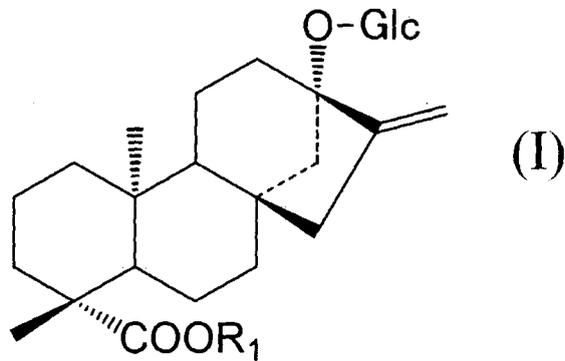


20

(式中、R₁ は H、C₁～C₂₀ アルキル基、C₂～C₂₀ アルケニル基、C₂～C₂₀ アルキニル基、C₄～C₂₀ アルキルジエニル基、C₆～C₁₈ アリアル基、C₆

～C₂₀ アルキルアリアル基、C₆～C₂₀ アリアルアルキル基、C₄～C₂₀ シクロアルキル基、C₄～C₂₀ シクロアルケニル基、(C₃～C₁₀ シクロアルキル) C₁～C₁₀ アルキル基又は糖残基を表す。)

- 17. 請求項 11 に記載の非ヒト形質転換体を用いることを特徴とするステビオール配糖体の製造方法。
- 18. 前記ステビオール配糖体が、ステビオールピオシド、ステビオシド、レバウディオシド A、レバウディオシド B、レバウディオシド C、レバウディオシド D、レバウディオシド E、レバウディオシド F 又はこれらの組み合わせである、請求項 17 に記載の方法。
- 19. 前記非ヒト形質転換体は、UGT85C2 遺伝子、UGT74G1 遺伝子、UGT76G1 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を発現するものであり、製造されるステビオール配糖体がステビオールピオシド、レバウディオシド A、ステビオシド及びレバウディオシド B である、請求項 17 に記載の方法。
- 20. 請求項 1 に記載のタンパク質と、UDP-糖と、下記一般式 (I) で示される化合物とを反応させる工程を含む、ステビオール配糖体の製造方法。



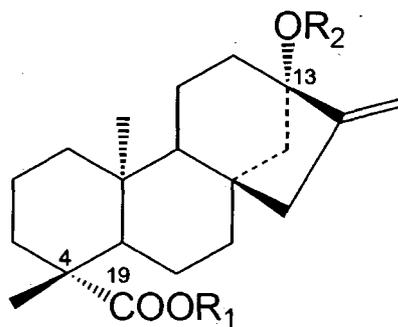
(式中、R₁ は H、C₁～C₂₀ アルキル基、C₂～C₂₀ アルケニル基、C₂～C₂₀ アルキニル基、C₄～C₂₀ アルキルジエニル基、C₆～C₁₈ アリアル基、C₆～C₂₀ アルキルアリアル基、C₆～C₂₀ アリアルアルキル基、C₄～C₂₀ シクロアルキル基、C₄～C₂₀ シクロアルケニル基、(C₃～C₁₀ シクロアルキル

) C₁~C₁₀ アルキル基又は糖残基を表す。)

- 2 1. 前記 UDP-糖における糖が、グルコースである、請求項 20 に記載の方法。
- 2 2. 前記ステビオール配糖体が、ステビオールピオシド、ステビオシド、レバウディオシド A、レバウディオシド B、レバウディオシド C、レバウディオシド D、レバウディオシド E、レバウディオシド F 又はこれらの組み合わせである、請求項 20 に記載の方法。

5

図 1



Name	R ₁	R ₂
Steviol	H	H
Steviolmonoside	H	Glc
Steviolbioside	H	Glc-Glc(β2→1)
Dulcoside A	H	Glc-Rha(β2→1)
Rubusoside	Glc	Glc
Stevioside	Glc	Glc-Glc(β2→1)
Rebaudioside A	Glc	Glc-Glc(β2→1) Glc(β3→1)
Rebaudioside B	H	Glc-Glc(β2→1) Glc(β3→1)
Rebaudioside C (Dulcoside B)	Glc	Glc-Rha(β2→1) Glc(β3→1)
Rebaudioside D	Glc-Glc(β2→1)	Glc-Glc(β2→1) Glc(β3→1)
Rebaudioside E	Glc-Glc(β2→1)	Glc-Glc(β2→1)
Rebaudioside F	Glc	Glc-Xyl(β2→1) Glc(β3→1)

図 2

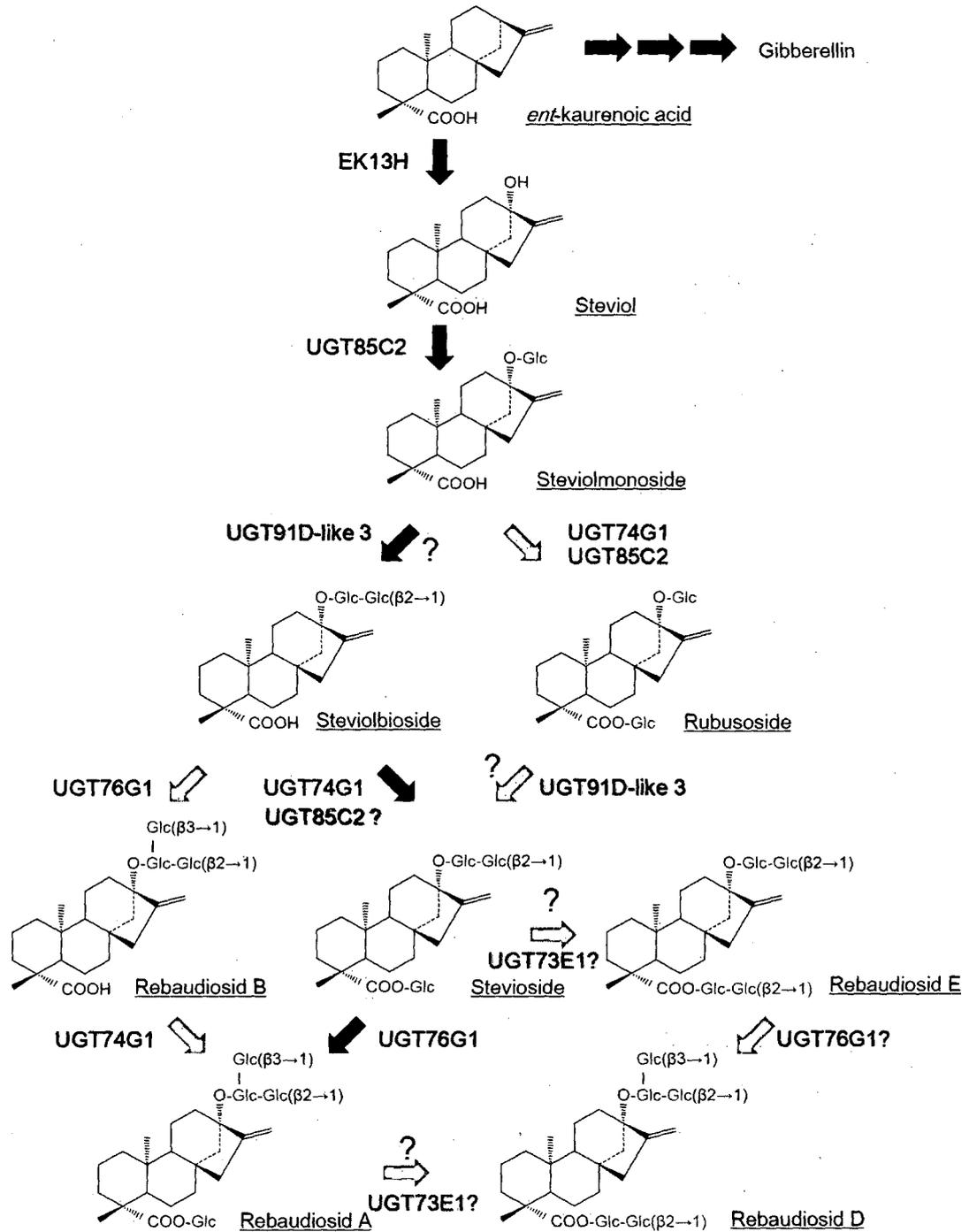


図 3

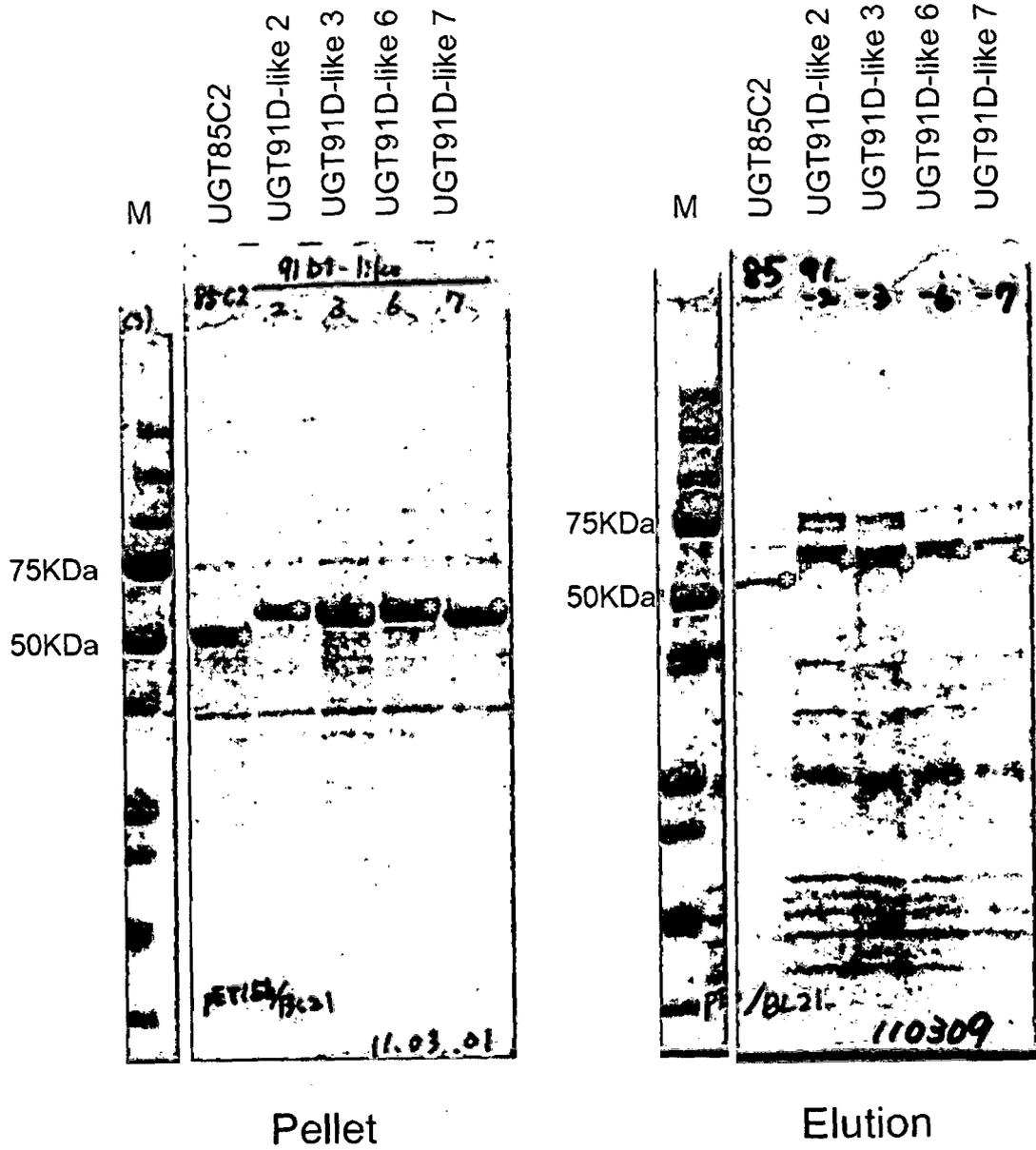
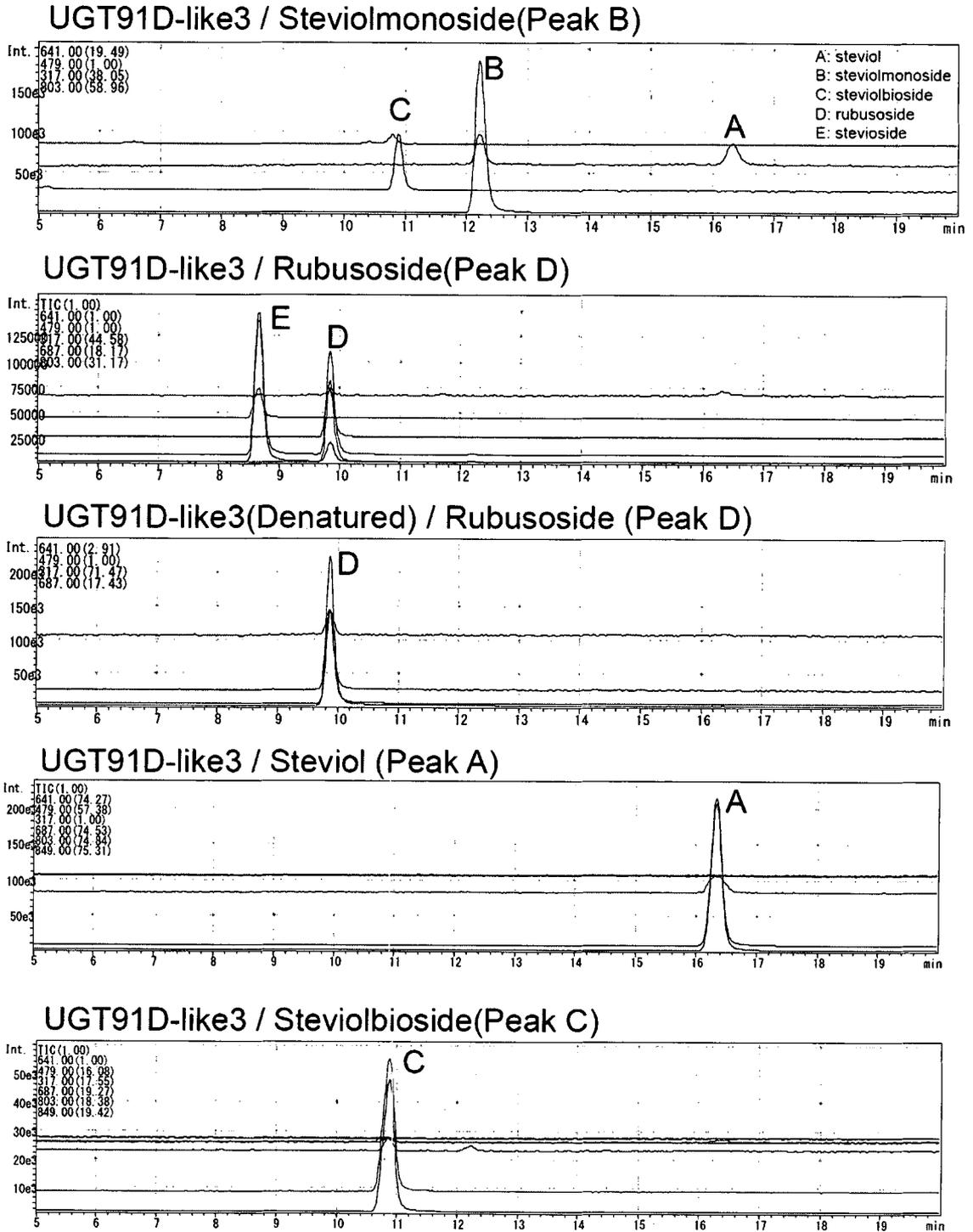
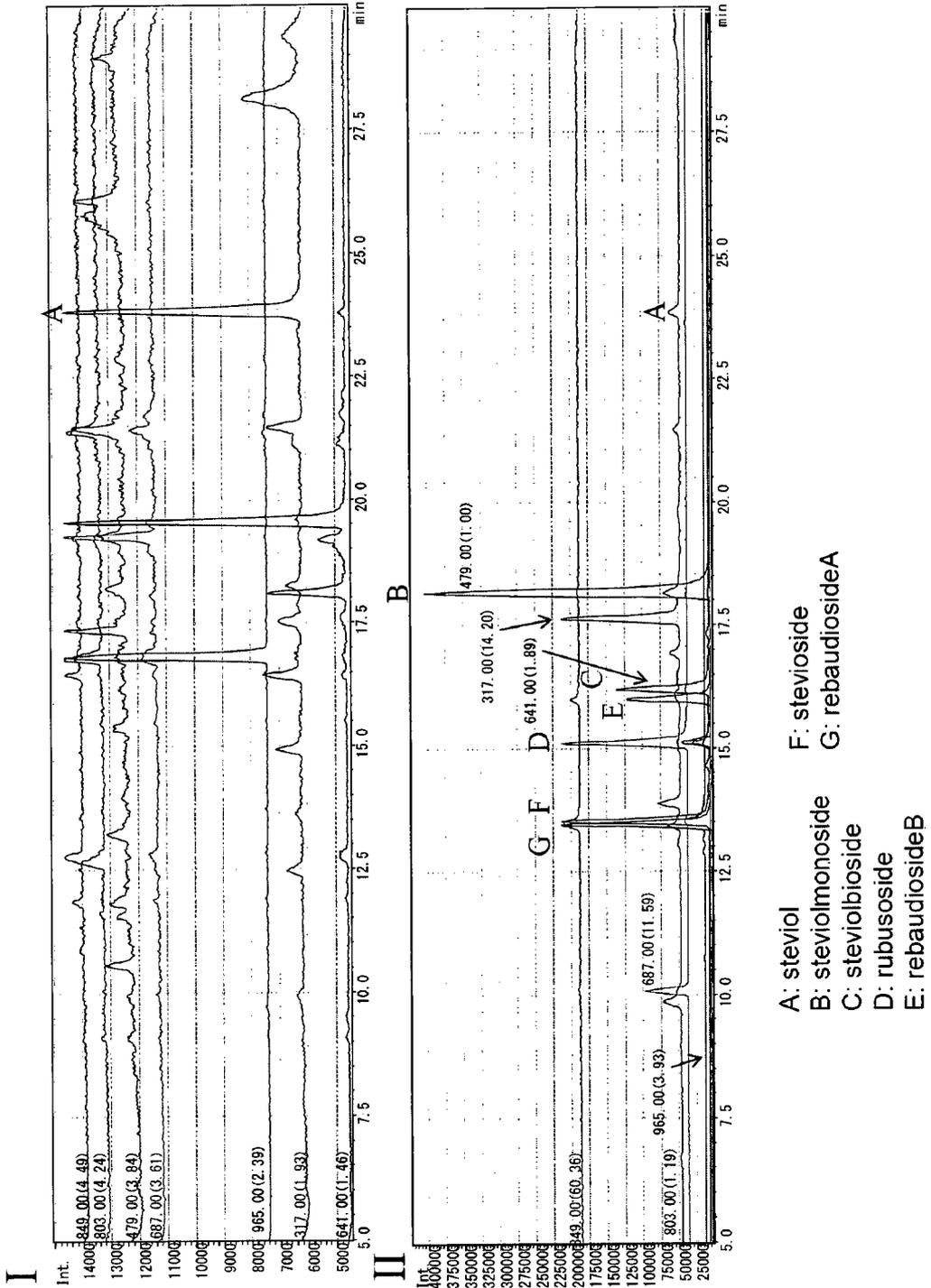


図 4



5



6

pET15b

UGT91D-like3

UGT91D2e

50kDa



7/7

Sr_UGT91D1
Sr_UGT91D-like3
Sr_UGT91D2e

*
MYNVTYHQNSKAMATSDSIVDDRRKQLHVATFPW
MYNVTYHQNSKAMATSDSIVDDRRKQLHVATFPW
MATSIVDDRRKQLHVATFPW

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, C07H15/256(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A01H5/00, A23L1/30, A61K8/60, C07H15/256, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12P19/44

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/153378 A1 (ABUNDA NUTRITION, INC.), 08 December 2011 (08.12.2011), (Family: none)	1-22
A	HUMPHREY TV et al., Spatial organisation of four enzymes from Stevia rebaudiana that are involved in steviol glycoside synthesis, Plant Mol. Biol., 2006, Vol.61, No.1-2, pp.47-62	1-22
A	RICHMAN A et al., Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of Stevia rebaudiana, Plant. J., 2005, Vol.41, No.1, pp.56-67	1-22

 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
15 April, 2013 (15.04.13)Date of mailing of the international search report
23 April, 2013 (23.04.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058189

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5-255372 A (Suntory Ltd.), 05 October 1993 (05.10.1993), (Family: none)	1-22
A	EP 1897951 B1 (Vineland Research and Innovation Centre), 15 December 2010 (15.12.2010), & US 2008/0064063 A1	1-22
A	BRANDLE JE et al., Steviol glycoside biosynthesis, <i>Phytochemistry</i> , 2007, Vol.68, No.14, pp.1855-1863	1-22
A	Ryoji KASAI et al., "Stevia-ha no Kanmi Diterpene Haitotai - Rebaudioside -A, -D, -E Oyobi Kanren Haitotai no Gosei Narabini Kanmi to Kagaku Kozo tonu Sokan -", <i>Journal of the Chemical Society of Japan</i> , 1981, no.5, pages 726 to 735	1-22
P,A	WO 2013/022989 A2 (EVLVASA), 14 February 2013 (14.02.2013), (Family: none)	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058189

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12P19/44(2006.01) i

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, C07H15/256(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i, C12P19/44(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A01H5/00, A23L1/30, A61K8/60, C07H15/256, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12P19/44

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2011/153378 A1 (ABUNDA NUTRITION, INC.) 2011.12.08, (ファミリーなし)	1-22
A	HUMPHREY TV et al., Spatial organisation of four enzymes from Stevia rebaudiana that are involved in steviol glycoside synthesis, Plant Mol. Biol., 2006, Vol.61, No.1-2, pp.47-62	1-22

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

15.04.2013

国際調査報告の発送日

23.04.2013

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

西村 亜希子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N 3 4 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	RICHMAN A et al., Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of <i>Stevia rebaudiana</i> , <i>Plant. J.</i> , 2005, Vol.41, No.1, pp.56-67	1-22
A	JP 5-255372 A (サントリー株式会社) 1993.10.05, (ファミリーなし)	1-22
A	EP 1897951 B1 (Vineland Research and Innovation Centre) 2010.12.15, & US 2008/0064063 A1	1-22
A	BRANDLE JE et al., Steviol glycoside biosynthesis, <i>Phytochemistry</i> , 2007, Vol.68, No.14, pp.1855-1863	1-22
A	笠井良次ほか, ステビア葉の甘味ジテルペン配糖体ーレバウディオシドーA, ーD, ーEおよび関連配糖体の合成ならびに甘味と化学構造との相関ー, <i>日本化学会誌</i> , 1981, No.5, pp.726-735	1-22
P, A	WO 2013/022989 A2 (EVOLVASA) 2013.02.14, (ファミリーなし)	1-22