

(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

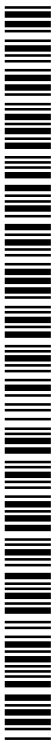


(43) 国際公開日
2010年12月23日(23.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/147196 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060328
- (22) 国際出願日: 2010年6月18日(18.06.2010)
- (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 2009-146754 2009年6月19日(19.06.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): キリンホールディングス株式会社(KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 矢崎一史(YAZAKI Kazufumi) [JP/JP]; 〒6110011 京都府宇治市五ヶ庄 国立大学法人京都大学 生存圏研究所内 Kyoto (JP). 梅基直行(UMEMOTO Naoyuki) [JP/JP]; 〒3291414 栃木県さくら市早乙女字申塚3377番地 キリンホールディングス株式会社 フロンティア技術研究所内 Tochigi (JP). 百瀬眞幸(MOMOSE Masaki) [JP/JP]; 〒3291414 栃木県さくら市早乙女字申塚3377番地 キリンホールディングス株式会社 フロンティア技術研究所内 Tochigi (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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 2010/147196 A1

(54) Title: PROTEIN HAVING NOVEL PRENYLATION ENZYME ACTIVITY AND GENE ENCODING SAME

(54) 発明の名称: 新規のプレニル化酵素活性を有するタンパク質とそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: Disclosed is DNA for a prenylation enzyme derived from hop (*Humulus*). Specifically disclosed are: a protein having a hop (*Humulus*)-derived prenylation enzyme activity; and method for producing or testing on a novel organism using a gene encoding the protein.

(57) 要約: ホップ (*Humulus*) のプレニル化酵素の DNA の提供。ホップのプレニル化酵素活性を有するタンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子を用いて新規の生物を作成・検定する方法。

明 細 書

発明の名称：

新規のプレニル化酵素活性を有するタンパク質とそれをコードする遺伝子

技術分野

[0001] 本発明は、ホップにおける特徴的なプレニル化化合物を生産する製造方法、プレニル化酵素、当該酵素をコードするDNA、および当該DNAを用いた新たなホップの育種、選抜方法に関する。

背景技術

[0002] プレニル化とは疎水性のプレニル基を化合物に付加する反応をいう。プレニル基は植物二次代謝産物の構造や生理活性の多様性に大きく貢献しており、プレニル化された芳香族化合物は天然有機化合物の大きなリソースとなっている。これらの化合物は、生合成的には複合経路と呼ばれる経路で生合成され、耐虫性や耐病性などにより植物の生命維持に多大な役割を果たしている。また、プレニル化芳香族化合物は、薬用植物において生理活性本体としてその薬理作用に寄与しているものもある（非特許文献1）。例えば、プレニルフラボノイドは、抗腫瘍活性や抗菌作用のような様々な生理活性をもつことが報告されており（非特許文献2）、医薬及び食品産業にとっても非常に重要な化合物群として認識されている。これらの化合物は、植物にとっては食害、感染防御において重要な役割を果たしている。

[0003] プレニル基がプレニル化フラボノイドなどプレニル化芳香族化合物の生理活性にとって重要であることが報告されており、生理活性を有するプレニル化芳香族化合物に対して、プレニル基を持たない母核化合物が生理活性を有しない例も多数存在する。芳香族化合物のプレニル化を触媒する酵素は、芳香族化合物の生理活性を増強し得るという点で、産業的に非常に重要である。しかし、芳香族を基質とするプレニル化酵素の多くは膜結合性であり、解析が容易でなかった。特に、フラボノイドを基質とする植物プレニル化酵素においては、その遺伝子のクローニングは近年になり薬用植物クララから世

界で始めて報告がされたに過ぎない（特許文献1）。

[0004] ホップ（Humulus）においてプレニル化合物は特に重要である。ビールの重要原料であるホップは、ビールにおいて苦味を与える。それらは様々な苦味酸の複合物からなり、そのさまざまな構成によってビールの香味をもたらすことが良く知られている（非特許文献3）。そのなかで代表的なホップの成分としては α 酸（フムロン）や β 酸（ルプロン）が上げられるが、これらは特殊なプレニル化合物である。一方、プレニルフラボノイドは非常に興味深い生理活性作用を示すことが知られている（非特許文献4）。例えば、キサントフモールは、広範囲の抗癌作用を示す。8-プレニルナリンゲニン是最も強力な女性ホルモン作用を示す。これらの物質はホップの毬花のルプリン腺で生成されるが、そのプレニル化の酵素活性については苦味酸でのみ可溶性画分にあるとの報告があるのみで（非特許文献5）、プレニルフラボノイドについては全く無い。さらには遺伝子について言及されている研究も無い。

[0005] 近年、低分子プレニル合成酵素（ゲラニル（ゲラニル）二燐酸合成酵素）がホモダイマーの活性ではゲラニルゲラニル活性を示すが、ヘテロダイマーになるとゲラニル二燐酸合成酵素になることが示されている。ゲラニルゲラニル化とゲラニル化については様々な修飾因子の関与によって活性比率が変わることがわかる可能性が示されている。しかし、その活性の本質はプレニル合成酵素本体である（非特許文献6）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2008-220304号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Mesia-Velaら、Phytomedicine, 8 (2001), p. 481-488

非特許文献2：Sohnら、Phytomedicine, 11 (2004), p. 666-672

非特許文献3：Pollock（編集）Brewing Science (Food Science & Technological Monograph) Academic Press (1979)

非特許文献4 : StevensとPage、 Phytochemistry. (2004) 65:1317-30.

非特許文献5 : Zuurbierら、 Phytochemistry. (1998) 49: 2315-2322.

非特許文献6 : Thollら、 Plant Cell (2004) 16: 977-992

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、ホップの新規プレニル化酵素活性を有するタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子の提供、ならびに該タンパク質をコードする遺伝子を用いて新規の生物を作成・検定する方法の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、それまで予想されていた可溶性画分にあるとされた苦味酸の酵素とは異なる、ホップで今だに明らかになっていないプレニル化酵素遺伝子を同定した。さらに本遺伝子を発現させることで新規のプレニル化化合物の生産が可能になり、同遺伝子のゲノム配列を各種のホップで比較することにより多型を解析することが可能となり新規に育種されたホップ植物を決定することが可能になることを示し、本発明を完成させるに至った。

- [0010] 即ち、本発明は以下の発明を包含する。

- [0011] [1] 以下の(a)または(b)のタンパク質：

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；および

(b) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質。

- [0012] [2] 以下の(c)～(f)のいずれかのDNAからなる遺伝子：

(c) 配列番号3に示す塩基配列からなるDNA；

(d) 配列番号3に示す塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(e) 配列番号3に示す塩基配列と80%以上の配列同一性を有する塩基配列

からなり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；
および

(f) 配列番号 3 に示す塩基配列の縮重異性体からなるDNA。

[0013] [3] 以下の (g) 又は (h) のタンパク質：

(g) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；および

(h) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が
欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プレニル
化酵素活性を有するタンパク質。

[0014] [4] 以下の (i) ~ (l) のいずれかのDNAからなる遺伝子：

(i) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるDNA；

(j) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDN
Aとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プレニル化酵素活
性を有するタンパク質をコードするDNA；

(k) 配列番号 4 に示す塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列から
なり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；およ
び

(l) 配列番号 4 に示す塩基配列の縮重異性体からなるDNA。

[0015] [5] [2] または [4] の遺伝子を含有する組換えベクター。

[0016] [6] [5] の組換えベクターを導入した形質転換体。

[0017] [7] 植物体である [6] の形質転換体。

[0018] [8] (i) ゲノムDNAまたはRNAである核酸を植物から単離する工程、

(ii) (i) の核酸がRNAである場合に逆転写しcDNAを合成する工程、

(iii) (i) または (ii) の工程で得られたDNAから配列番号 3、配列番号 4 また
は配列番号 11 に示す塩基配列を含有する遺伝子断片を増幅する工程、なら
びに

(iv) DNA中に突然変異および／または多型の存在を決定する工程、
とを含む、植物におけるプレニル化酵素をコードする遺伝子の突然変異およ
び／または多型の存在を検出する方法。

- [0019] [9] 植物がホップ属植物である[8]の方法。
- [0020] [10] [8]または[9]の方法によってプレニル化酵素をコードする遺伝子の突然変異および／または多型を検出し、突然変異および／または多型を有する植物体を選抜する方法。
- [0021] [11] [9]の方法により選抜された、プレニル化酵素をコードする遺伝子に突然変異および／または多型を有する植物体。
- [0022] [12] ホップ属植物である[11]の植物体。
- [0023] [13] プレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能またはコードするプレニル化酵素の活性が、既存品種に比較して改変されている植物を選抜する、[8]または[9]の植物体を選抜する方法。
- [0024] [14] [13]の方法によって選抜された、プレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能が既存品種に比較して改変されているか、またはプレニル化酵素の活性が既存品種に比較して改変されている植物体。
- [0025] [15] ホップ属植物である[14]の植物体。
- [0026] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2009-146765号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

- [0027] 本発明によれば、ホップ由来の新規プレニル化酵素活性を有するタンパク質とそれをコードする遺伝子の活性発現の調整を行うことができ、即ち当該遺伝子の活性が調整された植物を作成する方法、が提供される。本発明によりプレニル化化合物の含有に特徴があるホップの育種が可能になる。本発明の酵素により、様々な有用な生理活性を示すプレニル芳香族化合物を大量かつ安価に生産できる。

図面の簡単な説明

- [0028] [図1A]Database: NCBI/blast/db/FASTA/2008_09_05_09_00_0/nr 6,937,173 sequences; 2,395,280,820 total lettersを用いたHIPT1の部分配列(1211塩基)とソラニシル二リン酸を基質とするプラストキノン合成酵素遺伝子の相同性についてBLASTXを用いて検索した結果(抜粋)を示す図である。下線で示

す部分が相同性を示しているが、限定的かつ部分的な相同性であることがわかる。

[図1B] 図 1 A の続きである。

[図2A] Database: NCBI/blast/db/FASTA/2008_09_05_09_00_0/nr 6,937,173 sequences; 2,395,280,820 total letters を用いた HIPT2 の部分配列 (693塩基) とソラニシル二リン酸を基質とする プラストキノン合成酵素遺伝子の相同性について BLASTX を用いて検索した結果 (抜粋) を示す図である。下線で示す部分が相同性を示しているが、限定的かつ部分的な相同性であることがわかる。

[図2B] 図 2 A の続きである。

[図3] HIPT1 と HIPT2 の分子進化系統樹解析の結果を示す図である。

[図4] HIPT1 と HIPT2 の遺伝子発現による ゲラニルナリンゲニンの産生を示す図である。少なくとも a, b, c の 3 つの生成物が得られていることがわかる。そのうち c は図 5 により 6-ゲラニルナリンゲニンと同定された。

[図5] 6-ゲラニルナリンゲニンの同定の結果を示す図である。

[図6] HIPT1 の遺伝子発現による ゲラニルイソリキリチゲニンの産生を示す図である。

[図7] HIPT1 の遺伝子発現による ゲラニルサクラネチン、ゲラニルタキシフォーリン、ゲラニルゲニス테인の産生を示す図である。

[図8] キサンタンゲノールの同定の結果を示す図である。

[図9] 「キリン 2 号」と「とよみどり」の葉での HIPT1 と HIPT2 の発現解析の結果を示す図である。いずれも「キリン 2 号」より「とよみどり」での発現が高いことがわかる。

[図10A] 「キリン 2 号」のゲノム配列を示す図である。

[図10B] 「キリン 2 号」のゲノム配列を示す図である (図 10A の続き)。

発明を実施するための形態

[0029] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0030] 1. 新規のプレニル化酵素

本発明のタンパク質は、芳香族化合物とプレニル基を結合する活性を幅広く持つプレニル化酵素である。本発明の酵素は、ホップ(Humulus lupulus)等のホップ属(カラハナソウ属)植物由来のプレニル化酵素(プレニルトランスフェラーゼ)である。ホップ属植物には、ホップ(Humulus lupulus)、カラハナソウ(Humulus lupulus var. cordifolius)、カナムグラ(Humulus japonicus)等が含まれる。また、本発明の酵素は、膜結合型のプレニル化酵素である。

[0031] 本発明のプレニル化酵素の基質となる好ましい芳香族化合物としては、フラボノイド、イソフラボノイド、クマリン、カルコン、フロログルシノール等が挙げられ、フラボノイドとして、ナリンゲニン、ヘスペレチン、ガランギン、クリシン、イソサクラネチン、イソリキリチゲニン、サクラネチン、タキシフォリン、ゲニステインまたは2', 4', 4-トリヒドロキシ-6'-メトキシカルコン、などが挙げられる。フロログルシノールとして、PIV P (phlorisovalerophenone)、PIBP (phlorisobutyrophenone)、PMBP (phloromethylbutanophenone)などが挙げられる。本発明のプレニル化酵素は炭素数5のイソプレン単位で構成されるプレニル基を芳香族化合物に結合する。プレニル基としては、ジメチルアリル基(炭素数5)、ゲラニル基(炭素数10)、ファルネシル基(炭素数15)、ゲラニルゲラニル基(炭素数20個)等が挙げられる。プレニル基を供与する基質であるプレニル基ドナーとしてジメチルアリルジホスフェート(DMAPP)、ゲラニル二燐酸(GPP)、ファルネシル二燐酸(FPP)、ゲラニルゲラニル二燐酸(GGPP)、フィチル二燐酸(PDP)などが挙げられる。これらのプレニル基ドナーからプレニル化酵素の触媒により上記芳香族化合物にプレニル基が転移される。

[0032] 本発明の酵素の全長アミノ酸配列は、配列番号1または2に示される。さらに、本発明のタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列または配列番号2に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、プレニル化酵素活性を有するタンパク質を包含する。ここで、実質的に同一のアミノ酸配列としては、当該アミノ酸配列に対して1または複数もしくは数

個(1~10個、好ましくは1~7個、さらに好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、さらに好ましくは1個もしくは2個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール)) 等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の配列同一性を有しているアミノ酸配列が挙げられる。

[0033] 本発明のプレニル化酵素は、植物体から単離された天然のプレニル化酵素および遺伝子工学の手法により製造されたりコンビナントのプレニル化酵素を含む。

[0034] 2. プレニル化酵素をコードする遺伝子

本発明の遺伝子は、芳香族化合物とプレニル基を結合する活性を持つプレニル化酵素をコードする遺伝子であり、上記のプレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である。

[0035] 本発明の遺伝子のDNAの塩基配列は、配列番号3または4に示される。さらに、配列番号3または4に示される塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA、配列番号3または4に示される塩基配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール)) 等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の配列同一性を有しているDNA、または前記DNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1または複数もしくは数個(1~10個、好ましくは1~7個、さらに好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、さらに好ましくは1個もしくは2個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入お

よび／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAであって、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを包含する。ここで、「ストリンジントな条件」とは、例えば、「1XSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5XSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2XSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。さらに、本発明の遺伝子は、配列番号3または4に示す塩基配列の縮重異性体からなるDNAを包含する。

[0036] 3. 組換えベクター

本発明のベクターは、上記配列番号3または配列番号4のDNAが挿入された組換えベクターである。ベクターとしては公知の酵母用、植物細胞用、昆虫細胞用等のものを広く使用できる。公知の酵母用ベクターとしてはpDR196、pYES-DEST 52、Yip5、Yrp17、Yep24などが挙げられ、公知の植物細胞用ベクターとしては、pGWB vector、pBiEl2-GUS、pIG121-Hm、pBI121、pBiHyg-HSE、pB119、pBI101、pGV3850、pABH-Hm1などが挙げられ、公知の昆虫細胞用ベクターとしては、pBM030、pBM034、pBK283などが挙げられる。本発明において使用されるベクターには、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー等の遺伝子の発現や抑制に関する構成要素が組み込まれ、必要に応じて、選択マーカー（例えば、薬物耐性遺伝子、抗生物質耐性遺伝子、レポーター遺伝子）を含有する。遺伝子の発現や抑制に関する構成要素は、その性質に応じて、それぞれが機能し得る形で組換えベクターに組み込まれることが好ましい。そのような操作は、当業者であれば適切に行うことができる。

[0037] 4. 形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを保持する形質転換体である。形質転換体は、酵素をコードする遺伝子を挿入した組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。宿主は、ベクターに適したものを使用すればよい。例えば、酵母、植物細胞、昆虫細胞（Sf9など）、植物ウイルスなどが挙げられる。好ましくは、酵母、植物細胞または植物ウイルスなどが挙げられる。組換えベクターの

導入方法は、微生物にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69 : 2110(1972)]、エレクトロポレーション法、トリペアレンタルメイティング(tri-parental mating) 法等が挙げられる。また、形質転換植物体を作製する方法として、ウイルス、アグロバクテリウムのTiプラスミド、Riプラスミド等をベクターとして用いる方法が挙げられる。宿主植物としては、イネ、ムギ、トウモロコシ等の単子葉植物、ダイズ、ナタネ、トマト、バレイショ等の双子葉植物が挙げられる。形質転換植物体は、本発明の遺伝子で形質転換した植物細胞を再生させることにより得ることができる。植物細胞からの植物体の再生は公知の方法により行うことができる。

[0038] 5. プレニル化酵素の製造方法

本発明のプレニル化酵素は、通常の植物体から回収することができ、また、上記形質転換体から回収することができる。具体的には、例えば、Yazaki et al (JBC, 2002, 277, 6240-6246)に記載の方法を用いて行うことができる。

[0039] さらに、本発明のプレニル化酵素は、例えば、本発明の遺伝子で形質転換した酵母等の微生物発現系を用いた大量生産により製造することができ、また、上記の形質転換植物体中で本発明の遺伝子を発現させることにより得ることができる。

[0040] 形質転換体の培養は公知の培地を用いて公知の方法で行えばよい。

[0041] 6. 形質転換体を用いたプレニル化芳香族化合物の生産

本発明の膜結合プレニル化酵素は、酵母等の微生物において高い活性を持ったタンパク質として発現できるため、形質転換酵母の培養液に前記プレニル化酵素の基質を添加することにより、プレニル化芳香族化合物を生産することができる。例えば、形質転換酵母の培養液にナリンゲニン等のフラボノイドを基質として投与することにより、プレニル化フラボノイドを効率的に大量に生産することが可能である。ナリンゲニンは適度な水溶性と疎水性を

持つため、生体膜を通過し酵母細胞内に入り、酵母細胞内のプレニル化酵素と接触する。酵母はサイトゾルにDMAPPを生合成する経路（メバロン酸経路）を有しているため、プレニル基ドナーであるプレニル基質はインビボで供給される。生産されたプレニル化フラボノイドは、酵母培養物から得ることができる。ここで、酵母培養物とは、酵母細胞および培地を指す。

[0042] また、本発明の膜結合プレニル化酵素を本発明の遺伝子で形質転換した植物細胞や植物体で発現させることにより、プレニル化フラボノイド等のプレニル化芳香族化合物を植物で生産することができる。植物細胞の場合、DMAPPを生合成する経路は、サイトゾルのメバロン酸経路とプラスチド内に局在する非メバロン酸経路の2つある。前者の経路のDMAPPをプレニル基ドナーとして利用してプレニル化芳香族化合物を生産するためには、プラスチド局在化シグナルを除いた改変遺伝子を用いればよい。また、後者の経路のDMAPPをプレニル基ドナーとして利用してプレニル化芳香族化合物を生産するためには、内在性のプラスチド局在化シグナルを使うか、またはRuBisCo小サブユニットなどの他の遺伝子のプラスチド局在化シグナルを連結してプレニル化酵素をプラスチドに局在させればよい。フラボノイド基質等のフラボノイド芳香族化合物は、内在性の芳香族化合物がプレニル化されるため、植物を育成させて植物の組織からプレニル化芳香族化合物を回収することができる。または、ナリンゲニンのようなフラボノイドを植物に吸収させてプレニル化させ、プレニル化されたフラボノイドを植物組織から回収することもできる。この場合、植物の土壌等にフラボノイドを添加し、根から吸収させればよい。また、組織特異的なプロモータを利用することで、植物の任意の組織でプレニル化フラボノイドを生産することができる。

[0043] 上記のように、本発明のプレニル化酵素およびプレニル化酵素をコードする遺伝子を用いてフラボノイド等の種々の芳香族化合物をプレニル化し、プレニル化フラボノイド等のプレニル化芳香族化合物を生産することができる。プレニル化フラボノイドは、抗腫瘍活性、抗菌活性、抗ウイルス活性、抗酸化活性、女性ホルモン様活性、免疫増強活性、抗炎症活性等の種々の活性

を有しており、本発明のプレニル化酵素を利用して、これらの生理的活性が
増強された化合物を製造することができる。また、本発明のホップ由来のプ
レニル化酵素はフムロンやルプロンの苦味酸の合成にも関与している。フム
ロンやルプロンはPIVP (phlorisovalerophenone)、PIBP (phlorisobutyroph
enone)、PMBP (phlormethylbutanophenone) をプレニル化して得られる。本
発明のプレニル化酵素は、単量体として用いてもよいし、二量体として用い
てもよい。

[0044] 7. 本発明のプレニル化酵素の活性測定法および基質特異性の解析法

本発明のプレニル化酵素の活性測定は、例えば、以下の方法で行うことが
できる。

[0045] 340 μ gから730 μ gの本発明の酵素、1 mMのフラボノイド等の基質芳香族化
合物、1 mM プレニル基ドナー、20 mM $MgCl_2$ を100 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.
5) 200 μ lになるように調製し、30°Cで一晩反応させる。反応後、酢酸エチル
で産生物を抽出し、乾固させMeOHで溶解する。これを質量分析計やクロマト
グラフィーで分析すればよい。

[0046] また、この際種々の基質芳香族化合物を用いて、それぞれの芳香族化合物
がプレニル化されたかどうかを調べることにより基質特異性を解析すること
ができる。

[0047] 8. 遺伝子変異、多型個体、遺伝子発現変異の選抜

本発明は、植物におけるプレニル化酵素遺伝子突然変異、一塩基多型 (SNP
)等の多型、遺伝子発現変異の存在を検出するための方法を提供する。変異個
体は放射線によるもの、化学処理によるもの、UV照射によるもの、自然突然
変異によるものであっても構わない。

[0048] この方法には、ゲノムDNAやRNAを変異個体や様々な品種や育成個体の植物
から単離し、後者は逆転写しcDNAを合成する工程と、DNA増幅技術の使用によ
りDNAからプレニル化酵素遺伝子を含有する遺伝子断片を増幅する工程と、こ
のDNA中に突然変異の存在を決定する工程が含まれる。DNAやRNAを抽出する方
法には市販のキット (例えばDNeasyやRNeasy (キアゲン社) など) が使用でき

る。cDNAを合成する方法も市販キット（例えばスーパースクリプト ファーストストランド システム（インビトロジェン社）など）を使うことができる。DNA増幅技術の使用により遺伝子断片を増幅する方法としては、いわゆるPCR法やLAMP法などの技術を用いることができる。これらは継続的なポリメラーゼ反応により特異的なDNA配列の増幅（つまり、コピー数を増やすこと）を達成するためにポリメラーゼを使用することを基にした、一群の技術を意味する。この反応は、クローニングの代わりに使用することができるが、必要であるのは、核酸配列に関する情報のみである。DNAの増幅を行うために、増幅しようとするDNAの配列に相補的なプライマーを設計する。次にそのプライマーを自動DNA合成により作成する。DNA増幅方法は、当技術分野で周知であり、本明細書中で与えられる教示及び指示に基づき、当業者であれば容易に行うことができる。いくつかのPCR法（ならびに関連技術）は、例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、同第4,800,159号、同第4,965,188号、およびInnisら編、PCR Protocols:A guide to method and applicationsで述べられている。

[0049] DNA中に突然変異や多型の存在を決定する工程では塩基配列の決定（アプライドバイオシステムズ社ジェネティックアナライザ）やミスマッチペアの片側を切断する酵素を用いて突然変異体を検出するTILLING法（Till et al., 2003, Genome Res 13:524-530）など変異遺伝子と正常遺伝子の相同性を利用し検出する方法を用いればよい。これらは該技術から得られた配列データを遺伝子部分に関する配列番号3、配列番号4または配列番号11で定義される塩基配列と比較することで行うことができる。

[0050] mRNA量の違いによる変異を決定する工程では上記cDNAに対し、配列番号3または配列番号4で定義される塩基配列に基づいて作製したプライマーを利用してリアルタイムPCR法（ロシュ・ダイアグノスティックス社ライトサイクラーなど）等の定量的PCRを採用すればよい。その後、例えば、品種「キリン2号」から得られたcDNAの量と比較することでmRNA量の違いによる変異を決定することができる。

- [0051] 特に好ましい実施形態において、上記で定義したプレニル化酵素遺伝子の変異の存在の決定方法を、ホップ (*Humulus lupulus*) 等のホップ属 (カラハナソウ属) 植物から得られた材料に適用する。
- [0052] 上記の突然変異および/または多型を決定する方法により、プレニル化酵素をコードする遺伝子の突然変異や多型を塩基レベルで同定することができ、さらにプレニル化酵素をコードする遺伝子に突然変異を有する植物体を選抜し、得ることができる。本発明はこのようにして得られたプレニル化酵素をコードする遺伝子に突然変異や多型を有する植物体を包含する。
- [0053] また、突然変異や多型の決定やmRNA量の違いの決定により、プレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能またはプレニル化酵素の活性が改変された植物を選抜することが可能になる。ここで、ある植物の活性の改変は、その植物の種に含まれる既存品種に対する改変をいい、既存品種には野生型も含まれる。既存の品種は、プレニル化酵素をコードする遺伝子が改変された植物が得られたときに存在するすべての品種をいい、交配、遺伝子操作等の人為的操作により作出された品種、自然状態で出現した野生型とは酵素活性において区別できる個体群を含む。また、活性の改変において、すべての既存品種に対して、活性が変化している必要はなく、特定の既存品種に対して改変されていれば、「プレニル化酵素の活性が改変された植物」に含まれる。「プレニル化酵素の活性が改変された植物」は、人為的操作を受けず自然状態で突然変異により活性が改変された植物も含み、本発明の方法により、自然状態で活性が変化した植物を選抜することができ、新たな品種として確立することもできる。また、ある既存品種に変異誘発処理を行い、プレニル化酵素の活性が改変された植物を作出した場合、比較対象は変異誘発処理を行った既存品種でもよいし、それ以外の他の既存品種でもよい。例えば、植物がホップ (*Humulus lupulus*) の場合、既存品種として、「キリン2号」、「とよみどり」等がある。ここで、プレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能またはプレニル化酵素の活性が既存品種に対して改変された植物とは、既存品種に対してプレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能が増強した植物お

よび低下した植物を含み、さらに、プレニル化酵素の活性が既存品種に対して上昇した植物および低下した植物を含む。本発明は、このようなプレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能またはプレニル化酵素の活性が既存品種に対して改変された植物体も包含する。

[0054] これらの植物体は、例えば芳香族化合物をプレニル化する能力が増強されており、これらの植物や植物から得たプレニル化酵素を利用することにより、より効率的にプレニル化芳香族化合物を得ることができる。

実施例

[0055] 以下、本発明を、実施例を示してより詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0056] (実施例 1) ホップの遺伝子発現ライブラリーの構築と塩基配列の決定

ホップ (*Humulus lupulus*) の品種「キリン 2 号」の穂花からルプリンを多く含む部分を切除し液体窒素を用いて破碎した。CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 法 (Changら、1993. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116) を用いて全 RNA を抽出した。得られた全 RNA 620 μ g をタカラバイオ株式会社に提供し cDNA ライブラリーの作成、12,288 の EST 解析およびクラスタリング解析を委託し、Oligotex-dT Super mRNA Purification Kit (タカラバイオ) を使用して poly(A)+RNA を単離し、逆転写酵素で cDNA を作成した。cDNA プラスミドライブラリーは酵母発現用ベクター pDR196 を用いて構築した。cDNA の第 1 鎖を、XhoI 制限部位を含む oligo(dT) 18 アンカープライマーを使用して合成した。cDNA の第 2 鎖を合成した後、EcoRI 制限サイトを含む平滑末端アダプターを二本鎖 DNA へ結合させ、次いで当該フラグメントを、構成的プロモータ PMA1 を有するプラスミド、pDR196 中に組み込んだ。Escherichia coli DH10B1 に構築したライブラリーについて、プラスミドを抽出し 12,288 の 5' 端の塩基配列を決定した。クラスタリング解析の結果、1597 のクラスター遺伝子配列を含んでいることがわかった。

[0057] (実施例 2) 候補 cDNA クローンの抽出

上記クラスター遺伝子をアミノ酸配列データベース (Database: NCBI/blas

t/db/FASTA/2008_09_05_09_00_0/nr 6, 937, 173 sequences; 2, 395, 280, 820 total letters) に対して塩基配列相同性検索BLASTX 2.2.10 (Altschulら、Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))を用いて解析を行ったところ、プラストキノン合成酵素遺伝子 (Genbank accretion ABB701280) に対し2つのクラスター遺伝子 (HIPT1およびHIPT2) が相同性を示すことがわかった。HIPT1とプラストキノン合成酵素遺伝子の相同性についてのデータを図1Aおよび図1Bに、HIPT2とプラストキノン合成酵素遺伝子の相同性についてのデータを図2Aおよび図2Bに示す。図1Bは図1Aの続き、図2Bは図2Aの続きである。図1AおよびBならびに図2AおよびB中、下線で示す部分が相同性を示した部分である。相同性を有していたものの、相同性については部分的かつ限定的であり、活性を予測することはできなかった。驚くべきことに、以下の実施例で明らかのようにHIPT1とHIPT2はプラストキノン合成酵素遺伝子の活性とはかけ離れた活性を示すことが明らかになった。また以前取得されたホモゲンチジン酸プレニル基転移酵素遺伝子 (トコトリエノールやトコフェロール) や薬用植物クララから世界で始めて報告がされた遺伝子 (特開2008-220304号公報) を含むフラボノイドへのプレニル基転移酵素遺伝子とも分子進化系統樹 (ClustalXプログラム: (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>) (Human Genome Sequencing Center, Houston, TX) とTree View (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> を利用) を作成した。HIPT1とHIPT2はいずれもプラストキノン合成酵素遺伝子よりも類縁関係が遠いことがわかった (図3)。

[0058] (実施例3) 候補cDNAがコードする酵素の活性評価

2つのクラスター遺伝子 (HIPT1とHIPT2) の全長を含むクローン (pDR196-HIPT1とpDR196-HIPT2) を、酢酸リチウム法を用いて酵母株W303-1A- Δ coq2に導入した。SD-Ura液体培地 (180ml) 中で対数増殖期に達するまで培養することによって、酵母形質転換体中で組換えタンパク質発現させ、そこからYazakiら (JBC, 2002, 277, 6240-6246) に記載の方法を用いてマイクロソーム画分を調製した。全反応液を200 μ lにマイクロソーム画分の340 μ gから730 μ gの

タンパク質、1 mM flavonoid、1 mMプレニル基ドナー、20 mM MgCl₂、100 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)になるように調製し、30°Cで一晩反応した。反応後、酢酸エチルで抽出し、乾固させメタノール(MeOH)で溶解した。これをShimadzu LCMS-2010A及びLCMS-IT-TOF(島津製作所)、TSK-GEL ODS-80Ts 2.0 mm x 25 cm (TOSOH)、溶媒システム(0.3% 蟻酸:アセトニトリル=3:7)、流速 0.2 ml min⁻¹で解析を行った。基質としてナリングニン、プレニル基ドナーのゲラニル二燐酸を加えたところ、6位にプレニルが入ったものと8位や3'位にプレニルが入ったと予想されるものが検出された(図4)。これらの化合物が植物由来の遺伝子を用いて異種発現系を使って作製されたことはいままでにない。6-ゲラニルナリングニン(図4のピークc、東京大学葛山智久准教授より供与)については標準品と比較し、同じ保持時間、同じフラグメントが確認できた(図5)。こうして、新規のプレニル化酵素であるcDNA(HIPT1全長1,224 bp, ORF 308 a.a.、HIPT2全長1,233 bp, ORF 411 a.a.)が得られた。HIPT1およびHIPT2のコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1および2に示す。また、HIPT1およびHIPT2の塩基配列を、それぞれ配列番号3および4に示す。図3の結果から明らかのようにHIPT1とHIPT2の活性は同じように複数の産物を生成しており、かつHIPT1の活性が高かったことから以後の解析はHIPT1を主に解析を行ったが、同じように解析することは可能である。

[0059] (実施例4) 酵母発現系を用いた組換えHIPT1の基質特異性の解析

今まで知られているクララの遺伝子(特開2008-220304号公報)もダイズの遺伝子(明石ら、Plant Physiology 149:683-693 (2009))も極めて基質が限られている特異性の高い酵素をコードすることがわかっている。組換えHIPT1の酵素化学的性質をLCMS-IT-TOFを用い解析を行った。プレニル基ドナーには同じゲラニル二燐酸を用い、様々なフラボノイド関連化合物(イソリキリチゲニン、サクラネチン、タキシフォリン、ゲニステイン)のプレニル化を行った。驚くべきことに、いずれの基質に対してもプレニル基を転移する活性が認められた(図6および7)。特にイソリキリチゲニンに転移してできる

キサントゲノール（東京大学葛山智久准教授）については、標準品と比較したところ、同じ保持時間、および同じフラグメントを有することが確認できた（図8）。

[0060] （実施例5）HIPT1とHIPT2のゲノム塩基配列と他品種との比較

ホップは体内のいたるところに樹脂性成分を含んでいる。この樹脂性成分はPCR等の分子生物学的な解析をする際に共雑物となり各種反応を阻害することがわかった。そのためDNAをNucleon PhytoPure法（GEヘルスケア バイオサイエンス）で「キリン2号」と「とよみどり」からそれぞれ抽出した。配列番号4の塩基配列に基づいて2種のプライマー（ATGGAGCTCTCTTCAGTTTCTAGC（配列番号5）：U866, TCCTTTTGCTGTGTATGGTCTT（配列番号6）：U855）を作製しPCR法を用いてホップ・ゲノム遺伝子断片約1.2kbを増幅した。増幅された断片について直接、塩基配列を決めることと、部分的に大腸菌にTOPOTA クローニングキット（インビトロジェン）でクローニングすることで部分のゲノム塩基配列を決定した。「キリン2号」のcDNAの282番目のGと283番目のGの間（「とよみどり」では276番目のGと277番目のGの間）にイントロンが存在することがわかった。さらに両品種でゲノム塩基配列を比較したところ、イントロンの16番目が「キリン2号」ではTであるのに対し「とよみどり」ではAであることが判明した。この一塩基多型を検出する方法を使うことで容易にホップの品種が識別できるほか、育種過程の追跡、プレニル化合物と組成との相関を解析することで、品種評価、QTLなどの遺伝子解析が可能になり、遺伝子マーカーを作成することができる。

[0061] このようにイントロンにはより多くの多型の存在が予想され、塩基配列の差異を検出しやすい部分であると考えられる。配列番号3に対応する「キリン2号」のゲノム配列を配列番号11に示す。配列番号11から「キリン2号」ではHIPT1は6つのイントロンを有することが明らかとなった。この塩基配列情報をもとに遺伝子の任意の場所にゲノムDNAを増幅するプライマーを設計することが可能である。

[0062] （実施例6）ホップ品種および系統での遺伝子発現解析

ホップ品種「キリン2号」と「とよみどり」の葉からCTABを用いて全RNAを抽出した。cDNAはSuperScript IIIファーストストランド合成システム（インビトロジェン）で合成した。配列番号3および4の塩基配列に基づいてプライマー（HIPT1に対してはGCCCATTCATTTGTAGCAG（配列番号7）：U862とGCCCAATCACAAGATAACAA（配列番号8）：U849、HIPT2に対してはTGTATGTTGGGAGTATGTAAGACC（配列番号9）：U864とGCTGTAATGGGATTCTTCTTCC（配列番号10）：U851）を作製しRT-PCRを行った。「キリン2号」より「とよみどり」はプレニル化化合物を多く含むことが知られている品種である（2001-2002年日本産のフムロン類の総量である平均 α 酸含量は「キリン2号」で5.9%に対し「とよみどり」で11.9%）。図9に示すように「とよみどり」では「キリン2号」よりHIPT1とHIPT2の両遺伝子の発現が高いことがわかった。このように穂花でなくとも葉でも検定が可能であり、プレニル化化合物と組成との相関を解析することで、品種評価、QTLなどの遺伝子解析が可能になり、遺伝子発現マーカーを作成することができる。

産業上の利用可能性

- [0063] 本発明の新規プレニル化酵素及びその遺伝子を用いる生物作成・検定方法は、植物等の生物を用いた、プレニル化化合物の生産の開発、ホップ品種の選抜に有用である。

配列表フリーテキスト

- [0064] 配列番号5～10 プライマー

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1]

以下の(a)または(b)のタンパク質：

- (a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；および
- (b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質。

[請求項2]

以下の(c)～(f)のいずれかのDNAからなる遺伝子：

- (c) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるDNA；
- (d) 配列番号 3 に示す塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；
- (e) 配列番号 3 に示す塩基配列と80%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；および
- (f) 配列番号 3 に示す塩基配列の縮重異性体からなるDNA。

[請求項3]

以下の(g)又は(h)のタンパク質：

- (g) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質；および
- (h) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質。

[請求項4]

以下の(i)～(l)のいずれかのDNAからなる遺伝子：

- (i) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるDNA；
- (j) 配列番号 4 に示す塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；
- (k) 配列番号 4 に示す塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ、プレニル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA；および

- (l) 配列番号 4 に示す塩基配列の縮重異性体からなるDNA。
- [請求項5] 請求項 2 または 4 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。
- [請求項6] 請求項 5 に記載の組換えベクターを導入した形質転換体。
- [請求項7] 植物体である請求項 6 記載の形質転換体。
- [請求項8] (i) ゲノムDNAまたはRNAである核酸を植物から単離する工程、
(ii) (i)の核酸がRNAである場合に逆転写しcDNAを合成する工程、
(iii) (i)または(ii)の工程で得られたDNAから配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 1 1 に示す塩基配列を含む遺伝子断片を増幅する工程、ならびに
(iv) DNA中に突然変異および/または多型の存在を決定する工程、
とを含む、植物におけるプレニル化酵素をコードする遺伝子の突然変異および/または多型の存在を検出する方法。
- [請求項9] 植物がホップ属植物である請求項 8 に記載の方法。
- [請求項10] 請求項 8 または 9 に記載の方法によってプレニル化酵素をコードする遺伝子の突然変異および/または多型を検出し、突然変異および/または多型を有する植物体を選抜する方法。
- [請求項11] 請求項 9 に記載の方法により選抜された、プレニル化酵素をコードする遺伝子に突然変異および/または多型を有する植物体。
- [請求項12] ホップ属植物である請求項 1 1 記載の植物体。
- [請求項13] プレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能またはコードするプレニル化酵素の活性が、既存品種に比較して改変されている植物を選抜する、請求項 8 または 9 に記載の植物体を選抜する方法。
- [請求項14] 請求項 1 3 に記載の方法によって選抜された、プレニル化酵素をコードする遺伝子の発現能が既存品種に比較して改変されているか、またはプレニル化酵素の活性が既存品種に比較して改変されている植物体。
- [請求項15] ホップ属植物である請求項 1 4 記載の植物体。

[1A]

BLASTX 2.2.10 [Oct-19-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query= HIPT1 partial sequence
(1211 letters)

Database: NCBI/blast/db/FASTA/2008_09_05_09_00_0/nr
6,937,173 sequences; 2,395,280,820 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
emb CA023462.1 unnamed protein product [Vitis vini...	286	2e-75
ref NP_001078138.1 ATHST; prenyltransferase [Arabi...	286	2e-75
dbj BAC83059.1 putative tocopherol polyprenyltransf...	276	3e-72
ref NP_001060083.1 Os07g0576000 [Oryza sativa (jap...	265	4e-69
gb ABB70128.1 homogentisate phytyltransferase VTE2-...	261	1e-67
dbj BAB03104.1 unnamed protein product [Arabidopsis...	245	6e-63
ref XP_001764199.1 predicted protein [Physcomitrel...	238	7e-61
ref XP_001418412.1 predicted protein [Ostreococcus...	220	2e-55
emb CAL01105.1 homogentisate prenyltransferase [Ch...	215	5e-54
ref XP_001695341.1 homogentisate solanesyltransfer...	214	9e-54

[1B]

>ref|NP_001078138.1| ATHST: prenyltransferase [Arabidopsis thaliana]
 _____ Length = 386

Score = 286 bits (732), Expect = 2e-75
 Identities = 140/311 (45%), Positives = 202/311 (64%)
 Frame = +2

Query: 173 SEFPSTIVTKGSNFGHALWKFVRPIPFVAVSI ICTSLFGAELLKNPNLFSWQLMFDAFQG 352
 _____ +E ++ + + F +A W+F+RP ++ T+L L++N +L W L+ A G
 Sbjct: 77 AESDDPVLDRIFQACWRFLRPHITRGALGSTALVTRALIENTHLIKWSLVLKALSG 136

Query: 353 LVVILLYHIYINGLNQIYDLESDRINKPDLPLAAEEMSVKSAWFLIFSAVASLLLMIKL 532
 _____ L+ ++ + YI G+NQIYD+ D++NKP LP+AA ++SV+SAW L IF A+A LL+ +
 Sbjct: 137 LLALICGNGYIVGINQIYDIGIDKVNKPYLPIAAGDLSVQSAWLLVIFFAIAGLLV-VGF 195

Query: 533 KCGPFLTCMYCCYLVIGAMYSVPPFRWKHTHTFTSTLWNFSEIGIGINFLINYASRATLGL 712
 _____ GPF+T +Y L +G +YSVPP R K + L + G +NF + +A+RA LGL
 Sbjct: 196 NFGPFI TSLYSLGLFLGTIYSVPPLRMKRFPVA AFLI IATVRGFLLNFGVYHATRAALGL 255

Query: 713 PFQWRPPFTFIIGFVSTLSIILSILKDVPDVEGDKKVGMSTLPVIFGARTIVLVGSGFFL 892
 _____ PFQW P FI FV+ +++++I KD+PDVEGD+K +STL G R I +GSG L
 Sbjct: 256 PFQWSAPVAFITSFVTLFALVIAITKDLPDVEGDRKFQISTLATKLGVRNIAFLGSGLLL 315

Query: 893 LNYVAAIGVAIMWPQAFKGYIMIPAHAFASALIFKTWLLDKANYAKEASDSYHFLWFL 1072
 _____ +NYV+AI +A PQ F+G +MIPAH I AS LIF+TW+L+KANY KEA YY F+W L
 Sbjct: 316 VNYVSAISLAFYMPQVFRGSLMIPAHVILASGLIFQTWVLEKANYTKEAISGYRFIWNL 375

Query: 1073 MIAEYILYPFI 1105
 _____ AEY+L+PF+
 Sbjct: 376 FYAEYLLFPFL 386

[2A]

BLASTX 2.2.10 [Oct-19-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query= HIPT2 partial sequence
(693 letters)

Database: NCBI/blast/db/FASTA/2008_09_05_09_00_0/nr
6,937,173 sequences; 2,395,280,820 total letters

Searching..... done

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
emb CA023462.1 unnamed protein product [Vitis vini...	92	2e-17
ref NP_001078138.1 ATHST; prenyltransferase [Arabi...	89	3e-16
gb ABB70128.1 homogentisate phytyltransferase VTE2-...	88	6e-16
ref XP_001418412.1 predicted protein [Ostreococcus...	88	6e-16
dbj BAC83059.1 putative tocopherol polyprenyltransf...	86	2e-15
gb EAZ40403.1 hypothetical protein OsJ_023886 [Ory...	86	2e-15
gb EAZ04446.1 hypothetical protein OsI_025678 [Ory...	86	2e-15
dbj BAB03104.1 unnamed protein product [Arabidopsis...	85	4e-15
emb CAL53411.1 putative tocopherol polyprenyltrans...	84	9e-15
emb CAL01105.1 homogentisate prenyltransferase [Ch...	83	2e-14

[2B]

>ref|NP_001078138.1| ATHST; prenyltransferase [Arabidopsis thaliana]
Length = 386

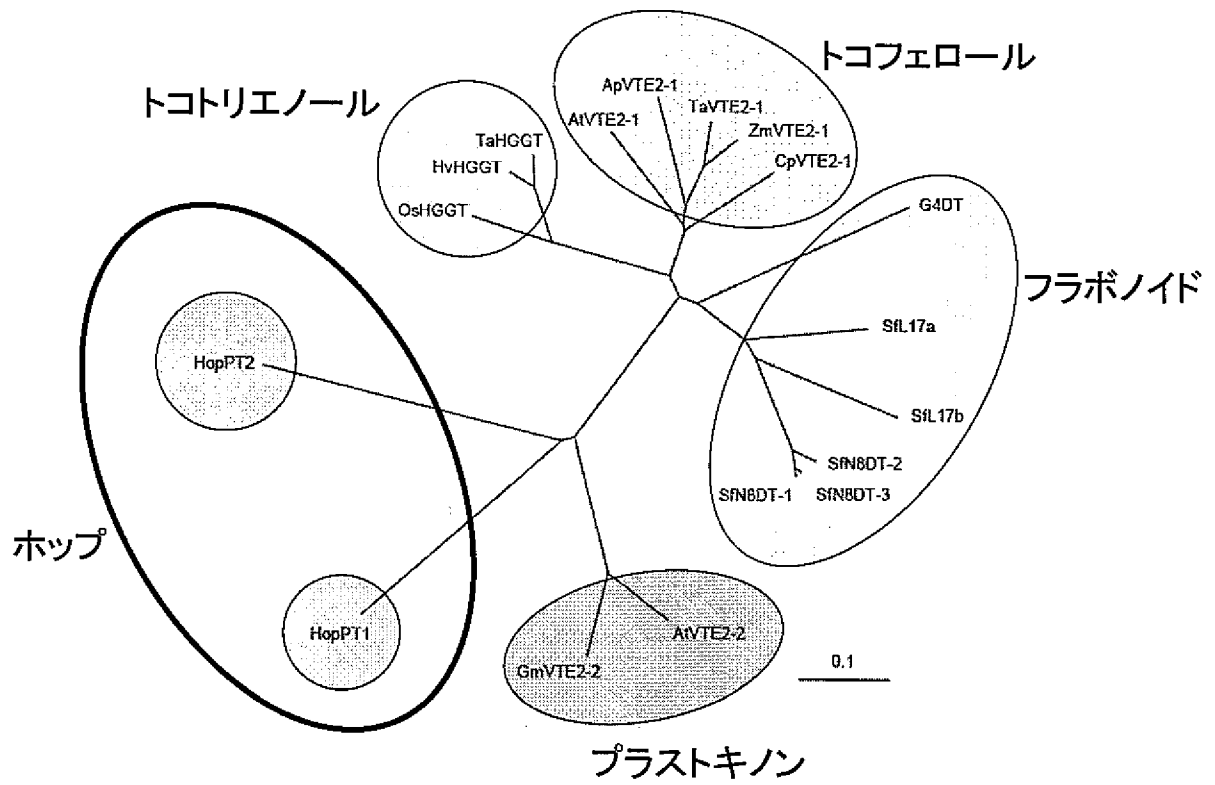
Score = 92.8 bits (229), Expect = 2e-17
Identities = 47/123 (38%), Positives = 73/123 (59%)
Frame = +2

Query: 320 SIFSCKDQRGNSIRASAIEDRPPESGNLSALTNVKDFVSVGCWEYVRPYTAKGVIICSSG 499
S F + R SIRA +Q+ + L + F + CW ++RP+I +G + S+
Sbjct: 56 SKFVSTNYRKISIRACSQVGAESDD---PVLDRIRFQACWRFLRPHTIRGTALGSTA 112

Query: 500 LFGRELLENPNLFSWPLIFRALLGMLAILGSCFYTAGINQIFDMDIDRINKPDLPLVSGR 679
L R L+EN +L W L+ +AL G+LA++ Y GINQI+D+ ID++NKP LP+ +G
Sbjct: 113 LVTRALIENTHLIKWSLVLKALSGLLALICGNGYIVGINQIYDIGIDKVNKPYLPAAAGD 172

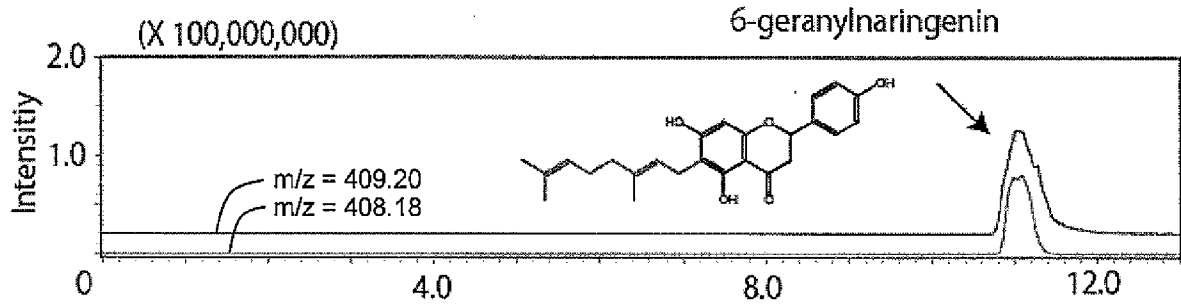
Query: 680 ISV 688
+SV
Sbjct: 173 LSV 175

[図3]

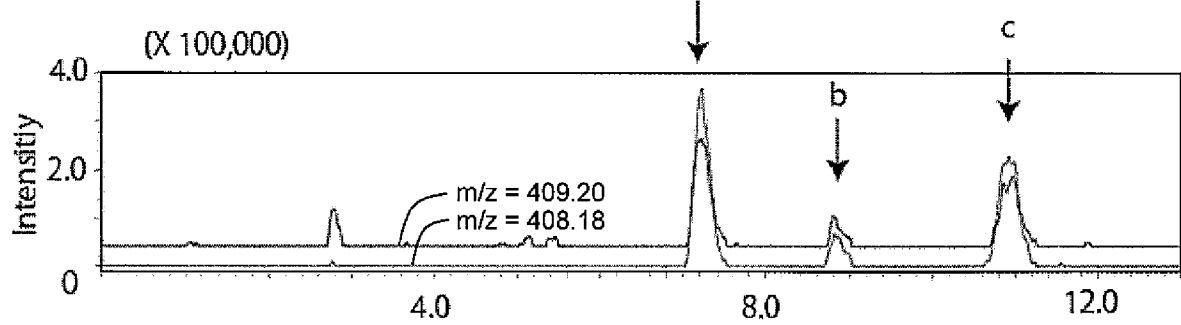


[図4]

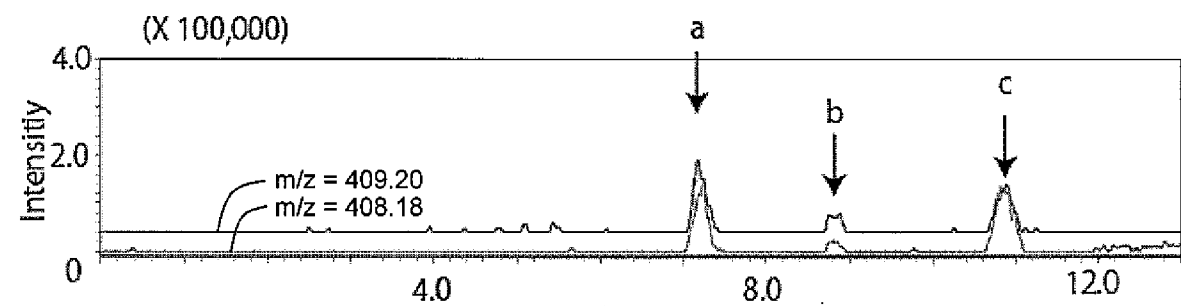
1. 標品 (6-geranylnaringenin)



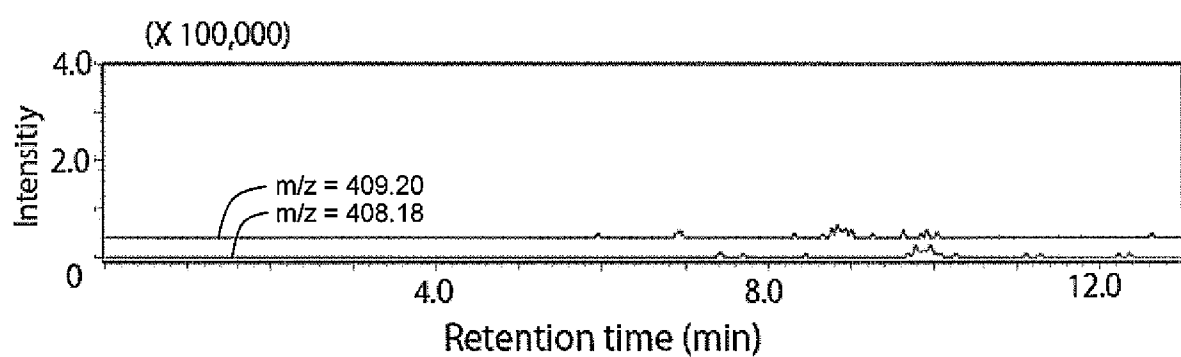
2. HIPT-1 組換え酵素



3. HIPT-2 組換え酵素



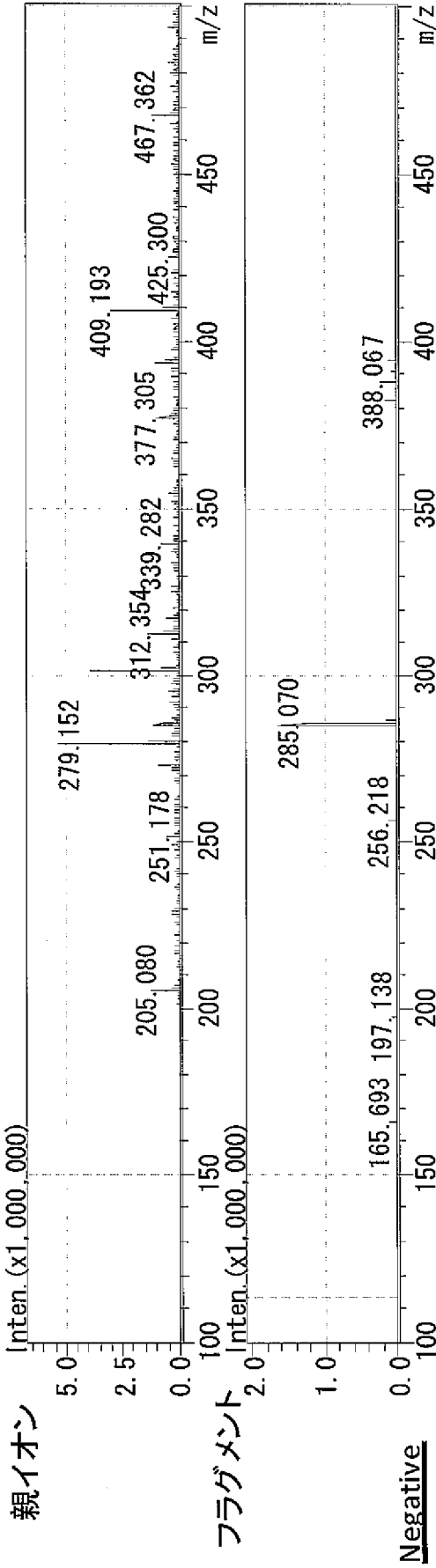
4. Vector control



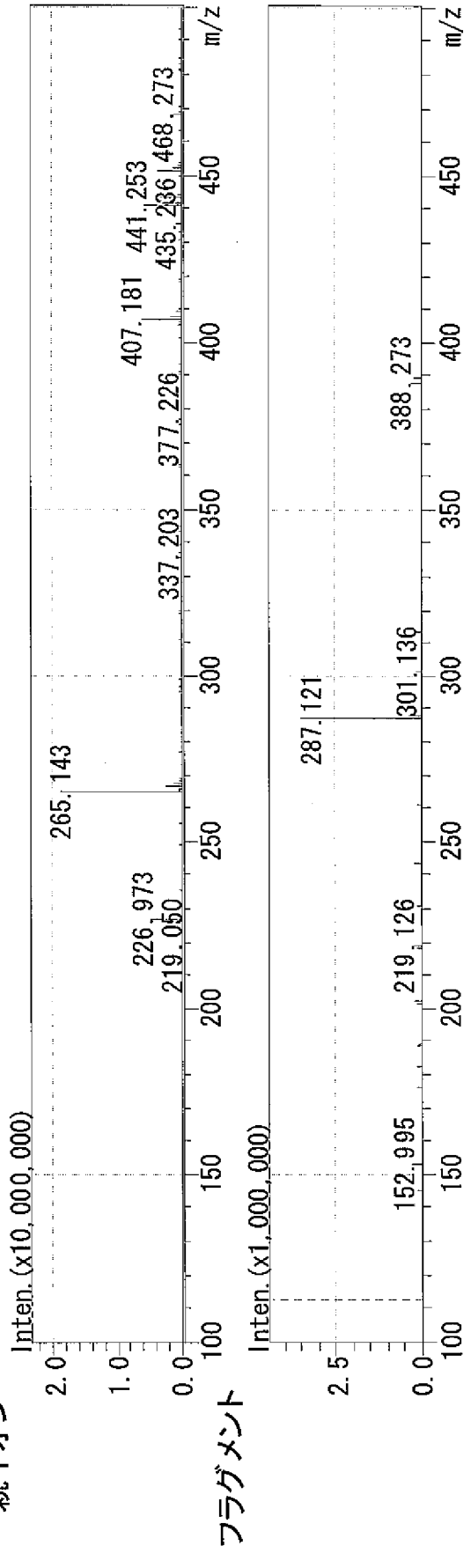
[5]

Rt = 54.23

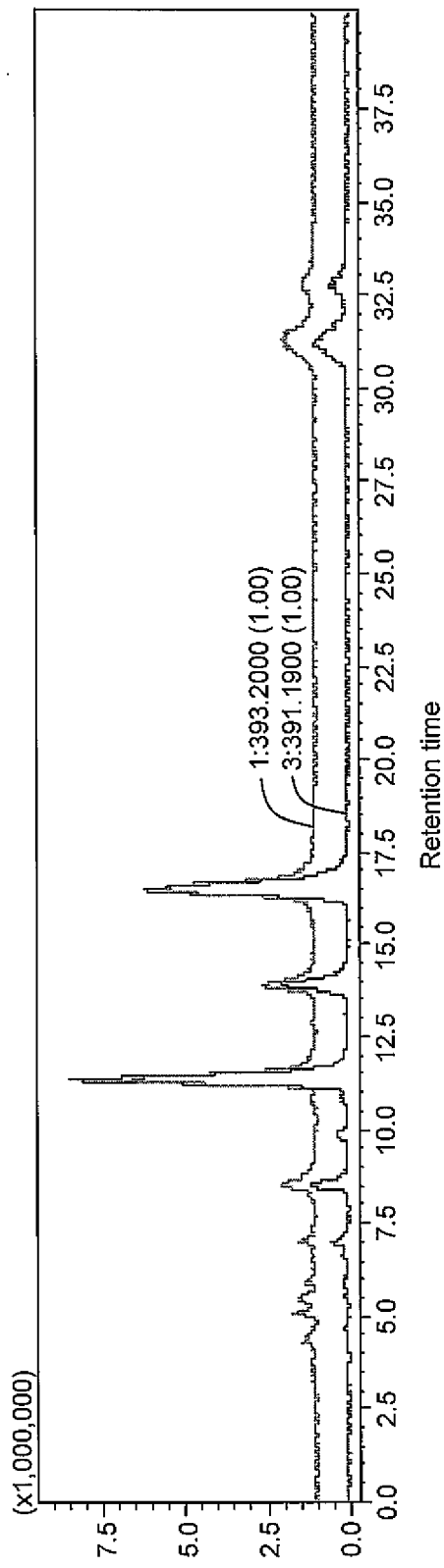
Positive



親イオン

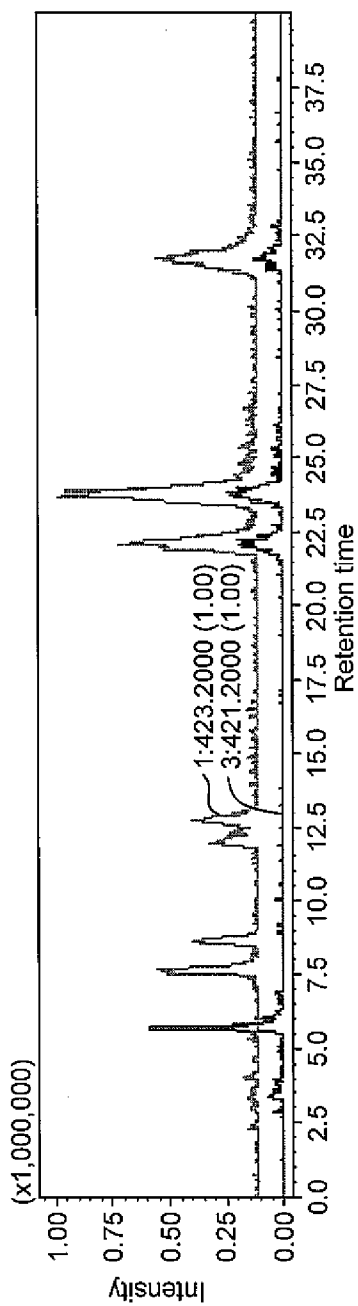


[6]

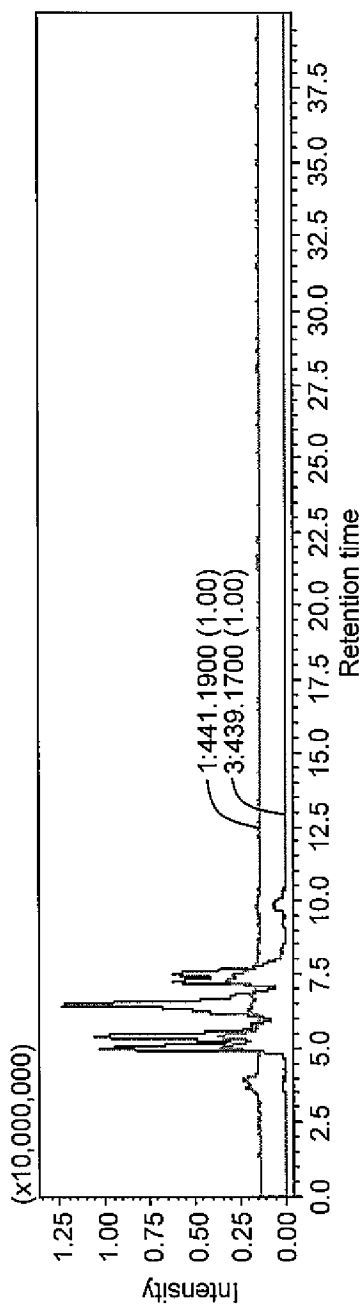


[7]

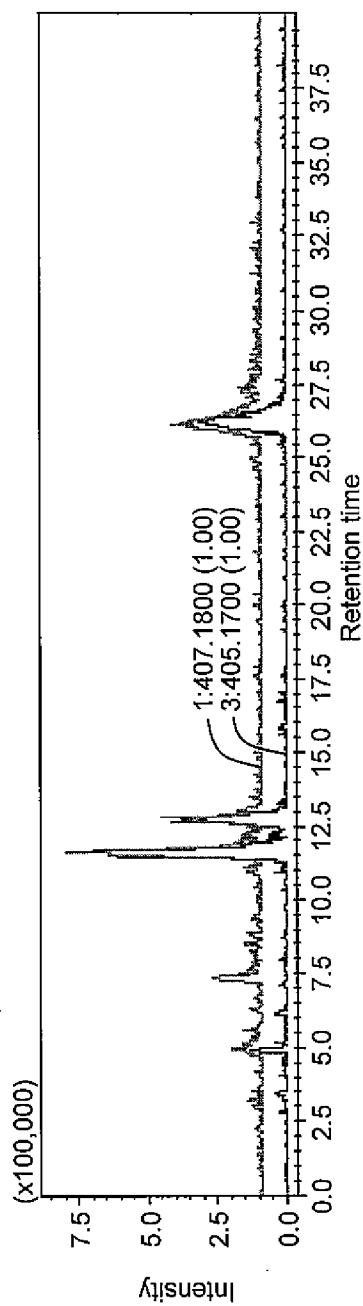
組換え酵素HIPT-1反応産物(Sakuranetin+GPP)



組換え酵素HIPT-1反応産物(Taxifolin+GPP)

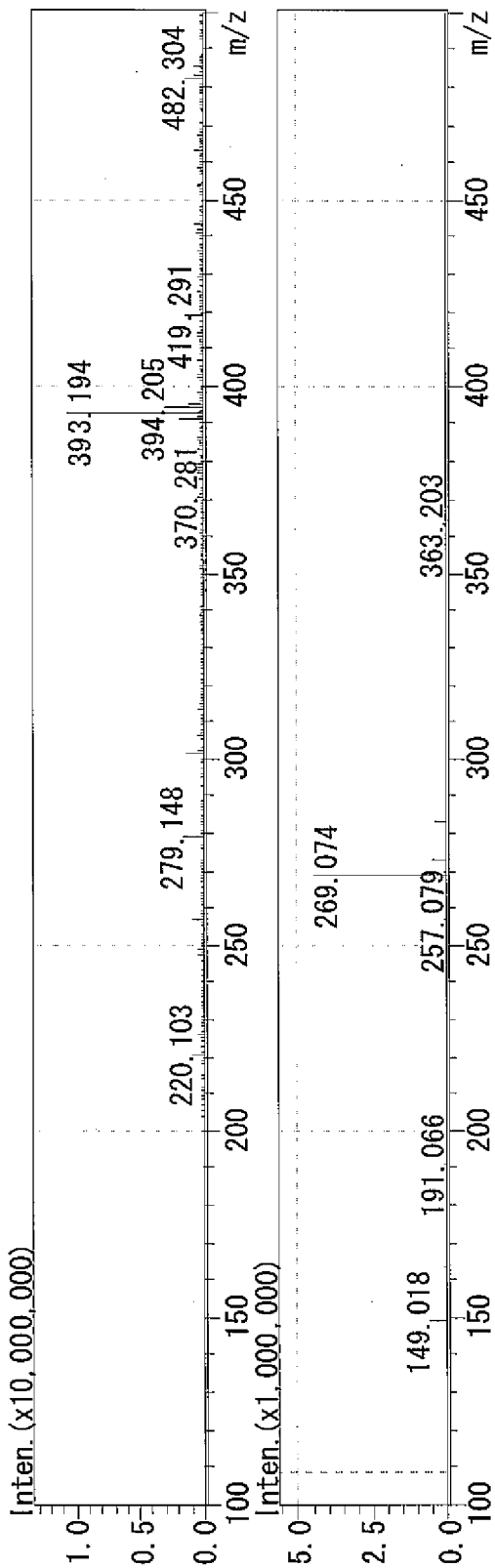


組換え酵素HIPT-1反応産物(Genistein+GPP)

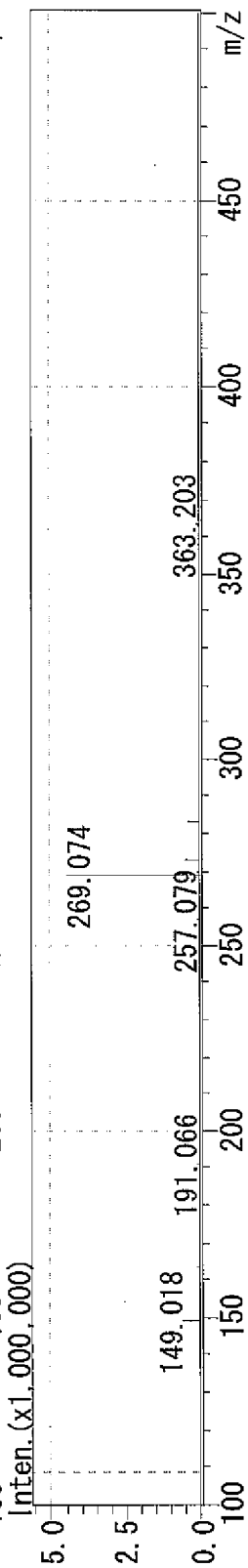


[8]

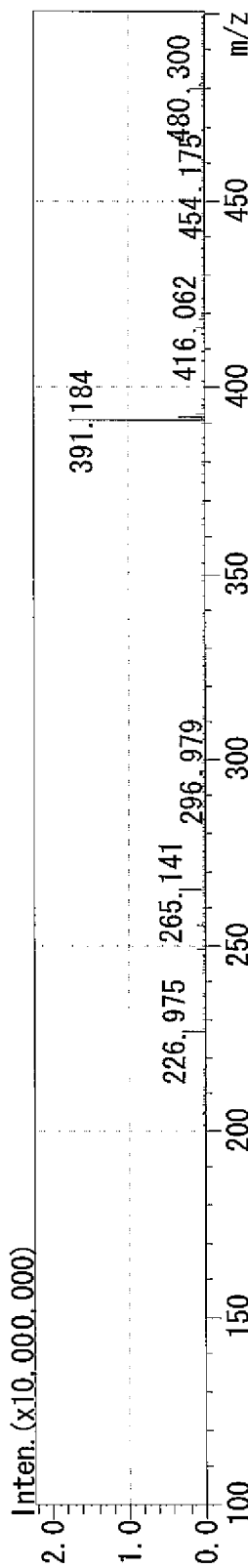
Positive



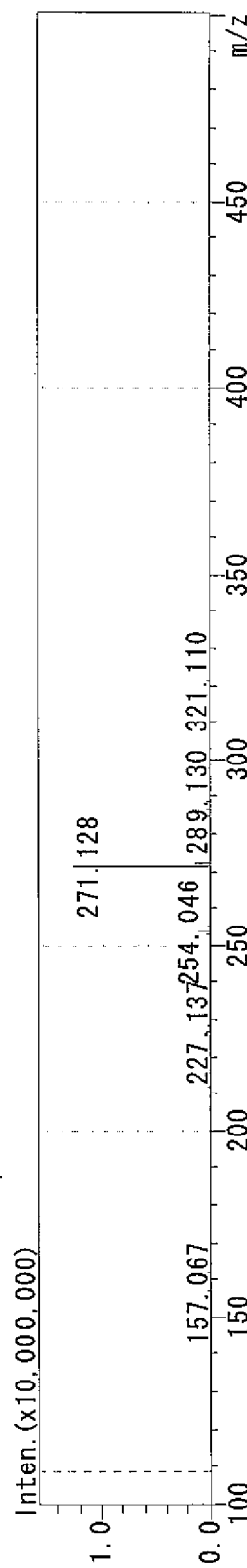
Fragment



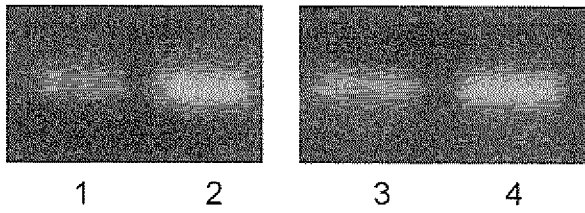
Negative



Fragment



[図9]



- 1:「キリン2号」HIPT1
- 2:「とよみどり」HIPT1
- 3:「キリン2号」HIPT2
- 4:「とよみどり」HIPT2

[図10A]

配列番号 1 1 : H1PT1 「キリン2号」ゲノム配列

7エクソン、6イントロン、下線=エクソン、ATG=開始コドン、TAA=終止コドン

GTTATTCTCTCTCTTTCCAGTTGAGATGGAGCTCTCATCAGCTTGTAATCTTTCACTTAAACCTAATTATTATTA
TTATGCCAACTTCATTATTCCCAAGTAATAATAGTTATAATAATCTCAAGGCCATCTTATTACCAAACACAGA
GACCTATCAAATGTTGTAGTTATTCTCCTTCAAAATATTGCTCCACCAAGAAGTTGCAGACAACACATCTACTTG
GGCTCTATGCAAAACACAAATGCTTGAAACCTTTTTCAATCGGTCATCTTCCAAGGCCAAATTCCTTACGGGCTT
GGTCTCATCAAAGTGAATTTCTAGTACAATAGTTACCAAAGGTTCAAATTTTGGACATGCTTCGTGGAAATTCG
TAAGGCCCATTCATTTGTAGCAGTATCTATCATATGCACTTCTTTGTTTGGAGCAGAGCTGTTAAAGAACCCAA
ATCTATTTAGCTGGCAATTGATGTTTGTATGCATTCCAAGGCTTAGTGGTTATATTACTATCCCATATTTACATAA
ATGGCCTCAATCAGATTTACGATTTGGAAAGTGACAGGATAAAACAAACCAGATTTACCACTAGCTGCAGAGGAAA
TGTCAGTTAAATCAGCTTGGTTCTTGACAATATTTAGTGCAGTAGCCAGCTTACTATTGATGATTAAGTTGAAGT
GTGGACTATTCCTTACTTGTATGTACTGTTGTTATCTTGTGATTGGGGCTATGTATTCTGTTCCTCCCTTTAGAT
GGAAGATGAATACTTTTACATCAACTCTCTGGAACCTTTTCGGTATGAAATGTTTTACTTTTTTCAATTTACAGACAT
TATAACACTTATACTTTAGCACCCCTTTAATGGGATTGATGTCATAATAAATTAATAATATGTCATGTATCAATAAT
GTTAGACACTTTAAGATCTCTTATACCAATGCTCATTCAATTTATCATTAACCCCAACTAATTAATTGTGTAATTC
TACTGCTTAATCTTATATATATTAATATATCTAGTTACCATACTGTATTTTTTTATTAATAAAAAAGTTATATTAT
CTATTTCTTATCATATACTGAAAAAATAACAGAAAAAATTTATATAATACACAGGAAATAGGTATCGGTATAA
ATTTTCTGATCAACTATGCTAGCAGAGCTACTCTTGGACTTCCATTTCAGTGGAGGTAGGTTCCAAATTTTCATA
ACATACCTCAAGTAAAGGAATGCAAAACAAACACTCTCTATCTTATCTTGTATGCCACATTTTTTCGAATAATTG
AGAATTTAATATATTAGATTATATTTTTGAAGTTATTTATTTTTAAATATTTCTTCTTGAATTATTGACATT
ATATAGTTTTACCTTTATTTAACATGACATGTCATCACCATTGTCGCTAAGCATGCCATGTAACCATTCATCTT
TTTTTTTTTTGAAGGAGAATTCCTTTTTGTCCTTTTCGTACATATATTTAAATGGTAAAACCTTACCCTAACATTTA
ACCAAAATTTATTTTTATTATCTTATATATTTATAAAAAAATATGTATTTAACGATTTTTGTTTGTTTAATAACC
CAAAATTTGAACAAAATATACTTTTTAAATCAATTAATAAATATTTATTGATTATATTAATAAATTTTTTAAAT
ATTATAATAATATTTAATACAAAACCTAGATATTTAATAATTATATCAATATAAATTCAAATGTTATAAAATATCA
TTATTATAAGGGTCATTTGGCAAAATGATCTATTTTTTGAAGTCATTTTGTACTCTAACCTAGTTTGGATAATTT
ATGATGTCGAAAACAAAGTTCAAATAGTTAGTTGCACACATATAAAAAATGACTCGTGCAACTAATTATTTGA
ACTATATTTTTAACACAGTACATTATTTTGAATTTCTGAAATCTAAACAGATATCTATTATAACTTCAATGTA
TACTGTCACGTAAGAATTTGGATTATAGTTTTTTCACATGGTAAAAATACATTTGTCCCCACCTGTAGAGACA
AAAATGGTATCTCTACCTAAAAAAGTACTATATATATATTAATATATATATGGATACATGAAAGCTCAAAAAAAA
AAAATTAATGTCCTATGAAATTAATTTTTATAACAATATCTAATAAATATTTATATATATAAATTTGACTCAGGC
CTCCATTTACTTTTCATCATTGGCTTTGTTTCAACTTTAAGTATTATCTTGAGCATCCTAAAAGATGTTCCCTGATG
TAGAAGGTGACAAGAAGTAAGTTTTTTTTTCCCTTTTCTTTTTAATGTATGCGATTATAAACAGTTCTAACTA
ATTAATAAAAAAACGCAATCATATATAAACAAAAATAATATTATCATCTTAATTTTCAGGGTTGGCATGTCAAC
GTTACCAGTAATATTTGGTGCTAGAACCATAGTATTAGTTGGTTCTGGATTTTTTCTCCTAAATTTAGTAGCTGC
TATTGGTGTGCCATTATGTGGCCTCAGGTACTCACCCTAAAAAATCAAATTAGCAATTTTTTAGTTGTATCAT
AAAATCTTTTGAATTAATGTCATTTATATTCGTGATAAAAAATTTTGTGCACTAAAAAAGTAATATTCAA
TCACAAATTTATTTTGTACACTTAAATTTTTGTAACATAATTTTTTTAGCCACAAAAACATTTTAGTAATAAT
AGATATATGTTAATATTTTTTATCACAATTTTTGTTTTGTTTTAATCACAATAACTTTGTTGTAATTAAGGTA
GAAAAATGATGATCGATCTTATAAAATAGTAGGAACAATATTAATAATATATACCTTCAAAACCTTAGTCTTTTC
AATTTCTTATCTACACAGGCTTTCAAGGGTACATAATGATTCCTGCTCATGCAATCTTTGCATCTGCCTTAATC
TTCAAGGTTTGTATATAAATCACAACATAATATTTCTTTATATAAAAAAATATATTGAGAACGAAATTTTTTTT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01) i, A01H1/00(2006.01) i, A01H5/00(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, C12Q1/68(2006.01) i</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) <i>C12N15/09, A01H1/00, A01H5/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12Q1/68</i> 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) <i>CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBDJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq,</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2009/114939 A1 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA), 24 September 2009 (24.09.2009), entire text (Family: none)	1-10,13
A	Yusuke TSURUMARU et al., "Hop Yurai no Flavonoid Prenyltransferase no Seikagakuteki Kaiseki", 26th Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology Osaka Taikai Symposium Koen Yoshishu, 2008, vol.26th, page 149	1-10,13
A	Sasaki K. et al., Cloning and Characterization of Naringenin 8-Prenyltransferase, a Flavonoid - Specific Prenyltransferase of Sophora flavescens., Plant Physiology, 2008, Vol.146, p.1075-1084	1-10,13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 17 August, 2010 (17.08.10)		Date of mailing of the international search report 31 August, 2010 (31.08.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060328

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 2008-220304 A (Kyoto University), 25 September 2008 (25.09.2008), entire text (Family: none)	1-10,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060328

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060328

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 11, 12, 14, 15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060328

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

[Claims 11, 12, 14, 15]

The plant body set forth in claims 11, 12, 14, 15 is specified by the method set forth in claim 9 or 13, and involves any plant bodies selected by said method.

However, plant bodies selected by said method are not at all concretely set forth in the description, and therefore, the above-said claims are lack in the support and also the disclosure by the description. Furthermore, even if common general technical knowledge is taken into consideration, it is unclear that what plant body is concretely involved and what plant body is not involved. In conclusion, the descriptions in the above-said claims are remarkably unclear.

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, A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(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, C12Q1/68(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, A01H1/00, A01H5/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12Q1/68

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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, 医学・薬学予稿集全文データベース

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
P X	WO 2009/114939 A1 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 2009.09.24, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 13
A	鶴丸優介他, ホップ由来のフラボノイド・プレニルトランスフェラーゼの生化学的解析, 第26回日本植物細胞分子生物学会大阪大会・シンポジウム講演要旨集, 2008, Vol.26th, p.149	1-10, 13

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 17.08.2010	国際調査報告の発送日 31.08.2010
--------------------------	--------------------------

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) 長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N	3 2 2 8
---	--	-----	---------

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	Sasaki K. et al., Cloning and Characterization of Naringenin 8-Prenyltransferase, a Flavonoid-Specific Prenyltransferase of <i>Sophora flavescens.</i> , Plant Physiology, 2008, Vol.146, p.1075-1084	1-10, 13
A	JP 2008-220304 A (国立大学法人京都大学) 2008.09.25, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 13

(第 II 欄 2. の続き)

【請求項 11、12、14、15】

請求項 11、12、14、15 の植物体は、請求項 9 又は請求項 13 の方法によって特定されており、当該方法によって選抜されるあらゆる植物体を包含するものである。

しかしながら、明細書には当該方法で選抜される植物体としての具体的なものが一切記載されていないから、上記請求項は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような植物体が包含され、どのような植物体が包含されないのかが不明であって、上記請求項の記載は著しく不明確である。

第 I 欄 ニュクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 提出時期
- 出願時の国際出願に含まれていたもの
- この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. 請求項 11, 12, 14, 15 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
(特別ページ参照。)
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。